



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Centro de Ciencias Genómicas

Análisis cuantitativo de la expresión proteómica diferencial de biopsias de cáncer cervico-uterino usando marcaje isobárico (ITRAQ), cromatografía líquida bidimensional y espectrometría de masas.

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Alberto Carlos Ramírez Torres

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Alejandro Manuel García-Carrancá

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Marcela Lizano Soberón

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México

Ciudad de México, abril 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO DE EXAMEN

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
(Presidente)

Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara
(Secretario)

Dra. Sandra Romero Hidalgo
(Vocal)

Dr. Osbaldo Resendis Antonio
(Vocal)

Dr. Vicente Madrid Marina
(Vocal)

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, Campus Morelos. Para su realización, conté con una beca CONACYT (255711), así mismo también gocé de un apoyo de "Ayudante de Investigador Nacional SNI III".

Agradecimientos

Doy mis agradecimientos a:

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de UNAM (PDCB UNAM) por permitirme realizar mis estudios de posgrado en su institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca obtenida que financió mis estudios de posgrado.

A los integrantes del jurado de examen Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay, Dra. Sandra Romero Hidalgo, Dr. Osbaldo Resendis Antonio, Dr. Vicente Madrid Marina, y el Dr. Sergio Encarnación por sus revisiones del trabajo, recomendaciones y apoyo para el término del mismo.

Al Dr. Sergio Encarnación mi tutor principal por las facilidades provistas, su tutela, consejos, apoyo incondicional, comprensión y paciencia para la realización y conclusión de mis estudios.

A mi comité tutor, el Dr. Diego Arenas y el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá por las tutorías y consejos provistos para la mejoría del trabajo durante el desarrollo del proyecto.

Al Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM) por los recursos, infraestructura y servicios puestos a disposición para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Michael F. Dunn por su apoyo en la lectura y edición crítica del artículo original de investigación producto de esta tesis para su posterior publicación.

A Alejandro Aguilar Vera por su soporte en los análisis estadísticos que componen a este trabajo.

A Emmanuel Salazar Bustamante por su colaboración y apoyo en el manejo, procesamiento y análisis de los datos obtenidos en este trabajo.

A mis hermanos que han compartido tanto conmigo y a mi mamá Rosaura Torres Cotino quien ha dado todo por mí y ser un gran ejemplo en mi vida.

A Xac por haberme permitido conocer a Liah Amaia Ramírez Castro quién con su persistente curiosidad me recuerda siempre la insaciable necesidad por entender, comprender y explicar la naturaleza.

Gracias

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
I.INTRODUCCIÓN	
1.1 Estadísticas del cáncer a nivel mundial.....	14
1.2 El cáncer como una enfermedad compleja	14
1.3 Autosuficiencia en señales de crecimiento.....	15
1.4 Insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento	16
1.5 Resistencia o evasión de la muerte celular programada (apoptosis).....	17
1.6 Inmortalidad replicativa	18
1.7 Inducción de angiogénesis.....	19
1.8 Invasión y metástasis.....	20
1.9 Nuevas dimensiones en las características del cáncer	21
1.10 Cáncer cervicouterino	22
1.11 Proteómica y cáncer	23
1.12 Proteómica para la búsqueda de biomarcadores	24
1.13 Naturaleza del adenocarcinoma cervicouterino.....	25
1.14 ITRAQ como estrategia para el análisis de cambios en la expresión proteica	26
1.15 Funciones de la familia de proteínas Reticulocalbina	26
1.16 Familia de proteínas Ras	27
1.17 Los tipos de cáncer cervicouterino y su prognosis	29
II.HIPÓTESIS	
HIPOTESIS	31
III.OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general.....	33
3.2 Objetivos particulares	33
IV. METODOLOGÍA	
4.1 Colecta de muestras	35
4.2 Detección y tipificación de papilomavirus (HPV)	35

4.3 Tratamiento de la biopsia para la extracción proteica	37
4.4 Digestión proteica y marcaje de péptidos.....	37
4.5 Prefraccionamiento de péptidos.....	38
4.6 Identificación de proteínas, análisis de componentes principales (PCA) y Super Exact Test (SET)	39
4.7 Análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA)	40
4.8 Análisis de enriquecimiento de vías por ShinyGO 0.77 y Hallmark MSigDB	40
4.9 Análisis Inmunohistoquímico.....	41
4.10 Producción de plásmido y lentivirus	41
4.11 Transfección de la línea celular HeLa	42
4.12 Modelo xenógrafo de ratón para el estudio de RAB14 y RCN3.....	42
V.RESULTADOS	44
5.1 Proteómica.....	45
5.2 Análisis de datos con intersecciones multigrupales.....	48
5.3 Análisis de enriquecimiento de genes por ShinyGO 0.77.....	49
5.4 Análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA) para elucidar vías de señalización en cáncer cervicouterino	52
5.5 Inmunohistoquímica de RCN3 y RAB14	63
5.6 Modelo tumoral xenógrafo para evaluar RCN3 y RAB14 in vivo	64
VI.DISCUSIÓN	
DISCUSIÓN.....	67
VII. CONCLUSIONES	
CONCLUSIONES	72
VIII. PERSPECTIVAS	
PERSPECTIVAS	74
IX. ANEXOS	
9.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	76
9.2 ARTICULO CIENTÍFICO ORIGINAL DERIVADO DEL PROYECTO DE TESIS.....	77
9.3 MEDIOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	95
X. REFERENCIAS	
REFERENCIAS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Adición de características emergentes y características facilitadoras al modelo de características del cáncer	22
Figura 2. Las proteínas Ras son importantes para el desarrollo normal.....	29
Figura 3. Diseño experimental y el marcaje con ITRAQ.....	38
Figura 4. Diagrama de los grupos de análisis (Biplot)	45
Figura 5. Clasificación de las proteínas de cáncer cervicouterino por ontología de genes .	47
Figura 6. Super ExactTest (SET) de las proteínas de cáncer cervicouterino.....	49
Figura 7. Procesos biológicos enriquecidos en cáncer cervicouterino con ShinyGO 0.77 (Hallmarck MsigDB).....	51
Figura 8. Ensayo de inmunohistoquímica (IHC) para la detección proteína de RAB14 y RCN3 en biopsias de cáncer cervicouterino	63
Figura 9. Modelo xenógrafo de ratón	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Cambios en estadísticamente significativos en la expresión proteica de los grupos de análisis de cáncer cervicouterino	48
Tabla II. Enriquecimiento de vías de señalización estadísticamente significativas en cáncer cervicouterino de acuerdo a análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA)	53
Tabla III. Proteínas diferencialmente expresadas en cáncer cervicouterino escamoso (SCC)	57
Tabla IV. Proteínas diferencialmente expresadas en adenocarcinoma cervicouterino (CAD)	59
Tabla V. Proteínas comunes entre cáncer cervicouterino escamoso (SCC) y adenocarcinoma cervicouterino (CAD)	60

ABREVIATURAS

2D LC-MS/MS: Cromatografía líquida bidimensional

AdMD16: Adenocarcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV16+

BMECs: Células endoteliales de médula ósea

BP: Proceso biológico

CAD: Adenocarcinoma de cérvix

CC: Cáncer de cérvix

CTRL: Tejido control sano

CTRL: Tejido sano control

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ds: doble cadena

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor de crecimiento epidermoide

EMT: Transición epitelio mesénquima

ER: Retículo Endoplásmico

ERK: Regulada por cinasa extracelular

ERS: Estrés de reticulo endoplásmico

FasL: Ligando Fas

FDR: Tasa de descubrimiento falso

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

GdmCl: Cloruro de guanidinio

GDP: Guanosin difosfato

GLUT4: Transportador de glucosa 4

GO: Ontología de genes

GSEA: Análisis de enriquecimiento de grupos de genes

GTP: Guanosin trifosfato

H & E: Hematoxilina y eosina

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HP MS: Espectrometría de masas de alta resolución

HPV: Virus del papiloma humano

HR HPV: Virus del papiloma humano de alto riesgo

HSIL: Lesiones de alto grado

IGF: Factor de crecimiento insulinoide

ITRAQ: Marcaje Isobárico para la cuantificación relativa y absoluta

kDa: KiloDalton

LB: Luria Bertani

LCR: Región grande de control.

M: Molaridad

MF: Función molecular

miRNA: MicroRNA

MM: Mezcla maestra

nm: nanómetro

NSLC: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas

NTAT: Tejido no tumoral adyacente

pb: Pares de bases

PBS: Solución buffer de fosfatos.

PCA: Análisis de componentes principales

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pPCR: Producto de PCR

pRB: Proteína de retinoblastoma

PTM: Modificación post-traduccionales
RCNs: Reticulocalbinas
RFP: Proteína roja fluorescente
RNA: Ácido ribonucleico
SCC: Cáncer de cérvix escamoso
SD: Desviación estándar
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SqMD16: Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV16+
SqMD18: Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV18+
SqMD31: Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV31+
SqPD16: Carcinoma escamoso pobremente diferenciado HPV16+
TBS: Clasificación Bethesda
TEAB: Trietil amonio
TGF β : Factor transformante de crecimiento beta
TNF: Factor de de necrosis tumoral
TNFR1: Receptor de necrosis tumoral 1
TSP-1: Trombospondina 1
VEGF-A: Factor de crecimiento vasculo-endotelial A
WB: Western blot
WT: Tipo silvestre

RP LC: Cromatografía de fase reversa
rpm: Revoluciones por minuto
RT: Temperatura ambiente

RESUMEN

A la fecha, la gran mayoría de los estudios de cáncer cervicouterino (CC) se han enfocado principalmente en el cáncer cervicouterino escamoso (SCC). Nuestro estudio se encargó de descubrir y aclarar las diferencias entre el cáncer cervicouterino tipo escamoso y el adenocarcinoma cervicouterino (CAD) que puedan ofrecer información valiosa para la identificación de las proteínas comunes entre SCC y CAD involucradas en el desarrollo del CC, así como las específicas de SCC y CAD. Materiales y métodos: Extractos totales de proteína de 15 muestras correspondientes a 5 diferentes tipos de grupos de análisis de CC fueron comparados contra un grupo de tejidos no cancerosos empleando cromatografía líquida bidimensional y espectrometría de masas (2D LC-MS/MS), marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta (ITRAQ), análisis de componentes principales (PCA) y análisis de enriquecimiento de genes (GSEA). Resultados: Se identificaron y cuantificaron 622 proteínas. La categoría más representada fue la de proteínas relacionadas con la exocitosis con 25% del total de las proteínas identificadas y cuantificadas. Considerando los resultados de los experimentos, se seleccionó a la proteína Reticulocalbina 3 (RCN3) y a la proteína relacionada a Ras Rab-14 (RAB14) para realizar una serie de ensayos *in vitro* e *in vivo*. RCN3 estuvo sobreexpresada en todos los tejidos de CC comparados contra el control y RAB14 estuvo sobreexpresada en cáncer cervicouterino escamoso (SCC) comparado contra el adenocarcinoma cervicouterino (CAD). En el experimento de inducción de tumores en ratón (nu/nu) la expresión de RAB14 estuvo correlacionada positivamente con el incremento en el tamaño del tumor comparado con el control. Además, la expresión de RCN3 en células HeLa indujo un incremento en tamaño discreto comparado con el control después de la inoculación al día 47. Conclusión: RAB14 y RCN3 son potenciales biomarcadores y blancos terapéuticos en el tratamiento del CC.

Palabras clave: RAB14, RCN3, adenocarcinoma cervicouterino, exosoma, ITRAQ, proteómica.

ABSTRACT

Background/Aim: To date, several proteomics studies in cervical cancer (CC) have focused mainly on squamous cervical cancer (SCC). Our study aimed to discover and clarify differences in SCC and CAD that may provide valuable information for the identification of proteins involved in tumor progression, in CC as a whole, or specific for SCC or CAD. **Materials and Methods:** Total protein extracts from 15 individual samples corresponding to 5 different CC tissue types were compared with a non-cancerous control group using bidimensional liquid chromatography-mass spectrometry (2D LC-MS/MS), isobaric tags for relative and absolute quantitation (ITRAQ), principal component analysis (PCA) and gene set enrichment analysis (GSEA). **Results:** A total of 622 statistically significant different proteins were detected. Exocytosis-related proteins were the most over-represented, accounting for 25% of the identified and quantified proteins. Based on the experimental results, reticulocalbin 3 (RCN3) and Ras-related protein Rab-14 (RAB14) were chosen for further downstream in vitro and vivo analyses. RCN3 was overexpressed in all CC tissues compared to the control and RAB14 was overexpressed in squamous cervical cancer (SCC) compared to invasive cervical adenocarcinoma (CAD). In the tumor xenograft experiment, RAB14 protein expression was positively correlated with increased tumor size. In addition, RCN3-expressing HeLa cells induced a discrete size increment compared to control, at day 47 after inoculation. **Conclusion:** RAB14 and RCN3 are suggested as potential biomarkers and therapeutic targets in the treatment of CC.

Key Words: RAB14, RCN3, cervical adenocarcinoma, exosome, ITRAQ, proteomics.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Estadísticas del cáncer a nivel mundial

El cáncer es un proceso patológico de crecimiento y diseminación incontrolada de células. Puede suscitarse prácticamente en cualquier parte del cuerpo. Este tipo de procesos biológicos suelen originar una masa celular denominada tumor. La mayoría de los tumores suelen ser tumores sólidos, sin embargo, existen tumores formados por células blancas que constituyen la sangre como sucede en la leucemia. De acuerdo con la más reciente actualización de la organización mundial de la salud (OMS) en el año 2018 el cáncer alcanzó 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes. El cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres es el cáncer de pulmón siendo diagnosticado en uno de cada cinco de casos de cáncer en hombres (22.0%) seguido en segundo lugar por el cáncer de próstata (13.5%), cáncer colorrectal (10.9%) en tercer lugar, así como cáncer de hígado en cuarto (10.2%). En cuanto al cáncer en mujeres, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia a nivel mundial, donde uno de cada cuatro casos de cáncer diagnosticado en mujeres es cáncer de mama. El cáncer de mama es la primera causa también de muerte en mujeres asociada al cáncer (15.0%), seguida del cáncer de pulmón (13.8%) en segundo lugar, cáncer colorrectal (9.5%) en tercera causa y en cuarta posición encontramos al cáncer cervicouterino (CC) con una mortalidad del 7.5% a nivel mundial¹.

1.2 El cáncer como una enfermedad compleja

Definir el cáncer desde un punto de vista biológico y organizacional es una tarea compleja. Algunas definiciones han ayudado a tratar de explicar esta enfermedad compleja, ya que se consideraba por la década de los 90s que los procesos tumorales empezaban por una célula que se convertía de célula normal a tumoral a través de diversos pasos. Se definía al cáncer como una enfermedad genética heredable donde muchos de los genes del cáncer estaban presentes en procesos esenciales de la biología celular como el crecimiento y desarrollo². Dividiendo dichos genes en oncogenes y supresores tumorales. Los oncogenes eran definidos como aquellos genes cuyos cambios en un aminoácido eran capaces de generar proteínas de estructura alterada con alguna función ganada reflejada en el crecimiento y división celular. Dicho nombre de oncogén se usa una vez que dichas secuencias génicas son introducidas en fibroblastos murinos en cultivo y estos presentan posteriormente una incontrolable división celular. Por otro lado, los supresores de tumores son conocidos de esta forma cuando se estudiaron casos clínicos de retinoblastoma hereditarios donde la pérdida de un gen en este caso el gen de la proteína de retinoblastoma (pRB) desde línea germinal generaba células mutantes que a la postre formarían un tumor en la retina ocular³. Por lo

que la pérdida de dicho gen constituía un incremento en la posibilidad de generar un tumor así que se le asignó el nombre de gen supresor de tumores. El enfoque genético como causal del cáncer resultó producto del estudio de tipos de cáncer heredables que en el caso de retinoblastoma son altamente improbables. Si bien el retinoblastoma es el cáncer ocular más común en infantes es un padecimiento altamente infrecuente con cerca de un caso por cada 16000-18000 nacimientos a nivel mundial⁴. Que, si bien ayudó un poco a definir un grupo de genes alterados en dicho tipo de cáncer, no refleja por completo las distintas variantes de cáncer que hasta la fecha se han descrito.

Ya para el año 2000 la búsqueda de un concepto que permitiera una mejor definición de una enfermedad compleja como el cáncer fue alimentada por el hallazgo de algunas características moleculares, celulares y bioquímicas presentes en células tumorales que pudieran quizá ser compartidas por otros tipos de tumores. Incluso cambió la visión de los factores genéticos como enteros causales del cáncer ahora se concibe al cáncer como un proceso de múltiples pasos que reflejan las alteraciones genéticas celulares y que conducen a las células normales hacia células tumorales. Estas células tumorales presentarían 6 características distintivas comunes en la mayoría de los más de 100 tipos de cáncer: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis⁵. De forma general estas seis características parecían englobar los diferentes tipos de células que conforman los tumores sin embargo no todos los tumores son capaces de generar metástasis, este hallazgo explicaba que la patogénesis de la metástasis dependía de la interacción de la célula tumoral (la semilla) y el microambiente específico del órgano blanco (el suelo)⁶.

1.3 Autosuficiencia en señales de crecimiento

Comúnmente en un contexto que podríamos llamar normal las células requieren de señales de crecimiento para que estas salgan de un estado inactivo (quiescente) y pasen a un estado activo o proliferativo. Por lo regular los cambios en estos estados están regulados por señales que son transmitidas de célula a célula a través de receptores de membrana. Entre estas señales podemos encontrar: factores de crecimiento difusibles, componentes de matriz extracelular, y moléculas de adhesión célula-célula. A la fecha sabemos que las células normales no comienzan a dividirse sin un motivo o señalización previa en ausencia de factores de crecimiento celular. Cabe mencionar que en cáncer muchas de las proteínas codificadas por oncogenes son capaces de ofrecer una gamma de diversos factores de

crecimiento que podrían simular el típico cambio de estado inactivo a activo de una célula normal durante la división celular. Algunos autores sostienen que todos los tipos de cáncer se originan a partir de una sola célula que cuenta con el potencial proliferativo indefinido algo que se podría definir como célula madre (*stem cell*) cuyos estrictos controles de división celular han sido vulnerados lo que posteriormente le vuelve capaz de generar una estirpe de células anormales que constituyan un tumor⁷. La autosuficiencia en señales de crecimiento puede ser endógena o exógena. Un claro ejemplo de esta característica del cáncer se puede apreciar en cáncer de pulmón y cáncer colorrectal cuyo comportamiento puede decirse en la mayoría de los casos no en todos suele demostrar la autosuficiencia de señales de crecimiento^{8,9}. La señalización exógena incluye la producción autocrina de amfiregulina y epiregulina, ambos ligandos del receptor de crecimiento epidermoide (EGFR), mientras que la señalización endógena sucede cuando surgen mutaciones activadoras del gen EGFR, por ejemplo.

1.4 Insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento

La talla de un organismo depende de la cantidad de células que este posee en su masa, la cual depende del total de células y de la masa de estas. Es preciso que existan mecanismos que regulen dicho número celular y lo mantengan en una especie de equilibrio (homeostasis) donde existe un balance entre la división y la muerte celular¹⁰. También es necesario que exista un control de la proliferación celular. Se puede observar que existen dos grupos de mecanismos reguladores de la proliferación celular, aquellos que la apagan permanentemente y aquellos que la detienen de forma transitoria hasta que esa señal inhibitoria es revertida por otra¹¹. Un mecanismo temporal es aquel donde la célula es forzada a ir al estado quiescente o de G0 a través de señales integradas por sus receptores celulares y el otro mecanismo suele ser cuando la célula ha llegado a un estado diferenciado que se le ha asignado para el cumplimiento de tareas altamente específicas de donde no podrá regresar a un estado menos diferenciado ni proliferativo. Uno de los ejemplos que subraya la importancia de la insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento en cáncer es el papel crítico que tiene el gen pRB. La recepción de las señales inhibitorias del crecimiento y su adecuada integración está basada en una compleja red de interacción de varias proteínas como pRB, p130 y p107 que interactúan con muchas proteínas como miembros de la familia E2 quienes principalmente participan en la transcripción de factores altamente involucrados en la síntesis de DNA¹². El gen pRB se comporta como un supresor tumoral cuya principal tarea es inhibir la función del factor transcripcional E2, mismo que es

esencial para la proliferación celular¹³. La naturaleza como supresor de tumores de pRB es innegable ya que la probabilidad de desarrollar osteosarcoma por un paciente con mutaciones en pRB incrementa cerca de 1000 veces comparado contra la población general¹⁴. Por otro lado, en cáncer de mama su inactivación se relaciona con la iniciación del tumor¹⁵. Otro de los genes que comúnmente se ven involucrados en la insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento es el gen p53 quien es considerado como el guardián del genoma, y se encuentra mutado en cerca del 50% de los casos¹⁶.

1.5 Resistencia o evasión de la muerte celular programada (apoptosis)

El balance entre la sobrevivencia y la muerte celular es un punto crítico en la homeostasis de un organismo. Existe un amplio número de mecanismos extracelulares e intracelulares que están involucrados en el mantenimiento de este balance. Cuando una célula es expuesta a daño inducido por agentes bioquímicos, físicos o biológicos nocivos, se activan genes de respuesta a stress. Si el daño es mínimo muy probablemente la célula logre recuperarse sin embargo si el daño es mayor está irá a apoptosis. La pérdida de regulación efectiva de los mecanismos que conducen a apoptosis es una condición que resulta en una enfermedad. La excesiva apoptosis está presente en isquemia cardiaca, infarto y enfermedades neurodegenerativas por mencionar algunas. Sin embargo, el caso opuesto es decir una deficiente apoptosis también es una condición patológica relacionada con padecimientos como infecciones autoinmunes, infecciones virales y muy frecuentemente a cáncer¹⁷. A la fecha se han descrito tres tipos de vías por los cuales puede llevarse a cabo la apoptosis, vía intrínseca (mitocondrial) y extrínseca. Ambas conducen a apoptosis. Sin embargo, hay un tercer mecanismo poco descrito conocido como apoptosis vía retículo endoplásmico. El mecanismo extrínseco comienza en el exterior de la célula, cuando las condiciones del medio ambiente determinan que una célula debe morir. Este mecanismo también involucra interacciones transmembranales de receptores, principalmente dos receptores proteicos llamados receptor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) y la proteína relacionada a Fas (CD95) así como sus respectivos ligandos llamados factor de necrosis tumoral (TNF) y ligando Fas (FasL)¹⁸.

La vía intrínseca involucra cambios en el funcionamiento de la mitocondria que suele ser producto de estrés celular o la influencia de agentes citotóxicos. En la vía intrínseca dos caspasas la caspasa 8 y la caspasa 9 son las que más participan en dicha interacción que resulta en el reclutamiento y subsecuente activación formando los complejos señalizadores

inductores de muerte celular y el apoptosoma Apaf-1, respectivamente, así como la subsecuente activación de efectores de caspasas -3, -6 y -7¹⁹.

1.6 Inmortalidad replicativa

La inmortalidad replicativa consiste en que las células tumorales poseen una marcada capacidad para seguirse dividiendo lo cual contrasta con el comportamiento de una célula normal. En la actualidad se ha aceptado que la gran mayoría de los tumores requieren una inmortalidad replicativa ilimitada para poder generar tumores macroscópicos. En la naturaleza de los organismos existen dos mecanismos que regulan la proliferación celular: La senescencia que es una pausa por lo regular irreversible en el ciclo celular, y que es un programa de respaldo para limitar la capacidad proliferativa de la célula que ha sido expuesta a señales de stress endógenas y exógenas. Algunos estudios han subrayado que existe una intensa forma de senescencia inducible que responde a una activación oncogénica para actuar como una barrera natural que interrumpe la tumorigénesis a un nivel premaligno²⁰. Después de la senescencia y el continuo y progresivo acortamiento de los telómeros inicia la crisis celular, un periodo de fusiones de extremos e inicios de los cromosomas y extensa muerte celular²¹. En muy pocas ocasiones, puede una célula o un grupo de células emerger de una población celular en crisis y exhibir un potencial replicativo ilimitado. Esta transición por lo regular es denominada inmortalización una habilidad que la mayoría de las líneas celulares establecidas poseen para proliferar en condiciones de cultivo sin presentar rasgo alguno de senescencia o crisis celular. Varias líneas de investigación han aportado evidencia que indica que la protección contra el acortamiento de los telómeros está relacionada con la proliferación ilimitada. Se ha estimado que existen vías alternas para el alargamiento de los telómeros, esto generaría un ambiente permisivo para la evolución clonal de la célula genómicamente inestable durante la progresión tumoral²². Los telómeros son estructuras compuestas de múltiples grupos de hexanucleótidos repetidos, que se van acortando progresivamente durante las divisiones celulares en células no inmortalizadas propagadas en cultivo, eventualmente estos pierden la capacidad de proteger los extremos de los cromosomas. La falta de protección de los extremos de los cromosomas promueve la formación de cromosomas di-céntricos que generan inestabilidad cromosómica y mutaciones cuyos resultados influyen en la biología de la célula sometida este tipo de *stress*. Se ha propuesto a la inmortalidad replicativa como una característica distintiva del cáncer considerando que en múltiples tipos de cáncer como colorrectal, pancreático, cáncer de páncreas, cáncer de cuello y cabeza.^{23,24,25}. En cáncer cervicouterino se ha observado un

incremento gradual y diferencias significativas a nivel de expresión de la proteína del gen de la telomerasa entre las lesiones premalignas en cuello uterino y los tumores ya establecidos²⁶.

1.7 Inducción de angiogénesis

Angiogénesis se define como la formación de vasos sanguíneos, esta función es una de las más importantes en los organismos ya que las funciones de las venas y vasos sanguíneos son de suma importancia en la homeostasis. Dos son las funciones más representativas de las venas: 1) conducen la sangre de los órganos corporales y tejidos de vuelta al corazón y 2) actúan como reservorio de grandes volúmenes de sangre ya que contienen cerca de dos terceras partes del volumen sanguíneo total²⁷. En embriogénesis el sistema cardiovascular es el primer órgano en desarrollarse y alcanzar un estado funcional, mismo que da soporte al desarrollo del embrión²⁸. Dadas las necesidades del embrión es crucial el desarrollo de una intrincada red vascular que se encarga de suministrar oxígeno y nutrientes a los altamente demandantes tejidos en desarrollo que constituyen al embrión. La angiogénesis es un proceso biológico que también puede suceder durante el estado adulto esto puede observarse en el ciclo reproductivo femenino (ovulación, menstruación, implantación y embarazo) donde es encendido de forma transitoria y finamente regulado²⁹. La regulación de la angiogénesis se puede dar ya sea por estimulación o inhibición de la misma en este sentido el factor crecimiento vasculoendotelial A (VEGF-A) y trombospondina-1 (TSP-1) participan como inductor e inhibidor de la angiogénesis respectivamente. La angiogénesis se encuentra ligada a diversos padecimientos no sólo por un exceso en la formación de nuevos vasos sanguíneos sino también por la falta de formación o reposición de los mismos³⁰. En cáncer la angiogénesis es un fenómeno que ha generado gran interés por que se cree que un tumor es capaz de generar células que viajan fuera del tumor primario y son capaces de formar un tumor secundario fenómeno conocido como metástasis, por lo que son importantes funciones de soporte tanto nutricional y oxigénico, así como la eficiente eliminación de los desechos producto del metabolismo celular, por un lado. La angiogénesis es de suma importancia para la sobrevivencia celular, así como la proliferación celular no solo por proveer de oxígeno a las células que componen el tumor en primera instancia sin embargo por también generar un mayor nivel de complejidad ya que ofrece diversos tipos de oxigenación heterogéneos que en combinación con la proliferación moldean el microambiente de un tumor.

1.8 Invasión y metástasis

El proceso conocido como metástasis se trata principalmente de la diseminación de células tumorales a través del cuerpo formando tumores secundarios en sitios distantes, esto requiere de la salida de las células tumorales del tumor primario, adquisición de capacidades migratorias e invasivas³¹. También son cambios en las propiedades físicas y químicas de la matriz extracelular y las células tumorales las que condicionan de fuerte manera la invasión en primer lugar del tejido local circundante. Las células tumorales rompen las interacciones célula-célula, remodelan los sitios de adhesión a la matriz celular, y producen proteasas. Cabe mencionar que este tipo de procesos de remodelación también se observan en procesos del desarrollo como gastrulación o migración de células a la cresta neural, donde células ya diferenciadas se desdiferencian, se mueven a sitios distantes y se rediferencian para formar una nueva estructura. Este fenómeno de espacio-tiempo se conoce como transición epitelio mesénquima (EMT) y es uno de los fenómenos de mayor interés cuando se trata de establecer las condiciones propicias para la migración de células tumorales, invasión y metástasis. Durante la EMT las células inmóviles, polarizadas, embebidas en interacciones célula-célula, disuelven sus interacciones célula-célula y se convierten en células individualizadas, es decir células mesenquimales móviles e invasivas. Las razones que anteceden a estos cambios en la fisiología celular y la arquitectura del tumor primario son aún un misterio sin embargo en recientes estudios en monocapa de células de cáncer de mama MDA-MB-468 sugiere que uno de los eventos primarios precursores de la EMT es la privación intracelular de calcio ya que al disminuir el calcio intracelular se evidenció una notable disminución de la producción de la proteína factor de crecimiento epidérmico (EGF) lo que generó hipoxia y la hipoxia parece haber detonado la EMT³². Otro de los eventos que comúnmente se asocian en la EMT son la pérdida de la función y expresión de E-Cadherina una proteína distintiva de la adhesión célula-célula, mientras que por el contrario en la EMT se da un incremento de la proteína N-Cadherina que está relacionada a la interacción célula-célula en células mesenquimales. Sin embargo, la EMT puede ser facilitada por otras señales intrínsecas como mutaciones génicas y señales extrínsecas como EGF. Entre los factores más reconocidos por fomentar la EMT se encuentran el factor transformante de crecimiento beta ($TGF\beta$)³³, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)³⁴, la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF)³⁵, factor de crecimiento insulinoide (IGF)³⁶ y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)³⁷.

1.9 Nuevas dimensiones en las características del cáncer

Las características del cáncer (*The Hallmarks of cancer*) es un concepto empleado como una herramienta simplificadora para resumir la vasta complejidad de fenotipos y genotipos en un grupo provisional de características principales. Se han enumerado al menos seis características distintivas del cáncer⁵:

- Autosuficiencia en señales de crecimiento.
- Insensibilidad a las señales inhibitoria del crecimiento.
- Resistencia o evasión de la muerte celular programada (apoptosis)
- Inmortalidad replicativa
- Inducción de angiogénesis
- Invasión y metástasis

A medida que avanza más la investigación en cáncer se adicionaron 2 características distintivas emergentes: Energética celular desregulada y evasión del sistema inmune, más dos características facilitadoras inestabilidad genómica y mutación e inflamación promotora tumoral.³⁸ Esta ampliación del concepto se basa en el hecho de que las 6 características se quedan cortas en la explicación del fenómeno del cáncer y su complejidad, que es precisamente explicar los mecanismos moleculares y celulares que permitieron la evolución de células preneoplásicas a desarrollar estas características fenotípicas aberrantes en el curso del desarrollo del tumor y la progresión del cáncer. La más reciente actualización del concepto de las características del cáncer propuesta por Douglas Hanahan es para incorporar dos características emergentes (Desbloqueo de la plasticidad fenotípica y Senescencia celular) y dos características facilitadoras (Reprogramación epigenética no mutacional y microbiomas polimórficos de tal forma que las características del cáncer quedan integradas como se muestra en la figura 1.

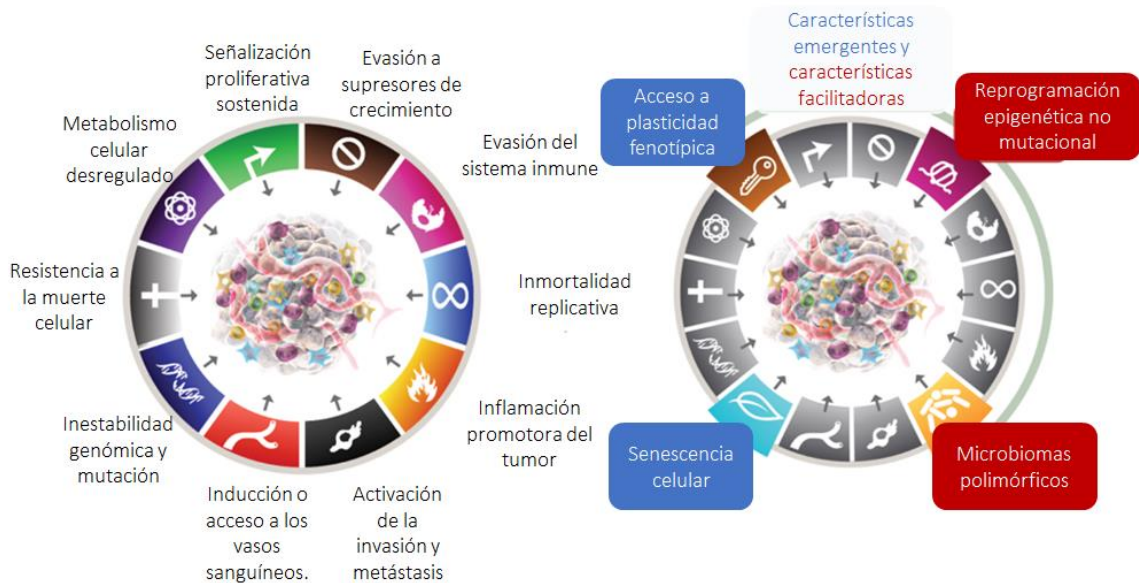


Figura 1. Adición de características emergentes y características facilitadoras al modelo de características del cáncer. Las características del cáncer (izquierda), engloban 8 capacidades y dos características facilitadoras. En el caso de la angiogénesis dado que se ha observado que los tumores pueden generar vasos sanguíneos por el encendido de vías de angiogénesis o por secuestro de vasos sanguíneos normales, esta característica se redefinió como inducción o acceso a vasos sanguíneos, esta característica también es conocida por inducir o facilitar la invasión y metástasis a través de vasos sanguíneos de soporte para el crecimiento tumoral. Posteriormente se añadieron inflamación promotora del tumor como una segunda característica facilitadora con inestabilidad genómica y mutación las cuales junto a las ocho características funcionales necesarias permiten el crecimiento y desarrollo natural. A la derecha se incorporan como características emergentes al acceso a la plasticidad fenotípica y senescencia celular, mientras que como características facilitadoras se propone a la reprogramación epigenética no mutacional y microbiomas polimórficos.

1.10 Cáncer cervicouterino

El CC es la cuarta causa de muerte en mujeres asociada a cáncer con cerca de 265000 muertes al año alrededor del mundo, gran parte de ellas cerca del 80% sucede en las regiones menos desarrolladas del mundo³⁹. Se ha probado que el virus del papiloma humano (HPV) tiene una importante participación en el inicio, promoción y desarrollo del CC⁴⁰. Si bien es cierto que los programas de salud han disminuido las muertes asociadas a al CC, la prognosis y la respuesta a tratamiento en algunas variantes de CC aún es pobre^{41,42}. El CC se encuentra principalmente dividido en dos grandes tipos: cáncer de cérvix escamoso (SCC) que representa cerca del 80% de los casos y el adenocarcinoma de cérvix (CAD) que suma el 20% de los casos restantes ⁴³. Aunque la gran mayoría de los casos de CC son de

tipo SCC, se ha observado una tendencia creciente de los casos de CAD comparada contra SCC especialmente en mujeres más jóvenes durante las últimas dos décadas⁴⁴, por otro lado, la evidencia epidemiológica apunta a que los métodos de diagnóstico son insuficientes para detectar una proporción significativa de lesiones precursoras de CAD⁴⁵.

En un estudio basado en una población de mujeres coreanas, se mostró que la prevalencia de HPV en muestras de CAD fue de aproximadamente 90%⁴⁶. La infección por HPV16 y/o HPV18 acumula 78% de los casos positivos mientras que en el 13% de los casos restantes se encontraron otros tipos de HPV⁴⁶.

Los factores de riesgo para el desarrollo de SCC se han descrito como: uso de anticonceptivos prolongado por más de 5, tabaquismo e infecciones por HPV de alto riesgo (HR). Una importante cantidad de evidencia ha señalado a las variantes de HPV HR como un factor detonante en el desarrollo de CC⁴⁷ principalmente en las variantes de SCC, sin embargo, es necesaria más información de las repercusiones de la infección por HPV en CAD a nivel genómico, transcriptómico y proteómico. El estudio de esta variante (CAD) puede arrojar información que ayude a determinar cuáles son los factores comunes entre SCC y CAD, así como cuales específicos para cada uno, además de potenciales blancos terapéuticos efectivos involucrados en el desarrollo de CAD.

1.11 Proteómica y cáncer

La comprensión de la compleja interacción de los componentes de un organismo ha sido un gran reto para la biología que tuvo un gran avance cuando en junio del año 2000 se concluyó la secuenciación completa del genoma humano, gracias al Consorcio de Secuenciación del Genoma Humano (HGSC por sus siglas en inglés). Se encontró que el genoma humano contiene 2.85 billones de nucleótidos interrumpidos por 341 espacios. La secuencia obtenida y descrita cubre el 99% del genoma y se le asocia una proporción de un error cada 100000 bases⁴⁸. Se llegó a la conclusión de que el genoma humano contenía más de 30000 genes únicos que potencialmente pueden dar origen a al menos 100000 diferentes proteínas⁴⁹. Considerando esto existe una gran necesidad por métodos biotecnológicos destinados a la caracterización de las posibles variantes proteicas que pudieran estar contenidas en un organismo. La proteómica no solo se encarga de estudiar las proteínas en un momento dado o condición dada en una célula sino también de aquellas isoformas y modificaciones, las interacciones entre ellas y la descripción de sus complejos proteicos. Además, conducir estudios con el paso del tiempo se ha vuelto más complejo y estos no sólo deben considerar

el enfoque genómico sino también el proteómico para con ello ofrecer resultados y conclusiones más detalladas y profundas. En la actualidad la proteómica es una parte complementaria en la difícil tarea de abordar fenómenos biológicos complejos como el cáncer por las siguientes razones:

- Hay una poca correlación entre la abundancia del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) y los niveles de la proteína correspondiente.
- Algunas moléculas de mRNA son no-codificantes y no generan proteínas como producto.
- Cierta tipo de transcritos de mRNA pasan por un corte alternativo: Un sólo gen puede dar origen a múltiples proteínas diferentes.
- Casi todas las proteínas eucariotas sufren modificaciones postraduccionales (PTM's). Estas modificaciones suelen tener un efecto crucial en la función de la proteína y esto no puede ser predicho basado en la secuencia génica.
- Las proteínas pueden ser degradadas y varían en su estabilidad.
- La función de la proteína no puede ser deducida considerando sólo la información contenida en la secuencia génica de la cual proviene.

Las razones anteriores y los problemas que suponen el abordaje de la biología del cáncer hacen de la proteómica una herramienta adecuada para la obtención de valiosa información, agrupamiento y procesamiento de los datos mediante herramientas bio-informáticas para darle sentido a la misma lo que permite comprender de mejor forma el fenómeno a estudiar.

1.12 Proteómica para la búsqueda de biomarcadores

Si bien es cierto los grandes avances en diversos campos como la Genómica, Transcriptómica y Proteómica han permitido llenar algunos espacios en el inicio y progresión de algunas patologías complejas como el cáncer⁵⁰. Es necesario el desarrollo e implementación de estrategias que permitan el diagnóstico temprano para con ello recibir un tratamiento adecuado y oportuno. Entre estas estrategias podemos encontrar el análisis proteómico de biopsias de CC. Algunos grupos de investigación han realizado estudios en biopsias de CC donde se compara el tejido tumoral contra el tejido no tumoral adyacente⁵¹. Sin embargo, una de las principales desventajas del empleo del tejido no tumoral adyacente (NTAT) es presencia de cambios morfológicos y fenotípicos entre los que se hallan alteraciones en los niveles de pH⁵², desbalance alélico, así como longitud telomérica⁵³, modificación de la arquitectura del estroma⁵⁴, así como aberraciones transcriptómicas y

epigenéticas⁵⁵. Se postula que el NTAT es más bien un tipo de estado transitorio e intermedio del tejido normal basado en que el tumor posee un enriquecimiento alto en señales proinflamatorias que difunden y permean hasta el NTAT resultando en repercusiones a diversos niveles en la biología del tejido endotelial circundante⁵⁶. Algunos otros trabajos comparan tejido normal, lesiones de alto grado (HSIL) y carcinoma invasivo sin embargo no establecen diferencias en las muestras incluidas a nivel de tipo histológico (SCC y CAD), así como por el tipo de papilomavirus presente en sus muestras⁵⁷. Una opción viable para la obtención de biopsias de tejido normal suele ser material obtenido de cirugías ginecológicas no relacionadas al cáncer⁵⁸. Este tipo de colecta de muestras donde se evalúa: perfil histopatológico de la muestra y verificación de la ausencia de infección por HPV permite poseer un buen control para establecer las diferencias entre los tejidos tumorales de CC contra el tejido normal lo que se traduzca en perfiles proteómicos globales de CC, así como específicos de SCC y CAD.

1.13 Naturaleza del adenocarcinoma cervicouterino

El adenocarcinoma cervicouterino (CAD) es el tipo de tumor más frecuente después del SCC. De acuerdo a las guías clínicas de manejo de la enfermedad, no existe diferencia en la estrategia de tratamiento entre SCC y CAD. Pese a la existencia de una importante cantidad de estudios que demuestran una peor prognosis para los pacientes con CAD comparada contra pacientes con SCC⁵⁹. Si bien es conocido y aceptado que la infección por HPV de alto riesgo tanto en SCC y CAD es un factor en común detonante en ambos tipos de CC, existen algunas diferencias sutiles, por ejemplo, en CAD el HPV18 suma de 50-58% de los casos, mientras que sólo de 15-18% de los casos de SCC⁶⁰⁻⁶².

En cuanto a los factores de riesgo, el desarrollo de CAD presenta una asociación más estrecha con factores de riesgo similares a los vistos en cáncer de endometrio como pueden ser nuliparidad⁶³ y obesidad⁶². Si se habla de prognosis las diferencias entre SCC y CAD son importantes considerando que los índices de metástasis hacia ovario presentes en CAD son más altas (cerca de 5.37%) contra las vistas en SCC (0.79%)^{64,65}. Otras diferencias que se pueden hallar es que es más probable que un CAD desarrolle nodos linfáticos en comparación con SCC, hecho ligado a una peor prognosis en pacientes de CAD comparados contra SCC ya que la presencia de nodos linfáticos es un factor de riesgo para desarrollo de metastasis⁶⁶. Los tratamientos y los resultados obtenidos en los pacientes siguen siendo aún un tema de debate considerando que los pacientes con CAD tienen una pobre respuesta y sobrevida cuando son tratados con radioterapia comparados contra pacientes con SCC⁶⁷.

1.14 ITRAQ como estrategia para el análisis de cambios en la expresión proteica

Las etiquetas isobáricas para la cuantificación absoluta y relativa (ITRAQ), combinadas con cromatografía líquida bidimensional (2D LC-MS/MS), es uno de los métodos más poderosos para cuantificar proteínas. El ITRAQ permite la cuantificación simultánea de hasta ocho muestras en una sola corrida. Este método se encarga de marcar las aminas primarias en los péptidos y puede permitir la marca de la mayoría de los péptidos, teóricamente. La habilidad de cuantificar varias muestras a la vez permite identificar y cuantificar los cambios proteicos específicos en los tejidos de CC (SCC y CAD) comparado entre ellos y los tejidos control sanos (CTRL). En consecuencia, el ITRAQ como herramienta proteómica es útil en la clasificación de las células y tejidos durante la enfermedad, así como comprender los diferentes estados biológicos y sus mecanismos⁶⁸.

1.15 Funciones de la familia de proteínas Reticulocalbina

Las Reticulocalbinas (RCNs) son un grupo de proteínas que pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio en la vía secretora del retículo endoplásmico. Esta familia basa parte de su funcionamiento en el calcio que tiene un papel fundamental en las células ya que participa como un segundo mensajero en la regulación de muchos procesos como la exocitosis, la transducción de señales, contracción, apoptosis y expresión de genes. La primera vez que estas proteínas se describieron fue en una línea celular de teratoma murino donde fueron después nombradas como reticulocalbinas⁶⁹. Las reticulocalbinas poseen dominios estructurales de mano EF que se localizan estrictamente en el retículo endoplásmico (ER).

Diversas pruebas inmunohistoquímicas han mostrado que la distribución de las RCNs es extensa y homogénea en tejido embrionario mientras que la distribución en tejido adulto es limitada y heterogénea⁷⁰. Pese a los múltiples estudios que se han realizado aún no se conoce del todo la función o funciones en las que pueden participar las RCNs sin embargo cabe resaltar que se hipotetiza que su función es crucial en el funcionamiento óptimo de las células, así como las funciones mínimas requeridas para la vida celular considerando que la delección homocigótica del gen de reticulocalbina es letal en ratones⁷¹.

La concentración de las RCNs se ha establecido de forma general como baja en condiciones normales esto tomando como referencia análisis inmunohistoquímicos realizados. En el caso contrario existen casos como en líneas celulares de cáncer de hígado donde las RCNs se encuentran sobreexpresadas, sugiriendo una cercana correlación de la sobreexpresión de

las RCNs con la tumorigenesis⁷². Por ejemplo, en cáncer de mama se ha reportado que las líneas celulares invasivas expresan RCNs mientras que las líneas celulares no invasivas no⁷³. Por ejemplo, ERC-55 una proteína de la familia de las RCNs que se localiza en retículo endoplásmico se asocia con la proteína E6 del HPV esto subraya la importancia de las RCNs en el proceso tumorigénico inducido por el HPV⁷⁴. Además, en el caso de RCN1 existe evidencia que menciona el papel de RCN1 en fomentar la resistencia a fármacos oncológicos como doxorubicina a través de la disminución de la ruptura de DNA asociada al fármaco principal mecanismo de acción de dicho compuesto⁷⁵. Otro hallazgo que suma información para elucidar la función de las RCNs es que la expresión de dichas proteínas está altamente regulada ya que su expresión en la mayoría de los órganos adultos es mínima o inexistente en condiciones normales, en caso contrario la expresión de las reticulocalbinas se ha visto elevada en tejido glandular cervicouterino bajo condiciones pro-inflamatorias⁷⁰.

1.16 Familia de proteínas Ras

La superfamilia de proteínas Ras es un grupo de aproximadamente 150 proteínas con un tamaño cercano a los 21 kDa generalmente, estas alternan un estado de encendido y apagado durante la transducción de señales⁷⁶. Las funciones de la familia Ras inciden en casi todos los procesos celulares (Figura 2). Estos apagadores proteicos son regulados de forma fina por lo que con regularidad múltiples enfermedades están relacionadas con un mal funcionamiento de las mismas y se les denomina Raso-patías⁷⁷. La principal causa de este grupo de enfermedades suele principalmente estar ligado a mutaciones que vuelven a los genes Ras y sus reguladores proteínas hiperactivas. Existen dos grandes causas para la hiperactividad de las proteínas Ras, la primera y más común es aquella relacionada con un cambio conformacional provocado por la sustitución de una glicina en el codón 12 por cualquier aminoácido diferente (excepto prolina) que impide el acceso de un dominio dedo de arginina que es el principal catalizador de la hidrólisis del GTP (Guanosin Trifosfato) dentro de la estructura de la proteína Ras, por lo que de esta forma al tener impedido el acceso al sitio catalítico y unida a guanosin trifosfato (GTP) la proteína Ras permanece activa⁷⁸. La segunda causa de la hiperactividad de las proteínas Ras es la rápida disociación del complejo Ras-guanosin difosfato (GDP) provocada por una mutación en la Alanina del sitio 146 de la proteína Ras, este mal funcionamiento causa la acumulación indirecta de complejos Ras-GTP lo que mantiene el circuito de señalización activo⁷⁹. El delicado equilibrio en la función de las proteínas Ras no solo puede ser afectado por mutaciones, sino que también se ha visto que eventos como infecciones virales pueden causar desperfectos en

este equilibrio⁸⁰. Es sabido que la infección por virus en células conduce en primera instancia a la producción de grandes cantidades de RNA de doble cadena (ds RNA), típicamente esto genera una respuesta defensiva por parte de la célula blanco para activar la fosforilación del factor de iniciación EIF-2 por parte de la proteína cinasa de respuesta a ds RNA (PKR), con lo que de esta forma se inhibe el inicio de la replicación viral⁸¹. En algunos casos la evidencia que señala que algunos virus como poliovirus y adenovirus, poseen genes que codifican para proteínas virales que previenen la fosforilación EIF-2 a través de PKR con lo que se favorece y promueve la sobrevivencia y propagación de los virus. Sin embargo, se ha descrito que existe un mecanismo alternativo para lograr la replicación viral de las células blanco y este se basa principalmente en afectar la vía de señalización de las proteínas Ras con lo que las células que bajo condiciones normales son resistentes a las infecciones virales ahora transformadas por Ras se vuelve susceptibles y no solo eso, sino que también este proceso va acompañado con la desfosforilación de PKR así como la reversión del inicio de la traducción⁸². Se cree que algunos componentes de la vía de señalización de Ras pudieran intervenir con el funcionamiento normal de protección contra las infecciones virales⁸³. Se estima que cerca del 30% de todos los tipos de cáncer en humanos albergan mutaciones activadoras de Ras, esto se basa en la fuerte conexión que existe en las vías de señalización y la proliferación celular⁸⁴. En cuanto a cáncer cervicouterino se refiere donde el HPV es el principal agente involucrado en la promoción de la carcinogénesis se ha encontrado que los niveles de H, K y N-Ras se encuentran más elevados en muestras de pacientes con cáncer cervicouterino positivo a HPV16 y HPV18 que en muestras de pacientes de cáncer cervicouterino negativos a estos virus, lo cual podría ser un indicativo de los mecanismos de transformación celular del HPV a través de las proteínas Ras⁸⁵.

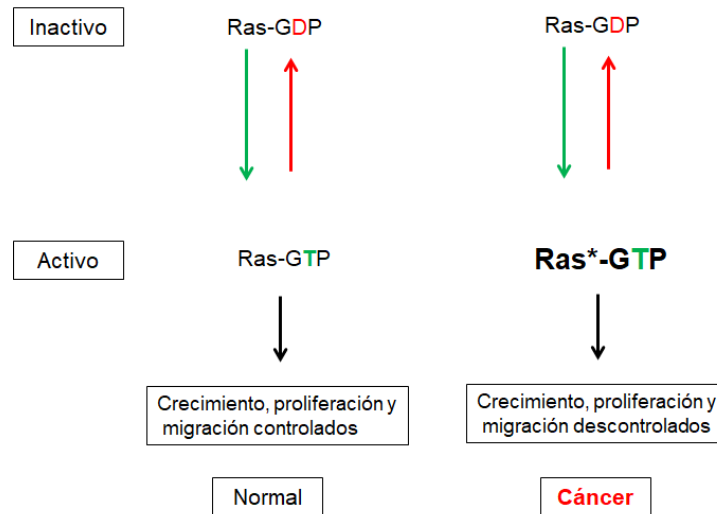


Figura 2. Las proteínas Ras son importantes para el desarrollo normal. Las proteínas Ras activas inducen el crecimiento, proliferación y migración celular. En células normales Ras recibe señales y las procesa para rápidamente alternar entre los estados activo (GTP) e inactivo (GDP). Ras mutado se queda en un estado activo, ignora las señales e incluso conduce a las células a convertirse en células tumorales.

Tomada del Instituto Nacional del Cáncer (*National Cancer Institute*), iniciativa de Ras por Jim Hartley.

1.17 Los tipos de cáncer cervicouterino y su pronóstico

El cáncer cervicouterino es la cuarta causa de muerte asociada a cáncer en mujeres a nivel mundial¹. Si bien la incidencia y mortalidad asociada a cáncer cervicouterino ha disminuido por la implementación del análisis citológico existen ciertos tipos como adenocarcinoma cervicouterino que representan dificultades en el diagnóstico oportuno. Es preciso mencionar que varios estudios de cervicouterino han aportado información relacionada al desarrollo de la patología, sin embargo, esta ha sido en su mayoría para el cáncer cervicouterino escamoso el subtipo más frecuente, dejando de lado al adenocarcinoma uterino que representa el 20% de los casos totales de cáncer cervicouterino y en cuyo caso los pacientes experimentan una peor pronóstico comparada contra el cáncer cervicouterino escamoso.

Es por ello que realizamos nuestro estudio considerando tres importantes características: Tipo de infección por HPV (HPV16, HPV18, HPV31), grado de diferenciación del tumor (pobrementemente diferenciado y moderadamente diferenciado) y subtipo de cáncer cervicouterino (escamoso y adenocarcinoma). La información obtenida servirá para establecer los patrones globales de expresión proteica tanto del cáncer cervicouterino, así como los específicos de cáncer cervicouterino escamoso y adenocarcinoma cervicouterino que contribuyan al diagnóstico oportuno, correcto tratamiento y mejor pronóstico de los pacientes con adenocarcinoma, así como cáncer cervicouterino.

II. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Los patrones de expresión proteica de los subtipos de cáncer cervicouterino, cáncer cervicouterino escamoso y adenocarcinoma cervicouterino pueden poseer patrones de expresión proteica comunes y específicos en el desarrollo y progresión del cáncer cervicouterino.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Identificar y cuantificar las diferencias a nivel proteico en los subtipos de CC (SCC y CAD) para establecer proteínas comunes, así como específicas de cada uno, que permitan establecer relaciones en el comportamiento biológico de los mismos.

3.2 Objetivos particulares

1. Tipificar y categorizar las muestras de los diversos tipos de CC por:
 - Tipo de infección por papilomavirus (HPV) (HPV16, HPV18 y HPV31),
 - Clasificación histopatológica (SCC y CAD),
 - Grado de diferenciación del tumor (poco o moderadamente diferenciado).
2. Determinar los patrones de expresión proteica de cada uno de los 5 grupos de análisis de cáncer cervicouterino (SqPD16, SqMD16, AdMD16, SqM18 y SqM31) y un grupo control.
3. Integrar los patrones de expresión proteica para encontrar las proteínas comunes y específicas entre cáncer cervicouterino escamoso y adenocarcinoma cervicouterino.
4. Mapear las vías de señalización presentes en cáncer cervicouterino escamoso y adenocarcinoma cervicouterino mediante análisis de enriquecimiento de grupos de genes.
5. Establecer los efectos en crecimiento tumoral de RCN3 y RAB14 por separado en un modelo murino atímico (nu/nu).

IV. METODOLOGÍA

4.1 Colecta de muestras

Se tomaron 15 muestras de CC y 3 muestras de tejido sano cervicouterino (CTRL) de un banco de tejido con aprobación del consejo de ética del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en Ciudad de México. Dichas muestras se obtuvieron de tumores extraídos de pacientes que asistían a cirugía bajo consentimiento informado. Se tomó expediente clínico y registro de dichas muestras que presentaban un promedio de edad de 45.5 años y una desviación estándar (SD) de 12.43 años. Después de la colecta de los tejidos estos se almacenaron a -80°C hasta su uso; una pieza representativa equivalente al 10% del tumor obtenido se conservó en 10% formol para posteriormente embeberla en parafina y realizarle estudios histopatológicos. Los datos clínicos y patológicos se guardaron en un archivo clínico. Estos incluían grado del tumor, clasificación histopatológica, tipo de HPV y edad del paciente.

4.2 Detección y tipificación de papilomavirus (HPV)

La detección del HPV se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El aislamiento del DNA se hizo usando el kit de purificación Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega, A1120). La concentración de DNA se midió con el espectrofotómetro NanoDrop 2000/c (Thermo Fisher Scientific) y se corroboró por absorbancia en gel de agarosa. 100 µg de DNA genómico total de las muestras de tumores fue empleado como molde para la tipificación del HPV.

Para la tipificación viral de las muestras de cáncer cervicouterino se emplearon dos grupos de cebadores MY09-MY11 (MY09 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3') (MY11 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') dirigidos a la región del gen de la proteína L1 de la cápside de HPV que generan un producto de PCR (pPCR) de 450 pares de bases (pb)⁸⁶. Para el caso del segundo grupo llamado GP5+GP6+ (GP5+ 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') (GP6+ 3'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG-5') dirigido también a L1 que da como resultado un pPCR de 150 pb⁸⁷. Una vez concluida la PCR se tomaron 10 µl de los 20 µl totales de volumen del pPCR y se verificó el tamaño del producto por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (BrEt) (0.5 µg/ml)⁸⁸.

Un tercer grupo de cebadores específicos para la detección del gen de la proteína E6 de HPV16 FA046 (TTG AAC CGA AAC CGG TTA GT) y R590 (TCA TGC AAT GTA GGT GTA TCT CC) que generan un pPCR de ~544 pb. Y un cuarto grupo de cebadores dirigido a la región grande de control (LCR) del HPV18 con un pPCR de 618-bp F7405 (CTG CAC ACC

TTA CAG CAT C) R165 (GTT CCG TGC ACA GAT CAG) que generan un pPCR de 618 pb se emplearon para la detección de los dos tipos virales de alto riesgo más prevalentes HPV16 y HPV18, cabe mencionar que las biopsias negativas a este par de cebadores (HPV16 y HPV18) se sometieron al sistema GP5+GP6+ y su pPCR resultante se purificó y secuenció para posteriormente identificarlo, resultando secuencias génicas correspondientes a HPV31.

La especificidad de los cebadores empleados en la detección del HPV16 y HPV18 por PCR se verificó primero mediante electroforesis en gel de agarosa visualizando el tamaño del producto de PCR con SnapGene Viewer, posteriormente se purificó dicho producto empleando el kit GeneJET purification kit (Thermo Fisher Scientific, K0701) de acuerdo a las indicaciones reportadas por el fabricante posteriormente se secuenció por electroforesis capilar.

La secuencia de DNA obtenida mediante la secuenciación se analizó con la herramienta de Alineamiento Local Básico de Secuencias (BLAST) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Se empleó el gen de la β -globina (540 bp) como control interno de la PCR. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas de una muestra de paciente de CC positiva a HPV16 y la línea celular SiHa positiva a HPV16 con la finalidad de corroborar la secuencia del gen amplificado.

En cuanto a los productos de PCR de LCR HPV18, de las secuencias de la línea celular HeLa y de un paciente de cáncer cervicouterino positivo a HPV18, también se les realizó el alineamiento de secuencia tomando como referencia la secuencia del gen Región Grande de Control (LCR) depositada en NCBI, comprobando que efectivamente el par de cebadores de LCR HPV18 amplificaban la región deseada para la tipificación del HPV18.

Las muestras de tejido cervicouterino control (CTRL) se revisaron contra los cuatro sistemas de detección por PCR descritos (MY09-MY11, GP5+GP6+, E6HPV16(F4046-R590) y LCRHPV18(F7405-R165). Donde se corroboró la ausencia de pPCR con los tres sistemas de cebadores antes mencionados para la detección de HPV.

La tipificación histopatológica de cada muestra fue realizada mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H & E) de los cortes histológicos de las biopsias de CC y confirmada por dos diferentes patólogos de acuerdo al sistema de clasificación Bethesda (TBS) para la emisión del diagnóstico en citología cérvico-vaginal⁸⁹.

4.3 Tratamiento de la biopsia para la extracción proteica

Se obtuvo un fragmento especular de la sección histológica de la biopsia de CC, se lavó tres veces con 1 mL de buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4 a 4°C suplementado con inhibidores de proteasas. Las muestras fueron finamente homogenizadas usando un mortero manual. Cada muestra se disolvió en dos volúmenes de buffer de lisis 2 molar (M) de cloruro de guanidio (GdmCl) e inhibidores de proteasas a 4 °C. Después de sonicar 10 segundos las muestras fueron centrifugadas a 14000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante para posteriormente cuantificar la concentración proteica mediante método de Bradford⁹⁰.

4.4 Digestión proteica y marcaje de péptidos.

La digestión proteica y el marcaje con ITRAQ se realizó de la siguiente manera: Seis grupos de 100 µg de proteína de tres diferentes tumores cada uno fue precipitado con nueve volúmenes de etanol frío toda una noche a -20°C. El precipitado (pellet) de proteína fue lavado tres veces usando etanol al 90%. Las proteínas extraídas fueron solubilizadas en buffer 0.5% dodecyl sulfato de sodio (SDS), 0.1 M de bicarbonato de trietil amonio (TEAB), pH 8.0. Para la digestión proteica se agregó tripsina en una proporción de 1:50 (enzima-sustrato), y la muestra fue incubada durante 16 horas a 37°C. El SDS fue removido por extracción de etil acetato bajo condiciones acidas (1 volumen de etil acetato fue adicionado a la muestra y se acidificó con 0.5% de ácido tricloroacético (TFA). Después de dar vórtex y centrifugar, la fase orgánica fue descartada, posteriormente se realizó un lavado más de etil acetato. Finalmente, la mezcla de péptidos fue desalada usando cromatografía de fase reversa (RP LC), secada y almacenada a -70°C hasta el marcaje con ITRAQ. Los experimentos de ITRAQ se realizaron en seis grupos de tres muestras cada uno. Un grupo de muestras sanas de cérvix útero se usó como grupo de referencia control (CTRL) para comparar las muestras de CC. Las muestras se disolvieron en 40 µl de TEAB pH 8.5 y se marcaron con el reactivo de ITRAQ de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems) de la siguiente forma: carcinoma escamoso pobremente diferenciado HPV16+ (SqPD16) etiqueta 114, carcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV16+ etiqueta 115(SqMD16), adenocarcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV16+ (AdMD16) etiqueta 116, carcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV18+ (SqMD18) etiqueta 117, carcinoma escamoso moderadamente diferenciado HPV31+ (SqMD31) etiqueta 118 tejido sano cervicouterino empleado como control (CTRL) etiqueta 121. Los péptidos de cada muestra marcados fueron desalados empleando los cartuchos de

C14 Sep-Pak C18 Vac cartridges (Waters) posteriormente se mezclaron y se secaron al vacío. El flujo de trabajo se describe en la Figura 3. Con la finalidad de incrementar la confiabilidad y cobertura del estudio, se realizó un paso de prefraccionamiento de péptidos, basado en cromatografía de fase reversa a pH básico, antes de analizarla por LC-MS/MS.

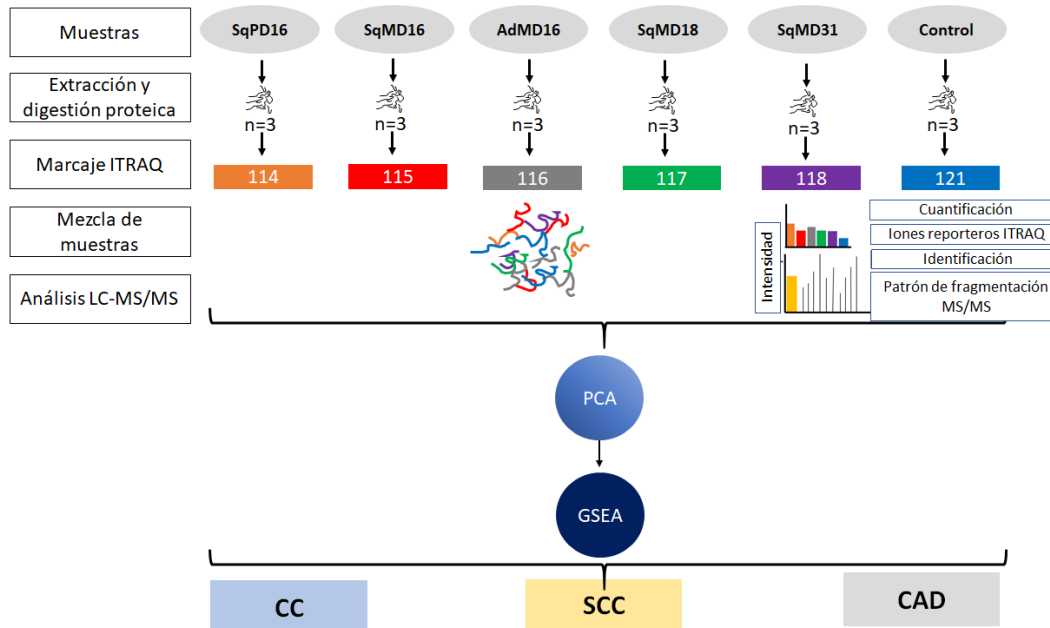


Figura 3. Diseño experimental y el marcaje con ITRAQ. Se muestra la preparación de las muestras para análisis por LC MS/MS. Se usó proteómica para el descubrimiento potencial de proteínas desreguladas en CC. Las muestras se dividieron en cinco grupos (SqPD16, SqMD16, AdMD16, SqMPD18 y SqMD31) y un grupo control (CTRL), todos los grupos se conformaron de 100 µg cada uno incluyendo la misma cantidad de proteína de cada uno de los tres tejidos incluidos por grupo de análisis. La estrategia de análisis fue la identificación y cuantificación de los extractos proteicos marcados con ITRAQ (MASCOT (v2.2.07) /Swiss-Prot), el agrupamiento de los datos por similitud y tendencia por análisis de componentes principales (PCA) y el hallazgo de grupos de genes enriquecidos (GSEA) comunes.

4.5 Prefraccionamiento de péptidos

Las mezclas de péptidos fueron sometidas a cromatografía de fase reversa a pH básico en una columna de fase reversa (RP) (4.9 X 150 mm) (Waters) a través de un cromatógrafo Waters 1525 con bomba de HPLC binaria, acoplada a un detector Waters 996, calibrado a 210 nanómetros (nm).

El sistema de buffers empleado está compuesto de solución A (Formiato de amonio 50 mM en agua a pH 10) y buffer B (formiato de amonio 50 mM en acetonitrilo/agua (60/40) a pH 10). Las muestras fueron cargadas en una columna a un flujo de 0.5 ml/min en buffer A y desaladas durante 20 minutos. El gradiente de elución fue, de 0-40 %de buffer B en 80 minutos, de 40% a 100% en 13 minutos, se mantuvo en buffer B durante 5 minutos extra, de 100% a 0% durante un minuto y se conservó al 100% durante un minuto extra. Las 30

fracciones obtenidas fueron colectadas cada minuto. Cada fracción fue desalada y secada por centrifugación al vacío en un concentrador Thermo Savant Speed Vac Concentrator DNA120-115, posteriormente almacenada a -80°C hasta su análisis por LC-MS/MS.

La determinación del ion precursor se realizó usando un escaneo magnificado en el espectrómetro de masas en el rango de 400-1400 m/z a 4000 amu/s (sin obtención de datos en Q0 y tiempo de llenado dinámico) con un voltaje de ionización de 2600 V aplicado a un picotip FS360-75-15-N con ionización por electrospray (gas nitrógeno). Los iones precursores colisionaron en Q2 empleando una energía rodante de colisión (máxima permitida CE=80). La producción incrementada de escaneos (MS/MS) se realizó en un rango de masa de 100-1700 m/z a 4000 amu/s, y el voltaje de colisión fue determinado dinámicamente. Todas las proporciones masa/carga de ion precursor fueron confirmados con un escaneo de alta resolución.

4.6 Identificación de proteínas, análisis de componentes principales (PCA) y Super Exact Test (SET)

La identificación de proteínas y su cuantificación se llevó a cabo usando el motor de búsqueda MASCOT (v2.2.07) contra la base de datos Swiss-Prot, estableciendo como método de digestión tripsina y la carbamidometil cisteína como modificación fija. Se identificó a las proteínas con una tasa de descubrimiento falso del 1%(FDR) y un *target-decoy* <1%.

La base de datos empleada para la identificación de proteínas fue el proteoma humano de referencia UP000005640 del repositorio UniProt. El criterio establecido para la cuantificación de las proteínas fue de al menos dos péptidos identificados por espectrometría de masas (MS/MS). Estos parámetros resultaron en la identificación de 622 proteínas presentes en al menos una réplica experimental.

Se obtuvieron espectros normalizados de cada grupo de análisis de CC (SqPD16, SqMD16, AdM16, SqMD18, SqMD31, y control) para ser analizados, y la masa de cada espectro se alineó empleando el motor de búsqueda MASCOT (v2.2.07). Posteriormente la intensidad de la masa de los picos localizados en el rango de masa fue seleccionada y exportada en formato de valores separados por comas (CSV). Los datos de abundancia proteica fueron normalizados en cada uno de los grupos de análisis y se empleó el método de *Random Forest* (miss Forest v.4; R package v2.35) para imputar los valores faltantes. Se empleó análisis de componentes principales en la matriz de correlación de la intensidad proteica (Facto MineR v2.3; R package v3.5), la cual dio como resultado el patrón de abundancia

proteica para cada grupo de análisis de cáncer cervicouterino. Para establecer si cualquier componente puede discriminar entre los grupos de análisis de CC, se graficaron los valores para cada componente. Una vez que se encontró cada componente, las proteínas que tuvieron potencial discriminatorio se identificaron empleando el coseno al cuadrado de la matriz de correlación entre los componentes y las proteínas.

Para evaluar el desempeño del PCA en los datos de LC-MS/MS se realizaron una prueba de t (nivel significancia de 0.05) y un análisis de orden de cambio para comparar los porcentajes de abundancia proteica entre los grupos de análisis de CC. El primer componente principal explicó la mayor parte de la variación en los datos como le fue posible, y de la misma forma sucede para cada componente subsecuente explicando tanta variación como le sea posible. En este caso los dos primeros componentes se consideraron para la clasificación de los datos obtenidos por LC-MS/MS. El análisis de componentes principales es un método estadístico que se encarga de simplificar los datos con una alta complejidad y los agrupa por tendencias y patrones⁹¹. Con la finalidad de determinar las relaciones entre los grupos de análisis en CC, se realizó un análisis de Super Exact Test (SET). El SET provee el marco teórico para computar las distribuciones estadísticas de las intersecciones multigrupales basado en la teoría combinatoria y un método de calcular con precisión la probabilidad de intersección entre ellas⁹².

4.7 Análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA)

Se realizaron dos replicas experimentales que generaron una lista de genes posteriormente estudiada por análisis de componentes principales con la finalidad de encontrar similitudes entre los grupos de análisis de CC SqPD16, SqMD16, AdMD16, SqMD18, SqMD31 y CTRL, así como diferencias. Los datos obtenidos por PCA se ingresaron al análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA v. 2.0, Broad Institute, Cambridge, MA, USA)⁹³. Los grupos de genes se obtuvieron con la base de datos de vías de Kioto (KEGG; www.genome.jp/kegg). Un numero de grupo de genes se encontró diferencialmente enriquecido ($P < 0.1$ and $FDR < 0.25$) en cada grupo de análisis de CC comparado contra el grupo control de tejido sano cervicouterino (CTRL).

4.8 Análisis de enriquecimiento de vías por ShinyGO 0.77 y Hallmark MSigDB

La lista de proteínas (622 proteínas) en dos replicas experimentales fue analizada empleando ShinyGO 0.77, para obtener vías de señalización enriquecidas⁹⁴. Para ello se comparó con la base de datos de firmas moleculares (Hallmark MSigDB) una base de datos

que incluye estados metabólicos y cáncer con más de 10000 grupos de genes⁹⁵. Esta base posee herramientas que disminuyen la redundancia de entre los grupos de genes buscando grupos en común que converjan en un estado o proceso biológico (grupo clave) y desplieguen una expresión acorde al proceso. Las características (Hallmarks) suman la información más relevante de los grupos clave con lo que se generan entradas más precisas para el análisis de enriquecimiento de genes.

4.9 Análisis Inmunohistoquímico

Se tomó un área especular de la muestra de cada muestra de tumor incluida en nuestro estudio. Se colocó en solución formaldehído 100%. El tejido fijado fue deshidratado a través de diversos grados de alcohol hasta embeberlo en parafina. La muestra embebida se cortó en secciones de 6 µm de grosor y se montó en portaobjetos Super Frost (VWR [Thermo Fisher Scientific]). Se eliminó la parafina de los tejidos embebidos con xileno y posteriormente con alcohol 100%. Para bloquear la actividad endógena de peroxidasa, se incubó las laminillas a temperatura ambiente (RT) en 3% peróxido (H₂O₂) en metanol (CH₃OH) por 30 minutos. Las laminillas se rehidrataron posteriormente en diversos pases por alcohol. Las secciones de tejido fueron lavadas con buffer de fosfatos (PBS) y posteriormente teñidas con el sistema médico ventana (Roche Laboratories, AZ, USA); las secciones de tejido fueron teñidas con anticuerpo como lo marca el instructivo del fabricante en cada caso.

Los anticuerpos empleados en este trabajo son los siguientes: RAB14 1:200 (Abcam [Cambridge, U.K.], ab28639), RCN3 1:200 (Novus Biologicals [CO, USA] NBP2-13213) y p16 (CINtec p16 Histology Roche, catalog number 725-4713) se usó como control positivo de CC para los tejidos tumorales. La tinción, así como el área positiva y su intensidad se evaluó usando la extensión IHC profiler del software ImageJ.

4.10 Producción de plásmido y lentivirus

Se realizó la sobreexpresión de la proteína RAB14 y RCN3 a través de vectores de expresión. Partículas virales conteniendo la secuencia del gen RAB14 fueron producidas mediante una co-transfección empleando los plásmidos: psPax2 (Addgene no. 12260), pMD2G (Addgene no. 12259), pL-SIN-EF1α-EGFP con proteína verde fluorescente (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) (Addgene No. 21320) y RAB14 tipo silvestre (*wild type* WT) (A gift from Curt Civin Addgene plasmid # 61493).

La producción de partículas virales se realizó en células HEK 293T empleando lipofectamina 3000 (Invitrogen, L30000015) de acuerdo a las instrucciones del producto. Las partículas virales producidas en cultivo se cosecharon a las 48 horas post-transfección y se clarificaron con un filtro con baja afinidad proteica con tamaño de poro de 0.45 μm y se conservaron a -70°C hasta su uso.

El plásmido PCDA 3.1 con proteína rojo fluorescente (*Red Fluorescent Protein*, RFP) (Addgen no. 13032) con la secuencia génica de reticulocalbina 3 (RCN3) se generó mediante fosfatasa alcalina (SAP) (ThermoFisher 783901000UN) para prevenir la recirculación del plásmido y posteriormente clonarlo empleando ligasa de DNA T4 (Invitrogen, EL0011). El plásmido pCDNA3.1 RFP-RCN3 se transfectó en la cepa DH5 α -*E. coli* y se seleccionó por resistencia al antibiótico carbencilina, se creció en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se verificó la inserción del gen RCN3 usando PCR. La purificación del plásmido pCDNA 3.1 se realizó usando el kit de purificación de DNA genómica (ThermoFisher, K0512), el plásmido purificado pCDNA3.1 RFP-RCN3 se almacenó a -70°C hasta que se realizó la transfección.

4.11 Transfección de la línea celular HeLa

Se realizó la construcción empleando el plásmido PCDA 3.1 con proteína roja fluorescente (RFP) (5446 pb) donde se clonó el gen de la proteína RCN3 (1018 pb) a partir de cDNA de la línea HPV18+ CaLo. Las células receptoras de la línea celular HeLa se crecieron hasta alcanzar el 80% de confluencia usando RPMI 1640 al 5% de suero fetal bovino (FBS), la transfección se realizó usando lipofectamina 3000 (Invitrogen, L30000015) en una placa de cultivo p60 y adicionalmente se transfectó con el vector vacío pCDNA (Mock). Después de 48 horas post infección/transfección, las células se cosecharon y lavaron en buffer de fosfatos (PBS) pH 7.5 y se inocularon (1.5 millones) en un ratón hembra inmunodeficiente BALB/c nu/nu.

4.12 Modelo xenógrafo de ratón para el estudio de RAB14 y RCN3

Se emplearon ratones hembra atímicas (BALB/c nu/nu) de 4-6 semanas de edad en este trabajo. El comité de bioética de UNAM e INCan aprobó el protocolo usado para el manejo de animales en este estudio. Para el desarrollo de tumores xenógrafos en ratones se emplearon 2×10^6 células HeLa con RAB14 o RCN3 y se inyectaron subcutáneamente (2×10^6 células) en los flancos de los ratones y se hizo seguimiento de la formación de tumores diariamente y se midieron cada semana por triplicado. El plásmido RAB14 WT fue un regalo

de Curt Civin (Addgene plasmid # 61493). Los animales control se inyectaron con células HeLa en medio libre de suero.

El volumen tumoral se midió usando la formula Attia-Weiss por triplicado: $a \times b^2 \times 0.4$, donde a = longitud y b =grosor. Después de 8 semanas, los ratones se sacrificaron y los tumores subcutáneos fueron removidos, fotografiados, fijados en 4% formaldehido y embebidos en parafina. Una pieza de los tumores inducidos por células HeLa que expresan RAB14 ó RCN3 fue tomada para medir el nivel de expresión proteica usando el tumor formado por células HeLa WT como control.

V.RESULTADOS

5.1 Proteómica

Se analizaron en total 18 muestras de biopsias de cáncer cervicouterino en 6 grupos compuestos de tres muestras individuales cada uno. Se procesó un total de 622 proteínas identificadas y cuantificadas (MASCOT (v2.2.07) / Swiss-Prot) mediante análisis de componentes principales (PCA). De acuerdo a los resultados de PCA, los valores de los componentes fueron graficados en la Dimensión 1 (Dim 1, eje X) y Dimensión 2 (Dim 2, eje Y).

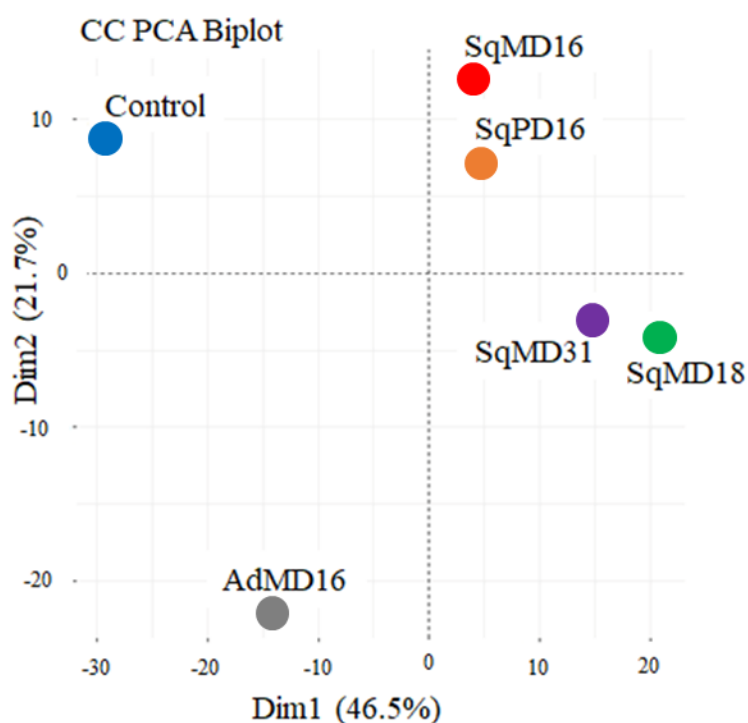


Figura 4. Diagrama de los grupos de análisis (Biplot). Se muestra un diagrama basado en el agrupamiento de tendencias presentes en los perfiles proteicos. Valores similares de grupos de análisis de cáncer cervicouterino (CC) tendrán una tendencia a formar agrupaciones mientras que aquellas con más diferencias tenderán a un distanciamiento mayor entre ellas. Los resultados obtenidos demuestran que el grupo de cáncer cervicouterino escamoso (SqMD31, SqMD18, SqMD16 y SqPD16) se constituye de dos subgrupos SqMD16/SqPD16 y SqMD31/SqMD18. El grupo de adenocarcinoma (AdMD16) se localiza a una distancia mayor del resto de los grupos de cáncer cervicouterino. El grupo control se localiza cerca del 10 sobre el eje de la dimensión 2 (Dim2) lejos de los grupos de CC, completamente alejado de los grupos de cáncer cervicouterino evidenciando una clara diferencia de los demás grupos de análisis.

Las proyecciones generadas por el PCA indicaron la separación del grupo control de los otros grupos de cáncer cervicouterino HPV+ (SqPD16, SqMD16, AdMD16, SqMD18 y SqMD31). Mientras que SqMD16 y SqPD16 mostraron una mayor cercanía, así como SqMD31 y SqMD18 por lo que se sugiere la presencia de proteínas en común. Además, la mayor

similitud entre los grupos de análisis en cáncer cervicouterino se observó en las muestras de los grupos SqMD16 y SqPD16, apuntando a que la contribución por HPV16 fue similar en tejidos moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Finalmente, observamos una diferencia pronunciada entre los perfiles de expresión proteica entre cáncer cervicouterino escamoso (SqPD16, SqMD16, SqMD31 y SqMD18) y adenocarcinoma (AdMD16), lo cual resalta las diferencias a nivel proteómico entre SCC y CAD. Las proteínas obtenidas de la identificación y la cuantificación (MASCOT (v2.2.07)) fueron también clasificadas de acuerdo a ontología de genes (GO por sus siglas en inglés de *Gene Ontology*) por proceso biológico (BP por sus siglas en inglés de *Biological Process*). El análisis de GO mostró que cerca del 25% de las proteínas identificadas y cuantificadas pertenecen a la vía de exocitosis (Exocitosis y exocitosis regulada). Las proteínas de unión fue la categoría más predominante en la clasificación de proteínas por función molecular (MF) en CC. En cuanto a las proteínas identificadas en cáncer cervicouterino clasificadas por componente celular, más de la mitad de las proteínas identificadas están relacionadas a vesículas y componentes del espacio extracelular como se muestra en la Figura 5.

Clasificación por ontología de genes

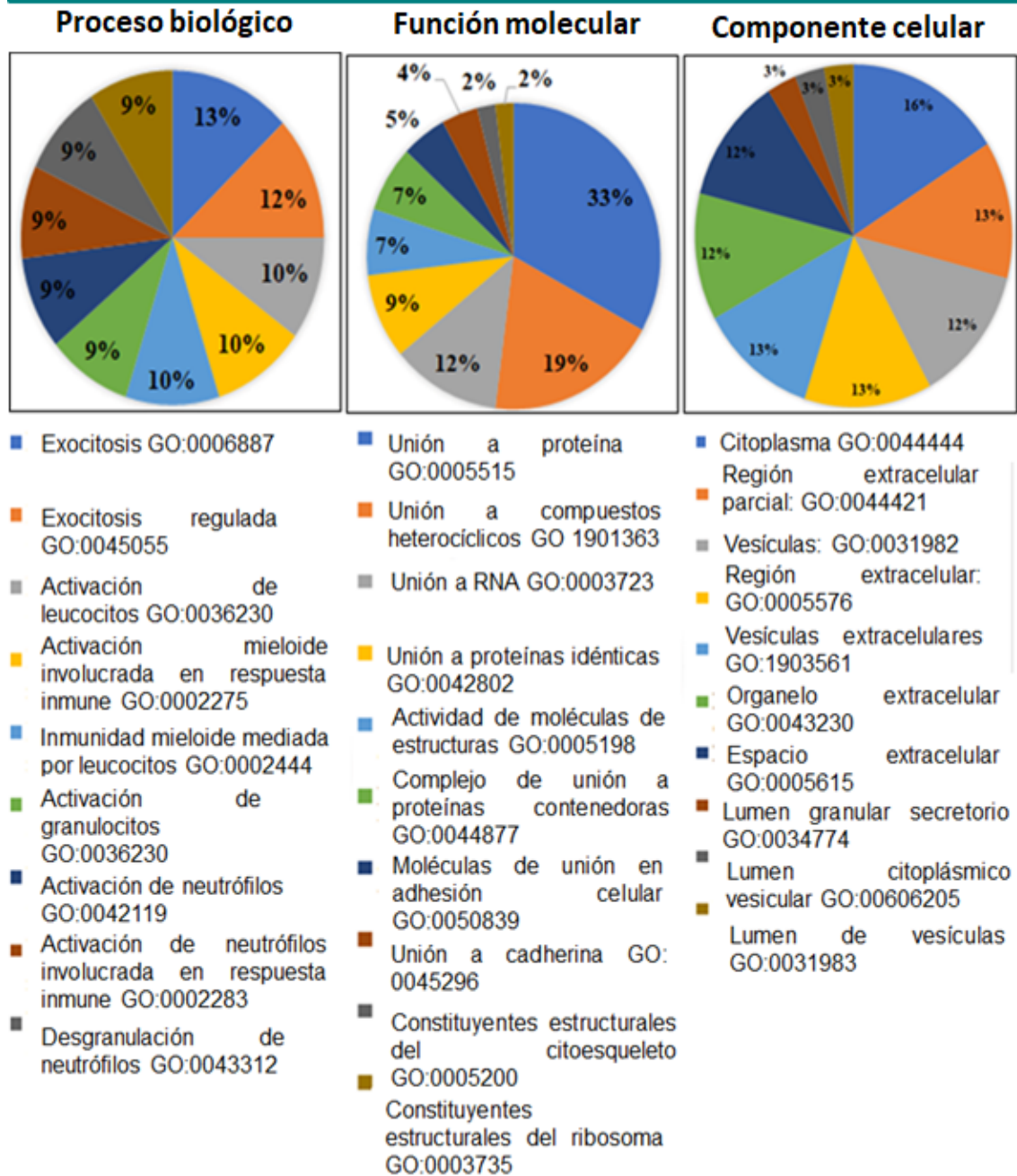


Figura 5. Clasificación de las proteínas de cáncer cervicouterino por ontología de genes. Un total de 622 proteínas identificadas y cuantificadas por marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta (ITRAQ) fueron agrupadas de acuerdo a ontología de genes (GO) y clasificadas por proceso biológico, función molecular y componente celular. La exocitosis regulada y la exocitosis acumularon cerca de 25% de la clasificación total en Cáncer Cervicouterino (CC).

5.2 Análisis de datos con intersecciones multigrupales

Las proteínas estadísticamente significativas sobre (1.9) ó por debajo de (-1.9) ordenes de cambio comparadas contra el tejido sano cervicouterino (Tabla I) fueron agrupadas y analizadas por SET para visualizar las intersecciones multigrupales de proteínas sobreexpresadas y subexpresadas en diversos grupos de cáncer cervicouterino y elucidar las proteínas comunes ó diferentes entre cada grupo. Los resultados se muestran en la Figura 6. CAD mostró un patrón proteico más específico comparado contra SCC y CC. De las 62 proteínas identificadas y cuantificadas experimentalmente, 597 se incluyeron en el GSEA, considerando sólo aquellas a las cuales se le asignó exitosamente identificador dentro del software de análisis.

Tabla I. Cambios en estadísticamente significativos en la expresión proteica de los grupos de análisis de cáncer cervicouterino.

Expresión proteica	Tipo de Cáncer		
	CC	SCC	CAD
Estatus			
Sobreexpresadas	40	60	41
Sin cambios	571	552	565
Subexpresadas	11	10	16

Identificación y cuantificación por MASCOT (v2.2.07) en base de datos Swissprot (1%FDR, <1% target-decoy), $\leq 1.9 \geq$ comparado contra el control.

CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso CAD: Adenocarcinoma cervicouterino.

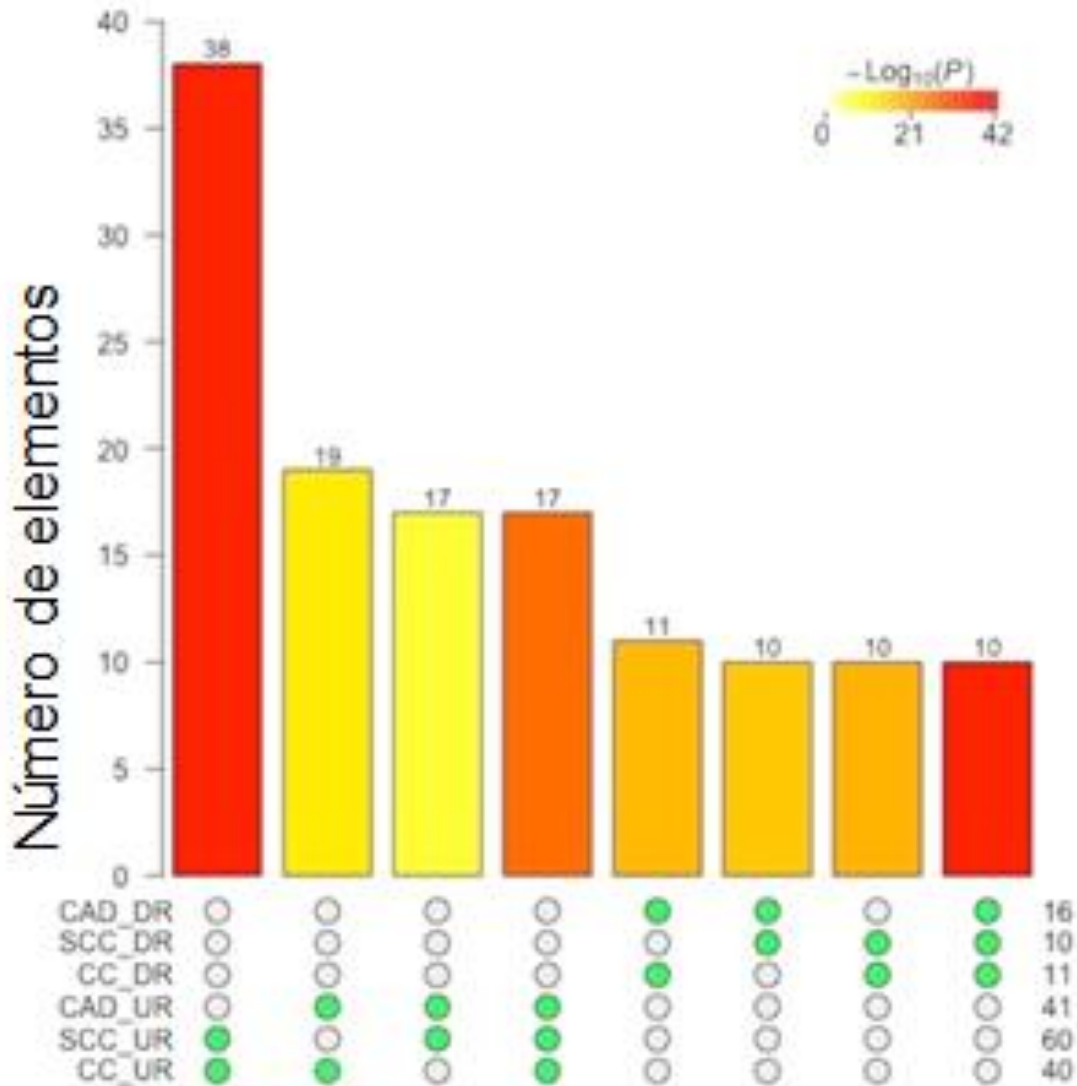


Figura 6. Super ExactTest (SET) de las proteínas de cáncer cervicouterino. Se muestran las intersecciones multigrupales entre los grupos de análisis cáncer cervicouterino (CC), cáncer cervicouterino escamoso (SCC), adenocarcinoma cervicouterino (CAD) para proteínas sobreexpresadas (UR) y subexpresadas (DR). Un total de 17 proteínas sobreexpresadas (UR) y 10 proteínas subexpresadas (DR) fueron comunes en los tres grupos de análisis (CC, SCC y CAD). La intensidad del color de las barras representa el peso estadístico en las intersecciones (más intenso más significativo estadísticamente).

5.3 Análisis de enriquecimiento de genes por ShinyGO 0.77

Los datos obtenidos de la identificación y cuantificación de proteínas (622 proteínas) fueron analizados empleando un método alternativo de enriquecimiento de genes (ShinyGO 0.77) tomando como referencia la base de datos Hallmark MSigDB. Los resultados obtenidos mostraron a la angiogénesis, blancos de MYC y transición epitelio mesénquima como las 3 funciones más enriquecidas (Figura 7B). En cuanto a la angiogénesis, se ha encontrado que

es un fenómeno indicativo de progresión del cáncer con la evolución de lesiones de bajo grado a lesiones de alto grado, se ha propuesto que los exosomas derivados del tumor son el mecanismo inductor de cambios en las células endoteliales facilitadores de la formación de nuevos vasos sanguíneos⁹⁶. Esta afirmación también experimentalmente se soporta en nuestros resultados con cerca del 25% de proteínas pertenecientes a exocitosis (Figura 5). Otro dato a resaltar es el grupo de proteínas blanco de MYC, en cuanto a esto se ha reportado en cáncer cervicouterino que tumores de pacientes con una elevada expresión de la proteína MYC tuvieron 6.1 veces más riesgo de metástasis comparada con pacientes con cáncer cérvico uterino con niveles normales de MYC⁹⁷, esto está relacionado con la naturaleza y estadio de los tumores de cáncer cervicouterino que incluimos en nuestro análisis.

En lo que respecta al mapa de vías de enriquecidas nos encontramos con que el punto de revisión G2M y los blancos de E2F que son los dos grupos que más genes comparten entre sí. Mientras que los dos grupos con mayor número de genes enriquecidos son los blancos de MYC y la transición epitelio mesénquima (Figura 7A).

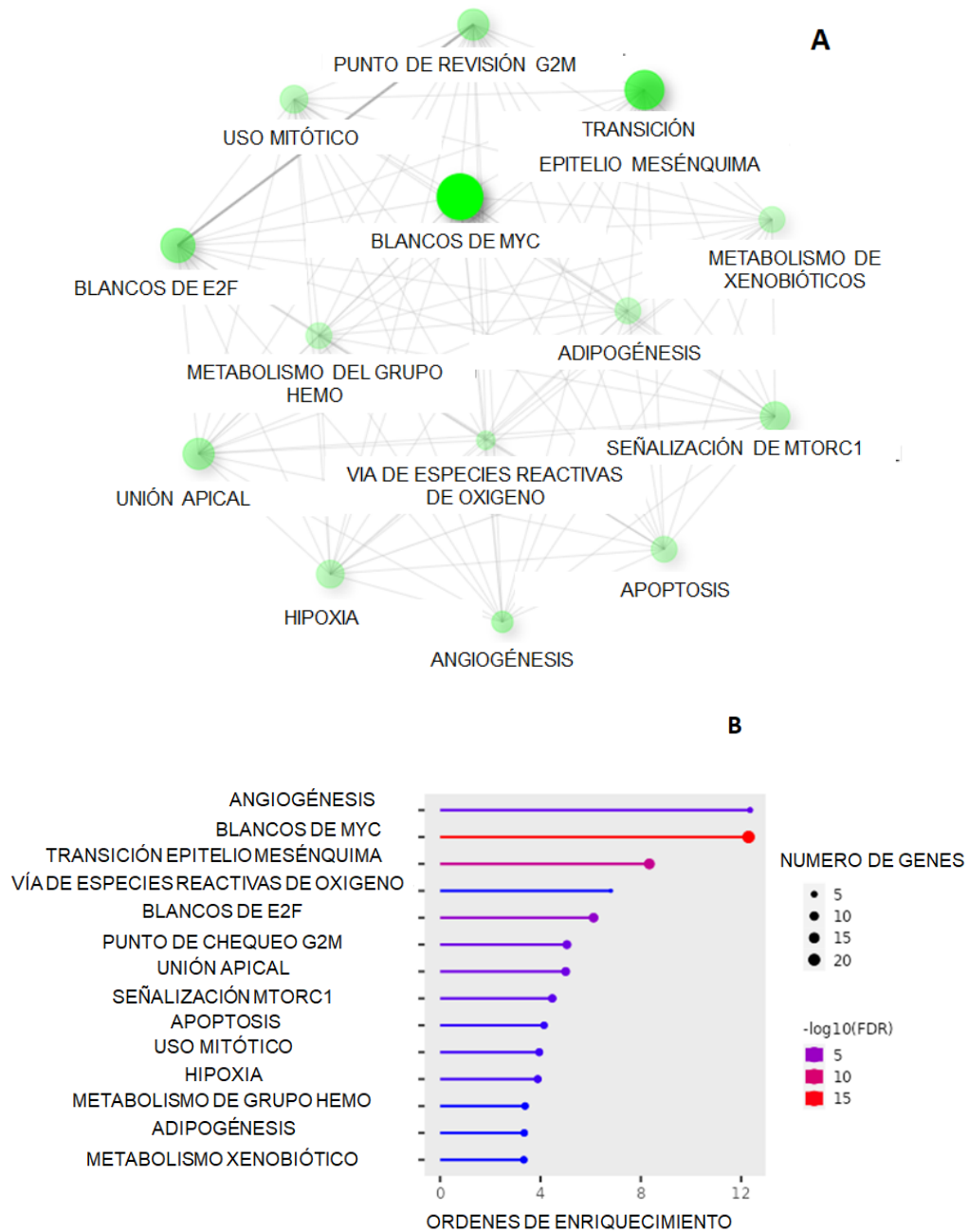


Figura 7. Procesos biológicos enriquecidos en cáncer cervicouterino con ShinyGO 0.77 (Hallmarck MsigDB). (A) Se muestra un diagrama donde se detallan las relaciones entre las vías de señalización enriquecidas. Las vías conectadas, comparten al menos 20% o más genes en común. Los nodos más oscuros representan grupos de genes más enriquecidos. Las líneas más oscuras significan una mayor cantidad de genes compartidos entre los grupos de genes conectados. (B) Se muestra el número de genes presentes en la vía (tamaño del círculo), así como su peso estadístico ($-\log_{10}(\text{FDR})$).

5.4 Análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA) para elucidar vías de señalización en cáncer cervicouterino

Los datos obtenidos de la identificación y cuantificación (MASCOT (v2.2.07)) de los extractos proteicos de dos replicas experimentales se emplearon para formular una lista de genes que posteriormente se analizaron por GSEA (GSEA v. 2.0, Broad Institute, Cambridge, MA, USA)⁹³. Los grupos de genes obtenidos se buscaron en vías de señalización bioquímicas de la base de datos Enciclopedia de Genes y Genomas (KEGG por sus siglas en inglés; www.genome.jp/kegg). Se obtuvo como resultado un total de 39 grupos de genes diferencialmente enriquecidos ($p \leq 0.1$ y $FDR \leq 0.25$) (Tabla suplementaria II y Figura suplementaria 1) de los cuales se eligió 21 grupos de genes ($p \text{ value} \leq 0.1$ y $FDR \leq 0.25$) que de acuerdo a los parámetros y criterios del GSEA estos grupos de genes están estadísticamente enriquecidos en al menos un grupo de CC.

Tabla II. Enriquecimiento de vías de señalización estadísticamente significativas en cáncer cervicouterino de acuerdo a análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA)

Tipo	Vía de señalización	p-Value	Proteínas involucradas
CC (SCC y CAD)	Ciclo celular	<0.0001	ARHGDIB CALML3
	Vía de señalización de neutrófilos	0.0011	CAMP SFN LYZ
	Meiosis de ovocitos	0.0012	VDAC1 VDAC3 YWHAB
	Secreción salival	0.0305	YWHAE YWHAH
	Vía de señalización de calcio	0.0277	YWHAZ YWHAQ CALML5
	Digestión y absorción de proteínas	<0.0001	COL1A1 COL1A2
	Interacciones de receptor de ECM	<0.0001	COL2A1 COL6A1
	Papilomavirus	<0.0001	COL6A2 COL6A3
	Uniones Gap	<0.0001	PPP1CC TUBB6
	Adhesión focal	<0.0001	TUBA4A COL14A1 VCL FLNA TUBB TUBA1A TUBB2B TUBA1B TUBB4B TUBA1C
SCC	Ciclo celular	<0.0001	ARHGDIB CALML3
	Meiosis de ovocitos	<0.0001	CAMP CTSD SFN
	Vía de señalización de neutrofilos	<0.0001	HSP90AA1 HSP90AB1
	Tuberculosis	0.0160	HSPD1 LSP1 STAT1
	Interacción planta-patógeno	0.0224	HSP90B1 YWHAB YWHAE YWHAH YWHAZ YWHAQ CALML5 CYCS
	Digestión y absorción de proteínas	<0.0001	COL1A1 COL1A2
	Papilomavirus	<0.0001	COL2A1 COL6A1
	Interacciones de receptor de ECM	<0.0001	COL6A2 COL6A3
	Uniones gap	<0.0001	TUBA4A COL14A1
	Adhesión focal	<0.0001	TUBA1A TUBA1B TUBB4B TUBB6 TUBA1C TUBB TUBB2B

CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino ¹p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes (GSEA)

Tabla II. Enriquecimiento de vías de señalización estadísticamente significativas en cáncer cervicouterino de acuerdo a análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA).

Tipo	Vía de señalización	p-Value ¹	Proteínas involucradas
SCC comparado con CAD	Meiosis de ovocitos	<0.0001	ALDOA ARHGDIB SFN
	Ciclo celular	0.002	GPI PFKL PFKP PGM1
	Vía de señalización de la pentosa fosfato	0.002	TUBA4A YWHAB
	Glucolisis/gluconeogénesis	0.003	YWHAE YWHAH
	Uniones gap	0.008	YWHAZ TUBA1A TUBA1B TUBB4B YWHAQ CALML5 TUBB6 TUBA1C TUBB TUBB2B
	Lupus eritematosos sistémico	0.013	APOA1 COL1A1 COL1A2
	Digestión y absorción de proteínas	0.012	COL2A1 ELANE H2AFX
	Tripanosomiasis africana	0.046	HBA2 HBB COL14A1 HIST1H3F HIST1H2AG H2AFY H2AFV
CAD	Lupus eritematosos sistémico	0.001	ATP5B ATP5D
	Contracción muscular cardíaca	0.004	ATP6V1E1 ATP5O
	Fosforilación oxidativa	0.049	CALML3 CAMP
	Tuberculosis	0.076	ELANE H2AFX
	Peroxisoma	0.084	ATP5B ATP5D ATP6V1E1 ATP5O CALML3 CAMP ELANE H2AFX HSPD1 LSP1 NDUFS4 SCP2 SOD1 TPM1 TPM2 TPM3 TPM4 HIST1H3F HIST1H2AG H2AFY NDUFA13 CYCS H2AFV
	Digestión y absorción de proteínas	<0.0001	A2M SERPINC1 CPAMD1
	Papilomavirus	<0.0001	COL2A1 COL6A1
	Uniones gap	<0.0001	COL6A2 COL6A3
	Interacciones de receptor de ECM	0.003	KNG1 PKM PLG
	Cascada de complemento y coagulación	0.011	TUBA4A COL14A1 TUBA1A TUBA1B TUBB4B TUBB6 TUBA1C TUBB TUBB2B

CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino ¹p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes (GSEA)

Después, las proteínas subexpresadas y sobreexpresadas del GSEA fueron clasificadas (Tabla II) incluyendo las principales proteínas de cada grupo. Las vías con mayor enriquecimiento en GSEA comunes en cáncer cervicouterino tanto para el tipo SCC y CAD fueron: Digestión y absorción de proteínas, uniones gap, adhesión focal, interacciones de receptor de matriz extracelular. Este resultado es soportado por los valores que reflejan la subexpresión de proteínas encargadas del mantenimiento de la matriz extracelular de la familia colágeno (CO6A1(-2.209), CO6A2(-2.387) y CO6A3(-1.950)) en cáncer cervicouterino que fueron experimentalmente descubiertas en nuestro estudio como se muestra en la tabla V. Las proteínas estadísticamente significativas se clasificaron en 3 grupos: i) proteínas diferencialmente expresadas en SCC comparadas contra control (Tabla III), ii) proteínas diferencialmente expresadas en CAD comparadas contra control (Tabla IV), y iii) proteínas comunes entre SCC y CAD comparada contra control (Tabla V). La información contenida en las tablas se obtuvo de reportes científicos que consideran la participación de las proteínas en las características del cáncer, mientras que se empleó la clasificación de ontología de genes por proceso biológico en proteínas de las que no se encontró reportes de participación en cáncer. La comparación entre cáncer cervicouterino escamoso contra control (Tabla III) mostró que cerca del 50% de las proteínas están relacionadas con activación de la invasión y metástasis entre estas pueden hallarse CALL5, ZN185, GT251, S10AE, K1C15, FLNB, K2C6C, NEBU, y YBOX3.

En cuanto a la clasificación de las proteínas de adenocarcinoma cervicouterino comparadas contra el control (Tabla IV), la principal categoría obtenida en el análisis fue la de resistencia a la muerte celular, como ejemplo tenemos la proteína S100-A9, la proteína de unión a ribosoma (RRBP1), proteína S100-A13 (S10AD), histona H2AX (H2AX) y la proteína S100-A12 (S10AC) (Tabla IV). La proteína 1 ribosomal de unión a retículo endoplásmico (RRBP1) es un transportador localizado en el retículo endoplásmico (ER).

La comparación de los perfiles de expresión proteica permitió establecer 27 proteínas compartidas entre SCC y CAD comparadas contra control (Tabla V). En este estudio, prosaposina (SAP) se sobreexpresó en términos generales en muestras de CC comparadas contra el control. Sin embargo, enfatizamos la sobreexpresión de SAP a nivel proteómico en CAD comparada contra el control. Considerando esta diferencia de expresión en el adenocarcinoma cervicouterino de prosaposina, podría ser posible participe confiriendo mayor resistencia a la apoptosis en células tumorales regulando de forma negativa la síntesis

de caspasas 3, 7 y 9 como se ha observado en cáncer de próstata⁹⁸, la promoción de la resistencia a la apoptosis por parte de la proteína prosaposina podría contribuir a una peor prognosis de los pacientes con adenocarcinoma cervicouterino comparada contra cáncer cervicouterino escamoso.

Reticulocalbina 3 (RCN3) se sobreexpresó en ambos tipos de CC (SCC y CAD), comparado con el tejido control (Tabla V). Por esta razón, decidimos realizar posteriores análisis *in vivo* para investigar el papel en el desarrollo del CC ya que la evidencia de su participación en CC es aún escasa.

Tabla III. Proteínas diferencialmente expresadas en cáncer cervicouterino escamoso (SCC).

#	Nombre	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Función
1	CALL5	1.829	0.067	2.073	0.041	0.431	0.747	1.642	0.049	Invasión y metástasis ⁹⁹
2	OSTF1	1.888	0.001	2.062	0.000	1.385	0.046	0.677	0.025	Osificación
3	COTL1	1.801	0.049	1.992	0.039	0.874	0.504	1.118	0.191	Proliferación sostenida ¹⁰⁰
4	ZN207	1.895	0.000	1.991	0.000	1.758	0.026	0.233	0.288	División celular
5	1433B	1.794	0.000	1.988	0.000	0.716	0.387	1.273	0.041	Resistencia la apoptosis ¹⁰¹
6	ZN185	1.678	0.082	1.981	0.072	1.212	0.293	0.769	0.357	Invasión y metástasis ¹⁰²
7	1433G	1.750	0.000	1.936	0.000	0.684	0.415	1.252	0.056	Resistencia a la apoptosis ¹⁰¹
8	PERE	1.602	0.048	1.933	0.037	0.837	0.593	1.097	0.342	Inflamación tumoral ¹⁰³
9	GT251	1.837	0.118	2.063	0.119	0.673	0.660	1.390	0.191	Invasión y metástasis ¹⁰⁴
10	S10AE	1.898	0.003	2.040	0.003	1.571	0.057	0.469	0.162	Invasión y metástasis ¹⁰⁵

¹Valores de expresión en orden de cambio, de acuerdo a MASCOT (v2.2.07) y Swiss-Prot (1%FDR, <1% target-decoy); ²p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes. CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino y CTRL: tejido sano control.

Tabla III. Proteínas diferencialmente expresadas en cáncer cervicouterino escamoso (SCC).										
#	Nombre	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Función
11	K1C15	1.708	0.010	1.997	0.006	0.630	0.637	1.367	0.165	Resistencia a la apoptosis ¹⁰⁶
12	FLNB	1.737	0.000	1.960	0.000	1.032	0.308	0.929	0.158	Invasión y metástasis ¹⁰⁷
13	GLU2B	1.807	0.000	1.921	0.000	1.663	0.024	0.258	0.306	Metabolismo celular de proteínas
14	1433F	1.738	0.000	1.921	0.000	0.711	0.404	1.210	0.063	Resistencia a la apoptosis ¹⁰¹
15	PLIN3	1.767	0.000	1.970	0.001	1.228	0.032	0.742	0.021	Resistencia a la apoptosis ¹⁰⁸
16	K2C6C	1.654	0.001	1.935	0.001	0.683	0.544	1.253	0.143	Invasión y metástasis ¹⁰⁶
17	NONO	1.896	0.001	1.932	0.003	1.585	0.066	0.347	0.236	Proliferación sostenida ^{109,110}
18	PSA2	1.673	0.055	1.904	0.051	0.776	0.546	1.128	0.230	Resistencia a la apoptosis ¹¹¹
19	NEBU	1.824	0.008	2.065	0.006	1.303	0.310	0.762	0.323	Invasión y metástasis ¹¹²
20	TBCA	1.808	0.000	1.951	0.000	1.456	0.023	0.495	0.022	Resistencia a la apoptosis ¹¹³
21	YBOX3	1.756	0.000	1.948	0.000	1.136	0.083	0.811	0.020	Invasión y metástasis ¹¹⁴
22	1433T	1.741	0.000	1.930	0.000	0.672	0.394	1.258	0.039	Resistencia a la apoptosis ¹⁰¹

¹Valores de expresión en orden de cambio, de acuerdo a MASCOT (v2.2.07) y Swiss-Prot (1%FDR, <1% target-decoy); ²p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes. CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino y CTRL: tejido sano control.

Tabla IV. Proteínas diferencialmente expresadas en adenocarcinoma cervicouterino (CAD).

#	Nombre	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Función
1	S10A9	1.726	0.001	1.546	0.001	2.441	0.163	-0.895	0.243	Resistencia a la apoptosis ¹¹⁵
2	RRBP1	1.597	0.018	1.558	0.039	2.040	0.206	-0.483	0.444	Resistencia a la apoptosis ^{116,117}
3	S10AD	1.575	0.054	1.578	0.089	2.153	0.035	-0.575	0.040	Resistencia a la apoptosis ¹¹⁸
4	H2AX	1.489	0.046	1.397	0.092	2.149	0.065	-0.752	0.000	Resistencia a la apoptosis ^{119,120}
5	CEAM5	1.650	0.060	1.338	0.147	2.600	0.313	-1.262	0.410	Invasión y metástasis ¹²¹
6	GPVI	1.807	0.014	1.732	0.032	2.322	0.287	-0.589	0.520	Invasión y metástasis ^{122,123}
7	S10A6	1.470	0.000	1.327	0.001	2.026	0.205	-0.700	0.358	Invasión y metástasis ¹²⁴
8	ELNE	1.853	0.001	1.870	0.001	2.125	0.196	-0.255	0.558	Inflamación tumoral ^{125,126}
9	CEAM8	1.310	0.141	1.085	0.246	2.014	0.304	-0.929	0.451	Inflamación tumoral ¹²⁷
10	S10AC	1.107	0.091	0.927	0.211	1.936	0.324	-1.009	0.415	Resistencia a la apoptosis ¹¹⁸
11	CYC	1.610	0.007	1.577	0.011	1.928	0.096	-0.351	0.337	Energética celular desregulada ^{123,128}
12	K2C8	1.410	0.023	1.507	0.075	1.910	0.021	-0.403	0.066	Invasión y metástasis ¹²⁹
13	CAMP	1.693	0.052	1.606	0.096	2.339	0.161	-0.732	0.308	Inflamación tumoral ^{130,131}
14	CYTA	1.569	0.004	1.346	0.026	2.336	0.120	-0.990	0.198	Evasión de supresores de crecimiento ¹³²

¹Valores de expresión en orden de cambio, de acuerdo a MASCOT (v2.2.07) y Swiss-Prot (1%FDR, <1% target-decoy); ²p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes. CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino y CTRL: tejido sano control.

Tabla V. Proteínas comunes entre cáncer cervicouterino escamoso (SCC) y adenocarcinoma cervicouterino (CAD).

#	Nombre	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Función
1	ICAL	2.575	0.000	2.638	0.000	2.685	0.174	-0.047	0.774	Invasión y metástasis ¹³³
2	EFHD2	2.190	0.000	2.342	0.000	1.916	0.078	0.426	0.166	Resistencia a la apoptosis ¹³⁴
3	SAP	2.103	0.001	2.029	0.007	2.810	0.019	-0.781	0.002	Resistencia a la apoptosis ⁹⁸
4	IF4H	2.029	0.014	2.047	0.009	2.142	0.032	-0.095	0.299	Resistencia a la apoptosis ^{135,136}
5	ML12B	1.971	0.000	2.103	0.001	1.993	0.001	0.110	0.898	Contracción muscular
6	RS28	2.171	0.000	2.285	0.000	1.953	0.072	0.333	0.325	Traducción citoplásmica
7	PRTN3	2.137	0.013	2.223	0.008	2.088	0.089	0.135	0.851	Respuesta humoral antimicrobiana
8	CH10	2.037	0.000	1.910	0.000	2.663	0.012	-0.753	0.000	Invasión y metástasis ¹³⁷
9	RCN3	1.943	0.042	1.940	0.046	1.975	0.192	-0.034	0.938	Invasión y metástasis ^{138,139}
10	GVIN1	1.919	0.000	1.974	0.000	2.039	0.092	-0.065	0.561	Inflamación tumoral ¹⁴⁰
11	PERM	2.340	0.005	2.036	0.020	3.069	0.020	-1.034	0.018	Inflamación tumoral ^{141,142}

¹Valores de expresión en orden de cambio, de acuerdo a MASCOT (v2.2.07) y Swiss-Prot (1%FDR, <1% target-decoy); ²p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes. CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino y CTRL: tejido sano control.

Tabla V. Proteínas comunes entre cáncer cervicouterino escamoso (SCC) y adenocarcinoma cervicouterino (CAD).

#	Nombre	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Función
12	TPD54	2.320	0.000	2.323	0.000	2.521	0.090	-0.199	0.397	Energética celular desregulada ^{143,144}
13	SRSF2	2.299	0.090	2.396	0.074	1.991	0.131	0.406	0.154	Procesamiento de RNA
14	HEBP2	2.301	0.001	2.361	0.002	2.535	0.012	-0.173	0.197	Regulación negativa del potencial de la membrana mitocondrial
15	TPM3L	2.155	0.000	2.295	0.000	1.983	0.048	0.312	0.262	Organización de filamentos de actina
16	ANXA3	2.236	0.011	2.430	0.007	1.951	0.059	0.479	0.201	Angiogénesis ^{145,146}
17	MARCS	2.795	0.000	3.010	0.000	2.296	0.260	0.714	0.347	Resistencia a la apoptosis ^{147,148}
18	MIME	-2.668	0.288	-2.778	0.283	-2.074	0.284	-0.704	0.695	Regulación negativa de la proliferación celular de musculo liso
19	COEA1	-2.670	0.303	-2.704	0.302	-2.624	0.291	-0.079	0.965	Adhesión célula-célula
20	DESM	-2.558	0.291	-2.456	0.291	-2.595	0.272	0.139	0.973	Angiogénesis ¹⁴⁹

¹Valores de expresión en orden de cambio, de acuerdo a MASCOT (v2.2.07) y Swiss-Prot (1%FDR, <1% target-decoy); ²p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes. CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino y CTRL: tejido sano control.

Tabla V. Proteínas comunes entre cáncer cervicouterino escamoso (SCC) y adenocarcinoma cervicouterino (CAD).

#	Nombre	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Función
21	KCRB	-2.035	0.000	-1.972	0.000	-2.108	0.071	0.136	0.893	Energética celular desregulada ¹⁵⁰
22	CO6A3	-1.950	0.230	-1.959	0.233	-2.349	0.183	0.390	0.627	Adhesión celular
23	NQO1	-2.056	0.076	-1.972	0.074	-2.693	0.075	0.722	0.040	Homeostasis redox celular
24	CO6A1	-2.209	0.333	-2.140	0.340	-2.908	0.294	0.768	0.518	Adhesión celular
25	CO6A2	-2.387	0.167	-2.364	0.168	-3.312	0.145	0.948	0.219	Adhesión celular
26	TGM2	-2.501	0.090	-2.201	0.087	-3.232	0.094	1.032	0.038	Invasión y metástasis ¹⁵¹
27	ALBU	-2.182	0.085	-2.098	0.086	-3.099	0.056	1.001	0.202	Regulación negativa del proceso apoptótico

¹Valores de expresión en orden de cambio, de acuerdo a MASCOT (v2.2.07) y Swiss-Prot (1%FDR, <1% target-decoy); ²p-value de acuerdo al análisis de enriquecimiento de genes. CC: cáncer cervicouterino; SCC: cáncer cervicouterino escamoso; CAD: adenocarcinoma cervicouterino y CTRL: tejido sano control.

5.5 Inmunohistoquímica de RCN3 y RAB14

Se llevó a cabo el análisis por inmunohistoquímica para verificar la expresión de las proteínas (RAB14 y RCN3) en nueve muestras de CC. Estas muestras fueron cortadas y teñidas con hematoxilina y eosina, así como anticuerpos contra las proteínas p16, RAB14 y RCN3. Se evaluaron los cortes con IHC mediante el plug-in IHC-profiler del software ImageJ, obteniendo seis de nueve muestras positivas para RAB14, cinco de nueve muestras positivas para RCN3. La proteína p16 se consideró como control positivo de CC (Figura 8).

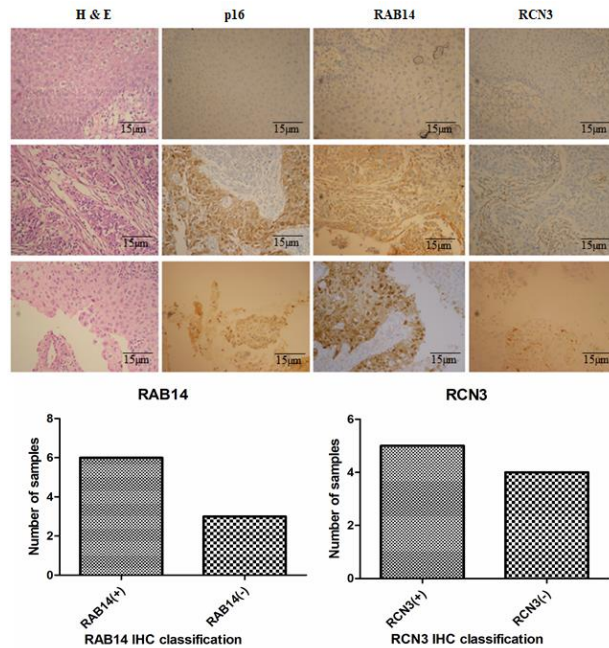


Figura 8. Ensayo de inmunohistoquímica (IHC) para la detección proteína de RAB14 y RCN3 en biopsias de cáncer cervicouterino. Se analizaron 9 muestras de cáncer cervicouterino de un grupo diferente. La proteína p16 se empleó como control positivo. Seis de nueve muestras fueron positivas para RAB14 y cinco de nueve muestras de cáncer cervicouterino fueron positivas para RCN3. H&E, Hematoxilina y Eosina.

RAB14 y RCN3, dos proteínas de retículo endoplásmico sobreexpresadas en CC se consideraron para estudiar sus efectos en la biología del tumor. RAB14 se encontró sobre expresada en dos réplicas de SqPD16, y RCN3 se encontró sobre expresada en todos los grupos de análisis de CC comparada contra tejido control (Tabla suplementaria I). Evidencia obtenida a nivel proteómico nos condujo a realizar estudios *in vivo* ya que RCN3 estuvo sobreexpresada (1.94 órdenes de cambio) en CC comparada contra el control (Tabla V), y RAB14 estuvo sobreexpresada (3.12 órdenes de cambio) en SqPD16 comparada contra control. (Ver en tabla suplementaria I)

5.6 Modelo tumoral xenógrafo para evaluar RCN3 y RAB14 in vivo

Se inocularon 2×10^6 células HeLa que sobreexpresan la proteína RAB14 o RCN3 por separado subcutáneamente en ratones hembra atímicos (nu/nu), los signos de formación del tumor fueron observados diariamente y medidos semanalmente por triplicado. El volumen tumoral se midió con la fórmula Attia Weiss como previamente se mencionó en materiales y métodos.

La formación del tumor fue visible al día 16; los tumores de HeLa RCN3 mostraron un efecto moderado en el crecimiento del tumor hasta el día 47. En contraste, los tumores de células HeLa que expresaban RAB14 mostraron efectos en el crecimiento desde inicio hasta el término del experimento de formación tumoral (Figura 9A y B). La expresión de las proteínas tanto de RCN3 como de RAB14 se evaluó mediante Western blot seleccionando el tumor pequeño y el tumor más grande de cada una (Figura 9D). Para la proteína RAB14, el análisis de Western blot (WB) mostró que el volumen tumoral está positivamente correlacionado con la expresión de RAB14 a nivel proteico (Figura 9E). Los tumores de RCN3 mostraron una mayor expresión de proteína sobre las células HeLa con plásmido vacío y las células HeLa WT control; sin embargo, se observó una moderada relación entre la expresión de la proteína RCN3 y el incremento del volumen tumoral que fue visible hasta el día 47. Los ratones inoculados con células que sobreexpresaban RAB14 desarrollaron tumores de mayor tamaño comparado con los controles. El incremento más pronunciado del tumor se observó cerca del día 35 y se mantuvo hasta el día 47, mostrando y confirmando la participación de RAB14 en la tumorigénesis, como se muestra en la Figura 9.

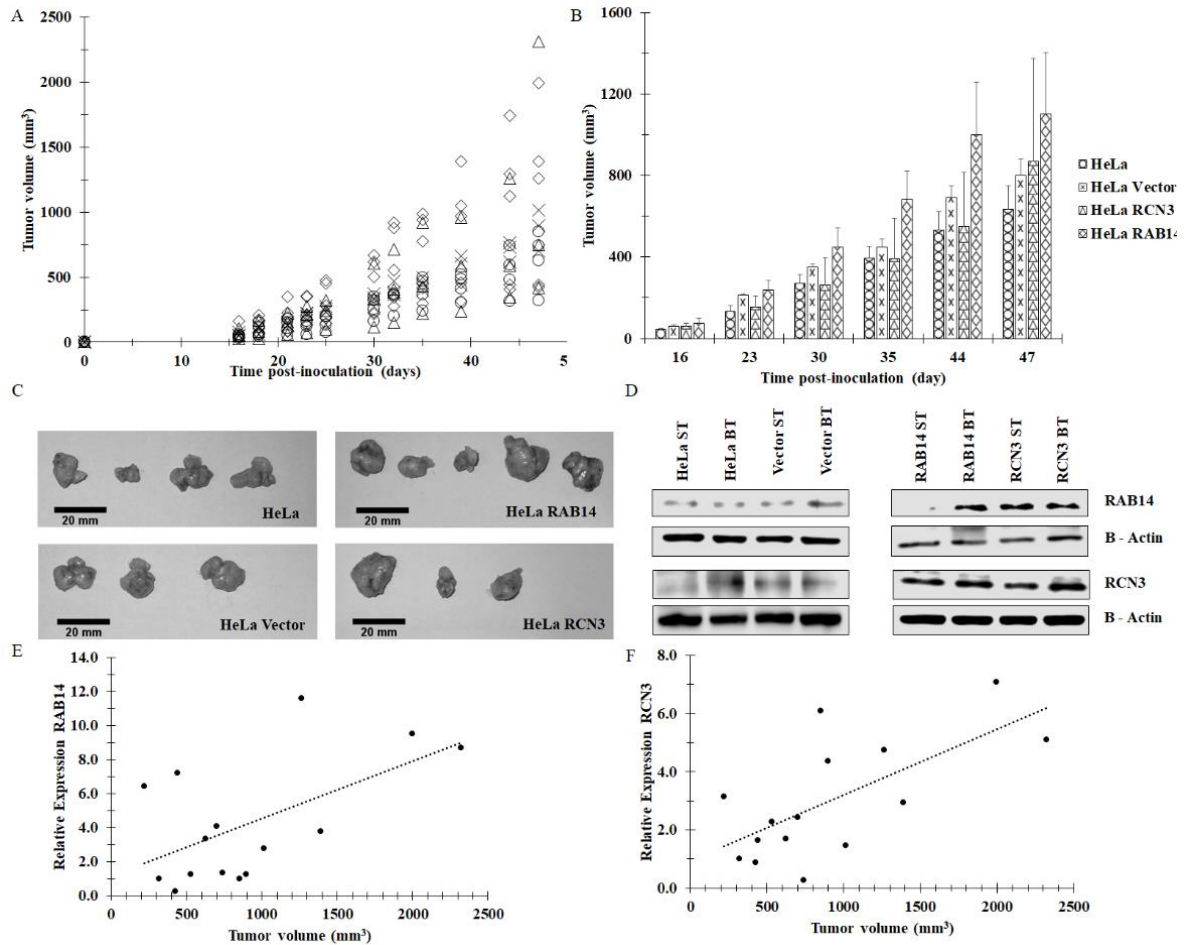


Figura 9. Modelo xenógrafo de ratón. Células HeLa que sobreexpresan RAB14 y RCN3 separadamente fueron inoculadas de forma subcutánea en ratones hembra nu/nu. Las curvas de crecimiento se compararon contra un tumor de HeLa *wild type* (WT) empleado como control, RAB14, RCN3, o vector vacío en células HeLa. (A) Gráfico de barras mostrando volumen tumoral; los valores se representan como promedio \pm SD (Desviación estándar) (B). Fotos de los tumores resectados de cada grupo. (C) La expresión de RAB14 y RCN3 fue analizada por ensayo de Western Blot (WB) en el tumor más pequeño (ST) y en el tumor más grande obtenido (BT); se empleó b-actina como control (D). Se midió la expresión proteica de RAB14 (E) y RCN3 (F) mediante ensayo de western blot (WB) considerando el volumen del tumor; se empleó B-actina como control interno.

VI.DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El CC es una de los tipos de cáncer en mujeres más frecuente a nivel mundial. Aunque los programas de salud pública han disminuido el número de casos y el porcentaje de mortalidad, la respuesta al tratamiento en algunos tipos de CC es aún pobre. Los sistemas de tamizaje como el Papanicolau (Pap) y las pruebas de DNA viral (HPV DNA test) han reducido la incidencia y la mortalidad de CC. Sin embargo, el CAD ha mostrado una pobre prognosis para el paciente y una mayor probabilidad de metástasis a sitios distante del tumor en comparación con pacientes con SCC.¹⁵² En este estudio, se obtuvieron patrones de expresión proteica global de CC, SCC y CAD comparados contra un grupo de tejido sano empleado como control (CTRL).

Se identificaron y cuantificaron 622 proteínas por LC/MS que posteriormente fueron analizadas por PCA, lo cual nos permitió agrupar y obtener patrones proteómicos globales que clasificamos como CC, SCC y CAD. Este análisis permitió encontrar patrones proteicos comunes en CC y patrones específicos en SCC y CAD. Cuando se empleó GO y las proteínas fueron clasificadas por BP cerca del 25% de las proteínas identificadas y cuantificadas estaba relacionada a la exocitosis y 24% a componentes extracelulares y componentes de organelos. Los datos experimentales que obtuvimos enfatizan la importancia de las proteínas de endocitosis/exocitosis en CC. Evidencia recientemente obtenida sugiere que rutas alteradas de trafico de proteínas y redes están preferentemente involucradas en la adquisición de capacidades pro-metastasicas¹⁵³. Se ha reportado que el reciclamiento endosomal posee un papel central en la integración de circuitos ligados a la metástasis y resistencia a la muerte celular (evasión de la apoptosis), las dos categorías más sobre representadas encontradas en nuestro estudio de CC.

En particular, la familia de proteínas relacionadas a Ras, está involucrada en la adquisición de metástasis y resistencia a la apoptosis mediada por reciclaje endosomal¹⁵⁴.

De un total de 622 proteínas identificadas y cuantificadas en este estudio (Tabla suplementaria I), 597 fueron analizadas por GSEA, y clasificadas de acuerdo a evidencia experimental reportada en la bibliografía. Las proteínas diferencialmente expresadas en SCC mostraron como función celular primaria la activación de la invasión y la metástasis (Tabla III), la resistencia a la muerte celular para las proteínas diferencialmente en CAD (Tabla IV), además la resistencia a la muerte celular y la activación de la invasión y metástasis como las dos funciones celulares comunes en SCC y CAD comparadas contra el control (Tabla V). Por

otro lado, RRPB1 se ha encontrado sobreexpresada en muestras de pacientes de CC con metástasis a nódulos linfáticos¹¹⁶ (Tabla IV). Además, RRPBI está involucrado en liberación de estrés de retículo endoplásmico (ERS) de cáncer de pulmón, como una respuesta al incremento de las funciones de proliferación celular como síntesis de proteínas, plegamiento y secreción. Esto se demostró mediante la expresión ectópica de RRPB1 en líneas celulares de cáncer de pulmón cuando se indujo ERS usando tunicamicina¹¹⁷. También se ha reportado que RRPB1 está altamente expresado en cáncer de próstata y que correlaciona con pobre prognosis, incluso ha sido propuesto como un potencial biomarcador en cáncer de próstata¹⁵⁵ y cáncer de ovario¹⁵⁶. Se ha observado que pacientes con una mayor expresión de RRPB1 tienen una peor esperanza de supervivencia; incluso se ha sugerido RRPB1 como un potencial blanco en el tratamiento de cáncer de ovario¹⁵⁶.

Por su parte, RCN3 es una proteína de unión a calcio en la vía secretoria y se encuentra localizada en el retículo endoplásmico (ER)⁷⁰. A la fecha, la evidencia de RCN3 en el desarrollo del cáncer es insuficiente comparada contra reticulocalbina 1 (RCN1). RCN1 es un miembro de las proteínas de unión a calcio expresada en la línea altamente metastásica de cáncer de próstata PC-3¹⁵⁷. También se ha encontrado la expresión elevada de RNA mensajero (mRNA) de RCN1 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435, comparada con la pobremente metastásica MCF-7⁷³. Se ha también sugerido a RCN1 como potencial marcador de cáncer renal al encontrarlo en 21 de 24 cortes histológicos de pacientes con cáncer renal¹⁵⁸. En cáncer de próstata, la expresión de RCN1 se incrementó en células endoteliales de médula ósea (BMECs) en presencia del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), una citocina proinflamatoria a menudo expresada en pacientes con cáncer de próstata con avanzada metástasis¹⁵⁹. RCN2 es otro miembro de la familia de reticulocalbinas, que se ha visto sobreexpresado en células de cáncer de hígado (HCC), ha sido involucrado en proliferación celular, crecimiento de tumores, presumiblemente a través de la regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la vía de señalización extracelular regulada por cinasa (ERK)¹⁶⁰. RCN1 y RCN2, en contraste a RCN3 han sido estudiadas extensivamente. Esta noción nos llevó a explorar el papel de RCN3 en la oncogénesis, especialmente en CC.

En el presente estudio, encontramos que RCN3 estuvo sobreexpresada en todos los grupos de análisis de CC cuando se comparó con el control (Tabla V). El análisis por IHC mostró 5/9 muestras positivas a RCN3. Además, las células HeLa que sobreexpresaban RCN3 inoculadas en hembras nu/nu indujeron un crecimiento moderado del tumor en comparación

con los tumores compuestos de células HeLa, al día 47. RCN3 ha sido identificado como un regulador negativo de la producción de colágeno en fibrosis cardíaca, esto basado en evidencia experimental donde la activación de RCN3 vía CRISPR/Cas-9 disminuyó la producción de colágeno en fibroblastos humanos de fibrosis cardíaca¹³⁸. En este estudio, la subexpresión de proteínas de colágeno tipo I y tipo II (CO6A1(-2.209), CO6A2(-2.387) y CO6A3(-1.950)) se observó en muestras de CC comparadas contra control. Estudios previos, han mostrado que la expresión del colágeno depende del estadio de desarrollo del tumor. Específicamente, fibroblastos normales crecidos en co-cultivos con líneas celulares de cáncer de mama derivadas de tumores de estadio avanzado (MDA-MB-231, MCF-7, T47D, y ZR-75-1) han mostrado una reducción de cerca del 50% en la expresión de colágeno. Además, se mostró mediante Northern blot que los niveles de mRNA de colágeno se encontraron elevados en la etapa I comparados contra el tejido normal adyacente, mientras que en los estadios de tumor II y III disminuyó¹⁶¹. Además, proponemos que RCN3 actúa como un regulador negativo de la producción de colágeno en CC y que modula de forma dinámica la concentración de colágeno de etapas tempranas a tardías en el desarrollo del tumor. En etapas tempranas, la concentración de colágeno tiende a incrementar comparada contra la matriz extracelular adyacente (ECM), esta proteína ha sido estudiada, y la evidencia muestra que el colágeno tipo I promueve resistencia a la apoptosis en las líneas celulares MCF-7 y células T-47D inducidas a estrés nutricional por ausencia de suero fetal bovino¹⁶². Además, se ha visto que la expresión de E-cadherina se encuentra disminuida a causa de la expresión de colágeno tipo I y III en líneas celulares de cáncer de páncreas¹⁶³. Incluso algunas condiciones patológicas como proliferación celular exacerbada en cáncer y metástasis se han relacionado con un proceso de adhesión celular mediada por cadherina-E defectuosa¹⁶⁴. Es posible que RCN3 se encuentre involucrada en la modulación de la expresión génica de colágeno y E-cadherina en CC.

Un cuarto de todas las proteínas identificadas y cuantificadas en CC están relacionadas a exocitosis. Varias líneas recientes de evidencia soportan la participación de la exocitosis en la adquisición de habilidades como metástasis y resistencia a la apoptosis a través de la familia de proteínas relacionadas a Ras como mediadores del reciclaje endosomal. RAB14 pertenece a la familia de proteínas reguladoras que dirigen los eventos de tráfico, incluyendo formación de vesículas, movimiento de vesículas y unión de vesículas a su blanco en la membrana celular¹⁶⁵. RAB14 se sobre expresó en SqPD16 comparado contra el control, y 6/9 muestras de CC fueron positivas a RAB14 en IHC. RAB14 actúa como un interruptor entre el estado inactivo y activo basado en su unión a guanosin difosfato (GDP) y guanosin trifosfato

(GTP), respectivamente para activar la vía de señalización río abajo. Se ha descrito que RAB14 se encuentra sobre expresado en tejido tumoral de cáncer gástrico comparado contra tejidos adyacentes no tumorales¹⁶⁶. A nivel postraducciona (miRNAs), la proteína RAB se ha sugerido como un oncogén en carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCL) debido a la frecuente pérdida de sus reguladores negativos miRNA como miR-451 y mir-338-3p^{167,168}. Reciente evidencia mostró que la expresión ectópica de miRNA-451 mostró efectos negativos en la proliferación *in vivo* así como la formación de colonias de células de NSCL y el desarrollo de tumores en ratones desnudos al incrementar la apoptosis. La expresión ectópica de miR-451 inhibió la expresión proteica de RAB14, y la restauración de RAB14 parcialmente inhibió la función de supresor tumoral de miR-451 en NSCLC.

La proteína RAB14 es un regulador crítico de la proliferación celular en cáncer¹⁶⁷, considerando que análisis realizados en vesículas positivas a RAB14 confirmaron que 38 proteínas cargo estaban directamente involucrada en la metástasis, es por ello que RAB14 participa como un regulador activo en metástasis facilitando el reciclaje endosomal¹⁶⁹.

En nuestro modelo murino, la sobreexpresión de RAB14 mostró una correlación con el crecimiento tumoral. De acuerdo a experimentos previos en adipocitos 3T3-L1, los niveles óptimos de RAB14 dirigen el tráfico de glucosa a través del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4). Esto fue demostrado con un ensayo de knockdown por shRNA de la proteína RAB14 endógena, observando una inhibición de la distribución de GLUT4 a los compartimentos celulares internos a través de vesículas¹⁷⁰. GLUT4 pertenece a la familia de transportadores de glucosa que están distribuidos en diversos órganos. GLUT1 y GLUT3 que se encuentran en neuronas, astrocitos, grasa, y tejido muscular¹⁷¹, GLUT2 en enterocitos, riñón y células de hígado¹⁷². GLUT4 se encuentra en músculos y adipocitos y es responsable de cerca del 80% del ingreso de glucosa en musculo esquelético¹⁷³. La sobreexpresión de RAB14 en células HeLa sugiere que RAB14 puede dirigir el reclutamiento de la glucosa de los compartimentos por traslocación de un mayor número de transportadores de glucosa GLUT4 de los compartimentos intracelulares (Membrana de Golgi y endosomas) a la superficie celular, de esta forma sosteniendo una regulación energética anormal que contribuye al crecimiento tumoral¹⁷⁴ como el que experimentalmente observamos, posiblemente debido a la sobreexpresión de RAB14. Este nuevo papel de RAB14 en CC puede proveer una nueva dirección en la prognosis y la terapia.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Las proteínas RAB14 y RCN3 son potenciales biomarcadores y blancos terapéuticos en CC.
- Los perfiles proteómicos de SCC y CAD ofrecen información valiosa que puede servir para identificar nuevos biomarcadores asociados con la prognosis de la enfermedad y nuevos potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento del CC.

VIII. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- Investigar el tipo de relación entre RAB14 y el transportador de glucosa (GLUT4) *in vitro* e *in vivo* en la línea de cáncer cervicouterino HeLa que sobreexpresa RAB14.
- Determinar el papel de GLUT4 en la línea celular HeLa que sobreexpresa RAB14 en el desarrollo tumoral *in vivo* empleando ratón atómico.
- Analizar el papel de RCN3 en la resistencia a la muerte celular en la línea celular HeLa que sobreexpresa RCN3.
- Establecer el efecto de la sobreexpresión de RCN3 en proteínas de matriz extracelular.

IX. ANEXOS

9.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO figura suplementaria 1, así como las tablas suplementarias I, II y III pueden ser revisada en el siguiente enlace:

<http://sinik.ccg.unam.mx/PGFP/Ramirez.AR2021.No399-R/>

9.2 ARTICULO CIENTIFICO ORIGINAL DERIVADO DEL PROYECTO DE TESIS

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 19: 241-258 (2022)
doi:10.21873/cgp.20317

Quantitative Proteomic Analysis of Cervical Cancer Tissues Identifies Proteins Associated With Cancer Progression

ALBERTO RAMÍREZ-TORRES¹, JEOVANIS GIL^{1,2}, SANDRA CONTRERAS¹, GRACIELA RAMÍREZ³,
HERIBERTO A. VALENCIA-GONZÁLEZ³, EMMANUEL SALAZAR-BUSTAMANTE¹, LEOPOLDO GÓMEZ-
CAUDILLO¹, ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA³ and SERGIO ENCARNACIÓN-GUEVARA¹

¹Proteomics, Center for Genomic Sciences, The National Autonomous University of Mexico (UNAM), Cuernavaca, Mexico;

²Division of Oncology, Section for Clinical Chemistry, Department of Translational Medicine, Lund University, Lund, Sweden;

³The National Institute of Cancerology (INCan), Mexico City, Mexico

Abstract. *Background/Aim:* To date, several proteomics studies in cervical cancer (CC) have focused mainly on squamous cervical cancer (SCC). Our study aimed to discover and clarify differences in SCC and CAD that may provide valuable information for the identification of proteins involved in tumor progression, in CC as a whole, or specific for SCC or CAD. *Materials and Methods:* Total protein extracts from 15 individual samples corresponding to 5 different CC tissue types were compared with a non-cancerous control group using bidimensional liquid chromatography-mass spectrometry (2D LC-MS/MS), isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ), principal component analysis (PCA) and gene set enrichment analysis (GSEA). *Results:* A total of 622 statistically significant different proteins were detected. Exocytosis-related proteins were the most over-represented, accounting for 25% of the identified and quantified proteins. Based on the experimental results, reticulocalbin 3 (RCN3) and Ras-related protein Rab-14 (RAB14) were chosen for further downstream *in vitro* and *in vivo* analyses. RCN3 was overexpressed in all CC tissues compared to the control and RAB14 was overexpressed in squamous cervical cancer (SCC) compared to invasive cervical adenocarcinoma (CAD). In the tumor xenograft experiment, RAB14 protein expression was positively correlated with increased tumor size. In addition,

RCN3-expressing HeLa cells induced a discrete size increment compared to control, at day 47 after inoculation. *Conclusion:* RAB14 and RCN3 are suggested as potential biomarkers and therapeutic targets in the treatment of CC.

Cervical cancer (CC) is the fourth most frequently diagnosed cancer in women, with an estimated 265,000 deaths worldwide (1). A large majority (around 80%) of the global burden occurs in the less developed countries (2). Careful retrospective investigations have strongly implicated high-risk human papillomavirus (HPV) with cervical carcinogenesis (3). Although CC diagnosis and treatment programs have decreased the number of cases and mortality rates, the prognosis and complete response to treatment remain poor in CC variants (4, 5). Approximately 80% of the CC cases worldwide are of the squamous cervical cancer (SCC) type, with the remainder being invasive cervical adenocarcinoma (CAD) (6). The incidence of CAD has increased, especially in younger women (7). During the last two decades, the relationship between CAD and SCC and all CCs has doubled even in developed countries. This epidemiological evidence suggests that current screening practices are inadequate to identify a significant proportion of CAD precursor lesions (8).

In a population-based study in Korean women, it was shown that the prevalence of HPV in CAD tissue is approximately 90% (9). The infection of HPV 16 and/or HPV 18 accounted for 78% of HPV-positive CADs, and multiple HPV types were found in the remaining 13% of cases (9). Risk factors for developing CC that have been described in SCC include the use of oral contraceptives for more than five years, smoking, and HPV infection (10). However, nowadays HPV infection is fully accepted as the common trigger factor for SCC and CAD development (11). Considering the high morbidity of the disease and the poor

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Sergio Encarnación-Guevara, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, México. Tel: +55 7773291899, Fax: +55 7773175094, e-mail: encarnac@ccg.unam.mx

Key Words: RAB14, RCN3, cervical adenocarcinoma, exosome, iTRAQ, proteomics.

prognosis of CC types, it is essential to identify proteins involved in CC development.

Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) combined with two-dimensional liquid chromatography (2D LC-MS/MS), are among the most powerful methodologies in quantitative proteomics. The multiplexing scope offered by iTRAQ reagents allowed us to identify and quantify changes in protein expression in CC tissues (SCC and CAD), enabling comparison between them, and of each of them against normal cervix tissue (NCT) used as control. Consequently, proteomics is a useful tool to classify cells and tissues from pathological conditions and understand different biological mechanisms (12).

In this study we used a mass spectrometry-based quantitative proteomics approach to obtain proteomic profiles of SCC and CAD to achieve an integrated analysis by principal component analysis (PCA) and gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed proteins. Our analysis revealed several proteins up-regulated in both conditions in comparison to the control. Reticulocalbin 3 (RCN3) and Ras-related protein RAB14 (RAB14) were selected for further analysis. HeLa cells overexpressing RAB14 and RCN3 separately were inoculated in nu/nu mice to elucidate RCN3 and RAB14 roles in CC. Our data indicated the fundamental role of these proteins in the regulation and progression of CC cells.

Materials and Methods

Samples and reagents. We analyzed 15 CC tissue samples from patients (mean age=45.5 years, SD=12.43) undergoing curative surgery at the Department of Gynecology of the Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Mexico City, Mexico. Normal cervix tissues (NCTs) with no evidence of CC and HPV infection were collected from patients attending the Gynecology Department of INCan, for treatment of cervix benign diseases. All the samples were collected with the consent of the patients and the protocol was approved by the Human Ethics Committee of the National Cancer Institute (INCan). After excision, the tissues were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until later use. A representative part of the tumor area was collected in 10% formalin and embedded in paraffin for histopathological analysis. The clinical and pathological data were recorded on a pre-designed form, which included the clinical stage of the tumor, histopathological classification, histopathological differentiation degree, HPV type, and age of the patient. HPV detection was performed by PCR analysis by extracting total DNA from 200 mg of CC tissue samples. DNA isolation was performed using a Wizard Genomic DNA purification Kit (A1120, Promega, Madison, WI, USA). DNA concentration was determined using a NanoDrop 2000/c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and visualized on agarose gel. One hundred μg of total DNA from each CC tumor sample was used as a template to detect HPV by PCR using MY09-MY11 HPV primers, designed to amplify a 450-base pair (bp) PCR product (PCRp) from DNA flanking the L1 HPV gene. Amplification was verified by running 10 μl of PCRp sample (out of a total PCR reaction volume of 20 μl) on a 1% agarose gel and staining with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A

second set of primers targeting the HPV 18-LCR (618-bp) and HPV 16-E6 (544-bp) regions was used for detecting the two most prevalent high-risk HPV types (HPV 16 and HPV 18), and HPV31 was detected using MY09-MY11 (11). PCRps were isolated with the GeneJET purification kit (K0701, Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol and sequenced by capillary electrophoresis. The DNA sequences were analyzed by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) at National Center for Biotechnology Information (NCBI). The β -globin housekeeping gene (540 bp) served as a PCR internal control.

The histological diagnosis of each sample was reconfirmed by microscopic examination of a frozen section stained with hematoxylin and eosin (H&E). Two different pathologists performed a histopathological classification according to the Bethesda System (TBS) to confirm cervical vaginal cytologic diagnoses (13). Next, a representative histological section of the tumor was washed 3 times in 1 ml of cold phosphate buffer saline (PBS), pH 7.5, supplemented with protease inhibitors. Frozen samples were crushed and finely homogenized using a handheld homogenizer. Each sample was dissolved in 2 volumes of lysis buffer containing 2 M guanidinium chloride (GdmCl), DNase/RNase, and protease inhibitors for 30 min at 4°C . After sonicating three times for 10 s, the samples were centrifuged at $18,000 \times g$ for 5 min at 4°C . The supernatant was taken for quantitative proteomics analysis, and the protein concentration was determined by the Bradford method (14). Also, each of 6 groups consisted of 3 individual samples, and all 18 samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to confirm sample integrity (data not shown).

Protein digestion and iTRAQ labeling. Protein digestion and iTRAQ labeling were performed as follows. Six pools, each containing 100 μg of protein from three different tumor protein samples, were precipitated with 9 volumes of cold ethanol at -20°C overnight. The pellet was washed 3 times with cold 90% ethanol. The precipitated proteins were solubilized in 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer, 0.1 M triethylammonium bicarbonate (TEAB), pH 8.0. For protein digestion, trypsin was added in a 1:50 ratio (enzyme-substrate), and the samples were incubated for 16 h at 37°C . SDS was removed by ethyl acetate extraction under acidic conditions (1 volume of ethyl acetate was added to the sample and acidified with 0.5% trifluoroacetic acid. After vortexing and centrifugation, the organic phase was discarded and an additional ethyl acetate extraction was carried out. Finally, the peptide mixture was desalted by reverse-phase chromatography, dried, and stored at -70°C until iTRAQ labeling. iTRAQ experiments were performed on 6 sets of 3 samples each. A pool of non-paired non-cancerous cervix tissue homogenates was used as a control in each set of experiments: an equal amount of total protein from lysates of 3 non-cancerous samples (non-paired controls) was pooled to generate a common reference "control sample" for CC samples comparison. The samples were dissolved in 40 μl TEAB pH 8.5 each, and the peptide was labeled using the iTRAQ reagent according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems) as follows: HPV16+ SCC poorly differentiated (SqPD16) reagent 114, HPV16+ SCC moderately differentiated (SqMD16) reagent 115, HPV16+ CAD moderately differentiated (AdMD16) reagent 116, HPV18+ SCC moderately differentiated (SqMD18) reagent 117, HPV31+ SCC moderately differentiated (SqMD31) reagent 118 and non-cancerous HPV-negative cervix tissue used as control reagent 121. All reactions were carried out according to the manufacturer's instructions. The peptide-

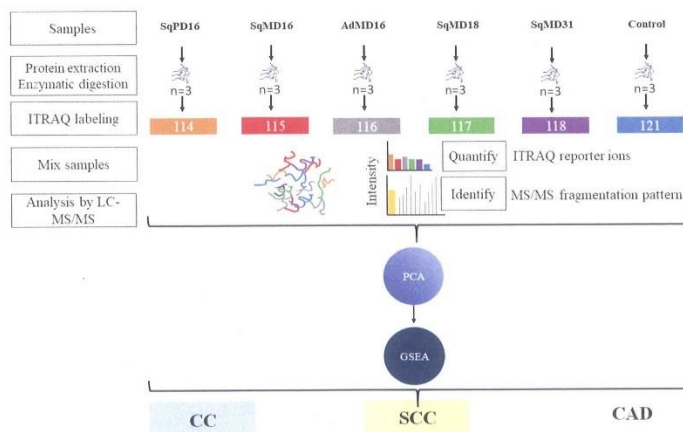


Figure 1. Schematic view of the experimental design. Proteomics was employed for the discovery of differentially regulated proteins in cervical cancer (CC) tissues and control tissues. The clinical samples were categorized into five sub-groups: human papillomavirus-16-positive (HPV16+) squamous cell cancer (SCC) poorly differentiated (SqPD16), HPV16+ SCC moderately differentiated (SqMD16), HPV16+ cervical adenocarcinoma (CAD) moderately differentiated (AdMD16), HPV18+ SCC moderately differentiated (SqMD18), HPV31+ SCC moderately differentiated (SqMD31) and a control group. Isobaric tags for relative and absolute quantitation (ITRAQ) combined with two-dimensional liquid chromatography (2D LC-MS/MS), are among the most powerful methodologies in quantitative proteomics were used. Principal component analysis (PCA) was performed to obtain through Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) the global CC proteomic profile, squamous cervical cancer proteomic profile (SCC) and cervical adenocarcinoma proteomic profile (CAD).

labeled mixtures were desalted using Sep-Pak C18 Vac cartridges (Waters), pooled, and dried under vacuum. The workflow of the proteomic study is shown in Figure 1.

Peptide pre-fractionation. To increase the confidence level and coverage of the study, we performed a peptide pre-fractionation step using reverse phase (RP) chromatography before the LC-MS/MS. Peptides mixtures were subjected to RP chromatography at high pH on an RP-column (4.9x150 mm) (Waters, USA) using a Binary HPLC Pump (Waters 1525) coupled to a photodiode array detector (Waters 996) set at 210 nm. The buffer system consisted of buffers A (50 mM ammonium formate in water, pH 10) and B (50 mM ammonium formate in 60% acetonitrile, pH 10). The separation was achieved by a gradient elution as follows: 0 to 20 min, 0% B; 20 to 25 min, 0 to 5% B; 25 to 90 min, 5 to 40% B; 90 to 105 min, 40 to 100% B; 105 to 115 min, 100% B; 115 to 120 min, 0% B for re-equilibration. The flow rate was 0.50 ml/min. Thirty fractions were collected; each fraction was dried on Speed-Vac vacuum, and stored at -80°C until LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS. Peptides were resuspended under initial chromatographic conditions and separated using an Agilent 1100 nano pump G2226A coupled to a hybrid triple quadrupole linear ion trap (QTRAP 3200, AB Sciex) equipped with a Nanospray II source and using data dependent acquisition (DDA). The tryptic peptides (8 µl) were desalted and concentrated on a Zorbax column (Agilent 5065-

9913) before analysis on an RP column (Agilent Zorbax 300SB C18, 3.5 µm, 150x0.075 mm). Separation was done at 300 nl/min using a linear gradient. Mobile phase A was water with 0.1% formic acid (v/v). Mobile phase B was acetonitrile with 0.1% formic acid (v/v). The gradient conditions were 100% A (0 min) to 95% (10 min); 100% A (10 min) to 75% (60 min); 70% A (60 min) to 20% (70 min); 20% A (70 min) to 20% (75 min); 20% A (75 min) to 100% (76 min); and 100% A (76 min) to 100% (80 min).

Precursor ion determination was carried out using an enhanced MS scan over a mass range of 400-1,400 m/z at 4,000 amu/s (with no trapping in Q0 and Dynamic fill time) with an ion spray voltage of 2,600 V applied to a Picotip FS360-75-15-N with ion spray gas (nitrogen). The precursor ions collided at Q2 using rolling collision energy (maximum allowed CE=80). Enhanced production scans (MS/MS) were performed in a mass range of 100-1,700 m/z at 4,000 amu/s, and collision voltages were dynamically determined. All precursor ion mass/charge ratios were confirmed with an Enhance Resolution scan.

Protein identification and quantification were carried out using MASCOT search engine (v2.2.07) against Swissprot database, setting trypsin as the digestion enzyme and carbamidomethyl-cysteine as fixed modification. N-terminal protein acetylation and oxidation were included as variable modifications. Proteins were identified with a 1% false discovery rate (FDR) <1% (target-decoy). The database used for protein identification was the human reference proteome UP000005640 from UniProt repository,

downloaded on April 30, 2016. Proteins with at least 2 razor-unique peptides identified by MS/MS were considered for quantification. These criteria resulted in 622 proteins identified in at least one experimental replicate.

Normalized spectra were extracted from each CC pool (SqMD16, SqMD16, AdM16, SqMD18, SqMD31, and control) to be analyzed, and the mass spectra were aligned by using MASCOT search engine (v2.2.07). Then the intensity mass peaks in the mass range were selected and exported in CSV file format. Protein analysis was performed for proteins with at least 2 intensity values in each analysis set. Protein abundance was normalized among conditions and the Random Forest method (miss Forest v.4; R package v2.35) was used to impute missing values (15). PCA was implemented in the protein intensity correlation matrix (Facto MineR v2.3; R package v3.5) (16) which led to protein abundance pattern for every CC analysis set (17). To establish whether any component could discriminate among CC analysis sets, the sample scores for each component were plotted. Once the component was found, the significant proteins that possessed discriminating capacity were identified using the squared cosine of the correlation matrix between the components and the proteins (18).

To evaluate the PCA performance on LC-MS/MS data, a t-test (significance level, 0.05) and a fold-change analysis were performed to compare protein abundance ratios among CC analysis sets. The first principal component accounts for as much of the variability in the data as possible, and similarly, each succeeding component explains as much of the remaining variability as possible (19). The first two components were considered for data classification.

SuperExactTest to clarify comprehensive relationships among CC analysis sets. The SuperExactTest (SET) was implemented to visualize comprehensive relationships among CC analysis sets. SET provides the theoretical framework to compute the statistical distributions of multi-set intersections based upon combinatorial theory and a procedure to accurately calculate the exact probabilities of multi-set intersections (20).

Gene set enrichment analysis to elucidate pathways in CC. The mean fold change data of the two experimental replicates were used to produce a preordered ranked gene list data set, then tested for enrichment by Gene set enrichment analysis (GSEA v. 2.0, Broad Institute, Cambridge, MA, USA) (21). Gene sets were generated and modified with biochemical pathway data from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; www.genome.jp/kegg). A number of gene sets were differentially enriched ($p < 0.1$ and $FDR < 0.25$) in each cancer tissue compared to control.

Immunohistochemical (IHC) analysis. A representative section was taken from tumor specimens and placed in a 100% formaldehyde solution. The fixed tissue was dehydrated with graded alcohols and embedded in paraffin wax. CC specimen sections (6- μ m thick) were cut and mounted on Super frost plus slides (VWR; Thermo Fisher Scientific). The sections were then deparaffinized with xylene and washed in 100% alcohol. The slides were incubated at room temperature (RT) in 3% (v/v) H_2O_2 in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity. The slides were then rehydrated through graded alcohols, washed in PBS, pH 7.5 and stained using a Ventana Medical Systems kit (Roche Tissue Diagnostics, Oro Valley, AZ, USA) according to the manufacturer's guidelines from the antibody incubation step.

The antibodies used were: anti-RAB14 1:200 (ab28639; Abcam, Cambridge, UK), anti-RCN3 1:200 (NBP2-13213; Novus Biologicals,

Centennial, CO, USA), and Anti-p16 (725-4713; CINtec[®] Histology, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), which was used as a positive control for CC tissues. Staining was assessed in the tumor area using the plug-in IHC profiler from ImageJ.

Plasmid and lentivirus production. Gene expression of RAB14 and RCN3 was carried out using plasmid expression vectors. Viral particles containing the RAB14 sequence gene were produced by a co-transfection using the plasmids psPax2 (12260; Addgene), pMD2G (Addgene no. 12259), pL-SIN-EF1a-EGFP (21320; Addgene), and RAB14 WT (plasmid #61493; gift by Dr. Curt Civin, Addgene). Viral particle production was performed in HEK 293T cell line by using lipofectamine 3000 (L30000015; Invitrogen). According to the product instructions, viral particles produced in cultured cells were harvested at 48 h post-transfection and cleared by a low-affinity protein filter (0.45 μ m pore size) and frozen at -70°C until further use. PCDNA 3.1 red fluorescent protein (RFP) (13032; Addgene) RCN3 was generated using shrimp alkaline phosphatase (ALP) (783901000UN; Thermo Fisher) to avoid plasmid recirculation, followed by T4 DNA ligase cloning (EL0011; Invitrogen). pCDNA3.1RFP-RCN3 plasmid was transfected into *E. coli* DH5 α and selected by carbenicillin resistance, grown in Luria-Bertani (LB) broth media and verified by detection of RCN3 by PCR. pCDNA 3.1 plasmid purification was performed using the Genomic DNA Purification Kit (K0512; Thermo Fisher) and the purified PCDNA3.1 RFP-RCN3 was stored at -70°C until use in transfection.

Cell transfection. HeLa cells were grown until reaching 80% cell confluence using RPMI 1640 5% fetal bovine serum. Transfection with the plasmids mentioned above was performed using lipofectamine 3000 (L30000015; Invitrogen) in p60 cell culture plates. In addition, cells were transfected with pCDNA empty vector (Mock), as control. After 48 h post-infection/transfection, cells were harvested and washed in PBS pH 7.5, counted and inoculated in immunodeficient mice.

Tumor xenograft mouse model. In this study, 4-6 old week old nude female athymic BALB/c nu/nu mice were used. The Bioethics Committees of UNAM and INCAN approved the protocol used for animal handling in this study. To develop tumor xenografts in mice, 2×10^6 HeLa cells transfected with RAB14 or RCN3 and injected subcutaneously in one flank of nude mice. The signs of tumor formation were observed daily and measured every week in triplicate. Control animals were injected with wild-type HeLa cells in serum-free cell culture media. Tumor volume was measured using the Attia-Weiss formula: $a \times b^2 \times 0.4$, where a = largest diameter and b = smallest diameter of tumor. After 8 weeks, mice were sacrificed, and the subcutaneous tumors were removed, photographed, fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. A representative section was taken from tumors induced by RAB14 or RCN3 HeLa transfected cells to measure the level of protein expression using wild-type HeLa cells tumors as a control.

Results

Patients and histopathological diagnosis. To perform quantitative proteomics, the histopathological diagnosis of each sample was performed by microscopic examination of a 5- μ m thick section of each research tissue sample. The eighteen samples were classified into 6 groups (SqPD16,

Table 1. Statistically significant protein changes were classified in upregulated, downregulated or non-differentially expressed proteins in CC, SCC and CAD analysis pools.

Protein expression	Cancer type		
	CC	SCC	CAD
Up-regulated	40	60	41
Non-differentially expressed	571	552	565
Down-regulated	11	10	16

CC: Cervical cancer; SCC: squamous cervical cancer; CAD: cervical adenocarcinoma.

SqMD16, AdMD16, SqMD18, SqMD31 and control), each of which consisted of 3 samples, as described in Materials and Methods.

Proteomics. Each group consisted of 3 individual samples, and all 18 samples were analyzed. A total of 622 proteins identified and quantified in both replicates (Supplemental Table 1) were processed by PCA, a statistical method designed to alleviate the degree of complexity in high-dimensional data but allowing the retention of trends and patterns (19), which is done by transforming the data into fewer dimensions that act as feature summaries.

According to PCA results, the component scores of spectra were plotted for Dimension 2 (Dim2; Y-axis) and Dimension 1 (Dim1; X-axis). In PCA, the projections indicated the separation of the control group (non-cancerous, HPV-negative cervical tissue) from the other groups (HPV+, cervical cancer tissue). SqMD16 and SqPD16 tended to be close and SqMD31 and SqMD18 suggested certain tumor proteins in common. In addition, the highest correlation among all CC analyzed groups was observed between SqMD16 and SqPD16 samples, suggesting HPV16 contribution was similar in moderately differentiated SCC samples and SCC poorly differentiated. Finally, we discovered a pronounced difference between SCC (SqPD16, SqMD16, SqMD31 and SqMD18) and CAD proteomic profile, which highlights the differences at the proteome level between SCC and CAD (Figure 2). The proteins obtained from the PCA analysis were also classified according to gene ontology (GO)-biological process (BP) classification. The BP analysis showed that 25% of the proteins identified and quantified belong to the exocytosis pathway (regulated exocytosis and exocytosis). Protein binding was the most predominant category for proteins in the molecular function classification, followed by structural molecule activity. For cell component classification proteins identified in CC, more than a half of the classified proteins were related to vesicle and extracellular space components (Figure 3). Next, PCA was used to estimate the similarity between them. Statically significant proteins were retrieved

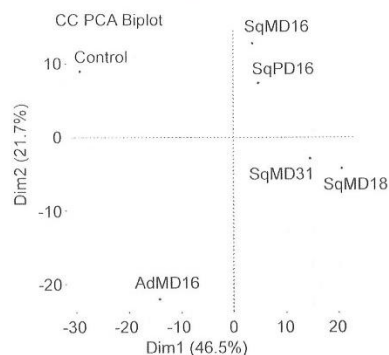


Figure 2. The biplot gives an indication about clustering and trends present in the protein profiles. Scores of similar cervical cancer (CC) pools will tend to form clusters whereas dissimilar samples will be located at greater mutual distances. The results demonstrate that SCC protein profiles constitute a cluster; SqMD31 and SqMD18 are closer relatives than SqMD16 and SqPD16 although they both belong to SCC profile. AdMD16 is located at a larger distance from the rest of CC groups. Control is located near 10 over the dimension 2 (Dim2) axis, far from the CC groups.

over (1.9) or below (-1.9) fold-change compared to control. Also SET was completed to visualize up-regulated and down-regulated proteins in CC multi-set intersections. Results are shown in Figure 4 and Table I. CAD showed a more specific proteomic pattern compared to SCC and CC. Out of 622 proteins, 597 were included in GSEA, considering only those collapsed in the analysis software data set.

GSEA to elucidate pathways in CC. The fold-change data, obtained from 2 experimental replicates were used to formulate a gene list data set, further tested by GSEA (GSEA v. 2.0, Broad Institute, Cambridge, MA, USA) (19). Gene sets were generated and modified using biochemical pathway data from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; www.genome.jp/kegg). Several sets of genes were differentially enriched ($p < 0.1$ and $FDR < 0.25$) in each CC tissue compared to the control. The results obtained from GSEA provided 39 sets of genes ($p\text{-value} \leq 0.1$ or $FDR \leq 0.25$) (Supplemental Table II and Supplemental Figure 1), of which 21 gene sets ($p\text{-value} \leq 0.1$ and $FDR \leq 0.25$) were chosen according to the GSEA parameters and criteria. These gene sets are statistically enriched in at least one CC cancer group. Next, the down-regulated and up-regulated pathways from GSEA were classified (Table II) including main proteins for each set. Focal adhesion, protein digestion and absorption, papillomavirus, and extracellular matrix receptor (ECM)

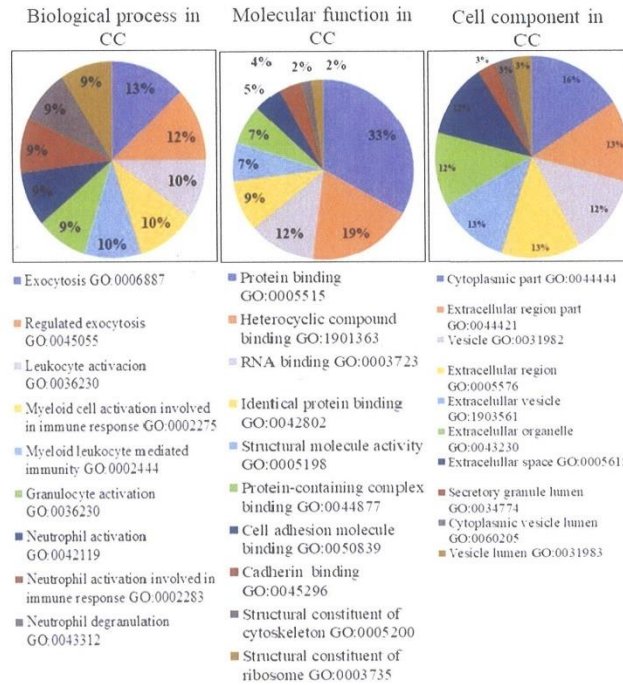


Figure 3. A total of 622 proteins identified and quantified by isobaric tags for relative and absolute quantitation (ITRAQ) were grouped according to gene ontology classification by biological process. Regulated exocytosis and exocytosis together accounted for 25% of total classification. CC, Cervical cancer.

interaction were the most the overrepresented pathways in GSEA. Compared to the control, one of the most up-regulated pathways in CC was calcium signaling; where voltage dependent anion channel 1 (VDAC-1) was identified as a critical interactor (Supplemental Table III). On the other hand, the ECM-receptor interaction was one of the most down-regulated pathways found in CC compared to control. This result is supported by the downregulation of collagens (COL6A3, COL6A1, COL14A1, and COL6A2) that we experimentally discovered in our study. Statistically significant proteins obtained by PCA and a fold-change analysis were classified into 3 groups: i) proteins differentially expressed in SCC compared to control (Table III), ii) proteins differentially expressed in CAD compared to control (Table IV), and iii) common proteins between SCC and CAD compared to control (Table V). The information

included in the tables was obtained from scientific reports that considered protein participation in the hallmarks of cancer, and BP was annotated to the proteins that no reports of participation in cancer were found. SCC_CRTL (Table III) showed that almost 50% of the proteins included are related to activating invasion and metastasis. The comparison of SCC with control showed that 22 proteins were overexpressed: activating invasion and metastasis was the leading category with 9 proteins (CALL5, ZN185, GT251, S10AE, K1C15, FLNB, K2C6C, NEBU, YBOX3).

Compared to the control (Table IV), the classification of CAD proteins showed resisting cell death as the main category of proteins obtained. Protein S100-A9 (S10A9), ribosome-binding protein 1 (RRBP1), protein S100-A13 (S10AD), histone H2AX (H2AX) and protein S100-A12 (S10AC) were classified in the main category. Endoplasmic reticulum

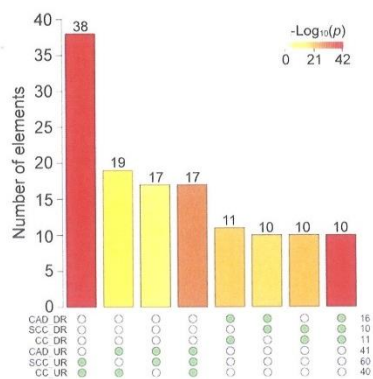


Figure 4. SuperExactTest (SET) was used to establish multi-set intersections among CC analysis sets, for up-regulated (UR) and down-regulated (DR) proteins. A total of 17 UR and 10 DR proteins were common in all the three analysis sets (CC, SCC and CAD). The color intensity of the bars represents the p-value significance of the intersections. CC, Cervical cancer; SCC, squamous cell cancer; CAD, cervical adenocarcinoma.

ribosomal binding protein 1 (RRBP1) is a transporter located in the rough endoplasmic reticulum (ER). Twenty-seven proteins were shared between SCC and CAD compared to control. Resisting cell death and activating invasion and metastasis were the main common cell function categories found in SCC and CAD. The down-regulated proteins in SCC and CAD compared to control were related to cell adhesion. Furthermore, the 10 kDa heat shock protein (CH10) was up-regulated in SCC and CAD compared to control.

In this study, prosaposin (SAP) was overexpressed in general terms in CC samples compared to control. However, we emphasize the greater overexpression of SAP at the proteomic level in CAD compared to control. Considering this difference, we hypothesized that SAP might be related to promoting the survival of tumor CC cells under stress conditions, contributing to the worse clinical outcome in CAD compared to SCC.

Reticulocalbin 3 (RCN3) was overexpressed in both CAD and SCC, compared to control tissue. For this reason, we decided to perform further *in vivo* analysis to investigate the role in CC development since the evidence associated with this protein in CC it is still scarce.

IHC analysis. IHC analysis was performed to verify protein expression in 9 CC tumor samples. These samples were cut and stained with hematoxylin and eosin, p16, RAB14, and RCN3 antibodies. IHC slides were evaluated using IHC

profiler plug-in, and the result was positive for 6/9 samples analyzed for p16 IHC (considered as a positive control for CC), 6/9 positive for RAB14 protein, and 5/9 positive tissue samples for RCN3 protein. Three different samples are shown in Figure 5.

RAB14 and RCN3, two ER proteins up-regulated in CC, were selected to further study their role in tumor biology. RAB14 was overexpressed in SqPD16 in 2 replicates, and RCN3 was overexpressed in CC analysis groups compared to control tissue by PCA data. Evidence provided at the proteomics level led us to perform *in vivo* studies considering RCN3 was overexpressed (1.94-fold-change) in CC compared to the control (Table V), and RAB14 was overexpressed (3.12-fold-change) in SqPD16 compared to the control (Supplemental Table I).

Tumor xenograft model. RAB14 and RCN3 HeLa transfected cells were separately inoculated subcutaneously into female nu/nu mice. Tumor formation was visible on day 16; HeLa RCN3 tumors showed a moderate effect on tumor growth development until day 47. In contrast, HeLa RAB14-expressing cells showed effects on tumor size from the beginning to the end of the tumor formation experiment (Figure 6A and B). The expression of RCN3 and RAB14 proteins in the xenograft tumors was evaluated by Western blot by selecting the smallest tumor and the largest tumor of each (Figure 6D). For RAB14 protein, Western blot analysis showed that tumor volume was positively correlated with RAB14 protein expression (Figure 6E). RCN3 tumors showed higher RCN3 protein expression over vector and WT HeLa control cells; however, a moderate relation was found between RCN3 protein expression and tumor size increment was visible until day 47. RAB14-inoculated mice developed larger tumors than those with control cells. The increase in tumor size in RAB14 was most pronounced around day 35 and was maintained until day 47, showing and confirming the role of RAB14 in tumorigenesis, as shown in Figure 6.

Discussion

CC remains one of the most common types of cancer in women worldwide. Although CC early detection and public health programs have decreased the number of cases and mortality rates, the response to treatment in CC variants remains poor. Detection systems such as the Pap and HPV DNA test have reduced the incidence and mortality of CC. However, CAD has shown a poor prognosis for patients and a greater probability of distant recurrence than SCC (76). In this study, global CC, SCC, and CAD proteomics profiles were obtained by comparing CC tissues with control tissue. Six hundred twenty-two proteins identified and quantified by LC/MS were processed by PCA, which allowed us to group and obtain global proteomic patterns that we classified as CC,

Table II. Statistically significant enrichment pathways in cervical cancer according to gene set enrichment analysis (GSEA).

Cervical cancer tissue type	Pathway	p-Value	Involved proteins	
CC (SCC & CAD)	Cell cycle	<0.0001	ARHGDB CALML3	
	Neurotrophin signaling pathway	0.0011	CAMP SFN LYZ	
	Oocyte meiosis	0.0012	VDAC1 VDAC3 YWHAB	
	Salivary secretion	0.0305	YWHAE YWHAH	
	Calcium signaling pathway	0.0277	YWHAZ YWHAQ CALML5	
	Protein digestion and absorption	<0.0001	COL1A1 COL1A2	
	ECM-receptor interaction	<0.0001	COL2A1 COL6A1	
	Papillomavirus	<0.0001	COL6A2 COL6A3	
	Gap junction	<0.0001	PPP1CC TUBB6	
	Focal adhesion	<0.0001	TUBA4A COL14A1 VCL FLNA TUBB TUBA1A TUBB2B TUBA1B TUBB4B TUBA1C	
	SCC	Cell cycle	<0.0001	ARHGDB CALML3
		Oocyte meiosis	<0.0001	CAMP CTSD SFN
		Neurotrophin signaling pathway	<0.0001	HSP90A1 HSP90AB1
Tuberculosis		0.0160	HSPD1 LSP1 STAT1	
Plant-pathogen interaction		0.0224	HSP90B1 YWHAB YWHAE YWHAH YWHAZ YWHAQ CALML5 CYCS	
Protein digestion and absorption		<0.0001	COL1A1 COL1A2	
Papillomavirus		<0.0001	COL2A1 COL6A1	
ECM-receptor interaction		<0.0001	COL6A2 COL6A3	
Gap junction		<0.0001	TUBA4A COL14A1	
Focal adhesion		<0.0001	TUBA1A TUBA1B TUBB4B TUBB6 TUBA1C TUBB TUBB2B	
SCC compared to CAD		Oocyte meiosis	<0.0001	ALDOA ARHGDB SFN
		Cell cycle	0.002	GPI PFKL PFKF PGM1
		Pentose phosphate pathway	0.002	TUBA4A YWHAB
	Glycolysis/gluconeogenesis	0.003	YWHAE YWHAH	
	Gap junction	0.008	YWHAZ TUBA1A TUBA1B TUBB4B YWHAQ CALML5 TUBB6 TUBA1C TUBB TUBB2B	
	Systemic lupus erythematosus	0.013	APOA1 COL1A1 COL1A2	
	Protein digestion and absorption	0.012	COL2A1 ELANE H2AFX	
	African trypanosomiasis	0.046	HBA2 HBB COL14A1 HIST1H3F HIST1H2AG H2AFY H2AFV ATP5B ATP5D	
	CAD	Systemic lupus erythematosus	0.001	ATP6V1E1 ATP5O
		Cardiac muscle contraction	0.004	CALML3 CAMP
		Oxidative phosphorylation	0.049	ELANE H2AFX
		Tuberculosis	0.076	HSPD1 LSP1 NDUFS4
		Peroxisome	0.084	SCP2 SOD1 TPM1 TPM2 TPM3 TPM4 HIST1H3F HIST1H2AG H2AFY NDUFA13 CYCS H2AFV
Protein digestion and absorption		<0.0001	A2M SERPINC1 CPAMD1	
Papillomavirus		<0.0001	COL2A1 COL6A1	
Gap junction		<0.0001	COL6A2 COL6A3	
ECM-receptor interaction		0.003	KNG1 PKM PLG	
Complement and coagulation cascades		0.011	TUBA4A COL14A1 TUBA1A TUBA1B TUBB4B TUBB6 TUBA1C TUBB TUBB2B	

CC: Cervical cancer; SCC: squamous cervical cancer; CAD: cervical adenocarcinoma.

Table III. Differentially expressed proteins in SCC.

Number	Name	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Cell function
1	CALL5	1.829	0.067	2.073	0.041	0.431	0.747	1.642	0.049	Activating invasion and metastasis (21-23)
2	OSTF1	1.888	0.001	2.062	0.000	1.385	0.046	0.677	0.025	Ossification
3	COTL1	1.801	0.049	1.992	0.039	0.874	0.504	1.118	0.191	Sustaining proliferative signaling (22-24)
4	ZN207	1.895	0.000	1.991	0.000	1.758	0.026	0.233	0.288	Cell division
5	1433B	1.794	0.000	1.988	0.000	0.716	0.387	1.273	0.041	Resisting cell death (23-25)
6	ZN185	1.678	0.082	1.981	0.072	1.212	0.293	0.769	0.357	Activating invasion and metastasis (24-26)
7	1433G	1.750	0.000	1.936	0.000	0.684	0.415	1.252	0.056	Resisting cell death (23-25)
8	PERE	1.602	0.048	1.933	0.037	0.837	0.593	1.097	0.342	Tumor promoting inflammation (25-27)
9	GT251	1.837	0.118	2.063	0.119	0.673	0.660	1.390	0.191	Activating invasion and metastasis (26-28)
10	S10AE	1.898	0.003	2.040	0.003	1.571	0.057	0.469	0.162	Activating invasion and metastasis (27-29)
11	K1C15	1.708	0.010	1.997	0.006	0.630	0.637	1.367	0.165	Activating invasion and metastasis (28-30)
12	FLNB	1.737	0.000	1.960	0.000	1.032	0.308	0.929	0.158	Activating invasion and metastasis (29-31)
13	GLU2B	1.807	0.000	1.921	0.000	1.663	0.024	0.258	0.306	Cellular protein metabolic process
14	1433F	1.738	0.000	1.921	0.000	0.711	0.404	1.210	0.063	Resisting cell death (23-25)
15	PLIN3	1.767	0.000	1.970	0.001	1.228	0.032	0.742	0.021	Resisting cell death (30-32)
16	K2C6C	1.654	0.001	1.935	0.001	0.683	0.544	1.253	0.143	Activating invasion and metastasis (28-30)
17	NONO	1.896	0.001	1.932	0.003	1.585	0.066	0.347	0.236	Sustaining proliferative signaling (31-34)
18	PSA2	1.673	0.055	1.904	0.051	0.776	0.546	1.128	0.230	Resisting cell death (33-35)
19	NEBU	1.824	0.008	2.065	0.006	1.303	0.310	0.762	0.323	Activating invasion and metastasis (34-36)
20	TBCA	1.808	0.000	1.951	0.000	1.456	0.023	0.495	0.022	Resisting cell death (35-37)
21	YBOX3	1.756	0.000	1.948	0.000	1.136	0.083	0.811	0.020	Activating invasion and metastasis (36-38)
22	1433T	1.741	0.000	1.930	0.000	0.672	0.394	1.258	0.039	Resisting cell death (23-25)

¹Protein expression fold-change; ²p-Value according to Gene Set Enrichment Analysis. CC: Cervical cancer; SCC: squamous cervical cancer; CAD: cervical adenocarcinoma; CTRL: control.

SCC, and CAD. This analysis aimed at finding common protein patterns in CC and specific ones in SCC and CAD. BP analysis classified 25% of proteins as proteins related to exocytosis and 24% as components of extracellular vesicle and organelle components. The experimental data that we obtained emphasizes the importance of endo/exocytosis proteins in CC. Recent evidence has suggested that altered protein trafficking routes/networks are preferentially involved in acquiring pro-metastatic traits (77). Endosomal recycling has been reported to play a central role in integrating circuits linked to metastasis and resistance to cell death, the two most overrepresented protein categories in CC found in our study. In particular, the family of Ras-related proteins is involved in acquiring metastatic traits and resistance to apoptosis mediated by endosomal recycling (78).

From the set of 622 proteins identified and quantified in this study (Supplemental Table I), 597 were subjected to GSEA, and were classified according to experimental evidence reported in the bibliography. Differentially expressed SCC proteins showed activating invasion and metastasis as the primary cell function in SCC (Table III), resisting cell death for CAD differentially expressed proteins (Table IV), and resisting cell death and activating invasion and metastasis as the two common cell function categories in SCC and CAD compared to control (Table V).

RRPB1 has been shown to be overexpressed in lymph node metastasis in CC patient samples (39) (Table IV). In addition, RRPB1 is involved in endoplasmic reticulum stress (ERS) release in lung cancer, as a response to increasing tumor cell proliferation functions like protein synthesis,

Table IV. Differentially expressed proteins in CAD.

Number	Name	CC_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CTRL ¹	p-Value ²	CAD_CTRL ¹	p-Value ²	SCC_CAD ¹	p-Value ²	Cell function
1	S10A9	1.726	0.001	1.546	0.001	2.441	0.163	-0.895	0.243	Resisting cell death (37-39)
2	RRBP1	1.597	0.018	1.558	0.039	2.040	0.206	-0.483	0.444	Resisting cell death (38-41)
3	S10AD	1.575	0.054	1.578	0.089	2.153	0.035	-0.575	0.040	Resisting cell death (40-42)
4	H2AX	1.489	0.046	1.397	0.092	2.149	0.065	-0.752	0.000	Resisting cell death (41-44)
5	CEAM5	1.650	0.060	1.338	0.147	2.600	0.313	-1.262	0.410	Activating invasion and metastasis (43-45)
6	GPVI	1.807	0.014	1.732	0.032	2.322	0.287	-0.589	0.520	Activating invasion and metastasis (44-47)
7	S10A6	1.470	0.000	1.327	0.001	2.026	0.205	-0.700	0.358	Activating invasion and metastasis (46-48)
8	ELNE	1.853	0.001	1.870	0.001	2.125	0.196	-0.255	0.558	Tumor promoting inflammation (47-50)
9	CEAM8	1.310	0.141	1.085	0.246	2.014	0.304	-0.929	0.451	Tumor promoting inflammation (49-51)
10	S10AC	1.107	0.091	0.927	0.211	1.936	0.324	-1.009	0.415	Resisting cell death (40-42)
11	CYC	1.610	0.007	1.577	0.011	1.928	0.096	-0.351	0.337	Deregulating cellular energetics (45-47), (50-52)
12	K2C8	1.410	0.023	1.507	0.075	1.910	0.021	-0.403	0.066	Activating invasion and metastasis (51-53)
13	CAMP	1.693	0.052	1.606	0.096	2.339	0.161	-0.732	0.308	Tumor promoting inflammation (52-55)
14	CYTA	1.569	0.004	1.346	0.026	2.336	0.120	-0.990	0.198	Evading growth suppressors (54-56)

¹Protein expression fold-change; ²p-Value according to Gene Set Enrichment Analysis. CC: Cervical cancer; SCC: squamous cervical cancer; CAD: cervical adenocarcinoma; CTRL: control.

folding, and secretion. This was shown by the expression of the ectopic protein RRPB1 in non-small cell lung cancer cell lines when ERS was induced using tunicamycin (40). Furthermore, it has been reported that RRPB1 is highly expressed in prostate cancer and correlates with poor prognosis, and thus has been suggested as a potential biomarker in PCa (79) and ovarian cancer (80). Patients with higher expression of RRPB1 have been reported to have worse overall survival; hence RRPB1 has also been suggested as a target for epithelial ovarian cancer treatment (80).

RCN3 is a Ca²⁺ binding protein in the secretory pathway and is located in the ER (81). To date, the evidence of RCN3 in relation to cancer development is insufficient compared to reticulocalbin 1 (RCN1). RCN1 is a member of the Ca²⁺ binding protein family expressed in the highly metastatic prostate cancer cell line PC-3 (82). RCN1 mRNA expression increased in the highly invasive breast cancer cell line MDA-MB-435, compared to poorly invasive MCF-7 (83). Furthermore, RCN1 has been suggested as a potential biomarker for renal cell carcinoma when discovered by proteomic approach and validated by IHC in 21 of 24 renal cell cancer paired tissue samples (84). In prostate cancer, RCN1 expression arose in bone marrow endothelial cells (BMECs), increased in the presence of tumor necrosis factor α (TNF- α), a pro-inflammatory cytokine often expressed in prostate cancer

patients with very advanced metastasis (85). RCN2 is another member of the reticulocalbin family which, when detected overexpressed in hepatocellular cell cancer (HCC), has been involved in cell proliferation and tumor growth, presumably by regulating epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway (86). RCN1 and RCN2, in contrast with RCN3, have been extensively studied. This notion guided us to explore the role of RCN3 in oncogenesis, especially in CC.

In the present study, we found that the expression of the RCN3 protein was upregulated in all CC analysis sets when compared to the control (Table V). IHC analysis showed positive expression of RCN3 in 5/9 samples. Moreover, RCN3-overexpressing HeLa cells inoculated in female nu/nu mice induced a moderate increased tumor growth compared to HeLa mock cells, at day 47. RCN3 has been identified as a negative regulator of collagen production in cardiac fibrosis. CRISPR/Cas9-mediated activation of RCN-3 decreased collagen production in human cardiac fibroblasts (62). In this study, down-regulation of collagen type I alpha 1 chain (COL1A1) and collagen alpha-2(I) chain (COL1A2) was observed in CC samples, compared to control. Previous studies have shown that collagen expression depends on the tumor stage. Specifically, normal breast fibroblasts in co-cultures with breast cancer cell lines derived from late-stage breast cancer

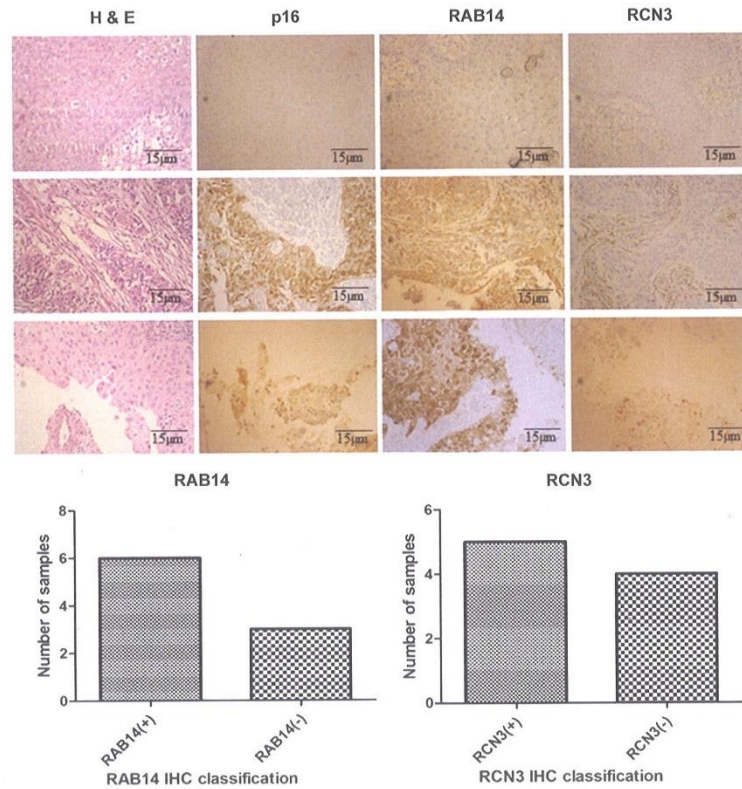


Figure 5. Immunohistochemical (IHC) assay for detection of RAB14 and RCN3 protein expression; p16 was considered positive control), RAB14 and RCN3. Six out of 9 samples were positive for RAB14 protein and 5 out of 9 slides from CC samples were positive to RCN3 protein. H&E, Hematoxylin-eosin.

(MDA-MB-231, MCF-7, T47D, and ZR-75-1) have been shown to exhibit a greater than 50% reduction in collagen protein. Furthermore, in breast cancer tissue samples, Northern analysis has revealed that collagen mRNA levels were elevated in stage I tumors compared to adjacent normal breast tissues, while decreased in stage II and III breast tumors (87). Therefore, we suggest that RCN3 may participate as a negative regulator of collagen production in CC and modulates the dynamic collagen concentration from the early to late stages of tumor development. In the early stages, the collagen concentration tends to increase compared to the adjacent extracellular matrix (ECM), this protein in cancer has been

studied, and evidence shows that collagen type I promotes resistance to apoptosis in fetal calf serum-starved MCF-7 and T-47D cells (88). Furthermore, E-cadherin gene expression has been found to be downregulated by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines (89). In addition, pathological conditions such as cancer cell proliferation and metastatic events have been associated with defective E-cadherin-mediated cell-cell adhesion (90). Therefore, RCN3 may be implicated in the modulation of collagen production and E-cadherin gene expression in CC cells.

A quarter of all proteins identified and quantified in CC are related to exocytosis. Recent lines of evidence support

Table V. Common proteins between SCC and CAD.

Number	Name	CC_CTRL1	p-Value ²	SCC_CTRL1	p-Value ²	CAD_CTRL1	p-Value ²	SCC_CAD1	p-Value ²	Cell function
1	ICAL	2.575	0.000	2.638	0.000	2.685	0.174	-0.047	0.774	Activating invasion and metastasis (55-57)
2	EFHD2	2.190	0.000	2.342	0.000	1.916	0.078	0.426	0.166	Resisting cell death (56-58)
3	SAP	2.103	0.001	2.029	0.007	2.810	0.019	-0.781	0.002	Resisting cell death (57-59)
4	IF4H	2.029	0.014	2.047	0.009	2.142	0.032	-0.095	0.299	Resisting cell death (58-61)
5	ML12B	1.971	0.000	2.103	0.001	1.993	0.001	0.110	0.898	Muscle contraction
6	RS28	2.171	0.000	2.285	0.000	1.953	0.072	0.333	0.325	Cytoplasmic translation
7	PRTN3	2.137	0.013	2.223	0.008	2.088	0.089	0.135	0.851	Antimicrobial humoral response
8	CH10	2.037	0.000	1.910	0.000	2.663	0.012	-0.753	0.000	Activating invasion and metastasis (60-62)
9	RCN3	1.943	0.042	1.940	0.046	1.975	0.192	-0.034	0.938	Activating invasion and metastasis (61-64)
10	GVIN1	1.919	0.000	1.974	0.000	2.039	0.092	-0.065	0.561	Tumor promoting inflammation (63-65)
11	PERM	2.340	0.005	2.036	0.020	3.069	0.020	-1.034	0.018	Tumor promoting inflammation (64-67)
12	TPD54	2.320	0.000	2.323	0.000	2.521	0.090	-0.199	0.397	Deregulating cellular energetics (66-69)
13	SRSF2	2.299	0.090	2.396	0.074	1.991	0.131	0.406	0.154	mRNA processing
14	HEBP2	2.301	0.001	2.361	0.002	2.535	0.012	-0.173	0.197	negative regulation of mitochondrial membrane potential
15	TPM3L	2.155	0.000	2.295	0.000	1.983	0.048	0.312	0.262	Actin filament organization
16	ANXA3	2.236	0.011	2.430	0.007	1.951	0.059	0.479	0.201	Inducing angiogenesis (68-71)
17	MARCS	2.795	0.000	3.010	0.000	2.296	0.260	0.714	0.347	Resisting cell death (70-73)
18	MIME	-2.668	0.288	-2.778	0.283	-2.074	0.284	-0.704	0.695	Negative regulation of smooth muscle cell proliferation
19	COEA1	-2.670	0.303	-2.704	0.302	-2.624	0.291	-0.079	0.965	Cell-cell adhesion
20	DESM	-2.558	0.291	-2.456	0.291	-2.595	0.272	0.139	0.973	Inducing angiogenesis (72-74)
21	KCRB	-2.035	0.000	-1.972	0.000	-2.108	0.071	0.136	0.893	Deregulating cellular energetics (73-75)
22	CO6A3	-1.950	0.230	-1.959	0.233	-2.349	0.183	0.390	0.627	Cell adhesion
23	NQO1	-2.056	0.076	-1.972	0.074	-2.693	0.075	0.722	0.040	Cell redox homeostasis
24	CO6A1	-2.209	0.333	-2.140	0.340	-2.908	0.294	0.768	0.518	Cell adhesion
25	CO6A2	-2.387	0.167	-2.364	0.168	-3.312	0.145	0.948	0.219	Cell adhesion
26	TGM2	-2.501	0.090	-2.201	0.087	-3.232	0.094	1.032	0.038	Activating invasion and metastasis (74-76)
27	ALBU	-2.182	0.085	-2.098	0.086	-3.099	0.056	1.001	0.202	Negative regulation of apoptotic process

¹Protein expression fold-change; ²p-Value according to Gene Set Enrichment Analysis. CC: Cervical cancer; SCC: squamous cervical cancer; CAD: cervical adenocarcinoma; CTRL: control.

the participation of exocytosis in the acquisition of metastatic traits and resistance to apoptosis through Ras-related protein family as endosomal recycling mediators. RAB14 belongs to a family of regulator proteins that orchestrate vesicle trafficking events, including vesicle formation, vesicle movement, and vesicle binding to their target membrane (91). RAB14 was overexpressed in SqPD16 compared to control, and 6/9 CC samples were positive to RAB14 by

IHC. RAB14 acts as a molecular switch between inactive and active states based on its binding to guanosine diphosphate (GDP) and guanosine triphosphate (GTP), respectively, to activate downstream pathways. RAB14 is up-regulated in gastric cancer tumor tissues compared to adjacent non-tumor tissues (92). At post-translational level (miRNAs), RAB protein has been suggested as an oncogene in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) due to the

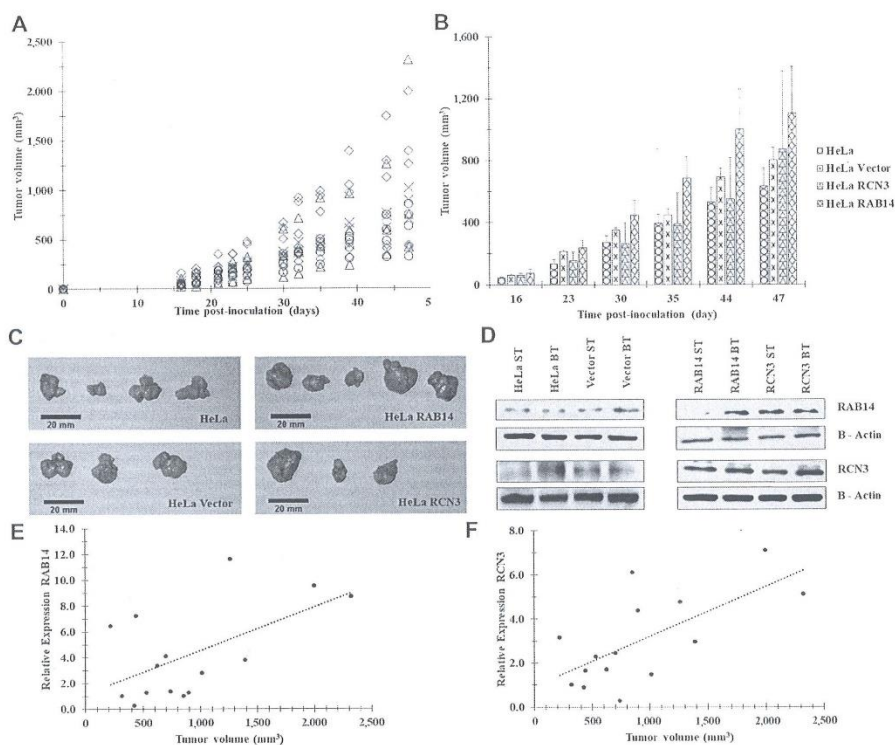


Figure 6. Tumor xenograft model: RAB14- and RCN3- overexpressing HeLa cells were separately inoculated subcutaneously into female *nu/nu* mice. Tumor growth curves measured for wild type, RAB14, RCN3, or vector expressing HeLa cells (A). Bar graph showing tumor volume; values are presented as mean±SD (B). Photos of the excised tumors from each group (C). The expression of RAB14 and RCN3 was analyzed by western blot assay in smallest tumor (ST) and biggest tumor obtained (BT); b-actin was used as an internal control (D). Relative protein expression of RAB14 (E) and RCN3 (F) was measured by western blot assay considering tumor volume; b-actin was used as internal control.

frequent loss of its negative miRNA regulators miR-451 and miR-338-3p (93, 94). Evidence provided by ectopic expression of miRNA-451 showed negative effects on *in vitro* proliferation and colony formation of NSCL cells and the development of tumors in nude mice by enhancing apoptosis. Ectopic expression of miR-451 inhibited RAB14 protein expression, and RAB14 restoration partially attenuated tumor suppressor function of miR-451 in NSCLC. RAB14 may be a critical regulator for cell proliferation in cancer (93). Furthermore, analyses performed on RAB14-positive vesicles confirmed that 38 cargo proteins were directly involved in metastasis. It was proposed that RAB14

participates as an active metastasis mediator by facilitating endosomal recycling (95).

In our xenograft murine model, RAB14 overexpression showed a positive correlation with tumor growth. According to previous experiments in 3T3-L1 adipocytes, optimal levels of RAB14 direct the traffic of glucose by the transporter type 4 (GLUT4). This was demonstrated when depletion of endogenous RAB14 by shRNA-mediated knockdown inhibited sorting of GLUT4 to an internal compartment(s) by means of vesicles (96). GLUT4 belongs to a family of glucose transporter isoforms distributed in different organs. GLUT1 and GLUT3 are found in neurons, astrocytes, fat, and muscle tissues (97),

GLUT2 in enterocytes, kidney, and liver cells (98). GLUT4 is found in muscle and fat cells and is responsible for 80% of glucose intake in skeletal muscle (99). RAB14 overexpression in HeLa cells suggest RAB14 may orchestrate glucose recruitment by translocation of more GLUT4 glucose transporters from intracellular compartments (Golgi membranes and endosomes) to the cell surface, thus sustaining abnormal cellular energy that contributes to tumor growth (100) as we experimentally observed. This new role for RAB14 in cervical cancer may provide a new direction in prognosis or therapy.

Conclusion

RAB14 and RCN3 were indicated as potential biomarkers and therapeutic targets in CC. SCC and CAD proteomic profiles offer valuable information that may serve to identify novel biomarkers associated with disease prognosis and new potential therapeutic targets for the treatment of CC.

Supplementary Material

Supplemental Figure 1, Supplemental Tables I, II, and III can be consulted in the following link: <http://sinik.ccg.unam.mx/PGFP/Ramirez.AR2021.No399-R/>

Conflicts of Interest

The Authors declare that the research was carried out in the absence of any commercial or financial relationship that could potentially be considered as conflicts of interest.

Authors' Contributions

SEG conceptualized the research. ART, JG, AGC and SEG conceived and designed the experiments. ART, SC, JG, GR, and HAVG performed the experiments. ART, LGC and ESB analyzed the data. SEG and AGC contributed resources and equipment. ART and SEG wrote the paper. All Authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Alberto Ramírez-Torres is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 255711 from CONACYT. We also thank Alejandro Aguilar Vera for his support in the statistical analysis, Michael F. Dunn for critical reading and language editing, and the Unidad de Modelos Biológicos IIB-UNAM for their support in production and handling the laboratory animals.

Funding

Part of this work was supported by DGAPA-PAPIIT grant IN-207519.

Availability of Data and Materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65(2): 87-108, 2015. PMID: 25651787. DOI: 10.3322/caac.21262
- 2 Safacian M, Solomon D and Castle PE: Cervical cancer prevention – cervical screening: science in evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am* 34(4): 739-60, ix, 2007. PMID: 18061867. DOI: 10.1016/j.ogc.2007.09.004
- 3 Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, de Sanjosé S and authors of ICO Monograph Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases Vaccine: Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 31(Suppl 7): H1-31, 2013. PMID: 24332295. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.10.003
- 4 Lee YY, Choi CH, Kim TJ, Lee JW, Kim BG, Lee JH and Bae DS: A comparison of pure adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix after radical hysterectomy in stage IB-IIA. *Gynecol Oncol* 120(3): 439-443, 2011. PMID: 21145099. DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.11.022
- 5 Katanyoo K, Sanguanrungrasirikul S and Manusirivithaya S: Comparison of treatment outcomes between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol* 125(2): 292-296, 2012. PMID: 22293041. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.01.034
- 6 International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer: Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer* 120(4): 885-891, 2007. PMID: 17131323. DOI: 10.1002/ijc.22357
- 7 Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR and Key CR: The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States – a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol* 78(2): 97-105, 2000. PMID: 10926787. DOI: 10.1006/gyno.2000.5826
- 8 Molijn A, Jenkins D, Chen W, Zhang X, Pirog E, Enqi W, Liu B, Schmidt J, Cui J, Qiao Y, Quint W and Chinese HPV Typing Group: The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma. *Int J Cancer* 138(2): 409-416, 2016. PMID: 26334557. DOI: 10.1002/ijc.29722
- 9 An HJ, Kim KR, Kim IS, Kim DW, Park MH, Park IA, Suh KS, Seo EJ, Sung SH, Sohn JH, Yoon HK, Chang ED, Cho HI, Han JY, Hong SR and Ahn GH: Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of cervical adenocarcinoma: a population-based study. *Mod Pathol* 18(4): 528-534, 2005. PMID: 15502807. DOI: 10.1038/modpathol.3800316
- 10 Berrington de González A, Sweetland S and Green J: Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the

- cervix: a meta-analysis. *Br J Cancer* 90(9): 1787-1791, 2004. PMID: 15150591. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601764
- 11 Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS and Burk RD: PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 35(6): 1304-1310, 1997. PMID: 9163434. DOI: 10.1128/jcm.35.6.1304-1310.1997
 - 12 Shruthi BS, Vinodhkumar P and Selvamani: Proteomics: A new perspective for cancer. *Adv Biomed Res* 5: 67, 2016. PMID: 27169098. DOI: 10.4103/2277-9175.180636
 - 13 Solomon D: The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis: an overview. *Int J Gynecol Pathol* 10(4): 323-325, 1991. PMID: 1774102. DOI: 10.1097/00004347-199110000-00003
 - 14 Kruger NJ: The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32: 9-15, 1994. PMID: 7951753. DOI: 10.1385/0-89603-268-X-9
 - 15 Stekhoven DJ and Bühlmann P: MissForest—non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics* 28(1): 112-118, 2012. PMID: 22039212. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr597
 - 16 Lê S, Josse J and Husson F: Factominer: An R package for multivariate analysis. *J Stat Softw* 25(1): 1-18, 2008. DOI: 10.18637/jss.v025.i01
 - 17 Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J and Vulpe CD: Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8(9): 1744-1749, 2008. PMID: 18442176. DOI: 10.1002/psp.200700919
 - 18 Abdi H and Williams L: Principal component analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2(4): 433-459, 2021. DOI: 10.1002/wics.101
 - 19 Lever J, Krzywinski M and Altman N: Principal component analysis. *Nature Methods* 14(7): 641-642, 2021. DOI: 10.1038/nmeth.4346
 - 20 Wang M, Zhao Y and Zhang B: Efficient test and visualization of multi-set intersections. *Sci Rep* 5: 16923, 2015. PMID: 26603754. DOI: 10.1038/srep16923
 - 21 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES and Mesirov JP: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(43): 15545-15550, 2005. PMID: 16199517. DOI: 10.1073/pnas.0506580102
 - 22 Kitazawa S, Takaoka Y, Ueda Y and Kitazawa R: Identification of calmodulin-like protein 5 as tumor-suppressor gene silenced during early stage of carcinogenesis in squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Int J Cancer* 149(6): 1358-1368, 2021. PMID: 33997976. DOI: 10.1002/ijc.33687
 - 23 Shao S, Fan Y, Zhong C, Zhu X and Zhu J: Coactosin-like protein (COTL1) promotes glioblastoma (GBM) growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Manag Res* 12: 10909-10917, 2020. PMID: 33154670. DOI: 10.2147/CMAR.S246030
 - 24 Liu J, Cao S, Ding G, Wang B, Li Y, Zhao Y, Shao Q, Feng J, Liu S, Qin L and Xiao Y: The role of 14-3-3 proteins in cell signalling pathways and virus infection. *J Cell Mol Med* 25(9): 4173-4182, 2021. PMID: 33793048. DOI: 10.1111/jcmm.16490
 - 25 Vanaja DK, Cheville JC, Iturria SJ and Young CY: Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 63(14): 3877-3882, 2003. PMID: 12873976.
 - 26 Sakkal S, Miller S, Apostolopoulos V and Nurgali K: Eosinophils in cancer: favourable or unfavourable? *Curr Med Chem* 23(7): 650-666, 2016. PMID: 26785997. DOI: 10.2174/0929867323666160119094313
 - 27 Qi Y and Xu R: Roles of PLODs in collagen synthesis and cancer progression. *Front Cell Dev Biol* 6: 66, 2018. PMID: 30003082. DOI: 10.3389/fcell.2018.00066
 - 28 Wang X, Yang J, Qian J, Liu Z, Chen H and Cui Z: S100A14, a mediator of epithelial-mesenchymal transition, regulates proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cells. *Am J Cancer Res* 5(4): 1484-1495, 2015. PMID: 26101712.
 - 29 Han W, Hu C, Fan ZJ and Shen GL: Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients. *Sci Rep* 11(1): 1023, 2021. PMID: 33441834. DOI: 10.1038/s41598-020-80336-8
 - 30 Bandaru S, Zhou AX, Rouhi P, Zhang Y, Bergo MO, Cao Y and Akyürek LM: Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis* 3: e119, 2014. PMID: 25244493. DOI: 10.1038/oncsis.2014.33
 - 31 Zhang X, Su L and Sun K: Expression status and prognostic value of the perilipin family of genes in breast cancer. *Am J Transl Res* 13(5): 4450-4463, 2021. PMID: 34150026.
 - 32 Li D, Chen Y, Mei H, Jiao W, Song H, Ye L, Fang E, Wang X, Yang F, Huang K, Zheng L and Tong Q: Ets-1 promoter-associated noncoding RNA regulates the NONO/ERG/Ets-1 axis to drive gastric cancer progression. *Oncogene* 37(35): 4871-4886, 2018. PMID: 29773901. DOI: 10.1038/s41388-018-0302-4
 - 33 Kim SJ, Ju JS, Kang MH, Eun JW, Kim YH, Raninga PV, Khanna KK, Györfy B, Pack CG, Han HD, Lee HJ, Gong G, Shin Y, Mills GB, Eyun SI and Park YY: RNA-binding protein NONO contributes to cancer cell growth and confers drug resistance as a theranostic target in TNBC. *Theranostics* 10(18): 7974-7992, 2020. PMID: 32724453. DOI: 10.7150/thno.45037
 - 34 Morozov AV and Karpov VL: Proteasomes and several aspects of their heterogeneity relevant to cancer. *Front Oncol* 9: 761, 2019. PMID: 31456945. DOI: 10.3389/fonc.2019.00761
 - 35 Zhang Y and Zhang L: Knockdown of LASP2 inhibits the proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells. *J Cell Biochem* 120(9): 15389-15396, 2019. PMID: 31026088. DOI: 10.1002/jcb.28806
 - 36 Hage-Sleiman R, Herveau S, Matera EL, Laurier JF and Dumontet C: Tubulin binding cofactor C (TBCC) suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells. *BMC Cancer* 10: 135, 2010. PMID: 20384997. DOI: 10.1186/1471-2407-10-135
 - 37 Pang T, Li M, Zhang Y, Yong W, Kang H, Yao Y and Hu X: Y Box-binding protein 1 promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis of cervical cancer via enhancing the expressions of snail. *Int J Gynecol Cancer* 27(8): 1753-1760, 2017. PMID: 28708785. DOI: 10.1097/IGC.0000000000001066
 - 38 Zhao C, Lu E, Hu X, Cheng H, Zhang JA and Zhu X: S100A9 regulates cisplatin chemosensitivity of squamous cervical cancer cells and related mechanism. *Cancer Manag Res* 10: 3753-3764, 2018. PMID: 30288106. DOI: 10.2147/CMAR.S168276
 - 39 Zhu J, Zhao R, Xu W, Ma J, Ning X, Ma R and Meng F: Correlation between reticulum ribosome-binding protein 1 (RRBP1) overexpression and prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *Biosci Trends* 14(4): 279-284, 2020. PMID: 32536673. DOI: 10.5582/bst.2020.03136

- 40 Tsai HY, Yang YF, Wu AT, Yang CJ, Liu YP, Jan YH, Lee CH, Hsiao YW, Yeh CT, Shen CN, Lu PJ, Huang MS and Hsiao M: Endoplasmic reticulum ribosome-binding protein 1 (RRBP1) overexpression is frequently found in lung cancer patients and alleviates intracellular stress-induced apoptosis through the enhancement of GRP78. *Oncogene* 32(41): 4921-4931, 2013. PMID: 23318453. DOI: 10.1038/onc.2012.514
- 41 Hua X, Zhang H, Jia J, Chen S, Sun Y and Zhu X: Roles of S100 family members in drug resistance in tumors: Status and prospects. *Biomed Pharmacother* 127: 110156, 2020. PMID: 32335300. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110156
- 42 Banáth JP, Macphail SH and Olive PL: Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 64(19): 7144-7149, 2004. PMID: 15466212. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1433
- 43 Weyemi U, Redon CE, Choudhuri R, Aziz T, Maeda D, Boufraqueh M, Parekh PR, Sethi TK, Kasoji M, Abrams N, Merchant A, Rajapakse VN and Bonner WM: The histone variant H2A.X is a regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun* 7: 10711, 2016. PMID: 26876487. DOI: 10.1038/ncomms10711
- 44 Gebauer F, Wicklein D, Horst J, Sundermann P, Maar H, Streichert T, Tachezy M, Izbicki JR, Bockhorn M and Schumacher U: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as biomarkers in pancreatic cancer. *PLoS One* 9(11): e113023, 2014. PMID: 25409014. DOI: 10.1371/journal.pone.0113023
- 45 Jain S, Russell S and Ware J: Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models. *J Thromb Haemost* 7(10): 1713-1717, 2009. PMID: 19624454. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03559.x
- 46 Herrmann PC, Gillespie JW, Charboneau L, Bichsel VE, Pawletz CP, Calvert VS, Kohn EC, Emmert-Buck MR, Liotta LA and Petricoin EF 3rd: Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics* 3(9): 1801-1810, 2003. PMID: 12973739. DOI: 10.1002/pmic.200300461
- 47 Nipp M, Elsner M, Balluff B, Meding S, Sarioglu H, Ueffing M, Rausser S, Unger K, Höfler H, Walch A and Zitzelsberger H: S100-A10, thioredoxin, and S100-A6 as biomarkers of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis identified by MALDI imaging. *J Mol Med (Berl)* 90(2): 163-174, 2012. PMID: 21938494. DOI: 10.1007/s00109-011-0815-6
- 48 Jaillon S, Ponzetta A, Di Mitri D, Santoni A, Bonocchi R and Mantovani A: Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 20(9): 485-503, 2020. PMID: 32694624. DOI: 10.1038/s41568-020-0281-y
- 49 Sato T, Takahashi S, Mizumoto T, Harao M, Akizuki M, Takasugi M, Fukutomi T and Yamashita J: Neutrophil elastase and cancer. *Surg Oncol* 15(4): 217-222, 2006. PMID: 17320378. DOI: 10.1016/j.suronc.2007.01.003
- 50 Zhao L, Xu S, Fjaertoft G, Pauksen K, Håkansson L and Venge P: An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities *in vivo*. *J Immunol Methods* 293(1-2): 207-214, 2004. PMID: 15541289. DOI: 10.1016/j.jim.2004.08.009
- 51 Vaughn AE and Deshmukh M: Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 10(12): 1477-1483, 2008. PMID: 19029908. DOI: 10.1038/ncb1807
- 52 Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, Joos U and Buerger H: Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* 6: 10, 2006. PMID: 16412231. DOI: 10.1186/1471-2407-6-10
- 53 Minns D, Smith KJ, Alessandrini V, Hardisty G, Melrose L, Jackson-Jones L, MacDonald AS, Davidson DJ and Gwyer Findlay E: The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat Commun* 12(1): 1285, 2021. PMID: 33627652. DOI: 10.1038/s41467-021-21533-5
- 54 Madanchi H, Shoushtari M, Kashani HH and Sardari S: Antimicrobial peptides of the vaginal innate immunity and their role in the fight against sexually transmitted diseases. *New Microbes New Infect* 34: 100627, 2019. PMID: 31993204. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100627
- 55 Ma Y, Chen Y, Li Y, Grün K, Berndt A, Zhou Z and Petersen I: Cystatin A suppresses tumor cell growth through inhibiting epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer. *Oncotarget* 9(18): 14084-14098, 2017. PMID: 29581829. DOI: 10.18632/oncotarget.23505
- 56 Zhang S, Deen S, Storr SJ, Chondrou PS, Nicholls H, Yao A, Rungtsakulert P and Martin SG: Calpain system protein expression and activity in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 145(2): 345-361, 2019. PMID: 30448882. DOI: 10.1007/s00432-018-2794-2
- 57 Thylur RP, Gowda R, Mishra S and Jun CD: Swiprosin-1: Its expression and diverse biological functions. *J Cell Biochem* 119(1): 150-156, 2018. PMID: 28590012. DOI: 10.1002/jcb.26199
- 58 Lee TJ, Sartor O, Luftig RB and Koochekpour S: Saposin C promotes survival and prevents apoptosis via PI3K/Akt-dependent pathway in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 3: 31, 2004. PMID: 15548330. DOI: 10.1186/1476-4598-3-31
- 59 Bitterman PB and Polunovsky VA: eIF4E-mediated translational control of cancer incidence. *Biochim Biophys Acta* 1849(7): 774-780, 2015. PMID: 25263391. DOI: 10.1016/j.bbaggerm.2014.09.007
- 60 Vaysse C, Philippe C, Martineau Y, Quelen C, Hieblot C, Renaud C, Nicaise Y, Desquesnes A, Pannese M, Filleron T, Escourrou G, Lawson M, Rintoul RC, Delisle MB, Pyronnet S, Brousset P, Prats H and Touriol C: Key contribution of eIF4E-mediated translational control in tumor promotion. *Oncotarget* 6(37): 39924-39940, 2015. PMID: 26498689. DOI: 10.18632/oncotarget.5442
- 61 Cappello F, Bellafiore M, David S, Anzalone R and Zummo G: Ten kilodalton heat shock protein (HSP10) is overexpressed during carcinogenesis of large bowel and uterine exocervix. *Cancer Lett* 196(1): 35-41, 2003. PMID: 12860287. DOI: 10.1016/s0304-3835(03)00212-x
- 62 Martínez-Martínez E, Ibarrola J, Fernández-Celis A, Santamaria E, Fernández-Irigoyen J, Rossignol P, Jaisser F and López-Andrés N: Differential proteomics identifies reticulocalbin-3 as a novel negative mediator of collagen production in human cardiac fibroblasts. *Sci Rep* 7(1): 12192, 2017. PMID: 28939891. DOI: 10.1038/s41598-017-12305-7
- 63 Tsuji A, Kikuchi Y, Sato Y, Koide S, Yuasa K, Nagahama M and Matsuda Y: A proteomic approach reveals transient association of reticulocalbin-3, a novel member of the CREC family, with the precursor of subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. *Biochem J* 396(1): 51-59, 2006. PMID: 16433634. DOI: 10.1042/BJ20051524

- 64 Pierangeli A, Degener AM, Ferreri ML, Riva E, Rizzo B, Turriziani O, Luciani S, Scagnolari C and Antonelli G: Interferon-induced gene expression in cervical mucosa during human papillomavirus infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24(1): 217-223, 2011. PMID: 21496405. DOI: 10.1177/039463201102400126
- 65 Preci DP, Almeida A, Weiler AL, Mukai Franciosi ML and Cardoso AM: Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 31(2): 265-271, 2021. PMID: 33109527. DOI: 10.1136/ijgc-2020-001587
- 66 Lages EL, Belo AV, Andrade SP, Rocha MÁ, de Freitas GF, Lamaita RM, Traiman P and Silva-Filho AL: Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomed Pharmacother* 65(7): 496-499, 2011. PMID: 22004597. DOI: 10.1016/j.biopha.2011.06.010
- 67 Zhuang Y, Ly RC, Frazier CV, Yu J, Qin S, Fan XY, Goetz MP, Boughey JC, Weinsilboum R and Wang L: The novel function of tumor protein D54 in regulating pyruvate dehydrogenase and metformin cytotoxicity in breast cancer. *Cancer Metab* 7: 1, 2019. PMID: 30697423. DOI: 10.1186/s40170-018-0193-4
- 68 Ren L, Chen J and Zhang X: Increased expression of tumor protein D54 is associated with clinical progression and poor prognosis in patients with prostate cancer. *Oncol Lett* 14(6): 7739-7744, 2017. PMID: 29250174. DOI: 10.3892/ol.2017.7214
- 69 Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Anfossi S, Thomas M, Burnett A, Kay HH, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr and Pecorelli S: Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 331(2): 269-291, 2005. PMID: 15629771. DOI: 10.1016/j.virol.2004.09.045
- 70 Meadows SM and Cleaver O: Annexin A3 regulates early blood vessel formation. *PLoS One* 10(7): e0132580, 2015. PMID: 26182056. DOI: 10.1371/journal.pone.0132580
- 71 Li Y, Gao M, Xu LN, Yin LH, Qi Y and Peng JY: MicroRNA-142-3p attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via targeting of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *Pharmacol Res* 156: 104783, 2020. PMID: 32224251. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104783
- 72 Iyer DN, Faruq O, Zhang L, Rastgoo N, Liu A and Chang H: Pathophysiological roles of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) in hematological malignancies. *Biomark Res* 9(1): 34, 2021. PMID: 33958003. DOI: 10.1186/s40364-021-00286-9
- 73 Wu MP, Young MJ, Tzeng CC, Tzeng CR, Huang KF, Wu LW and Chou CY: A novel role of thrombospondin-1 in cervical carcinogenesis: inhibit stroma reaction by inhibiting activated fibroblasts from invading cancer. *Carcinogenesis* 29(6): 1115-1123, 2008. PMID: 18413367. DOI: 10.1093/carcin/bgn077
- 74 Mooney SM, Rajagopalan K, Williams BH, Zeng Y, Christudass CS, Li Y, Yin B, Kulkarni P and Getzenberg RH: Creatine kinase brain overexpression protects colorectal cells from various metabolic and non-metabolic stresses. *J Cell Biochem* 112(4): 1066-1075, 2011. PMID: 21308735. DOI: 10.1002/jcb.23020
- 75 Caffarel MM, Chattopadhyay A, Araujo AM, Bauer J, Scarpini CG and Coleman N: Tissue transglutaminase mediates the pro-malignant effects of oncostatin M receptor over-expression in cervical squamous cell carcinoma. *J Pathol* 231(2): 168-179, 2013. PMID: 23765377. DOI: 10.1002/path.4222
- 76 Jung EJ, Byun JM, Kim YN, Lee KB, Sung MS, Kim KT and Jeong DH: Cervical adenocarcinoma has a poorer prognosis and a higher propensity for distant recurrence than squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 27(6): 1228-1236, 2017. PMID: 28604449. DOI: 10.1097/IGC.0000000000001009
- 77 Nusinow DP, Szpyt J, Ghandi M, Rose CM, McDonald ER 3rd, Kalocsay M, Jané-Valbuena J, Gelfand E, Schweppe DK, Jedrychowski M, Golji J, Porter DA, Rejtar T, Wang YK, Kryukov GV, Stegmeier F, Erickson BK, Garraway LA, Sellers WR and Gygi SP: Quantitative proteomics of the cancer cell line encyclopedia. *Cell* 180(2): 387-402.e16, 2020. PMID: 31978347. DOI: 10.1016/j.cell.2019.12.023
- 78 Lanzetti L and Di Fiore PP: Behind the scenes: Endo/exocytosis in the acquisition of metastatic traits. *Cancer Res* 77(8): 1813-1817, 2017. PMID: 28373181. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3403
- 79 Li T, Wang Q, Hong X, Li H, Yang K, Li J and Lei B: RRBPI is highly expressed in prostate cancer and correlates with prognosis. *Cancer Manag Res* 11: 3021-3027, 2019. PMID: 31118771. DOI: 10.2147/CMAR.S186632
- 80 Ma J, Ren S, Ding J, Liu S, Zhu J, Ma R and Meng F: Expression of RRBPI in epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *Biosci Rep* 39(7): BSR20190656, 2019. PMID: 31285390. DOI: 10.1042/BSR20190656
- 81 Fukuda T, Oyamada H, Isshiki T, Maeda M, Kusakabe T, Hozumi A, Yamaguchi T, Igarashi T, Hasegawa H, Seidoh T and Suzuki T: Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. *J Histochem Cytochem* 55(4): 335-345, 2007. PMID: 17189526. DOI: 10.1369/jhc.6A6943.2006
- 82 Cooper CR, Graves B, Pruitt F, Chaib H, Lynch JE, Cox AK, Sequeria L, van Golen KL, Evans A, Czymmek K, Bullard RS, Donald CD, Sol-Church K, Gendernalik JD, Weksler B, Farach-Carson MC, Macoska JA, Sikes RA and Pienta KJ: Novel surface expression of reticulocalbin 1 on bone endothelial cells and human prostate cancer cells is regulated by TNF-alpha. *J Cell Biochem* 104(6): 2298-2309, 2008. PMID: 18561328. DOI: 10.1002/jcb.21785
- 83 Liu Z, Brattain MG and Appert H: Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun* 231(2): 283-289, 1997. PMID: 9070264. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6083
- 84 Giribaldi G, Barbero G, Mandili G, Daniele L, Khadjavi A, Notarpietro A, Ulliers D, Prato M, Minerò VG, Battaglia A, Allasia M, Bosio A, Sapino A, Gontero P, Frea B, Fontana D and Destefanis P: Proteomic identification of Reticulocalbin 1 as potential tumor marker in renal cell carcinoma. *J Proteomics* 91: 385-392, 2013. PMID: 23916412. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.07.018
- 85 Furue M: Epithelial tumor, invasion and stroma. *Ann Dermatol* 23(2): 125-131, 2011. PMID: 21747608. DOI: 10.5021/ad.2011.23.2.125
- 86 Ding D, Huang H, Jiang W, Yu W, Zhu H, Liu J, Saiyin H, Wu J, Huang H, Jiang S and Yu L: Reticulocalbin-2 enhances hepatocellular carcinoma proliferation via modulating the EGFR-ERK pathway. *Oncogene* 36(48): 6691-6700, 2017. PMID: 28745317. DOI: 10.1038/nc.2017.230
- 87 Fenhalls G, Geyp M, Dent DM and Parker MF: Breast tumour cell-induced down-regulation of type I collagen mRNA in fibroblasts. *Br J Cancer* 81(7): 1142-1149, 1999. PMID: 10584874. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690821

- 88 Badaoui M, Mimsy-Julienne C, Saby C, Van Gulick L, Peretti M, Jeannesson P, Morjani H and Ouadid-Ahidouch H: Collagen type I promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orail calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget* 9(37): 24653-24671, 2017. PMID: 29872495. DOI: 10.18632/oncotarget.19065
- 89 Menke A, Philippi C, Vogelmann R, Seidel B, Lutz MP, Adler G and Wedlich D: Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and type III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 61(8): 3508-3517, 2001. PMID: 11309315.
- 90 Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS and Mareel M: Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 439(6): 725-751, 2001. PMID: 11787845. DOI: 10.1007/s004280100516
- 91 Zerial M and McBride H: Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 107-117, 2001. PMID: 11252952. DOI: 10.1038/35052055
- 92 Guo B, Wang W, Zhao Z, Li Q, Zhou K, Zhao L, Wang L, Yang J and Huang C: Rab14 act as oncogene and induce proliferation of gastric cancer cells via AKT signaling pathway. *PLoS One* 12(1): e0170620, 2017. PMID: 28107526. DOI: 10.1371/journal.pone.0170620
- 93 Wang R, Wang ZX, Yang JS, Pan X, De W and Chen LB: MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Oncogene* 30(23): 2644-2658, 2011. PMID: 21358675. DOI: 10.1038/onc.2010.642
- 94 Sun J, Feng X, Gao S and Xiao Z: microRNA-338-3p functions as a tumor suppressor in human non small cell lung carcinoma and targets Ras-related protein 14. *Mol Med Rep* 11(2): 1400-1406, 2015. PMID: 25374067. DOI: 10.3892/mmr.2014.2880
- 95 Junutula JR, De Mazière AM, Peden AA, Ervin KE, Advani RJ, van Dijk SM, Klumperman J and Scheller RH: Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol Biol Cell* 15(5): 2218-2229, 2004. PMID: 15004230. DOI: 10.1091/mbc.e03-10-0777
- 96 Reed SE, Hodgson LR, Song S, May MT, Kelly EE, McCaffrey MW, Mastick CC, Verkade P and Tavaré JM: A role for Rab14 in the endocytic trafficking of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Sci* 126(Pt 9): 1931-1941, 2013. PMID: 23444368. DOI: 10.1242/jcs.104307
- 97 Zhao FQ and Keating AF: Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* 8(2): 113-128, 2007. PMID: 18660845. DOI: 10.2174/138920207780368187
- 98 Wood IS and Trayhurn P: Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89(1): 3-9, 2003. PMID: 12568659. DOI: 10.1079/BJN2002763
- 99 Henriksen EJ: Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol* (1985) 93(2): 788-796, 2002. PMID: 12133893. DOI: 10.1152/jappphysiol.01219.2001
- 100 Brewer PD, Habtemichael EN, Romenskaia I, Coster AC and Mastick CC: Rab14 limits the sorting of Glut4 from endosomes into insulin-sensitive regulated secretory compartments in adipocytes. *Biochem J* 473(10): 1315-1327, 2016. PMID: 26936971. DOI: 10.1042/BCJ20160020

Received July 21, 2021

Revised December 9, 2021

Accepted January 7, 2022

9.3 MEDIOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS

Solución buffer de fosfatos pH 7.4 1X

Reactivo	Con. Final (mM)	Peso (g)
NaCl	136 mM	8
KCl	2.68 mM	0.2
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM	1.44
KH ₂ PO ₄	1.76 mM	0.24

Depositar los compuestos debidamente pesados en un vaso de precipitados de 1 L, adicionar 800 ml de agua bidestilada, disolver por completo, ajustar pH con HCl ó NaOH concentrado según sea el caso hasta llegar a un pH 7.4

Solución salina de Verseno pH 7.7 1X

Reactivo	Con. Final (mM)	Peso (g)
Tris Base	25.1	3.04
NaCl	136.9	8.00
KCl	5.36	0.4
EDTA	1.1	0.4

Ajustar a pH 7.7 con HCl concentrado y aforar con agua bidestilada (18.3 ohm) hasta 1000 ml finales.

Solución de crio preservación de líneas celulares.

Reactivo	Con. Final (%v/v)	Volumen (ml)
Suero fetal bovino	50	25
Medio de cultivo RPMI 1640	40	20
DMSO	10	5

Mezclar todos los componentes y esterilizar por filtración en 0.22 µm en campana de flujo laminar. Almacenar a -20 C.

Solución Stock de Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.8%

Reactivo	Con. Final (%p/v)	Peso (g)
Acrilamida	30	300
Bis- acrilamida	0.8	0.8

Depositar los reactivos correctamente pesados en un vaso de precipitados de 1 L, adicionar 800 ml de agua bidestilada disolver los componentes por completo, aforar con agua bidestilada a 1000 ml finales. Filtrar la solución en 0.45 μm . Almacenar en frasco ámbar limpio la solución stock a 4°C.

Solución Stock Tris base 1.5 M pH 8.8

Reactivo	Con. Final (M)	Peso (g)
Acrilamida	1.07	130.8
Bis- acrilamida	0.42	66.3

Depositar los reactivos en un vaso de precipitados de 1 L, adicionar 800 ml de agua bidestilada disolver los componentes por completo, aforar con agua bidestilada 1000 ml finales. Filtrar la solución en 0.45 μm . Almacenar a temperatura ambiente.

Solución stock dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%

Reactivo	Con. Final (%p/v)	Peso (g)
SDS 99%	10	10

Depositar el polvo de SDS en un vaso de precipitados de 250 ml de cristal, adicionar 70 ml de agua bidestilada, disolver, aforar a 100 ml y filtrar en 0.45 μm . Almacenar a temperatura ambiente. Se recomienda el uso de vaso de precipitados de cristal en caso de haber bajas temperaturas ya que estas pueden causar baja solubilidad del SDS en agua, por lo que puede calentarse el agua a 37°C para facilitar la disolución.

Solución stock tris base 0.5 M pH 6.8

Reactivo	Con. Final (M)	Peso (g)
Tris base	0.014	1.71
Tris HCl	0.48	76.8

Depositar los reactivos bien pesados en un vaso de precipitados de 1 L, adicione 800 ml de agua bidestilada, afore a 1000 ml finales con agua bidestilada, filtre en 0.45 μm . Almacene la solución stock a temperatura ambiente.

Solución de tris, glicina, SDS (10X)

Reactivo	Con. Final	Peso (g)
Tris base	0.25 M	30.28
Glicina	1.92 M	144. 1
SDS 99%	1% p/v	10

Depositar los reactivos bien pesados en un vaso de precipitados de 1 L, adicione 800 ml de agua bidestilada, afore a 1000 ml finales con agua bidestilada. Almacene solución stock 10X a temperatura ambiente. Si va a realizar electroforesis recuerde hacer una dilución 1 en 10 con agua bidestilada para trabajar a una concentración de 1X.

Solución de Coomassie

Reactivo	Con. Final	Peso (g)
Ácido acético 99%	10% v/v	30.28
Metanol 99%	30% v/v	144. 1
Azul de Coomassie	0.2% p/v	10

Depositar los reactivos bien pesados en un vaso de precipitados de 1 L, adicione 800 ml de agua bidestilada, afore a 1000 ml finales con agua bidestilada. Almacene solución stock 10X a temperatura ambiente. Si va a realizar electroforesis recuerde hacer una dilución 1 en 10 con agua bidestilada para trabajar a una concentración de 1X.

Solución Desteñidora I

Reactivo	Con. Final	Vol. (ml)
Ácido acético 99%	10% v/v	100
Metanol 99%	50% v/v	500
Agua bidestilada	40% v/v	400

Mezclar y aforar con agua bidestilada a 1000 ml finales, almacenar a 4°C.

Solución Desteñidora II

Reactivo	Con. Final	Vol. (ml)
Ácido acético 99%	7% v/v	100
Metanol 99%	5% v/v	500
Agua bidestilada	88% v/v	400

Mezclar y aforar con agua bidestilada a 1000 ml finales, almacenar a 4°C.

Buffer del Ánodo I

Reactivo	Con. Final	Cantidad
Tris base	0.3 M	36.34 g
Metanol 99%	10% v/v	100 ml

Disolver el tris base en 700 ml de agua bidestilada y adicionar el metanol para posteriormente aforar a 1000 ml finales. Almacene a -4°C para evitar la evaporación del metanol.

Buffer del Ánodo I

Reactivo	Con. Final	Cantidad
Tris base	25 mM	3.02 g
Metanol 99%	10% v/v	100 ml

Disolver el tris base en 700 ml de agua bidestilada y adicionar el metanol para posteriormente aforar a 1000 ml finales. Almacene a -4°C para evitar la evaporación del metanol.

Buffer del Cátodo

Reactivo	Con. Final	Cantidad
Glicina	40 mM	3.00 g
Metanol 99%	10% v/v	100 ml

Disolver la glicina en 700 ml de agua bidestilada y adicionar el metanol para posteriormente aforar a 1000 ml finales. Almacene a -4°C para evitar la evaporación del metanol.

Solución de Rojo Ponceau

Reactivo	Con. Final	Cantidad
Rojo Ponceau	0.5% p/v	0.25 g
Ácido acético 99%	3% v/v	1.25 ml

Depositar el polvo de rojo Ponceau en un tubo falcon de 50 ml limpio y luego adicionar el 1.25 ml de ácido acético 99%. Finalmente aforar a 50 ml finales con agua bidestilada. Almacenar a 4°C.

Buffer TE 10X pH 8.5

Reactivo	Con. Final	Cantidad
Tris base	100 mM	12.14 g
EDTA	10 mM	2.9 g

Disolver los compuestos debidamente pesados en un vaso de precipitados de 1 L, adicionar 800 ml de agua bidestilada, disolver por completo los componentes en la solución, ajustar el PH a 8.5 final. Aforar a 1000 ml finales con agua bidestilada. Almacenar a temperatura ambiente. Recuerde hacer la dilución de esta solución stock 10X a una concentración de trabajo 1X.

Buffer TAE 50X

Reactivo	Con. Final	Cantidad
Tris base	2 M	242 g
Ácido acético 99%	5.71% v/v	57.1 ml
EDTA	0.06 M	18.6 g

Mezclar en un vaso de precipitados con 800 ml de agua bidestilada disolver por completo y aforar a 1000 ml finales. Recuerde que es una solución stock y la concentración de trabajo optima es 1X.

X. REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Release, P. Press Release N° 263. 13–15 (2018).
2. Bishop, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science (1979)* **235**, 305–311 (1987).
3. Ponder, B. A. J. Molecular genetics of cancer. *Br Med J* **304**, 1234–1236 (1992).
4. Fabian, I. D. & Sagoo, M. S. Understanding retinoblastoma: epidemiology and genetics. *Community Eye Health* **31**, 7 (2018).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
6. &NA; Hypothesis Revisited. *Pediatr Infect Dis J* **10**, 260 (1991).
7. Rosen, J. M. & Jordan, C. T. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science (1979)* **324**, 1670–1673 (2009).
8. Perez-Soler, R. Individualized therapy in non-small-cell lung cancer: future versus current clinical practice. *Oncogene* **28**, S38 (2009).
9. Heinemann, V., Stintzing, S., Kirchner, T., Boeck, S. & Jung, A. Clinical relevance of EGFR-and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* **35**, 262–271 (2009).
10. Alberts, B. *et al.* Extracellular control of cell division, cell growth, and apoptosis. in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition* (Garland Science, 2002).
11. Cree, I. A. Cancer biology. in *Cancer Cell Culture* 1–11 (Springer, 2011).
12. Sherr, C. J. & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103–112 (2002).
13. Hallstrom, T. C. & Nevins, J. R. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate. *Cell Cycle* **8**, 532–535 (2009).
14. Engel, B. E., Cress, W. D. & Santiago-Cardona, P. G. The retinoblastoma protein: a master tumor suppressor acts as a link between cell cycle and cell adhesion. *Cell Health Cytoskelet* **7**, 1 (2015).
15. Simin, K. *et al.* pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *PLoS Biol* **2**, e22 (2004).
16. Vousden, K. H. & Lane, D. P. P53 in Health and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275–283 (2007).
17. Kam, P. C. A. & Ferch, N. I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* **55**, 1081–1093 (2000).
18. Wong, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* **30**, 87 (2011).

19. Inoue, S., Browne, G., Melino, G. & Cohen, G. M. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ* **16**, 1053 (2009).
20. Schmitt, C. A. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1775**, 5–20 (2007).
21. Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H. & Shay, J. W. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* **8**, (2016).
22. Bernal, A. & Tusell, L. Telomeres: Implications for Cancer Development. *Int J Mol Sci* **19**, 294 (2018).
23. Chadeneau, C., Hay, K., Hirte, H. W., Gallinger, S. & Bacchetti, S. Telomerase Activity Associated with Acquisition of Malignancy in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res* **55**, 2533–2536 (1995).
24. Hiyama, E. *et al.* Telomerase Activity Is Detected in Pancreatic Cancer but not in Benign Tumors. *Cancer Res* **57**, 326 LP – 331 (1997).
25. Mao, L. *et al.* Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* **56**, 5600–5604 (1996).
26. Kyo, S., Takakura, M., Tanaka, M., Kanaya, T. & Inoue, M. Telomerase activity in cervical cancer is quantitatively distinct from that in its precursor lesions. *Int J Cancer* **79**, 66–70 (1998).
27. Tansey, E. A., Montgomery, L. E. A., Quinn, J. G., Roe, S. M. & Johnson, C. D. Understanding basic vein physiology and venous blood pressure through simple physical assessments. *Adv Physiol Educ* **43**, 423–429 (2019).
28. Chung, A. S. & Ferrara, N. Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 563–584 (2011).
29. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364 (1996).
30. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**, 653–660 (2003).
31. Yilmaz, M. & Christofori, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* **28**, 15–33 (2009).
32. Davis, F. M. *et al.* Induction of epithelial–mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* **33**, 2307–2316 (2014).
33. Zavadil, J. & Böttinger, E. P. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764–5774 (2005).
34. Savagner, P., Yamada, K. M. & Thiery, J. P. The Zinc-Finger Protein Slug Causes Desmosome Dissociation, an Initial and Necessary Step for Growth Factor–induced Epithelial–Mesenchymal Transition. *Journal of Cell Biology* **137**, 1403–1419 (1997).

35. Lo, H.-W. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of *Twist* Gene Expression. *Cancer Res* **67**, 9066 LP – 9076 (2007).
36. Graham, T. R. *et al.* Insulin-like Growth Factor-I–Dependent Up-regulation of ZEB1 Drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* **68**, 2479 LP – 2488 (2008).
37. Acevedo, V. D. *et al.* Inducible FGFR-1 Activation Leads to Irreversible Prostate Adenocarcinoma and an Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell* **12**, 559–571 (2007).
38. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
39. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics, 2012. **65**, 87–108 (2015).
40. Bosch, F. X. *et al.* Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine* **31**, 11-31 (2013).
41. Lee, Y.-Y. *et al.* A comparison of pure adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix after radical hysterectomy in stage IB--IIA. *Gynecol Oncol* **120**, 439–443 (2011).
42. Katanyoo, K., Sanguanrungrasirikul, S. & Manusirivithaya, S. Comparison of treatment outcomes between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol* **125**, 292–296 (2012).
43. Bosch, F. X. *et al.* Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix : Collaborative reanalysis of individual data on 8 , 097 women with squamous cell carcinoma and 1 , 374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological stud. **891**, 885–891 (2006).
44. Molijn, A. *et al.* The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma. *Int J Cancer* **138**, 409–416 (2016).
45. Smith, H. O., Tiffany, M. F., Qualls, C. R. & Key, C. R. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States—a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol* **78**, 97–105 (2000).
46. An, H. J. *et al.* Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of cervical adenocarcinoma: a population-based study. *Modern pathology* **18**, 528 (2005).
47. De González, A. B., Sweetland, S. & Green, J. Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. *Br J Cancer* **90**, 1787 (2004).
48. Consortium, I. H. G. S. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945 (2004).
49. Fonović, M. & Bogoy, M. Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases. *Expert Rev Proteomics* **5**, 721–730 (2008).

50. Hanash, S. Disease proteomics. *Nature* **422**, 226–232 (2003).
51. Zhu, X., Lv, J., Yu, L., Zhu, X. & Wu, J. Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecol Oncol* **112**, 248–256 (2009).
52. Gerweck, L. E. & Seetharaman, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* **56**, 1194–1198 (1996).
53. Heaphy, C. M. *et al.* Telomere DNA content and allelic imbalance demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. *Int J Cancer* **119**, 108–116 (2006).
54. Trujillo, K. A. *et al.* Markers of fibrosis and epithelial to mesenchymal transition demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors. *Int J Cancer* **129**, 1310–1321 (2011).
55. Heaphy, C. M., Griffith, J. K. & Bisoffi, M. Mammary field cancerization: molecular evidence and clinical importance. *Breast Cancer Res Treat* **118**, 229–239 (2009).
56. Aran, D. *et al.* Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nat Commun* **8**, 1077 (2017).
57. Arnouk, H. *et al.* Characterization of molecular markers indicative of cervical cancer progression. *Proteomics Clin Appl* **3**, 516–527 (2009).
58. Serafín-Higuera, I. *et al.* Differential proteins among normal cervix cells and cervical cancer cells with HPV-16 infection, through mass spectrometry-based Proteomics (2D-DIGE) in women from Southern México. *Proteome Sci* **14**, 10 (2016).
59. Fujiwara, K., Monk, B. & Devouassoux-Shisheboran, M. Adenocarcinoma of the uterine cervix: why is it different? *Curr Oncol Rep* **16**, 416 (2014).
60. Davy, M. L. J., Dodd, T. J., Luke, C. G. & Roder, D. M. Cervical cancer: effect of glandular cell type on prognosis, treatment, and survival. *Obstetrics and gynecology* **101**, 38–45 (2003).
61. Sherman, M. E., Wang, S. S., Carreon, J. & Devesa, S. S. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. Relation to incidence and survival. *Cancer* **103**, 1258–1264 (2005).
62. Castellsagué, X. *et al.* Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* **98**, 303–315 (2006).
63. Wang, S. S., Sherman, M. E., Hildesheim, A., Lacey, J. V. J. & Devesa, S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. *Cancer* **100**, 1035–1044 (2004).
64. Eifel, P. J., Burke, T. W., Morris, M. & Smith, T. L. Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* **59**, 38–44 (1995).

65. Eifel, P. J., Morris, M., Oswald, M. J., Wharton, J. T. & Delclos, L. Adenocarcinoma of the uterine cervix. Prognosis and patterns of failure in 367 cases. *Cancer* **65**, 2507–2514 (1990).
66. Yanaranop, M., Sathapornteera, N. & Nakrangsee, S. Risk factors of pelvic lymph node metastasis in cervical adenocarcinoma following radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *J Med Assoc Thai* **97 Suppl 1**, S87-95 (2014).
67. Rose, P. G. *et al.* Locally advanced adenocarcinoma and adenosquamous carcinomas of the cervix compared to squamous cell carcinomas of the cervix in Gynecologic Oncology Group trials of cisplatin-based chemoradiation. *Gynecol Oncol* **135**, 208–212 (2014).
68. Shruthi, B. S., Vinodhkumar, P. & Selvamani. Proteomics: A new perspective for cancer. *Adv Biomed Res* **5**, 67 (2016).
69. Ozawa, M. & Muramatsu, T. Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *J Biol Chem* **268**, 699–705 (1993).
70. Fukuda, T. *et al.* Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. *J Histochem Cytochem* **55**, 335–345 (2007).
71. Ozawa, M. Cloning of a Human Homologue of Mouse Reticulocalbin Reveals Conservation of Structural Domains in the Novel Endoplasmic Reticulum Resident Ca²⁺-Binding Protein with Multiple EF-Hand Motifs1. *The Journal of Biochemistry* **117**, 1113–1119 (1995).
72. Yu, L. R. *et al.* Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**, 3058–3068 (2000).
73. Line, C., Liu, Z., Brattain, M. G. & Appert, H. Differential Display of Reticulocalbin in the Highly Invasive Cell Line , MDA-MB-435 , versus the Poorly Invasive. **289**, 283–289 (1997).
74. Chen, J. J., Reid, C. E., Band, V. & Androphy, E. J. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* **269**, 529–531 (1995).
75. Wong, E. *et al.* Identification of up- and down-regulated proteins in doxorubicin-resistant uterine cancer cells : Reticulocalbin-1 plays a key role in the development of doxorubicin-associated resistance. *Pharmacol Res* **90**, 1–17 (2014).
76. Johnson, D. S. & Chen, Y. H. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* **12**, 458–463 (2012).
77. Simanshu, D. K., Nissley, D. V & McCormick, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* **170**, 17–33 (2017).
78. Scheffzek, K. *et al.* The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333–338 (1997).
79. Edkins, S. *et al.* Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* **5**, 928–932 (2006).

80. Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J. & Der, C. J. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1395–1413 (1998).
81. Liu, Y. *et al.* The role of host eIF2 α in viral infection. *Virology* **17**, 112 (2020).
82. Strong, J. E., Coffey, M. C., Tang, D., Sabinin, P. & Lee, P. W. The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J* **17**, 3351–3362 (1998).
83. Gong, J. & Mita, M. M. Activated ras signaling pathways and reovirus oncolysis: an update on the mechanism of preferential reovirus replication in cancer cells. *Front Oncol* **4**, 167 (2014).
84. Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**, 4682–4689 (1989).
85. Mammas, I. N., Zafiroopoulos, A., Sifakis, S., Sourvinos, G. & Spandidos, D. A. Human papillomavirus (HPV) typing in relation to ras oncogene mRNA expression in HPV-associated human squamous cervical neoplasia. *Int J Biol Markers* **20**, 257–263 (2005).
86. Depuydt, C. E. *et al.* Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *J Cell Mol Med* **11**, 881–891 (2007).
87. Jacobs, M. V. *et al.* Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* **33**, 901–905 (1995).
88. Qu, W. *et al.* PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* **35**, 1304–1310 (1997).
89. Solomon, D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis: an overview. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* vol. 10 323–325 Preprint at <https://doi.org/10.1097/00004347-199110000-00003> (1991).
90. Kruger, N. J. The Bradford method for protein quantitation. in *The protein protocols handbook* 17–24 (Springer, 2009).
91. Okumura, K. *et al.* PCAF modulates PTEN activity. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 26562–26568 (2006).
92. Wang, M., Zhao, Y. & Zhang, B. Efficient Test and Visualization of Multi-Set Intersections. *Sci Rep* **5**, 16923 (2015).
93. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 15545 LP – 15550 (2005).
94. Ge, S. X., Jung, D., Jung, D. & Yao, R. ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* **36**, (2020).
95. Liberzon, A. *et al.* The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst* **1**, (2015).

96. Bhat, A. *et al.* Exosomes from cervical cancer cells facilitate pro-angiogenic endothelial reconditioning through transfer of Hedgehog–GLI signaling components. *Cancer Cell Int* **21**, (2021).
97. Riou, G. F., Bourhis, J. & Le, M. G. The c-myc proto-oncogene in invasive carcinomas of the uterine cervix: Clinical relevance of overexpression in early stages of the cancer. *Anticancer Res* **10**, 1225–1232 (1990).
98. Lee, T.-J., Sartor, O., Luftig, R. B. & Koochekpour, S. Saposin C promotes survival and prevents apoptosis via PI3K/Akt-dependent pathway in prostate cancer cells. *Mol Cancer* **3**, 31 (2004).
99. Kitazawa, S., Takaoka, Y., Ueda, Y. & Kitazawa, R. Identification of calmodulin-like protein 5 as tumor-suppressor gene silenced during early stage of carcinogenesis in squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Int J Cancer* **149**, 1358–1368 (2021).
100. Shao, S., Fan, Y., Zhong, C., Zhu, X. & Zhu, J. Coactosin-Like Protein (COTL1) Promotes Glioblastoma (GBM) Growth in vitro and in vivo. *Cancer Manag Res* **12**, 10909–10917 (2020).
101. Liu, J. *et al.* The role of 14-3-3 proteins in cell signalling pathways and virus infection. *J Cell Mol Med* **25**, 4173–4182 (2021).
102. Vanaja, D. K., Cheville, J. C., Iturria, S. J. & Young, C. Y. F. Transcriptional Silencing of Zinc Finger Protein 185 Identified by Expression Profiling Is Associated with Prostate Cancer Progression. *Cancer Res* **63**, 3877 LP – 3882 (2003).
103. Sakkal, S., Miller, S., Apostolopoulos, V. & Nurgali, K. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Curr Med Chem* **23**, 650–666 (2016).
104. Qi, Y. & Xu, R. Roles of PLODs in Collagen Synthesis and Cancer Progression. *Front Cell Dev Biol* **6**, 66 (2018).
105. Wang, X. *et al.* S100A14, a mediator of epithelial-mesenchymal transition, regulates proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cells. *Am J Cancer Res* **5**, 1484–1495 (2015).
106. Han, W., Hu, C., Fan, Z.-J. & Shen, G.-L. Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients. *Sci Rep* **11**, 1023 (2021).
107. Bandaru, S. *et al.* Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis* **3**, e119–e119 (2014).
108. Zhang, X., Su, L. & Sun, K. Expression status and prognostic value of the perilipin family of genes in breast cancer. *Am J Transl Res* **13**, 4450–4463 (2021).
109. Li, D. *et al.* Ets-1 promoter-associated noncoding RNA regulates the NONO/ERG/Ets-1 axis to drive gastric cancer progression. *Oncogene* **37**, 4871–4886 (2018).
110. Kim, S.-J. *et al.* RNA-binding protein NONO contributes to cancer cell growth and confers drug resistance as a theranostic target in TNBC. *Theranostics* **10**, 7974–7992 (2020).

111. Morozov, A. V & Karpov, V. L. Proteasomes and Several Aspects of Their Heterogeneity Relevant to Cancer. *Front Oncol* **9**, 761 (2019).
112. Zhang, Y. & Zhang, L. Knockdown of LASP2 inhibits the proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells. *J Cell Biochem* **120**, 15389–15396 (2019).
113. Hage-Sleiman, R., Herveau, S., Matera, E.-L., Laurier, J.-F. & Dumontet, C. Tubulin binding cofactor C (TBCC) suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells. *BMC Cancer* **10**, 135 (2010).
114. Pang, T. *et al.* Y Box-Binding Protein 1 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, Invasion, and Metastasis of Cervical Cancer via Enhancing the Expressions of Snail. *Int J Gynecol Cancer* **27**, 1753–1760 (2017).
115. Zhao, C. *et al.* S100A9 regulates cisplatin chemosensitivity of squamous cervical cancer cells and related mechanism. *Cancer Manag Res* **10**, 3753–3764 (2018).
116. Zhu, J. *et al.* Correlation between reticulum ribosome-binding protein 1 (RRBP1) overexpression and prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *Biosci Trends* (2020).
117. Tsai, H.-Y. *et al.* Endoplasmic reticulum ribosome-binding protein 1 (RRBP1) overexpression is frequently found in lung cancer patients and alleviates intracellular stress-induced apoptosis through the enhancement of GRP78. *Oncogene* **32**, 4921–4931 (2013).
118. Hua, X. *et al.* Roles of S100 family members in drug resistance in tumors: Status and prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **127**, 110156 (2020).
119. Banáth, J. P., Macphail, S. H. & Olive, P. L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* **64**, 7144–7149 (2004).
120. Weyemi, U. *et al.* The histone variant H2A.X is a regulator of the epithelial–mesenchymal transition. *Nat Commun* **7**, 10711 (2016).
121. Gebauer, F. *et al.* Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as Biomarkers in Pancreatic Cancer. *PLoS One* **9**, e113023 (2014).
122. Mammadova-Bach, E. *et al.* Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell–derived galectin-3. *Blood* **135**, 1146–1160 (2020).
123. Herrmann, P. C. *et al.* Mitochondrial proteome: Altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics* **3**, 1801–1810 (2003).
124. Nipp, M. *et al.* S100-A10, thioredoxin, and S100-A6 as biomarkers of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis identified by MALDI Imaging. *J Mol Med* **90**, 163–174 (2012).
125. Jaillon, S. *et al.* Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer* **20**, 485–503 (2020).
126. Sato, T. *et al.* Neutrophil elastase and cancer. *Surg Oncol* **15**, 217–222 (2006).

127. Zhao, L. *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8, a biological marker of granulocyte activities in vivo. *J Immunol Methods* **293**, 207–214 (2004).
128. Vaughn, A. E. & Deshmukh, M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* **10**, 1477–1483 (2008).
129. Fillies, T. *et al.* Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* **6**, 10 (2006).
130. Minns, D. *et al.* The neutrophil antimicrobial peptide cathelicidin promotes Th17 differentiation. *Nat Commun* **12**, 1285 (2021).
131. Madanchi, H., Shoushtari, M., Kashani, H. H. & Sardari, S. Antimicrobial peptides of the vaginal innate immunity and their role in the fight against sexually transmitted diseases. *New Microbes New Infect* **34**, 100627 (2020).
132. Ma, Y. *et al.* Cystatin A suppresses tumor cell growth through inhibiting epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer. *Oncotarget* **9**, 14084–14098 (2017).
133. Zhang, S. *et al.* Calpain system protein expression and activity in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **145**, 345–361 (2019).
134. Thylur, R. P., Gowda, R., Mishra, S. & Jun, C.-D. Swiprosin-1: Its Expression and Diverse Biological Functions. *J Cell Biochem* **119**, 150–156 (2018).
135. Bitterman, P. B. & Polunovsky, V. A. eIF4E-mediated translational control of cancer incidence. *Biochim Biophys Acta* **1849**, 774–780 (2015).
136. Vaysse, C. *et al.* Key contribution of eIF4H-mediated translational control in tumor promotion. *Oncotarget* **6**, 39924–39940 (2015).
137. Cappello, F., Bellafiore, M., David, S., Anzalone, R. & Zummo, G. Ten kilodalton heat shock protein (HSP10) is overexpressed during carcinogenesis of large bowel and uterine exocervix. *Cancer Lett* **196**, 35–41 (2003).
138. Martínez-martínez, E. *et al.* Differential Proteomics Identifies Reticulocalbin-3 as a Novel Negative Mediator of Collagen Production in Human Cardiac Fibroblasts. 1–10 (2017) doi:10.1038/s41598-017-12305-7.
139. Tsuji, A. *et al.* A proteomic approach reveals transient association of reticulocalbin-3, a novel member of the CREC family, with the precursor of subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. *Biochem J* **396**, 51–59 (2006).
140. Pierangeli, A. *et al.* Interferon-induced gene expression in cervical mucosa during human papillomavirus infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* **24**, 217–223 (2011).
141. Preci, D. P., Almeida, A., Weiler, A. L., Mukai Franciosi, M. L. & Cardoso, A. M. Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* **31**, 265–271 (2021).

142. Lages, E. L. e *et al.* Analysis of systemic inflammatory response in the carcinogenic process of uterine cervical neoplasia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **65**, 496–499 (2011).
143. Zhuang, Y. *et al.* The novel function of tumor protein D54 in regulating pyruvate dehydrogenase and metformin cytotoxicity in breast cancer. *Cancer Metab* **7**, 1 (2019).
144. Ren, L., Chen, J. & Zhang, X. Increased expression of tumor protein D54 is associated with clinical progression and poor prognosis in patients with prostate cancer. *Oncol Lett* **14**, 7739–7744 (2017).
145. Santin, A. D. *et al.* Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* **331**, 269–291 (2005).
146. Meadows, S. M. & Cleaver, O. Annexin A3 Regulates Early Blood Vessel Formation. *PLoS One* **10**, e0132580–e0132580 (2015).
147. Li, Y. *et al.* MicroRNA-142-3p attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury via targeting of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *Pharmacol Res* **156**, 104783 (2020).
148. Iyer, D. N. *et al.* Pathophysiological roles of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) in hematological malignancies. *Biomark Res* **9**, 34 (2021).
149. Wu, M.-P. *et al.* A novel role of thrombospondin-1 in cervical carcinogenesis: inhibit stroma reaction by inhibiting activated fibroblasts from invading cancer. *Carcinogenesis* **29**, 1115–1123 (2008).
150. Mooney, S. M. *et al.* Creatine kinase brain overexpression protects colorectal cells from various metabolic and non-metabolic stresses. *J Cell Biochem* **112**, 1066–1075 (2011).
151. Caffarel, M. M. *et al.* Tissue transglutaminase mediates the pro-malignant effects of oncostatin M receptor over-expression in cervical squamous cell carcinoma. *J Pathol* **231**, 168–179 (2013).
152. Jung, E. J. *et al.* Cervical adenocarcinoma has a poorer prognosis and a higher propensity for distant recurrence than squamous cell carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer* **27**, 1228–1236 (2017).
153. Nusinow, D. P. *et al.* Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell* **180**, 387-402.e16 (2020).
154. Lanzetti, L. & Di Fiore, P. P. Behind the Scenes: Endo/Exocytosis in the Acquisition of Metastatic Traits. *Cancer Res* **77**, 1813 LP – 1817 (2017).
155. Li, T. *et al.* RRBP1 is highly expressed in prostate cancer and correlates with prognosis. *Cancer Manag Res* **11**, 3021–3027 (2019).
156. Ma, J. *et al.* Expression of RRBP1 in epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *Biosci Rep* **39**, (2019).

157. Cooper, C. R. *et al.* Novel Surface Expression of Reticulocalbin 1 on Bone Endothelial Cells and Human Prostate Cancer Cells Is Regulated by TNF- α . **2309**, 2298–2309 (2008).
158. Giribaldi, G. *et al.* ScienceDirect Proteomic identification of Reticulocalbin 1 as potential tumor marker in renal cell carcinoma. *J Proteomics* **91**, 385–392 (2013).
159. Furue, M. Epithelial tumor, invasion and stroma. *Ann Dermatol* **23**, 125–131 (2011).
160. Ding, D. *et al.* Reticulocalbin-2 enhances hepatocellular carcinoma proliferation via modulating the EGFR-ERK pathway. 1–10 (2017) doi:10.1038/onc.2017.230.
161. Fenhalls, G., Geyp, M., Dent, D. M. & Parker, M. I. Breast tumour cell-induced down-regulation of type I collagen mRNA in fibroblasts. **81**, 1142–1149 (1999).
162. Badaoui, M. *et al.* Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget* **5**, 1–19 (2017).
163. Menke, A. *et al.* Down-regulation of e-cadherin gene expression by collagen type i and type iii in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* **61**, 3508–3517 (2001).
164. Van Aken, E., De Wever, O., Correia da Rocha, A. S. & Mareel, M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* **439**, 725–751 (2001).
165. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107–117 (2001).
166. Guo, B. *et al.* Rab14 Act as Oncogene and Induce Proliferation of Gastric Cancer Cells via AKT Signaling Pathway. 1–11 (2017) doi:10.1371/journal.pone.0170620.
167. Wang, R. *et al.* MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Oncogene* **30**, 2644–2658 (2011).
168. Sun, J., Feng, X., Gao, S. & Xiao, Z. MicroRNA-338-3p functions as a tumor suppressor in human nonsmallcell lung carcinoma and targets Ras-related protein 14. *Mol Med Rep* **11**, 1400–1406 (2015).
169. Junutula, J. R. *et al.* Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol Biol Cell* **15**, 2218–2229 (2004).
170. Reed, S. E. *et al.* A role for Rab14 in the endocytic trafficking of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Reed, S. E. *et al.* A role for Rab14 in the endocytic trafficking of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Cell Sci.* **126**, 1931–1941 (2013). *J Cell Sci* **126**, 1931–1941 (2013).
171. Zhao, F.-Q. & Keating, A. F. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* **8**, 113–128 (2007).
172. Wood, I. S. & Trayhurn, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* **89**, 3–9 (2003).
173. Henriksen, E. J. Invited Review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol* **93**, 788–796 (2002).

174. Brewer, P. D., Habtemichael, E. N., Romenskaia, I., Coster, A. C. F. & Mastick, C. C. Rab14 limits the sorting of Glut4 from endosomes into insulin-sensitive regulated secretory compartments in adipocytes. *Biochem J* **473**, 1315–1327 (2016).