

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

“ANÁLISIS SISTEMÁTICO DEL METILOMA DE CÉLULAS MDA-MB-231 DE
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO
CON RESVERATROL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

L.N RUBICELI MEDINA AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIO CÉSAR LÓPEZ CAMARILLO

MÉXICO D. F. AGOSTO 2012.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor investigador. Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer.

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTOR

Dr. Carlos Pérez Plasencia

Laboratorio de Investigación Biomédica en Cáncer

Instituto Nacional de Cancerología

ASESORAS

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Laboratorio de Oncología Experimental

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Profesora titular del Programa Institucional de Biomedicina Molecular

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía

Instituto Politécnico Nacional

Dra. Mavil López Casamichana

Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesora investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Mavil López Casamichana

Profesora investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Profesora Titular del Programa Institucional de Biomedicina Molecular

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

Instituto Politécnico Nacional

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Laboratorio de Oncología Experimental.

Instituto Nacional de Cancerología

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el respaldo académico otorgado al proyecto de investigación y el aporte económico para la impresión de esta tesis.

Agradezco al CONACyT la beca para estudios de maestría recibida durante el periodo Agosto 2010 a Julio 2012.

Esta tesis forma parte del proyecto SALUD-2009-01-115306, "Perfiles de Expresión Genómica de MicroRNAs en Biopsias de Tumores de Cáncer de Mama Esporádico en Población Mexicana."Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradezco también el apoyo fundamental de mis tutores para el desarrollo del trabajo experimental realizado en el Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del cáncer del Posgrado en Ciencias Genómicas bajo la tutoría del Dr. César López Camarillo; y en el Laboratorio de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan) bajo la tutoría del Dr. Carlos Pérez Plasencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César López Camarillo por brindarme un espacio en su grupo de trabajo, por entender los tropiezos y proporcionarme las herramientas necesarias para concretar exitosamente cada experimento. Por sus exigencias que lograron hacerme crecer profesionalmente.

Al Dr. Carlos Pérez Plasencia por su valiosa asesoría, tiempo y profesionalismo. A su equipo de trabajo, por todas las facilidades otorgadas para las labores experimentales.

A la Dra. Elena Aréchaga Ocampo agradezco el gran soporte académico, las instrucciones y sugerencias que hicieron posible avanzar a tiempo cada objetivo.

A la Dra. Laurence Annie Marchat por su interés y los comentarios que enriquecieron este trabajo en cada evaluación.

A la Dra. Mavil López Casamichana y la Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez por todo el apoyo, tiempo dedicado a la lectura de esta tesis y las importantes observaciones.

A los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas por sus aportaciones.

Gracias Olga Hernández y Alí Flores por ser mis maestros. A Itzel López, Miguel Angel Fonseca, Lidia López, Marcos Muñiz agradezco su amistad y apoyo incondicional.

A mis compañeras de generación, Zelene Vázquez, Lidia López, Alín Acuña, Ma. Elena Romero, Carla Orozco y Fernanda de la Cueva por la camaradería que nos hizo cómplices para terminar la maestría. A mis amigos Alma Villalobos, José Luis Villalpando, Miguel Angel del Moral, Daniel Ortega y Helios Cárdenas por su agradable compañía durante las jornadas largas.

Dedicatorias

A mis padres Sonia Aguilar y Adán Medina por crear los pilares que sostienen esta torre de sueños, por ser mi ejemplo de trabajo y honor.

A mi valiente hermana con admiración por su lucha interminable buscando caminos que otros puedan recorrer para conseguir su libertad.

A mis amados y siempre recordados abuelos.

A mi gente de tierra caliente por enseñarme el valor de las oportunidades.

A Pablo Anduaga por acompañarme amorosamente y sin ataduras.

A las mujeres con cáncer de mama que no han perdido la esperanza.

A mis maestros.

Una voz me dijo un día:

¡Ten cuidado con lo que sueñas, se puede convertir en realidad!

Así comenzó este trabajo, soñando.

INDICE

Página

ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

I. INTRODUCCION

1. Antecedentes generales del tema

1.1 Carcinogénesis.....1

1.2 Cáncer de mama.....4

1.3 Morbilidad y mortalidad del cáncer de mama.....5

1.4 Cáncer de mama triple negativo.....9

2. Estado del arte

2.1 Fitoquímicos en el tratamiento del cáncer.....11

2.2 Epigenética y cáncer.....12

3. Antecedentes particulares del proyecto

3.1 El papel de la dieta en el cáncer.....14

3.2 El resveratrol.....18

3.3 Propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas del resveratrol.....19

3.4 Metilación del DNA y cáncer.....22

3.5 Herramientas de análisis de los perfiles globales de metilación.....27

3.6 Microarreglos de metilación del DNA.....28

4. Importancia de continuar el estudio.....31

II. OBJETIVOS

1.1	Objetivo general.....	32
1.2	Objetivos particulares.....	32

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....33

IV. METODOLOGÍA

4.1	Línea celular, reactivos y condiciones de tratamiento.....	35
4.2	Análisis de viabilidad por MTT.	35
4.3	Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo.	36
4.4	Análisis de apoptosis por TUNEL.....	39
4.5	Inmunofluorescencia indirecta con anti-5-metil-citosina.....	40
4.6	Protocolo aPRIMES.....	41

V. RESULTADOS

5.1	Viabilidad de las células MDA-MB-231.....	51
5.2	Efecto del resveratrol en la apoptosis de células MDA-MB-231.....	53
5.2	Apoptosis detectada por ensayo de TUNEL.	
5.3	Cambios en la metilación global del ADN de células MDA-MB-231.....	59
5.3.1	Efectos del resveratrol en la metilación detectada por anti-5-metil-citosina	
5.3.2	Patrón de metilación obtenido por el microarreglo de metilación.....	64
5.3.3	Genes modulados a nivel epigenético y rutas celulares involucradas...	76
5.3.4	Señalización Notch y su importancia en cáncer de mama.....	80.

VI. DISCUSIÓN.....	85
VII. CONCLUSIONES.....	90
ANEXO.....	91
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	124

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Anti 5-mc: Anticuerpo anti 5- metil-citosina.

CpGs: Dinucleótidos citosina-guanina enlazados por un fosfato.

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting (citómetro de flujo).

Her2: Human epidermal receptor 2.

TN: Triple negativo

MTT: Sal de tetrazolio : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide.

PCR: Reacción n cadena de la Polimerasa.

RE: Receptores de estrógenos.

RP: receptores de progesterona.

RSV: trans-3,4',-5-trihydroxystilbene.

SAM: S-Adenosilmetionina (donador universal de grupos metilo)

BRCA1: Breast cancer tipo 1.

BRCA2: Breast cancer tipo 2.

MSP: Methil Sensitive Array.

MeDIP: Methylated DNA immunoprecipitation.

DMH: Differential Methylation Hybridization.

MAS: Maskless Array Synthesis.

aPRIMES: Array-based profiling of reference-independent methylation status.

DL50: Dosis letal media.

TUNEL: Deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole.

Cy3: Cyanine Dye 3.

CY5: Cyanine Dye 5.

DTT: Ditionitrosol

anti-BrdU: anti-5-Bromodeoxyuridine (BrdU).

FITC: Fluorescein isothiocyanate.

MseI: Endonucleasa de restricción convencional en 5'...T^AT A A...3'

3'...A A T^AT...5'.

T4 DNA ligase: Ligasa del DNA que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre 5'-fosfato y 3'-hidroxilo terminal.

Acil: Enzima de restricción que tiene un sitio de reconocimiento no palindrómico.

HinP1I: Endonucleasa de restricción que produce una extensión del extremo 5' cuando HhaI produce extensión del extremo 3'.

HpaII: Endonucleasa de restricción, isoisómero de MspI.

McrBc: Enzima de restricción dependiente de metilación.

µg: Microgramos

µl: Microlitros

µM: Micromolar

M: Molar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo general de la carcinogénesis.

Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria

Figura 3. Incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer de mama en México.

Figura 4. Mecanismos epigenéticos involucrados en la carcinogénesis.

Figura 5. Mecanismos genotóxicos y no genotóxicos producidos por la dieta y su relación con el cáncer.

Figura 6. Estructura química del resveratrol.

Figura 7. Mecanismos celulares responsables de las propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas del resveratrol.

Figura 8. Patrones de metilación del DNA y de configuración de la cromatina en células normales y tumorales.

Figura 9. Sondas de oligonucleótidos del ADN que contiene un microarreglo NimbleGen 3x720K (más de 100 bases).

Figura 10. Sistema MAS (maskless array síntesis) empleado en la manufactura del microarreglo de metilación 3x720K NimbleGen.

Figura 11. Diagrama de flujo de la estrategia experimental realizada para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo.

Figura 12. Diagrama de flujo para la obtención del patrón de metilación de células MDA-MB-231 mediante protocolo para identificación de fracciones diferencialmente metiladas (aPRIMES).

Figura 13. Viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de resveratrol.

Figura 14. Células MDA-MB-231 teñidas con anexina V-ioduro de propidio para detectar apoptosis mediante citometría de flujo.

Figura 15. Apoptosis detectada por citometría de flujo a las 24 y 48 horas de tratamiento con resveratrol (100 μ M).

Figura 16. Imágenes de microscopía confocal resultantes del ensayo de TUNEL en células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol (100 μ M) por 24 h.

Figura 17. Imágenes de microscopía confocal resultantes del ensayo de TUNEL en células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol (100 μ M) por 48 h.

Figura 18. Imágenes de microscopía confocal que muestran la señal de metil-citosinas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231 sin tratamiento.

Figura 19. Imágenes de microscopía confocal que muestran la señal de metil-citosinas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231 posterior al tratamiento con resveratrol (100 μ M) por 24 y 48 h.

Figura 20. Imágenes de microscopía confocal que muestran la concentración de metil-citosinas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231 posterior al tratamiento con EGCG (50 μ M) por 24 y 48 h.

Figura 21. Gel de agarosa al 1.2% que muestra integridad del DNA teñido con BrEt de células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con resveratrol (100 μ M) durante 24 y 48 h.

Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% que muestra el tamaño de los fragmentos de DNA resultantes de la digestión con MseI y ligación con DNA T4 ligasa.

Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% que muestra el resultado de la segunda digestión enzimática para obtener las fracciones genómicas metiladas y no-metiladas.

Figura 24. Imágenes del microarreglo de metilación del microarreglo 3x720K obtenidas del escaneo con MS200 de Roche NimbleGen.

Figura 25. Flujo de trabajo de metilación del DNA para el análisis de imágenes y la obtención de datos del microarreglo mediante DEVA software.

Figura 26. Mapa de anotación que resulta del análisis de metilación por DEVA software.

Figura 27. Efecto del resveratrol en la inactivación de NOTCH2 en las células de cáncer.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo para cáncer de mama en mujeres.

Tabla 2. Algunos fitoquímicos con propiedades anti-carcinógenas presentes en los alimentos.

Tabla 3. Componentes bioactivos presentes en alimentos, estructura molecular y blancos epigenéticos.

Tabla 4. Blancos moleculares y efectos celulares del resveratrol en diversas líneas celulares de cáncer.

Tabla 5. Valores de la concentración y absorbancia de las fracciones genómicas metiladas y no-metiladas obtenidas de la segunda digestión enzimática.

Tabla 6. Valores reportados en el archivo experimental metrics. txt del plan de hibridación generados por el software DEVA de Roche NimbleGen.

Tabla 7. Resultados del análisis de metilación por DEVA software.

Tabla 8. Total de transcritos primarios hipermetilados, metilados, desmetilados e hipometilados de células MDA-MB-231 por efecto del tratamiento con resveratrol 100 μ M durante 24 y 48 horas.

Tabla 9. Transcritos de las células MDA-MB-231 sin tratamiento que cambiaron su estatus de metilación en respuesta al tratamiento con resveratrol (100 μ M) a las 24 y 48 horas.

RESUMEN.

Los alimentos nos ofrecen una gran cantidad de poderosos fitoquímicos capaces de arrestar o revertir la progresión del cáncer. Uno de ellos es el resveratrol que encontramos en las uvas, los frutos rojos, los cacahuates, algunas plantas y en el vino tinto. Este polifenol tiene un alto potencial quimiopreventivo y quimioterapéutico, existen abundantes evidencias de su capacidad para inducir la apoptosis de las células tumorales, inhibir su proliferación, la invasión a otros tejidos y prevenir daño oxidativo de células sanas. Aún falta mucho por conocer acerca de las posibilidades terapéuticas que este agente natural tiene sobre las alteraciones epigenéticas que conducen al cáncer. Dada la importancia de los factores epigenéticos en el control de la expresión génica, este trabajo evaluó el efecto del resveratrol sobre el estado de metilación de células de cáncer de mama del tipo triple negativo mediante inmunofluorescencia indirecta con anti-5-metilcitosina y un microarreglo de metilación 3x720K NimbleGen. El análisis del metiloma de células MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con resveratrol es una herramienta molecular que nos permitió evidenciar cambios globales en la metilación de genes relevantes en el desarrollo y progresión del cáncer, de tal manera que se pudieron explicar en parte las propiedades quimioterapéuticas y quimiopreventivas de este agente natural en cáncer y definir nuevos blancos terapéuticos. Los resultados mostraron que el resveratrol es capaz de regular la expresión génica a nivel epigenético cambiando el estado de la metilación de cientos de genes entre los que se encuentran NOTCH2, plasminógeno (PLG), factor de complemento H (CFH), suero amiloide A2 (SAA2), ADAM metalopeptidasa 6 (ADAM6), gonadotropina coriónica (CGB7), sirtuina 7 (SIRT7), entre otros que participan en señalización celular y del sistema inmune, la comunicación intercelular, el mantenimiento de la integridad cromosómica, la apoptosis, en mecanismos de invasión y proliferación celular y en general, en la iniciación, promoción y progresión de células tumorales. El empleo de fitoquímicos como el resveratrol en la terapia de las pacientes con cáncer de mama triple negativo, para el que no hay un tratamiento específico ni eficaz, amplía las posibilidades para mejorar su calidad de vida.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Antecedentes generales del tema

1.1 Carcinogénesis

Actualmente se sabe que el desarrollo y la progresión de un cáncer desde la lesión preneoplásica hasta el tumor con capacidad de invasión y metástasis, abarcan una cadena de eventos complejos y sucesivos. Éstos consisten en diversos episodios de expansión clonal de las células somáticas, que pueden ocurrir a lo largo de décadas, y durante los cuales el genoma de la célula incipientemente cancerosa adquiere ventajas de crecimiento debido a la aparición de alelos mutantes de oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes que controlan en forma directa o indirecta la proliferación y la muerte celular. Para transformarse en cancerosa, una célula debe acumular al menos cinco o seis de esas mutaciones. Las mutaciones y la inestabilidad genética son responsables de las características biológicas de la progresión tumoral (1). La transformación de una célula normal en tumoral, conlleva una pérdida del control de la proliferación. Es decir, si las células pierden la capacidad de responder a factores inhibidores del crecimiento, se genera como consecuencia la acumulación progresiva de defectos en el genoma, que contribuyen, en su conjunto, a la generación y progresión tumoral. La gran mayoría de los tipos tumorales presenta una enorme variedad de funciones génicas alteradas, incluyendo la activación de genes promotores del crecimiento, así como el silenciamiento de genes con funciones supresoras del mismo. Todas estas alteraciones colaboran en el desencadenamiento de un crecimiento celular descontrolado (**figura 1**).

Las células disponen de mecanismos de control o “checkpoints” que actúan controlando la normalidad de la progresión del ciclo celular. Cuando estos sistemas de control detectan alguna anomalía detienen el ciclo activando mecanismos de reparación, en el caso de no poder resolver cualquier alteración de la homeostasia celular, ataque contra la integridad celular, etc., desencadenan la muerte celular programada o apoptosis (2). Por tanto, la pérdida de control de la proliferación en combinación con la falta de funcionalidad de los “checkpoints”, permite que las células adquieran la capacidad de formar tumores. El ADN genómico contiene la información genética de la célula, dictada por el orden secuencial de las cuatro bases: adenina, guanina, citosina y timina. Las alteraciones de la secuencia original y la modificación de las bases nitrogenadas, contribuyen a la definición de los patrones de expresión génica. La regulación anormal de la proliferación en las células cancerosas se origina por la acumulación de mutaciones en genes clave que inducen o inhiben diferenciación, senescencia o muerte celular (3). La carcinogénesis es un proceso a través del cual una célula evade los mecanismos de control de crecimiento normales y se divide de forma acelerada. Estas células adquieren capacidad invasiva (proceso conocido como metástasis) que les permite colonizar y proliferar en otros tejidos dañándolos y provocando tumores (4). Así, la carcinogénesis puede surgir como resultado de alteraciones químicas o biológicas que ocurren en células normales en un proceso de pasos múltiples que involucra inicialmente cambios a nivel genético, seguido por la promoción y la progresión que finalmente produce tumores malignos.

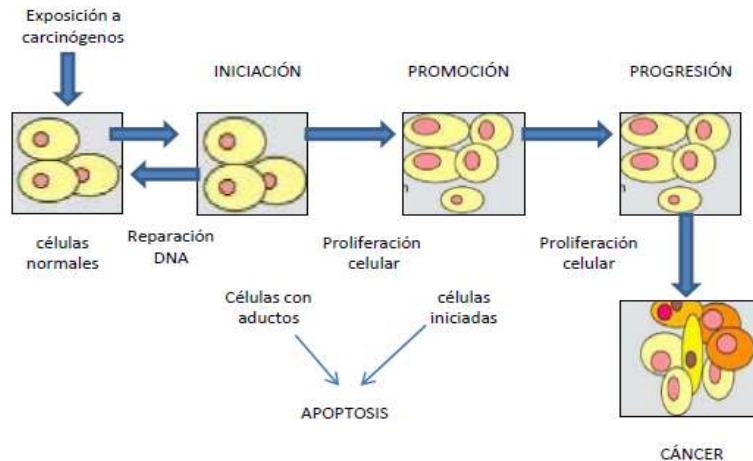


Figura 1. Mecanismo general de la carcinogénesis. La primera etapa de la carcinogénesis se denomina iniciación. En este proceso, las células normales (no tumorales) sufren daño en el ADN al estar expuestas constantemente a agentes carcinógenos (sustancias químicas, la radiación o algunos virus). La lesión genética inicial puede producirse en cualquier lugar del genoma. Sin embargo, existen dianas principales sobre las que recaen las mutaciones, que son diferentes clases de genes reguladores normales: oncogenes, genes supresores de tumores, genes que regulan la apoptosis y genes de reparación del ADN dañado. La pérdida de funcionalidad de alguno de estos genes lleva a la proliferación descontrolada, provocando de esta manera la aparición del cáncer. Esta etapa, a partir de la primera célula dañada que se replica sin control, se denomina promoción. La siguiente etapa se conoce como transformación e implica el paso de la progenie celular hacia un fenotipo maligno. La multiplicación de estas células, con la consecuente formación de la masa tumoral se denomina progresión. Tomada y modificada de Ma X, Yu H. Global burden of cancer. Yale J Biol Med.2006; 79(3-4):85–94.

1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea causada por la interacción entre factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que producen degeneración celular, dando paso a lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos en los tejidos de la mama. La glándula mamaria se está formada por los alvéolos, cúmulos de células donde se produce la leche, los lobulillos, grupos de 10 a 100 alvéolos aglutinados alrededor de un conducto, son los encargados de expulsar la leche, la cual desemboca en los conductos galactóforos. Éstos al llegar a la base del pezón forman los senos lactíferos, que se constituyen en depósitos de la leche en el amamantamiento. En la parte más sobresaliente de la mama se localiza un área de hiperpigmentación cutánea denominada aréola, en cuyo centro se encuentra una prominencia eréctil, el pezón donde desembocan los conductos galactóforos en orificios independientes (**figura 2**).

El cáncer de mama se detecta principalmente por mastografías de escrutinio, estas indican que del 15 al 30% de las neoplasias malignas de mama corresponden a carcinomas *in situ* y el resto a carcinomas infiltrantes (6). Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares. Los carcinomas ductales infiltrantes pueden ser de tipo tubular/cribiforme, coloides, medulares o papilares. Una célula cancerosa de mama generalmente se duplica cada 100-300 días. Una neoplasia de mama de 1 cm realiza cerca de 30 duplicaciones antes de alcanzar este tamaño, por lo que este cáncer tiene como mínimo unos 7 años de evolución. La evidencia disponible indica que el cáncer de mama tiene una relación causal con el estado hormonal. El periodo de exposición a estrógenos es un factor crítico por lo que una menarca temprana y menopausia

tardía se asocian a carcinogénesis en mama. Por otro lado, la nuliparidad y los embarazos en edad avanzada aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. La historia familiar, mutaciones genéticas BRCA1 y BRCA2 (en aproximadamente una de cada mil mujeres), polimorfismos genéticos asociados a la síntesis de estrógenos y su metabolismo, determinan la prevalencia de cáncer mamario en una población. Aunque se debe considerar que en el 85% de los casos de cáncer de mama no hay evidencia de historia familiar, cuando esta se presenta, el riesgo para la mujer con antecedentes familiares (madre, hermana, hija) es 2-3 veces mayor que en la población sin antecedentes familiares (**tabla 1**).

1.3 Morbilidad y mortalidad del cáncer de mama

El cáncer de mama es actualmente el tipo de cáncer más frecuente y el de mayor mortalidad entre las mujeres del mundo (7). El número de fallecimientos por esta causa se ha duplicado en 22 años, y afecta tanto a los países industrializados como a los menos desarrollados. El cáncer de mama es actualmente un problema de salud pública debido al incremento gradual de casos que se presentan cada año, así como al costo de su tratamiento. Los datos más recientes disponibles muestran una incidencia de cáncer de mama en nuestro país de 7.57 casos por cada 100 mil habitantes, el cáncer de mama ocasiona el 17.3% de las muertes (**figura 3**). En la mayoría de los casos detectados, los tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis) ocasionando aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año (8).

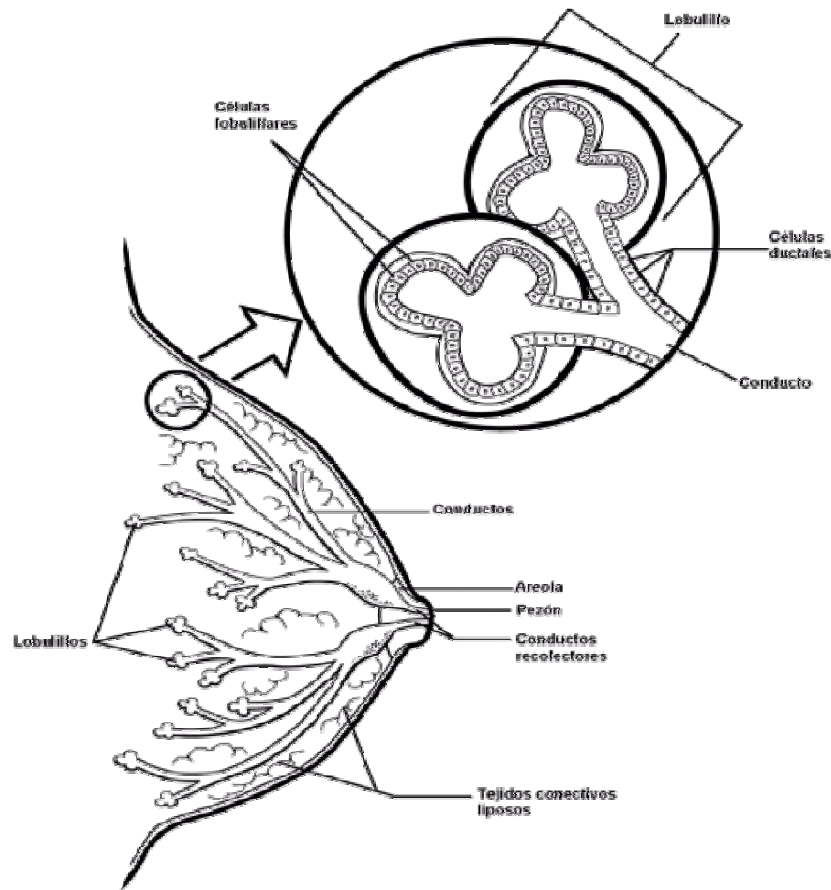


Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria. El seno femenino consiste principalmente en **lobulillos** (glándulas productoras de leche), **conductos** (tubos diminutos que llevan la leche desde los lobulillos al pezón) y **estroma** (el tejido adiposo y el tejido conectivo que rodean los conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos). La mayoría de los cánceres de seno comienzan en las células que recubren los conductos (*cánceres **ductales***). Algunos cánceres de seno se originan en las células que recubren los lobulillos (*cánceres **lobulillares***), mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos.

Factor	Riesgo	Grupo de alto riesgo
Edad	>10	Mayores edades
Localización geográfica	5	Países desarrollados
Edad de la menarca	3	Menarca antes de 11 años
Edad de la menopausia	2	Menopausia después de 54 años
Edad de primer embarazo a término	3	Primer hijo después de los 35 años
Historia familiar	≥2	Cáncer de mama antes de la menopausia en familiar de 1er. grado
Antecedentes de enfermedades benignas	4-5	Hiperplasia atípica
Cáncer en la otra mama	>4	
Grupo socio-económico	2	Grupos I y II (altos)
Dieta	1,5	Alta ingesta de grasas saturadas
Peso corporal:		
Premenopáusica	0.7	Índice de masa corporal >35
Postmenopáusica	2	Índice de masa corporal >35
Consumo de Alcohol	1.3	Ingesta excesiva
Exposición a radiación ionizante	3	Exposición anormal en mujeres adolescentes
Ingesta de hormonas:		
Contraceptivos Orales	1.24	Uso frecuente
Terapia hormonal de reemplazo	1.35	Uso por más de 10 años
Diethylstilbestrol	2	Uso durante el embarazo

Tabla 1. Factores de riesgo para cáncer de mama en mujeres. En la primera columna de la tabla, se muestran los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de mama en mujeres. En la columna central, se indica el número de veces que se incrementa la posibilidad de padecer esta enfermedad, si se tiene alguno (s) de los factores de riesgo atribuidos. En la última columna se incluyen las características de las mujeres con alto riesgo. Tomada y modificada de McPherson K, Steel CM and Dixon JM, Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics.BMJ 2000; 321:624-628.

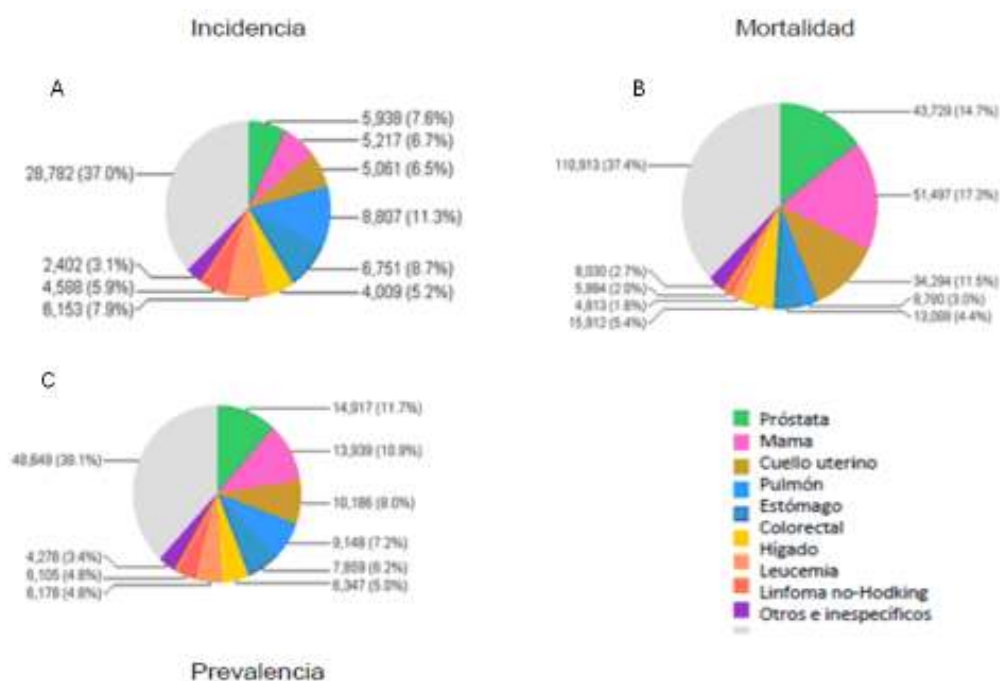


Figura 3. Incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer de mama en México.

(A) La incidencia del cáncer de mama en nuestro país (6.7%) es más alta que la del cáncer cérvico uterino (6.5%). B) De las muertes por cáncer registradas, el cáncer de mama es la principal causa de muerte de mujeres en México (17.3%). C) La prevalencia de esta enfermedad en la población femenina es del 10.9%. Imagen tomada de <http://www.who.int/topics/cancer/index1.html>.

1.4 Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama comprende un heterogéneo grupo de enfermedades que varían en morfología, biología, comportamiento y respuesta a la terapia. Los tumores aunque aparentemente sean de morfología homogénea, tienen características biológicas que afectan la respuesta al tratamiento y los perfiles genéticos de cáncer de mama. Esta heterogeneidad ha hecho necesaria la identificación de los tumores mediante su agrupamiento en diferentes clases, que varían tanto por las características biológicas del tumor, como por la respuesta a tratamientos específicos. Con este fin, en el manejo clínico de rutina del cáncer de mama se utilizan marcadores moleculares con valor predictivo y pronóstico que incluyen receptores hormonales HR (receptores estrogénicos (ER) y receptores de progesterona (PR)), y los receptores del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Los tumores del tipo triple negativo no expresan receptores hormonales (ER y PR) ni HER2, alcanzan gran tamaño, producen metástasis e invaden ganglios linfáticos con mayor facilidad. Generalmente se presentan en pacientes jóvenes. Se calcula que del 10 al 16% de los casos diagnosticados con cáncer de mama son del tipo triple negativo. Se estima que un millón de casos de cáncer de mama se diagnostican cada año en el mundo, de estos, más de 170,000 son descritos como triple negativo (9). Este tipo de tumores constituyen del alrededor del 15% de los casos reportados en México. Este tipo de cáncer tiene una historia clínica agresiva, la quimioterapia ha sido el tratamiento de elección, con un pobre pronóstico y sin blancos terapéuticos conocidos. Los tumores pueden ser identificados por un análisis de tinción inmunohistoquímica, principalmente en base a la ausencia de expresión de los receptores hormonales, tanto del receptor

de estrógenos (ER) como del receptor de progesterona (PR) y la negatividad a la sobreexpresión de la proteína HER2 (10). Sin embargo, dada la heterogeneidad de los tumores, se ha hecho necesario evaluar sus características a nivel molecular mediante el análisis de expresión de genes por medio de microarreglos. Este análisis ha permitido diferenciar entre dos subtipos de tumores que tienen el fenotipo de triple negatividad (no expresan ER, PR, HER2). Se distinguen tumores del sub tipo “normal like” y “basal like” de acuerdo a su expresión de citoqueratinas (CK 5/6/14/17) vimentina, p-caderina, aB cristalina, caveolinas 1 y 2, un alto índice de proliferación y la presencia o ausencia del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Tanto las citoqueratinas como el EGFR son marcadores asociados al pobre pronóstico que caracteriza a este tipo de cáncer. Se ha estimado que el 91 % de los tumores triple negativo pertenecen al subtipo “basal like” (expresan CK 5/6/14/17 y EGFR) y solo el 9% al fenotipo “normal like” (expresan CK 5/6/14/17 pero no EGFR) (11). Es necesario aclarar que los términos “basal like” y cáncer de mama triple negativo no son sinónimos aunque ambos subtipos se caracterizan por la falta de expresión de ER, PR, HER-2. Por ejemplo, de 15 a 45% de los cánceres de mama *basal like* expresan bajos niveles de ER2, 14% expresan HER-2. En cambio, de 16 a 44% de los cánceres de mama triple negativo son negativos para todos los marcadores basales, y 71% son positivos para al menos un marcador basal. Sin embargo, aunque esta clasificación molecular permita evaluar la respuesta a la quimioterapia en el cáncer de mama del tipo triple negativo, aún no existen blancos terapéuticos que cambien el manejo clínico agresivo o que aumenten la supervivencia para las pacientes.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Fitoquímicos en el tratamiento del cáncer.

Agentes dietarios naturales incluyendo frutas, vegetales y especias han mostrado un gran potencial en la prevención y tratamiento de una amplia variedad de enfermedades incluyendo al cáncer. A través de estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, se han identificado en los alimentos una gran cantidad de fitoquímicos con prometedores efectos quimiopreventivos. Entre estos, los polifenoles son uno de los más grandes grupos estudiados por su habilidad para interrumpir o revertir el proceso de carcinogénesis actuando sobre moléculas de la red de señalización intracelular involucradas en la iniciación y o promoción del cáncer. Los polifenoles son esenciales en la dieta humana, su función en las plantas es protegerlas del estrés fotosintético, de las especies reactivas de oxígeno y de ser devoradas por herbívoros. Se han encontrado más de 8000 diferentes polifenoles dietarios (12) flavonoides y ácidos fenólicos los cuales se pueden ingerir en los alimentos comunes de la dieta diaria. Entre los componentes dietarios bioactivos se encuentran las catequinas del té verde, la curcumina de la cúrcuma, la genisteína de la soya, el resveratrol de las uvas, los sulforafanos e isotiocianatos presentes en las crucíferas y otros componentes bioactivos como la epigenina del perejil, la silimarina del cardo lechero, etc., que modulan diversos blancos moleculares y genes que participan en la prevención y terapia del cáncer (13). Además, estos agentes naturales pueden alterar la metilación del ADN y modificar las histonas activando o silenciando genes clave de las rutas de señalización que inducen la apoptosis celular, y la promoción o supresión tumoral (14).

2.2 Epigenética y cáncer.

El cáncer es percibido como un grupo heterogéneo de desórdenes causados por cambios en genes supresores de tumor y oncogenes. Sin embargo, evidencia acumulada en los años recientes indica que la heterogeneidad tumoral está dada en parte por alteraciones epigenéticas en células de cáncer. El término “epigenética” se refiere a los cambios heredables reversibles que no están codificados en la secuencia del ADN pero juegan un importante papel en el control de la expresión génica. Las alteraciones epigenéticas, principalmente la metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de histonas, son mecanismos adicionales que contribuyen al fenotipo maligno. Los patrones aberrantes de metilación del ADN son una de las alteraciones moleculares encontradas con mayor frecuencia en las neoplasias humanas. A diferencia de las alteraciones genéticas, las modificaciones epigenéticas no alteran la secuencia del ADN, son reversibles y están implicadas en la regulación de la transcripción génica. Podemos decir actualmente que el cáncer se manifiesta por alteraciones genéticas y epigenéticas (15). Los procesos epigenéticos afectan la estabilidad de la transcripción, el plegamiento del ADN, el posicionamiento del nucleosoma, la compactación de la cromatina, y la organización nuclear completa del material genético. La epigenética es un campo prometedor para el tratamiento del cáncer, dado que la expresión de los genes puede ser restaurada. Por ejemplo, los genes silenciados por metilación pueden ser desmetilados, los complejos de histonas pueden mantener un estado de transcripción activa de genes supresores de tumor, modificando el estado de acetilación y metilación de histonas, vía nutrientes, fármacos u otras intervenciones dietarias (**figura 4**).

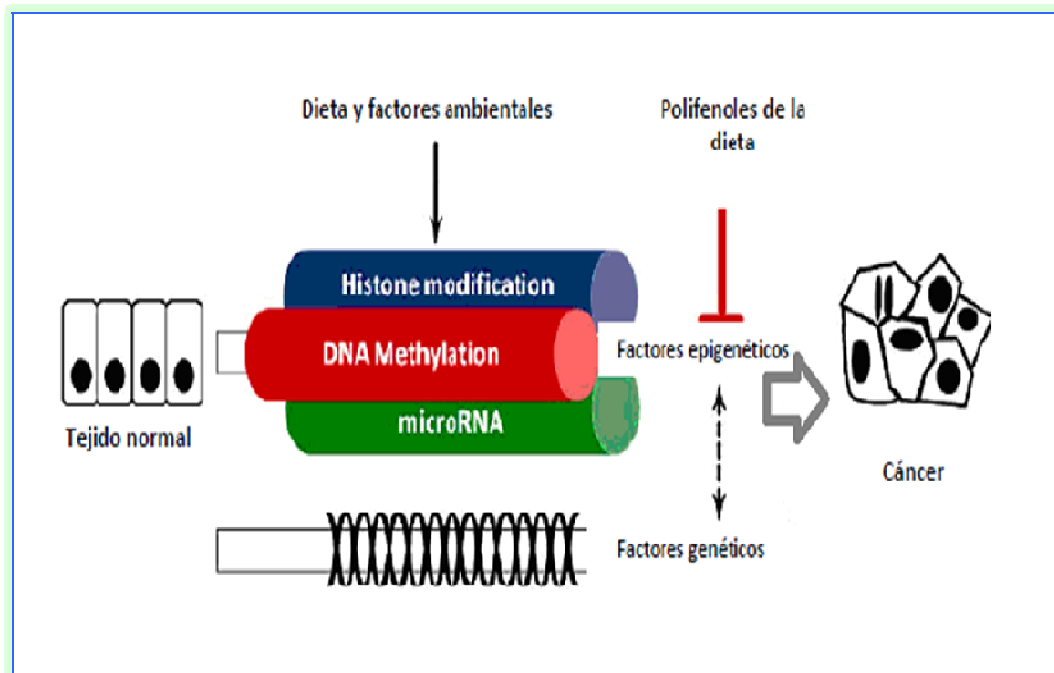


Figura 4. Mecanismos epigenéticos involucrados en la carcinogénesis. La dieta y factores ambientales pueden generar cambios en la modificación a histonas, metilación del ADN y modificaciones postranscripcionales por microRNAs. Los polifenoles de la dieta pueden inhibir el desarrollo del cáncer modulando procesos epigenéticos. Tomado y modificado de Alexander Link, Francesc Balaguer, Ajay Goel. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology* 80 (2010) 1771-1792.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

3.1 El papel de la dieta en el cáncer.

Se conoce que solo del 5-10% de todos los casos de cáncer son causados por defectos genéticos y el resto 90-95% son resultado de la interacción de factores ambientales y del estilo de vida (**figura 5**). No es completamente entendido cómo la dieta contribuye al cáncer. Sin embargo, una buena parte de las muertes por cáncer se pueden prevenir modificando la dieta, dado que existen componentes específicos contenidos en los alimentos que favorecen la prevención, entre ellos, algunos fitoquímicos que han sido identificados en frutas, vegetales, especias y granos con potencial quimiopreventivo (**tabla 2**). Se conoce que existe una relación entre la dieta y el 35% de las muertes por cáncer (15). La evidencia acumulada sugiere que el consumo regular de frutas y vegetales está inversamente relacionado con el riesgo de desarrollar tumores malignos (16). Hay un gran interés en la comunidad científica por los usos de los compuestos botánicos naturales (fitoquímicos) en la prevención de enfermedades, incluyendo el cáncer. En diversas investigaciones se ha mostrado que en frutas, vegetales y otros componentes de la dieta diaria existen fitoquímicos con propiedades quimiopreventivas (17, 18, 19) que pueden alterar la metilación del ADN y modificar histonas activando o silenciando genes de promoción o supresión tumoral como se muestra en la **tabla 3**.

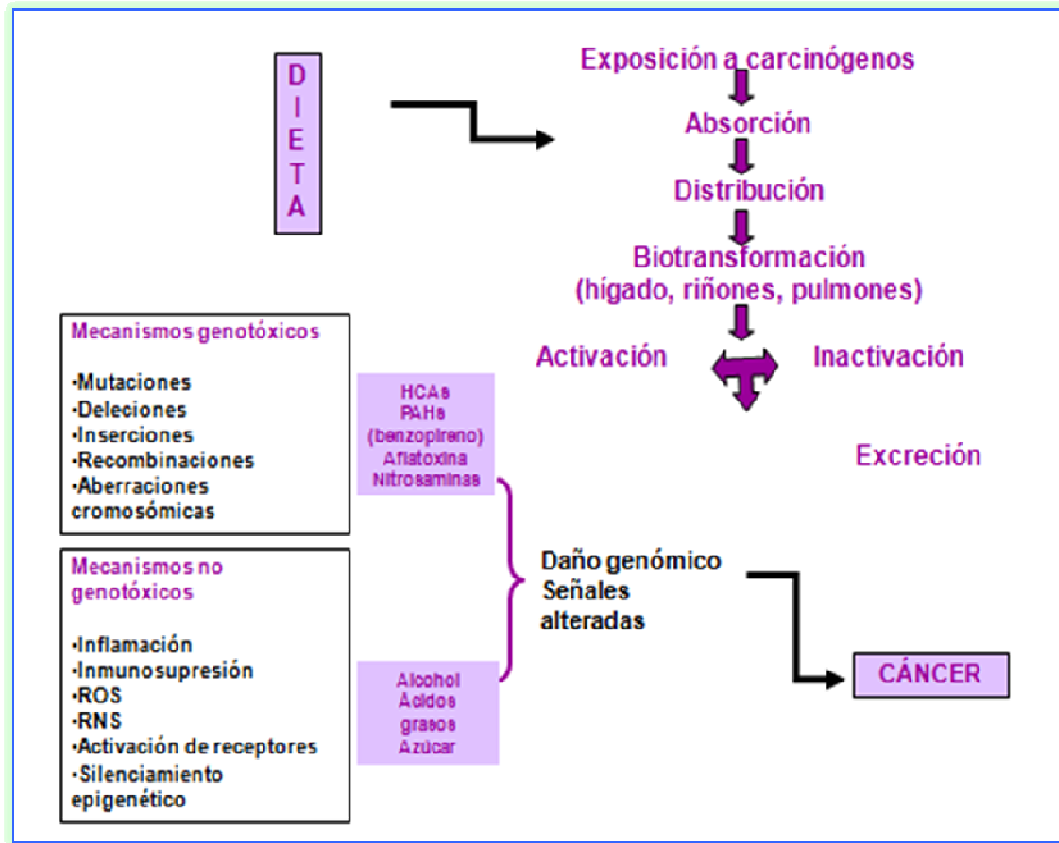


Figura 5. Mecanismos genotóxicos y no genotóxicos producidos por la dieta y su relación con el cáncer. En los alimentos se encuentran agentes carcinogénicos que pueden generar señales celulares alteradas y favorecer el desarrollo de células cancerosas. La exposición a carcinógenos de la dieta como los benzopirenos, aflatoxinas o nitrosaminas, el consumo de alcohol, grasa saturada y azúcar, pueden activar mecanismos genotóxicos (daño a DNA) o no genotóxicos (no afectan la secuencia del ADN pero activan procesos de promoción tumoral como la producción excesiva de radicales libres, la inflamación o cambios epigenéticos). La progresión al desarrollo de cáncer depende tanto de la absorción, así como de la distribución y biotransformación de estos agentes en el organismo humano.

Clase	Componente Bioactivo	Recurso Dietario
Vitaminas	Vitamina B ₂	Productos cárnicos
	Ácido Fólico	Vegetales
	Vitamina A	Vegetales
	Vitamina E (tocoferol)	Aceites vegetales
	Ácido ascórbico	Vegetales, frutas
Minerales	Calcio	Productos lácteos, vegetales
	Selenio	Granos de cereales, carne, pez
	Zinc	Carnes, vegetales
Carotenoides	Lycopene	Jitomate
	Luteína	Vegetales verde oscuro
	B-caroteno	Vegetales amarillo-naranja
Flavonoides	Genisteína	Soya
	<u>Resveratrol</u>	<u>Uvas, vino tinto</u>
	Quercetina	Vegetales, frutas
	Yangereóna	Frutas cítricas
	Catequinas	Uvas
Organosulfuro	(epigallocatequina-3-galato)	Té verde
	Alii sulfuro	Vegetales <i>Allium</i>
Isotiocianatos	Dialil sulfito	Ajo
	Alii isotiocianato	Calabaza
	Sulforafano	Brócoli
Indoles	Indol 3- carbinol	Crucíferas
Monoterpenos	D-Limoneno	Aromas de frutas cítricas
Ácidos fenólicos	Curcúmina	Curry, mostaza
	Ácido cafeico	Frutas, café, soya
	Ácido ferúlico	Vegetales verdes
	Ácido ferúlico	Vegetales verdes
	Clorofila	Vegetales verdes
Clorofilas	Clorofila	
	Clorofila	

Tabla 2. Algunos fitoquímicos con propiedades anti-carcinógenas presentes en los alimentos. Adaptado de Huang, M.-T., Osawa, T., Ho, C.-T., & Rosen, R.T. (1994) Food Phytochemicals for Cancer Prevention I: Fruits and vegetables. American Chemical Society, Whashington, DC.

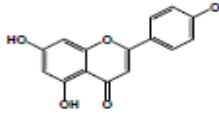
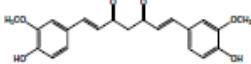
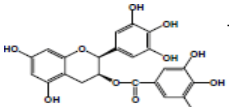
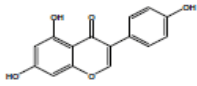
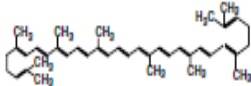
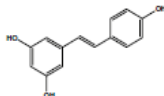
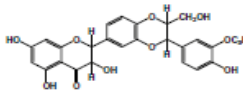
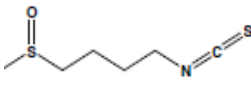
Componente bioactivo	Estructura	Efecto epigenético en cáncer	Fuente dietaria
Apigenina		Inhibidor de DNMT	Perejil 
Alisina		Inhibidor de HDAC	Ajo 
Curcumina		Inhibidor de DNMT Inhibidor HDAC y HAT	Curry 
Epigallocatequina-3-galato		Inhibidor de DNMT y HAT	Té verde 
Genisteína		Inhibidor de DNMT y HDAC Activador de HAT	Soya 
Licopeno		Desmetila GSTP1, RARα2, y HIN 1 (en MDA-MB-231 y MCF10A)	Jitomate 
Resveratrol		Inhibidor de DNMT Activador de SIRT1	Uva 
Silimarina		Activador de SIRT1	Cardo mariano 
Sulforafano		Inhibidor de DNMT y HDAC	Crucíferas 

Tabla 3. Componentes bioactivos presentes en alimentos, estructura molecular y blancos epigenéticos. DNMT: DNA metil transferasa; HDAC: Desacetilasa de histonas. Tomada y modificada de Syed M. Meeran, Amiya Ahmed and Trigve O. Tollefsbol. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. Clin Epigenet 2010; 1:101-116.

3.2 El resveratrol.

El resveratrol (3,4,5- trihidroxiestilbeno) es un polifenol producido por más de 70 especies de plantas, incluyendo alimentos como las uvas o nueces, en respuesta al daño ocasionado por la radiación UV y el ataque de hongos (20). Experimentos *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*, han demostrado diversas actividades biológicas de este metabolito que lo hacen uno de los más prominentes agentes quimiopreventivos, con actividades quimioterapéuticas por su habilidad de bloquear cada paso en el proceso de la carcinogénesis (iniciación del tumor, promoción y progresión).

Se sabe que este fitoquímico modula múltiples blancos moleculares y rutas de señalización (**tabla 4**), pero aún hace falta determinar cómo exactamente son regulados los blancos y rutas intracelulares, por lo que aumentar la investigación sobre las posibilidades de prevención y terapia en diversos tipos de cáncer humano de componentes bioactivos como el resveratrol, resulta de gran importancia.

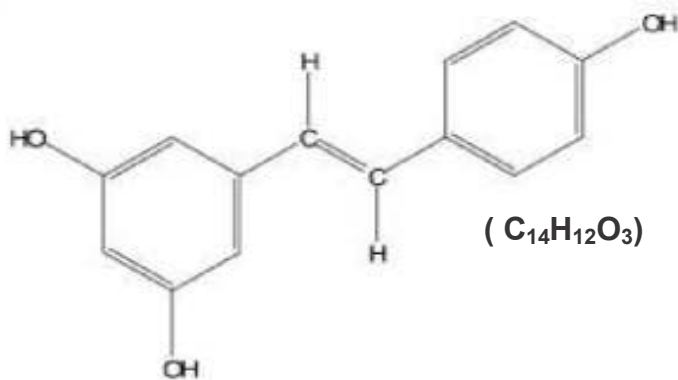


Figura 6. Estructura química del resveratrol
(trans-3,4',5-trihidroxistilbeno).

3.3 Propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas del resveratrol.

Se ha reportado que el resveratrol es efectivo para bloquear los tres estados de la carcinogénesis iniciación, promoción y progresión (21). La **figura 7** muestra las propiedades quimiopreventivas del resveratrol, entre las que se incluyen:

- Habilidad para bloquear la activación de varios carcinógenos y/o estimular su detoxificación.
- Prevención del daño oxidativo del DNA de células blanco, reducción de la respuesta inflamatoria y disminución de la proliferación de células cancerosas.
- Bloqueo de procesos metastásicos y angiogénicos de la progresión de tumores y disminución de la resistencia a la quimioterapia indicando su potencial quimioterapéutico.
- Inhibe proliferación celular e induce apoptosis en varios tipos de cáncer o células transformadas.
- Revierte parcialmente la quimioresistencia o radioresistencia de las células cancerosas induciendo apoptosis y suprimiendo la metástasis.

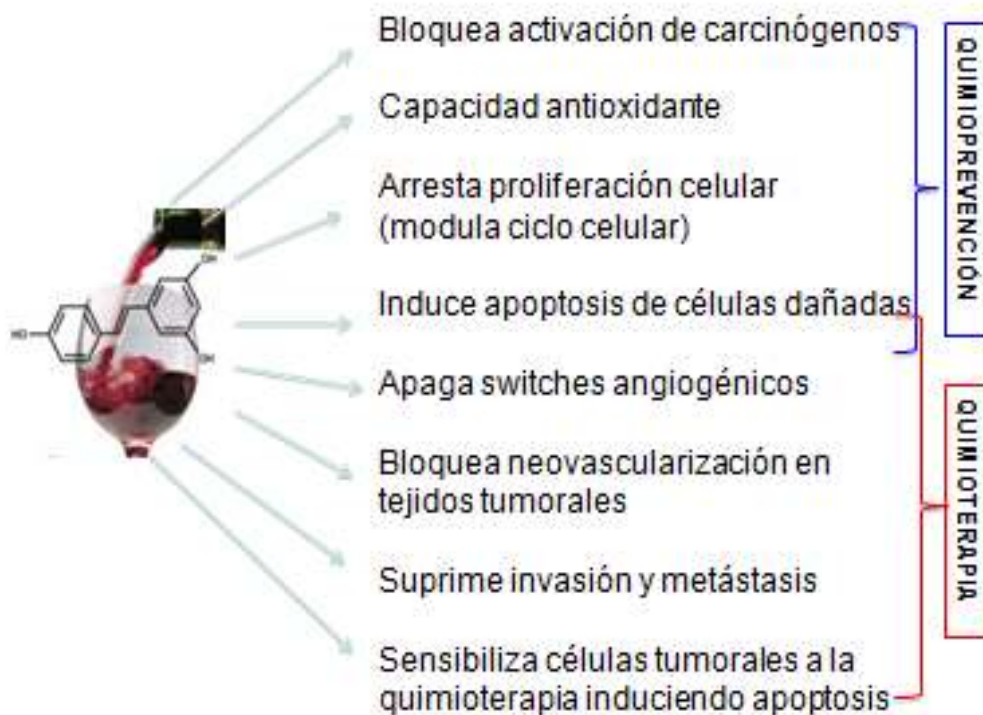


Figura 7. Mecanismos celulares responsables de las propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas del resveratrol. El resveratrol ha demostrado ser un agente quimiopreventivo y quimioterapéutico por diversos mecanismos, entre ellos, como inductor de células tumorales a la apoptosis, bloqueando angiogénesis y sensibilizando a las células a la quimioterapia. Tomado de Joydeb KUMAR Kundu, Young-Joon Surh. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol. Mechanistic perspectives. *Cáncer Letters* 269 (2008).

Modelo Tumor	Línea Celular	Blancos moleculares	Efectos Celulares	Referencias
Cáncer de Mama	T47D	P53,PTEN,p27,ROS,NO,QR,p21	Apoptosis	(Akhlaq et al., 2007; Kim et al., 2004; K. Lee and Safe, 2001; Pozo-Guisado, 2005; Waite et al., 2005)
	MDA-MB-231	P70S6K, ppS6RP, Src Stat3, pAkt,	Arresto del crecimiento y migración celular	
	MDA-MB-468	Bcl-2, NF- κ B, MMP9, ciclina D, Cdk4, ribonucleótido-reductasa, CYP1A1, telomerase.		
	MCF-7			
Cáncer de Próstata	LNCap,	Caspasa 3/9, p53, p21, p27, Bax, Bak, Bid, Bad, MKP5	Apoptosis, arresto G0/G1	(Awad et al., 2005; Aziz et al., 2006; Benitez et al., 2007a; Kotha et al., 2006; Nonn et al., 2007)
	PC-3	P13K, pAKT, ciclinas B/D/E, Cdk1/4, Bcl-2, Src-Stat3, ROS	Tasa de proliferación, viabilidad celular	
	DU145			
	Colo357			
	LAPC-4			
Cáncer de Colon	HT-29	AMPK, ROS, cathepsina D, caspasa -2, citocromo c, ATF3	Apoptosis, arresto G2, Crecimiento celular	(Bottone et al., 2005; Hwang et al., 2007; Liang et al., 2003; Mohan et al., 2006; Trincheri et al., 2007)
	DLD1	Cdk7, p34Cdc2		
	HCT116			
Cáncer Páncreas	CD18	MIC-1, citocromo C, caspasa-3	Apoptosis	(Golkar et al., 2007; Kotha et al., 2006; Moura et al., 2002)
	S2-013	Src-Stat3, NF- κ B	Crecimiento celular	
	Panc-1			
Leucemia	HL-60	NO	Apoptosis, tamaño nuclear, granularidad Crecimiento celular	(Quiney et al., 2004; Sterbo et al., 2006)
Hepatoma	HepG2		Apoptosis, tamaño nuclear, granularidad Crecimiento celular	(Sterbo et al., 2006)
Linfoma de células B	LY1	P27, p53, CD69	Apoptosis, arresto G0/ G1, gliodilisis	(Faber and Chiles, 2006; Faber et al., 2007)
	LY8			
	LY18	BCL6, Myc, pAKT, pp70S6K		
Osteo-sarcoma	SJSA1	pERK 1/2, pp53 (Ser 15)	Apoptosis Crecimiento celular	(Akhlaq and Jaffal, 2006)
Carcinoma de células escamosas	A431	P21, p27 Ciclinas A/E/D1/D2 Cdk2/4/6, pRb, MEK1, pERK 1/2, c-Jun, AP-1, HIF-1 α , VGEF, Akt, E2F1-6, DP 1/4	Arresto G0/G1	(Adhami et al., 2001; Ahmad et al., 2005)
Mieloma múltiple	RPMI 8226	c-fms, CD14, CD11a, receptor nuclear 1, 25 (OH)2D3, Bax, Apaf-1	Apoptosis	(Bolsy et al., 2005; Jazirehi and Bonavida, 2004; Sun et al., 2006)
	OPM-2	Catepsina K, RANK, NFATc1, Translocación nuclear NF- κ B, Bcl-x (L), XIAP, Mcl-1, MMP-9		
	U26			

Tabla 4. Blancos moleculares y efectos celulares del resveratrol en varias líneas celulares de cáncer. Adaptado de Huang, M.-T., Osawa, T., Ho, C.-T., & Rosen, R. T. (1994) Food Phytochemicals for Cancer Prevention I: Fruits and vegetables. American Chemical Society, Washington.

3.4 Metilación del ADN y cáncer.

La metilación es uno de los tres principales procesos epigenéticos que pueden dar lugar a cambios en la regulación de los genes. El segundo proceso es la modificación de histonas, que pueden inducir cambios en la estructura de la cromatina y el tercer proceso lo llevan a cabo los RNAs de interferencia (mi-ARN, si-ARN) que están implicados en la modificación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Estos procesos juntos constituyen el “metiloma” o set completo de modificaciones de la metilación del ADN de una célula.

La metilación del ADN consiste en la transferencia de grupos metilos (-CH₃) a algunas de las bases citosinas (C) del ADN situadas previa y contiguamente a una guanina (G). El dinucleótido CpG no está distribuido al azar en el genoma, sino que hay regiones ricas en CpG, conocidas como islas CpG, repartidas de forma heterogénea y que comprenden de 1-2% del genoma total. Estas islas CpG son regiones entre 0.5 y 5.5 kb con un contenido de dinucleótidos CG de al menos 55% (suponen un 1% del genoma y no suelen estar metiladas), generalmente, coinciden con los sitios de iniciación de la transcripción. No obstante, llegan a extenderse desde la región promotora hasta el primer exón e incluso hasta el primer intrón y se concentran especialmente en la región promotora de los genes. Los promotores son secuencias específicas de ADN localizadas en el extremos 5'-terminal de los genes y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula. La ARN polimerasa se une a las secuencias de dichos promotores iniciando el proceso de la transcripción. La metilación del DNA es un mecanismo normal de silenciamiento génico con un papel en la represión transcripcional de regiones repetidas y centroméricas, y durante el desarrollo, la

metilación del ADN en asociación con la modificación de histonas, es un componente esencial de la maquinaria epigenética que regulan la expresión de genes y la arquitectura de la cromatina. La metilación del ADN permite el silenciamiento de genes al prevenir o promover el reclutamiento de proteínas reguladoras del ADN, a través de una variedad de mecanismos.

La metilación del ADN está catalizada por distintas familias de ADN metiltransferasas (DNMTs) formando 5'-metil-citosina. Durante la fase S, las DNMTs copian el patrón de metilación de la hebra parental a la hebra hija del ADN de forma que la metilación se hereda tras la división celular. En el genoma de mamíferos esta modificación tiene lugar en residuos de citosina que preceden a guaninas (dinucleótidos CpG) a esto se conoce como metilación focal. Se estima que alrededor del 90% de las islas CpG se encuentran no-metiladas en células somáticas normales y en células de cáncer presentan un fenómeno de hipermetilación focal (metilación en islas CpG) (22).

Cuando se hace referencia a metilación global, las células cancerosas presentan un bajo contenido de 5-metil citosinas a lo largo del ADN. Esta hipometilación tiene lugar principalmente en elementos repetitivos del ADN lo que puede dar lugar a inestabilidad genómica y a deleciones o translocaciones cromosómicas. Mediante estudios globales de metilación del ADN y microarrays genómicos se han descrito grandes áreas de ADN hipometilado en regiones pobres en genes en células transformadas (23).

Algunos investigadores postulan que la baja frecuencia de citosinas metiladas en el genoma de cáncer se debe a que son propensas a sufrir desaminación. Se forman entonces timinas que si no se reparan, permanecen en el genoma como

mutaciones C por T. Parece probable que la metilación, junto con la gran capacidad mutagénica de las citosinas metiladas, sean los responsables de la eliminación progresiva de los dinucleótidos CpG del genoma a lo largo del tiempo. La extinción de dinucleótidos CpG en el genoma se asocia directamente con sitios en los que se han producido tales transiciones como resultado del alto potencial mutagénico de la 5-metilcitosina (24).

En el genoma de la célula normal, alrededor del 80% de los dinucleótidos CpG no asociados a islas se encuentran metilados. Mientras, los que forman parte de ellas especialmente si están asociados a promotores suelen estar no metilados (**figura 8**). La excepción a esta generalidad la constituyen los genes silenciados transcripcionalmente en el cromosoma X inactivo de las hembras en mamíferos y los alelos silenciados de genes imprintados, que mediante una hipermetilación en uno de los dos alelos parentales, están programados para asegurar la expresión monoalélica (25). Por otro lado, se ha encontrado que algunas islas CpG se metilan con el envejecimiento celular (26). Durante el desarrollo de un tumor, el grado de hipometilación del DNA va aumentando según la lesión progresa desde la proliferación celular benigna al cáncer invasivo. La pérdida de impronta génica (LOI, Lost Of Genomic Imprinting) también está asociada a la hipometilación del DNA en cáncer (27). En paralelo a esta hipometilación global, en las células tumorales se produce la hipermetilación de islas CpG, que normalmente no están metiladas (**figura 8 A**). La hipermetilación de los promotores de genes supresores de tumores es un mecanismo muy frecuente de silenciamiento génico en muchos tipos de cáncer (**figura 8 B**). Algunos ejemplos de supresores tumorales típicos que son inactivados por este mecanismo son el gen del retinoblastoma (RB),

p16INK4a, MLH1, o BRCA1. La hipermetilación de islas CpG de promotores afecta a genes implicados en diferentes procesos celulares: regulación del ciclo celular, reparación del DNA, metabolismo de carcinógenos, interacciones célula-célula, apoptosis, etc., todos ellos implicados en el desarrollo tumoral (28). Los mecanismos de silenciamiento génico dependen además, de una serie compleja de modificaciones enzimáticas de histonas. La acetilación y metilación de aminoácidos específicos de histonas resultan en modificaciones a la estructura de la cromatina, permitiendo la transcripción o inactivándola. Una de las principales marcas de silenciamiento es la acetilación de la histona 3 en el residuo de lisina 9 y una marca que indica que la cromatina se encuentra en un estado de transcripción activa es la acetilación de la histona 3 en el residuo lisina 4. Estos cambios en la acetilación y metilación en los residuos clave de las histonas son influenciados por la metilación del ADN, esta metilación permite la unión de proteínas que mantienen a la cromatina en un estado de silenciamiento transcripcional, incluyendo proteínas de unión a metil citosinas, HDACs y correpresores transcripcionales. La metilación de islas CpGs en regiones promotoras y la desacetilación de histonas, ocurre durante la tumorigénesis, resultando en cambios conformacionales que obstruyen físicamente la transcripción (**figura 8 B**).

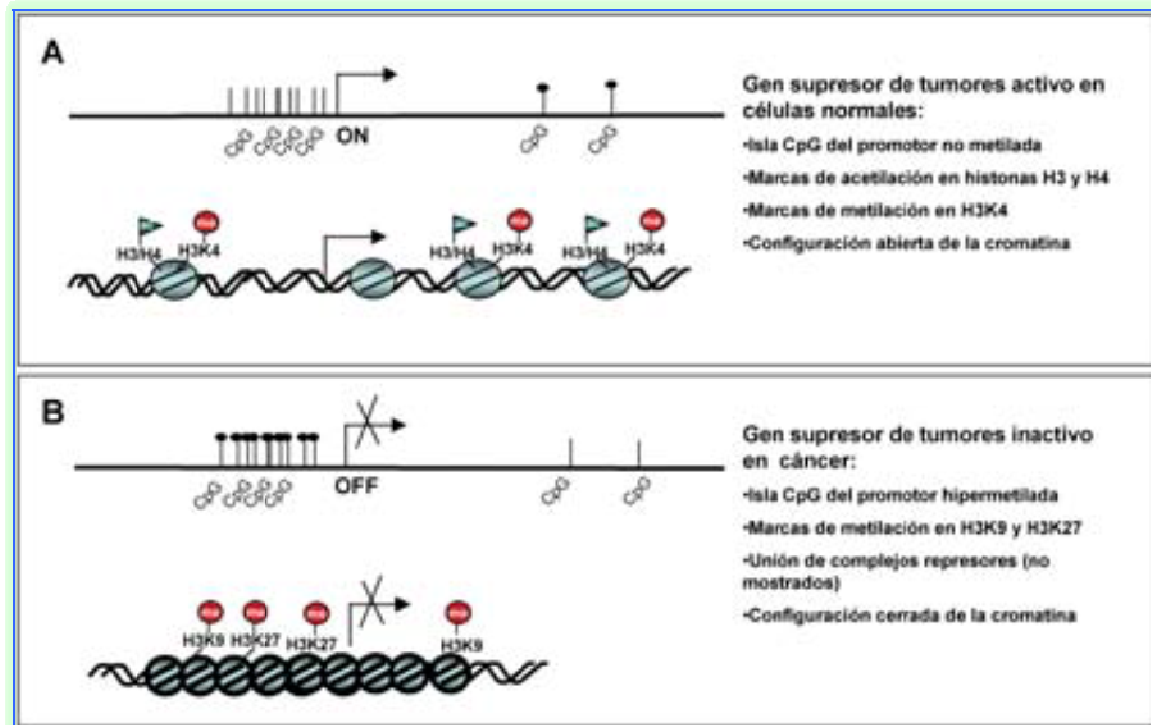


Figura 8. Patrones de metilación del DNA y de configuración de la cromatina en células normales y tumorales. (A) Los promotores de los genes supresores de tumores activos en células normales presentan islas CpG no metiladas, marcas de acetilación y metilación de histonas propias de cromatina activa y configuración de cromatina descondensada relativamente libre de nucleosomas. (B) Los genes supresores de tumores silenciados en cáncer presentan promotores con islas CpG hipermetiladas, marcas represivas de metilación de histonas y elevado grado de condensación de la cromatina.

3.5 Herramientas de análisis de los perfiles globales de metilación.

La metilación de citosinas es la modificación al ADN más común en los organismos eucariotas. La metilación puede ser detectada usando conversión por bisulfito, enzimas de restricción sensibles a metilación, proteínas de unión a metilos y anticuerpos anti-metilcitosinas. Combinando esas técnicas con microarreglos de ADN se puede mapear el estado de metilación en una escala genómica amplia. Muchos métodos para el análisis de la metilación del ADN han sido desarrollados en los últimos años. Sin embargo, están basados en alguna de las tres técnicas principales que son: conversión por bisulfito, digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y purificación por afinidad. Por ejemplo, el tratamiento con bisulfito (MSP; Methyl Sensitive Array).tiene como propósito la transformación química de las citosinas no metiladas a uracilos, por el tratamiento con bisulfito de sodio, que no afecta las 5-metilcitosinas, y marca de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG. La modificación del ADN, su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o secuenciación automatizada son las técnicas más usadas con este propósito. Otra técnica empleada para cuantificar la metilación del ADN es MeDIP (Methylated DNA immunoprecipitation), en la que el ADN total es obtenido tras sonicación, el metilado precipita gracias a los anticuerpos anti-metil citosina. El ADN metilado y sin metilar se unen a diferentes fluorocromos y mediante un análisis de microarreglos de dos colores se cuantifica el grado de metilación. Además, la cuantificación de la metilación se puede realizar mediante digestión enzimática DMH (Differential Methylation Hybridization). En este proceso se hace una

digestión de distintas combinaciones de enzimas sensibles o no a la metilación genera fragmentos de ADN que analizados en un microarreglo frente a un control permiten cuantificar el grado de metilación de las islas CpG.

3.6 Microarreglos de metilación del DNA.

Un microarreglo es una colección de oligonucleótidos también llamados sondas del ADN, arreglados en una plataforma rectangular de vidrio, usado para analizar de forma paralela diferentes tipos de oligonucleótidos de muestras a investigar. Cada sonda corresponde a una secuencia específica de nucleótidos guanina, adenina, citosina y timina (**figura 9**). En un microarreglo de metilación, las sondas empleadas permiten el mapeo de regiones metiladas del ADN y el reconocimiento de islas CpGs metiladas para poder medir el estatus de metilación del ADN de células de tumores de cáncer de mama triple negativo.

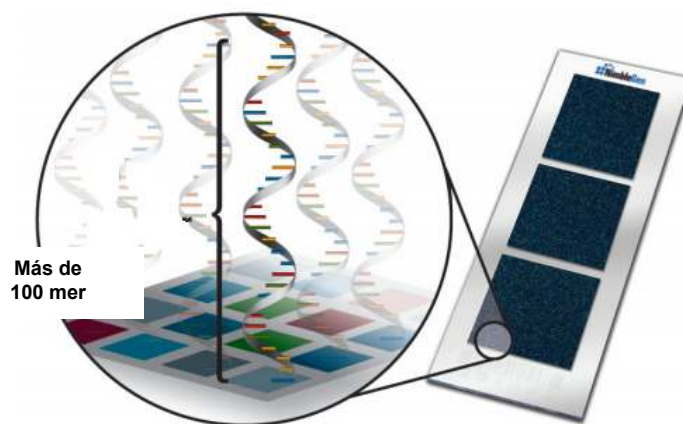


Figura 9. Sondas de oligonucleótidos del ADN que contiene un microarreglo NimbleGen 3x720K (más de 100 bases o mer).

El microarreglo de metilación de Roche NimbleGen 3x720K que utilizamos en este trabajo está elaborado con tecnología MAS (maskless array síntesis), es un método de fabricación de microarreglos usando síntesis química mediada por luz (**figura 10**). Utiliza un sistema digital de microespejos de aluminio (DMD) arreglados para crear un patrón de millones de píxeles individuales de luz. El sistema DMD controla el patrón de luz UV creando una “máscara virtual” que es proyectada sobre la placa que contiene las sondas. Cada espejo dentro del sistema DMD es activado y luego un grupo fotolábil protegido es removido de los oligonucleótidos unidos que se encuentran en la superficie del arreglo, permitiendo la unión de un nuevo oligonucleótido. Esto ocurre a través de un proceso de activación por luz UV, las sondas de oligonucleótidos que se sintetizan alcanzan las 100 bases de longitud. El empleo de esta tecnología en el microarreglo permite una alta densidad del ADN en el microarreglo y además que éste tenga una sensibilidad y especificidad.

La determinación de los patrones de metilación mediante microarreglos permite analizar los efectos de la metilación aberrante en el genoma de humano, proporcionan robustez estadística debido a la detección cuantitativa a nivel puntal de islas CpGs, con alta resolución para el entendimiento de cambios epigenéticos por comparación de condiciones. El análisis con microarreglos de metilación es una poderosa herramienta para cuantificación de cambios en la metilación de un genoma completo. Nos permitió obtener el estatus de metilación del DNA de células MDA-MB-231 y comparar el efecto que el tratamiento con resveratrol por 24 y 48 horas tuvo en éstas células.

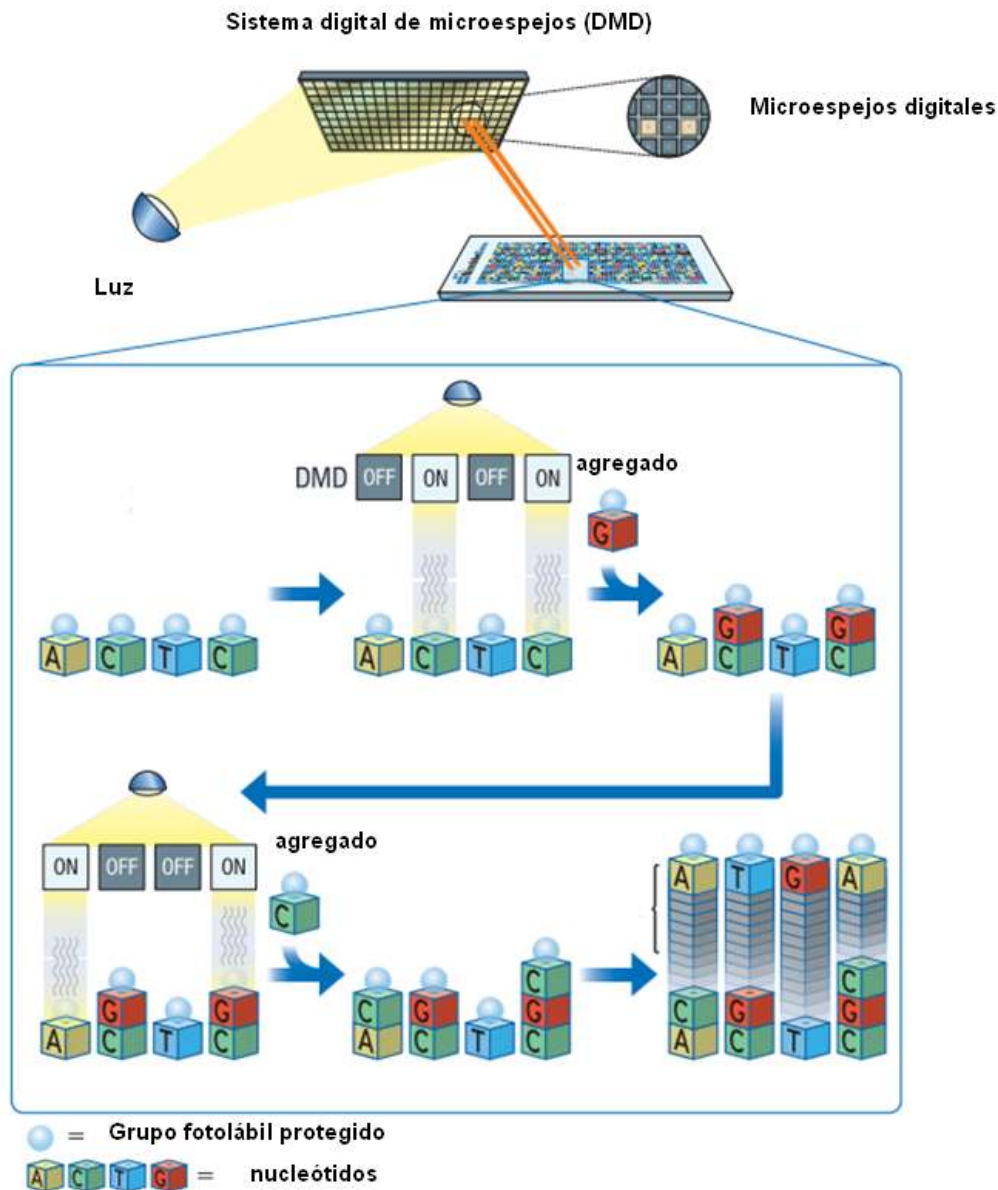


Figura 10. Sistema MAS (maskless array síntesis) empleado en la manufactura del microarreglo de metilación 3x720K NimbleGen. El sistema MAS es un sistema digital de microespejos de aluminio (DMD) arreglados para crear un patrón de millones de pixeles individuales de luz, una tecnología de NimbleGen que respalda la alta sensibilidad y especificidad del microarreglo.

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO.

El cáncer de mama triple negativo constituye un subtipo de tumores de características clínicas agresivas. Las terapias disponibles son poco efectivas y se requiere la implementación de nuevos fármacos. El resveratrol es un fitoquímico con propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas que regula blancos moleculares involucrados en la tumorigénesis, bloquea carcinógenos, previene el daño oxidativo, inhibe angiogénesis y procesos metastásicos e induce apoptosis. Una característica importante es que tiene la capacidad de alterar la metilación del ADN y modificar las histonas, regulando la expresión génica a nivel epigenético. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que las alteraciones epigenéticas adquiridas por influencia de factores ambientales como la dieta, participan en todas las etapas del desarrollo de un tumor y son procesos reversibles que favorecen el desarrollo del cáncer de mama. Por tanto, es de suma importancia la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos cuyos efectos puedan restablecer la transcripción génica mejorando la calidad de vida de las pacientes con cáncer de mama triple negativo, para el que no hay un tratamiento específico ni eficaz. El análisis del metiloma de células MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con resveratrol es una herramienta molecular que nos permitió evidenciar cambios globales en la metilación de genes relevantes en el desarrollo y progresión del cáncer y definir nuevos blancos terapéuticos. Sin embargo, es necesario continuar el estudio de los mecanismos de regulación epigenética que puedan explicar las propiedades quimioterapéuticas y quimiopreventivas de agentes naturales como el resveratrol.

II. OBJETIVOS.

1.1 Objetivo general.

Análisis sistemático del metiloma de células MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo en respuesta al tratamiento con resveratrol.

1.2 Objetivos particulares.

1.- Determinar la dosis letal media (DL50) del resveratrol en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo.

2.- Cuantificar la apoptosis en la línea celular MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con resveratrol.

3.- Identificar cambios en los patrones de metilación de los promotores de los genes mediante el análisis del perfil global de metilación de las células MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con resveratrol.

4.- Predecir las rutas biológicas relevantes en cáncer y en las cuales participan los genes modulados a nivel epigenético en respuesta al resveratrol.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

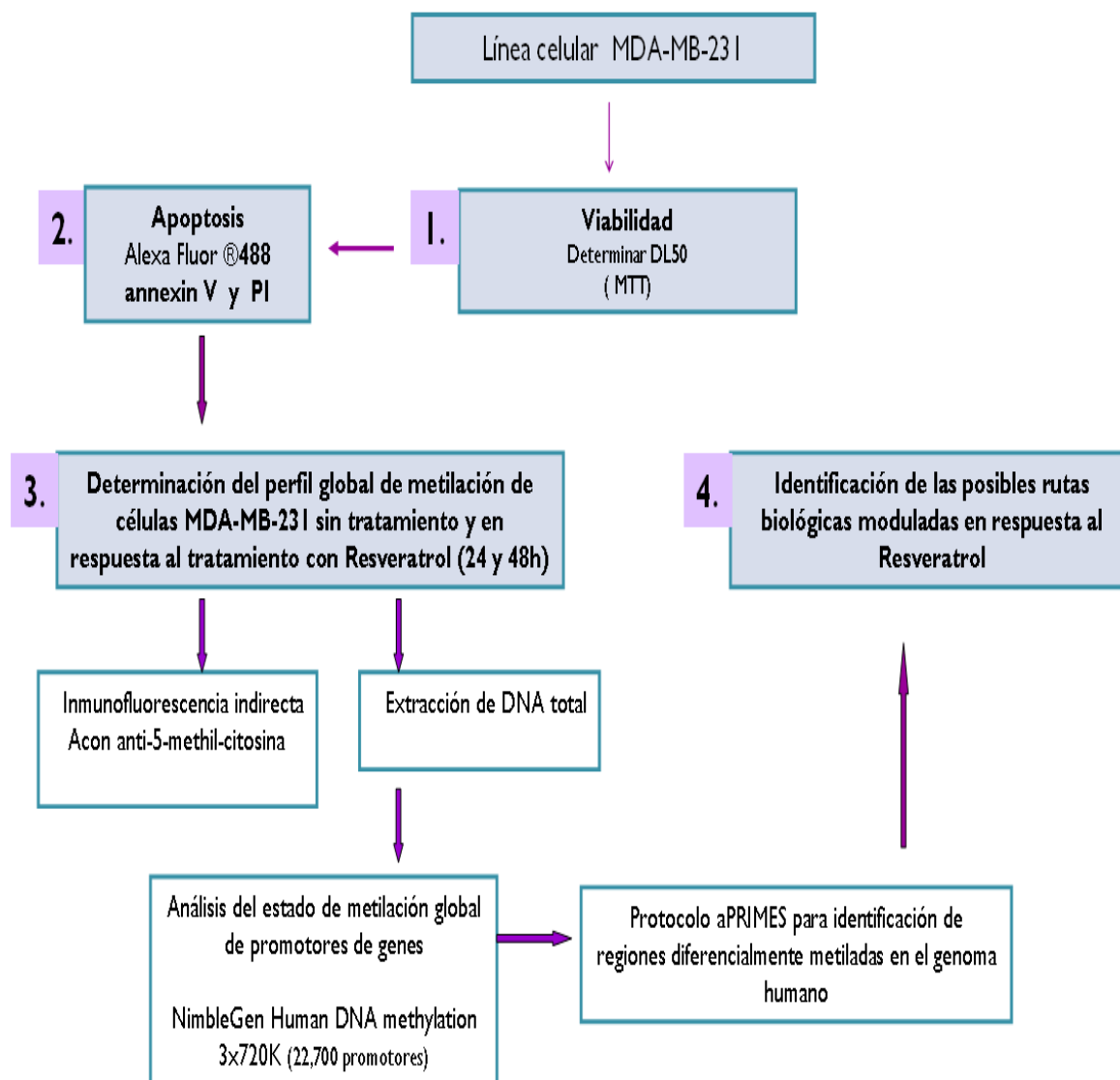


Figura 11. Diagrama de flujo de la estrategia experimental realizada para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo. Se utilizaron células MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo a las que se adicionó resveratrol a concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 μ M. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular por ensayo de MTT y se determinó la DL50. Las células fueron

teñidas con anexina y ioduro de propidio. Se obtuvo el porcentaje de células en apoptosis en respuesta a resveratrol y finalmente, para determinar el perfil de metilación, se realizaron inmunofluorescencias con el anticuerpo anti-5-metil-citosina y un microarreglo de metilación 3x720K NimbleGen. El ADN obtenido fue sometido a digestión con enzimas sensibles y no sensibles a metilación (protocolo aPRIMES). De esta manera se obtuvieron regiones del ADN diferencialmente metiladas para posteriormente hibridar al microarreglo de metilación y obtener imágenes del patrón de metilación global de metilación de las células MDA-MB-231 y las islas CpGs asociadas a sus transcritos de ARN, así como los cambios generados después del tratamiento con resveratrol (100 μ M) a las 24 y 48 horas y la identificación de las posibles rutas biológicas moduladas por este fitoquímico a nivel epigenético.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Línea celular y tratamiento con resveratrol.

Se emplearon células de tumores de glándula mamaria, adherentes de morfología epitelial de la línea celular metastásica MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo. Esta línea celular fue crecida en cajas de 75 mm con 7 ml de DMEMF12 adicionado con 10% de suero bovino fetal, penicilina y estreptomicina. Se mantuvieron los cultivos en una atmósfera de 5% CO₂-95% aire a 37⁰ C cada tercer día. Las células fueron lavadas con PBS-1X para crecerlas en condiciones óptimas y cuando alcanzaban una confluencia del 80 al 90 % eran separadas a cantidades iguales en dos cajas de cultivo.

El tratamiento con resveratrol se preparó disolviendo 1 mg de resveratrol (Sigma-Aldrich®) en 55 µL de etanol al 100% para lograr una solución stock a una concentración 80 µM. A partir de la solución stock se obtuvieron las concentraciones 50, 100, 150, 200 y 250 µM empleadas en los ensayos de viabilidad.

4.2 Análisis de la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con resveratrol mediante MTT.

El ensayo colorimétrico MTT está basado en la capacidad de las células viables para metabolizar la sal de tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) (Sigma-Aldrich®) de color amarillo (MTT) dando lugar a la sal de formazán de color violeta, la cual se precipita después de cuatro horas de incubación a 37^o C. Esta sal se solubilizó con Isopropanol, resultando una solución violeta cuantificable mediante absorbancia a 570 nm en un lector convencional de

ELISA. Como lectura de referencia se utilizó una longitud de 695 nm. La densidad óptica DO, fue proporcional al número de células viables. En nuestros ensayos se plaquearon células de la línea MDA-MB-231 en placas de 24 pozos con una densidad de 200,000 células por pozo. Después de 24 horas en cultivo, se aspiró el medio normal y se añadió medio con diferentes concentraciones de resveratrol (50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, y 250 μ M). El tratamiento con el resveratrol se realizó durante 24 y 48 horas renovándolo cada 24 horas desde el inicio del tratamiento. Las lecturas de citotoxicidad fueron tomadas a las 24 y 48 horas de tratamiento. Cada experimento se repitió tres veces de forma independiente. En cada experimento, se calculó la fracción de supervivencia como el cociente de DO entre las células tratadas y el DO de las células control (no tratadas). Se obtuvo la recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados que presentaba un coeficiente r^2 superior a 0.95. A partir de la línea resultante se calculó la pendiente m y la DL50 (dosis que inhibe el 50% del crecimiento celular).

4.3 Cuantificación de la apoptosis mediante citometría de flujo de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo en respuesta al tratamiento con resveratrol.

El método permitió detectar el proceso de translocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana celular que se produce durante los estadios tempranos de la apoptosis. El procedimiento consistió en una doble tinción Anexina V (Invitrogen® / Ioduro de propidio. La Anexina V es un anticuerpo específico de la fosfatidilserina que lleva conjugada una molécula de fluoresceína que emite en la zona verde del espectro y que al unirse a la membrana celular

permite cuantificar el porcentaje de células apoptóticas presentes en un cultivo. El yoduro de propidio (emisión en la zona roja del espectro) es un colorante vital que entra únicamente en células muertas y que nos permitió calcular el porcentaje de células necróticas presentes en el cultivo. Todas las muestras se analizaron por citometría de flujo con el citómetro FACS-Canto II (Becton-Dickinson®) con el software FACSDIVA® de la misma casa comercial. Las distintas poblaciones celulares se centraron atendiendo al tamaño y complejidad celular (FSC/SSC). La fluorescencia se midió mediante los fotomultiplicadores FL3 y FL5 para el IP y la anexina respectivamente. El protocolo de tinción utilizado para este ensayo fue el del kit comercial Alexa®Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry (Invitrogen). Las células fueron plaqueadas en una caja de 6 pozos a una densidad celular 1×10^6 por pozo en 2000 μL de DMEMF12. Se colocaron dos pozos como controles negativos de los experimentos células MDA-MB-231 sin tratamiento; dos pozos como controles positivos que contenían células tratadas con doxorrubicina 1 μM y en los 2 pozos restantes, células tratadas con resveratrol 100 μM . Para el ensayo a 48 horas, el tratamiento fue renovado cada 24 horas. El tratamiento con resveratrol se preparó a partir de una dilución stock con 2 mg de resveratrol en 110 μL de etanol (concentración: 80 μM). Para obtener el resveratrol a una concentración final de 100 μM , se depositaron en un tubo eppendorf 2.5 μL de resveratrol de la solución stock +1997.5 μL DMEMF12 para cada pozo con tratamiento con resveratrol 100 μM . El buffer de unión a anexina 1X se preparó mezclando 1 ml de 5X annexin-binding buffer (componente C del kit) + 4 ml de agua desionizada; la solución de trabajo de yoduro de propidio a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo diluyendo 5 μL de la solución stock de yoduro de propidio

(componente B del kit) en 45 μ L del buffer de unión a anexina 1X. Ambas soluciones fueron cubiertas con aluminio para protegerlas de la luz. Después de 24 horas de tratamiento, las células fueron tripsinizadas para despegarlas de la superficie, esto se llevó a cabo retirando el medio de los pozos para lavarlos con PBS1X pH7 y después, agregando 1.5 mL de PBS1X-EDTA +64 μ L de tripsina a cada pozo. Se incubaron 3 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó con medio DMEMF12 (1 ml/pozo). Las células se despegaron con movimientos suaves y se recuperaron en tubos. Después se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante para obtener el pellet. Luego, se hizo un lavado con PBS y se adicionó a las células el buffer de unión a anexina 1X (100uL x cada 1×10^6 células). Seguido a esto, se agregó 5uL de Alexa Fluor 488 annexin V (Componente A) + 1uL de la solución de trabajo de ioduro de propidio por cada 100uL de suspensión celular, las células fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de la incubación, se agregaron 400 μ L de buffer de unión a anexina 1X, mezclando bien, se conservaron en hielo previo y durante el análisis de las células teñidas por citometría de flujo.

4.4 Análisis de apoptosis mediante la técnica de TUNEL.

Esta técnica se basa en la incorporación de un oligonucleótido marcado con fluorescencia, permitiendo la localización y cuantificación de núcleos fragmentado. La técnica de TUNEL (dUTP-final TdT-mediada) nos permitió evaluar la fragmentación nuclear del ADN *in situ*. Este método incorpora desoxiuridina biotinilada al 3'OH del ADN cuando éste se encuentra fragmentado. La biotina

actúa como señal y puede ser detectada por técnicas fluorescentes. Cuantas más roturas tenga el ADN mayor es la señal resultante. Los ensayos de TUNEL que se realizaron en este trabajo se basaron en el protocolo In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein® (Roche). Las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Después de 24 horas en cultivo, se procedió de la misma manera que para los ensayos anteriores, aspirando el medio normal y añadiendo medio recién preparado con la doxorrubicina $1 \mu\text{M}$ o el resveratrol $100 \mu\text{M}$. Los tratamientos se fueron renovando cada 24 horas durante 48 horas. Transcurrido este periodo de tiempo, las muestras se fijaron con formaldehído al 4% en PBS 1X durante una hora. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% en citrato sódico en PBS 1X. Las preparaciones se montaron con medio Vectashield-DAPI (VECTOR®) y posteriormente se observaron en microscopio confocal.

4.5 Obtención del patrón de metilación global de células MDA-MB-231 mediante inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-5-metil-citosina.

La inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-5-metil-citosina es una de las herramientas para el análisis de metilación del genoma. Este anticuerpo monoclonal reconoce citosinas metiladas en los nucleosomas de las células. Actualmente se sabe que el DNA en los tumores está frecuentemente hipometilado comparado con el DNA de tejidos normales. Para este ensayo, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas de 6 pozos a una densidad de 1×10^6 células por pozo, después de 24 horas y una vez que se formó

la monocapa, se retiró el medio DMEMF12, se hizo un lavado con PBS 1X pH 7 por un minuto y se retiró el PBS. A continuación se fijaron las células agregando 1000 μ L de paraformaldehído al 4% a cada pozo y se dejaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego se hicieron 3 lavados con PBS 1X pH7 de 10 minutos cada uno. Posteriormente se permeabilizaron las células agregando PBS/tritón 100X 0.2% durante 10 minutos. Se lavaron con PBS 1X pH 7 3 veces x 5 minutos y luego se hizo un bloqueo adicionando 1000 μ L de SFB al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavó con PBS1X pH 7 3 veces x 5 minutos. A continuación, se agregó el anticuerpo primario (1:100) sobre parafilm (para evitar que se secase la laminilla y que se dispersara el anticuerpo) de la siguiente manera: 1 μ L de anti-5-Methylcytosine Mouse mAb (162 33 D3; Calbiochem) en 999 μ L de PBS pH7 y se agregaron 50uL a cada pozo, incubando a 37⁰C en cámara húmeda toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se lavó con PBS 1X pH 7 3 veces x 5 minutos y finalmente se agregó el anticuerpo secundario anti-mouse IgG antibody conjugated to FITC Biotinylated Goat anti-Mouse IgG (H+L), a una concentración de 1:500 (Jackson Immuno Research). Se Incubó a 37⁰C en cámara húmeda por 1 hora. Posteriormente se lavó con PBS1X pH 7 3 veces x 5 minutos y se tiñó con DAPI diluyendo 1 μ L de DAPI en 999 μ L de PBS1X pH 7 y sobre parafilm se esparcieron 20 μ L colocando encima las laminillas. Se incubó por 2 minutos en oscuridad. Se hizo un lavado con PBS1X pH 7 toda la noche. Al siguiente día, sobre portaobjetos se colocaron 10-12 μ L de vectashield a cada laminilla y con esmalte fueron selladas. Se observaron en microscopio confocal.

4.6 Obtención del patrón de metilación en islas CpGs de promotores de genes en células MDA-MB-231 mediante protocolo aPRIMES (array-based profiling of reference-independent methylation status).

El protocolo aPRIMES es un método empleado para la obtención de regiones genómicas enriquecidas con secuencias CG-GC metiladas; es decir, islas CpG metiladas, enriquecidas por medio de PCR. Se obtuvo la fracción genómica que no tuvo modificación por metilación; es decir, regiones hipometiladas. A partir de 1×10^6 células MDA-MB-231 se extrajo 2 μg de DNA de alta calidad $A_{260}/_{280} > 1.7$ a una concentración de 250-100 ng/ μL . Se cuantificó en espectrofotómetro NanoDrop® y mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% se comprobó la integridad del DNA. Se procesaron las muestras para la identificación de regiones diferencialmente metiladas en el Genoma Humano mediante el protocolo aPRIMES descrito de forma general en la **figura 12**.

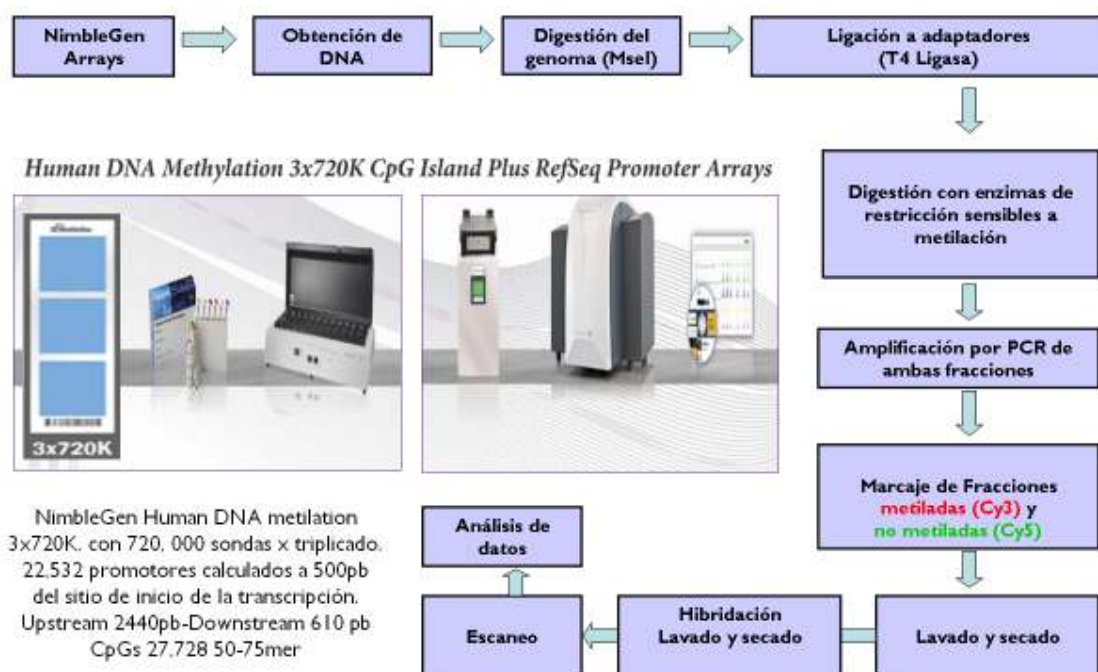


Figura 12. Diagrama de flujo para la obtención del patrón de metilación de células MDA-MB-231 mediante protocolo para identificación de fracciones diferencialmente metiladas (aPRIMES). El microarreglo de metilación 3x720K NimbleGen se utilizó para obtener el perfil de metilación de las células de interés, para ello, se obtuvo ADN de alta calidad que posteriormente fue sometido a digestión con enzimas de restricción que lo fragmentaron. Una vez fragmentado, se crearon extremos cohesivos en las cadenas de ADN, por tanto, se unieron los adaptadores por medio de la enzima DNA T4 ligasa. Una vez realizado esto, se emplearon enzimas de restricción sensibles a metilación para obtener las fracciones metiladas y no metiladas. Dado que la digestión fue eficiente, se procedió a la amplificación de estas fracciones mediante PCR, se hizo el marcaje con las cianinas Cy3 y CY5, las muestras se hibridaron al microarreglo, se hicieron los lavados correspondientes y finalmente, se escaneó el micorarreglo y se analizaron los datos.

4.6.1 Ligación a adaptadores.

Se mezclaron 2 µg de DNA genómico, 20 U de MseI (2 l) y 2 µl de Buffer de digestión 10X (NEB 2) la reacción se llevó a un volumen final de 20 µL. Se sometió a digestión durante seis horas a 37° C. transcurrido ese tiempo, se inactivó a la enzima por calor a 65° C por 20 min. Después, se añadió a la reacción 400 U de T4 DNA Ligasa, 1 µl de adaptadores y 2 µl de ATP, este proceso de ligación se mantuvo por seis horas a 16° C. Luego se inactivó por calor a 65° C durante 20 min. De este volumen, se tomaron 10 µl para electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

4.6.2 Digestión enzimática para la obtención de fracción genómica metilada y no-metilada.

Se agregó a la reacción 10 µL de ddH_2O para tener un volumen de 20 µL. Se hizo una división en dos fracciones (10 µL c/u). A la que representó la fracción metilada se agregaron: 20 µL de agua, 2 µL de Acil, 2 µL de HinPII, 2 µL de HpaII y 4 µL de Buffer NEB 1 10X en un volumen final de 40 µL agregando 10 µL de Muestra. A la fracción no metilada se agregaron 13 µL de agua, 3 µL de la enzima MCrBC, 2 µl de Buffer NEB 2, 1 µL de BSA 100X y 1 µL de GTP para un volumen final de 30 µL agregando 10 µL de muestra. Se incubaron ambas fracciones x 6 horas a 37° C. Transcurridas 4 horas de incubación se adicionó 1 µL de las enzimas a cada fracción y la reacción continuó hasta completar las 6 h. Luego se inactivó por calor a 65° C durante 20 minutos.

4.6.3 Amplificación por PCR de las fracciones metilada y no metilada.

Antes de realizar la amplificación de las fracciones metiladas y no metiladas, se realizó un control de digestión tomando 2 μL de cada fracción y se sometió a digestión con McrBC a la fracción metilada, y a la no metilada con el cóctel de enzimas HinPII, AclI y HpaII. Se agregó 1 μL de cada enzima para un volumen final de 30 μL . Después se incubó a 37⁰ C por 4 horas. Posterior a esto, se inactivó la reacción por calor a 65⁰ C durante 20 minutos. El master mix para los controles de digestión se realizó para una reacción con 2.5 μL de Buffer 10X PCR sin MgCl_2 , 0.625 μL de dNTPs (10 Mm), 1.8 μL de MgCl_2 , 0.25 μL de TaqPol, 1.25 μL del Primer LibI (20 μM) y 13.575 μL de ddH_2O . Una vez que se comprobó que la digestión enzimática anterior fue eficiente dada la ausencia de fragmentos de DNA sujetos a digestión con enzimas contrarias, se realizó la amplificación de las fracciones metiladas y no metiladas. El master mix para las 2 fracciones metiladas y 2 no metiladas totales obtenidas antes de los controles de digestión se realizó con 20 μL del PCR Buffer 10X, 5 μL de DNTPs (10 mM), 14.4 μL de MgCl_2 , 2 μL de Taq Pol, 10 μL del primer LibI (20 μM), 40 μL de la fracción metilada o 30 μL de la no metilada. Además de una parte variable de agua para llevar a un volumen final de 200 μL . Las condiciones en que se realizó la PCR fueron: 3 minutos a 72⁰ C; seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 90⁰ C, 30 segundos a 92⁰ C y 90 segundos a 72⁰ C. después 10 minutos a 72⁰ C y finalmente, a 4⁰ C ∞ .

4.6.4 Marcaje de fracciones metiladas y no metiladas con Cy3 / Cy5.

Para este procedimiento se utilizó Dual Color DNA Labeling Kit de Roche NimbleGen. Las muestras experimentales y los controles se organizaron en tubos de PCR. La fracción metilada (1 µg) se marcó con 40 µL de cianina Cy3 y la no metilada (1 µg) con 40 µL de Cy5. Ambos tubos se llevaron a un volumen final de 80 µL de agua grado PCR. A continuación, se desnaturalizaron las muestras por calor a 98°C x 10 minutos e inmediatamente después se colocaron en hielo por 10 minutos. Se utilizó el siguiente Master Mix para cada muestra conservando todos los reactivos del dNTP/Klenow master mix en hielo y sin vortexear después de la adición de klenow. El dNTP/Klenow Master Mix para una muestra fue preparado con 10 µL de dNTP Mix (10 mM de cada dNTP) vial 6, 8 µL de agua grado PCR y 2 µL de Klenow (3'-5'exo) 50 U/µL (vial 5), completando en total 20 µL. Se adicionó a cada muestra del paso inicial (80 µL) 20uL de dNTP/klenow master mix preparado en el paso anterior, de manera que el volumen total fue de 100 µL para cada muestra en este proceso. Se mezclaron bien las muestras por pipeteo y no vortex, después se les dió un spin de 5 segundos y posteriormente se incubaron por 3 horas a 37° C en un termociclador con tapa caliente, protegidas de la luz. La reacción se detuvo por adición de la solución de paro agregando a las reacciones anteriores 21.5 µL de la solución de paro (vial 7 del kit) logrando un total de 121.5 µL de cada tubo. Brevemente, las muestras fueron vortexeadas, se les dió un spin y el contenido de cada tubo se transfirió a tubos de 1.5 ml que contenían 110 µL de isopropanol. Hasta aquí, cada reacción tenía un volumen final de 231.5 µL. Después de vortexear, los tubos se incubaron por 10 minutos a 15 o 25° C

protegidos de la luz. A continuación, fueron centrifugados a 12000 x g por 10 minutos para remover el sobrenadante con una pipeta. Los pellets marcados con Cy3 mostraban un color rosa, y un tono azul los teñidos con Cy5. Luego, se resuspendieron los pellets en 500 µL de etanol al 80% bien frío, disgregando el pellet del tubo por pipeteo. Nuevamente, se sometieron a centrifugación a 12000 x g por 2 minutos, el sobrenadante fue removido con una pipeta y finalmente, el pellet se hidrató en 25 µL de agua inyectable para su cuantificación en NanoDrop. Una vez cuantificadas, se guardaron a -30°C protegidos de la luz y dos días después, se continuó con el protocolo de hibridación como se describe enseguida.

4.6.5 Hibridación del microarreglo.

Se empleó el sistema de hibridación NimbleGen para el alineamiento de Oligos y Sample Tracking Control Kits (STCs). Los STCs son sondas constituidas por 20 bloques de secuencias repetidas que se colocan en el centro y extremos del microarreglo, se utilizan como marcadores del alineamiento y rastreo de muestras en un microarreglo. Las muestras fueron etiquetadas con las cianinas Cy3 (experimental) y Cy5 (control). Se utilizaron 5.6 µL de cada STC. Ambas muestras (fracción metilada y no metilada) se juntaron en un mismo tubo y se colocaron en speed back hasta quedar secas. A cada tubo se adicionó un STC (simple tracking control) distinto que se eligió para cada tubo. Para la muestra 1, SCT # 5; muestra 2, SCT # 17; muestra 3, SCT # 20. Luego de vortexear y dar un spin a cada tubo, se preparó el master mix de la solución de hibridación para 1 slide, agregando 35 µL del buffer de hibridación 2X (vial 1), 14 µL del componente A de hibridación

(vial 2), 1.4 μ L de oligos de alineamiento (vial 3), en un volumen total de 50.4 μ L. Se agregó 14.4 μ L de la solución de hibridación a cada par de muestras (5.6 μ L) para un volumen final de 20 μ L. Se vortexearon e incubaron por 5 minutos a 95°C protegidas de la luz previo a la carga en el mixer. Para cargar las muestras, se utilizaron pipetas y puntas Gilson Microman como recomienda el protocolo, para evitar la formación de burbujas o el derrame de las muestras en el puerto de llenado. Así, la muestra correspondiente al tiempo 24 horas se cargó en el puerto A01, la de 48 horas en A02 y el control en A03. El mixer se cubrió con una fina película adherente y se colocó en el sistema de hibridación. El proceso de hibridación de las muestras sobre el arreglo se hizo a una temperatura de 42° C durante 20 horas. Transcurrido el tiempo, se prepararon las soluciones de lavado de acuerdo a las recomendaciones del protocolo NimbleGen Wash Buffer Kit. El proceso de lavado se realizó sin interrupción para obtener mejores resultados. Primero, antes de remover el mixer del sistema de hibridación, se prepararon los lavados 1, 2 y 3 con 225 mL de agua destilada, 25 mL del buffer de lavado 1, 2 o 3 (según correspondía) y 25 μ L de DTT 1M para un volumen final de 25 mL. Ya listas las soluciones de lavado, se procedió a la remoción del mixer sumergiéndolo en el contenedor con la solución del lavado a 42° C. Se retiró cuidadosamente y sin tocar la superficie del arreglo, la película utilizada para sellar las muestras. Se sumergió el arreglo en un tubo falcon de 50 mL que contenía la solución de lavado 1 durante 30 segundos, agitando vigorosamente para remover la solución de hibridación. Inmediatamente después, se realizó el segundo lavado al transferir la placa a otro tubo falcon que contenía la solución de lavado 2 y durante 1 minuto se

agitó vigorosamente, de forma continua se transfirió al tubo con la solución de lavado 3 y se mantuvo en constante agitación durante 15 segundos. Ya por último, se dejó secando durante 2 minutos. Al terminar, se realizó el escaneo.

4.6.6 Escaneo del microarreglo.

Se utilizó el protocolo Scanning two-color NimbleGen arrays del escaner MS 200 y el MS 200 Data Collection software que se encuentran en la Unidad de Genómica del Instituto Nacional de Cancerología. El proceso fue realizado siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, antes de iniciar el escaneo, se realizó el test inicial ILC del NimbleGen MS200 software para verificar el buen funcionamiento del equipo. En la ventana principal del software se establecieron los parámetros con los que se inició el escaneo, indicando una velocidad y sensibilidad alta, la lectura de los canales 1 y 2 correspondientes a láser verde a 532 nm y rojo a 635 nm, una intensidad de láser 1 y 2 al 100% y finalmente, ya revisados los parámetros anteriores, comenzó el escaneo. Después, el arreglo se insertó en dirección al código de barras, con el botón insert/eject, el scanner comenzó el reconocimiento. El proceso duró 25 minutos, las imágenes resultantes fueron almacenadas en formato .tiff de forma separada para su análisis posterior mediante DEVA software.

4.6.7 Análisis de imágenes del microarreglo.

Las imágenes y datos obtenidos del escaneo del microarreglo 3x720K de Roche NimbleGen fueron extraídos, analizados y visualizados mediante el software DEVA versión 1.2. DEVA software es una aplicación de cómputo que automatizó

la extracción de imagen y el análisis primario de los datos usando los diseños de los microarreglos que oferta NimbleGen, de manera que solo con la imagen en formato .tiff el programa pudo detectar que se trataba de un arreglo de metilación 3X720K. Se verificó el código de barras del microarreglo (500238) y automáticamente las imágenes fueron cortadas y alineadas. Para el análisis de las imágenes se obtuvo una versión gratuita por 30 días que fue descargada de <http://www.NimbleGen.com/DEVA> a una computadora con 8GB disponibles en memoria. Una vez instalado, se creó el proyecto de análisis especificando tanto el directorio a la que serían exportados los archivos generados, así como la carpeta en que se encuentran los diseños y la anotación contenida en el CD que provee el distribuidor a la compra del microarreglo. Se estableció que la función DNA methylation workflow sería el flujo de trabajo para el análisis. No se modificaron los valores establecidos por default. Ya elegido el flujo de trabajo, se cargaron los diseños de las sondas a partir de los archivos .ncd y los demás anotación contenida en el CD. Se especificó que el diseño del microarreglo (HG18), y se capturó el código de barras correspondiente (520238). Con la información anterior, fue posible verificar la calidad del alineamiento en la función “hybridization plan” del programa y así obtener el reporte de los SCTs (simple control trackings) que fueron utilizados como referencia en la hibridación del microarreglo. Este reporte permitió comprobar que la alineación de las imágenes fue correcta. Ya con los parámetros anteriores verificados, se corrió el análisis y como resultado, se obtuvieron gráficos con la información sobre los transcritos primarios, las islas CpGs, los sitios de inicio de la transcripción y su localización en cada cromosoma. Para convertir estos archivos gráficos a tablas, se crearon los archivos de

anotación en formato .gff tal como lo sugiere el manual de usuario de este software. Los archivos de anotación obtenidos, pudieron ser analizados como hojas de cálculo en Microsoft Excel 14.0. Los datos fueron organizados en tres grupos para cada una de las condiciones de análisis: grupo 1, islas CpGs; grupo 2, sitios de inicio de la transcripción; grupo 3, transcritos primarios. Los datos obtenidos permiten múltiples posibilidades de análisis. Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo corresponden únicamente a los transcritos primarios. Se establecieron puntos de corte para formar cuatro categorías de acuerdo a los valores normalizados de la tasa de cambio obtenidos por DEVA software. Así, a los valores ($\log_2$) entre 0 y 2 se asignó la etiqueta “metilados” (categoría 1); a aquellos entre 0 y -2 “desmetilados” (categoría 2); valores >2 “hipermetilados” (categoría 3) y finalmente, < -2 “hipometilados” (categoría 4). Una vez que los datos fueron organizados en las categorías correspondientes y para obtener la lista de transcritos primarios que cambiaron su estado de metilación por efecto del tratamiento con resveratrol, se compararon las categorías metilados e hipermetilados en la condición control Vs desmetilados e hipometilados de la condición con tratamiento por 24 y 48 horas. Así también las categorías desmetilados e hipometilados del control Vs metilados e hipermetilados de las condiciones experimentales. Mediante este proceso de comparación, obtuvimos la lista de genes que cambiaron su estado de metilación en respuesta al tratamiento con resveratrol. Para determinar las rutas celulares de importancia en cáncer, utilizamos dos herramientas bioinformáticas: reactome.org y string-db.org que permitieron la identificación de las relaciones ya reportadas entre los genes anotados y los procesos celulares en los que están involucrados.

V. RESULTADOS.

5.1 Efecto del resveratrol en la viabilidad de las células MDA-MB-231.

Esta sección del trabajo experimental se realizó para evaluar la toxicidad del resveratrol en células de cáncer de mama triple negativo mediante el uso del colorante tetrazolio (MTT) tal como se describe en materiales y métodos. Brevemente, la viabilidad celular fue medida indirectamente por la reducción de tetrazolio a un producto de formazán en las células vivas. La cantidad de MTT-formazán reducido fue determinado espectrofotométricamente. Los resultados muestran que los valores de absorbancia (570 nm) obtenidos en este ensayo disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de resveratrol (50, 100, 150, 200 y 250 μM). De tal manera que a las 24 horas del tratamiento con resveratrol a una concentración de 50 μM y 150 μM , la viabilidad de las células disminuyó un 20% y 68% respectivamente. Sin embargo, a las 48 horas del tratamiento con resveratrol a una concentración de 50 μM , la viabilidad solo bajó 10% y a la concentración de 150 μM la viabilidad fue del 55% (**figura 13**). Al utilizar concentraciones muy altas (250 μM) la mayoría de las células (89%) no sobrevivieron. Los valores de densidad óptica permitieron calcular la dosis que en un periodo de tiempo definido (24 y 48 horas) mató el 50% de la población de células evaluadas (DL50). Se determinó por análisis probit que la concentración a la cual el 50% de las células murieron por efecto del resveratrol fue de 134 μM y 168 μM a las 24 y 48 horas respectivamente. Por tanto, se tomó la decisión de utilizar una concentración de 100 μM de resveratrol para los tratamientos realizados a las células en los ensayos posteriores.

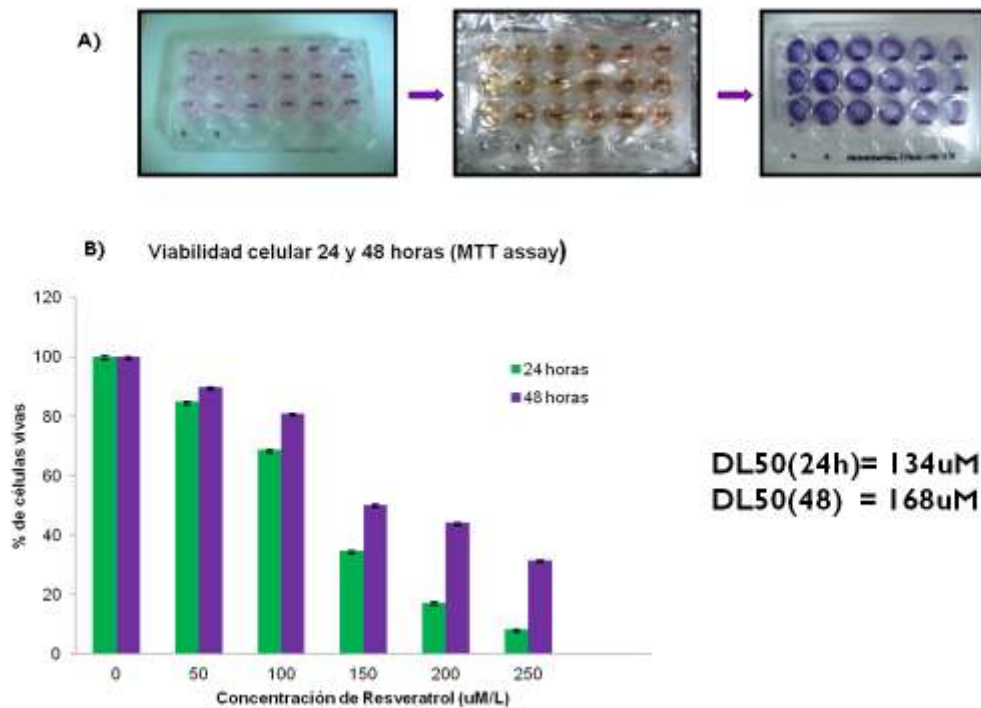


Figura 13. Viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con diferentes concentraciones de resveratrol. (A) Placas de 24 pozos con células MDA-MB-231 (1×10^6). De izquierda a derecha, se muestran los pozos que contienen células sin tratamiento, células tratadas con resveratrol (50, 100, 150, 200 y 250 µM) por triplicado durante 24 y 48 horas. Se observó un cambio de color que va de amarillo a violeta producido por las células vivas cuando ocurrió la reducción del tetrazolio (MTT) a cristales de formazán. (B) La gráfica muestra el porcentaje de células que sobrevivieron al tratamiento con resveratrol a distintas concentraciones. Las barras en color verde y morado corresponden al porcentaje de viabilidad después del tratamiento con resveratrol a las 24 y 48 horas respectivamente.

5.2 Efecto del resveratrol en la apoptosis de células MDA-MB-231.

5.2.1 Células MDA-MB-231 en apoptosis detectadas por citometría de flujo.

Con la finalidad de evaluar el efecto del resveratrol en la apoptosis de células MDA-MB-231, se utilizó el kit de apoptosis de invitrogen para teñir a las células con Alexa Fluor 488-A y Ioduro de propidio siguiendo las recomendaciones del fabricante. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio que tiene una alta afinidad a fosfatidil-serina (PS), contiene una etiqueta de biotina o un fluoróforo que permite identificar células apoptóticas por unión a fosfatidilserina expuesta al exterior. En células vivas normales, la PS no está expuesta al ambiente externo celular y la fluorescencia resultante es mínima. Como era esperado, las células apoptóticas mostraron una fluorescencia verde, las células muertas una fluorescencia roja y las células vivas, poca o nula fluorescencia. Cada ensayo (24 y 48 horas) se realizó por triplicado. Los datos obtenidos del citómetro de flujo, mostraron que hubo 14% más células apoptóticas teñidas por anexina V cuando éstas fueron tratadas con resveratrol (100 μ M) a las 24 horas, respecto de las células que no recibieron tratamiento (**figura 14**). De 10,000 células contadas por el citómetro de flujo, solo el 0.3 % de las células no tratadas y el 0.5 % de las células tratadas con doxorrubicina (1 μ M) presentaron apoptosis a las 24 horas. Sin embargo, a las 48 horas, este efecto se incrementó a 8.56 % en células después del tratamiento con doxorrubicina (1 μ M), mientras que la apoptosis en las células tratadas con resveratrol disminuyó de 14.31 % a 6.35 % (**figura 15**).

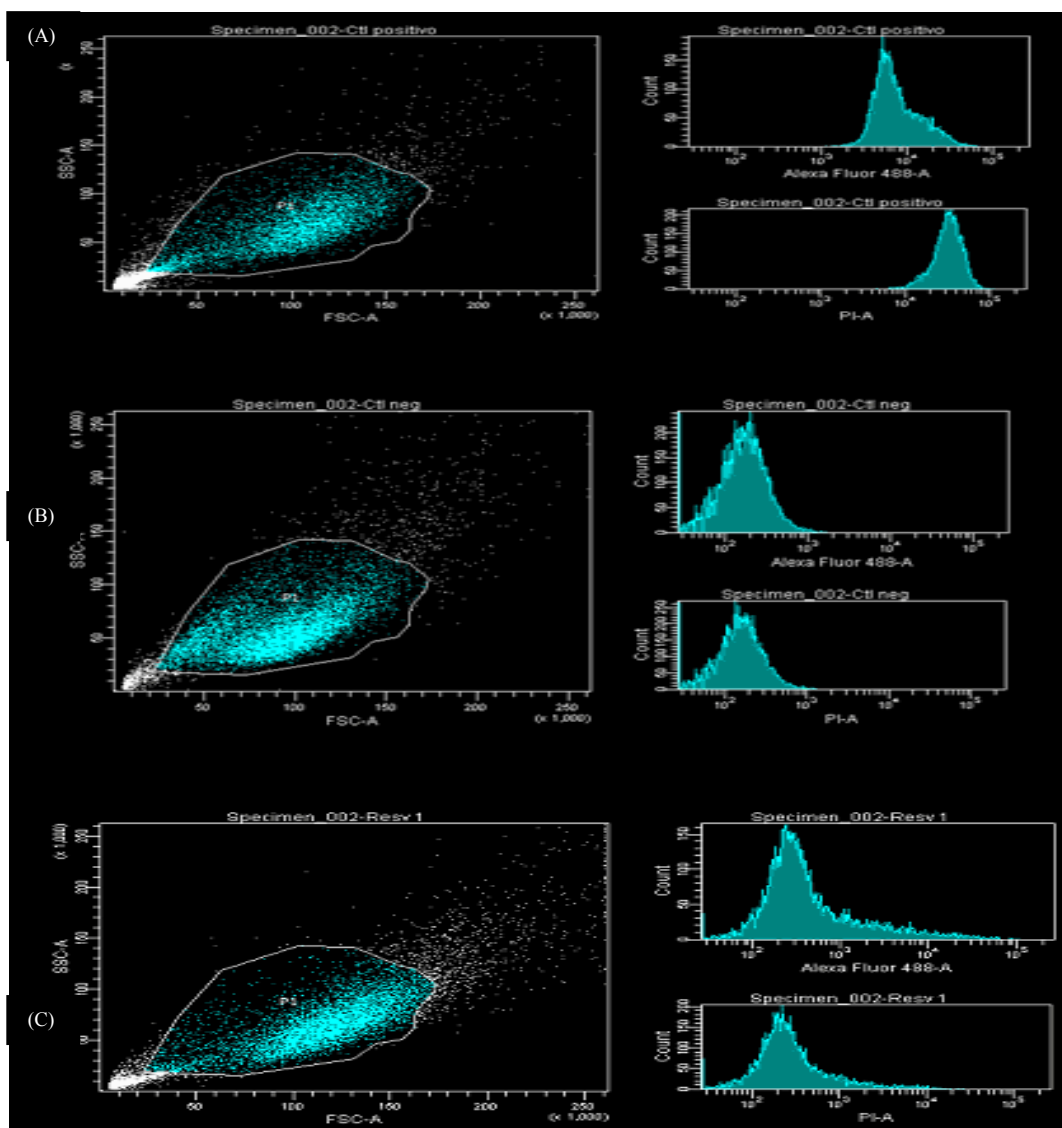
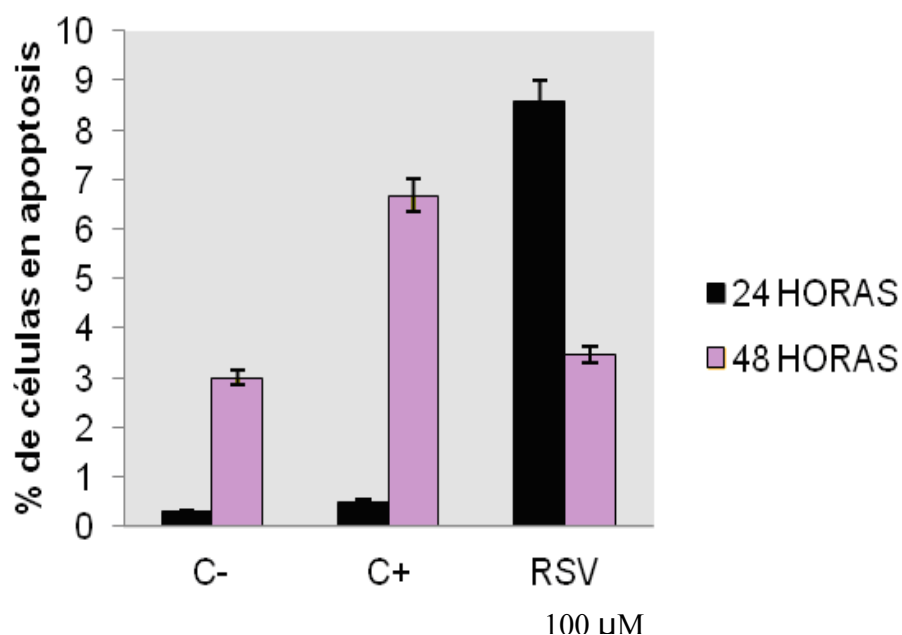


Figura 14. Células MDA-MB-231 teñidas con anexina V-ioduro de propidio para detectar apoptosis mediante citometría de flujo. (A) células MDA-MB-231 tratadas con doxorrubicina 1 μ M (agente inductor de apoptosis), en el panel izquierdo se muestra la región de células contempladas en el conteo (10,000); en el panel derecho, se muestran las células en apoptosis teñidas con Alexa Fluor 488-A y las células necróticas con ioduro de propidio. (B) células MDA-MB-231 sin tratamiento. (C) células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol 100 μ M.



	24 HORAS (%)	48 HORAS (%)
C- (sin tratar)	0.3	3
C+ (doxorrubicina 1 μM)	0.5	8.56
RSV (100 μM)	14.31	6.35

Figura 15. Apoptosis detectada por citometría de flujo a las 24 y 48 horas de tratamiento con resveratrol 100 μM. En el panel superior, las barras en color negro y violeta de la gráfica, corresponden al porcentaje de células en apoptosis a las 24 y 48 horas respectivamente. (C-) células MDA-MB-231 sin tratamiento; (C+) células tratadas con doxorrubicina 1 μM; (RSV) células tratadas con resveratrol 100 μM. La tabla del panel inferior, muestra en resumen los valores porcentuales de apoptosis en ambos ensayos.

5.2.2 Células MDA-MB-231 en apoptosis detectadas por TUNEL.

Dado que la apoptosis es un evento de muerte celular programada que resulta en fragmentación nuclear y citoplásmica, se realizó el ensayo de TUNEL para identificar células MDA-MB-231 en apoptosis, de manera que este proceso celular fue evaluado por la fragmentación del DNA característica de la apoptosis tardía de las células. En el ensayo de TUNEL tal como se describe en materiales y métodos, se utilizó 2′deoxiuridina 5′trifosfato (dUTP) como una etiqueta para los extremos terminales 3′OH libres que se produjeron cada vez que una cadena de DNA se fragmentaba. Estos sitios del DNA etiquetados con dUTPs, pudieron ser identificados por un anticuerpo monoclonal conjugado con un fluorocromo (FITC). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal permitieron observar como previamente se ha reportado (46), que la doxorrubicina (1 μ M) inducedaño al DNA de células MDA-MB-231 a las 24 horas posteriores al tratamiento (**figura 16 A-C**) comparadas con las que no recibieron la doxorrubicina (**figura 16 D-F**). El 60% de las células tratadas con doxorrubicina 1 μ M así como el 15% de las que fueron tratadas con resveratrol 100 μ M por 24 horas (**figura 16 G-I**) resultaron positivas a TUNEL. A las 48 h el 90% de las células dio positivo a TUNEL después del tratamiento con doxorrubicina 1 μ M (**figura 17 A-C**). Así también, el 30% de las células tratadas con resveratrol (**figura 17 G-I**).

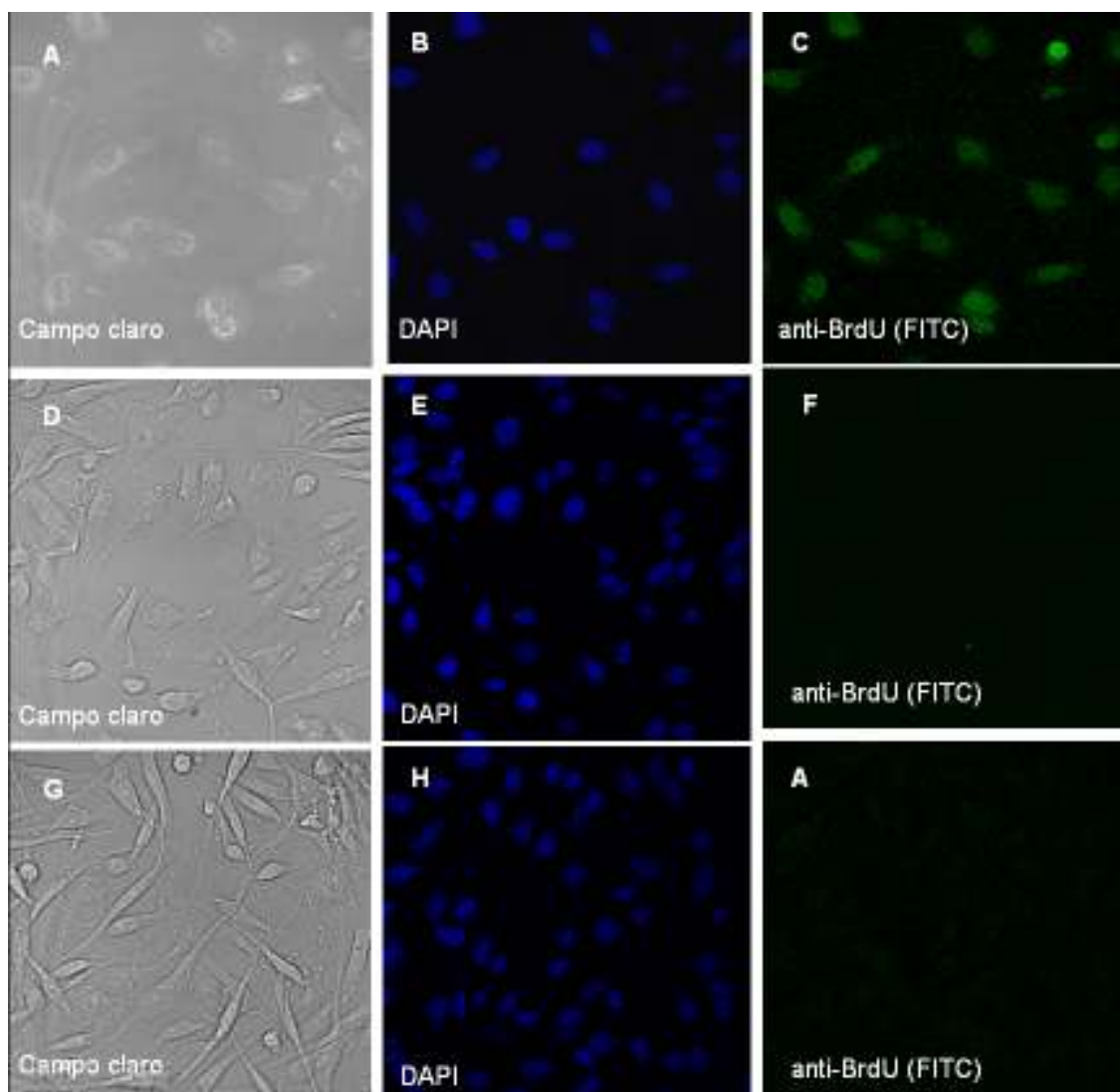


Figura 16. Imágenes de microscopía confocal resultantes del ensayo de TUNEL en células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol 100 μM por 24 horas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado a FITC para detectar las cadenas rotas de DNA por efecto de los tratamientos. (A-C) células tratadas con doxorrubicina 1 μM ; (D-F) células sin tratamiento; (G-I) células tratadas con resveratrol (100 μM).

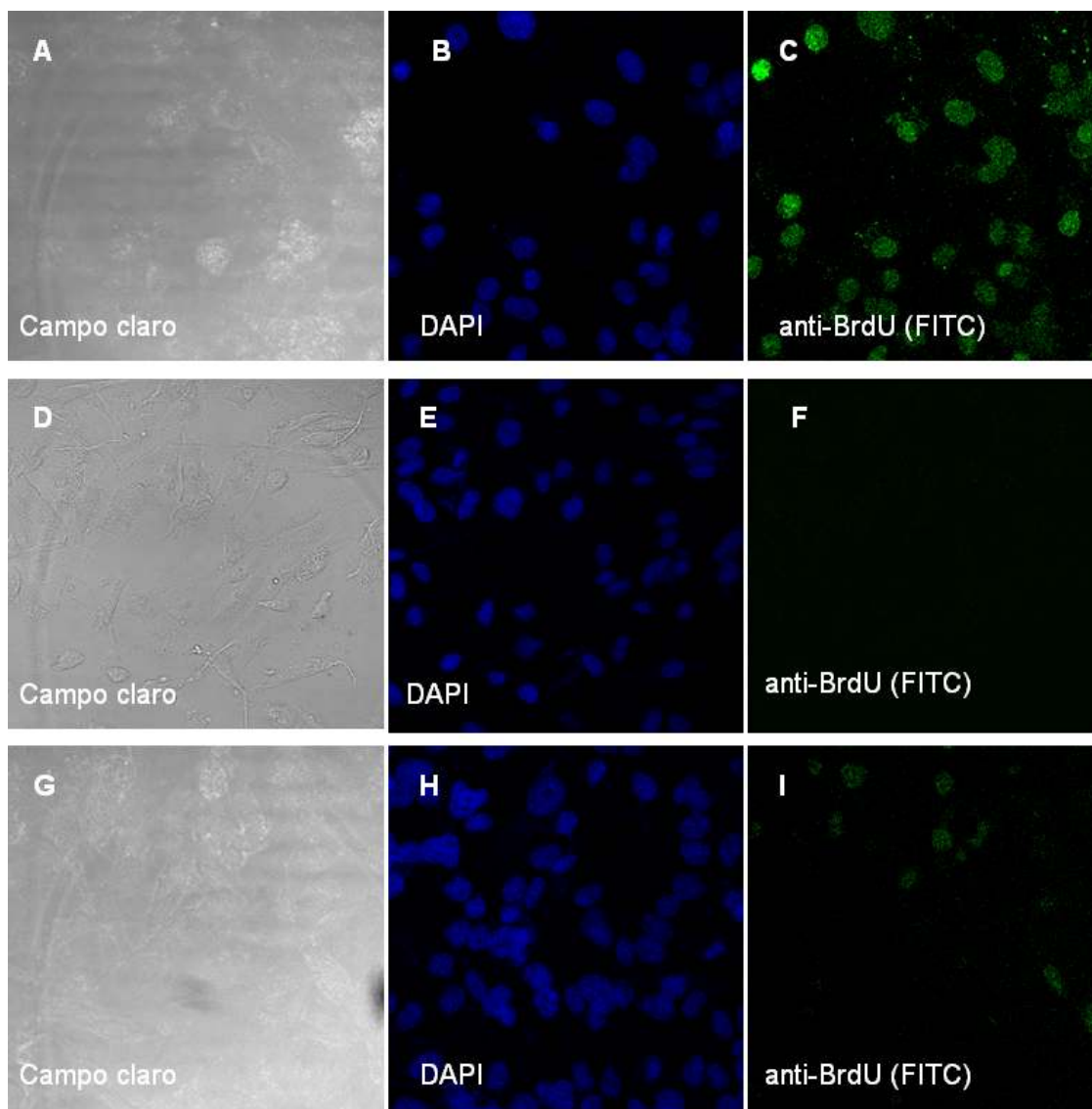


Figura 17. Imágenes de microscopía confocal resultantes del ensayo de TUNEL en células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol 100 μ M por 48 horas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado a FITC para detectar las cadenas rotas de DNA por efecto de los tratamientos. (A-C) células tratadas con doxorubicina 1 μ M; (D-F) células sin tratamiento; (G-I) células tratadas con resveratrol (100 μ M).

5.3 Cambios en la metilación global del ADN de células MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento con resveratrol.

5.3.1 Efectos del resveratrol en la concentración de citosinas metiladas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231.

Con el fin de llevar a cabo un análisis sobre las modificaciones que ocurren en las células tumorales a nivel epigenético cuando son tratadas con resveratrol, se evaluó la concentración de metil-citosinas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231 mediante inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo anti-5-metil-citosina. Esta técnica es utilizada para conocer el perfil global de metilación del DNA que actualmente es considerado como un marcador molecular del cáncer, pues juega un papel determinante en el control de la actividad génica a nivel epigenético. Las imágenes de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-5-metilcitosina, muestran diferencias en el patrón de metilación cuando las células son tratadas con resveratrol 100 μ M durante 24 y 48 horas respecto a las que no recibieron tratamiento (**figuras 18, 19 y 20**).

Se ha reportado que en las células de cualquier tipo de cáncer, entre ellos el cáncer de mama, se presenta un patrón de hipometilación global del genoma que las predispone a sufrir translocaciones y aneuploidías. Esto contribuye a la progresión del tumor, por lo que la hipometilación global está estrechamente relacionada con el grado de malignidad (5). Como era de esperarse, las células MDA-MB-231 que no recibieron tratamiento con resveratrol, mostraron una baja concentración de citosinas metiladas en los nucleosomas como se observa en la

imagen de la figura 18. Como control interno del experimento se comprobó que el anticuerpo secundario no permaneciera en las células en ausencia del anticuerpo primario. En el panel superior de la **figura 18**, se puede ver que en ausencia de anti-5-mc no hay señal de metilación en el núcleo dada por la unión del anticuerpo secundario al primario. Por otro lado, en la **figura 19** se muestra que en células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol (100 μ M) a las 24 horas no hay una diferencia notable de la señal detectada respecto a las células que no recibieron tratamiento. Sin embargo, a las 48 horas, es claro el aumento en la concentración de citosinas metiladas cuya señal se observa en los núcleos al realizar el merge.

Es importante mencionar que simultáneamente a la hipometilación, ocurre hipermetilación que se concentra en islas CpGs de promotores de genes, silenciando genes supresores de tumor. Utilizamos como control positivo de metilación global el fitoquímico epigallocatequina-3- galato (EGCG) a una concentración de 50 μ M (**figura 20**). Este compuesto ha sido previamente reportado como un agente capaz de reactivar genes silenciados por hipermetilación de islas CpGs a nivel de promotores de genes (44). Como se observa en la figura 18, la EGCG es capaz de inducir un aumento en la metilación del ADN de células MDA-MB-231. Cabe resaltar que la imagen superpuesta muestra una mayor localización nuclear del anticuerpo anti-5-metil-citosina en las células MDA-MB-231 tratadas con EGCG por 48 horas que a las 24 horas de tratamiento.

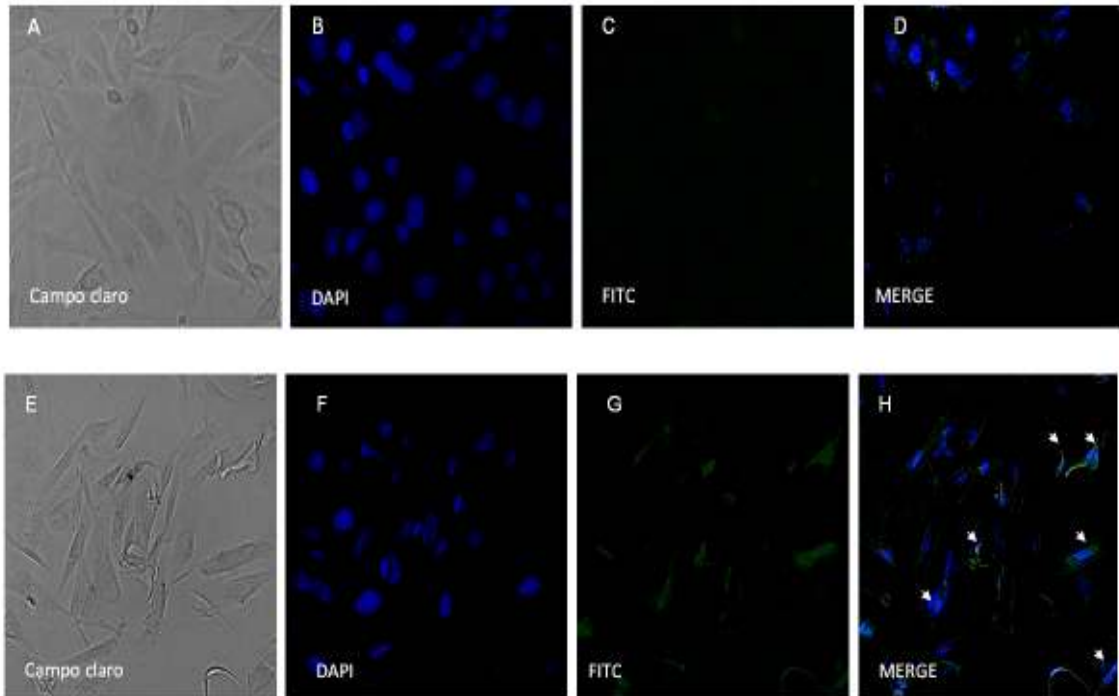


Figura 18. Imágenes de microscopía confocal que muestran la señal de metil-citosinas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231 sin tratamiento. (A-D) células a las que se agregó únicamente el anticuerpo secundario. (E-H) células sin tratamiento a las que se adicionó anti-5-metil-citosina (1:100) y el anticuerpo secundario (1:500). Las flechas indican la localización del anticuerpo anti-5-metil-citosina en los nucleosomas de las células.

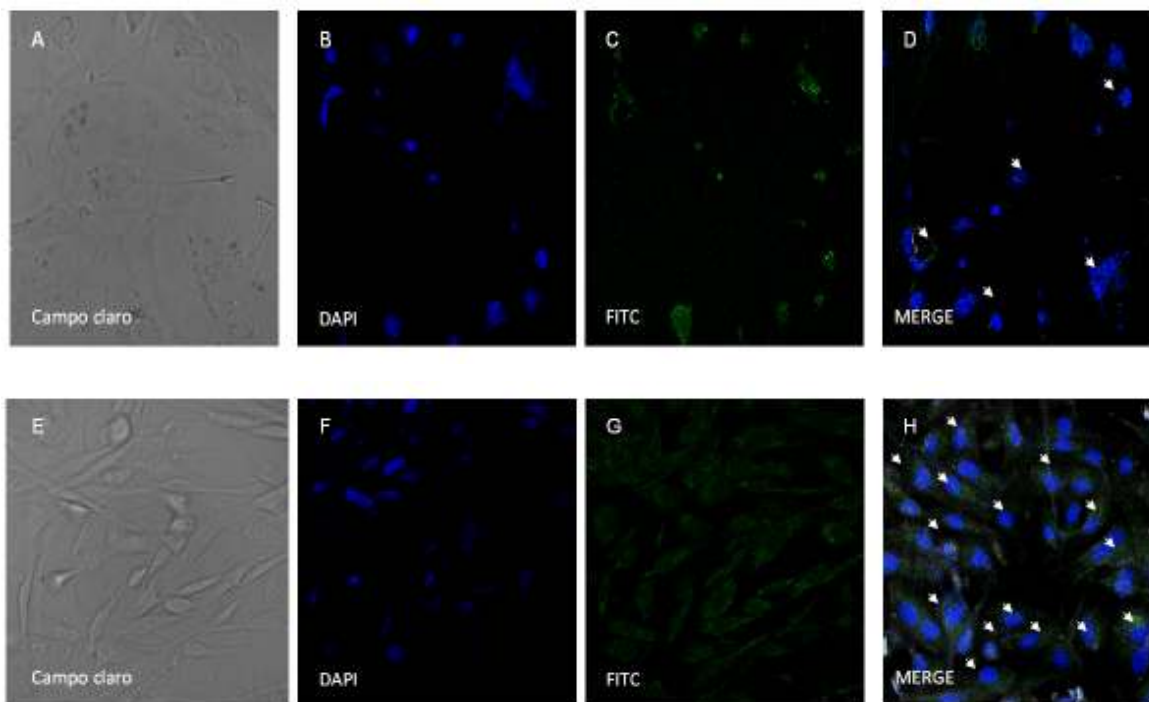


Figura 19. Imágenes de microscopía confocal que muestran la distribución de metil-citosinas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231 posterior al tratamiento con resveratrol por 24 y 48 horas. (A-D) células tratadas con resveratrol (100 μ M) durante 24 horas. (E-H) células tratadas con resveratrol (100 μ M) durante 48 horas e incubadas con el anticuerpo anti-5-metil-citosina (1:100). Las flechas indican la señal correspondiente al anticuerpo anti-5-metil-citosina en los nucleosomas de las células.

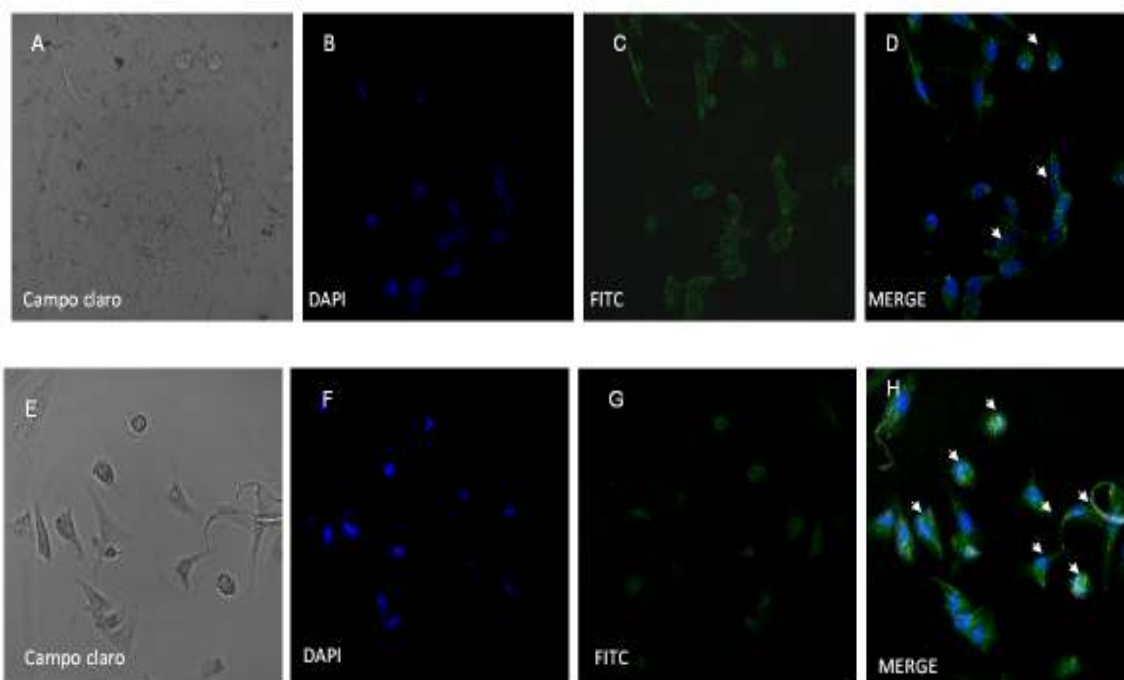
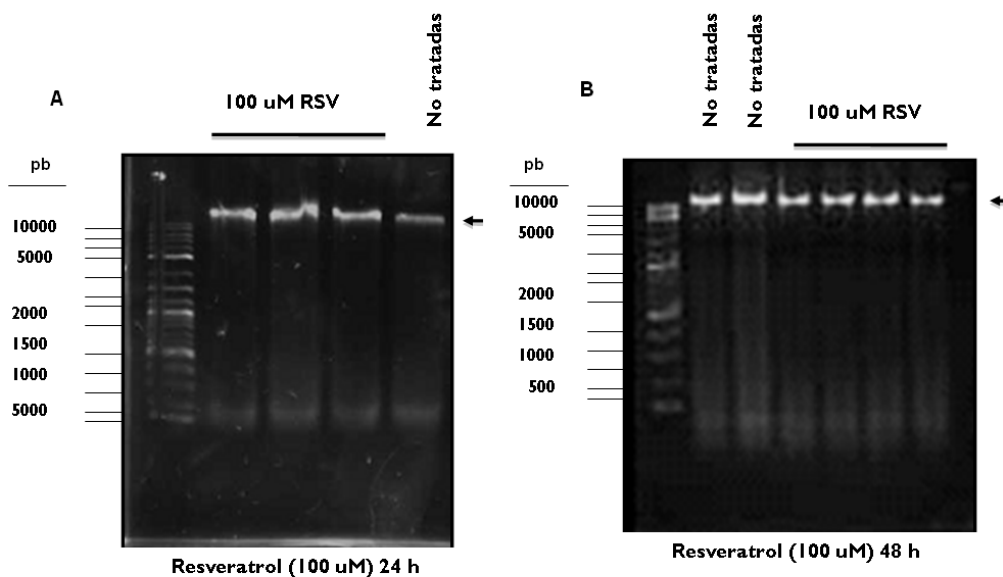


Figura 20. Imágenes de microscopía confocal que muestran la distribución de metil-citosinas en los nucleosomas de las células MDA-MB-231 posterior al tratamiento con EGCG (50 μ M) por 24 y 48 horas. (A-D) células tratadas con EGCG durante 24 horas. (E-H) células tratadas con EGCG durante 48 horas. Las flechas indican la localización de la señal correspondiente al anticuerpo anti-5-metil-citosina (1:100) en los nucleosomas de las células.

5.3.2 Efectos del resveratrol en la metilación de células MDA-MB-231 evaluados por un microarreglo de metilación 3x720K NimbleGen.

Contrariamente al fenómeno de hipometilación global en células de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama, existe evidencia de hipermetilación concentrada en islas CpGs de regiones promotoras de genes, silenciando por ejemplo, genes supresores de tumor (46). Dada la importancia de estos sucesos, y por la ausencia de información sobre efectos que fitoquímicos como el resveratrol tienen sobre los estados de metilación de las células de tumores de cáncer de mama triple negativo, se obtuvo el perfil de metilación mediante un microarreglo 3x720K HG18 Nimblegen con 27,728 sondas de islas CpGs, 22,532 promotores y 30,848 transcritos. Este microarreglo permitió obtener simultáneamente el metiloma de las células MDA-MB-231 en tres condiciones: sin tratamiento y tratadas con resveratrol (100 μ M) por 24 y 48 horas.

Como primer paso, se obtuvo DNA de alta calidad a partir de 1×10^6 células mediante método de fenol-cloroformo. La integridad del DNA de las células tratadas y no tratadas se muestra en la **figura 21**. Posteriormente, el DNA fue procesado mediante protocolo aPRIMES. Este protocolo se basa en la obtención de fracciones genómicas diferencialmente metiladas a partir del DNA obtenido de las células tratadas y no tratadas. El protocolo aPRIMES comienza sometiendo el DNA a digestión enzimática con la enzima MseI para fragmentarlo, los extremos resultantes de este proceso fueron ligados con la enzima DNA T4 ligasa.



$A_{260}/A_{280} > 1.7$ y $A_{260}/A_{230} > 1.6$

Figura 21. Gel de Agarosa al 1.2% que muestra integridad del DNA teñido con bromuro de etidio de células MDA-MB-231.(A) DNA de células tratadas y no tratadas con resveratrol durante 24 horas. (B) DNA de células tratadas y no tratadas con resveratrol durante 48 horas.

Los fragmentos obtenidos de la digestión-ligación fueron menores a 100 pb como se observa en el gel de agarosa de la **figura 22**. Para continuar, se realizó una segunda digestión con las enzimas Acil, HinPII y HpaII en buffer NEB1 para obtener la fracción metilada y se utilizó la enzima McrBc para la fracción no metilada de cada muestra. Para comprobar la eficiencia de la digestión se tomó una pequeña cantidad del volumen final de cada fracción (2 μ L) y se agregaron las enzimas de manera inversa, es decir a la fracción metilada se adicionó 1 μ L de McrBc y a la no metilada 1 μ L de cada enzima del cóctel de enzimas Acil, HinPII y HpaII de manera tal que se realizó la amplificación de los controles de digestión descrita en la metodología y los productos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 1.5%. Los fragmentos resultantes fueron casi imperceptibles y mayores a 100pb que se observaron como un barrido (**figura 23** carriles 3, 5, 7, 9, 11 y 13). De esta manera se pudo continuar con el protocolo realizando la amplificación de las fracciones metiladas y no metiladas mediante PCR. Se purificaron los productos de PCR utilizando Wizard SVGel and PCR clean-up system siguiendo las recomendaciones del protocolo. En el gel de agarosa al 1.5% de la figura 23, se muestran cada una de las fracciones metiladas y sus controles. Así, en los carriles 2 a 4 se observan la fracción metilada y no metilada con sus controles respectivos en los carriles 3 y 5 de células tratadas con resveratrol 100 μ M por 24 horas. En los carriles 6 y 8 se observa la fracción metilada y no metilada con sus controles respectivos en los carriles 7 y 9 respectivamente de células tratadas con resveratrol 100 μ M por 48 horas. En los carriles 10 y 12 se observa la fracción metilada y no metilada de la condición células sin tratamiento. Cada control corresponde a DNA metilado sujeto a digestión con enzimas HinPI, Acil, HpaII. Los

controles de las fracciones no metiladas corresponden a DNA sujeto a digestión con McrBC. La cantidad de ADN obtenido después de la purificación fue de 6.1 a 14.43 µg, cantidad suficiente para realizar el marcaje con las cianinas Cy3 (ADN metilado) y Cy5 (ADN no metilado). Se obtuvieron de 21.6 a 57.92 µg de las fracciones metiladas y no metiladas de las muestras marcadas y purificadas (**tabla 5**). Esta cantidad fue suficiente para cubrir los 15 µg que se requerían para la hibridación al microarreglo de metilación 3x720K cuyo código de barras es 520238.

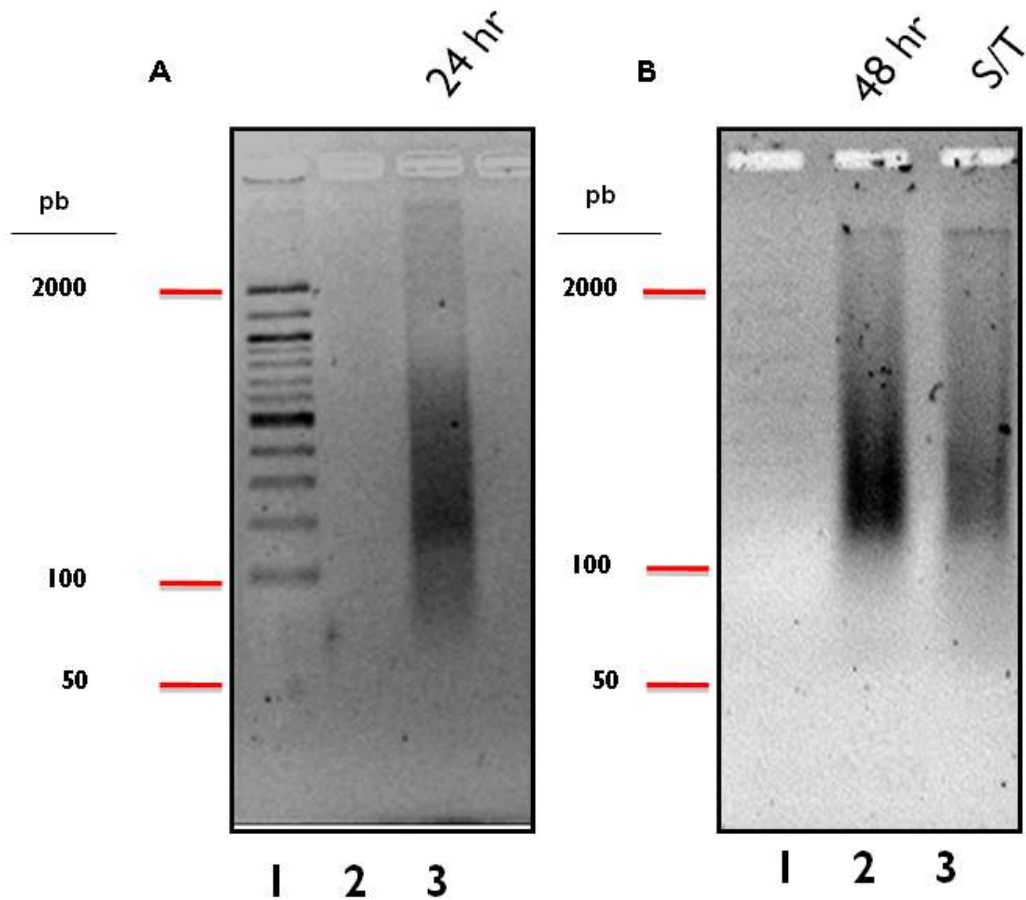


Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% que muestra el tamaño de los fragmentos de DNA resultantes de la digestión con MseI y ligación con DNA T4 ligasa. (A) Carril 1 ladder 50 a 2000 pb. Carril 2 vacío; carril 3 DNA de células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol 100 μ M por 24 horas sujeto a digestión con MseI y T4 ligasa. (B) carril 1 ladder 50 a 2000pb; carril 2 DNA de células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol 100 μ M por 48 horas sujeto a digestión con MseI y T4 ligasa; carril 3 DNA sujeto a digestión con MseI y T4 ligasa de células MDA-MB-231 sin tratamiento.

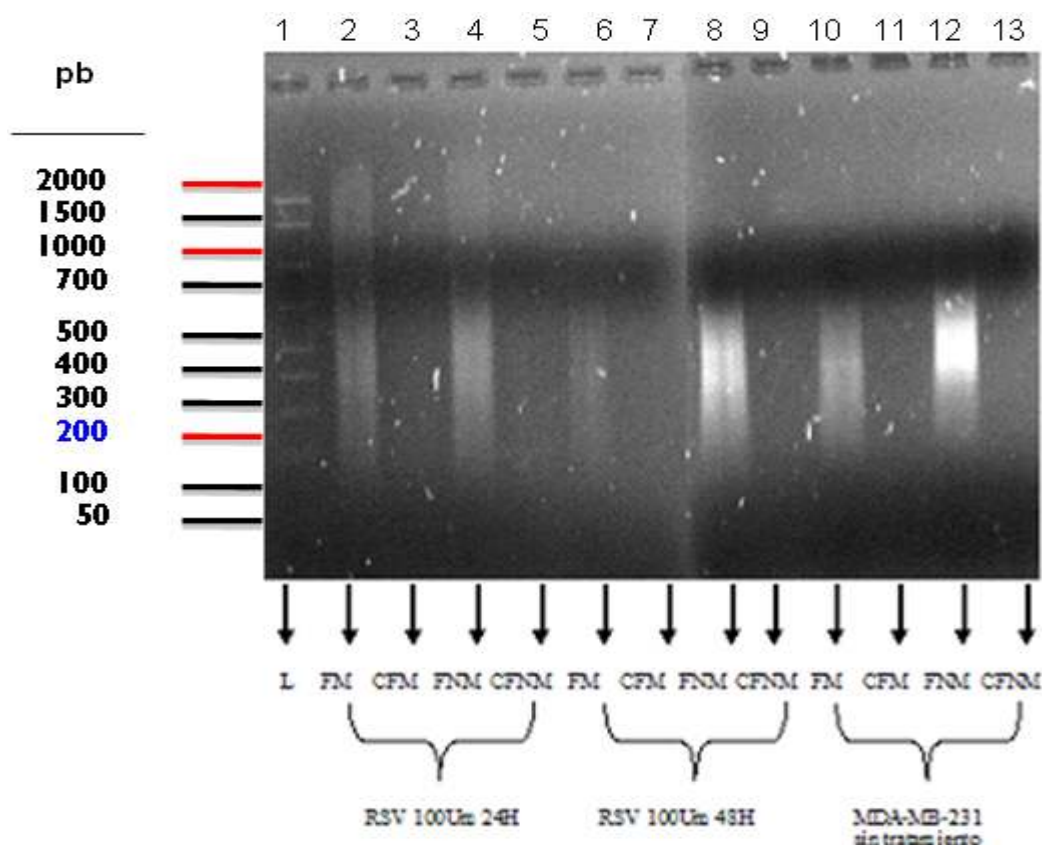


Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% que muestra el resultado de la segunda digestión enzimática para obtener las fracciones genómicas metiladas y no-metiladas. Carril 1 marcador de peso molecular (50-2000 pb). Carriles 2 y 4 fracción metilada y no metilada respectivamente de células tratadas con resveratrol (100 μ M) por 24 horas. Carriles 3 y 5 controles de digestión enzimática de fracción metilada y no metilada. Carriles 6 y 8 fracción metilada y no metilada respectivamente de células tratadas con resveratrol (100 μ M) por 48 horas. Carriles 7 y 9 controles de digestión enzimática correspondientes a la fracción metilada y no metilada. Carriles 10 y 12 fracción metilada y no metilada respectivamente de células no tratadas y sus respectivos controles de digestión se cargaron en los carriles 11 y 13.

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.
FMRSV24h	241.03	4.821	2.513	1.92	2.34	50	230	2.062
FNMRSV24h	270.1	5.402	2.809	1.92	2.08	50	230	2.591
FMRSV48h	116.57	2.331	1.227	1.9	1.49	50	230	1.564
FNMRSV48h	288.74	5.775	3.029	1.91	2.06	50	230	2.802
FMMDAs/t	121.95	2.439	1.273	1.92	1.94	50	230	1.26
FNMDAs/t	258.06	5.161	2.72	1.9	2.31	50	230	2.23
CFMRSV48h	29.12	0.582	0.296	1.97	1.45	50	230	0.401
CFNMRSV48h	29.31	0.586	0.324	1.81	1.44	50	230	0.408
CFMMDAs/t	29.76	0.595	0.327	1.82	1.53	50	230	0.388
CFNMMDAs/t	27.23	0.545	0.285	1.91	1.55	50	230	0.35

Total FMRSV24h=> 12.05 ug **FMRSV48h=> 5.82ug** **FMMDA s/t => 6.1ug**
Total FNMRSV24h=>13.5ug **FNMRSV48h=>14.43ug** **FNMDA s/t=> 12.9ug**

Tabla 5. Valores de la concentración y absorbancia de las fracciones genómica metiladas y no-metiladas obtenidas de la segunda digestión enzimática después de la purificación. FMRSV24h/FMRSV48h/FMRSVs/t fracción metilada obtenida del DNA de células tratadas con resverarol (100 μ M) durante 24 o 48 horas o sin tratamiento (s/t) según corresponde. CFMRSV48h/CFMRSVs/t control de digestión de la fracción metilada del ADN de células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol (100 μ M) por 48 horas o sin tratamiento (s/t) según corresponde. CFNMRSV48h/CFNMRSVs/t control de digestión de la fracción metilada del ADN de células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol (100 μ M) por 48 horas o sin tratamiento (s/t) según corresponde.

La hibridación fue correcta, de acuerdo a los parámetros de calidad que resultaron del escaneo mediante MS200 scanner. Las imágenes tomadas a 532 nm y 635 nm fueron guardadas por separado e importadas y procesadas por DEVA software de NimbleGen (**figura 24**). Se observan diferencias visibles en el nivel de metilación entre las tres condiciones: células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol 100 μ M (A01), tratadas con resveratrol por 48 horas (A02) y sin tratamiento (A03). El alineamiento de las imágenes fue corroborado por un valor de alineamiento menor a 0.16 y la correspondencia de SCTs, de manera que para A01 se utilizó un simple control tracking 5, para A02 sct 17 y para A03 sct 20. El reporte métrico experimental muestra el plan de hibridación utilizado (**tabla 6**). Al iniciar DEVA software se estableció el flujo de trabajo de metilación del DNA para el análisis de las imágenes. En este flujo de trabajo se tomaron los parámetros default que el programa establece para el análisis de la metilación (**figura 25**). Una vez que se comprobó la calidad del alineamiento y se realizó el plan de hibridación, el análisis corrió exitosamente dando como resultado 3 archivos de anotación (.gff) que permitieron visualizar gráficamente la distribución de las islas CpGs en cada uno de los cromosomas y los peaks de metilación de estas islas CpGs, los transcritos primarios y los sitios de inicio de la transcripción para cada gen como se muestra en la **figura 26**. Para tener una imagen alternativa y complementaria de los datos obtenidos, los archivos fueron exportados a SignalMap NimbleGen (datos no mostrados). Con esto se pudo obtener la localización cromosómica y el score de metilación del gran conjunto de valores normalizados. En ambas aplicaciones se observaron cambios en los patrones de metilación de las islas CpGs entre las tres condiciones analizadas.

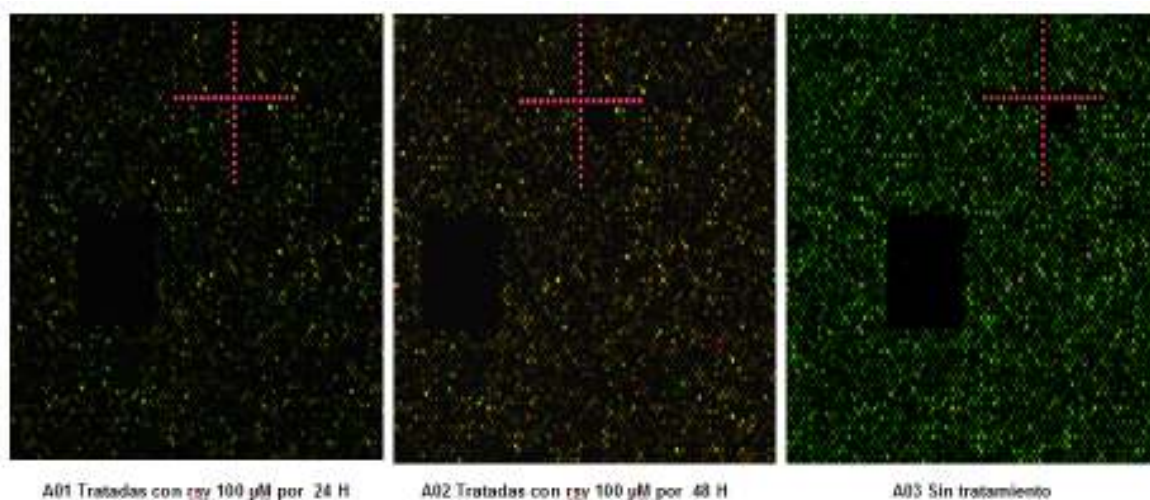
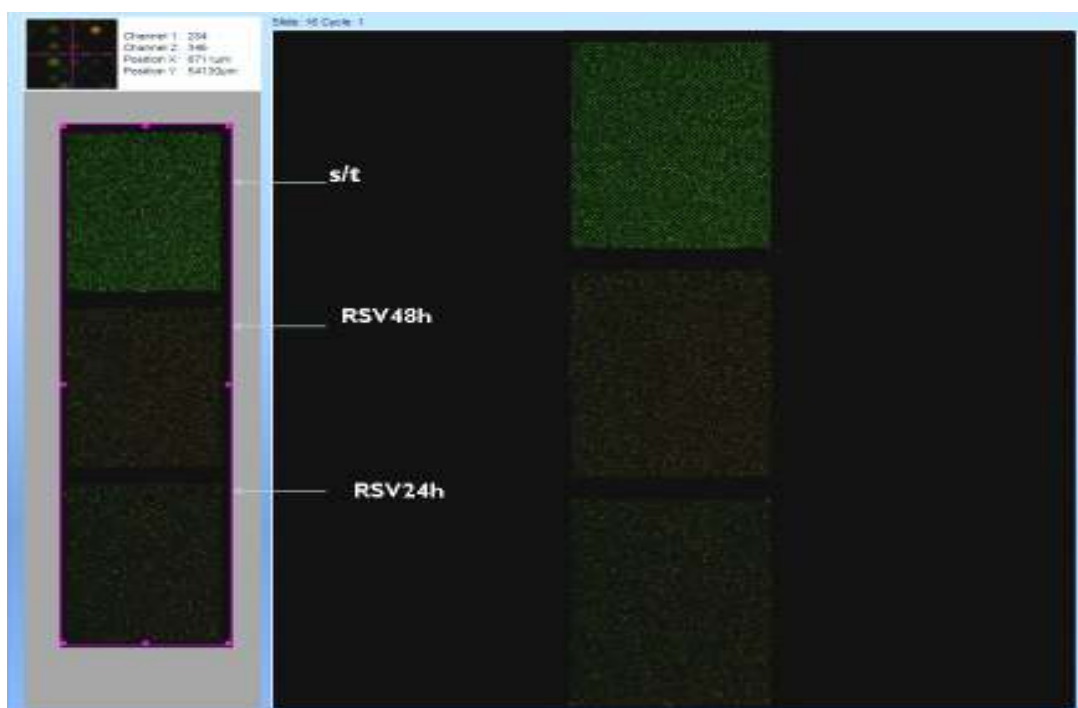


Figura 24. Imágenes del microarreglo de metilación 3x720K obtenidas del equipo de escaneo MS200 de Roche NimbleGen. A01, A02 y A03 muestran los spots metilados (rojo) y no metilados (verde) del ADN de células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol por 24, 48 horas y sin tratamiento respectivamente.

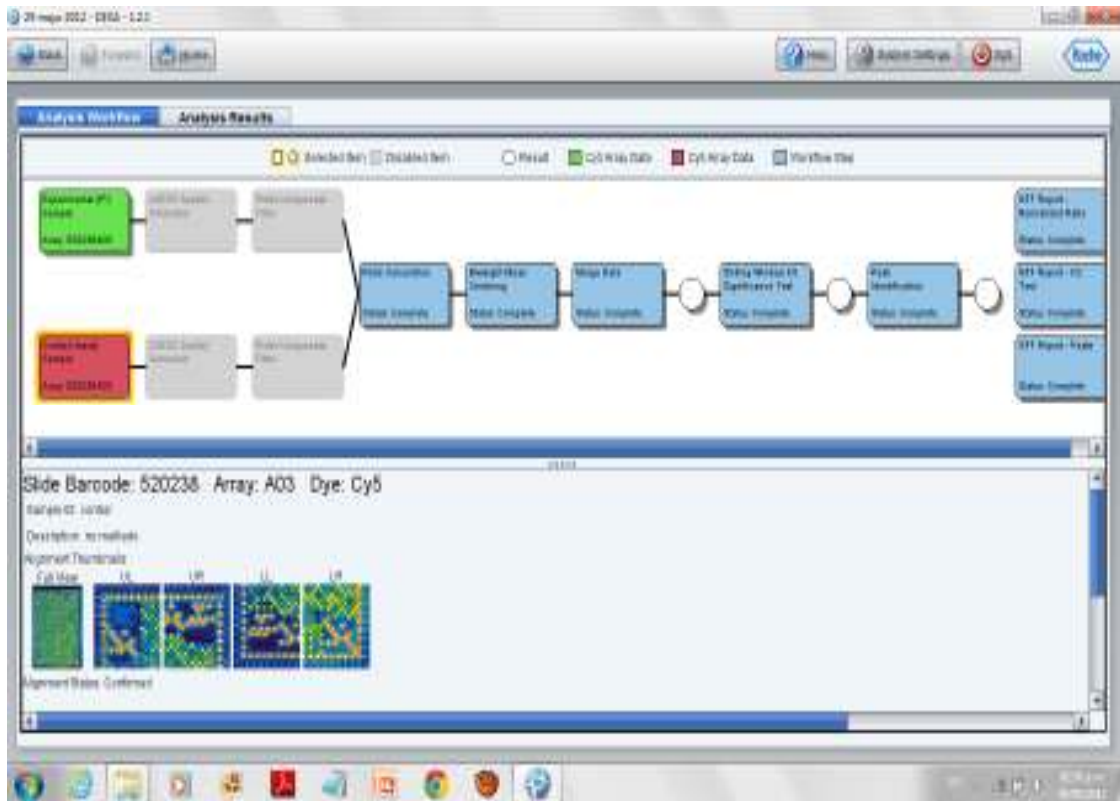


Figura 25. Flujo de trabajo de metilación del DNA requerido en el DEVA software para el análisis de imágenes y la obtención de datos del microarreglo. La imagen muestra en el panel superior los pasos que el flujo de trabajo realizar durante el análisis de las imágenes del microarreglo de metilación. En el panel inferior se muestra el alineamiento de las imágenes del microarreglo en base a las sondas o SCTs.

Roche NimbleGen, Inc. DEVA 1.2.1. For Life Science Research only. Not for use in diagnostic procedures.

IMAGE_NAME	BARCODE	ARRAY_ID	DESIGN_NAME	SAMPLE_NA	SAMPLE_DES	SAMPLE_ORG	INTERQUART
520238A01_20:	520238	A01	100718_HG18_CpG_Refseq_Prom_MeDIP	24 horas	metilado	Homo sapiens	1.554
520238A01_20:	520238	A01	100718_HG18_CpG_Refseq_Prom_MeDIP	24 horas	no metilado	Homo sapiens	1.508
520238A02_20:	520238	A02	100718_HG18_CpG_Refseq_Prom_MeDIP	48 horas	metilado	Homo sapiens	1.63
520238A02_20:	520238	A02	100718_HG18_CpG_Refseq_Prom_MeDIP	48 horas	no metilado	Homo sapiens	1.505
520238A03_20:	520238	A03	100718_HG18_CpG_Refseq_Prom_MeDIP	control	metilado	Homo sapiens	1.563
520238A03_20:	520238	A03	100718_HG18_CpG_Refseq_Prom_MeDIP	control	no metilado	Homo sapiens	1.478

RATIO_RANGE	SIGNAL_RANGE	UNIFORMITY	UNIFORMITY	NUM_EMPTY	MEAN_EMPTY	NUM_EXPER	MEAN_EXPER	NUM_RANDOM	MEAN_RANDOM
0.298	0.17	3971.002	0.032	741877	1185.645	714794	3971.076	3000	1938.783
0.298	0.442	2810.845	0.076	741877	1052.68	714794	2811.561	3000	1359.445
0.27	0.141	4161.228	0.02	741877	1006.523	714794	4161.371	3000	2014.903
0.27	0.392	4070.868	0.078	741877	1411.82	714794	4071.937	3000	2032.981
0.243	0.308	11900.896	0.05	741877	2593.004	714794	11903.192	3000	6573.91
0.243	0.529	3314.457	0.102	741877	1052.903	714794	3315.624	3000	1819.155

Tabla 6. Valores reportados en el archivo experimental metrics. txt del plan de hibridación generados por el software DEVA de Roche NimbleGen. Los valores de esta tabla son utilizados como control del calidad del análisis que el software realizó. El número 520238 corresponde al código de barras, HG18 es el diseño de las sondas realizado en 2006 y que fue utilizado en el microarreglo; los valores del panel inferior, entre los que se encuentran: rango de señal, uniformidad, etc., son los parámetros que evalúan la calidad del plan de hibridación diseñado para el análisis.

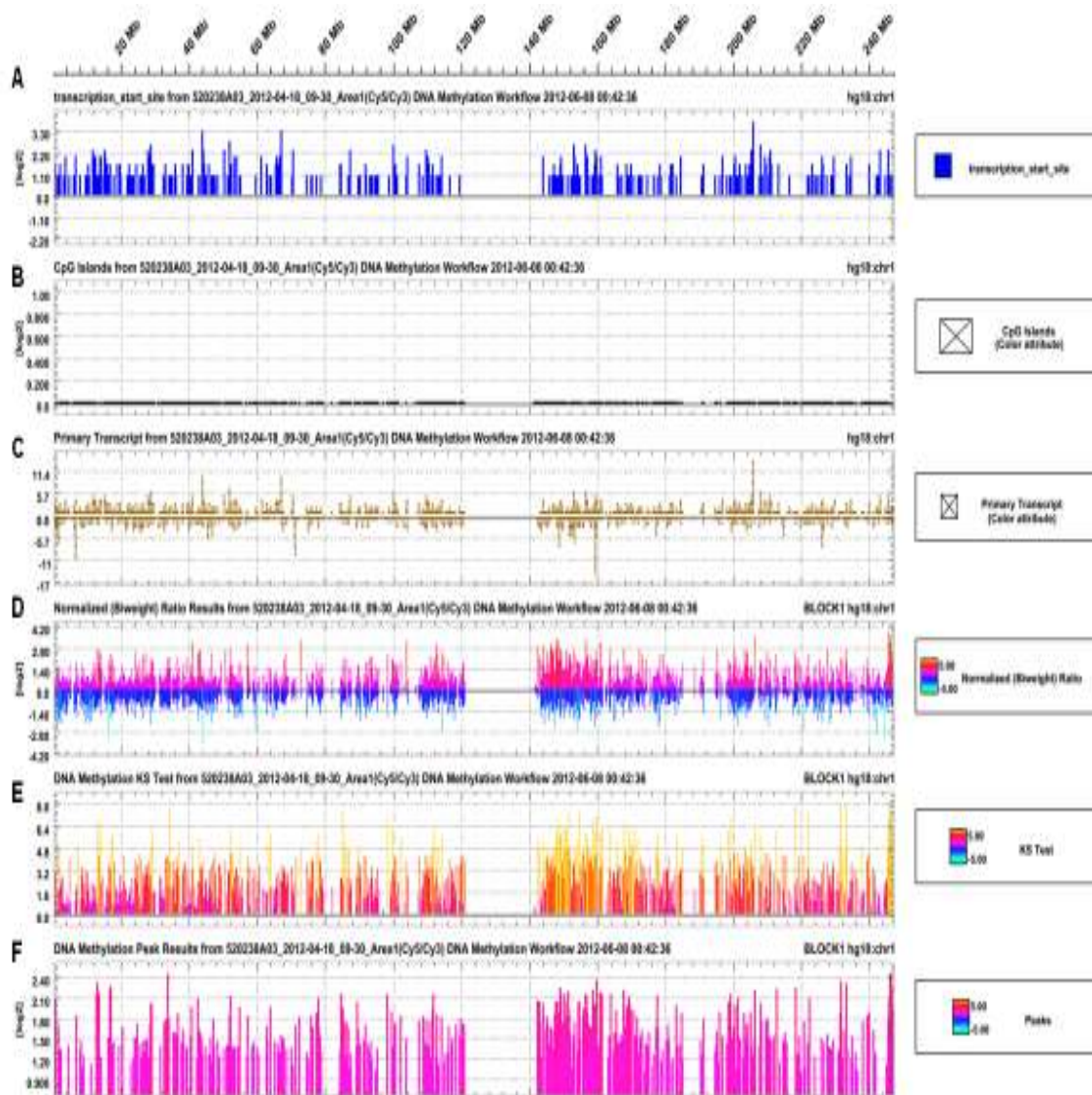


Figura 26. Mapa de anotación que resulta del análisis de metilación por DEVA software. A) distribución y localización de los sitios de inicio de la transcripción en el cromosoma1. B) distribución y localización de las islas CpGs en los promotores de genes del cromosoma 1. C) distribución y localización de los transcritos primarios en el cromosoma 1. D) datos normalizados de los valores de metilación de islas CpGs del cromosoma 1. E) Valores de la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov. F) Puntuaciones máximo promedio de las sondas de ese pico.

5.3.3 Genes modulados a nivel epigenético en células MDA-MB-231 como respuesta al tratamiento con resveratrol.

Los datos se procesaron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Mediante el software DEVA NimbleGen analizaron las imágenes del microarreglo de metilación, los resultados obtenidos fueron cargados a una base de datos en Excel. El total de islas CpGs en la condición control fue de 20,515, de las cuales 1,138 presentaron una tasa de cambio (Log_2) mayor a 2 por lo que se agruparon en la categoría de islas CpGs hipermetiladas, 731 tuvieron un valor menor a -2 y se clasificaron como islas CpGs hipometiladas. Las restantes 31,724 fueron metiladas o desmetiladas por sus valores intermedios. Para A01 se obtuvieron 38,757 islas CpGs, 3,652 hipermetiladas y 3,381 hipometiladas. Para A02 se contaron 40,878 islas CpGs, 2,990 hipermetiladas y 2994 hipometiladas. De la misma manera, se agruparon los datos correspondientes a sondas de transcritos primarios y sitios de inicio de la transcripción. Los resultados se muestran en la **tabla 7**. En este trabajo consideramos únicamente los cambios en la metilación de transcritos primarios que corresponden a 500 pb de la región promotora, de estos, tomamos en cuenta los datos de las cuatro categorías de metilación mostradas en la tabla 7 y aplicamos un filtro por su valor de secuencia única (uniqueness count) mayor a 2. Los resultados mostraron que en A03 hubo 32 transcritos hipermetilados, 605 metilados, 941 desmetilados y 102 hipometilados. En A01 hubo 218 hipermetilados, 596 metilados, 1301 desmetilados y 158 hipometilados. En A02 se obtuvieron 95 hipermetilados, 832 metilados, 1401 desmetilados y 147 hipometilados (**tabla 8**). Posteriormente, la suma de los datos de las categorías metilados e hipermetilados de la condición control fue comparado con el total de transcritos desmetilados e hipometilados. Los datos

obtenidos mediante la herramienta de cómputo ACCESS permitieron saber que de los 637 transcritos metilados e hipermetilados 244 y 266 cambiaron su estado de metilación a desmetilados o hipometilados por efecto del tratamiento con resveratrol durante 24 y 48 horas respectivamente. Por otra parte, comparamos el grupo de transcritos desmetilados e hipometilados de la condición control Vs los datos de las categorías metilados e hipermetilados de las condiciones experimentales. De los 1043 que resultaron desmetilados e hipometilados en el control, 256 y 282 cambiaron su estado de metilación a metilados e hipermetilados resultado del tratamiento con resveratrol durante 24 y 48 horas respectivamente. Los datos se muestran resumidos en la **tabla 9**. Se identificaron algunas funciones biológicas asociadas a los genes que cambiaron su estado de metilación, entre estas se encuentran su participación en distintas vías de la transducción de señales como la señalización por GPCR (receptores acoplados a proteínas G), en sistema inmune, en ciclo celular, en el ensamble de nucleosomas y mantenimiento de telómeros y en la comunicación célula a célula que favorece la migración tumoral, entre otras. De forma importante cabe mencionar que entre los oncogenes silenciados por resveratrol encontramos algunos empleados actualmente como biomarcadores tumorales: NOTCH2, plasminógeno (PLG), factor de complemento H (CFH), suero amiloide A2 (SAA2), ADAM metalopeptidasa 6 (ADAM6), gonadotropina coriónica (CGB7), sirtuina 7 (SIRT7), entre otros. En la **figura 27** se muestra un ejemplo de la participación del resveratrol como modulador epigenético silenciando al gen NOTCH2 que actúa favoreciendo la promoción tumoral.

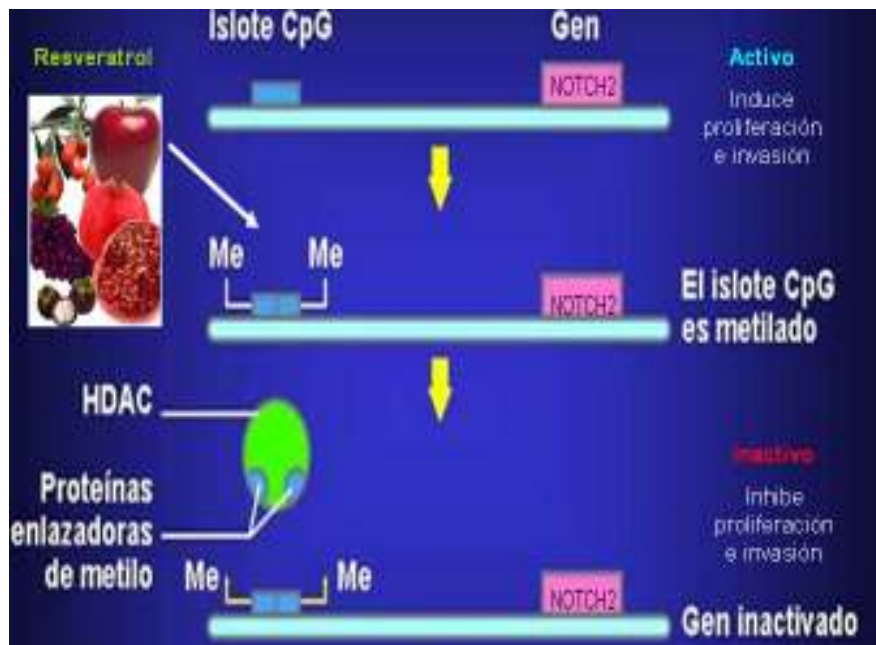


Figura 27. Efecto del resveratrol en la inactivación de NOTCH2 en las células de cáncer. En células tumorales NOTCH2 no está metilado manteniendo activo al gen que induce a las células a la proliferación e invasión. El resveratrol aumenta la metilación de las islas CpGs del promotor del gen NOTCH2 inactivándolo, de esta manera impide la proliferación e invasión de las células cancerosas.

5.3.4 Señalización Notch y su importancia en cáncer de mama.

La vía de señalización Notch desempeña un papel fundamental para el desarrollo normal de muchos tejidos y tipos celulares. Es una ruta clave en las diferentes etapas del desarrollo celular como la proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis. Cambios en la regulación de la diferenciación, supervivencia y/o proliferación permiten la transformación maligna mediante señales fisiopatológicas de Notch, esto contribuye potencialmente al desarrollo del cáncer. Por ejemplo, estudios recientes (59) han demostrado que, dependiendo del nivel de expresión y del contexto celular, los receptores de membrana Notch contribuyen en la resistencia a apoptosis en células tumorales. Estos descubrimientos sugieren que componentes de la vía de señalización Notch son un blanco potencial para el desarrollo de terapias más efectivas contra el cáncer de mama.

Los genes Notch codifican receptores de superficie celular altamente conservados. La ruta de señalización Notch consiste de receptores Notch, ligandos, modificadores positivos y negativos y factores de transcripción. Son cuatro los receptores Notch (1-4), se trata de proteínas de membrana que tienen grandes motifs, en la superficie celular se rompen proteolíticamente por la acción de convertasas, las subunidades Notch extracelular consisten de grandes dominios de unión a ligandos compuestos por repetidos en tándem del tipo factor de crecimiento epidermal (EGF). La subunidad transmembranal incluye un dominio extracelular, un único dominio transmembranal y un dominio grande intracelular. Los cuatro receptores tienen estructuras muy similares entre sí, con diferencias esenciales en las porciones extracelular y citoplásmica. Los receptores Notch-1 y -

2 contienen 36 repeticiones “EGF-like” en sus dominios EC, mientras que Notch-3 contiene 34 y Notch-4 solamente 29. A nivel del dominio IC tienen las siguientes diferencias: Notch-1 contiene un dominio de transactivación fuerte (TAD, por sus siglas en inglés), mientras que en Notch-2 su TAD es débil y en Notch-3 y -4 no está presente. Se conocen cinco ligandos de receptores Notch en mamíferos denominados JAG1, JAG2 y H-Delta-1, -3, y -4 (DLL1, DLL3, y DLL4), estos ligandos que sugieren que Notch puede mediar la comunicación entre células no contiguas. Además, se han identificado proteínas que modulan la degradación/procesamiento de Notch a nivel intracelular; entre éstas, la proteína Numb que actúa regulando negativamente la señalización al unirse con la región intracelular de Notch y la proteína citoplasmática Deltex que potencia la señalización de Notch en algunos contextos y en otros lo inhibe.

La señalización Notch comienza con la unión del receptor a un ligando que dispara dos procesos proteolíticos que permiten la liberación del dominio intracelular activo de Notch (ICN por sus siglas en inglés) de la membrana celular. ICN se transloca al núcleo donde interactúa con factores reguladores transcripcionales. Un factor transcripcional caracterizado es CSL, un represor transcripcional asociado con desacetilasas de histonas y correpresores. La unión de ICN a CSL desplaza complejos correpresores y recluta coactivadores permitiendo la transcripción de promotores que contienen elementos de unión a CSL. El complejo de activación transcripcional Notch o enhanceosoma es un complejo grande de proteínas clave que son: ICN, CSL y MAML. El ensamblaje del enhanceosoma de Notch resulta en la transcripción de una gran variedad de genes blanco de Notch incluyen factores de transcripción represores entre los que

se encuentran los pertenecientes a las familias de proteínas HES (*hairy and enhancer of Split*) y HRT/HERP/Hey (familia "*basic helix-loop-helix-Orange*"), IL-4, p21, etcétera. Sin embargo, aún no es claro cuál(es) de esos genes es/son el/los responsables de los efectos fenotípicos de la señal Notch.

La señalización Notch está implicada en la neurogénesis, hematopoyesis y vasculogénesis. Específicamente, Notch-2 en la morfogénesis dental, probablemente Notch-3 en neurogénesis y adipogénesis, y Notch-4 en el desarrollo vascular, renal y hepático. Los componentes de la vía Notch están involucrados en una gran variedad de enfermedades humanas, siendo la más frecuente el cáncer. Entre las causas principales se encuentran la presencia de mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales en sus genes. En los últimos años se ha notificado que la sobreexpresión de componentes de la vía Notch ocurre en una gran variedad de carcinomas humanos, incluyendo leucemias, neuroblastomas, cáncer cervicouterino, cáncer de mama, tumores mucoepidermoides, carcinomas renales, cáncer de piel y cáncer pulmonar, entre otros (61). Las evidencias indican que el sistema de señalización Notch está frecuentemente desregulado en cáncer y, por lo tanto, su modulación ofrece una nueva estrategia terapéutica. Con el objeto de regular la señalización Notch en condiciones patológicas, se ha considerado el uso de proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, anticuerpos monoclonales, oligonucleótidos antisentido y terapia génica. Sin embargo, se han explorado muy poco los mecanismos de regulación a nivel epigenético inducidos por fitoquímicos, y que significan un campo de investigación prometedor para el desarrollo de agentes antineoplásicos.

	A01 (24 h)	A02 (48)	A03 (control)
CpGs(total)	38,757	40,878	20,515
Hipermetiladas	3,652	2,990	1,138
Hipometiladas	3,381	2,994	731
Desmetiladas y metiladas	31,724	34,894	18,646
Sitios de inicio de la Transcripción (total)	40,929	42,144	31,191
Hipermetilados	7,068	5,360	2,231
Hipometilados	3,494	2,294	510
Desmetilados y metilados	30,367	34,490	33,932
Transcritos Primarios (total)	79,866	80,438	25,183
Hipermetilados	7,862	5,914	1,017
Hipometilados	6,165	5,404	2,476
Desmetilados y metilados	65,839	69,120	21,690

Tabla 7. Resultados del análisis de metilación por DEVA software. La tabla muestra el número de sondas que corresponden a islas CpGs, sitios de inicio de la transcripción y transcritos primarios con hiper o hipometilación obtenidas del análisis con DEVA. Los datos presentados se obtuvieron en el primer análisis y no se aplicó ningún filtro. A01 y A02 corresponden a la condición de células tratadas con resveratrol durante 24 y 48 horas respectivamente. A03 se refiere a la condición control.

Transcritos primarios	En células tratadas con resveratrol (100 µM) por 24 H.	En células tratadas con resveratrol (100 µM) por 48 H.	En células sin tratamiento
Hipermetilados (>2)	218	95	32
Metilados (>0 y <2)	596	832	605
Total	814	927	637
Desmetilados (-2 > 0)	1301	1401	941
Hipometilados (> -2)	158	147	102
Total	1458	1548	1043

Tabla 8. Total de transcritos primarios hipermetilados, metilados, desmetilados e hipometilados de células MDA-MB-231 por efecto del tratamiento con resveratrol 100 µM durante 24 y 48 horas. La primera columna de la izquierda muestra las cuatro categorías en que fueron agrupados los datos de acuerdo a su valor de tasa de cambio (Log_2). Un valor por encima de 2 corresponde a la categoría hipermetilados y de 0 a 2 a metilados, de menor a 0 y mayor que -2 a desmetilados y finalmente, si es menor que -2 a la categoría hipometilados.

CONTROL transcritos metilados e hipermetilados (0 a 5)	Vs	RSV 24 H Transcritos desmetilados e hipometilados	RSV 48 H Transcritos desmetilados e hipometilados
637		244	266
CONTROL Transcritos desmetilados e hipometilados (<-5 y >0)	Vs	RSV 24 H Transcritos metilados e hipermetilados	RSV 48 H Transcritos metilados e hipermetilados
1043		256	282

Tabla 9. Transcritos de las células MDA-MB-231 sin tratamiento que cambiaron su estatus de metilación en respuesta al tratamiento con resveratrol (100 µM) a las 24 y 48 horas. Las categorías metilados e hipermetilados comprenden valores de cambio entre 0 y 5. Las categorías desmetilados e hipometilados abarcan valores menores a 0 y -5.

VI. DISCUSIÓN

Todos los tipos de cáncer entre ellos el de mama, son causados por la acumulación de múltiples alteraciones epigenéticas en oncogenes y genes supresores de tumor, las cuales no afectan la secuencia del DNA pero tienen un importante papel en el control de la expresión génica (46). La metilación del ADN es uno de los principales procesos epigenéticos heredables que afectan la transcripción, la compactación de la cromatina y la organización nuclear del material genético. Consiste en la adición de un grupo metilo de la S-adenosil L-metionina obtenido de folatos, colina y metionina aportados por la dieta, al carbono 5 de la citosina en los dinucleótidos CpGs que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma (metilación global), o en las islas CpGs presentes en los promotores de genes (metilación local) (47). En células normales, el 80% de los dinucleótidos CpG se encuentran metilados e hipometilados en las regiones promotoras de los genes. En cambio, durante la tumorigénesis la inestabilidad genómica y la activación de oncogenes están asociadas a hipometilación global. También ocurre hipermetilación en las islas CpGs ocasionando silenciamiento de los genes supresores de tumor. Los mecanismos epigenéticos representan un campo prometedor para el tratamiento del cáncer debido a que diversos agentes externos provenientes de la dieta pueden restaurar el estado de metilación normal de los genes supresores de tumor revirtiendo las propiedades tumorales. Se han encontrado más de 8000 diferentes polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos con potencial quimiopreventivo conferido por su capacidad para modular las alteraciones epigenéticas que ocurren en las células cancerosas. Estos compuestos están presentes en los alimentos de la dieta diaria por ejemplo,

diversas catequinas (té verde), la curcumina (cúrcuma), la genisteína (soya), el resveratrol (uvas), los sulforafanos (crucíferas), la epigenina (perejil), la silimarina (cardo lechero), entre otros. Sin embargo, los efectos quimiopreventivos y quimioterapéuticos del resveratrol a través de la metilación y consecuente silenciamiento o activación de genes en células tumorales de cáncer de mama se desconoce a la fecha. El resveratrol es un fitoquímico de origen natural que se consume a diario en la dieta y que presenta una amplia gama de propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas. El resveratrol inhibe la expresión de genes involucrados en la tumorigenesis, así mismo es capaz de inactivar carcinógenos, previene el daño oxidativo del DNA, induce apoptosis y de manera notable inhibe la angiogénesis y metástasis de los tumores in vivo. El resveratrol también tiene la capacidad de alterar la metilación del DNA y modificar las histonas, regulando la expresión génica a nivel epigenético. Las alteraciones epigenéticas adquiridas por influencia de la dieta, pueden tener un gran impacto en todas las etapas que favorecen el desarrollo del cáncer de mama. En este trabajo observamos que el número de células vivas de tumores de cáncer de mama triple negativo disminuye de forma dependiente a la concentración de resveratrol al medir la viabilidad celular indirectamente por la reducción de tetrazolio a un producto de formazán en las células vivas. La cantidad de MTT-formazán reducido fue determinado espectrofotométricamente. Los resultados mostraron que los valores de absorbancia (570 nm) obtenidos en este ensayo disminuyeron a medida que se incrementó la concentración de resveratrol (50, 100, 150, 200 y 250 μM). De tal manera que a las 24 horas del tratamiento con resveratrol a una concentración de 50 μM y 150 μM , la viabilidad de las células

disminuyó un 20% y 68% respectivamente. A las 48 horas del tratamiento con resveratrol a una concentración de 50 μM , la viabilidad solo bajó 10% y a la concentración de 150 μM la viabilidad fue del 55%. Al utilizar concentraciones muy altas (250 μM) la mayoría de las células (89%) no sobrevivieron. Se determinó que la concentración a la cual el 50% de las células murieron (DL50) por efecto del resveratrol fue de 134 μM y 168 μM a las 24 y 48 horas respectivamente. Medimos la apoptosis causada por el resveratrol en células MDA-MB-231 con Alexa Fluor 488-A y Ioduro de propidio siguiendo las recomendaciones del fabricante y comprobamos que el resveratrol (100 μM) induce apoptosis en células de cáncer de mama triple negativo a las 24 y 48 horas de tratamiento. Los datos obtenidos del citómetro de flujo, mostraron que de 10,000 células solo el 0.3 % de las no tratadas y el 0.5 % de las células tratadas con doxorrubicina (1 μM) presentaron apoptosis a las 24 horas. Se observó un 14% más de células apoptóticas teñidas por anexina V cuando éstas fueron tratadas con resveratrol 100 μM a las 24 horas, respecto de las células que no recibieron tratamiento. Sin embargo, a las 48 horas este efecto se incrementó a 8.56 % en células después del tratamiento con doxorrubicina (1 μM), mientras que la apoptosis en las células tratadas con resveratrol disminuyó de 14.31 % a 6.35 %. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal obtenidas del ensayo de TUNEL permitieron observar que la doxorrubicina (1 μM) indujo daño al ADN en el 60% de células MDA-MB-231 a las 24 horas posteriores al tratamiento, el 15% de las células que fueron tratadas con resveratrol 100 μM por 24 horas y el 30% de las tratadas con resveratrol a las 48 horas resultaron positivas a TUNEL a diferencia de las células que no recibieron tratamiento en las que no se observó señal de daño al ADN. Observamos también

que el resveratrol aumentó la señal de concentración de citosinas metiladas en los nucleosomas de las células de tumor de cáncer de mama triple negativo y fue capaz de cambiar el estado de la metilación de genes que participan en la iniciación, promoción y progresión de células tumorales. Las imágenes de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-5-metilcitosina, mostraron que las células MDA-MB-231 que no recibieron tratamiento con resveratrol tuvieron una baja concentración de citosinas metiladas en los nucleosomas, en cambio células MDA-MB-231 tratadas con resveratrol (100 μ M) a las 24 horas no mostraron una diferencia notable de la señal detectada. Sin embargo, a las 48 horas es claro el aumento en la concentración de citosinas metiladas cuya señal se observó en los núcleos. Se utilizó como control positivo la epigallocatequina-3-galato a una concentración de 50 μ M y ésta fue capaz de aumentar la concentración de citosinas metiladas a nivel global en células MDA-MB-231. Se observó una mayor localización nuclear del anticuerpo anti-5-metil-citosina en las células MDA-MB-231 tratadas con EGCG por 48 horas que a las 24 horas de tratamiento. Finalmente, se obtuvo el perfil de metilación mediante un microarreglo 3x720K HG18 Nimblegen con 27,728 sondas de islas CpGs, 22,532 promotores y 30,848 transcritos. Este microarreglo permitió obtener simultáneamente el metiloma de las células MDA-MB-231 en tres condiciones: sin tratamiento y tratadas con resveratrol 100 μ M por 24 y 48 horas mediante protocolo aPRIMES para la obtención de fracciones genómicas diferencialmente metiladas a partir del DNA obtenido de las células tratadas y no tratadas. El estado de metilación de los genes de células MDA-MB-231 fue obtenido por NimbleGen DEVA software 1.2. Los datos se filtraron por valor de cambio de metilación expresado en logaritmo base 2

para agruparlos en cuatro categorías: metilados, hipermetilados, desmetilados y hipometilados. En el presente trabajo analizamos el efecto del resveratrol en el patrón de metilación global del DNA en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama con la finalidad de definir huellas epigenéticas que nos permitieran identificar oncogenes que puedan ser hipermetilados y silenciados por el resveratrol, lo cual puede revertir las propiedades tumorales tales como crecimiento, proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis. Nuestros resultados nos permitieron establecer por primera vez que el resveratrol es capaz de inducir cambios notables en el estado de metilación de cientos de genes relevantes en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Después de 24 h de tratamiento con resveratrol (100 μ M) 814 genes se hipermetilaron, mientras que 1458 se desmetilaron, lo cual puede tener un profundo impacto en la biología del tumor. Por ejemplo, encontramos que el resveratrol induce una hipermetilación y silenciamiento del gen Notch2, el cual se encuentra comúnmente activado en cáncer de mama provocando aumento en la proliferación, invasión y resistencia a la quimioterapia. Otros genes de interés en cáncer que encontramos hipermetilados en respuesta a resveratrol incluyen PLG, CFH, SAA2, MRPL45, Y CGB7. Nuestros hallazgos explican en parte las propiedades quimioterapéuticas y quimiopreventivas de este agente natural en cáncer y nos permite vislumbrar nuevos blancos terapéuticos. El análisis de la metilación de células de tumor realizado en este trabajo muestra la capacidad que el resveratrol tiene a nivel epigenético para activar genes que participan en la transducción de señales, control de la división y el crecimiento celular, apoptosis, inflamación, angiogénesis y metástasis.

VII. CONCLUSIONES.

1.- El número de células vivas de tumores de cáncer de mama triple negativo disminuye de forma dependiente a la concentración de resveratrol.

2.- El resveratrol (100 μ M) induce apoptosis en células de cáncer de mama triple negativo a las 24 y 48 horas de tratamiento.

3.- El resveratrol inactiva oncogenes mediante la hipermetilación de las islas CpG y en general, actúa cambiando el estado de metilación de genes que participan en la iniciación, promoción y progresión de células tumorales.

4.- El resveratrol puede regular a nivel epigenético las vías que favorecen la iniciación, promoción, y progresión del cáncer, reestableciendo la función de genes implicados en la transducción de señales, sistema inmune, progresión del ciclo celular, ensamblaje de nucleosomas, mantenimiento de telómeros y en la comunicación célula a célula a través de su efecto en la metilación.

ANEXO

Funciones celulares asociadas a genes inactivados por resveratrol (100 µM) a las 24 horas.

Name of this Event	Submitted identifiers mapping to this Event
<u>Olfactory Receptor - G Protein d factory trimer complex formation</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, OR5T2, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, OR2T34, OR5M10, OR8B3, OR2T6, OR1E1, OR4C12, OR2J3, O
<u>Olfactory Signaling Pathway</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, OR5T2, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, OR2T34, OR5M10, OR8B3, OR2T6, OR1E1, OR4C12, OR2J3, O
<u>Serum amyloid P binds DNA and chromatin</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Trimethylation of Histone H3 by PRDM9</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Amyloids</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, SAA2, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>GPCR downstream signaling</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, OR5T2, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, SAA2, OR2T34, OR5M10, CCR2, OR8B3, OR1E1, OR2T6, OR4C12, OR2J3, OR2T3
<u>Beta defensins</u>	DEFB105B, CCR2, DEFB130, DEFB106B, DEFB106A, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Pre-pro-defensins are cleaved to remove the signal peptide</u>	DEFB105B, DEFB106B, DEFB106A, DEFA1, DEFA1B, DEFB130, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Signaling by GPCR</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, CCL3L1, OR5T2, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, CCL3L3, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, SAA2, OR2T34, OR5M10, CCR2, OR8B3, OR1E1, OR2T6, OR4C12, OR2J3, OR2T3
<u>Defensins</u>	DEFB105B, DEFB106B, DEFB106A, DEFA1, CCR2, DEFA1B, DEFB130, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Meiotic Recombination</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Packaging Of Telomere Ends</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Incorporation Of Extended And Processed Telomere End Into Higher Order T-Loop And Associated Protein Structure</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Incorporation Of Extended And Processed Telomere End Into Associated Protein Structure</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Beta-defensins bind microbial membranes causing disruption</u>	DEFB105B, DEFB130, DEFB106B, DEFB106A, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Beta-defensins are secreted</u>	DEFB105B, DEFB130, DEFB106B, DEFB106A, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Digestion of linear starch (amylose) by extracellular amylase</u>	AMY1C, AMY1A, AMY1B
<u>Digestion of branched starch (amylopectin) by extracellular amylase</u>	AMY1C, AMY1A, AMY1B
<u>KIR2DL2/3 interacting with HLA-C group 1 (Ow4)</u>	KIR2DL2, KIR2DL3
<u>Deposition of New CENPA-containing Nucleosomes at the Centromere</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Deposition of New CENPA-containing Nucleosomes at the Centromere</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>RSF Complex Binds the Centromere</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Nucleosome assembly</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Telomere clustering at the nuclear membrane</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Meiosis</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Formation of Meiotic Heteroduplex</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Formation of Meiotic Single-stranded DNA Invasion Complex</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Digestion of dietary carbohydrate</u>	AMY1C, AMY1A, AMY1B
<u>Recruitment of BRCA1 to Unsynapsed Regions</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Telomere Maintenance</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Meiotic Synapsis</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Recruitment of ATR Kinase to Unsynapsed Regions</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>ATR Phosphorylates Histone H2A.X at Unsynapsed Regions</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Formation of Meiotic Holliday Junction</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Signal Transduction</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, CCL3L1, OR5T2, OR4M1, MST1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, NOTCH2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, CCL3L3, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, RHOQ, PLG, SAA2, OR2T34, OR5M10, CCR2, OR8B3, OR1E1, OR2T6, OR4C12, OR2J3, OR2T3
<u>Phase II conjugation</u>	UGT2B17, GSTA1, SULT1A2, UGT2B15
<u>Formation of O-glucuronides</u>	UGT2B17, UGT2B15
<u>Glucuronidation</u>	UGT2B17, UGT2B15
<u>Biological oxidations</u>	UGT2B17, GSTA1, ADH1A, SULT1A2, UGT2B15
<u>Chromosome Maintenance</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC

Funciones biológicas asociadas a los genes inactivados por resveratrol (100 µM) a las 24 horas.

ID	Pathway names
ADH1A	Abacavir transport and metabolism; Abacavir transport and metabolism; Biological oxidations; Biological oxidations; Metabolism; Metabolism; Phase 1 - Functionalization of compounds; Phase 1 - Functionalization of compounds
ALG10B	Asparagine N-linked glycosylation; Asparagine N-linked glycosylation; Metabolism of proteins; Metabolism of proteins; Post-translational protein modification; Post-translational protein modification
AMY1A	Metabolism; Metabolism; Metabolism of carbohydrates; Metabolism of carbohydrates
AMY1B	Metabolism; Metabolism of carbohydrates
AMY1C	Metabolism; Metabolism of carbohydrates
ATP7A	Ion channel transport; Ion channel transport; Ion channel transport; Ion channel transport; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules
CA5A	Metabolism; Metabolism; Reversible Hydration of Carbon Dioxide; Reversible Hydration of Carbon Dioxide
CCL3L1	GPCR ligand binding; Signal Transduction; Signaling by GPCR
CCL3L3	GPCR ligand binding; Signal Transduction; Signaling by GPCR
CCR2	Defensins; Defensins; Defensins; GPCR downstream signaling; GPCR downstream signaling; GPCR ligand binding; GPCR ligand binding; Immune System; Immune System; Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by GPCR; Signaling by GPCR
CFH	Complement cascade; Complement cascade; Complement cascade; Immune System; Immune System; Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System
CGB7	Metabolism; Metabolism of amino acids and derivatives
CSF2RA	Cytokine Signaling in Immune system; Cytokine Signaling in Immune system; Immune System; Immune System; Interleukin-2 signaling; Interleukin-2 signaling; Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling; Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling; Signaling by Interleukins; Signaling by Interleukins
DEFA1	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFA1B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB104A	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB104B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB105A	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB105B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB106A	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB106B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB130	Defensins; Immune System; Innate Immune System
FCGR1B	Adaptive Immune System; Class I MHC mediated antigen processing & presentation; Cytokine Signaling in Immune system; Immune System; Interferon gamma signaling; Interferon Signaling
GSTA1	Biological oxidations; Biological oxidations; Metabolism; Metabolism; Phase II conjugation; Phase II conjugation

HIST1H2AC	Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease;Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly;Telomere Maintenance
HIST1H2AI	Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Meiosis; Meiotic Synapsis
HIST1H2BC	Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease;Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly;Telomere Maintenance
HIST1H2BL	Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease;Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly;Telomere Maintenance
HIST1H3H	Amyloids; Amyloids; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Disease; Disease; Factors involved in megakaryocyte development and platelet production; Factors involved in megakaryocyte development and platelet production; Hemostasis; Hemostasis; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis
HIST2H4A	Amyloids; Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance;Disease; Disease; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance;Telomere Maintenance
HIST2H4B	Amyloids; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Disease; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance
HSD17B7	Cholesterol biosynthesis; Cholesterol biosynthesis; Cholesterol biosynthesis; Metabolism;Metabolism; Metabolism; Metabolism of lipids and lipoproteins; Metabolism of lipids and lipoproteins;Metabolism of lipids and lipoproteins
KCNH5	Neuronal System; Neuronal System; Neuronal System; Neuronal System; Potassium Channels;Potassium Channels; Potassium Channels; Potassium Channels
KIR2DL2	Adaptive Immune System; Immune System; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell
KIR2DL3	Adaptive Immune System; Immune System; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell
MAFG	Factors involved in megakaryocyte development and platelet production; Factors involved in megakaryocyte development and platelet production; Factors involved in megakaryocyte development and platelet production; Hemostasis; Hemostasis; Hemostasis

MAPK10	Immune System; Immune System; Immune System; Innate immune response mediated by toll like receptors; Innate Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; MAP kinase activation in TLR cascade; MAP kinase activation in TLR cascade; MAP kinase activation in TLR cascade; MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases; MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases; MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases; MyD88 cascade initiated on plasma membrane; MyD88 cascade initiated on plasma membrane; MyD88 cascade initiated on plasma membrane; MyD88 dependent cascade initiated on endosome; MyD88 dependent cascade initiated on endosome; MyD88-dependent cascade ; MyD88-independent cascade ; MyD88-independent cascade ; MyD88-independent cascade ; MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane; MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane; MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane; Toll Receptor Cascades; Toll Receptor Cascades; Toll Receptor Cascades
MLLT4	Cell junction organization; Cell junction organization; Cell-Cell communication; Cell-Cell communication
MOB2	Signal Transduction; Signaling by Hippo
NBR1	Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Generic Transcription Pathway; Generic Transcription Pathway; Generic Transcription Pathway; Generic Transcription Pathway; Pre-NOTCH Expression and Processing; Pre-NOTCH Expression and Processing; Pre-NOTCH Expression and Processing; Pre-NOTCH Expression and Processing; Signal Transduction; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH2; Signaling by NOTCH2; Signaling by NOTCH2; Signaling by NOTCH2
NXF2	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
NXF2B	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR11H12	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR13C3	
OR1E1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR1S1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2J3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2M1P	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T2	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T34	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T5	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T6	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4C12	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4C13	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4C46	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR

OR4M1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4M2	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4Q3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR52E6	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR52L1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR5M1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR5M3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR8U8	Activation of Matrix Metalloproteinases; Activation of Matrix Metalloproteinases; Degradation of the extracellular matrix; Degradation of the extracellular matrix; Diabetes pathways; Diabetes pathways; Diabetes pathways; Disease; Disease; Disease; Dissolution of Fibrin Clot; Dissolution of Fibrin Clot; Dissolution of Fibrin Clot; Extracellular matrix organization; Extracellular matrix organization; Hemostasis; Hemostasis; Hemostasis; Lipid digestion, mobilization, and transport; Lipid digestion, mobilization, and transport; Metabolism; Metabolism; Metabolism of lipids and lipoproteins; Metabolism of lipids and lipoproteins; Platelet activation, signaling and aggregation; Platelet activation, signaling and aggregation; Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs); Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs); Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)
RABL2A	Signal Transduction; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by Rho GTPases; Signaling by Rho GTPases; Signaling by Rho GTPases
RGPD1	Adaptive Immune System; Class I MHC mediated antigen processing & presentation; Immune System
RHOXF2	Advanced glycosylation endproduct receptor signaling; Advanced glycosylation endproduct receptor signaling; Amyloids; Amyloids; Disease; Disease; Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK; Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK; GPCR downstream signaling; GPCR downstream signaling; GPCR ligand binding; GPCR ligand binding; Immune System; Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by GPCR; Signaling by GPCR
SEMG2	SLC-mediated transmembrane transport; SLC-mediated transmembrane transport; SLC-mediated transmembrane transport; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules; Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides; Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides; Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides
SEPT7P2	Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Metabolism of non-coding RNA; Metabolism of non-coding RNA; Metabolism of non-coding RNA; Metabolism of non-coding RNA
SIRT7	Gene Expression; Metabolism of non-coding RNA
SPANXN3	Biological oxidations; Metabolism; Phase II conjugation

SRSF10	Disease; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; HIV Infection; HIV Life Cycle; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription
TP53TG3	Biological oxidations; Metabolism; Phase II conjugation
TP53TG3B	Biological oxidations; Metabolism; Phase II conjugation
UGT2B17	Gene Expression; Generic Transcription Pathway
XAGE2	Gene Expression; Generic Transcription Pathway
ZNF286A	Gene Expression; Generic Transcription Pathway

Funciones celulares asociadas a genes inactivados por resveratrol (100 µM) a las 48 horas.

Name of this Event	Submitted identifiers mapping to this Event
<u>Olfactory Receptor - G Protein olfactory trimer complex formation</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, OR2T34, OR5M10, OR8B3, OR2T6, OR1E1, OR2J3, OR2T3
<u>Olfactory Signaling Pathway</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, OR2T34, OR5M10, OR8B3, OR2T6, OR1E1, OR2J3, OR2T3
<u>Beta defensins</u>	DEFB105B, DEFB106B, DEFB106A, CCR2, DEFB108B, DEFB130, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Pre-pro-defensins are cleaved to remove the signal peptide</u>	DEFB105B, DEFB106B, DEFB106A, DEFA1, DEFA1B, DEFB130, DEFB108B, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Serum amyloid P binds DNA and chromatin</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Trimethylation of Histone H3 by PRDM9</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Amyloids</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, SAA2, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Beta-defensins bind microbial membranes causing disruption</u>	DEFB105B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB108B, DEFB130, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Beta-defensins are secreted</u>	DEFB105B, DEFB106B, DEFB106A, DEFB108B, DEFB130, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Defensins</u>	DEFB105B, DEFB106B, DEFB106A, DEFA1, CCR2, DEFA1B, DEFB130, DEFB108B, DEFB104B, DEFB105A, DEFB104A
<u>Signaling by GPCR</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, CCL3L1, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, CCL3L3, OR4M2, OR4Q3, CCL4, OR52L1, SAA2, OR2T34, OR5M10, CCR2, PDPK1, OR8B3, OR1E1, OR2T6, OR2J3, OR2T3
<u>GPCR downstream signaling</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, OR4M1, OR52E6, OR4C46, OR2T2, OR5P3, OR5M1, OR2T5, OR4M2, OR4Q3, OR52L1, SAA2, OR2T34, OR5M10, CCR2, PDPK1, OR8B3, OR1E1, OR2T6, OR2J3, OR2T3
<u>Meiotic Recombination Packaging Of Telomere Ends</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Incorporation Of Extended And Processed Telomere End Into Higher Order T-Loop And Associated Protein Structure</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Incorporation Of Extended And Processed Telomere End Into Associated Protein Structure</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Digestion of linear starch (amylose) by extracellular amylase</u>	AMY1C, AMY1A, AMY1B
<u>Digestion of branched starch (amylopectin) by extracellular amylase</u>	AMY1C, AMY1A, AMY1B
<u>KIR2DL2/3 interacting with HLA-C group 1 (Cw4)</u>	KIR2DL2, KIR2DL3
<u>Deposition of New CENPA-containing Nucleosomes at the Centromere</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Deposition of New CENPA-containing Nucleosomes at the Centromere</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>RSF Complex Binds the Centromere</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Nucleosome assembly</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Telomere clustering at the nuclear membrane</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Meiosis</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H3H, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Formation of Meiotic Heteroduplex</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC

<u>Formation of Meiotic Single-stranded DNA Invasion Complex</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Digestion of dietary carbohydrate</u>	AMY1C, AMY1A, AMY1B
<u>Recruitment of BRCA1 to Unsynapsed Regions</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Telomere Maintenance</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Recruitment of ATR Kinase to Unsynapsed Regions</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>ATR Phosphorylates Histone H2A.X at Unsynapsed Regions</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Formation of Meiotic Holliday Junction</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC
<u>Meiotic Synapsis</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC
<u>Signal Transduction</u>	OR1S1, OR4C13, OR5M3, OR4C46, OR5P3, OR5M1, OR2T5, OR4Q3, OR52L1, RHOQ, PLG, SAA2, OR5M10, CCR2, PDPK1, OR8B3, OR2T6, OR2T3, ARHGA P11A, CCL3L1, MST1, OR4M1, NOTCH2, OR2T2, OR52E6, CCL3L3, OR4M2, CCL4, OR2T34, ARHGAP11B, OR1E1, OR2J3
<u>Receptor CCBP2 binds most inflammatory CC chemokines</u>	CCL3L1, CCL3L3, CCL4
<u>Formation of O-glucuronides</u>	UGT2B17, UGT2B15
<u>Glucuronidation</u>	UGT2B17, UGT2B15
<u>Chemokine receptors bind chemokines</u>	CCR2, CCL3L1, CCL3L3, CCL4
<u>Chromosome Maintenance</u>	HIST1H2BL, HIST2H4A, HIST2H4B, HIST1H2BC, HIST1H2AC

Rutas biológicas en las que participan los genes inactivados por resveratrol (100 μ M) a las 48 horas.

ID	Pathway names
ADH1A	Abacavir transport and metabolism; Abacavir transport and metabolism; Biological oxidations; Biological oxidations; Metabolism; Metabolism; Phase 1 - Functionalization of compounds; Phase 1 - Functionalization of compounds
AIMP2	Gene Expression; tRNA Aminoacylation
ALG10B	Asparagine N-linked glycosylation; Asparagine N-linked glycosylation; Metabolism of proteins; Metabolism of proteins; Post-translational protein modification; Post-translational protein modification
AMY1A	Metabolism; Metabolism; Metabolism of carbohydrates; Metabolism of carbohydrates
AMY1B	Metabolism; Metabolism of carbohydrates
AMY1C	Metabolism; Metabolism of carbohydrates
ARHGAP11A	Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by Rho GTPases; Signaling by Rho GTPases
ARHGAP11B	Signal Transduction; Signaling by Rho GTPases
CA5A	Metabolism; Metabolism; Reversible Hydration of Carbon Dioxide; Reversible Hydration of Carbon Dioxide
CCL3L1	GPCR ligand binding; Signal Transduction; Signaling by GPCR
CCL3L3	GPCR ligand binding; Signal Transduction; Signaling by GPCR
CCL4	GPCR ligand binding; GPCR ligand binding; GPCR ligand binding; Signal Transduction; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by GPCR; Signaling by GPCR; Signaling by GPCR
CCR2	Defensins; Defensins; Defensins; GPCR downstream signaling; GPCR downstream signaling; GPCR ligand binding; GPCR ligand binding; Immune System; Immune System; Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by GPCR; Signaling by GPCR
CDK11B	Cell Cycle; Cell Cycle; Cell Cycle, Mitotic; Cell Cycle, Mitotic; Developmental Biology; Mitotic G2-G2/M phases; Mitotic G2-G2/M phases; Transcriptional Regulation of White Adipocyte Differentiation
CGB7	Metabolism; Metabolism of amino acids and derivatives
CSF2RA	Cytokine Signaling in Immune system; Cytokine Signaling in Immune system; Immune System; Immune System; Interleukin-2 signaling; Interleukin-2 signaling; Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling; Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling; Signaling by Interleukins; Signaling by Interleukins
DEFA1	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFA1B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB104A	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB104B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB105A	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB105B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB106A	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB106B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB108B	Defensins; Immune System; Innate Immune System
DEFB130	Defensins; Immune System; Innate Immune System
EIF3C	Eukaryotic Translation Initiation; Eukaryotic Translation Initiation; Gene Expression; Gene Expression; Metabolism of proteins; Metabolism of proteins; Translation; Translation
EIF3CL	Eukaryotic Translation Initiation; Gene Expression; Metabolism of proteins; Translation
FBXW10	Metabolism of proteins; Protein folding
HIST1H2AC	Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance
HIST1H2AI	Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Meiosis; Meiotic Synapsis
HIST1H2BC	Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance
HIST1H2BL	Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance
HIST2H4A	Amyloids; Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease; Disease; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance; Telomere Maintenance

HIST1H2BL	Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance
HIST2H4A	Amyloids; Amyloids; Cell Cycle; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Chromosome Maintenance; Disease; Disease; Meiosis; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance; Telomere Maintenance
HIST2H4B	Amyloids; Cell Cycle; Chromosome Maintenance; Disease; Meiosis; Meiotic Recombination; Meiotic Synapsis; Nucleosome assembly; Telomere Maintenance
HSD17B7	Cholesterol biosynthesis; Cholesterol biosynthesis; Cholesterol biosynthesis; Metabolism; Metabolism; Metabolism; Metabolism of lipids and lipoproteins; Metabolism of lipids and lipoproteins; Metabolism of lipids and lipoproteins
KIR2DL2	Adaptive Immune System; Immune System; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell
KIR2DL3	Adaptive Immune System; Immune System; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell
LILRB3	Adaptive Immune System; Immune System; Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell
MAPK10	Immune System; Immune System; Immune System; Innate immune response mediated by toll like receptors; Innate Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; MAP kinase activation in TLR cascade; MAP kinase activation in TLR cascade; MAP kinase activation in TLR cascade; MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases; MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases; MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases; MyD88 cascade initiated on plasma membrane; MyD88 cascade initiated on plasma membrane; MyD88 cascade initiated on plasma membrane; MyD88 dependent cascade initiated on endosome; MyD88 dependent cascade initiated on endosome; MyD88 dependent cascade initiated on endosome; MyD88-independent cascade ; MyD88-independent cascade ; MyD88-independent cascade ; MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane; MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane; Toll Receptor Cascades; Toll Receptor Cascades; Toll Receptor Cascades
MLLT4	Cell junction organization; Cell junction organization; Cell-Cell communication; Cell-Cell communication
MST1	Signal Transduction; Signaling by Hippo
NOTCH2	Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Generic Transcription Pathway; Generic Transcription Pathway; Generic Transcription Pathway; Generic Transcription Pathway; Pre-NOTCH Expression and Processing; Pre-NOTCH Expression and Processing; Pre-NOTCH Expression and Processing; Pre-NOTCH Expression and Processing; Signal Transduction; Signal Transduction; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH; Signaling by NOTCH2; Signaling by NOTCH2; Signaling by NOTCH2
OR1E1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR1S1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2J3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T2	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T34	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T5	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR2T6	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4C13	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4C46	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4M1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4M2	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR4Q3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR52E6	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR52L1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR5M1	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR

OR5M10	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR5M3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR5P3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
OR8B3	GPCR downstream signaling; Signal Transduction; Signaling by GPCR
PDPK1	Adaptive Immune System; Adaptive Immune System; Adaptive Immune System; Costimulation by the CD28 family; Costimulation by the CD28 family; Costimulation by the CD28 family; Disease; Disease; Disease; GPCR downstream signaling; GPCR downstream signaling; GPCR downstream signaling; GPVI-mediated activation cascade; GPVI-mediated activation cascade; GPVI-mediated activation cascade; Hemostasis; Hemostasis; Hemostasis; Immune System; Immune System; Immune System; Integrin alphaIIb beta3 signaling; Integrin alphaIIb beta3 signaling; Integrin cell surface interactions; Integrin cell surface interactions; Neuronal System; Neuronal System; Neuronal System; Neurotransmitter Receptor Binding And Downstream Transmission In The Postsynaptic Cell; Neurotransmitter Receptor Binding And Downstream Transmission In The Postsynaptic Cell; Neurotransmitter Receptor Binding And Downstream Transmission In The Postsynaptic Cell; NGF signalling via TRKA from the plasma membrane; NGF signalling via TRKA from the plasma membrane; NGF signalling via TRKA from the plasma membrane; PIP3 activates AKT signaling; PIP3 activates AKT signaling; PIP3 activates AKT signaling; Platelet activation
PLG	Activation of Matrix Metalloproteinases; Activation of Matrix Metalloproteinases; Activation of Matrix Metalloproteinases; Degradation of the extracellular matrix; Degradation of the extracellular matrix; Degradation of the extracellular matrix; Diabetes pathways; Diabetes pathways; Diabetes pathways; Disease; Disease; Disease; Dissolution of Fibrin Clot; Dissolution of Fibrin Clot; Dissolution of Fibrin Clot; Extracellular matrix organization; Extracellular matrix organization; Extracellular matrix organization; Hemostasis; Hemostasis; Hemostasis; Lipid digestion, mobilization, and transport; Lipid digestion, mobilization, and transport; Metabolism; Metabolism; Metabolism of lipids and lipoproteins; Metabolism of lipids and lipoproteins; Platelet activation, signaling and aggregation; Platelet activation, signaling and aggregation; Platelet activation, signaling and aggregation; Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs); Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs); Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by Insulin-like Growth F
POM121	Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes; Cytokine Signaling in Immune system; Disease; Hexose transport; Hexose transport; HIV Infection; HIV Life Cycle; Host Interactions of HIV factors; Immune System; Interferon Signaling; ISG 15 antiviral mechanism; Metabolism; Metabolism; Metabolism of carbohydrates; Metabolism of carbohydrates; SLC-mediated transmembrane transport; SLC-mediated transmembrane transport; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules
RHOQ	Signal Transduction; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by Rho GTPases; Signaling by Rho GTPases; Signaling by Rho GTPases
RHOXF2	
RHOXF2B	
RNF123	Adaptive Immune System; Class I MHC mediated antigen processing & presentation; Immune System
RPL23AP7	
SAA2	Advanced glycosylation endproduct receptor signaling; Advanced glycosylation endproduct receptor signaling; Amyloids; Amyloids; Disease; Disease; Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK; Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK; GPCR downstream signaling; GPCR downstream signaling; GPCR ligand binding; GPCR ligand binding; Immune System; Immune System; Innate Immune System; Innate Immune System; Signal Transduction; Signal Transduction; Signaling by GPCR; Signaling by GPCR

SDHA	Metabolism; Metabolism; Metabolism; Metabolism; Metabolism; Metabolism; Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; The tricarboxylic acid cycle
SLC12A7	SLC-mediated transmembrane transport; SLC-mediated transmembrane transport; SLC-mediated transmembrane transport; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules; Transmembrane transport of small molecules; Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides; Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides; Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides
SMN1	Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Metabolism of non-coding RNA; Metabolism of non-coding RNA; Metabolism of non-coding RNA; Metabolism of non-coding RNA
SMN2	Gene Expression; Metabolism of non-coding RNA
TAF13	Disease; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; Gene Expression; HIV Infection; HIV Life Cycle; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription; RNA Polymerase II Transcription
UGT2B15	Biological oxidations; Metabolism; Phase II conjugation
UGT2B17	Biological oxidations; Metabolism; Phase II conjugation
VAMP7	Membrane Trafficking
VKORC1L1	Gene Expression; Generic Transcription Pathway
ZDHHC19	Gene Expression; Generic Transcription Pathway
ZNF286B	Gene Expression; Generic Transcription Pathway
ZNF320	Gene Expression; Generic Transcription Pathway

Interacciones conocidas de los genes activados por resveratrol a las 24 horas.

Name	Known interaction
CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen) (344 aa)
DDT	D-dopachrome tautomerase; Tautomerization of D-dopachrome with decarboxylation to give 5,6-dihydroxyindole (DHI) (118 aa)
CST4	cystatin S; Human saliva appears to contain several cysteine proteinase inhibitors that are immunologically related to cystatin S but that differ in their specificity due to amino acid sequence differences. Cystatin SN, with a pI of 7.5, is a much better inhibitor of papain and dipeptidyl peptidase I than is cystatin S, although both inhibit ficin equally well (141 aa)
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3; Chemotactic for lymphocytes and monocytes. Is a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5. Is an inhibitor of HIV-1-infection. The processed form LD78-beta(3-70) shows a 20-fold to 30-fold higher chemotactic activity and is a very potent inhibitor of HIV-1- infection. LD78-beta(3-70) is also a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5 (92 aa)
PRAMEF10	PRAME family member 10 (474 aa)
SEPT7L	Novel protein (92 aa)
PRAMEF2	PRAME family member 2 (474 aa)
QCM	oncomodulin; Has some calmodulin-like activity with respect to enzyme activation and growth regulation. Binds two calcium ions (109 aa)
FKBP9	FK506 binding protein 9, 63 kDa; PPIases accelerate the folding of proteins during protein synthesis (570 aa)
ZNF468	zinc finger protein 468; May be involved in transcriptional regulation (522 aa)
HIST1H2BJ	histone cluster 1, H2bj; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (126 aa)
TMEM111	transmembrane protein 111 (261 aa)
KATNAL2	katanin p60 subunit A-like 2; Severs microtubules in vitro in an ATP-dependent manner. This activity may promote rapid reorganization of cellular microtubule arrays (By similarity) (466 aa)
SBDS	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome; May be involved in the biogenesis of the 60S ribosomal subunit and translational activation of ribosomes. May trigger the GTP-dependent release of EIF6 from 60S pre-ribosomes in the cytoplasm, thereby activating ribosomes for translation competence by allowing 80S ribosome assembly and facilitating EIF6 recycling to the nucleus, where it is required for 60S rRNA processing and nuclear export (By similarity) (250 aa)
USP6	ubiquitin specific peptidase 6 (Tre-2 oncogene); Has an ATP-independent isopeptidase activity, cleaving at the C-terminus of the ubiquitin moiety. In vitro, isoform 2, but not isoform 3, shows deubiquitinating activity (1406 aa)
ZNF232	zinc finger protein 232; May be involved in transcriptional regulation (444 aa)
HSD17B7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7; Responsible for the reduction of the keto group on the C-3 of sterols (341 aa)
SAA2	serum amyloid A2; Major acute phase reactant. Apolipoprotein of the HDL complex (By similarity) (122 aa)
ANKRD36	ankyrin repeat domain 36B (1353 aa)
CBWD2	COBW domain containing 2 (395 aa)
CFC1	cripto, FRL-1, cryptic family 1; Involved in the correct establishment of the left-right axis. May play a role in mesoderm and/or neural patterning during gastrulation (223 aa)
SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5; Sodium-independent, high-affinity transport of large neutral amino acids such as phenylalanine, tyrosine, leucine, arginine and tryptophan, when associated with SLC3A2/4F2hc. Involved in cellular amino acid uptake. Acts as an amino acid exchanger. Involved in the transport of L-DOPA across the blood- brain barrier, and that of thyroid hormones triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) across the cell membrane in tissues such as placenta. Plays a role in neuronal cell proliferation (neurogenesis) in brain. In [...] (507 aa)
FGF7	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor); Growth factor active on keratinocytes. Possible major paracrine effector of normal epithelial cell proliferation (194 aa)
ARHGDI	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha; Regulates the GDP/GTP exchange reaction of the Rho proteins by inhibiting the dissociation of GDP from them, and the subsequent binding of GTP to them (By similarity) (204 aa)
AMMECR1L	AMME chromosomal region gene 1-like (310 aa)
GTF2H2	general transcription factor IIH, polypeptide 2, 44 kDa; Component of the core-TFIIH basal transcription factor involved in nucleotide excision repair (NER) of DNA and, when complexed to CAK, in RNA transcription by RNA polymerase II. The N-terminus interacts with and regulates XPD whereas an intact C-terminus is required for a successful escape of RNAP II from the promoter (395 aa)
CFC1B	cripto, FRL-1, cryptic family 1B; Involved in the correct establishment of the left-right axis. May play a role in mesoderm and/or neural patterning during gastrulation (223 aa)
FLJ36492	coiled-coil domain containing 144B (724 aa)
ZNF714	zinc finger protein 714; May be involved in transcriptional regulation (554 aa)
KIR3DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3; Receptor on natural killer cells. May inhibit the activity of NK cells thus preventing cell lysis (410 aa)
BTN2A3	butyrophilin, subfamily 2, member A3 (586 aa)
POTED	POTE ankyrin domain family, member D (584 aa)
ZNF701	zinc finger protein 701; May be involved in transcriptional regulation (465 aa)
SPACA5B	sperm acrosome associated 5B (159 aa)
DTYMK	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase); Catalyzes the conversion of dTMP to dTDP (212 aa)
OR1S2	olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 2; Odorant receptor (Potential) (325 aa)
SPACA5	sperm acrosome associated 5 (159 aa)
ZNF182	zinc finger protein 182; May be involved in transcriptional regulation (639 aa)
MRPL45	mitochondrial ribosomal protein L45 (306 aa)

ALG10B	asparagine-linked glycosylation 10, alpha-1,2-glucosyltransferase homolog B (yeast); Putative alpha-1,2-glucosyltransferase, which adds the third glucose residue to the lipid-linked oligosaccharide precursor for N-linked glycosylation. Transfers glucose from dolichyl phosphate glucose (Dol-P-Glc) onto the lipid-linked oligosaccharide Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol. When coupled to KCNH2 may reduce KCNH2 sensitivity to classic proarrhythmic drug blockade, possibly by mediating glycosylation of KCNH2 (473 aa)
BTN2A1	butyrophilin, subfamily 2, member A1 (527 aa)
FAM156A	family with sequence similarity 156, member B (213 aa)
STAG3	stromal antigen 3; Meiosis specific component of cohesin complex. The cohesin complex is required for the cohesion of sister chromatids after DNA replication. The cohesin complex apparently forms a large proteinaceous ring within which sister chromatids can be trapped. At anaphase, the complex is cleaved and dissociates from chromatin, allowing sister chromatids to segregate. The meiosis-specific cohesin complex probably replaces mitosis specific cohesin complex when it dissociates from chromatin during prophase I (By similarity) (1225 aa)
OR4N2	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 3 pseudogene; Odorant receptor (Potential) (307 aa)
EPN2	epsin 2; Plays a role in the formation of clathrin-coated invaginations and endocytosis (641 aa)
DEFB104A	defensin, beta 104A (72 aa)
DEFB104B	defensin, beta 104B; Has antimicrobial activity. Synergistic effects with lysozyme and DEFB103 (72 aa)
ZNF321	zinc finger protein 321 (164 aa)
OR2T35	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 35; Odorant receptor (Potential) (323 aa)
KIR3DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA-A alleles. Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (455 aa)
OR1D4	olfactory receptor, family 1, subfamily D, member 4; Odorant receptor (Potential) (330 aa)
TRIM49	tripartite motif-containing 49 (452 aa)
PRAMEF15	PRAME family member 15 (478 aa)
ICEB3C	transcription elongation factor B polypeptide 3C (elongin A3); SIII, also known as elongin, is a general transcription elongation factor that increases the RNA polymerase II transcription elongation past template-encoded arresting sites. Subunit A3 is transcriptionally active but its transcription activity is not enhanced by binding to the dimeric complex of the SIII regulatory subunits B and C (elongin BC complex) (By similarity) (546 aa)
DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific; Defensin 1 and defensin 2 have antibacterial, fungicide and antiviral activities. Has antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Defensins are thought to kill microbes by permeabilizing their plasma membrane (94 aa)
PRAMEF7	PRAME family member 7 (474 aa)
OR4C46	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 46; Odorant receptor (Potential) (309 aa)
LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C; Binds galactosides. Has high affinity for the Forssman pentasaccharide. May play a role in thymocyte-epithelial interactions relevant to the biology of the thymus. Inhibits cell proliferation. It is a ligand for HAVCR2/TIM3. Induces T-helper type 1 lymphocyte (Th1) death. Isoform Short acts as an eosinophil chemoattractant (356 aa)
OR4Q3	olfactory receptor, family 4, subfamily Q, member 3; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
CD8B	CD8b molecule; Identifies cytotoxic/suppressor T-cells that interact with MHC class I bearing targets. CD8 is thought to play a role in the process of T-cell mediated killing (By similarity) (243 aa)
OR2T29	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 29; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
PRAMEF19	PRAME family member 19 (481 aa)
PRAMEF21	PRAME family member 21 (475 aa)
CTAG1A	cancer/testis antigen 1A (180 aa)
PRAMEF1	PRAME family member 1 (474 aa)
OR4N4	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4; Odorant receptor (Potential) (316 aa)
CTAG1B	cancer/testis antigen 1B (180 aa)
EIF3C	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C; Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2-GTP-methionyl-tRNAi and eIF-5 to form the 43S preinitiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of posttermination ribosome [...] (913 aa)
RGPD2	RANBP2-like and GRIP domain containing 2; E3 SUMO-protein ligase which facilitates SUMO1 and SUMO2 conjugation by UBE2L. Involved in transport factor (Ran-GTP, karyopherin)-mediated protein import via the F-G repeat-containing domain which acts as a docking site for substrates. Could also have isomerase or chaperone activity and may bind RNA or DNA. Component of the nuclear export pathway. Specific docking site for the nuclear export factor exportin-1 (1013 aa)
UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B28; UDPGTs are of major importance in the conjugation and subsequent elimination of potentially toxic xenobiotics and endogenous compounds. This isozyme has glucuronidating capacity with steroid substrates such as 5-beta-androstane 3-alpha,17-beta-diol, estradiol, ADT, eugenol and bile acids. Only isoform 1 seems to be active (529 aa)
DEFB105A	defensin, beta 105A (78 aa)
DEFB106B	defensin, beta 106B; Has antibacterial activity (65 aa)
DEFB107A	defensin, beta 107A (70 aa)
PNRC2	proline-rich nuclear receptor coactivator 2 (139 aa)
DEFB105B	defensin, beta 105B; Has antibacterial activity (Potential) (78 aa)
DEFB106A	defensin, beta 106A (65 aa)
KIR2DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA-C alleles (HLA-Cw1, HLA-Cw3 and HLA-Cw7). Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (348 aa)
KIR2DL4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4 (342 aa)

ZNF600	zinc finger protein 600; May be involved in transcriptional regulation (722 aa)
RPS17	ribosomal protein S17 (135 aa)
PRAMEF20	PRAME family member 20 (475 aa)
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide; Platelet-derived growth factor is a potent mitogen for cells of mesenchymal origin. Binding of this growth factor to its affinity receptor elicits a variety of cellular responses. It is released by platelets upon wounding and plays an important role in stimulating adjacent cells to grow and thereby heals the wound (211 aa)
OR8B3	olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 3; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
MINK1	misshapen-like kinase 1 (zebrafish); Serine/threonine kinase that may play a role in the response to environmental stress. Appears to act upstream of the JUN N-terminal pathway. May play a role in the development of the brain (By similarity) (1332 aa)
DEFB107B	defensin, beta 107B; Has antibacterial activity (Potential) (70 aa)
HSD17B7P2	Putative uncharacterized protein HSD17B7P2 ; Responsible for the reduction of the keto group on the C-3 of sterols (341 aa)
CBWD1	COBW domain containing 1 (395 aa)
SAA1	serum amyloid A1; Major acute phase reactant. Apolipoprotein of the HDL complex (By similarity) (122 aa)
BTN2A2	butyrophilin, subfamily 2, member A2 (523 aa)
CSAG3	CSAG family, member 3; Drug-resistance related protein, its expression is associated with the chemotherapy resistant and neoplastic phenotype. May also be linked to the malignant phenotype (127 aa)
POTEM	ANKRD26-like family C member ENSP00000349402 (508 aa)
HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (126 aa)
FAM115C	family with sequence similarity 115, member C (845 aa)
PRAMEF8	PRAME family member 8 (474 aa)
ANAPC11	anaphase promoting complex subunit 11; Component of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), a cell cycle-regulated E3 ubiquitin ligase that controls progression through mitosis and the G1 phase of the cell cycle. The APC/C complex acts by mediating ubiquitination and subsequent degradation of target proteins- it mainly mediates the formation of 'Lys-11'-linked polyubiquitin chains and, to a lower extent, the formation of 'Lys-48'- and 'Lys-63'-linked polyubiquitin chains. May recruit the E2 ubiquitin-conjugating enzymes to the complex (196 aa)
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2; Receptor for CCL2, CCL5, CCL7 and CCL8 (By similarity) (356 aa)
C6orf124	Uncharacterized protein C6orf124 (Protein HGC6.4) (254 aa)
ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3; Cleaves a variety of phosphodiester and phosphosulfate bonds including deoxynucleotides, nucleotide sugars, and NAD (By similarity) (875 aa)
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIB, receptor (CD32); Receptor for the Fc region of complexed or aggregated immunoglobulins gamma. Low affinity receptor. Involved in a variety of effector and regulatory functions such as phagocytosis of immune complexes and modulation of antibody production by B- cells. Binding to this receptor results in down-modulation of previous state of cell activation triggered via antigen receptors on B-cells (BCR), T-cells (TCR) or via another Fc receptor. Isoform IIB1 fails to mediate endocytosis or phagocytosis. Isoform IIB2 does not trigger phagocytosis (310 aa)
HIST1H2AI	histone cluster 1, H2Ai (130 aa)
OR2T3	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 3; Odorant receptor (Potential) (318 aa)
TYW1	tRNA-yW synthesizing protein 1 homolog (S. cerevisiae); Probable component of the wybutosine biosynthesis pathway. Wybutosine is a hyper modified guanosine with a tricyclic base found at the 3'-position adjacent to the anticodon of eukaryotic phenylalanine tRNA (By similarity) (732 aa)
CBWD3	COBW domain containing 3 (395 aa)
NOTCH2NL	Notch homolog 2 (Drosophila) N-terminal like; May function in the Notch signaling pathway and regulate neutrophil differentiation (236 aa)
PCDH11Y	protocadherin 11 Y-linked; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein (1048 aa)
OR2T5	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 5; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a); Receptor for the Fc region of immunoglobulins gamma. Low affinity receptor. Binds complexed or aggregated IgG and also monomeric IgG. Contrary to III-A, is not capable to mediate antibody-dependent cytotoxicity and phagocytosis. May serve as a trap for immune complexes in the peripheral circulation which does not activate neutrophils (290 aa)
HIST2H4B	histone cluster 2, H4b (103 aa)
HIST1H3H	histone cluster 1, H3h; Variant histone H3 which replaces conventional H3 in a wide range of nucleosomes in active genes. Constitutes the predominant form of histone H3 in non-dividing cells and is incorporated into chromatin independently of DNA synthesis. Deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes, suggesting that it represents an epigenetic imprint of transcriptionally active chromatin. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a centr [...] (136 aa)
HIST2H4A	histone cluster 2, H4a (103 aa)
HIST2H2BF	histone cluster 2, H2bf; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (By similarity) (126 aa)
SPANXN3	SPANX family, member N3 (141 aa)
RHOF2	Rhox homeobox family, member 2 (288 aa)
RHOF2B	Rhox homeobox family, member 2B (288 aa)

SFTPA1	surfactant protein A1; In presence of calcium ions, it binds to surfactant phospholipids and contributes to lower the surface tension at the air-liquid interface in the alveoli of the mammalian lung and is essential for normal respiration (248 aa)
SFTPA2	surfactant protein A2; In presence of calcium ions, it binds to surfactant phospholipids and contributes to lower the surface tension at the air-liquid interface in the alveoli of the mammalian lung and is essential for normal respiration (248 aa)
NXF2B	nuclear RNA export factor 2B; Involved in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm (626 aa)
NXF2	nuclear RNA export factor 2; Involved in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm (626 aa)
OXC2	3-oxoacid CoA transferase 2; Key enzyme for ketone body catabolism. Transfers the CoA moiety from succinate to acetoacetate. Formation of the enzyme-CoA intermediate proceeds via an unstable anhydride species formed between the carboxylate groups of the enzyme and substrate (By similarity) (517 aa)
BMP8B	bone morphogenetic protein 8b; Induces cartilage and bone formation. May be the osteoinductive factor responsible for the phenomenon of epithelial osteogenesis. Plays a role in calcium regulation and bone homeostasis (By similarity) (402 aa)
PCDH11X	protocadherin 11 X-linked; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein (1347 aa)
PABPC1L2B	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like 2B (200 aa)
OR8B2	olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 2; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
ZNF322B	zinc finger protein 322B; May be involved in transcriptional regulation (By similarity) (402 aa)
HIAL2	hippocampus abundant transcript-like 2 (134 aa)
HIAL1	hippocampus abundant transcript-like 1 (506 aa)
PRAMEF18	PRAME family member 18 (479 aa)
PRAMEF9	PRAME family member 9 (478 aa)
PRAMEF22	PRAME family member 22 (481 aa)
SSX4B	synovial sarcoma, X breakpoint 4B (188 aa)
SSX4	synovial sarcoma, X breakpoint 4; Could act as a modulator of transcription (188 aa)
CBWD5	COBW domain containing 5 (347 aa)
HIST1H2BL	histone cluster 1, H2bl; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (126 aa)
CBWD6	COBW domain containing 6 (395 aa)
FAM27A	family with sequence similarity 27, member A (67 aa)
PRR20B	proline rich 20B (221 aa)
PRR20A	proline rich 20A (221 aa)
CCL3L1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1; Chemotactic for lymphocytes and monocytes. Is a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5. Is an inhibitor of HIV-1-infection. The processed form LD78-beta(3-70) shows a 20-fold to 30-fold higher chemotactic activity and is a very potent inhibitor of HIV-1- infection. LD78-beta(3-70) is also a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5 (93 aa)
OR4A5	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 5; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
FAM106A	family with sequence similarity 106, member A (169 aa)
PMS2L10	Postmeiotic segregation increased 2-like protein 2 (Postmeiotic segregation increased 2-like protein 14)(Postmeiotic segregation increased protein 4) (232 aa)
SMN1	survival of motor neuron 1, telomeric (294 aa)
GTF2H2C	general transcription factor IIH, polypeptide 2C; Component of the core-TFIIH basal transcription factor involved in nucleotide excision repair (NER) of DNA and, when complexed to CAK, in RNA transcription by RNA polymerase II. The N-terminus interacts with and regulates XPD whereas an intact C- terminus is required for a successful escape of RNAP II from the promoter (395 aa)
SMN2	survival of motor neuron 2, centromeric; The SMN complex plays an essential role in spliceosomal snRNP assembly in the cytoplasm and is required for pre-mRNA splicing in the nucleus. It may also play a role in the metabolism of snoRNPs (294 aa)
EIF3CL	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C-like; Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2-GTP-methionyl-tRNAi and eIF-5 to form the 43S preinitiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of posttermination ri [...] (914 aa)
CRLF2	cytokine receptor-like factor 2; Receptor for thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Forms a functional complex with TSLP and IL7R which is capable of stimulating cell proliferation through activation of STAT3 and STAT5. Also activates JAK2 (By similarity). Implicated in the development of the hematopoietic system (256 aa)
DEFA1	defensin, alpha 1; Defensin 1 and defensin 2 have antibacterial, fungicide and antiviral activities. Has antimicrobial activity against Gram- negative and Gram-positive bacteria. Defensins are thought to kill microbes by permeabilizing their plasma membrane (94 aa)
DEFA1B	defensin, alpha 1B; Defensin 1 and defensin 2 have antibacterial, fungicide and antiviral activities. Has antimicrobial activity against Gram- negative and Gram-positive bacteria. Defensins are thought to kill microbes by permeabilizing their plasma membrane (94 aa)
ZFP62	zinc finger protein 62 homolog (mouse); May play a role in differentiating skeletal muscle (By similarity) (840 aa)
PTPRN2	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2; Implicated in development of nervous system and pancreatic endocrine cells (1015 aa)
KRTAP2-1	keratin associated protein 2-1; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (128 aa)
ASH1L	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila); Histone methyltransferase. Probably methylates 'Lys-4' of histone H3, a specific tag for epigenetic transcriptional activation (By similarity) (2964 aa)

KRTAP4-12	keratin associated protein 4-12; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (201 aa)
PMS2L5	postmeiotic segregation increased 2-like 5 (159 aa)
ZNF286A	zinc finger protein 286A; May be involved in transcriptional regulation (521 aa)
ZNF765	zinc finger protein 765; May be involved in transcriptional regulation (By similarity) (523 aa)
C6orf103	Calpain-7-like protein ; Not known. Probably catalytically inactive (1667 aa)
ENSG00000236761	Putative uncharacterized protein ENSP00000381209 Fragment (230 aa)
RGPD1	RANBP2-like and GRIP domain containing 1; E3 SUMO-protein ligase which facilitates SUMO1 and SUMO2 conjugation by UBE2I. Involved in transport factor (Ran-GTP, karyopherin)-mediated protein import via the F-G repeat-containing domain which acts as a docking site for substrates. Could also have isomerase or chaperone activity and may bind RNA or DNA. Component of the nuclear export pathway. Specific docking site for the nuclear export factor exportin-1 (1756 aa)
MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4; Belongs to an adhesion system, probably together with the E-cadherin-catenin system, which plays a role in the organization of homotypic, interneuronal and heterotypic cell-cell adherens junctions (AJs). Nectin- and actin-filament-binding protein that connects nectin to the actin cytoskeleton (1834 aa)
KIR2DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, short cytoplasmic tail, 1; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA Bw4 allele. Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (455 aa)
FAM72D	family with sequence similarity 72, member D (149 aa)
ANKRD30BL	non-protein coding RNA 164 (258 aa)
POTEG	POTE ankyrin domain family, member G (508 aa)
LGALS9B	lectin, galactoside-binding, soluble, 9B; Binds galactosides. Has high affinity for the Forssman pentasaccharide. May play a role in thymocyte-epithelial interactions relevant to the biology of the thymus. Inhibits cell proliferation. It is a ligand for HAVCR2/TIM3. Induces T-helper type 1 lymphocyte (Th1) death. Isoform Short acts as an eosinophil chemoattractant (355 aa)
PRR20D	proline rich 20D (221 aa)
DEFB130	defensin, beta 130; Has antibacterial activity (Potential) (79 aa)
TEX101	testis expressed 101; May play a role in signal transduction and promote protein tyrosine phosphorylation (By similarity) (267 aa)
STAG3L2	stromal antigen 3-like 2; Meiosis specific component of cohesin complex. The cohesin complex is required for the cohesion of sister chromatids after DNA replication. The cohesin complex apparently forms a large proteinaceous ring within which sister chromatids can be trapped. At anaphase, the complex is cleaved and dissociates from chromatin, allowing sister chromatids to segregate. The meiosis- specific cohesin complex probably replaces mitosis specific cohesin complex when it dissociates from chromatin during prophase I (By similarity) (134 aa)
LOC643854	CTAGE family, member 9; Tumor-associated antigen (777 aa)
FAM86A	family with sequence similarity 86, member A (330 aa)
ZNF761	zinc finger protein 761; May be involved in transcriptional regulation (By similarity) (746 aa)
CSAG2	CSAG family, member 2 (127 aa)
UBTFL2	HCG1799097Putative uncharacterized protein ENSP00000403967 ; (393 aa)
PRR20E	proline rich 20E (221 aa)
LIMS3	LIM and senescent cell antigen-like domains 3; Effector of integrin and growth factor signaling, coupling surface receptors to downstream signaling molecules involved in the regulation of cell survival, cell proliferation and cell differentiation. Focal adhesion protein part of the complex ILK-PINCH. This complex is considered to be one of the convergence points of integrin- and growth factor-signaling pathway (117 aa)
SEPT7P2	septin 13 (285 aa)
GTF2H2B	general transcription factor IIH, polypeptide 2B; Component of the core-TFIIH basal transcription factor involved in nucleotide excision repair (NER) of DNA and, when complexed to CAK, in RNA transcription by RNA polymerase II. The N-terminus interacts with and regulates XPD whereas an intact C- terminus is required for a successful escape of RNAP II from the promoter (395 aa)
FAM86B1	family with sequence similarity 86, member B1 (296 aa)
ENSG00000176476	coiled-coil domain containing 101 pseudogene (LOC388242), non-coding RNA; Involved in transcriptional regulation, probably through association with histone acetyltransferase (HAT) complexes like the TFIIIC-HAT or STAGA complexes. May be involved in c-Myc-mediated oncogenic transformation (By similarity). Component of the ATAC complex, a complex with histone acetyltransferase activity on histones H3 and H4 (168 aa)
OR2J3	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 3 (311 aa)
SPAG11B	sperm associated antigen 11B (133 aa)
IRIM64	tripartite motif-containing 64 (455 aa)
TCEB3CL	transcription elongation factor B polypeptide 3C-like; SIII, also known as elongin, is a general transcription elongation factor that increases the RNA polymerase II transcription elongation past template-encoded arresting sites. Subunit A3 is transcriptionally active but its transcription activity is not enhanced by binding to the dimeric complex of the SIII regulatory subunits B and C (elongin BC complex) (By similarity) (546 aa)
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase); Caspase inhibitor. Acts as a regulator of procaspase- 1/CASP1 activation implicated in the regulation of the proteolytic maturation of pro-Interleukin-1 beta (IL1B) and its release during inflammation. Inhibits the release of IL1B in response to LPS in monocytes. Also induces NF-kappa-B activation during the pro- inflammatory cytokine response. Also able to inhibit CASP1 - mediated neuronal cell death, TNF-alpha, hypoxia-, UV-, and staurosporine-mediated cell death but not ER stress-mediated cell death. A [...] (404 aa)
PRR20C	proline rich 20C (221 aa)
MST1P9	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) pseudogene 9; Probably has no proteolytic activity, since crucial characteristic of serine proteases catalytic sites are not conserved (By similarity) (715 aa)
FAM41C	Putative protein FAM41C (46 aa)

CTAGE4	CTAGE family, member 4; Tumor-associated antigen (777 aa)
FCGR2C	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32); Receptor for the Fc region of complexed or aggregated immunoglobulins gamma. Low affinity receptor. Involved in a variety of effector and regulatory functions such as phagocytosis of immune complexes and modulation of antibody production by B- cells. Binding to this receptor results in down-modulation of previous state of cell activation triggered via antigen receptors on B-cells (BCR), T-cells (TCR) or via another Fc receptor. Isoform IIB1 fails to mediate endocytosis or phagocytosis. Isoform IIB2 does not trigger phagocytosis (181 aa)
PRB1	proline-rich protein BstNI subfamily 1 (330 aa)

(Homo sapiens)

String-db.org

Interacciones conocidas de los genes activados por resveratrol a las 48 horas.

Name	Known interaction
FAM65C	family with sequence similarity 65, member C (946 aa)
ASAH2B	N-acylsphingosine amidohydrolase (non-lysosomal ceramidase) 2B; Hydrolyzes the sphingolipid ceramide into sphingosine and free fatty acid at an optimal pH of 6.5-8.5. Acts as a key regulator of sphingolipid signaling metabolites by generating sphingosine at the cell surface. Acts as a repressor of apoptosis both by reducing C16-ceramide, thereby preventing ceramide-induced apoptosis, and generating sphingosine, a precursor of the antiapoptotic factor sphingosine 1-phosphate. Probably involved in the digestion of dietary sphingolipids in intestine by acting as a key enzyme for the catab [...] (165 aa)
CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen) (344 aa)
ADH1A	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide (375 aa)
DDTL	D-dopachrome tautomerase-like; May have lyase activity (Potential) (134 aa)
DDI	D-dopachrome tautomerase; Tautomerization of D-dopachrome with decarboxylation to give 5,6-dihydroxyindole (DHI) (118 aa)
GSTT2	glutathione S-transferase theta 2; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles. Has a sulfatase activity (244 aa)
LHB	lutinizing hormone beta polypeptide; Promotes spermatogenesis and ovulation by stimulating the testes and ovaries to synthesize steroids (141 aa)
CEACAM4	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4 (244 aa)
AIMP2	aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2; Required for assembly and stability of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. Mediates ubiquitination and degradation of FUBP1, a transcriptional activator of MYC, leading to MYC down-regulation which is required for avascular type II cell differentiation. Blocks MDM2-mediated ubiquitination and degradation of TP53/p53. Functions as a proapoptotic factor (320 aa)
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3; Chemotactic for lymphocytes and monocytes. Is a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5. Is an inhibitor of HIV-1-infection. The processed form LD78-beta(3-70) shows a 20-fold to 30-fold higher chemotactic activity and is a very potent inhibitor of HIV-1-infection. LD78-beta(3-70) is also a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5 (92 aa)
FAM18B2	family with sequence similarity 18, member B2 (276 aa)
HSPA8	heat shock 70kDa protein 8; Chaperone. Isoform 2 may function as an endogenous inhibitory regulator of HSC70 by competing the co-chaperones (646 aa)
CCDC86	coiled-coil domain containing 86 (360 aa)
NANOG	Nanog homeobox; Transcription regulator involved in inner cell mass and embryonic stem (ES) cells proliferation and self-renewal. Imposes pluripotency on ES cells and prevents their differentiation towards extraembryonic endoderm and trophectoderm lineages. Blocks bone morphogenetic protein-induced mesoderm differentiation of ES cells by physically interacting with SMAD1 and interfering with the recruitment of coactivators to the active SMAD transcriptional complexes (By similarity). Acts as a transcriptional activator or repressor (By similarity). Binds optimally to the DNA consensus [...] (305 aa)
KATNAL2	katanin p60 subunit A-like 2; Severs microtubules in vitro in an ATP-dependent manner. This activity may promote rapid reorganization of cellular microtubule arrays (By similarity) (466 aa)
FAM182A	family with sequence similarity 182, member A (154 aa)
HTN1	histatin 1; Histatins are salivary proteins that are considered to be major precursors of the protective proteinaceous structure on tooth surfaces (enamel pellicle). In addition, histatins exhibit antibacterial and antifungal activities (57 aa)
OR1E2	olfactory receptor, family 1, subfamily E, member 2; Odorant receptor (Potential) (323 aa)
CD68	CD68 molecule; Could play a role in phagocytic activities of tissue macrophages, both in intracellular lysosomal metabolism and extracellular cell-cell and cell-pathogen interactions. Binds to tissue- and organ-specific lectins or selectins, allowing homing of macrophage subsets to particular sites. Rapid recirculation of CD68 from endosomes and lysosomes to the plasma membrane may allow macrophages to crawl over selectin-bearing substrates or other cells (354 aa)
MPDU1	mannose-P-dolichol utilization defect 1; Not known. May be involved in the synthesis of the sugar donor Do1-P-Man which is required in the synthesis of N-linked and O-linked oligosaccharides and for that of GPI anchors (By similarity) (247 aa)
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4; Monokine with inflammatory and chemokinetic properties. Binds to CCR5. One of the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T-cells. Recombinant MIP-1-beta induces a dose-dependent inhibition of different strains of HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus (SIV). The processed form MIP-1-beta(3-69) retains the abilities to induce down-modulation of surface expression of the chemokine receptor CCR5 and to inhibit the CCR5-mediated entry of HIV-1 in T-cells. MIP-1-beta(3-69) is also a ligand for CCR1 and CCR2 isoform B (92 aa)
GIYD2	GIY-YIG domain containing 2 (275 aa)
LILRA1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1; May act as receptor for class I MHC antigens (489 aa)
LILRA3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3; May act as soluble receptor for class I MHC antigens (439 aa)
HBA2	hemoglobin, alpha 2; Involved in oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues (By similarity) (142 aa)
GALNT8	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 8 (GalNAc-T8); Probably catalyzes the initial reaction in O-linked oligosaccharide biosynthesis, the transfer of an N-acetyl-D-galactosamine residue to a serine or threonine residue on the protein receptor (By similarity) (637 aa)
OR11H1	olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 1; Odorant receptor (Potential) (326 aa)
FAM22F	family with sequence similarity 22, member F (756 aa)
FAM153A	family with sequence similarity 153, member B (387 aa)
PCDH A6	protocadherin alpha subfamily C, 1; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain (963 aa)
KRTAP9-8	keratin associated protein 9-8; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high-sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (159 aa)
HSD17B7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7; Responsible for the reduction of the keto group on the C-3 of steroids (341 aa)
ADAM20	ADAM metalloproteinase domain 20; May be involved in sperm maturation and/or fertilization (776 aa)

NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila); Functions as a receptor for membrane-bound ligands Jagged1, Jagged2 and Delta1 to regulate cell-fate determination. Upon ligand activation through the released notch intracellular domain (NICD) it forms a transcriptional activator complex with RBP-J kappa and activates genes of the enhancer of split locus. Affects the implementation of differentiation, proliferation and apoptotic programs (By similarity) (2471 aa)
GNS	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (552 aa)
ANKRD36	ankyrin repeat domain 36B (1353 aa)
CBWD2	COBW domain containing 2 (395 aa)
CFC1	cripto, FRL-1, cryptic family 1; Involved in the correct establishment of the left-right axis. May play a role in mesoderm and/or neural patterning during gastrulation (223 aa)
OR13C9	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 9; Odorant receptor (Potential) (318 aa)
OR1L4	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 4; Odorant receptor (Potential) (311 aa)
CCBL2	cysteine conjugate-beta lyase 2; Catalyzes the irreversible transamination of the L- tryptophan metabolite L- kynurenine to form kynurenic acid (KA). May catalyze the beta-elimination of S-conjugates and Se- conjugates of L- (seleno)cysteine, resulting in the cleavage of the C-S or C-Se bond (By similarity) (454 aa)
MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3; Histone methyltransferase. Methylates 'Lys-4' of histone H3. H3 'Lys-4' methylation represents a specific tag for epigenetic transcriptional activation. Central component of the MLL2/MLL3 complex, a coactivator complex of nuclear receptors, involved in transcriptional coactivation. MLL3 may be a catalytic subunit of this complex. May be involved in leukemogenesis and developmental disorder (4911 aa)
FAM86B2	family with sequence similarity 86, member B2 (330 aa)
METTL2B	methyltransferase like 2B; Probable methyltransferase (By similarity) (378 aa)
CHCHD3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3 (227 aa)
CABIN1	calcineurin binding protein 1; May be required for replication-independent chromatin assembly. May serve as a negative regulator of T-cell receptor (TCR) signaling via inhibition of calcineurin. Inhibition of activated calcineurin is dependent on both PKC and calcium signals (2220 aa)
NOX4	NADPH oxidase 4; Constitutive NADPH oxidase which generates superoxide intracellularly upon formation of a complex with CYBA/p22phox. Regulates signaling cascades probably through phosphatases inhibition. May function as an oxygen sensor regulating the KCNK3/TASK-1 potassium channel and HIF1A activity. May regulate insulin signaling cascade. May play a role in apoptosis, bone resorption and lipolysaccharide-mediated activation of NFKB. May produce superoxide in the nucleus and play a role in regulating gene expression upon cell stimulation. Isoform 3 is not functional. Isoform 4 displa [...] (578 aa)
AREG	amphiregulin; Bifunctional growth-modulating glycoprotein. Inhibits growth of several human carcinoma cells in culture and stimulates proliferation of human fibroblasts and certain other tumor cells (252 aa)
GPN1	GPN-loop GTPase 1; Forms an interface between the RNA polymerase II enzyme and chaperone/scaffolding protein, suggesting that it is required to connect RNA polymerase II to regulators of protein complex formation. May be involved in nuclear localization of XPA (388 aa)
ALG10	asparagine-linked glycosylation 10, alpha-1,2-glucosyltransferase homolog (S. pombe); Putative alpha-1,2-glucosyltransferase, which adds the third glucose residue to the lipid-linked oligosaccharide precursor for N-linked glycosylation. Transfers glucose from dolichyl phosphate glucose (Dol-P-Glc) onto the lipid-linked oligosaccharide Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol. When coupled to KCNH2 may reduce KCNH2 sensitivity to classic proarrhythmic drug blockade, possibly by mediating glycosylation of KCNH2 (473 aa)
ADAM21	ADAM metallopeptidase domain 21 pseudogene 1; May be involved in sperm maturation and/or fertilization. May also be involved in epithelia functions associated with establishing and maintaining gradients of ions or nutrients (722 aa)
EGF7	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor); Growth factor active on keratinocytes. Possible major paracrine effector of normal epithelial cell proliferation (194 aa)
ARHGDI	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha; Regulates the GDP/GTP exchange reaction of the Rho proteins by inhibiting the dissociation of GDP from them, and the subsequent binding of GTP to them (By similarity) (204 aa)
NAT8	N-acetyltransferase 8B (GCN5-related, putative, gene/pseudogene); Plays a role in regulation of gastrulation (227 aa)
AMMECR1L	AMME chromosomal region gene 1-like (310 aa)
GTF2H2	general transcription factor IIH, polypeptide 2, 44kDa; Component of the core-TFIIH basal transcription factor involved in nucleotide excision repair (NER) of DNA and, when complexed to CAK, in RNA transcription by RNA polymerase II. The N-terminus interacts with and regulates XPD whereas an intact C- terminus is required for a successful escape of RNAP II from the promoter (395 aa)
NLGN4X	neuroligin 4, X-linked; Putative neuronal cell surface protein involved in cell-cell-interactions (816 aa)
FBXO25	F-box protein 25; Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex (367 aa)
NACC2	NACC family member 2, BEN and BTB (POZ) domain containing (587 aa)
CFC1B	cripto, FRL-1, cryptic family 1B; Involved in the correct establishment of the left-right axis. May play a role in mesoderm and/or neural patterning during gastrulation (223 aa)
CDH12	cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2); Cadherins are calcium dependent cell adhesion proteins. They preferentially interact with themselves in a homophilic manner in connecting cells; cadherins may thus contribute to the sorting of heterogeneous cell types (794 aa)
FLJ36492	coiled-coil domain containing 144B (724 aa)
GSTT2B	glutathione S-transferase theta 2B (gene/pseudogene); Conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles. Has a sulfatase activity (244 aa)
OR3A3	olfactory receptor, family 3, subfamily A, member 3; Odorant receptor (Potential) (321 aa)
KIR3DL3	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3; Receptor on natural killer cells. May inhibit the activity of NK cells thus preventing cell lysis (410 aa)
MED27	mediator complex subunit 27; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a bridge to convey information from gene-specific regulatory proteins to the basal RNA polymerase II transcription machinery. Mediator is recruited to promoters by direct interactions with regulatory proteins and serves as a scaffold for the assembly of a functional preinitiation complex with RNA polymerase II and the general transcription factors (311 aa)

CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2; Receptor for the MCP-1, MCP-3 and MCP-4 chemokines. Transduces a signal by increasing the intracellular calcium ions level. Alternative coreceptor with CD4 for HIV-1 infection (374 aa)
EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1; ATP-dependent RNA helicase which is a subunit of the eIF4F complex involved in cap recognition and is required for mRNA binding to ribosome. In the current model of translation initiation, eIF4A unwinds RNA secondary structures in the 5'-UTR of mRNAs which is necessary to allow efficient binding of the small ribosomal subunit, and subsequent scanning for the initiator codon (406 aa)
FCGR3B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD16b); Receptor for the Fc region of immunoglobulins gamma. Low affinity receptor. Binds complexed or aggregated IgG and also monomeric IgG. Contrary to III-A, is not capable to mediate antibody-dependent cytotoxicity and phagocytosis. May serve as a trap for immune complexes in the peripheral circulation which does not activate neutrophils (233 aa)
FLJ25701	coiled-coil domain containing 127 (260 aa)
BTN2A3	butyrophilin, subfamily 2, member A3 (586 aa)
FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated); High specificity for fatty acids. Highest affinity for C18 chain length. Decreasing the chain length or introducing double bonds reduces the affinity. May be involved in keratinocyte differentiation (135 aa)
PDIA3	protein disulfide isomerase family A, member 3 (505 aa)
MFSD3	major facilitator superfamily domain containing 3 (412 aa)
OR8J3	olfactory receptor, family 8, subfamily J, member 3; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
KCTD5	potassium channel tetramerisation domain containing 5; Its interaction with CUL3 suggests that it may act as a substrate adapter in some E3 ligase complex. Does not affect the function of Kv channel Kv2.1/KCNB1, Kv1.2/KCNA2, Kv4.2/KCND2 and Kv3.4/KCNC4 (234 aa)
OR52K1	olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 1; Odorant receptor (Potential) (314 aa)
OR4K15	olfactory receptor, family 4, subfamily K, member 15; Odorant receptor (Potential) (348 aa)
OR8U1	olfactory receptor, family 8, subfamily U, member 9; Odorant receptor (Potential) (309 aa)
OR2AT4	olfactory receptor, family 2, subfamily AT, member 4; Odorant receptor (Potential) (320 aa)
OR1S2	olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 2; Odorant receptor (Potential) (325 aa)
FAM18B1	family with sequence similarity 18, member B (205 aa)
OR2A20P	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 20 pseudogene (194 aa)
OTUD7A	OTU domain containing 7A; Has deubiquitinating activity that is directed towards 'Lys-48' or 'Lys-63'-linked polyubiquitin chains. Hydrolyzes both linear and branched forms of polyubiquitin (By similarity) (926 aa)
GRM5	glutamate receptor, metabotropic 5; Receptor for glutamate. The activity of this receptor is mediated by a G-protein that activates a phosphatidylinositol-calcium second messenger system and generates a calcium-activated chloride current (1212 aa)
BOLA2B	bolA homolog 2B (E. coli) (152 aa)
MST1	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like); Probably has no proteolytic activity, since crucial characteristic of serine proteases catalytic sites are not conserved (725 aa)
MRPL45	mitochondrial ribosomal protein L45 (306 aa)
OR9G1	olfactory receptor, family 9, subfamily G, member 9; Odorant receptor (Potential) (305 aa)
CA5A	carbonic anhydrase VA, mitochondrial; Reversible hydration of carbon dioxide (305 aa)
ALG10B	asparagine-linked glycosylation 10, alpha-1,2-glucosyltransferase homolog B (yeast); Putative alpha-1,2-glucosyltransferase, which adds the third glucose residue to the lipid-linked oligosaccharide precursor for N-linked glycosylation. Transfers glucose from dolichyl phosphate glucose (Do1-P-Glc) onto the lipid-linked oligosaccharide Glc(2)Man(9)GlcNAc(2)-PP-Dol. When coupled to KCNH2 may reduce KCNH2 sensitivity to classic proarrhythmic drug blockade, possibly by mediating glycosylation of KCNH2 (473 aa)
CHMP2A	chromatin modifying protein 2A; Probable core component of the endosomal sorting required for transport complex III (ESCRT-III) which is involved in multivesicular bodies (MVBs) formation and sorting of endosomal cargo proteins into MVBs. MVBs contain intraluminal vesicles (ILVs) that are generated by invagination and scission from the limiting membrane of the endosome and mostly are delivered to lysosomes enabling degradation of membrane proteins, such as stimulated growth factor receptors, lysosomal enzymes and lipids. The MVB pathway appears to require the sequential function of ESC [...] (222 aa)
OR7D4	olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 4; Odorant receptor. Selectively activated by androstene and the related odorous steroid androstadiene (312 aa)
CYP4A11	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11; Catalyzes the omega- and (omega-1)-hydroxylation of various fatty acids such as laurate and palmitate. Shows no activity towards arachidonic acid and prostaglandin A1. Lacks functional activity in the kidney and does not contribute to renal 20-hydroxyecosatetraenoic acid (20-HETE) biosynthesis (519 aa)
OR1S1	olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 1; Odorant receptor (Potential) (325 aa)
BTN2A1	butyrophilin, subfamily 2, member A1 (527 aa)
OR5M3	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 3; Odorant receptor (Potential) (307 aa)
ADRBK1	adrenergic, beta, receptor kinase 1; Specifically phosphorylates the agonist-occupied form of the beta-adrenergic and closely related receptors, probably inducing a desensitization of them (689 aa)
OR1E1	olfactory receptor, family 1, subfamily E, member 1; Odorant receptor (Potential) (314 aa)
OR3A1	olfactory receptor, family 3, subfamily A, member 1; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
DDX10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10; Putative ATP-dependent RNA helicase (875 aa)
CD163L1	CD163 molecule-like 1 (1453 aa)
LILRB1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1; Receptor for class I MHC antigens. Recognizes a broad spectrum of HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-G alleles. Receptor for H301/UL18, a human cytomegalovirus class I MHC homolog. Ligand binding results in inhibitory signals and down-regulation of the immune response. Engagement of LILRB1 present on natural killer cells or T-cells by class I MHC molecules protects the target cells from lysis. Interaction with HLA-B or HLA-E leads to inhibition of the signal triggered by FCER1A and inhibits serotonin release [...] (652 aa)
OR9A2	olfactory receptor, family 9, subfamily A, member 2; Odorant receptor (Potential) (310 aa)
OR7A5	olfactory receptor, family 7, subfamily A, member 5; Odorant receptor (Potential) (319 aa)
OR13D1	olfactory receptor, family 13, subfamily D, member 1; Odorant receptor (Potential) (346 aa)
OR13C2	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 2; Odorant receptor (Potential) (318 aa)
MRFAP1L1	Morf4 family associated protein 1-like 1 (127 aa)
FAM156A	family with sequence similarity 156, member B (213 aa)

FAM46A	family with sequence similarity 46, member A (442 aa)
FAM27L	Protein FAM27L (92 aa)
OR52K2	olfactory receptor, family 52, subfamily K, member 2; Odorant receptor (Potential) (314 aa)
OR4N2	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 3 pseudogene; Odorant receptor (Potential) (307 aa)
OR4M1	olfactory receptor, family 4, subfamily M, member 1; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
GPR89A	G protein-coupled receptor 89A; May be involved in the NF-kappa-B and MAPK signaling pathways (455 aa)
OR4D11	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 11; Odorant receptor (Potential) (311 aa)
EPN2	epsin 2; Plays a role in the formation of clathrin-coated invaginations and endocytosis (641 aa)
DEFB104A	defensin, beta 104A (72 aa)
DEFB103A	defensin, beta 103B (67 aa)
OR56A1	olfactory receptor, family 56, subfamily A, member 1; Odorant receptor (Potential) (318 aa)
HIST1H2AC	histone cluster 1, H2ac; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (130 aa)
HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bc; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (By similarity) (126 aa)
DEFB104B	defensin, beta 104B; Has antimicrobial activity. Synergistic effects with lysozyme and DEFB103 (72 aa)
HBA1	hemoglobin, alpha 1; Involved in oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues (By similarity) (142 aa)
OR5AK2	Olfactory receptor 5AK2; Odorant receptor (Potential) (309 aa)
OR5M8	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 8; Odorant receptor (Potential) (311 aa)
OR8H1	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 1; Odorant receptor (Potential) (311 aa)
OR5T1	olfactory receptor, family 5, subfamily T, member 1; Odorant receptor (Potential) (326 aa)
OR8H3	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 3; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
OR8H2	olfactory receptor, family 8, subfamily H, member 2; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
OR2T35	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 35; Odorant receptor (Potential) (323 aa)
OR2M7	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 7; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
DEFB103B	defensin, beta 103A; Exhibits antimicrobial activity against Gram-positive bacteria <i>S. aureus</i> and <i>S. pyogenes</i> , Gram-negative bacteria <i>P. aeruginosa</i> and <i>E. coli</i> and the yeast <i>C. albicans</i> . Kills multidrug-resistant <i>S. aureus</i> and vancomycin-resistant <i>E. faecium</i> . No significant hemolytic activity was observed (67 aa)
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6; Cytochromes P450 are a group of heme-thiolate monooxygenases. In liver microsomes, this enzyme is involved in an NADPH-dependent electron transport pathway. It oxidizes a variety of structurally unrelated compounds, including steroids, fatty acids, and xenobiotics (491 aa)
OR4A15	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 15; Odorant receptor (Potential) (344 aa)
OR10G4	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 8; Odorant receptor (Potential) (311 aa)
LASP1	LIM and SH3 protein 1; Plays an important role in the regulation of dynamic actin-based, cytoskeletal activities. Agonist-dependent changes in LASP1 phosphorylation may also serve to regulate actin-associated ion transport activities, not only in the parietal cell but also in certain other F-actin-rich secretory epithelial cell types (By similarity) (261 aa)
KIR3DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA-A alleles. Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (455 aa)
DHRS4	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4; Reduces all-trans-retinal and 9-cis-retinal. Can also catalyze the oxidation of all-trans-retinol with NADP as co-factor, but with much lower efficiency. Reduces alkyl phenyl ketones and alpha-dicarbonyl compounds with aromatic rings, such as pyrimidine-4-aldehyde, 3-benzoylpyridine, 4-benzoylpyridine, menadione and 4-hexanoylpyridine. Has no activity towards aliphatic aldehydes and ketones (By similarity) (278 aa)
MYNN	myonerin (610 aa)
OR1D4	olfactory receptor, family 1, subfamily D, member 4; Odorant receptor (Potential) (330 aa)
OR1D2	olfactory receptor, family 1, subfamily D, member 2; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
CCDC144NL	coiled-coil domain containing 144 family, N-terminal like (221 aa)
DEFA3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific; Defensin 1 and defensin 2 have antibacterial, fungicide and antiviral activities. Has antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Defensins are thought to kill microbes by permeabilizing their plasma membrane (94 aa)
KRTAP4-8	keratin associated protein 4-8; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high-sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (185 aa)
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (128 aa)
OR52E8	olfactory receptor, family 52, subfamily E, member 8; Odorant receptor (Potential) (317 aa)
GIYD1	GIY-YIG domain containing 1; Catalytic subunit of the SLX1-SLX4 structure-specific endonuclease that resolves DNA secondary structures generated during DNA repair and recombination. Has endonuclease activity towards branched DNA substrates, introducing single-strand cuts in duplex DNA close to junctions with ss-DNA. Has a preference for 5'-flap structures, and promotes symmetrical cleavage of static and migrating Holliday junctions (HJs). Resolves HJs by generating two pairs of ligatable, nicked duplex products (275 aa)
OR4C46	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 46; Odorant receptor (Potential) (309 aa)
OR4M2	olfactory receptor, family 4, subfamily M, member 2; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
CD300C	CD300c molecule (224 aa)
OR10G7	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 7; Odorant receptor (Potential) (311 aa)

LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C; Binds galactosides. Has high affinity for the Forssman pentasaccharide. May play a role in thymocyte-epithelial interactions relevant to the biology of the thymus. Inhibits cell proliferation. It is a ligand for HAVCR2/TIM3. Induces T-helper type 1 lymphocyte (Th1) death. Isoform Short acts as an eosinophil chemoattractant (356 aa)
OR4Q3	olfactory receptor, family 4, subfamily Q, member 3; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
HIST1H2AK	histone cluster 1, H2ak (130 aa)
OR52L1	olfactory receptor, family 52, subfamily L, member 1; Odorant receptor (Potential) (329 aa)
AMY1B	amylase, alpha 1B (salivary) (511 aa)
OR2T34	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 34; Odorant receptor (Potential) (318 aa)
BOLA2	bolA homolog 2 (E. coli) (152 aa)
CD8B	CD8b molecule; Identifies cytotoxic/suppressor T-cells that interact with MHC class I bearing targets. CD8 is thought to play a role in the process of T-cell mediated killing (By similarity) (243 aa)
MBD3L5	Putative methyl-CpG-binding domain protein 3-like 5 (MBD3-like 5) (208 aa)
OR2T29	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 29; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
OR10J3	olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 3; Odorant receptor (Potential) (329 aa)
CTAG1A	cancer/testis antigen 1A (180 aa)
OR5P3	olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 3; Odorant receptor (Potential). May be involved in taste perception (311 aa)
OR4N5	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 5; Odorant receptor (Potential) (308 aa)
DZIP1L	DAZ interacting protein 1-like (767 aa)
HIST2H2AC	histone cluster 2, H2ac; Variant histone H2A which replaces conventional H2A in a subset of nucleosomes. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling. Required for checkpoint-mediated arrest of cell cycle progression in response [...] (129 aa)
OR4N4	olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 4; Odorant receptor (Potential) (316 aa)
CTAG1B	cancer/testis antigen 1B (180 aa)
EIF3C	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C; Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2-GTP-methionyl-tRNAi and eIF-5 to form the 43S preinitiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of posttermination ribosome [...] (913 aa)
NSUN5P2	NOP2/Sun domain family, member 5C; May have S-adenosyl-L-methionine-dependent methyl-transferase activity (Potential) (315 aa)
HIST2H2AB	histone cluster 2, H2ab; Variant histone H2A which replaces conventional H2A in a subset of nucleosomes. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling. Required for checkpoint-mediated arrest of cell cycle progression in response [...] (130 aa)
ARPM1	Actin-related protein M1 (372 aa)
DEFB108B	defensin, beta 108B; Has antibacterial activity (By similarity) (73 aa)
HIST2H3D	histone cluster 2, H3d; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (136 aa)
CYP2F1	cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1; May be involved in the metabolism of various pneumotoxicants including naphthalene. Is able to dealkylate ethoxycoumarin, propoxycoumarin, and pentoxifyresorufin but possesses no activity toward ethoxycoumarin and only trace dearylation activity toward benzyloxycoumarin. Bioactivates 3-methylindole (3MI) by dehydrogenation to the putative electrophile 3-methyleneindolenine (491 aa)
CYP4Z1	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1 (505 aa)
DEFB105A	defensin, beta 105A (78 aa)
DEFB106B	defensin, beta 106B; Has antibacterial activity (65 aa)
DEFB105B	defensin, beta 105B; Has antibacterial activity (Potential) (78 aa)
DEFB106A	defensin, beta 106A (65 aa)
KRTAP21-1	keratin associated protein 21-1; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high-sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (79 aa)
KRTAP19-4	keratin associated protein 19-4; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high-sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (84 aa)
OR1J2	olfactory receptor, family 1, subfamily J, member 2; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
KRTAP19-2	keratin associated protein 19-2; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high-sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (52 aa)
KIR2DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA-C alleles (HLA-Cw1, HLA-Cw3 and HLA-Cw7). Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (348 aa)
ARL17A	ADP-ribosylation factor-like 17B (177 aa)

CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4; Cytochromes P450 are a group of heme-thiolate monooxygenases. In liver microsomes, this enzyme is involved in an NADPH-dependent electron transport pathway. It performs a variety of oxidation reactions (e.g. caffeine 8-oxidation, omeprazole sulfoxidation, midazolam 1'-hydroxylation and midazolam 4'-hydroxylation) of structurally unrelated compounds, including steroids, fatty acids, and xenobiotics. The enzyme also hydroxylates etoposide (503 aa)
HTR7	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7 (adenylate cyclase-coupled); This is one of the several different receptors for 5- hydroxytryptamine (serotonin), a biogenic hormone that functions as a neurotransmitter, a hormone, and a mitogen. The activity of this receptor is mediated by G proteins that stimulate adenylate cyclase (479 aa)
KIR2DL4 KIR2DS4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4 (342 aa) killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA-C alleles. Does not inhibit the activity of NK cells (239 aa)
LRRC37B	leucine rich repeat containing 37B (947 aa)
HIST1H2AD	histone cluster 1, H2ad; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (130 aa)
DAP3 ENSA	death associated protein 3; Involved in mediating interferon-gamma-induced cell death (398 aa) endosulfine alpha; Endogenous ligand for sulfonylurea receptor. By inhibiting sulfonylurea from binding to the receptor, it reduces K(ATP) channel currents and thereby stimulates insulin secretion (137 aa)
OR2T7 KIR2DL3	ofactory receptor, family 2, subfamily T, member 27; Odorant receptor (Potential) (317 aa) killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA-C alleles (HLA-Cw1, HLA-Cw3 and HLA-Cw7). Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (341 aa)
ARHGAP11B	Rho GTPase activating protein 11B (267 aa)
OR2T2	ofactory receptor, family 2, subfamily T, member 2; Odorant receptor (Potential) (324 aa)
NBR1	neighbor of BRCA1 gene 1 (966 aa)
ENSG00000243435	coiled-coil domain containing 144C (226 aa)
PDPK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1; Phosphorylates and activates not only PKB/AKT, but also PKA, PKC-zeta, RPS6KA1 and RPS6KB1. May play a general role in signaling processes and in development (By similarity). Isoform 3 is catalytically inactive (556 aa)
OR56A5	Putative uncharacterized protein ENSP00000344387 Fragment ; Odorant receptor (Potential) (246 aa)
OR8G1 C2orf88	ofactory receptor, family 8, subfamily G, member 1; Odorant receptor (Potential) (311 aa) UPF0733 protein C2orf88 (95 aa)
CXCL17	chemokine (C-X-C motif) ligand 17; Plays a role in angiogenesis and possibly in the development of tumors. May be a housekeeping chemokine regulating recruitment of nonactivated blood monocytes and immature dendritic cells into tissues. May play a role in the innate defense against infections (119 aa)
KIF25 ADAMTSL2	kinesin family member 25 (384 aa) ADAMTS-like 2 (951 aa)
OR8B3 C14orf167	ofactory receptor, family 8, subfamily B, member 3; Odorant receptor (Potential) (313 aa) Uncharacterized protein C14orf167 (65 aa)
AK2	adenylate kinase 2; Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group between ATP and AMP. This small ubiquitous enzyme involved in energy metabolism and nucleotide synthesis that is essential for maintenance and cell growth. Plays a key role in hematopoiesis (239 aa)
MINK1	misshapen-like kinase 1 (zebrafish); Serine/threonine kinase that may play a role in the response to environmental stress. Appears to act upstream of the JUN N-terminal pathway. May play a role in the development of the brain (By similarity) (1332 aa)
MYH7 KRTAP13-1	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta; Muscle contraction (1935 aa) keratin associated protein 13-1; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (By similarity) (172 aa)
OR2T6 CGB7	ofactory receptor, family 2, subfamily T, member 6; Odorant receptor (Potential) (308 aa) chorionic gonadotropin, beta polypeptide 7 (165 aa)
MYH6 HSD17B7P2	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha; Muscle contraction (1939 aa) Putative uncharacterized protein HSD17B7P2 ; Responsible for the reduction of the keto group on the C-3 of sterols (341 aa)
HYLS1 C20orf191	hydrolethalus syndrome 1 (299 aa) Putative nuclear receptor corepressor 1-like protein C20orf191 (102 aa)
CBWD1 BTN2A2	COBW domain containing 1 (395 aa) butyrophilin, subfamily 2, member A2 (523 aa)
BAGE2 FAM163B	B melanoma antigen family, member 3; Unknown. Antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T-lymphocytes (109 aa) family with sequence similarity 163, member B (166 aa)
PCDHA4 NBR2	protocadherin alpha 4; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain (798 aa) neighbor of BRCA1 gene 2 (non-protein coding) (112 aa)
CSAG3	CSAG family, member 3; Drug-resistance related protein, its expression is associated with the chemotherapy resistant and neoplastic phenotype. May also be linked to the malignant phenotype (127 aa)
HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (126 aa)
C9orf174	KIAA1529 (1646 aa)

OR2L8	olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 8; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
HIST1H2AL	histone cluster 1, H2a1 (130 aa)
FAM115C	family with sequence similarity 115, member C (845 aa)
CCL2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2; Receptor for CCL2, CCL5, CCL7 and CCL8 (By similarity) (356 aa)
CEACAM3	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3; Major granulocyte receptor mediating recognition and efficient opsonin-independent phagocytosis of CEACAM-binding microorganisms, including <i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i> and <i>Haemophilus</i> species, thus playing an important role in the clearance of pathogens by the innate immune system. Responsible for RAC1 stimulation in the course of pathogen phagocytosis (252 aa)
C6orf124	Uncharacterized protein C6orf124 (Protein HGC6.4) (254 aa)
HIST1H4K	histone cluster 1, H4k (103 aa)
ENPP3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3; Cleaves a variety of phosphodiester and phosphosulfate bonds including deoxynucleotides, nucleotide sugars, and NAD (By similarity) (875 aa)
BRCA1	breast cancer 1, early onset; The BRCA1-BARD1 heterodimer coordinates a diverse range of cellular pathways such as DNA damage repair, ubiquitination and transcriptional regulation to maintain genomic stability. Acts by mediating ubiquitin E3 ligase activity that is required for its tumor suppressor function. Plays a central role in DNA repair by facilitating cellular response to DNA repair. Required for appropriate cell cycle arrests after ionizing irradiation in both the S-phase and the G2 phase of the cell cycle. Involved in transcriptional regulation of P21 in response to DNA damage [...] (1863 aa)
OR2L13	olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 13; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
GYPE	glycophorin E; This protein is a minor sialoglycoprotein in human erythrocyte membranes (78 aa)
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32); Receptor for the Fc region of complexed or aggregated immunoglobulins gamma. Low affinity receptor. Involved in a variety of effector and regulatory functions such as phagocytosis of immune complexes and modulation of antibody production by B-cells. Binding to this receptor results in down-modulation of previous state of cell activation triggered via antigen receptors on B-cells (BCR), T-cells (TCR) or via another Fc receptor. Isoform IIB1 fails to mediate endocytosis or phagocytosis. Isoform IIB2 does not trigger phagocytosis (310 aa)
HIST1H2AI	histone cluster 1, H2ai (130 aa)
MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10; Responds to activation by environmental stress and pro-inflammatory cytokines by phosphorylating a number of transcription factors, primarily components of AP-1 such as JUN, JDP2 and ATF2 and thus regulates AP-1 transcriptional activity. In T-cells, JNK1 and JNK2 are required for polarized differentiation of T-helper cells into Th1 cells (By similarity). Phosphorylates heat shock factor protein 4 (HSF4) (464 aa)
FAM86C	family with sequence similarity 86, member C (165 aa)
HIST1H2BM	histone cluster 1, H2bm; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (126 aa)
OR2T3	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 3; Odorant receptor (Potential) (318 aa)
OR2M2	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 2; Odorant receptor (Potential) (347 aa)
OR11H12	olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 12; Odorant receptor (Potential) (326 aa)
OR2L3	olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 3; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
HIST1H2BF	histone cluster 1, H2bf; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (By similarity) (126 aa)
CBWD3	COBW domain containing 3 (395 aa)
HIST1H4E	histone cluster 1, H4e (103 aa)
CCDC144A	coiled-coil domain containing 144A (1427 aa)
CES1	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1); Involved in the detoxification of xenobiotics and in the activation of ester and amide prodrugs. Hydrolyzes aromatic and aliphatic esters, but has no catalytic activity toward amides or a fatty acyl CoA ester (568 aa)
LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14 (168 aa)
MAGT1	magnesium transporter 1; May be involved in N-glycosylation through its association with N-oligosaccharyl transferase. May be involved in Mg(2+) transport in epithelial cells (367 aa)
OSTC	oligosaccharyltransferase complex subunit (149 aa)
NOTCH2NL	Notch homolog 2 (Drosophila) N-terminal like; May function in the Notch signaling pathway and regulate neutrophil differentiation (236 aa)
ARHGAP11A	Rho GTPase activating protein 11A (1023 aa)
MPHOSPH8	M-phase phosphoprotein 8 (860 aa)
PCDH11Y	protocadherin 11 Y-linked; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein (1048 aa)
OR2T5	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 5; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
OR2T4	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 4; Odorant receptor (Potential) (348 aa)
OR2M5	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 5; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
OR2L2	olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 2; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
OPN3	opsin 3; May play a role in encephalic photoreception (402 aa)
HIST3H2A	histone cluster 3, H2a; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (130 aa)
FAM72A	family with sequence similarity 72, member A (149 aa)
KLHL12	kelch-like 12 (Drosophila); Serves as a substrate-specific adapter for the CUL3-based ubiquitin-protein E3 ligase complex. Negatively regulates the Wnt signaling pathway via the targeted ubiquitination and subsequent proteolysis of DVL3 (568 aa)
F13B	coagulation factor XIII, B polypeptide; The B chain of factor XIII is not catalytically active, but is thought to stabilize the A subunits and regulate the rate of transglutaminase formation by thrombin (661 aa)

FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a); Receptor for the Fc region of immunoglobulins gamma. Low affinity receptor. Binds complexed or aggregated IgG and also monomeric IgG. Contrary to III-A, is not capable to mediate antibody-dependent cytotoxicity and phagocytosis. May serve as a trap for immune complexes in the peripheral circulation which does not activate neutrophils (290 aa)
LCE2B	late cornified envelope 2B; Precursors of the cornified envelope of the stratum corneum (110 aa)
LCE2C	late cornified envelope 2C; Precursors of the cornified envelope of the stratum (110 aa)
LCE2D	late cornified envelope 2D; Precursors of the cornified envelope of the stratum corneum (110 aa)
HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (By similarity) (126 aa)
HIST2H4B	histone cluster 2, H4b (103 aa)
HIST2H3C	histone cluster 2, H3c (136 aa)
HIST2H2AA4	histone cluster 2, H2aa4; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (130 aa)
HIST2H2AA3	histone cluster 2, H2aa3; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (130 aa)
HIST1H3H	histone cluster 1, H3h; Variant histone H3 which replaces conventional H3 in a wide range of nucleosomes in active genes. Constitutes the predominant form of histone H3 in non-dividing cells and is incorporated into chromatin independently of DNA synthesis. Deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes, suggesting that it represents an epigenetic imprint of transcriptionally active chromatin. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a centr [...] (136 aa)
HIST2H4A	histone cluster 2, H4a (103 aa)
HIST2H2BF	histone cluster 2, H2bf; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (By similarity) (126 aa)
FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64); May bind to the Fc region of immunoglobulins gamma with a low affinity compared to FCGR1A. May function in the humoral immune response (374 aa)
NBPF15	neuroblastoma breakpoint family, member 15 (670 aa)
KIAA0776	KIAA0776 (794 aa)
FAM72B	family with sequence similarity 72, member B (149 aa)
HSD3B2	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2; 3-beta-HSD is a bifunctional enzyme, that catalyzes the oxidative conversion of Delta(5)-ene-3-beta-hydroxy steroid, and the oxidative conversion of ketosteroids. The 3-beta-HSD enzymatic system plays a crucial role in the biosynthesis of all classes of hormonal steroids. Efficiently catalyzes the transformation of pregnenolone to progesterone, 17-alpha-hydroxypregnenolone to 17-alpha-hydroxypregesterone, DHEA to 4-androstenedione, dihydrotestosterone to 5-alpha-androstane-3 beta,17 beta-diol, dehydroepiandr [...] (372 aa)
AMY1C	amylase, alpha 1C (salivary) (511 aa)
AMY1A	amylase, alpha 1A (salivary) (511 aa)
KIAA1586	KIAA1586 (787 aa)
NDOR1	NADPH dependent diflavin oxidoreductase 1; Oxidoreductase that catalyzes the NADP-dependent reduction of cytochrome c and one-electron acceptors, such as doxorubicin, potassium ferricyanide and menadione (in vitro) (606 aa)
CXorf61	chromosome X open reading frame 61 (113 aa)
NXF2B	nuclear RNA export factor 2B; Involved in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm (626 aa)
NXF2	nuclear RNA export factor 2; Involved in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm (626 aa)
DNAJC9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9 (260 aa)
PABPC1L2A	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like 2A (200 aa)
PABPC1L2B	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like 2B (200 aa)
OR1L6	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 6; Odorant receptor (Potential) (347 aa)
ERMPD2	FERM and PDZ domain containing 2 (1309 aa)
FERMPD2L2	FERM and PDZ domain containing 2 like 2 (320 aa)
OR13C5	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 5; Odorant receptor (Potential) (318 aa)
OR13C3	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 3; Odorant receptor (Potential) (347 aa)
HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5 (266 aa)
OR8B2	olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 2; Odorant receptor (Potential) (313 aa)
OR10G9	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 9; Odorant receptor (Potential) (311 aa)
HIATL2	hippocampus abundant transcript-like 2 (134 aa)
HIATL1	hippocampus abundant transcript-like 1 (506 aa)
ADPRHL1	ADP-ribosylhydrolase like 1 (354 aa)
C20orf186	Long palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 4 Precursor (Ligand-binding protein RY2G5); May have the capacity to recognize and bind specific classes of odorants. May act as a carrier molecule, transporting odorants across the mucus layer to access receptor sites. May serve as a primary defense mechanism by recognizing and removing potentially harmful odorants or pathogenic microorganisms from the mucosa or clearing excess odorant from mucus to enable new odorant stimuli to be received (By similarity) (614 aa)

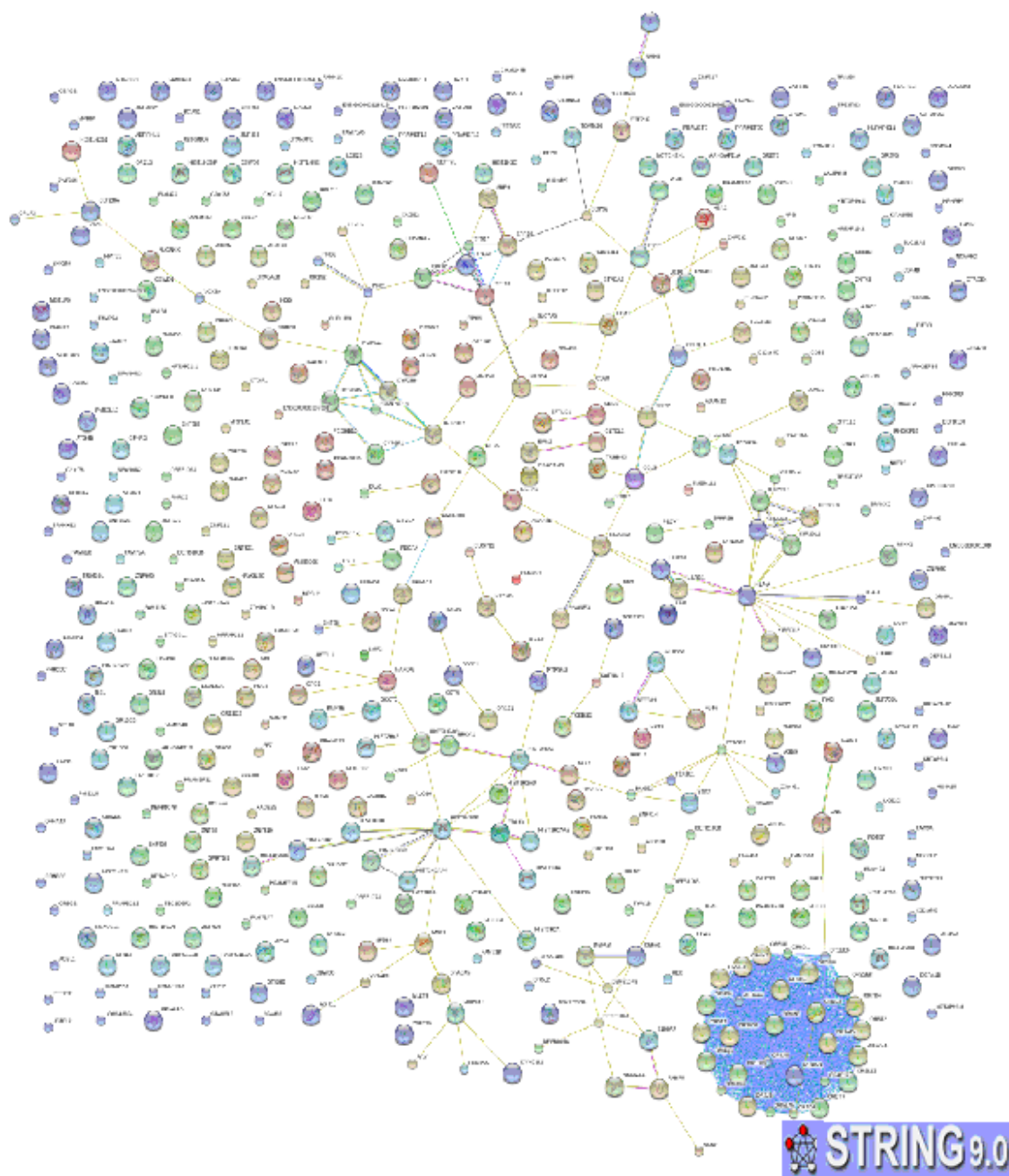
HNRNPCL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1; May play a role in nucleosome assembly by neutralizing basic proteins such as A and B core hnRNPs (By similarity) (293 aa)
CBWD5	COBW domain containing 5 (347 aa)
HIST1H2BL	histone cluster 1, H2b1; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (126 aa)
CBWD6	COBW domain containing 6 (395 aa)
HIST1H2AH	histone cluster 1, H2a1; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (128 aa)
FAM27A	family with sequence similarity 27, member A (67 aa)
FAM27C	family with sequence similarity 27, member C (67 aa)
ENSG00000204838	Putative UPF0633 protein MGC21881 (94 aa)
KRTAP9-3	keratin associated protein 9-3; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (159 aa)
HIST1H3D	histone cluster 1, H3d (136 aa)
PCDHA5	protocadherin alpha 5; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain (816 aa)
PCDHA3	protocadherin alpha 3; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain (824 aa)
PCDHA2	protocadherin alpha 2; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain (824 aa)
PCDHA1	protocadherin alpha 1; Potential calcium-dependent cell-adhesion protein. May be involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain (807 aa)
CCL3L1	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1; Chemotactic for lymphocytes and monocytes. Is a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5. Is an inhibitor of HIV-1-infection. The processed form LD78-beta(3-70) shows a 20-fold to 30-fold higher chemotactic activity and is a very potent inhibitor of HIV-1-infection. LD78-beta(3-70) is also a ligand for CCR1, CCR3 and CCR5 (93 aa)
OR5L2	olfactory receptor, family 5, subfamily L, member 2; Odorant receptor (Potential) (311 aa)
OR4A5	olfactory receptor, family 4, subfamily A, member 5; Odorant receptor (Potential) (315 aa)
OR4C13	olfactory receptor, family 4, subfamily C, member 13; Odorant receptor (Potential) (309 aa)
FRG2	FSHD region gene 2 (278 aa)
KBTBD7	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7 (684 aa)
OR52E6	olfactory receptor, family 52, subfamily E, member 6; Odorant receptor (Potential) (317 aa)
ASB9	ankyrin repeat and SOCS box-containing 9; May be a substrate-recognition component of a SCF-like ECS (Elongin-Cullin-SOCS-box protein) E3 ubiquitin-protein ligase complex which mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target proteins (By similarity) (294 aa)
CPXM1	carboxypeptidase X (M14 family), member 1; May be involved in cell-cell interactions. No carboxypeptidase activity was found yet (By similarity) (734 aa)
GTF2H2C	general transcription factor IIF, polypeptide 2C; Component of the core-TFIIH basal transcription factor involved in nucleotide excision repair (NER) of DNA and, when complexed to CAK, in RNA transcription by RNA polymerase II. The N-terminus interacts with and regulates XPD whereas an intact C-terminus is required for a successful escape of RNAP II from the promoter (395 aa)
EIF3CL	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C-like; Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex, which is required for several steps in the initiation of protein synthesis. The eIF-3 complex associates with the 40S ribosome and facilitates the recruitment of eIF-1, eIF-1A, eIF-2-GTP-methionyl-tRNAi and eIF-5 to form the 43S preinitiation complex (43S PIC). The eIF-3 complex stimulates mRNA recruitment to the 43S PIC and scanning of the mRNA for AUG recognition. The eIF-3 complex is also required for disassembly and recycling of posttermination ribosome (914 aa)
HTN3	histatin 3; Histatins are salivary proteins that are considered to be major precursors of the protective proteinaceous structure on tooth surfaces (enamel pellicle). In addition, histatins exhibit antibacterial and antifungal activities. Histatin-3 1/24 (histatin-5) is especially effective against <i>C.albicans</i> and <i>C.neofomans</i> , and inhibits Lys-gingipain and Arg-gingipain (rgpB) from <i>P.gingivalis</i> . In addition, histatin-3 1/24 is a potent inhibitor of metalloproteinases MMP2 and MMP9 (51 aa)
MBD3L2	methyl-CpG binding domain protein 3-like 2 (208 aa)
CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage); Low affinity receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Transduces a signal that results in the proliferation, differentiation, and functional activation of hematopoietic cells (400 aa)
CRLE2	cytokine receptor-like factor 2; Receptor for thymic stromal lymphopoietin (TSLP). Forms a functional complex with TSLP and IL7R which is capable of stimulating cell proliferation through activation of STAT3 and STAT5. Also activates JAK2 (By similarity). Implicated in the development of the hematopoietic system (256 aa)
C22orf42	Uncharacterized protein C22orf42 (251 aa)
DAZ3	deleted in azoospermia 3; RNA-binding protein that plays an essential role in spermatogenesis. May act by binding to the 3'-UTR of mRNAs and regulating their translation (438 aa)
DEFA1	defensin, alpha 1; Defensin 1 and defensin 2 have antibacterial, fungicide and antiviral activities. Has antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Defensins are thought to kill microbes by permeabilizing their plasma membrane (94 aa)
DEFA1B	defensin, alpha 1B; Defensin 1 and defensin 2 have antibacterial, fungicide and antiviral activities. Has antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Defensins are thought to kill microbes by permeabilizing their plasma membrane (94 aa)
OR5H6	olfactory receptor, family 5, subfamily H, member 6; Odorant receptor (Potential) (325 aa)
OTOA	otoancorin; May act as an adhesion molecule (1139 aa)

NLRP5	NLR family, pyrin domain containing 5; As a member of the subcortical maternal complex (SCMC), plays an essential role for zygotes to progress beyond the first embryonic cell divisions (By similarity) (1200 aa)
KRTAP19-1	keratin associated protein 19-1; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (90 aa)
KRTAP4-9	keratin associated protein 4-9; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (210 aa)
KRTAP2-1	keratin associated protein 2-1; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (128 aa)
KIR3DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA Bw4 allele. Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (444 aa)
LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2; Receptor for class I MHC antigens. Recognizes a broad spectrum of HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-G alleles. Involved in the down-regulation of the immune response and the development of tolerance. Competes with CD8A for binding to class I MHC antigens. Inhibits FCGR1A-mediated phosphorylation of cellular proteins and mobilization of intracellular calcium ions (598 aa)
HIST3H2BB	histone cluster 3, H2bb; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (By similarity) (126 aa)
ASH1L	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila); Histone methyltransferase. Probably methylates 'Lys-4' of histone H3, a specific tag for epigenetic transcriptional activation (By similarity) (2964 aa)
KRTAP2-4	keratin associated protein 2-4; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (128 aa)
CCL4L2	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2 (92 aa)
GPT	glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase); Participates in cellular nitrogen metabolism and also in liver gluconeogenesis starting with precursors transported from skeletal muscles (496 aa)
LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9; Binds galactosides. Has high affinity for the Forssman pentasaccharide. May play a role in thymocyte-epithelial interactions relevant to the biology of the thymus. Inhibits cell proliferation. It is a ligand for HAVCR2/TIM3. Induces T-helper type 1 lymphocyte (Th1) death. Isoform Short acts as an eosinophil chemoattractant (355 aa)
FBXW10	F-box and WD repeat domain containing 10 (1051 aa)
MRIP	myosin phosphatase Rho interacting protein; Targets myosin phosphatase to the actin cytoskeleton. Required for the regulation of the actin cytoskeleton by RhoA and ROCK1. Depletion leads to an increased number of stress fibers in smooth muscle cells through stabilization of actin fibers by phosphorylated myosin. Overexpression of MRIP as well as its F- actin-binding region leads to disassembly of stress fibers in neuronal cells (1038 aa)
BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1 (584 aa)
HIST1H2BN	histone cluster 1, H2bn; Core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication and chromosomal stability. DNA accessibility is regulated via a complex set of post-translational modifications of histones, also called histone code, and nucleosome remodeling (By similarity) (126 aa)
DYNC1I2	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2; The intermediate chains seem to help dynein bind to dynactin 150 kDa component (638 aa)
C16orf13	UPF0585 protein C16orf13 (205 aa)
ENSG00000236761	Putative uncharacterized protein ENSP00000381209 Fragment (230 aa)
KRTAP5-11	keratin associated protein 5-11; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated protein (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (156 aa)
KRTAP5-10	keratin associated protein 5-10; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated protein (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (202 aa)
MOB2	Mps one binder kinase activator-like 2 (Mob2 homolog)(HCCA2); Stimulates the autophosphorylation and kinase activity of STK38 and STK38L (268 aa)
C9orf144	Chromosome 9 open reading frame 144 (138 aa)
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D) (132 aa)
KRTAP13-2	keratin associated protein 13-6, pseudogene; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfilamentous matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (By similarity) (175 aa)
DEFB115	defensin, beta 115; Has antibacterial activity (By similarity) (88 aa)

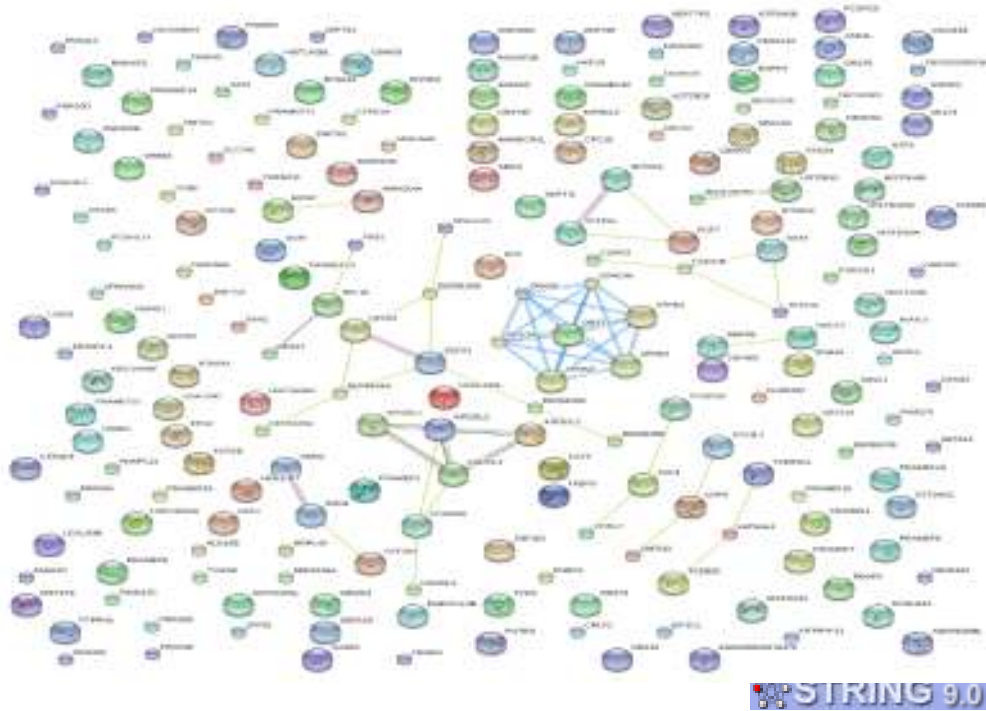
MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 4; Belongs to an adhesion system, probably together with the E-cadherin-catenin system, which plays a role in the organization of homotypic, interneuronal and heterotypic cell-cell adherens junctions (AJs). Nectin- and actin-filament-binding protein that connects nectin to the actin cytoskeleton (1834 aa)
KIR2DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, short cytoplasmic tail, 1; Receptor on natural killer (NK) cells for HLA Bw4 allele. Inhibits the activity of NK cells thus preventing cell lysis (455 aa)
FAM72D	family with sequence similarity 72, member D (149 aa)
ATG4B	ATG4 autophagy related 4 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>); Cysteine protease required for autophagy, which cleaves the C-terminal part of either MAP1LC3, GABARAP L2 or GABARAP, allowing the liberation of form I. A subpopulation of form I is subsequently converted to a smaller form (form II). Form II, with a revealed C-terminal glycine, is considered to be the phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated form, and has the capacity for the binding to autophagosomes (393 aa)
CDK11A	cyclin-dependent kinase 11A; Appears to play multiple roles in cell cycle progression, cytokinesis and apoptosis. The p110 isoforms have been suggested to be involved in pre-mRNA splicing, potentially by phosphorylating the splicing protein SFRS7. The p58 isoform may act as a negative regulator of normal cell cycle progression (780 aa)
MTMR3	myotubularin related protein 3; Phosphatase that acts on lipids with a phosphoinositol headgroup. Has phosphatase activity towards phosphatidylinositol-3-phosphate and phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate. May also dephosphorylate proteins phosphorylated on Ser, Thr, and Tyr residues (1198 aa)
DDX11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 11 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i>); DNA helicase involved in cellular proliferation. Required for maintaining the chromosome segregation and is essential for embryonic development and the prevention of aneuploidy. May function during either S, G2, or M phase of the cell cycle. Binds to both single- and double-stranded DNA (970 aa)
HIST2H3A	histone cluster 2, H3a; Variant histone H3 which replaces conventional H3 in a wide range of nucleosomes in active genes. Constitutes the predominant form of histone H3 in non-dividing cells and is incorporated into chromatin independently of DNA synthesis. Deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes, suggesting that it represents an epigenetic imprint of transcriptionally active chromatin. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machineries which require DNA as a template. Histones thereby play a centr [...] (136 aa)
MS4A15	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 15; May be involved in signal transduction as a component of a multimeric receptor complex (By similarity) (240 aa)
OR2A14	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 14; Odorant receptor (Potential) (310 aa)
OR3A2	olfactory receptor, family 3, subfamily A, member 2; Odorant receptor (Potential) (321 aa)
KRTAP19-3	keratin associated protein 19-3; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (81 aa)
RAB6C	RAB6C, member RAS oncogene family (254 aa)
FCGR1C	Fc fragment of IgG, high affinity Ic, receptor (CD64); May bind to the Fc region of immunoglobulins gamma with a low affinity compared to FCGR1A. May function in the humoral immune response (280 aa)
LGALS9B	lectin, galactoside-binding, soluble, 9B; Binds galactosides. Has high affinity for the Forsman pentasaccharide. May play a role in thymocyte-epithelial interactions relevant to the biology of the thymus. Inhibits cell proliferation. It is a ligand for HAVCR2/TIM3. Induces T-helper type 1 lymphocyte (Th1) death. Isoform Short acts as an eosinophil chemoattractant (355 aa)
OR2M3	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 3; Odorant receptor (Potential) (312 aa)
LILRB3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3; May act as receptor for class I MHC antigens (By similarity) (632 aa)
HRNP3	Hexanucleotide binding protein 3 (105 aa)
OR2A9P	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 9 pseudogene (194 aa)
DEFB130	defensin, beta 130; Has antibacterial activity (Potential) (79 aa)
MRGPRE	MAS-related GPR, member E; Orphan receptor. May regulate nociceptor function and/or development, including the sensation or modulation of pain (311 aa)
C2orf90	Putative uncharacterized protein ENSP00000393656 (215 aa)
AGBL1	ATP/GTP binding protein-like 1; May play a role in the processing of tubulin (By similarity) (1043 aa)
OR8G2	olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2; Odorant receptor (Potential) (309 aa)
ENSG00000215374	Putative protein FAM66E (47 aa)
FAM86A	family with sequence similarity 86, member A (330 aa)
OR10J1	olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 8 pseudogene; Odorant receptor (Potential) (320 aa)
KIAA0125	KIAA0125 (151 aa)
HLA-DPB2	major histocompatibility complex, class II, DP beta 2 (pseudogene) (157 aa)
KRTAP5-2	keratin associated protein 5-2; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated protein (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (177 aa)
DDX12	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 12 (CHL1-like helicase homolog, <i>S. cerevisiae</i>); DNA helicase involved in cellular proliferation. Required for maintaining the chromosome segregation and is essential for embryonic development and the prevention of aneuploidy. May function during either S, G2, or M phase of the cell cycle. Binds to both single- and double-stranded DNA (971 aa)
CSAG2	CSAG family, member 2 (127 aa)
ENSG00000165733	BMS1 pseudogene 4 (BMS1P4), non-coding RNA; May act as a molecular switch during maturation of the 40S ribosomal subunit in the nucleolus (By similarity) (189 aa)
ARL17B	ADP-ribosylation factor-like protein 17 (ADP-ribosylation factor 7 variant); GTP-binding protein that functions as an allosteric activator of the cholera toxin catalytic subunit, an ADP-ribosyltransferase. Involved in protein trafficking; may modulate vesicle budding and uncoating within the Golgi apparatus (By similarity) (177 aa)

LIMS3	LIM and senescent cell antigen-like domains 3; Effector of integrin and growth factor signaling, coupling surface receptors to downstream signaling molecules involved in the regulation of cell survival, cell proliferation and cell differentiation. Focal adhesion protein part of the complex ILK-PINCH. This complex is considered to be one of the convergence points of integrin- and growth factor-signaling pathway (117 aa)
CCL4L1	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1; Monokine with inflammatory and chemokinetic properties. Binds to CCR5. One of the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T-cells. Recombinant MIP-1-beta induces a dose-dependent inhibition of different strains of HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus (SIV). The processed form MIP-1-beta(3-69) retains the abilities to induce down-modulation of surface expression of the chemokine receptor CCR5 and to inhibit the CCR5-mediated entry of HIV-1 in T-cells. MIP-1-beta(3-69) is also a ligand for CCR1 and CCR2 isoform B (92 aa)
GTF2H2B	general transcription factor IIH, polypeptide 2B; Component of the core-TFIID basal transcription factor involved in nucleotide excision repair (NER) of DNA and, when complexed to CAK, in RNA transcription by RNA polymerase II. The N-terminus interacts with and regulates XPD whereas an intact C-terminus is required for a successful escape of RNAP II from the promoter (395 aa)
FAM86B1	family with sequence similarity 86, member B1 (296 aa)
GPX1	glutathione peroxidase 1; Protects the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown (203 aa)
GUSBP1	Putative beta-glucuronidase-like protein SMA3 (140 aa)
ENSG00000176476	coiled-coil domain containing 101 pseudogene (LOC388242), non-coding RNA; Involved in transcriptional regulation, probably through association with histone acetyltransferase (HAT) complexes like the TFIIIC-HAT or STAGA complexes. May be involved in c-Myc-mediated oncogenic transformation (By similarity). Component of the ATAC complex, a complex with histone acetyltransferase activity on histones H3 and H4 (168 aa)
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B (383 aa)
FRMPD2L1	FERM and PDZ domain containing 2 like 1 (320 aa)
OR2J3	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 3 (311 aa)
BMS1P5	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 9; Putative GTPase-activating protein (Potential) (686 aa)
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase); Caspase inhibitor. Acts as a regulator of procaspase- 1/CASP1 activation implicated in the regulation of the proteolytic maturation of pro-interleukin-1 beta (IL1B) and its release during inflammation. Inhibits the release of IL1B in response to LPS in monocytes. Also induces NF-kappa-B activation during the pro-inflammatory cytokine response. Also able to inhibit CASP1-mediated neuronal cell death, TNF-alpha, hypoxia-, UV-, and staurosporine-mediated cell death but not ER stress-mediated cell death. A[...] (404 aa)
PATE4	prostate and testis expressed 4; May modulate the function of nicotinic acetylcholine receptors. May enhance sperm motility (98 aa)
LOC646802	Uncharacterized protein C2orf14 (118 aa)
CCDC121	coiled-coil domain containing 121 (442 aa)
MST1P9	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) pseudogene 9; Probably has no proteolytic activity, since crucial characteristic of serine proteases catalytic sites are not conserved (By similarity) (715 aa)
KRTAP9-9	keratin associated protein 9-9; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated proteins (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (175 aa)
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A (383 aa)
KRTAP5-7	keratin associated protein 5-7; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated protein (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (165 aa)
FSD1L	fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like (530 aa)
COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb; This protein is one of the nuclear-coded polypeptide chains of cytochrome c oxidase, the terminal oxidase in mitochondrial electron transport (80 aa)
C9orf144B	Transmembrane protein C9orf144B (1335 aa)
KRTAP5-8	keratin associated protein 5-8; In the hair cortex, hair keratin intermediate filaments are embedded in an interfibrillar matrix, consisting of hair keratin-associated protein (KRTAP), which are essential for the formation of a rigid and resistant hair shaft through their extensive disulfide bond cross-linking with abundant cysteine residues of hair keratins. The matrix proteins include the high- sulfur and high-glycine-tyrosine keratins (187 aa)
FCGR2C	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32); Receptor for the Fc region of complexed or aggregated immunoglobulins gamma. Low affinity receptor. Involved in a variety of effector and regulatory functions such as phagocytosis of immune complexes and modulation of antibody production by B- cells. Binding to this receptor results in down-modulation of previous state of cell activation triggered via antigen receptors on B-cells (BCR), T-cells (TCR) or via another Fc receptor. Isoform IIB1 fails to mediate endocytosis or phagocytosis. Isoform IIB2 does not trigger phagocytosis (181 aa)
	(Homo sapiens)

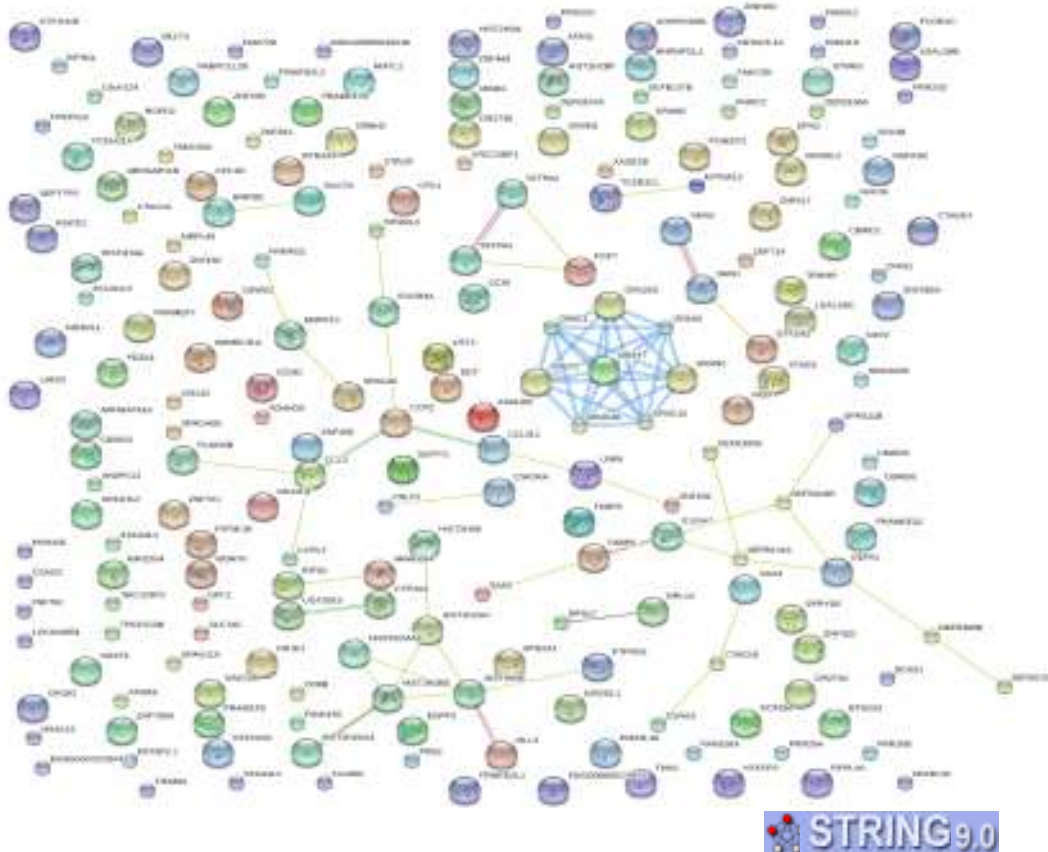
Genes metilados e hipermetilados (inactivos) en células MDA-MB-231 sin tratamiento



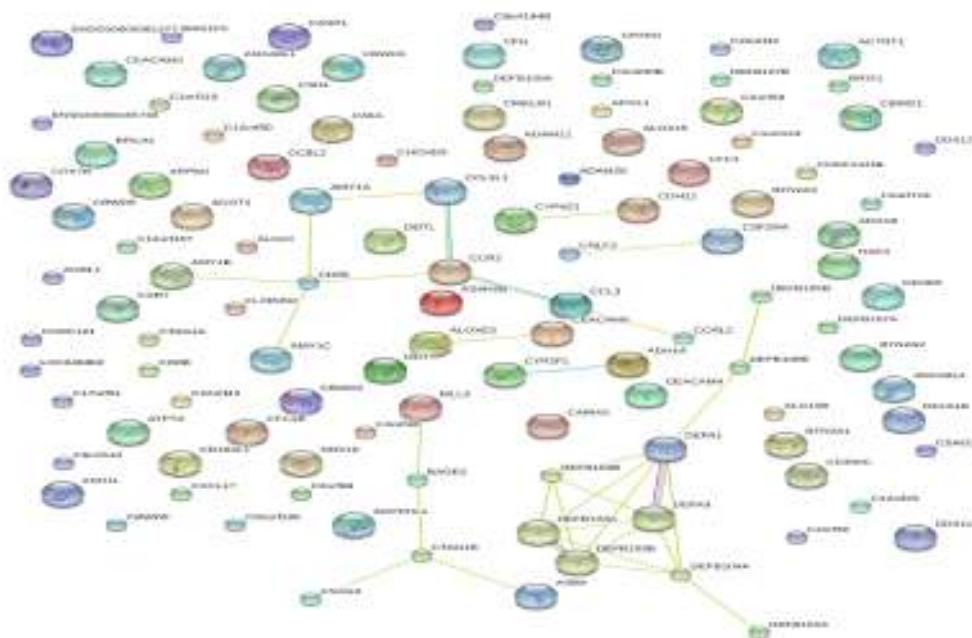
Genes que son activados en respuesta al tratamiento con resveratrol (100 μ M) por 24 H.



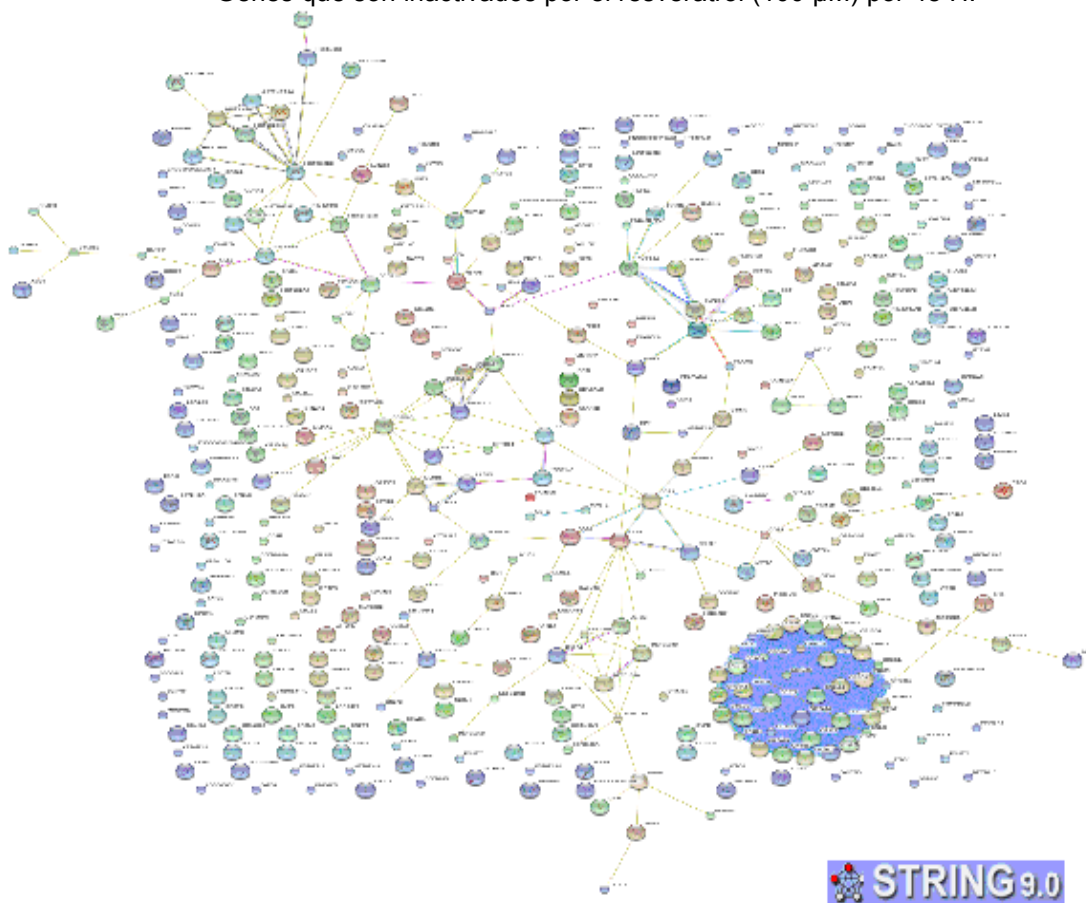
Genes que son activados en respuesta al tratamiento con resveratrol (100 μ M) por 48 H.



Genes que son inactivados en respuesta al tratamiento con resveratrol (100 μ M) por 24 H.



Genes que son inactivados por el resveratrol (100 μ M) por 48 H.



VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. P.A. Jones, S.B. Baylin. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.*, Jun, 3 (6): 415-28.
- 2.A. Herrera-Gómez, M. González y M. Granados. (2006). *Manual de Oncología y Procedimientos Medicoquirúrgicos*. McGraw-Hill.
3. A. Muñoz. (1997) *Cáncer: Genes y Nuevas Terapias*. Ed. Hélice.
- 4.P. Anand, A.B. Kunnumakara, C. Sundaram, K.B. Harikumar,S.T. Tharakan. (2008). Cancer is a preventable disease that requires majorlifestyle changes. *Pharm Res*, 25(9):2007-2116.
5. K. McPherson, C.M. Steel and J.M. Dixon, (2000). Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ*, 321:624-628.
6. R.S. Cotran, S.L. Robbins y V. Kumar. (1999). *Patología Estructural y Funcional*. Mc-Graw Hill. 6ª ed.
7. Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). *Cáncer de mama: prevención y control*. Documento revisado el 7 de enero de 2011, de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>.
- 8.Cancer Mondial, International Agency for Research on Cancer, IARC, <http://wwwdep.iarc.fr>
- 9.Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). *Cáncer*. Nota descriptiva No. 297. Documento revisado el 7 de enero de 2011, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
10. Krishna P.L. Bhat, John M. Pezzutto. (2006). *Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol* Article first published online: 24 JAN 2006.

11. D. Kopans. (1999) Breast Imaging, Lippincott Williams & Wilkins.
12. J S Reis-Filho & A. N. L. Tutt. (2008). Triple negative tumors: a critical review. Histopathology, 52:108-118.
13. Emad A. Rakha, David S.P. Tan, William D. Foulkes, et al. (2007). Are triple-negative tumors and basal-like breast cancer synonymous?. Breast Cancer Research, 9:404.
14. Ismail-Khan R., Bui M.M. (2010). A review of triple-negative breast cancer en Cancer Control. Jul, 17(3): 173-6.
15. R. Doll, and R. Peto. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risk of cancer on the United States today. J. Natl. Cancer Ins. 66:1191-1308.
16. Surh Y-J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat. Rev. Cancer, 3:768–780.
17. B. B. Aggarwl and S. Shishodia. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. Biochemical Pharmacology 71:1397-1421.
18. J.K. Kundu y Y-J Surh. (2004). Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. Mutat. Res, 555:65–80.
19. Alexander Link. (2010). Cáncer chemioprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. Biochemical Pharmacology 80:1771-1792.
20. Syed M. Meeran. (2010). Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. Clin Epigenetics, December 1;1 (3-4):101-116.
21. Julie Gusman, Huges Malone and Ghanem Atassi. (2001). A reappraisal of the potencial chemiopreventive and chemoterapeutic properties of resveratrol. Carcinogénesis vol.22 (8):1111-1117.

22. Joydeb Kumar Kundu, Young-Joon Surh. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters* 269:243-261.
23. Alexander Link, Francesc Balaguer, Ajay Goel. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology* 80:1771-1792.
24. H. Santos-Rosa y C. Caldas. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 41:2381-2402.
25. M. Weber, J. J. Davies, D. Wittig, E. J. Oakeley, M. Haase, W. L. Lam y D. Schubeler. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 37:853-862.
26. M. Esteller. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 16 Spec (1):50-59.
27. K. Gronbaek, C. Hother, y P. A. Jones. (2007). Epigenetic changes in cancer. *Apmis* 115:1039-1059.
28. K. Robertson. (2002). DNA methylation and chromatin – unraveling the tangled web. *Oncogene*, 21:5361–5379.
29. A. Feinberg and B. Vogelstein. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301:89-92.
30. S.B. Baylin, and J.G. Herman. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, 16:168–174.
31. D. Takai, and P.A.Jones. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:3740–3745.

32. A.P. Feinberg. (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Cancer Biol.*, 14:427–432.
33. P. Das, and R. Singal. (2004) DNA methylation and cancer. *J. Clin. Oncol.*, 22:4632–4642.
34. C.J. Piyathilake, A.R. Frost, W.C. Bell, D. Oelschlager, H. Weiss, G.L. Johanning, A. Niveleau, D.C. Heimburger, W.E. Grizzle. (2001). Altered global methylation of DNA: An epigenetic difference in susceptibility for lung cancer is associated with its progression. *Human Pathol.* 32(8):856-862.
35. M. Esteller. (2005). Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:629-656.
36. J. P. Issa. (2007). DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 13:1634-1637.
37. P.A. Jones, S.B. Baylin. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428.
38. F. Antequera, J. Boyes, A. Bird. (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, 62:503–514.
39. C.M. Suter, M. Norrie, S.L. Ku, K.F. Cheong, I. Tomlinson, et al. (2003). CpG island methylation is a common finding in colorectal cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 88:413–419.
40. Chiang, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K. and McCann, P.P. (1996) S-adenosylmethionine and methylation. *FA S E B J.*, 10, 471–480
41. R.W. Yen, P.M. Vertino, B.D. Nelkin, J.J. Yu, W. El-Deiry, A. Cumaraswamy, G.G. Lennon, B.J. Trask, P. Celano, and S.B. Baylin. (1992). Isolation and

characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 20:2287–2291.

42. Mohammad Obaidul Hoque, Maria Prencipe, Maria Luana Poeta, et al. (2009). Changes in CpG Islands Promoter Methylation Patterns during Ductal Breast Carcinoma Progression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18:2694-2700.

43. Daniel Zilberman. (2007). The human promoter methylome. *Nature Genetics*, 39:442-443.

44. NimbleGen Arrays User's Guide: Epigenetics Arrays Chip-chip and DNA Methylation User's Guide.

45. R. Irizarry, C. Ladd-Acosta, B. Wen, Z. Wu, C. Montano, P. Onyango, H. Cui, K. Gabo, M. Rongione, M. Webster, H. Ji, J. Potash, S. Sabunciyan and A. Feinberg. (2009). Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* February 41(2):178-186.

46. G.J. Dennis, B.T. Sherman, D.A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H.C. Lane, and R.A. Lempicki. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*, 4(5):P3.

47. Stefan Pfister, Christof Schlaeger, Frank Mendrzyk, Andrea Wittmann, et al. (2007). Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma. *Nucleic Acids Research*. 35 (7).

48. D. Ziberman and S. Henikoff. (2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development ePress online publication* 134 (22): 3959-3965.
49. Juan Sandoval, Holger Heyn, Sebastian Moran, Jordi Serra-Musach, Miguel A. Pujana, Marina Bibikova and Manel Esteller. (2011). Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* 6 (6):692-702.
50. Aimée M. Deaton and Adrian Bird. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25:1010-1022
- 51 NimbleGen ChIP-chip & DNA Methylation Microarrays. (2011). Unravel the epigenome with confidence. Roche Diagnostics GmbH.
52. Won Jun Lee, Joong-Young Shim and Bao Ting Zhu. (2005). Mechanisms for the Inhibition o DNA Methyltransferases by Tea Catechins and Bioflavoniods. *Molecular Pharmacology*, 68 (4):1018-1030.
53. S. Pfister, C. Shclaege, F. Mendrzyk, A. Wittmann, A. Benner, A. Kulozik, W. Sheurlen, B. Radlwimmer and P. Lichter. (2007). Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma. *Nucleic Acids Research*, 35 (7):1-11.
54. D. Sprul, C. Nestor, j. Culley, J. H. Dickson, J.M. Dixon, D. J. Harrison, R. R. Meehan, A. H. Sims and B. H. Ramsahoye. (2010). Transcriptionally repressed genes become aberrantly methylated and distinguish tumor of different lineages in breast cancer. *PNAS*, 108 (11):4364-4369.
55. Fang Fang, Sevi Turcan, Andrea Rimner, Andrew Kaufman, Dilip Girl, Luc G. T. Morris, Ronglai She, Venkatraman Seshan, Qianxing Mo, Adriana Heguy,

- Stephen B. Baylin, Nia Ahuja, Agnes Viale, Joan Massague, Larry Norton, Linda T. Vahdat, Mary Ellen Moynahan and Timothy A. Chan. (2011). Breast Cancer Methyomes Establish an Epigenomic Foundation for Metastasis. *NIH*, 3(75):1-21.
56. Stephen B. Baylin. (2004). Understanding DNA methylation and epigenetic gene silencing in cancer. *Current Therapeutics*.
57. L. Jiang, T. A. Gonda, M.V. Gamble, et al. (2008). Global hypomethylation of Genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts. *Cancer Research*, 68:9900-9908.
58. Jung-Hoon Park, Jinah Park, Jung Kyoong Choi, Jaemyun Lyu, Min-Gyun Bae, Young-Gun Lee, Jae-Bum Bae, Dong Yoon Park, Han-Kwang Yang, Tae-You Kim, Young-Joon Kim. Identification of DNA methylation changes associated with human gastric cancer. *BMC Medical Genomics* 82 (4).
59. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284:770-776.
60. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: A new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003; 22:6598-6608.
61. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: Oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003; 3:756-767.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 3 de Agosto del 2012, en la Ciudad de México D.F. para optar al grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Lic. Nutrición Rubiceli Medina Aguilar.

Dr. Mario César López Camarillo

Dr. Carlos Pérez Plasencia

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Dra. Ma. Elizbeth Álvarez Sánchez

Dra. Mavil López Casamichana

Dra. Laurence A. Marchat Marchau
