

Evaluación *in vitro* del efecto antiviral del Litocoiloleato frente al Virus de Herpes Simplex 1

¹Luis Enrique Puga-Galván, ¹Erika Nahomy Marino-Marmolejo, ¹Flor Yohana Flores-Hernández, ¹Darwin Eduardo Elizondo-Quiroga, ¹Juan Carlos Mateos-Díaz, ¹Ana Daniela Vega-Rodríguez, ¹Ernesto Prado-Montes de Oca, ²Jorge Gaona-Bernal y ¹Jorge Bravo-Madrigal*

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica. Guadalajara. Jalisco, México.

²Universidad de Guadalajara (UDG), Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Guadalajara, Jalisco, México.

*Autor de correspondencia: jbravo@ciatej.mx.

Palabras clave:

antiviral, inmunología, VHS-1, litocoiloleato

Resumen

El Litocoiloleato es un compuesto con potencial terapéutico desarrollado en CIATEJ, capaz de estimular células para la producción de moléculas con actividad antiviral como Catelicidina LL37, Beta defensina humana 1 e Interferón- γ , que permiten generar un estado de defensa celular contra infecciones. Se evaluó la capacidad antiviral de dicho compuesto frente al Virus de Herpes simplex 1 (VHS-1), donde se observó que existe sinergia con aciclovir al utilizar ambos en una concentración 0.05 mM, en combinación logró disminuir el título viral (TCID₅₀), el cual es la dosis necesaria para infectar al 50% del cultivo celular desde 4×10^4 TCID₅₀ hasta 56.2 TCID₅₀, es decir, un 99.87%. Lo anterior al ser estimuladas las células durante 2 horas. También se observó que no existe una toxicidad considerable al hacer la prueba de viabilidad celular mediante la prueba de MTT. Estos resultados abren la puerta a posibles tratamientos para VHS-1 así como la evaluación de su efecto contra otros virus o infecciones.

Enfoques Transdisciplinarios:
Ciencia y Sociedad, 1(1), 83-91.
ISSN. 3061-709X. <https://doi.org/10.5281/zenodo.12810177>

Recibido: 28 febrero 2023
Revisado: 15 de mayo 2023
Aceptado: 06 de junio 2023
Publicado: 24 de julio 2023



Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia CC BY-NC-SA 4.0. Para ver una copia de esta licencia visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Introducción

En la actualidad cuando uno escucha sobre el desarrollo de nuevos fármacos se piensa en grandes laboratorios de corporaciones de gran importancia económica como Bayer, Roche o Pfizer; sin embargo, en México existen diferentes grupos de investigación que constantemente están haciendo pruebas para encontrar o desarrollar nuevos fármacos que puedan ser útiles para la sociedad no solamente mexicana, sino global. En CIATEJ, por ejemplo, existen diferentes líneas de investiga-



ción que van dirigidas a generar fármacos que puedan ser utilizados en un futuro para dar un tratamiento eficaz contra alguna enfermedad. Es importante que estas investigaciones se lleven a cabo, ya que pueden ser benéficas para la población ante posibles brotes de microorganismos que pudieran ser resistentes a los medicamentos que existen en la actualidad, asimismo, nuestro país poco a poco dejaría de ser dependiente del desarrollo farmacéutico extranjero.

El Litocoiloleato (LO) es una molécula desarrollada en el grupo de investigación del Dr. Prado, que sirve como elicitador de péptidos antimicrobianos, el cual presenta actividad antimicrobiana indirecta e inmunomoduladora al inducir la expresión o sobreexpresión de péptidos antimicrobianos e interferón tipo II (interferón- γ). El LO es un derivado del ácido litocólico esterificado con ácido oleico. Es un líquido oleoso amarillento a temperatura ambiente con un peso molecular de 641g/mol y fórmula química C₄₂H₇₂O₄ (Prado-Montes de OCA *et al.*, 2015). Los elicitores de péptidos antimicrobianos se clasifican en físicos (clase I), químicos (clase II) y biológicos (clase III). El Litocoiloleato forma parte de la clase II (Prado-Montes De Oca, 2013; Prado-Montes de OCA *et al.*, 2015).

El interferón- γ así como los péptidos inducidos por el Litocoiloleato (Catelicidina LL37 y Beta defensina Humana 1), debido a su naturaleza, tienen un gran potencial antiviral, como mencionaron Prado-Montes de oca & Bravo-Madrigal en el 2018 donde demostraron que al exponer un cultivo celular a LO 0.05 mM lograba haber una reducción del título viral de al menos 1 logaritmo respecto a la carga viral inicial, probablemente provocado gracias a estas moléculas antivirales (Prado-Montes de oca & Bravo-Madrigal, 2018). El hecho de que el Litocoiloleato fomente la producción de moléculas con capacidad antiviral abre la puerta a su uso en tratamientos contra este virus de forma más efectiva.

En este trabajo, nos dimos a la tarea de buscar una forma de solubilizar con mayor eficacia el Litocoiloleato, con el fin de favorecer la entrada a la célula, para posteriormente evaluar la actividad antiviral que tiene el Litocoiloleato frente al virus de Herpes Simplex tipo 1 (VHS-1). Una vez que se obtuvieron resultados favorables evaluamos diferentes concentraciones para poder confirmar su seguridad toxicológica en cultivos celulares.

Desarrollo

Cultivo celular

Se empleó la línea celular derivada del riñón de mono verde africano (VERO CCL-81), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Se propagó utilizando medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma), el cual fue suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino (SFB) (ByProducts) sin antibióticos. El cultivo celular fue colocado en una incubadora NuairMT (NU-4750) a 37 °C y 5% de CO₂.

Virus

El Virus de Herpes simplex tipo 1 (VHS-1 VR-733) fue obtenido de la ATCC. Previamente fue replicado en células Vero donde se utilizó el medio DMEM con 1% de SFB. El título viral



que se logró obtener fue de 7.4×10^7 TCID₅₀/mL (TCID₅₀: Dosis necesaria para infectar al 50% del cultivo celular). Se replicó el virus en una monocapa de células Vero utilizando medio DMEM suplementado con 1% de SFB. El título viral infectivo de la suspensión de trabajo es de 1×10^7 TCID₅₀/mL.

Estimulación e Infección Viral

Se evaluaron las concentraciones de 0.5 mM y 0.05 mM de Litocoiloleato, se compararon con el antiviral Aciclovir, efectivo contra el VHS-1 a la misma concentración 0.05 mM, así mismo, se evaluó la sinergia que existe entre ambas moléculas. Se emplearon dos microplacas de 12 pozos (Corning), las cuales se prepararon un día previo con 4×10^5 células vero por pozo y medio DMEM (SIGMA) con Suero fetal bovino SFB al 5% (ATCC). Se desechó el medio y se realizaron dos lavados con 1 mL cada uno de PBS (Gibco), después se colocó 1ml de las soluciones a evaluar en los pozos y se estimuló una placa durante 2h y la otra durante 24h. Una vez que concluyó el tiempo de estimulación se reservó este medio de estimulación, se procedió a realizar la infección viral con VHS-1 (4×10^4 TCID₅₀ en 60 uL por pozo), para los controles con células sin infectar, se colocó 60 uL de medio DMEM con 1% SFB, y se incubó durante 60 minutos para su adsorción en la cual cada 10 minutos se homogeneizó para evitar que se secan las células, pasado el tiempo se regresó cada medio de estimulación a sus respectivos pozos y se incubaron durante 3 días a 37 °C/ 5% CO₂ mientras se observaba el avance de la infección y la aparición del efecto citopático clásico del VHS-1, una vez completados los días se congeló la microplaca para su posterior titulación.

Titulación Viral

Se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos (Corning), las cuales fueron preparadas un día previo con 12,500 células por pozo en medio DMEM al 5% SFB. Se descongelaron las microplacas donde se realizó la infección viral y del contenido se realizaron diluciones con factor 1:10, posteriormente se descartó el medio de la placa de 96 pozos que se tenía previamente y se procedió a colocar 100 uL por pozo en la placa donde el pozo del extremo derecho era el más diluido y hacia la izquierda se iba concentrando de virus. Se incubó durante 3 días a 37°C/ 5% CO₂. Se marcaron los pozos donde había efecto citopático y mediante la ecuación de Spearman-Kärber se realizó el cálculo de TCID₅₀ existente después de la estimulación con los tratamientos.

Citotoxicidad celular

Se realizó en microplacas de 96 pozos (Corning) y por triplicado en diferentes tiempos. Una vez que la monocapa estuvo en confluencia, fue tratada con 0.1mL por pozo de medio DMEM con 1%SFB, Etanol al 2%, albúmina al 0.4% y la concentración del Litocoiloleato a evaluar como se muestra en la Tabla 1, teniendo un total de ocho repeticiones por muestra y siete repeticiones por cada control. Las placas con las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 24h, 48h y 72h. Después de la evaluación microscópica, las concentración de LO a evaluar fueron removidas de las microplacas y se realizaron dos lavados con 0.1 mL por pozo con



PBS (Gibco) para remover cualquier residuo. Se siguió el procedimiento descrito por Nga y colaboradores en el 2020 (Nga *et al.*, 2020). Se le añadió 0.1 mL de medio DMEM sin SFB, así como 10 uL de solución de MTT (Sigma) (la solución de trabajo de MTT contiene: 5mg de MTT por 2 mL de medio DMEM sin SFB), se agitó un poco para asegurar la incorporación y se cubrió de la luz. Las células fueron incubadas por 4h a 37°C/ 5% CO₂. Se añadieron 90 uL de DMSO (Merck) y después 60 uL de SDS 30% (Sigma) (30 g de SDS por 100 mL de agua destilada) por pozo y se cubrieron todos los pozos con una película adhesiva transparente para evitar la contaminación entre los pozos y se volvió a cubrir de la luz. Se agitó durante 60 minutos a 600RPM. Se leyó la absorbancia generada por cada muestra a 550 nm en el lector de microplacas xMarkMT Microplate Spectrophotometer (Biorad).

Se utilizó como control de células muertas DMSO al 60% (Sigma), así como un control de células vivas en el cual únicamente tenían medio DMEM con 1% SFB, también se añadió un control de los excipientes, el cual contenía medio DMEM con 1% SFB, 2% Etanol y albúmina 0.4% para observar el efecto que tienen estos en el monocapa celular.

Resultados

Ensayo actividad antiviral

En la Figura 1 se muestra el título final de cada una de las soluciones evaluadas, la Tabla 2 contiene los datos desglosados de la titulación, donde se logra observar que en ambos tiempos de estimulación el Litocoiloleato no es capaz de hacer frente a la infección viral por sí misma al emplearse únicamente disuelta en el excipiente; sin embargo, existe una importante sinergia entre el Litocoiloleato y el aciclovir, los cuales tienen un mejor efecto antiviral en comparación con el aciclovir solo. También se observa que la estimulación del cultivo celular con 2 horas en contacto con la solución 0.05mM de Litocoiloleato y 0.05mM se logró disminuir 99.87% la carga viral inicial, es decir, de 4×10^4 TCID₅₀ a 56.2 TCID₅₀ mientras que la estimulación del mismo compuesto durante 24 horas a un cultivo celular logró disminuir un 99.55%, es decir, hasta 178 TCID₅₀. En el caso del LO 0.5 mM y aciclovir 0.05 mM, se observó a las 2 horas de estimulación una reducción similar, es decir, de 4×10^4 TCID₅₀ a 100 TCID₅₀ y a las 24 horas de 178 TCID₅₀. Si comparamos cualquiera de los dos resultados con la reducción del virus que hubo con el aciclovir 0.05mM la carga inicial se redujo un 99.21% después de 2 horas de estímulo (3.16×10^2 TCID₅₀); no obstante, no se observó efecto neto virucida después de 24 horas de estímulo a ya que de hecho el título se incrementó a 5.62×10^4 TCID₅₀.

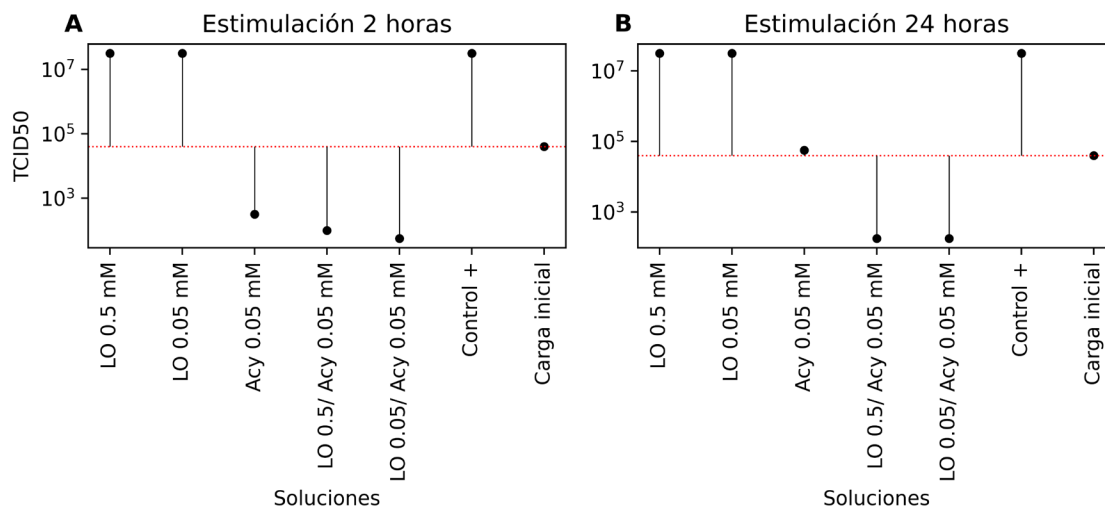


Figura 1. Resultados de las titulaciones virales tras la exposición a los tratamientos. La línea roja indica la carga inicial con la cual fue inoculado el cultivo 4×10^4 TCID₅₀. El punto representa el título viral al final del experimento de cada una de las soluciones evaluadas. Se puede observar cómo en ambos casos los tratamientos con Litocoiloleato 0.5/0.05mM y aciclovir 0.05 mM tuvieron un efecto sinérgico disminuyendo el título final aún más que el Aciclovir 0.05mM solo, también se observa la replicación normal del VHS-1 en el control positivo de infección.

Los resultados anteriores muestran que existe un mejor efecto antiviral a las 2h de estimulación en comparación con las 24h y en la concentración de Litocoiloleato a 0.05mM en combinación con el aciclovir a 0.05mM, siendo significativos ya que casi logran eliminar por completo el VHS-1. Es necesario corroborar estos resultados en queratinocitos humanos y en placas de 6 pozos.

Citotoxicidad celular

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad. Tras analizar los datos se observó una toxicidad moderada, la cual aparentemente se debe al etanol al 2% presente en el excipiente ya que se observan resultados muy parecidos cuando se compara con la toxicidad observada únicamente en las células expuestas sólo al excipiente. Los resultados estadísticos confirmaron que no hay una diferencia significativa.

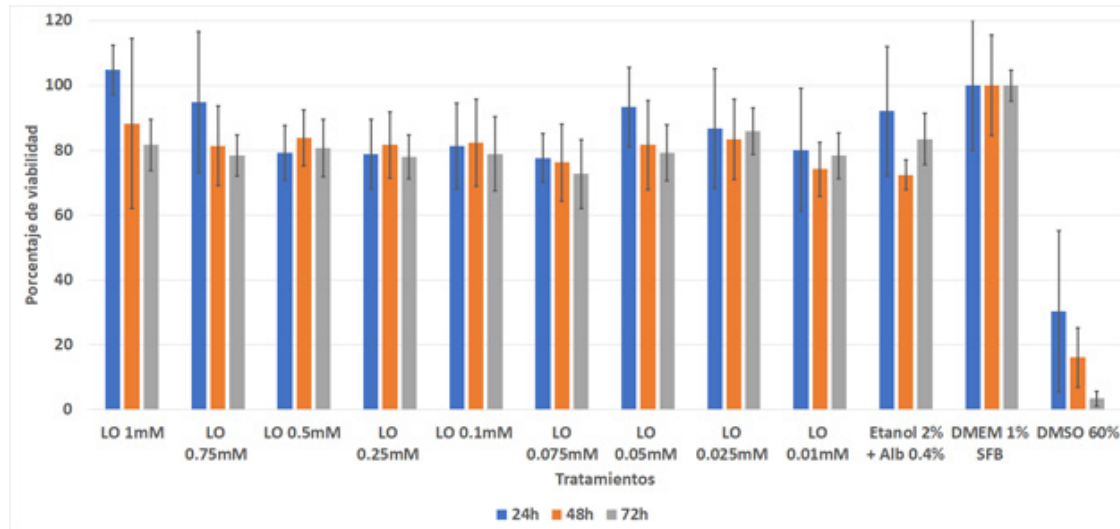


Figura 2. Gráfico de citotoxicidad mediante la prueba de MTT de los diferentes tratamientos evaluados. Se muestran las líneas de error que fueron establecidas de acuerdo con la desviación estándar de los resultados.

La prueba de citotoxicidad por MTT nos permite observar la respiración celular al metabolizar el MTT por parte de las células, sin embargo, esta puede ser modificada si el compuesto a evaluar crea estrés en las células y estas aumentan la velocidad de su metabolismo, motivo por el cual sería necesario complementar dichos resultados con la prueba de toxicidad mediante citometría de flujo, la cual nos mostraría la integridad celular y de esa forma asegurar que la molécula es segura, al menos a nivel celular, posteriormente será necesario también hacer evaluaciones de seguridad en su administración en su modelo preclínico.

Discusión

Diversos autores han encontrado que la beta defensina humana 1 (Álvarez *et al.*, 2018; Brice & Diamond, 2019), la catelicidina LL37 (Ahmed *et al.*, 2019; Pahar *et al.*, 2020) y el interferón- γ (Kajita *et al.*, 2015; Sainz & Halford, 2002) son capaces de hacer frente contra infecciones por VHS-1 por sí mismos, así que se podría hipotetizar que el Litocoiloleato al estar en contacto con las células estimula la síntesis de estos péptidos antivirales y citocinas posibilitando que la célula pueda hacer frente a una infección viral; sin embargo, es necesario realizar una qRT-PCR para poder confirmar que en la línea VERO se está llevando la sobreexpresión de estos así como cuantificar, además de realizarse el modelo de actividad antiviral en queratinocitos, modelo donde se ha constatado la sobreexpresión de la beta defensina, catelicidina e interferón- γ . Los resultados observados en este trabajo muestran que por sí solo el LO no ejerce un efecto antiviral, como sí lo hace el aciclovir, aunque se han detectado cepas resistentes a este antiviral, en especial en pacientes inmunocomprometidos, y que han sido tratados con un solo antiherpético (Epstein *et al.*, n.d.; Greeley *et al.*, 2020). En general, este virus sigue siendo tratado con aciclovir de manera efectiva, no obstante, el uso combinado con el aciclovir incrementa el efecto antiviral de este, lo que permitiría, en principio, reducir el tiempo de infección con un tratamiento en conjunto.



Nuestro grupo considera que este efecto sinérgico puede ser al menos, en parte, debido a que se ha demostrado previamente que el LO tiene un efecto elicitor del interferón γ y de los péptidos antimicrobianos: catelicidina y beta-defensina en células A549 y queratinocitos humanos (Prado-Montes de OCA *et al.*, 2015). Estos resultados abren la puerta a posibles tratamientos futuros con ambas moléculas con el fin de ayudar principalmente a pacientes inmunocomprometidos que sufran de infección viral por Herpes, sin embargo, es necesario continuar con la investigación sobre su actividad antiviral indirecta. También es importante mencionar que la citotoxicidad observada en los ensayos no sería perjudicial al momento de tratar con Litocoiloleato a pacientes que tengan alguna infección por VHS-1.

Uno de los principales problemas que se observaron en este trabajo fue lograr la correcta integración del LO en los cultivos celulares, esto dado la hidrofobicidad de la molécula, esto se logró resolver utilizando como agente acarreador el SFB al 80% o bien la albúmina al 4%, con lo cual se logró la integración del LO desde una concentración 1mM. Los mejores resultados se observaron en concentración 0.05mM, concentración que si bien no es viricida, sí es capaz de ejercer un efecto inhibitorio (virostático) cuando se compara con células expuestas únicamente al vehículo usado para resuspender el LO. Por otra parte, los resultados muestran que el mejor efecto se observa después de 2h de estimulación del LO sobre las células epiteliales, esto implica que aparentemente el LO es una molécula que ejerce su efecto antes de las 24h, no obstante, resulta contrastante que la expresión del Interferón γ se observa primordialmente después de 72 horas en líneas celulares humanas (Prado-Montes de OCA *et al.*, 2015). Esto implica que es necesario evaluar y comparar los niveles de expresión de la beta defensina, interferón gamma y catelicidina a las 72 h de estimulación con el LO. En relación con la solubilidad y tomando en consideración su uso industrial, podemos considerar que dado el carácter lipofílico del LO, se espera que dicha molécula pueda ser incorporada en formulaciones de aplicación tópica similares a las que actualmente se comercializa para tratar el fuego labial, el cual es uno de los principales trastornos causantes del virus VHS-1.

Conclusión

El Litocoiloleato es una molécula con actividad inmunomoduladora, la cual es capaz de proveer a las células de un mecanismo de defensa, el cual en sinergia con el aciclovir podría ayuda a tratar la infección contra el Virus de Herpes Simplex tipo 1, esto abre la posibilidad de utilizarlo con pacientes que estén inmunocomprometidos o incluso de poder utilizarlo con otros antivirales para evaluar su eficacia contra diferentes virus. Dada la capacidad del LO para estimular la expresión de péptidos antimicrobianos, se tienen las perspectivas que esta molécula pueda ser utilizada para inducir un incremento en la capacidad defensiva de las células epiteliales frente a diversas infecciones virales o bacterianas. Por otra parte, dado que esta molécula no tiene un efecto antiviral directo, sino más bien induce en las células la capacidad de generar diversas moléculas con actividad antimicrobiana, se podría advertir que, en particular, podría ser útil para evitar la resistencia antimicrobiana y/o resistencia antiviral. En relación con la seguridad, aunque aún hace



falta realizar más pruebas, al menos la prueba de citotoxicidad indica que esta molécula es segura para las células en la concentración en la cual es efectiva como inductor de péptidos antivirales.

Financiamiento

Proyecto Clave 312570: Potencial Inmunomodulador para COVID-19: Evaluación del Litocoleato como inductor de síntesis de péptidos antivirales en células epiteliales expuestas a infección con el virus SARS-COV-2 (PAACTI-CONACYT)-2020.

Referencias

- Ahmed, A., Siman-Tov, G., Hall, G., Bhalla, N., & Narayanan, A. (2019). Human antimicrobial peptides as therapeutics for viral infections. *Viruses*, *11*(8), MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v11080704>
- Álvarez, Á. H., Martínez Velázquez, M., & Prado Montes de Oca, E. (2018). Human β -defensin 1 update: Potential clinical applications of the restless warrior. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *104*, pp. 133–137. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.007>
- Brice, D. C., & Diamond, G. (2019). Antiviral Activities of Human Host Defense Peptides. *Current Medicinal Chemistry*, *27*(9), 1420–1443. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190805151654>
- Kajita, A., Morizane, S., Takiguchi, T., Yamamoto, T., Yamada, M., & Iwatsuki, K. (2015). Interferon-Gamma Enhances TLR3 Expression and Anti-Viral Activity in Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *135*(8), 2005–2011. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.125>
- Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., & Thao, D. T. P. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry*, *610*, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113937>
- Pahar, B., Madonna, S., Das, A., Albanesi, C., & Girolomoni, G. (2020). Immunomodulatory Role of the Antimicrobial LL-37 Peptide in Autoimmune Diseases and Viral Infections. *MDPI*, *7*, 1–19.
- Prado-Montes De Oca, E. (2013). Antimicrobial peptide elicitors: New hope for the post-antibiotic era. *Innate Immunity*, *19* (3), pp. 227–241. SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1753425912460708>
- Prado-Montes de oca, E., & Bravo-Madrigal, J. (2018). *Elicitor de péptidos antimicrobianos Litocoleato como agente antiviral*.
- Prado-Montes de OCA, E., Mateos-Díaz, J. C., Gonzalez-Avila, M., & Grajales-Hernández, D. Alberto. (2015). *Process for obtaining a molecule serving as an antimicrobial peptide elicitor*.
- Sainz, B., & Halford, W. P. (2002). Alpha/Beta Interferon and Gamma Interferon Synergize To Inhibit the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1. *Journal of Virology*, *76*(22), 11541–11550. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11541-11550.2002>



Tablas y complementos

Tabla 1. Soluciones para evaluar la citotoxicidad.

Soluciones Para Evaluar	Albúmina 0.4%	Etanol 2%	SFB 1%	12,500 células vero / pozo	Propósito
Litocoiloleato 1 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.75 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.5 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.25 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.1 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.075 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.05 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.025 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
Litocoiloleato 0.01 mM	+	+	+	+	Evaluar citotoxicidad.
DMEM + 1% SFB + DMSO 60% + Albúmina 0.4% + 2% Etanol	+	+	+	+	Control de células muertas.
DMEM 1% SFB + 2% Etanol + Albúmina 0.4%	+	+	+	+	Control de Excipientes
DMEM 1% SFB	-	-	+	+	Control de células vivas

Tabla 2. Resultados de la titulación viral tras la estimulación del cultivo celular con los diferentes tratamientos. LO: Litocoiloleato. Acy: Aciclovir.

*Ensayos efectuados en presencia de 400,000 células VERO		Carga viral en DICT50%		Modificación de la carga inicial	
		por ensayo		Número de veces que Aumento	Número de veces que disminuyo
		Carga viral Inicial	Carga viral 3 Días post infección		
2h estimulación	LO 0.5mM	4.00E+04	3.16E+07	790.6	-
	LO 0.05mM	4.00E+04	3.16E+07	790.6	-
	Acy 0.05mM	4.00E+04	3.16E+02	0.0	126.5
	LO 0.5/ Acy 0.05 mM	4.00E+04	1.00E+02	0.0	400.0
	LO 0.05/ Acy 0.05 mM	4.00E+04	5.62E+01	0.0	711.3
	Control +	4.00E+04	3.16E+07	790.6	0.0
24h estimulación	LO 0.5mM	4.00E+04	3.16E+07	790.6	-
	LO 0.05mM	4.00E+04	3.16E+07	790.6	-
	Acy 0.05mM	4.00E+04	5.62E+04	1.4	0.7
	LO 0.5/ Acy 0.05 mM	4.00E+04	1.78E+02	0.0	224.9
	LO 0.05/ Acy 0.05 mM	4.00E+04	1.78E+02	0.0	224.9
	Control +	4.00E+04	3.16E+07	790.6	0.0