

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Laboratorio de Proteómica, Programa de Genómica Funcional de Procariontes.  
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

**Dinámica Proteómica en Tumores de Cáncer Cérvico  
Uterino de las líneas celulares HeLa y SiHa**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
**Luis Fernando Delgadillo Silva**

**Tutor principal: Dr. Sergio Encarnación Guevara, Biol. Alberto Checa Rojas.  
Centro de Ciencias Genómicas**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva            UNAM, IBT

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos            UNAM, IBT

MÉXICO, Morelos, Cuernavaca., Enero 2014



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.

## Índice

<b>Resumen</b>	5
<b>Agradecimientos</b>	6
<b>Introducción</b>	6
<b>1. Generalidades del Cáncer</b>	6
○ Vías de señalización	6
○ Tumorigénesis	7
○ Microambiente	8
○ Alteraciones de las células cancerosas	10
<b>2. Estudios genómicos del cáncer cérvico uterino</b>	14
○ Cancer Cervico Uterino (CaCu)	14
○ Genómica y proteómica	14
○ Proteómica en cáncer	16
○ Proteómica en cáncer cérvico uterino	17
○ Medicina genómica y medicina translacional	17
<b>3. Modelos de estudio en CaCu</b>	24
○ Líneas celulares: HeLa y SiHa	20
○ El modelo murino y el caso del ratón atómico <i>Nu/Nu</i>	21
<b>Justificación</b>	30
<b>Hipótesis</b>	24
<b>Objetivo general</b>	24
<b>Objetivos particulares</b>	24
<b>Material y métodos</b>	25
○ Metodología	25
○ Cultivo Celular	26
○ Tumores de CaCu	26
○ Extracción de las muestras, cuantificación	26
○ Electroforesis de doble dimensión	26
○ Análisis de geles	27
○ Identificación de proteínas por espectrometría de masas	27
○ Construcción de redes de interacciones proteína-proteína	27
○ Análisis de enriquecimiento de GOs	28
○ Análisis de enriquecimiento de vías de interacción	28
○ Diseño de morfolidos	28
○ Tratamiento con morfolidos	29

○ Western Blot	29
<b>Resultados</b>	<b>32</b>
○ Cinética de crecimiento de HeLa y SiHa.	30
○ Resultados de los Western Blots	44
○ Tratamiento con morfolinos anti GSTM3, GSTP1 y control	44
<b>Discusión e integración de resultados</b>	<b>45</b>
○ Volumen tumoral a los 30, 45 y 50 días post-inoculación	45
○ Perfiles proteómicos	46
○ Posibles funciones de las proteínas identificadas en los perfiles Proteómicos	48
○ Desregulación metabólica	52
○ Evasión de la apoptosis	55
○ Invasión de tejidos y metástasis	61
○ Angiogénesis	64
○ Inestabilidad genómica	65
○ Autosuficiencia en señales de crecimiento	67
○ Interacciones proteína-proteína (IPP) de cada categoría	70
○ Ontologías Génicas: Señalización	70
○ Análisis de sobrerrepresentación de vías moleculares	72
○ Ensayo funcional sobre GSTM3 y GSTP1	74
<b>Conclusiones</b>	<b>85</b>
○ Modelo del desarrollo tumoral a través del tiempo	85
<b>Perspectivas</b>	<b>89</b>
<b>Referencias</b>	<b>90</b>
Apéndice A: Información extra	95
Apéndice B: Protocolos	97
Apéndice C: Geles	100
Apéndice D: Proteínas identificadas	114
Apéndice E: Análisis Westernblots	118
Apéndice F: Resultados suplementarios	129

# Resumen

---

El cáncer cérvico uterino (**CaCu**) es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres y en países subdesarrollados el cancer femenino con mayor número de muertes. El agente etiológico del CaCu es el Virus del Papiloma Humano (**HPV**), presente en  $\geq 99.7\%$  de los casos. En la última década, las proteínas diferencialmente expresadas del CaCu han sido identificadas, sin embargo, los cambios del proteoma a través del desarrollo tumoral (**DT**) han sido pobremente documentados. Para abordar la dinámica proteómica durante el DT, estudiamos los cambios del proteoma en tres tiempos (30, 45 y 50 días) del desarrollo de tumores de las líneas celulares HeLa y SiHa, derivados de ratones hembras de la cepa nude-*Foxn1<sup>nu</sup>*. Durante el DT, observamos una sobreexpresión en proteínas glicolíticas, anti-estreses bioquímicos y citoqueratinas, al mismo tiempo detectamos la subexpresión de proteínas ancladoras del citoesqueleto y proteínas asociadas a la traducción tipo cap-dependiente. Al integrar los resultados, la dinámica del proteoma durante el DT parece estar involucrada con la desregulación de las vías de señalización TNF- $\alpha$  y TLR4 y que las Glutación S-transferasas (GSTM3 y GSTP1) promueven esta alteración. Por último, llevamos a cabo un ensayo funcional de estas proteínas *in vivo*, donde 5/6 (HeLa, CaLo, CaSki, SiHa, Colo205 y MDA231) líneas cancerosas redujeron su volumen tumoral, siendo los tumores de CaCu los mas afectados. Estos resultados, sugieren fuertemente que la GSTM3 y la GSTP1 son blancos terapéuticos durante el DT del CaCu.

# Agradecimientos

---

# Introducción

---

## Generalidades del cáncer

Un organismo pluricelular tiene células de mantenimiento, que son capaces de proliferar a lo largo de su vida. Esta capacidad está regulada por sistemas y vías de señalización celular que controlan la organización celular, las interacciones inter-celulares, la diferenciación, proliferación y muerte celular, permitiendo la homeostasis del organismo [1,2]. Cuando hay alteraciones celulares, las células son capaces de repararlas y si el daño es demasiado grande se activa la muerte celular programada llamada apoptosis, sin embargo, no todas las alteraciones celulares son reparadas y con el tiempo acumula más alteraciones, las cuales pueden conferirle la capacidad de superar los controles celulares y en última instancia converger en el desarrollo de un cáncer [1,3].

Los tumores se definen como una acumulación de células alteradas a comparación del tejido normal. Se desarrollan en cualquier individuo y con una mayor frecuencia en los de edad avanzada. La mayoría de los tumores no son un riesgo para la salud, ya que suelen ser localizados, de tamaño pequeño y no invaden otros tejidos; a estos se les denomina **tumores benignos**. No obstante, un tumor benigno puede causar la muerte, si crece de manera que obstruya algún órgano, si presiona algún nervio vital, o si secreta un exceso de sustancias activas, como hormonas. Las células de un **tumor maligno** o cáncer, se dividen más rápido que las células normales, mueren con una menor tasa, presentan la formación de vasos sanguíneos (**angiogénesis**) y la capacidad de invadir tejidos distantes (**metástasis**), la cual se considera la principal causa de muerte [1,2].

## Vías de señalización celular

Las vías de señalización celular son sistemas de comunicación intra- e inter-celulares, las cuales coordinan las actividades celulares y permiten a las células distinguir y responder correctamente a la información del microambiente para ejecutar eventos celulares como la proliferación, reparación de tejidos, respuesta inmune, etc., en el tiempo correcto y de manera ordenada [1-3].

Las vías de señalización celular funcionan por medio de la transducción de señales, el cual es un proceso de dos etapas: 1) Una molécula señal-ligando se une a su receptor. 2) El receptor es activado y se produce un segundo mensajero, lo que permite que se transmita la señal. Para llevar a cabo la transducción de señales se requiere de una maquinaria especializada compuesta por los receptores, divididos en intracelulares y extracelulares [2].

Los **receptores extracelulares** son proteínas integrales transmembranales anclados en la membrana plasmática y que generalmente tienen un dominio expuesto hacia el exterior de la célula y otro hacia el interior. La transducción de señales se inicia con la unión del receptor con su ligando (molécula señal), lo que provoca que el receptor active su función señalizadora, (cinasa, fosfatasa, fosfodiesterasa, etc.) ó la de las enzimas asociadas al receptor. De esta manera se

transduce la señal y puede ser propagada en el citoplasma. Esto ocurre con el receptor TNF- $\alpha$  ("Tumor Necrosis Factor"), que cuando se une a ligando se activa, reclutando diferentes cinasas como TRAF2 y ASK1, las cuales se encargan de transducir las señales río abajo [5-9]. El receptor TNF- $\alpha$  es un ejemplo, pero existe una amplia diversidad de dominios receptores extracelulares, los cuales llevan a cabo la integración de las señales extracelulares y permiten la respuesta coordinada como: Las proteínas G acopladas a receptores de tirosina e histidina cinasas, integrinas, canales iónicos y receptores tipo Toll [7]. Los **Receptores intracelulares**, son proteínas solubles localizadas en núcleo y citoplasma. Los ligandos típicos de receptores nucleares son hormonas lipídicas, como las esteroideas y derivados de vitaminas A y D [8]. *nota: para mayor información revisar Apéndice A sección Receptores extracelulares* Los

La respuesta celular a la transducción de señales incluye la activación génica, cambios en las proteínas y cambios metabólicos. Debido a que los genes transcritos pueden incluir factores transcripcionales, el número de genes pueden ser regulados por un estímulo es alto. De esta manera, la activación de una vía de señalización puede producir profundos cambios celulares [8]. La investigación biomédica tiene un gran interés en entender la desregulación de las vías de señalización celular, ya que varias enfermedades surgen de la desregulación de estas, como diabetes, enfermedades autoinmunes y cáncer, por lo cual su estudio es necesario para entender mejor su biología y la fabricación de fármacos dirigidos [2].

## Tumorigénesis

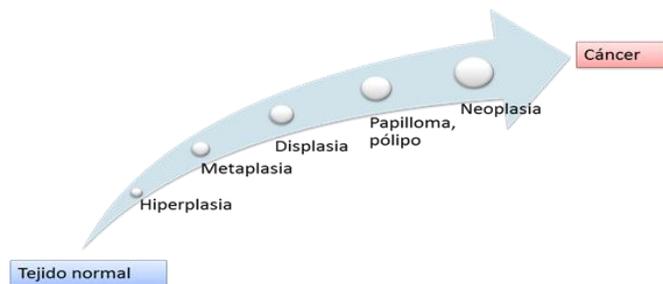
El desarrollo del cáncer es un proceso de múltiples etapas a través del tiempo donde las células deben sobrepasar los controles biológicos para ser capaces de crecer, formar tumores e invadir otros tejidos. Entre las células normales y las cancerosas hay grandes diferencias, que reflejan los cambios sufridos por las células cancerosas con el tiempo. No obstante, no todas las alteraciones en el crecimiento celular son consideradas como cáncer y se clasifican de la siguiente manera [1].

- **Hiperplasia:** se debe al incremento en el estrés (como el uso muscular intenso), inflamación crónica, desbalance hormonal, o compensación en el tejido por daño o enfermedad. En este tipo de crecimiento las células prácticamente son iguales a las normales con excepción de un incremento en su número.
- **Metaplasia:** Es la transformación de un tipo de tejido en otro, este fenómeno es visto como un desplazamiento de células incapaces de soportar un estrés por aquellas con una mayor resistencia. En la metaplasia las células son prácticamente normales a excepción de las que se encuentran en una capa celular a la cual no pertenecen.
- **Displasia:** Es cualquier desorden en la maduración y crecimiento de un tejido, el cual es reversible si se elimina la causa. Se diferencia de la metaplasia puesto que hay una expansión de células normales por células inmaduras. A este nivel las células presentan alteraciones citológicas y cambios en tamaño, forma y organización.
- **Papilomas, pólipos:** Estas células tienen un crecimiento anormal, a veces son llamadas displasias de alto grado. Este tipo de células aun respetan la laminilla basal, pero

presentan una mayor proliferación y suelen formar estructuras visibles llamadas papilomas o pólipos que son consideradas como tumores benignos.

- **Neoplasia:** Son células fuera del control celular, su crecimiento no respeta la laminilla basal e invade los tejidos que lo rodean. En este punto se presenta la capacidad de diseminación hacia órganos distantes (metástasis), y ya es considerado como cáncer [1,3].

Las distintas anomalías en el crecimiento celular son una serie de cambios, en los cuales las células de los tejidos normales son alteradas hasta volverse malignas. Es importante remarcar el hecho de que estas alteraciones no se han probado como pasos secuenciales hacia el desarrollo de un cáncer (Figura 1) [1,3].



**Figura 1. Distintas alteraciones del crecimiento celular.** Desde un tejido normal hasta un cáncer hay una serie de alteraciones en el crecimiento, sin embargo, no todas son consideradas como cáncer. Las alteraciones del crecimiento celular no se han probado como eventos secuenciales hasta el desarrollo de un cáncer, pero queda la pregunta si existen vías comunes hacia el Desarrollo tumoral.

## Microambiente

El desarrollo tumoral (**DT**) es un proceso complejo que no puede ser entendido si se separa a las células tumorales de su microambiente, el cual está compuesto por las células, tejidos y componentes celulares adyacentes al tumor [10]. Cuando las células tumorales sobrepasan la laminilla basal, tienen nuevas interacciones, una de las primeras es con la estructura de soporte llamada matriz extracelular (**ME**), la cual es un reservorio de moléculas proliferativas, de diferenciación y polarización celular entre otras. Durante el DT además de la ME, el tumor interactúa con distintos tipos de células, como fibroblastos, células del sistema inmune y endoteliales [11]. Los fibroblastos son células predominantes en la ME, los cuales están sintetizando y remodelan la ME. Los fibroblastos asociados a tumores muestran una mayor proliferación, condición conocida como desmoplasia y que está acompañada por el reclutamiento de células inflamatorias, degradación de la ME y la promoción de angiogénesis, lo que en conjunto promueve el DT [12, 13].

## Sistema Inmune

Este se compone de leucocitos (mononucleares: linfocitos y monocitos, y polimorfonucleares: neutrófilos, basófilos y eosinófilos), células dendríticas, macrófagos, asesinas naturales (**NK**) y mastocitos, los cuales monitorean constantemente a las células del organismo y si detectan una célula alterada el sistema inmune produce citocinas que activan la apoptosis en esta célula. Sin

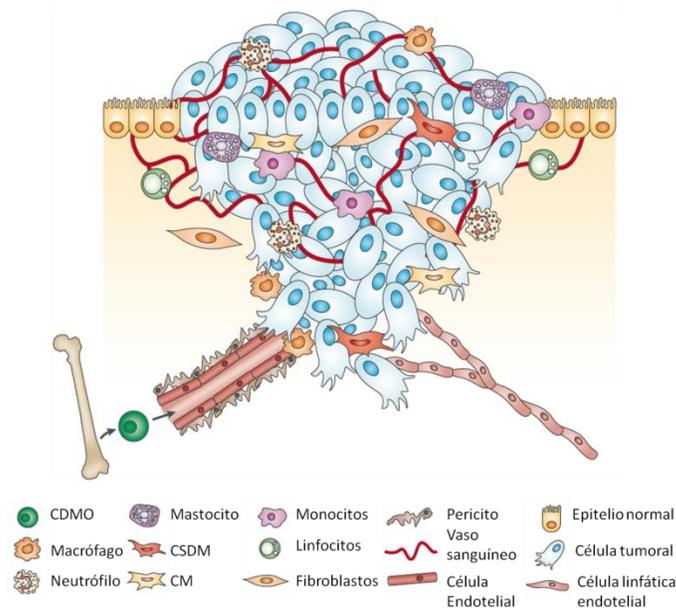
embargo, si las células cancerosas no son detectadas o no responden a las citocinas proapoptóticas, se crea un ambiente inflamatorio alrededor de las células cancerosas promoviendo la proliferación de las células cancerosas, la migración de los fibroblastos, la remodelación de la ME, alteraciones en la integridad genómica y la promoción de la angiogénesis, de esta manera el sistema inmune contradictoriamente contribuye al DT [3, 14-16]

### Angiogenesis

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales son esenciales en la oxigenación, transporte de nutrientes y remoción de desechos celulares. En el DT, no se sabe si la angiogénesis es promovida solo por la secreción de factores angiogénicos del tumor ó si involucra además la participación de la ME. Durante el DT las células estromales y endoteliales proliferan dentro y alrededor del tumor formando vasos sanguíneos que contribuyen a su desarrollo, lo que hace notar una dependencia del tumor a estas células [17, 18].

### Sistema Endocrino

Otro componente importante del microambiente son las hormonas, las cuales pueden promover la aparición y progresión de algunos tipos de cáncer si su producción no es regulada [19]. Factores críticos como TGF- $\beta$ , IGF-1 y VEGF, son alterados con la administración de cantidades altas de hormonas sexuales, estos factores son reguladores parácrinos de células epiteliales y estromales, por lo cual una regulación hormonal inadecuada puede promover el DT (Figura 2) [20, 21].



**Figura 2. El microambiente de las células tumorales.** Las células cancerosas se ven involucradas en un complejo microambiente que incluye células derivadas de la médula espinal (CDMO), células supresoras derivadas de mieloides (CSDM), células mesenquimales (CM), células endoteliales, células epiteliales, hormonas y matriz extracelular, entre otras. Imagen modificada de ref. 16.

## Alteraciones de las células cancerosas

### Autosuficiencia en señales de crecimiento

Una de las principales características de las células cancerosas es su alta tasa proliferativa a comparación de las células normales, las cuales regulan el paso de cada fase del ciclo celular (G1, S, G2, M) por medio de finos controles, entre los que destacan el control por hormonas, volumen celular, regulación de citoesqueleto y regulación de la fase M [1].

Las hormonas son parte de las señales que controlan la proliferación celular y desregulación en la producción de hormonas proliferativas, ayuda a adquirir la autosuficiencia en señales de crecimiento, por ejemplo, la desregulación de la CP21A, (productora de precursores hormonales) se asocian a tumores de mayor masa [22,23].

Las células para proliferar deben crecer y esto es regulado por varias vías de señalización. Las células cancerosas sobrepasan estos controles celulares por dos estrategias, la primera consiste en sobreactivar directamente las cinasas proliferativas como ERK, p38 y/o Akt, o receptores proliferativos como VEGF y EGF (*"Epidermal growth factor"*), y la otra es la sobreactivación de los reguladores positivos de estas cinasas, como es la sobreexpresión de PKHA2 (*"Pleckstrin homology domain-containing family A member 2"*), la cual aumenta la sensibilidad de las células a la insulina y por lo tanto sobreactiva cinasas proliferativas de manera indirecta [24].

Las células que se encuentran en la fase G2, controlan el volumen celular lo que regula la transición a la fase G2 a la fase M; la proteína CLIC1, que es un canal de cloro, participa en la regulación del volumen celular adecuado para la transición de la fase G2 a la M [25,26].

Durante la fase M, los cromosomas deben ser segregados correctamente entre las dos células hijas, por lo cual varias proteínas regulan tanto el posicionamiento de los cromosomas como su separación en el uso mitótico y su migración a cada célula hija. Una de las proteínas que regulan la liberación del uso mitótico es la proteína RAN, la cual promueve la correcta liberación de los cromosomas en el uso mitótico y permite que la fase S continúe. Alteraciones en las funciones de proteínas como RAN, tienen implicaciones como aneuploidía, las cuales pueden promover la aparición y progresión de un cáncer [2].

Las células cancerosas muestran autonomía en cuanto a señales de crecimiento lo que les confiere una ventaja proliferativa en comparación a las células normales, por lo cual el entendimiento de cómo estas células adquieren y mantienen esta capacidad es importante para entender la aparición y progresión de un cáncer.

### Evasión de la apoptosis

La apoptosis ó muerte celular programada, es un mecanismo celular ejecutado de manera activa en respuesta a ciertos estímulos, en particular a daños celulares. Este proceso puede ser activado por la vía extrínseca o la intrínseca: La vía extrínseca es activada de manera extracelular por medio de los receptores tipo TNF (*"Tumor Necrosis Factor"*) y sus ligandos, los cuales activan la apoptosis.

La vía intrínseca se inicia dentro de la célula, y es mediada por la liberación del Citocromo-C de la mitocondria al citoplasma, el cual da la señal de inicio para la apoptosis [3].

Las células cancerosas evaden la apoptosis extrínseca por dos procesos. En el primero se bloquea la capacidad del receptor tipo TNF de activar la apoptosis río abajo en la señalización: esto se logra al sobreexpresar los inhibidores de las cinasas pro-apoptóticas como JNK que son activadas por los receptores tipo TNF, como TNF- $\alpha$  (“*Tumor Necrosis Factor-alfa*”) o TLR4 (“*Toll-like receptor 4*”), de esta manera, aunque los receptores extrínsecos hayan sido activados, estos no son capaces de activar la apoptosis. La segunda estrategia, consiste en inhibir a los receptores tipo TNF por medio de su internalización en vesículas celulares, por lo tanto no pueden unirse a su ligando y desencadenar la apoptosis [1,2].

Los principales factores que activan la vía intrínseca son estreses bioquímicos como: Daño génico, estrés por proteínas mal plegadas, hipoxia y altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (“**ROS**”). Las células cancerosas son capaces de evadir la activación de la apoptosis intrínseca al sobreexpresar proteínas que combaten estos estreses; la respuesta por proteínas mal plegadas es contenida al sobreexpresar chaperonas, Disulfuro Isomerasas y la activación del proteosoma y para contrarrestar la formación de ROS, las células tumorales sobreexpresan Peroxidas y/o Glutación S-Transferasas, las cuales los neutralizan. De esta manera se evita la activación de la apoptosis intrínseca [1-3].

Los sistemas de ejecución para la apoptosis pueden ser funcionales en células cancerosas, pero debido a que estas presentan anomalías en los sistemas de activación, esta no puede ser activada-ejecutada, y las células tumorales adquieren la capacidad de evadir la apoptosis.

### **Invasión de tejidos y metástasis**

La invasión de tejidos es la capacidad de las células cancerosas de “colonizar” distintos sitios y se dividen en dos tipos: la invasión local y metástasis. La invasión local se refiere a la capacidad de las células cancerosas de invadir tejidos adyacentes y la capacidad de sobrepasar la laminilla basal. La metástasis se define como la invasión de las células cancerosas a tejidos distantes de su origen.

La invasión local por las células cancerosas se asocia al fenómeno de Transición Epitelial-Mesenquimal (**TEM**), el cual es un proceso donde las células cancerosas utilizan mecanismos de la embriogénesis, dediferenciación celular y curación de heridas, para ser capaces de invadir tejidos adyacentes y sobrepasar la laminilla basal. Estos cambios se asocian a la pérdida de proteínas ancladoras del citoesqueleto tanto de conexiones célula-célula (integrinas) como uniones célula-laminilla basal (caderinas). El fenómeno TEM consecuentemente implica alteraciones generales en la estructura y función del citoesqueleto de las células cancerosas [4].

La metástasis ha sido esquematizada en 5 pasos: Invasión local, que es la invasión a tejidos adyacentes, intravasación, o la entrada de las células cancerosas a los sistemas circulatorios (vasos sanguíneos y vasos linfáticos), extravasación, que marca la salida de las células cancerosas de los sistemas circulatorios, la formación de microcolonias de células cancerosas (micrometástasis) en tejidos distantes y finalmente el crecimiento de tumores macroscópicos (colonización) [4].

Los procesos de invasión y metástasis han sido esquematizados, pero la forma en que son ejecutados aún no se comprende. Debido a que la causa general de muerte de los pacientes con cáncer es por metástasis, es indispensable entender cómo se adquiere esta capacidad durante el desarrollo tumoral.

### **Desregulación metabólica**

Para mantener una alta capacidad proliferativa, las células cancerosas deben ajustar su metabolismo celular. En células normales, la glucosa se oxida hasta piruvato por la glicolisis produciendo 2 ATPs de energía, NADH y piruvato, y en condiciones de normoxia el piruvato se oxida en la mitocondria produciendo 30 ATPs de energía; en condiciones de hipoxia, se favorece la glicolisis para la producción de energía y el flujo del piruvato se redirige a la producción de lactato el cual produce NADH. Sin embargo, las células cancerosas muestran un metabolismo alterado, donde la mayor producción energética proviene directamente la glicolisis y no de la mitocondria aún en condiciones de normoxia; a este fenómeno se le conoce como efecto Warburg o “glicolisis aerobica” [1-4].

La glicolisis aerobica ha sido documentada en muchos tipos de cáncer y esta acompañada de la alteración en la expresión de proteínas involucradas en la glicolisis:  $\alpha$ -enolasa, Glutamato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, etc. La glicolisis aerobica además de aportar energía, aporta esqueletos de carbono precursores para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos y lípidos. Como resultado, la glicolisis aerobica es clave para la alta capacidad proliferativa de las células cancerosas [4].

### **Inestabilidad genómica**

Las células tienen sistemas de mantenimiento del DNA que conservan el número de mutaciones al mínimo. Sin embargo, en las células cancerosas que adquieren mutaciones que interfieren con estos mecanismos la tasa de mutaciones puede aumentar significativamente, las cuales con el tiempo se pueden acumular y tener como consecuencia otras alteraciones celulares [1].

Otra de las características de las células cancerosas, es que muestran un metabolismo del RNA alterado. Estos cambios están acompañados con la alteración de proteínas involucradas en la transcripción y traducción del RNA, como son helicasas, factores de elongación y ribonucleoproteínas. En conjunto estas alteraciones promueven cambios en la expresión de los genes [1-3].

La inestabilidad genómica permite una alta tasa de mutaciones y también esta conformada por perfiles de transcripción y traducción del RNA alterados, los cuales pueden conferir ventajas a las células cancerosas sobre las normales y de esta manera sobrepasar los controles celulares, por lo cual su entendimiento es básico en el estudio del cáncer [1-3].

Existen más de 100 tipos de cáncer, puede haber subtipos y presentar diferentes grados de malignidad. Esto presupone que las alteraciones que las células cancerosas presentan deben ser muchas. Se ha propuesto que la mayoría de los cánceres presentan esencialmente 10 alteraciones-capacidades en comparación a las células normales (Figura 3) [4].

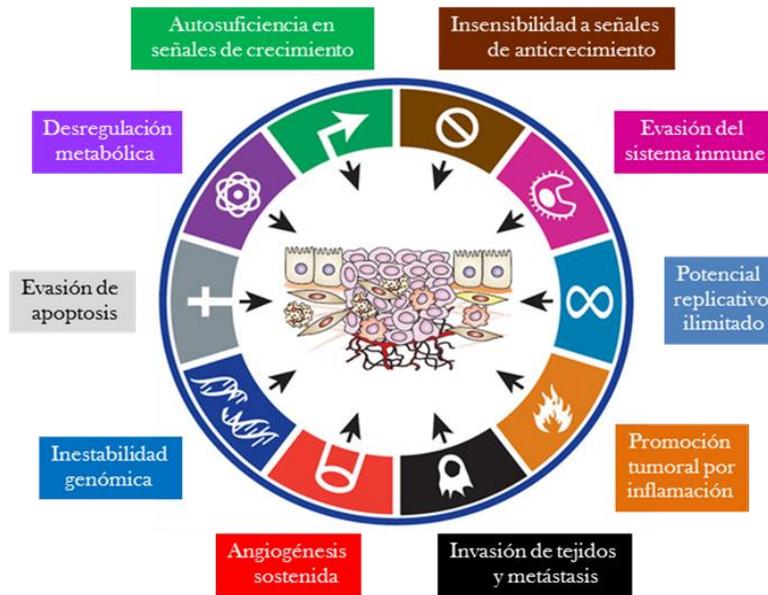


Figura 3. Las 10 características distintivas del cáncer. Imagen adaptada de ref. 4. Se esquematizan las 10 alteraciones-capacidades distintivas del cáncer.

# Estudios genómicos del cáncer cérvico uterino

---

## Cáncer cérvico uterino (CaCu)

De acuerdo con reportes de la OMS, en el año 2008 hubo 12.4 millones de nuevos casos y más de 7.6 millones de muertes por cáncer en el mundo. El cáncer de mama, pulmón y colorectal representaron el 42.5% del total de las muertes en mujeres en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo el cáncer cérvico uterino (**CaCu**) ocupó el primer lugar con un 13.9% de las muertes registradas por cáncer. En México, el CaCu representa la segunda causa de muerte asociada a cáncer, con una tasa de defunciones de 7.4 por cada 100,000 mujeres [29,30].

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un cáncer de lenta y progresiva evolución que se desarrolla en el epitelio cervical y del cuello uterino, la cual es precedida por lesiones neoplásicas intraepiteliales (**NIC**) de grados 1 a 3, generalmente inducidas por el factor etiológico del CaCu: el Virus del Papiloma Humano (**HPV**), presente en  $\geq 99.7\%$  de los tumores. Durante el ciclo de vida del HPV las oncoproteínas E6 y E7 son expresadas y desregulan las funciones de p53 y E2F, lo que altera el ciclo celular. La infección por HPV no es suficiente para el desarrollo del CaCu, otros factores tanto exógenos como endógenos contribuyen al desarrollo y progresión del CaCu [28-31].

## Genómica y Proteómica

Cuando se estableció al genoma como la unidad biológica contenedora de la información genética de un organismo surge la genómica como la ciencia que lo estudia, la cual tienen sus antecedentes en las leyes de la herencia de Gregorio Mendel, el desiframiento del código genético por Georgiy Antonovich Gamow, el establecimiento del DNA como el material hereditario por Oswald Avery, Colin MacLeod, y Maclyn McCarty, los estudios de cristalografía del DNA de Rosalind Franklin, el modelo de doble hélice de Watson y Crick, y las tecnologías de secuenciación masiva [35].

La era genómica se caracteriza porque los genomas de muchos organismos han sido secuenciados con una alta cobertura y la mayoría se encuentra en bases de datos públicas (más de 800 genomas que incluyen archeas, bacterias, eucariontes y organelos celulares), lo que ha permitido tanto estudiar las secuencias de los genomas como el diseño de ensayos funcionales sobre los genes.

Como se mencionó anteriormente, la tumorigénesis es un proceso de múltiples etapas que se suceden a lo largo de décadas e involucran alteraciones genéticas, epigenéticas, proteómicas y de la morfología celular. Este proceso multi-etapas es observado en campos clínicos, epidemiológicos y experimentales [2]. El CaCu muestra una evolución caracterizada por alteraciones citogenéticas y sus perfiles de expresión a nivel de mRNA revelan que varios genes siguen tendencias secuenciales de expresión entre un tejido normal, neoplasia intraepitelial (**NIC**) 1, NIC 2 y NIC 3 [37,38].

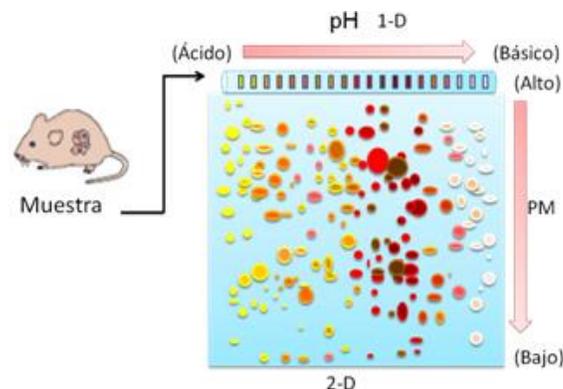
La genómica en el estudio del CaCu se ha concentrado en estudiar los perfiles de expresión génica a nivel de mensajero y principalmente por medio de la tecnología de los microarreglos, sin embargo, cada estudio tiene una planeación específica y el uso de diferentes plataformas no siempre permite comparar directamente los resultados entre estudios, además, el microarreglo representa la expresión de una célula en una condición, pero no es capaz de diferenciar los productos del empalme alternativo ó si existen fusiones transcripcionales, anudado a esto, la correlación entre la expresión a nivel de mensajero y a nivel proteico es bajo [39].

En los tumores, las alteraciones genéticas y epigenéticas son muy comunes, lo que revela una dependencia en las proteínas como actoras principales en la tumorigénesis [40]. En la mayoría de los procesos celulares (crecimiento, proliferación, apoptosis, senescencia, metabolismo, etc.), las proteínas tienen un papel predominante como las moléculas biológicamente activas, por lo tanto, los perfiles proteómicos y cómo las proteínas se relacionan y controlan los distintos procesos deben ser estudiados para entender la biología del DT [41].

## Proteómica

Mark Wilkins fue el primero en usar el termino proteoma, que se refiere a la totalidad de proteínas expresadas en una célula, tejido u organismo, en una etapa dada y bajo condiciones específicas. La proteómica se define como el estudio del proteoma de un genoma. Para estudiar el proteoma, la proteómica utiliza técnicas de extracción y separación de proteínas para su posterior identificación por la espectrometría de masas.

La separación del proteoma se lleva a cabo por distintas metodologías, entre las que destacan la electroforesis en gels de dos dimensiones (**2D-PAGE**), que separa a las proteínas por dos propiedades fisicoquímicas: El punto isoeléctrico (**pI**) y el peso molecular (**pM**) (**Figura 4**) [42].



**Figura 4. Electroforesis de 2-D.** Una vez que el proteoma de la muestra biológica a analizar ha sido obtenido, es separada primero por punto isoeléctrico 1-D y después por peso molecular 2-D.

Una vez separadas las proteínas de una muestra, la identificación proteica es por medio de la espectrometría de masas (**MS "Mass Spectrometry"**) [42]. Un espectrometro de masas es un instrumento que separa iones moleculares por su diferencia entre la proporción de masa y carga ( $m/z$ ). Un espectrómetro de masas consiste en al menos tres componentes: una fuente de

ionización, un analizador de masas y un detector de iones. EL MALDI-TOF (**Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of- Flight**) es un espectrómetro de masas que con un laser ioniza la mezcla de péptidos cristalizados en una matriz especial, estos iones son acelerados en vacío y aquellos iones de menor masa (time-of-fly) son separados de los de mayor y registrados por el detector de iones. Gracias a este principio, la resolución que se alcanza es alta (menos de 1 Dalton de diferencia). Como resultado de este proceso, el MALDI-TOF da la huella digital de la proteína la cual se basa en el peso molecular de los péptidos **PMF** (*peptide-mass fingerprinting*) [43].

El PMF se refiere al espectro de masa producido por la digestión de proteínas con proteasas como la tripsina, lo cual produce una mezcla de péptidos, que al tener una combinación única, les diferencian de otras proteínas lo que da por resultado una “huella” única de la proteína digerida. Estas huellas son comparadas contra las masas de la digestión teórica *in silico* realizada de las secuencias de las proteínas, lo que permite identificar la proteína analizada [42].

## Proteómica en cáncer

La proteómica es la ciencia que estudia los proteomas, si bien, el objetivo de la proteómica es identificar todas las proteínas expresadas en un momento dado, la lista de las proteínas no da información funcional acerca de estas. El objetivo final de la proteómica debe ser la caracterización funcional de la estructuras proteicas, modificaciones post-traduccionales y el flujo de funciones por medio de las interacciones proteína/proteína/DNA/RNA/lípidos/pequeñas moléculas en las células [42].

La Oncoproteómica o la aplicación de la proteómica en el estudio del cáncer, ha permitido la identificación de los cambios en la expresión proteica en diferentes tipos de cáncer y se ha concentrado en la búsqueda de proteínas específicas que correlacionen directamente con la presencia del cancer, en otras palabras, biomarcadores, y aquellas proteínas que puedan ser blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer, los cuales podrían funcionar para la detección molecular de los diferentes tipos de cancer o para su tratamiento específico [43].

La mayoría de los estudios oncoproteómicos llevan a cabo la comparación entre los perfiles proteómicos del control contra el cáncer de interés. Por medio de este enfoque, se han identificado las proteínas diferencialmente expresadas en diferentes tipos de cáncer (**Tabla 1**), sin embargo, el tumor representa un estadio avanzado del cancer, por consecuencia, los cambios detectados son cambios tardíos del desarrollo del cancer. Debido a esto, más del 60% de los pacientes diagnosticados con cancer ya presentan metástasis, por lo tanto, las terapias ya son poco efectivas. Lo ideal sería establecer el proteoma del tejido sano, lesiones precancerosas, tumor no invasivo, displasia y cáncer metastático, para poder identificar biomarcadores y blancos terapéuticos en etapas tempranas del desarrollo tumoral, y no aquellos de etapas tardías que ya muestran consecuencias clínicas graves [44].

El cáncer colorectal muestra una sucesión de etapas característica de la I a la IV. En este cáncer se llevó a cabo uno de los primeros estudios proteómicos que muestran la dinámica de expresión de

las etapas I a la IV. Como consecuencia, pudo establecer un biomarcador para diferenciar entre dos estadios del desarrollo de cancer colorectal [45].

**Tabla 1. Biomarcadores identificados por proteómica para distintos tipos de cáncer.**

Tipo de cáncer	Marcadores
<b>Colorectal</b>	Apolipoproteína C1, Compelento C3a des-arg, a1-antitripsina y transferina [48].
<b>Mama</b>	Calciclina y Calgranulina A [49].
<b>Próstata</b>	PC-1, PC-2, PC-3 [50].
<b>ovario</b>	FK506, inhibidor de disecación Rho, proteína-G y glioxilasa [51].

### Proteómica en cáncer cérvico uterino

Los primeros estudios proteómicos sobre el CaCu datan del 2004, donde el objetivo fue distinguir las diferencias entre el proteoma de tejidos no afectados, líneas celulares no cancerígenas, tejido adyacente al cancerígeno no afectado y biopsias de cáncer cérvico uterino [52, 53, 54, 55]. Hilal Arnouk fue uno de los primeros en observar que la expresión proteica del CaCu es variable entre diferentes estadios de progresión, ya que comparó los perfiles proteómicos de tejido cervical no afectado por cáncer, lesión intraepitelial de alto grado y carcinoma invasivo [56].

Lomnytska fue el primero en abordar el estudio de la expresión proteica de la ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2 y TPM4 durante las neoplasia intraepitelial (**NIC**) 2/3, cáncer microinvasivo y cáncer cérvico escamoso (**CCE**) invasivo. Este estudio evaluó la aplicación clínica como biomarcadores de las proteínas mencionadas así como su implicación en la prognosis, y este estudio fue el primero en notar la expresión dinámica de las proteínas durante el DT del CaCu [58].

La mayoría de las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas entre los diferentes estudios proteómicos del CaCu son diferentes y esto se debe principalmente a que cada estudio presenta la heterogeneidad intrínseca a los pacientes (edad, estado hormonal, genética, medio ambiente), a las biopsias (contenido estromal, estadios distintos, tipo de cáncer) y al tipo de control utilizado (líneas celulares, tejido normal y tejido adyacente al canceroso), anudado a esto, las biopsias solo representan un punto tardío del CaCu. Esta diversidad de controles y análisis estático al comparar solo un punto del DT del CaCu, no permiten establecer la dinámica proteómica del DT en distintos tiempos [53-55].

### Medicina genómica y medicina translacional

En el año 2013 se cumple una década de la terminación del proyecto “The Human Genome Project” (**HGP**) (el proyecto del genoma humano) que fue esfuerzo internacional para secuenciar el genoma humano y que ha permitido el estudio metódico del mismo. Este acontecimiento

histórico sembró las bases para el avance en todos los estudios de las áreas biológicas que involucren al DNA, en especial, para la Medicina Genómica [1].

Con el genoma humano, el diseño y aplicación de ensayos funcionales de forma dirigida y racional fue posible. Así para entender la función de una proteína, se podría utilizar herramientas biomoleculares como RNAs de interferencia, o morfolinós, los cuales se unen al mRNA codificador de la proteína de interés e inhiben su traducción a proteína, de esta manera, es posible observar cuales son sus funciones. Esto es de gran importancia ya que antes del HGP, la medicina diagnosticaba una enfermedad por la presencia de algunos síntomas clínicos y la localización anatomica de la enfermedad, sin embargo, esta metodología empirica, en general errónea e imprecisa, daba como resultado el tratamiento desafortunado de una enfermedad al no entender sus bases funcionales [2,35].

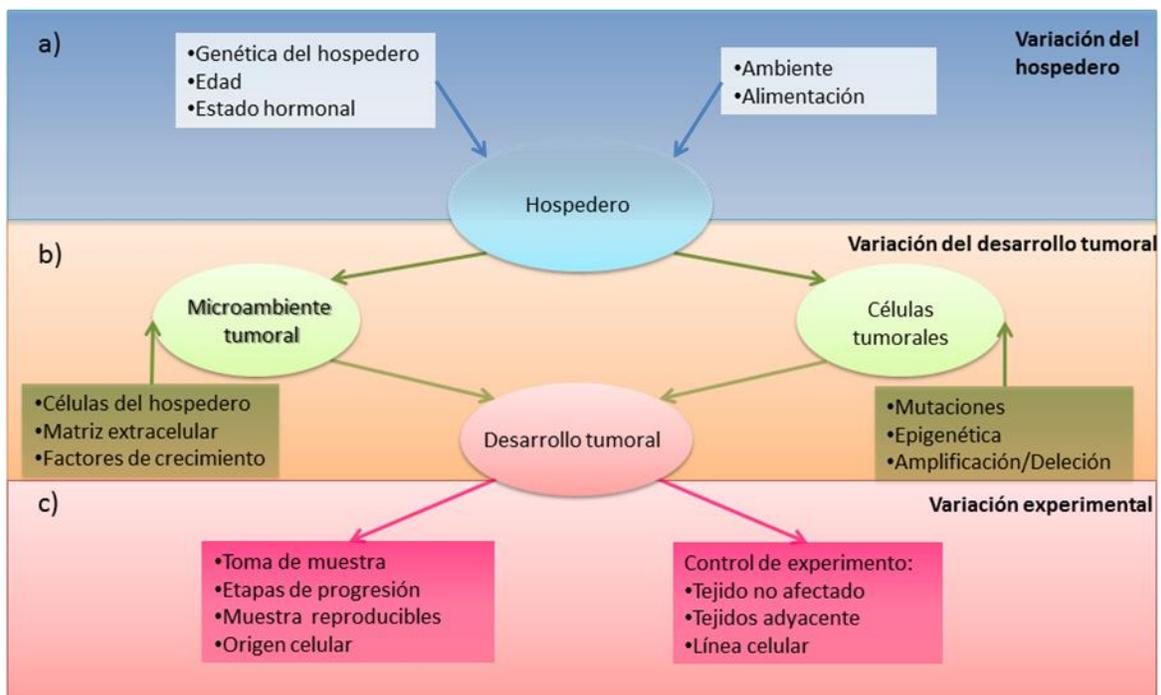
La medicina translacional, se define como la disciplina que “translada” los descubrimientos de la ciencia básica en aplicaciones que mejoren la calidad de vida de la sociedad, como herramientas diagnósticas, tratamiento de enfermedades, estrategias de prevención, políticas y educación. Al combinar la medicina genómica y la medicina translacional se puede llegar a aplicar el diagnóstico basado en el genoma y pruebas moleculares, y así desarrollar y aplicar de manera racional el tratamiento correcto. Este concepto ha sido exitosamente aplicado en los campos de Susceptibilidad a enfermedades, Diagnóstico y pronóstico preclínico, y Farmacogenómica: Dosis, efectividad, consecuencias adversas del uso de fármacos (Tabla 2) [36].

**Tabla 2. Campos donde la medicina genómica y translacional han tenido éxito** (tabla adaptada de Ref. 36).

Susceptibilidad a enfermedades	Diagnóstico y pronóstico preclínico	Farmacogenómica			
		Cáncer, Blanco terapéutico y droga	Dosis	Efectividad	Eventos adversos
Predisposición a desarrollar cáncer de mama por los genes BRCA1/BRCA2	Oncotipo DX: 21 firmas de RNA en tumores de mama y 12 en tumores de colon	Cáncer de mama, HER-2—trastuzumab	CYP2D9/VKORC1—warfarin	Enfermedad de la arteria coronaria y enfermedad vascular periférica CYP2C19—clopidogrel	HLA-B*5701—abacavir (HIV infection)
Predisposición al desarrollo de cáncer colorectal del tipo Lynch	MammaPrint: 70 RNAs relacionados al cáncer de mama	Cáncer de pulmón. EGFR—gefitinib		Infección por virus de hepatitis C IL28B—pegylated interferón/ribavirin (infección por HCV)	HLA-B*1502—carbamazepine (epilepsia, desorden bipolar)
Predisposición a desarrollar Celiacía por antígenos humanos en leucocitos	OVA1: 5 proteínas asociadas al desarrollo de cáncer de ovario	Cáncer colorectal KRAS—cetuximab and panitumumab			
Enfermedades Mendelianas	AlloMap: 11 RNAs en sangre que predicen el rechazo de trasplante cardiaco Corus CAD: 23 RNAs en sangre que predicen alteraciones en la arteria coronaria	Cáncer de pulmón ALK—crizotinib Varios tipos de cáncer BRAF—vemurafenib			

# Modelos de estudio en CaCu

La biología del cáncer puede ser estudiada en biopsias, las cuales representan el estado patológico de un tumor *in vivo* y puede ayudar a definir los cambios generales entre un tumor y tejido sano. Sin embargo, los diferentes estudios en biopsias deben ser interpretados con precaución, debido a que cada biopsia estuvo expuesta a una serie de factores que generan variación y no permite la comparación directa entre estos estudios. Estos factores por su origen pueden ser agrupados en tres categorías: Variación del hospedero, del desarrollo tumoral (**DT**) (células cancerosas y microambiente tumoral) y experimental (**Figura 5**).



**Figura 5. Factores que generan variación en el estudio del DT.** a) Variación del hospedero: esta variación se ve afectada por la genética del paciente, la edad, el estado hormonal y el medio ambiente al cual está expuesto el individuo b) Variación del DT: este concepto se refiere a que cada tumor se desarrolla en un microambiente particular y esto afecta su desarrollo, además el origen celular de las células cancerosas también influye en el DT c) La variación experimental: Se refiere a las distintas metodologías utilizadas desde la toma de la muestra, hasta el análisis e interpretación de los resultados.

Las biopsias, representan un solo punto de la evolución del DT y no reflejan su dinámica a través del tiempo. Por cuestiones bio-éticas las muestras humanas de tumores no son sujetas a experimentación controlada, por lo tanto, para estudiar la dinámica del DT es necesario el uso de modelos de estudio, los cuales permiten:

- Un rango de observación desde el origen del cáncer hasta las últimas etapas de su desarrollo.
- Probar hipótesis acerca del origen, patofisiología y alteraciones presentes en el cáncer.
- Estudiar en detalle rutas patológicas.
- Definir marcas de diagnóstico potenciales.
- Minimizar la interferencia de variables externas al cáncer.
- Provar posibles blancos terapéuticos.

En el estudio del cáncer, las líneas celulares y modelos murinos ha sido indispensable, ya que bajo cuidados correctos y una adecuada planeación experimental, han ayudado a obtener valiosos conocimientos que representan fehacientemente varias de las características de diversos tipos de cáncer [59].

### Líneas celulares: HeLa y SiHa

Las líneas celulares son modelos *in vitro* que por más de 50 años han aportado valiosos conocimientos en la investigación biomédica del cáncer. Las líneas celulares de cáncer, son de un solo tipo celular, se propagadas de manera rápida, son genéticamente y manipulables, y bajo las condiciones correctas y el control apropiado, retienen varias de las propiedades del cáncer de origen y presentan varias ventajas sobre el uso de biopsias como:

- Control preciso del medio ambiente: pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y humedad, entre otras.
- Control sobre densidad celular.
- Composición homogénea de la muestra: células con un fenotipo y genotipo similar y un número casi ilimitado de material..
- Permite el uso de reactivos o medicamentos en volúmenes pequeños y con acceso directo a las células, lo que se traduce en un bajo costo experimental.
- La investigación biomédica requiere del sacrificio de animales de experimentación, el cultivo celular no puede reemplazar al ensayo *in vivo*, pero es una alternativa válida para probar experimentos previos al ensayo *in vivo*.

El cultivo celular, sin embargo, también presenta desventajas:

- Inestabilidad. El cultivo de líneas celulares cancerosas puede ser inestable, debido a la composición cromosómica aneuploide que presentan y su capacidad de adaptación, las células cultivadas bajo condiciones diferentes, pueden cambiar tanto su composición genética como su morfología, lo que propicia que los experimentos entre laboratorios no sean reproducibles. La única manera de evitar esto es hacer un banco de células y resembrarlas para el experimento en cuestión cada cierto tiempo.
- Requiere condiciones continuas de asepsia y de un personal altamente calificado para el manejo adecuado.
- El ensayo *in vitro* no siempre garantiza el mismo efecto *in vivo*.

- Los complejos sistemas hormonales de un sistema vivo no son incluidos..
- El crecimiento celular tridimensional no es reproducido.
- El microambiente no esta presente en este tipo de cultivos.

Entre las líneas celulares que más aportes a la biología han ofrecido es la línea celular HeLa. En el año 1951 se estableció la línea celular HeLa a partir de un adenocarcinoma cervical grado III, proveniente de una mujer de 31 años de ascendencia africana, esta línea es HPV-18+. Análisis citogenéticos muestra que la línea suele presentar un número modal de 82 cromosomas con un rango de 70 a 164. Desde entonces otras líneas celulares han sido establecidas [60].

La línea celular SiHa fue establecida en 1970 a partir de fragmentos de un cáncer cérvico escamoso grado II obtenido de la cirugía de una paciente de 55 años de edad de ascendencia Asiática. Esta línea es hipertriploide, con un número modal de  $69 \pm 21$  cromosomas, Es HPV-16+ con una o dos copias por célula [61].

Las células HeLa y SiHa han sido cultivadas por más de 40 años, y son modelos de estudio esencial en la biología. Una de sus características de las líneas celulares de cáncer, es que forman tumores en ratones inmuno-comprometidos [59-62].

### El ratón atómico *Nu/Nu*

La especie animal más utilizada en experimentación científica es el ratón (*Mus musculus*). El cual es uno de los modelos de mayor uso para el entendimiento de la biología del cáncer y desarrollo y prueba de fármacos antitumorales. Este modelo *in vivo*, puede ser manipulado genéticamente (ratón transgénico) o la inoculación de líneas celulares cancerosas (cultivo *in vivo*). El modelo murino tiene ventajas y desventajas, pero con una correcta planeación y la interpretación adecuada de los resultados obtenidos en el ratón, permiten obtener resultados indispensables en el estudio del cáncer [59].

El primer ratón *Nu/Nu* fue descubierto en 1937 por el criador Miroslav Holub, originalmente se les describió como ratones *Nu* (de la palabra *Nude*), pero posteriormente se les llamo Hfh11nu, cuando el gen homólogo *HNF-3/forkhead* del cromosoma 11 fue identificado como el causante de su fenotipo. En el 2000, este gen fue identificado como miembro de la familia génica *Fox* y la nomenclatura cambio nuevamente a *Foxn11nu* [59].

Este tipo de ratón es llamado *ratón desnudo atómico*, debido a la presencia de dos copias defectuosas del gen *Nu*, que no permiten el desarrollo normal del timo, lo que imposibilita la correcta formación de linfocitos T maduros y por lo tanto la incapacita la respuesta inmune dependiente de células T, la cual incluye:

- Formación de anticuerpos que requieren células T de ayuda.
- Respuesta inmune mediada por células, que requieren de células T CD8+.
- Respuesta hipersensitiva que requiere de células T de memoria.
- Destrucción de células infectadas por virus que requieren de células citotóxicas T.

Los ratones *Nu/Nu*, son incapaces de rechazar xenógrafos, puesto que esto requiere de células T CD4+ y CD8+. Aunque en algunos individuos se llega a presentar un timo rudimentario, no suele haber una maduración correcta de las células T [59].

Los ratones *Nu/Nu*, presentan niveles elevados de macrófagos, LAK (*lymphokine-activated killer*), células NK, células B y una respuesta normal por células del sistema independientes a las células T. Gracias a estas características, los ratones desnudos son un modelo para el estudio de tejidos cancerosos trasplantados o la inoculación con células formadoras de tumores [3, 59]. Cuando una línea celular cancerosa es inoculada en ratones *Nu/Nu*, se le conoce como cultivo *in vivo* ó tumor xenógrafo, el cual ofrece las ventajas de ambos modelos (Tabla 3) [62].

**Tabla 3. Propiedades de cultivo *in vitro*, ratones y cultivos *in vivo*.**

Propiedades	Modelos <i>in vivo</i>		Modelo <i>in vitro</i>
	Transgénicos	Xenógrafos	Células cancerosas
Cambios genéticos	+	+	+
Cambios epigenéticos	?	?	?
Cinéticas de crecimiento	-	+	+
Matriz extracelular	+	+	-
Organización 3D	+	+	-
Temperatura, pO <sub>2</sub> y pH fisiológico	+	+	-
Factores de crecimiento y hormonas a niveles fisiológicos	+	+	-
Presencia de células	+	+	-
Presencia de células inflamatorias, endoteliales y fibroblastos	+	+	-

*Nota: el símbolo "+" representa presencia, el símbolo "-" representa ausencia y/o parcialmente presente y el "?", significa desconocido.*

# Justificación

---

Los estudios proteómicos del CaCu han identificado proteínas diferencialmente expresadas del CaCu, sin embargo, existe muy poca información acerca de los cambios del proteoma durante el desarrollo y progresión tumoral [53,55].

Para establecer los cambios del proteoma en el tiempo durante el DT de las células cancerosas se requiere de un modelo biológico dinámico, que reproduzca las complejas interacciones del microambiente a lo largo de este proceso y al mismo tiempo minimice la variación entre las muestras [10,11,14,59,60].

Una solución parcial, es generar tumores de células cancerosas en ratones *Nu/Nu*, lo cual recrea las interacciones del microambiente, condiciones de espacio, nutrientes, hormonas y estructura tumoral durante el DT. En conjunto este modelo permite minimizar la variación entre las muestras analizadas y como consecuencia se podrá establecer los cambios del proteoma durante el DT a través del tiempo [42,59,62].

# Hipótesis

---

Los cambios que las células cancerosas sufren en el tiempo durante el DT, pueden ser abordadas por medio del proteoma.

## Objetivo General

---

Analizar el proteoma durante el desarrollo de tumores derivados de la línea celular de cáncer cérvico-uterino HeLa y SiHa en tres tiempos distintos.

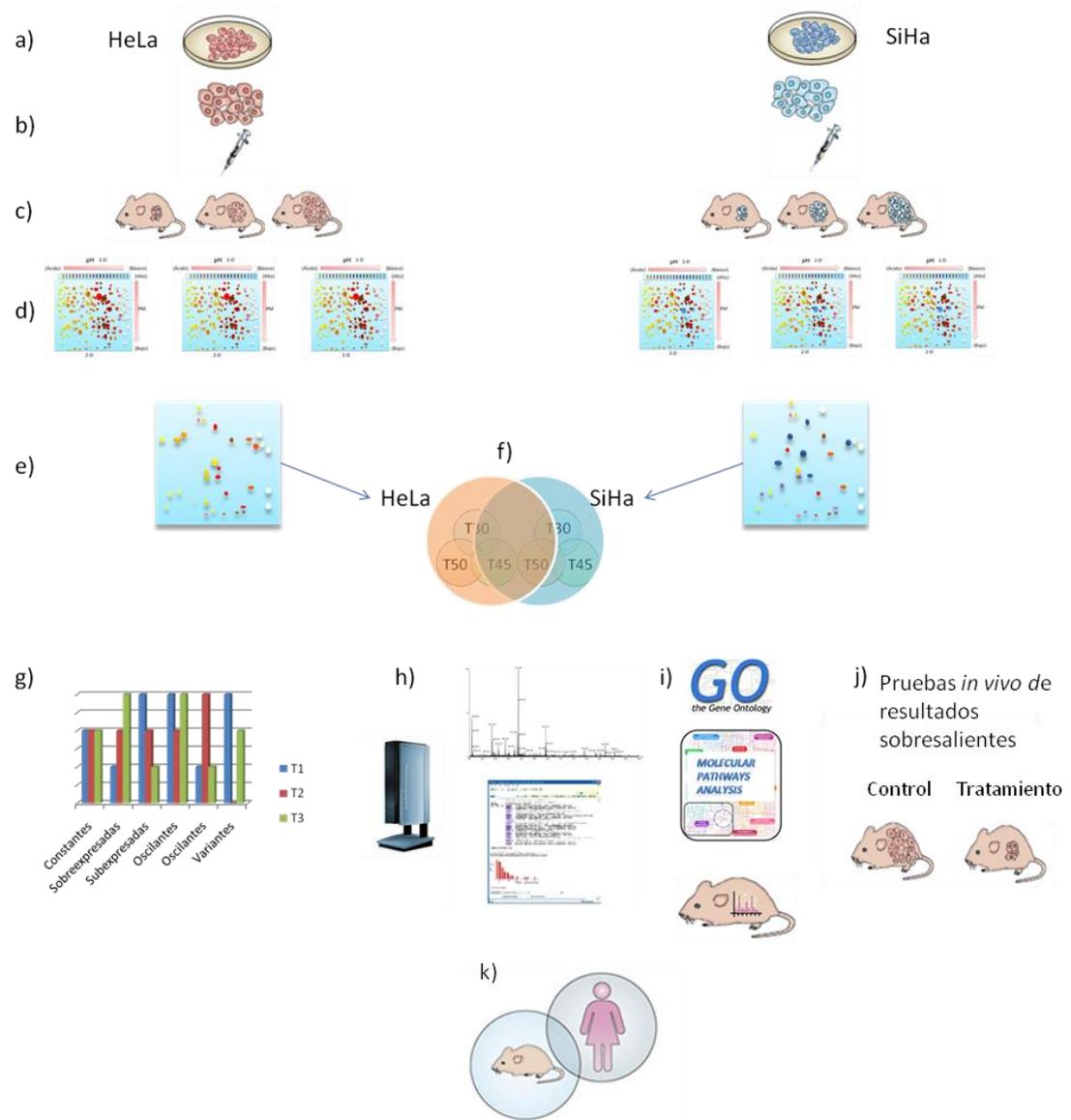
### Objetivos Particulares

1. Analisar la cinética de crecimiento tumoral de las líneas celulares de CaCu en ratones inoculados de la cepa *Nu/Nu*.
2. Analisar los perfiles proteómicos a tres tiempos del DT posteriores a la inoculación de las líneas celulares HeLa y SiHa en ratones *Nu/Nu*.
3. Analisar las posibles funciones de las proteínas diferencialmente expresadas en los tres tiempos y entre las líneas celulares de CaCu.
4. Llevar a cabo el ensayo funcional de los resultados más sobresalientes.

# Material y métodos

## Diseño de metodología:

**Figura 6. Metodología.** **a)** Las células HeLa o SiHa fueron cultivadas hasta un 70-80% de confluencia, **b)** cosechadas e inoculadas en ratones hembra de la cepa *Nu/Nu* a las 6 semanas de edad **c)** Se cosecharon los tumores a tres tiempos (30, 45 y 50 días posteriores a la inoculación y tres replicas biológicas por tiempo). **d)** Se obtuvo el perfil proteómico de cada tiempo. **e-g)** Se compararon los perfiles proteómicos para encontrar las proteínas diferencialmente expresadas en el DT. **h)** Las proteínas fueron identificadas por medio de MALDI-TOF y el uso de MASCOT. **i)** Se analizaron los resultados por medio de un enfoque de redes y el uso de GOs y rutas de interacciones. **j)** Prueba *in vivo* de los resultados sobresalientes por medio del “*knock-down*” con morfolinós durante el DT **k)** Análisis de resultados y la literatura para entender y proponer aquellos cambios que suceden a lo largo del DT del modelo y su posible intersección con el DT del CaCu en el humano.



## Cultivo celular

La línea celular HeLa y SiHa se cultivaron en medio Advanced-RPMI (Invitrogen, CA), suplementado con L-Glutamina y Antibiótico-Antimicótico (10, 000 unidades de penicilina, 10mg de estreptomycin y 25 mg de anfotericina B por mL) en botellas de cultivo de 75 cm<sup>3</sup> (Nunclon, Dinamarca) con una concentración constante de CO<sub>2</sub> al 5%, una temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad.

## Tumores de CaCu

Las células en cultivo, se cosecharon en una confluencia aproximada de 80-90%. Se colocaron las células en tubos de 50mL y se centrifugo a 1,500xg por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 10mL de medio de cultivo y se procedió a contar de la siguiente manera:

Se colocaron 10µL de las células resuspendidas y se agregaron 1µL de azul tripano, se agito sutilmente y se incubo por 30 segundos, después se colocaron los 11µL en la cámara *Neubauer* y se observó al microscopio. Se contaron las células presentes en los cuadrantes y el número de células fue estimado con la fórmula:

$$\text{Numero de células} = \frac{\bar{X} \times \text{Volumen} \times 10,000 \times \text{Num de cuadrantes totales}}{\text{Num de cuadrantes contados}}$$

Una vez contadas las células se procedió a la inoculación de 9 ratones *Nu/Nu* hembras con un rango de edad de 4 a 8 semanas, por cada línea celular. Se inyectaron sub-dérmicamente un número de  $1 \times 10^7$  células por ratón. Los tumores fueron cosechados en tres tiempos del crecimiento tumoral: 30 días, 45 días y 50 días. Los tumores fueron quirúrgicamente removidos, lavados con solución salina estéril removiendo sangre y restos de tejido no tumoral, posteriormente se congelaron y se almacenaron a -70°C.

## Extracción de las muestras y cuantificación

Los tumores fueron macerados en nitrógeno líquido, con inhibidores de proteasas (Roche German, AC). La extracción proteica se realizó mediante extracción fenólica y su cuantificación se llevó a cabo por el método de Bradford ácido. *Nota: para mayores detalles ver apéndice B.*

## Electroforesis de doble dimensión

Para la electroforesis 2-D se utilizó el protocolo descrito por Encarnación S., *et al.* [66]. La primera dimensión fue preparada con un gradiente de anfolitos pH 3-10 (Servalyt, grado analítico, SERVA C.A.), con un pre-enfoque y posteriormente un enfoque isoeléctrico con 500 µg de muestra, la segunda dimensión fue realizada en geles de poliacrilamida al 12%. Una vez finalizada la

electroforesis los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal y escaneados en escáner GS-800 (Bio-Rad, C.A.)

## Análisis de geles

Las imágenes digitalizadas de los geles procedentes de la electroforesis de 2-D fueron agrupadas en los grupos experimentales de T30, T45 y T50, se utilizó el software PDQuest 8.01 (Bio-Rad, AC), para analizar los perfiles proteómicos, con el cual se obtuvo una imagen virtual que resume la información de las réplicas experimentales en un solo gel virtual llamado “gel maestro”. Se tomó como identidad electroforética válida, aquella presente en al menos un gel. Una vez obtenido el gel maestro, los geles son comparados entre ellos para obtener aquellas proteínas diferencialmente expresadas en el tiempo a través de pruebas estadísticas.

## Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Con las identidades electroforéticas seleccionadas como diferencialmente expresadas y aquellas con una expresión constantes, fueron identificadas con el protocolo descrito por Encarnación S., *et al.* Las proteínas fueron recortadas de geles 2-D, alquiladas, reducidas y digeridas con tripsina [66]. Después fueron montadas en la placa de análisis del MALDI-TOF, donde se obtuvieron los espectros de masas o PFM, los cuales con el uso de MASCOT y la base de datos SwissProt 2010\_13 y con los siguientes parámetros de búsqueda fueron identificadas:

Tipo de búsqueda	: Huella de masa molecular
Enzima	: Tripsina
Modificaciones fijas	: Carbamidometil (C)
Modificaciones variables	: Oxidación (M)
Valores de masa	: Monoisotopicos
Masa de proteína	: Sin restricciones
Tolerancia en masa del péptido	: $\pm 100$ ppm
Estado de carga del péptido	: 1+
Máximo número de cortes perdidos	: 1

## Construcción de redes de interacciones proteína-proteína

Una vez identificadas las proteínas, las redes de interacciones de las proteínas identificadas se construyeron de manera bioinformática, se utilizó el programa Cytoscape y el plug-in BisoGenet, en conjunto estas dos herramientas permiten obtener las interacciones Proteína-Proteína reportadas por las bases SysBiomics, la cual integra las bases INTACT, BIOGRID, MINT, DIP, BIND y HPRD. Se utilizó como anzuelo (proteína utilizada para la búsqueda de interacciones) las proteínas identificadas en HeLa y SiHa. Agregando conexiones a los nodos ingresados con los siguientes parámetros y así obteniendo las redes extendidas [67, 68]:

Identificadores	Parámetros de Datos	Método	Salida
Organismo: <i>Homo sapiens</i> (Humano) Identificadores de la lista de entrada: solamente identificadores de proteína.	BioRelaciones: Interacciones Proteína.	Criterio de selección para construcción de Red: Agregar vecinos a los nodos de entrada a una distancia de 1	Representación de los nodos de la red en términos de: Proteínas

### Análisis de enriquecimiento de GOs (Gene Ontology)

El análisis de enriquecimientos de GOs se llevó a cabo utilizando todos los nodos de las redes extendidas de cada categoría con la herramienta ConsensusPathDB (CPDB) del Instituto Max Planck para la Genética Molecular, en conjunto con las herramientas en línea de sobrerrepresentación de Ontología de Genes (GO) nivel 4, categoría de proceso biológico. Para encontrar aquellos GOs sobrerrepresentados, se hace una prueba Hipergeométrica que calcula la significancia estadística de la representación en cierto porcentaje de las proteínas en un GO con las propias. Se tomó como punto de corte un valor  $p < 1 \times 10^{-9}$  para los GOs sobrerrepresentados [165].

### Análisis de enriquecimiento de vías de interacción

El análisis de enriquecimientos de rutas de interacción, se llevó a cabo utilizando todos los nodos de las redes extendidas de cada tiempo usando ConsensusPathDB (CPDB) del Instituto Max Planck para la Genética Molecular, con las herramientas en línea de sobrerrepresentación de rutas de interacción (pathway over-representation). Para encontrar aquellas vías de interacción sobrerrepresentadas, se hace una prueba Hipergeométrica que calcula la significancia estadística de la representación en cierto porcentaje de las proteínas en un vía de interacción con las propias. Se tomó como punto de corte un valor  $p < 1 \times 10^{-7}$  y un sobre lape de vía mínimo de 5, para las proteínas constantes, sobre-expresadas, sub-expresadas y oscilantes [165].

### Diseño de morfolidos

Una vez analizadas las funciones de las proteínas identificadas, se decidió hacer un “*knockdown*” de la expresión génica de las proteínas GSTP1 y GSTM3, para esto se utilizaron morfolidos, los cuales fueron diseñados para unirse a la secuencia complementaria del su gen blanco con una longitud de 25 nucleótidos, incluyendo el codón de inicio ATG. Se buscó que la secuencia no contuviera más de 6 G continuas y se calculó la  $\Delta G$  de las posibles estructuras secundarias y buscando un límite no menor a  $\Delta G = -3$ .

## Tratamiento con morfolinós

Los morfolinós fueron administrados durante el desarrollo tumoral, iniciando la primera dosis el día 15 post-inoculación y cada tercer día, por 15 días, de manera intratumoral con jeringas de insulina de 2mm y fueron administrados 40ng en un volumen de 50 $\mu$ L cada inyección. Se sacrificó el ratón y se obtuvieron los tumores de manera quirúrgica, e inmediatamente después congelados. El volumen se midió igual que los tumores anteriores.

## Western Blot

Se llevó a cabo una electroforesis 1-D, en formato de 6cm de largo por 4cm de ancho y 10 carriles, cargando 20ug de cada muestra y marcadores de peso. Una vez hecha la electroforesis, inmediatamente se transfirió el gel en membrana Immobilon, por una hora con una intensidad de corriente de 8.3 mili-amperes/cm<sup>2</sup>, después de la transferencia se corroboró con rojo Ponceau al 0.5% en acético al 0.1%. Se bloqueó con leche al 5% (Svelty) en TBST durante una hora, se lavó 3 veces por 20 min en TBST, y después se colocó el anticuerpo primario a la dilución adecuada en TBST y se incubó toda la noche. Después se lavó la membrana 3 veces por 20 min con TBST, y se incubó por una hora con el anticuerpo secundario. Se reveló usando una solución de carbazol 8mg\*mL en buffer de acetatos (acetato de sodio: 13.61g, ajuste de pH a 5.2 con ácido acético, llevar a 1ltr).

# Resultados

## Cinética de crecimiento de HeLa y SiHa.

Los tiempos a los cuales los tumores fueron cosechados tanto para HeLa como para SiHa se realizaron en base a la cinética de crecimiento tumoral de la línea celular HeLa [57]. Las cuales muestran de los días 1 al 25 un periodo para el establecimiento del tumor, y durante los días 30 a 50 días un crecimiento acelerado. Para calcular los volúmenes de los tumores se usó la fórmula  $V=3.1614/6 \times L \times W \times H$  [69]. Los ratones *Nu/Nu* hembras fueron inoculados a la edad de 4-8 semanas y los volúmenes tumorales se resumen en la tabla 3 (*Nota: Para mayor información ver Tabla 1, Apéndice E: Resultados extras*):

Línea		
	HeLa	SiHa
Tiempo	Media $\pm$ desviación estándar	
T30	90.01 mm <sup>3</sup> $\pm$ 17.49 mm <sup>3</sup>	150.17 mm <sup>3</sup> $\pm$ 16.04 mm <sup>3</sup>
T45	189.82 mm <sup>3</sup> $\pm$ 86.00 mm <sup>3</sup>	240.82 mm <sup>3</sup> $\pm$ 49.91 mm <sup>3</sup>
T50	559.37 mm <sup>3</sup> $\pm$ 84.37 mm <sup>3</sup>	383.93 mm <sup>3</sup> $\pm$ 21.38 mm <sup>3</sup>

**Tabla 4. Volumen tumoral medio de los tiempos 30, 45 y 50, para las líneas SiHa y HeLa.**

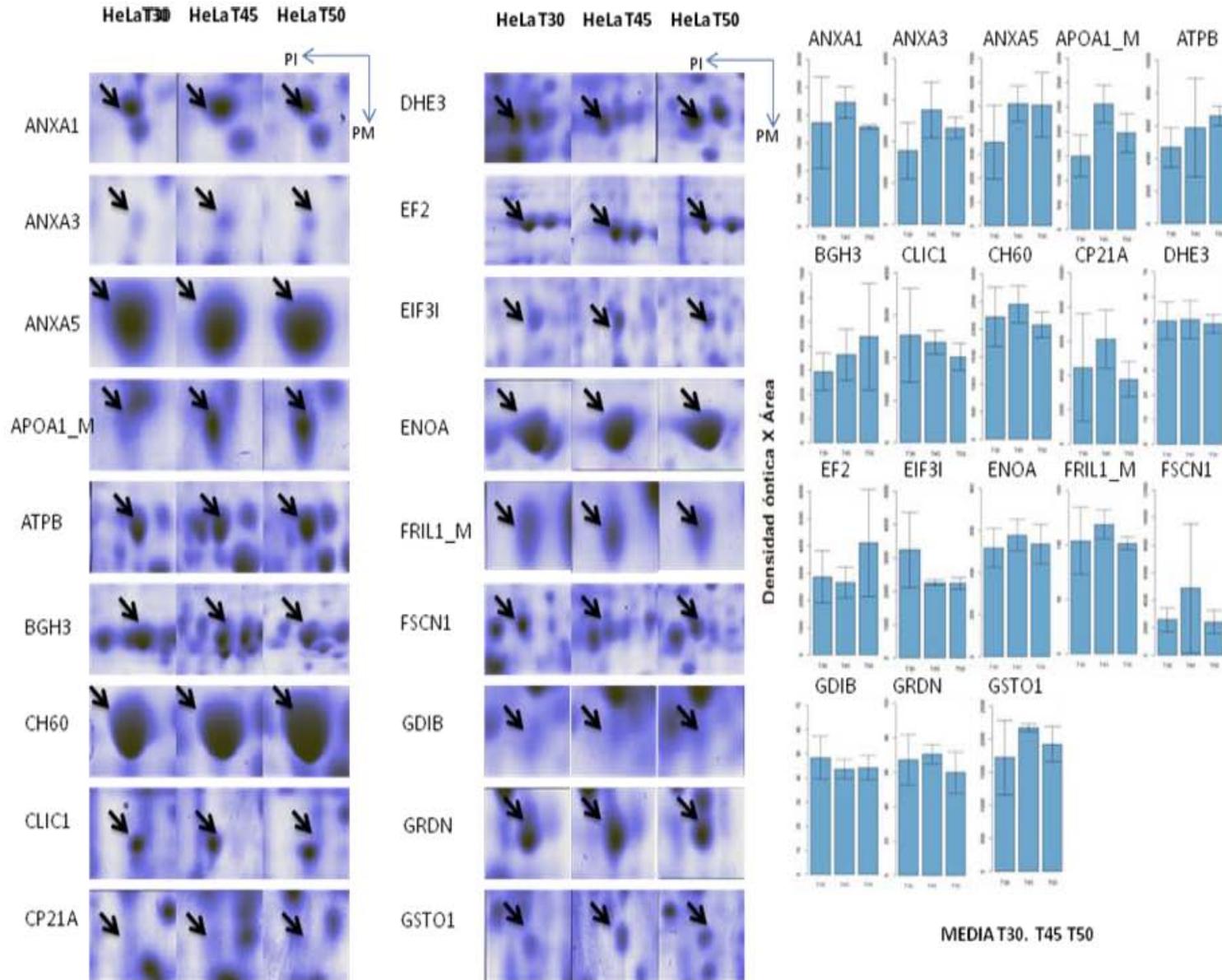
Una vez colectados los tumores y tomado sus parámetros, se obtuvieron sus perfiles proteómicos por geles de 2-D. En el perfil proteómico de HeLa se analizaron 120 entidades electroforéticas con una expresión diferencial, y se identificaron 55 proteínas por medio de MALDI-TOF las cuales fueron agrupadas dependiendo del patrón de expresión a través del tiempo como: constantes, sobre-expresadas, sub-expresadas, oscilantes sobre-expresadas, oscilantes sub-expresadas (ver [Figura 7-Figura 11](#) y [Tabla 5](#)), en cuanto al perfil proteómico de SiHa, se encontraron 172 identidades electroforéticas que muestran una expresión diferencial, y por MALDI-TOF se identificaron 49 proteínas, las cuales fueron agrupadas de la misma manera ([Figura 49-Figura 14](#) y [Tabla 6](#)). *Nota: Para observar individualmente cada proteína identificada ver apéndice D, Proteínas identificadas, HeLa y SiHa.*

Tabla 5. Se muestran las 50 proteínas identificadas por MALDI-TOF, MASCOT y la base de datos Swissprot\_2013 para los tumores de la línea celular HeLa

Expresión	Nombre	Identificador Swissprot	Puntaje MASCOT	valor-p
Constantes	Anexina A1	ANXA1_HUMAN	134	2.10E-08
	Anexina A3	ANXA3_HUMAN	148	1.00E-10
	Anexina A5	ANXA5_HUMAN	65	2.10E-02
	Apolipoproteína A-I	APOA1_MOUSE	165	2.70E-11
	Subunidad beta mitocondrial de la ATP sintasa	ATPB_HUMAN	126	2.00E-05
	Proteína ig-h3 inducida por TGF-β	BGH3_HUMAN	135	6.20E-07
	Proteína de choque térmico mitocondrial de 60kDa	CH60_HUMAN	74	3.30E-03
	Proteína intracelular canal de cloro 1	CLIC1_HUMAN	80	4.80E-03
	Esteroido 21-Hidroxilasa	CP21A_HUMAN	67	3.70E-03
	Glutamato deshidrogenasa 1 mitocondrial	DHE3_HUMAN	150	2.50E-08
	Factor de elongación 2	EF2_HUMAN	178	3.90E-11
	Subunidad 3-factor de inicio de traducción eucariótico	EIF3I_HUMAN	81	4.60E-03
	Enolasa-α	ENOA_HUMAN	92	3.80E-05
	Ferritina de cadena ligera 1	FRIL1_MOUSE	89	7.50E-05
	Fascina 1	FSCN1_HUMAN	126	2.00E-05
	Beta inhibidor de disociación de GDP Rab	GDIB_HUMAN	83	3.40E-04
	Girdina	GRDN_HUMAN	73	3.50E-03
	Glutación S-transferasa Omega 1	GSTO1_HUMAN	89	6.80E-04
	Proteína de choque térmico 1A/1B de 70 kDa	HSP71_HUMAN	78	9.40E-04
	Proteína disulfuro-isomerasa A3	PDIA3_HUMAN	165	1.70E-11
	Fosfoglicerato mutasa 1	PGAM1_HUMAN	73	3.50E-03
	Prohibitina	PHB_HUMAN	136	1.40E-08
	Dominio homologo a pleckstrina contenedor del miembro 2 familia A	PKHA2_HUMAN	66	2.30E-02
	Peroxiredoxina 2	PRDX2_HUMAN	75	1.90E-02
	Peroxiredoxina 4	PRDX4_HUMAN	107	1.10E-05
	Sub-unidad de proteosoma alfa 1	PSA1_HUMAN	73	2.10E-02
	Sub-unidad de proteosoma alfa 5	PSA5_HUMAN	81	4.00E-03
	Subunidad de proteosoma beta 4	PSB4_HUMAN	85	1.80E-03

	Proteína nuclear de unión a GTP RAN	RAN	73	2.60E-02
	RuvB1-like helicasa de DNA	RUVB1_HUMAN	85	1.80E-03
	Subunidad Z de complejo-T	TCPZ_HUMAN	109	8.20E-07
	Triosa fosfato isómerasa	TPIS_HUMAN	102	4.10E-06
Sub- expresadas	Actina alfa de musculo esquelético	ACTS_HUMAN	172	4.10E-13
	Anexina A2	ANXA2_HUMAN	68	9.90E-03
	Colagenasa cadena alfa-2(VI)	CO6A2_MOUSE	103	3.30E-06
	Helicasa de RNA dependiente de ATP DDX3X	DDX3X_HUMAN	104	2.60E-06
	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa	GRP78_HUMAN	189	8.20E-15
	Proteína beta de choque termico-1	HSPB1_HUMAN	136	1.40E-08
	Factor de iniciación eucariótico 4A-1	IF4A1_HUMAN	134	2.90E-09
	Cadena alfa 3 de tropomiosina	TPM3_HUMAN	65	2.00E-02
	Cadena alfa 4 de tropomiosina	TPM4_HUMAN	106	1.60E-06
	Vimentina	VIME_HUMAN	171	4.30E-12
Sobre- expresadas	Albumina sérica	ALBU_MOUSE	126	2.00E-05
	Gliceraldehído 3 fosfato	G3P_HUMAN	79	8.40E-04
	Glutación S-transferasa Mu 3	GSTM3_HUMAN	81	5.70E-04
	L-lactato deshidrogenasa cadena B	LDHB_HUMAN	106	1.40E-05
	Serotransferrina	TRFE_MOUSE	73	2.60E-02
Oscilantes Sobre- expresadas	Proteína cognado de choque térmico de 71 kDa	HSP7C_HUMAN	134	2.60E-09
	Fosforilasa de nucleósido Purina	PNPH_MOUSE	109	8.20E-07
Oscilantes	Factor de degradación de insulina	IDE_MOUSE	90	6.70E-05
Sub- expresadas	Creatina cinasa tipo M	KCRM_MOUSE	91	5.10E-05
	Triosa fosfato isómerasa	TPIS_MOUSE/	70	7.00E-03
	Cadena beta de tropomiosina	TPM2_MOUSE/HUMAN	71	5.30E-03

Figura 7. Proteínas Constantes HeLa



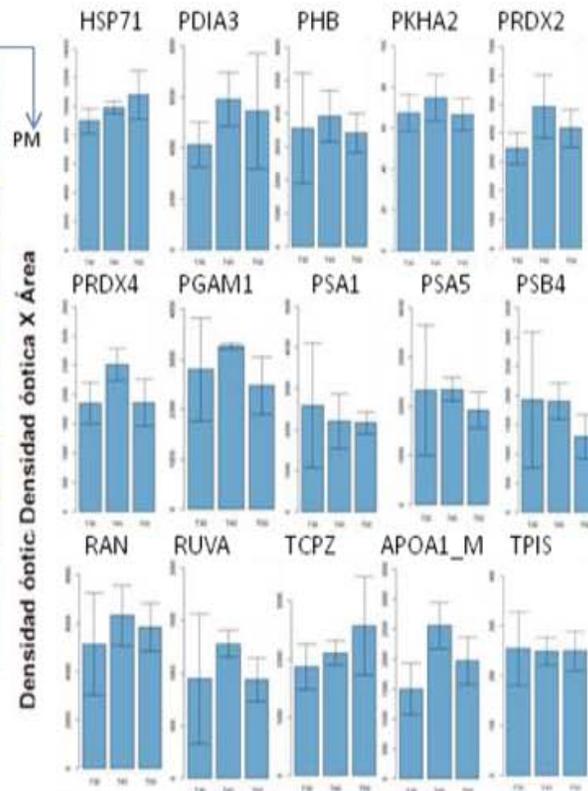
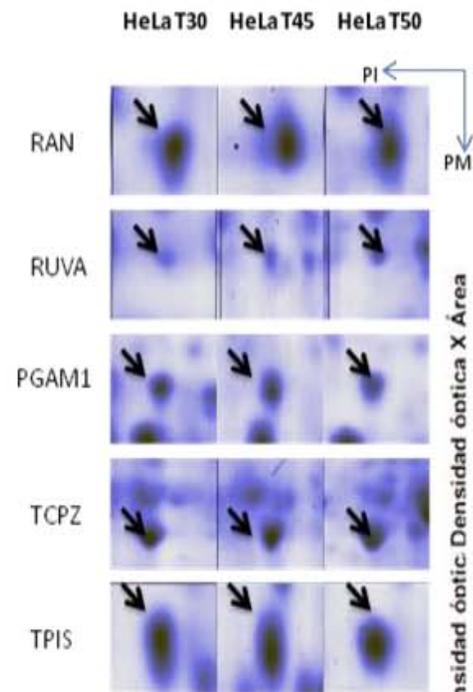
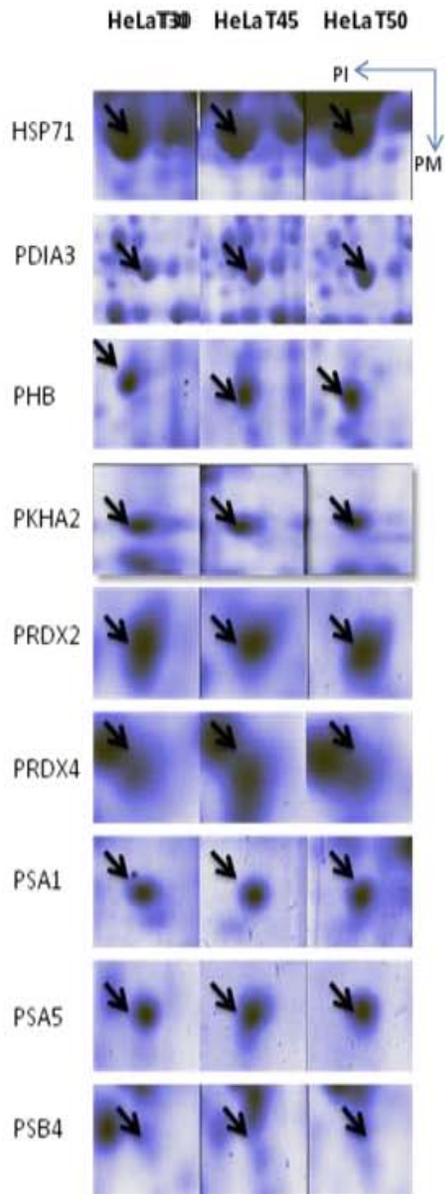


Figura 8. Proteínas Sobre-expresadas HeLa.

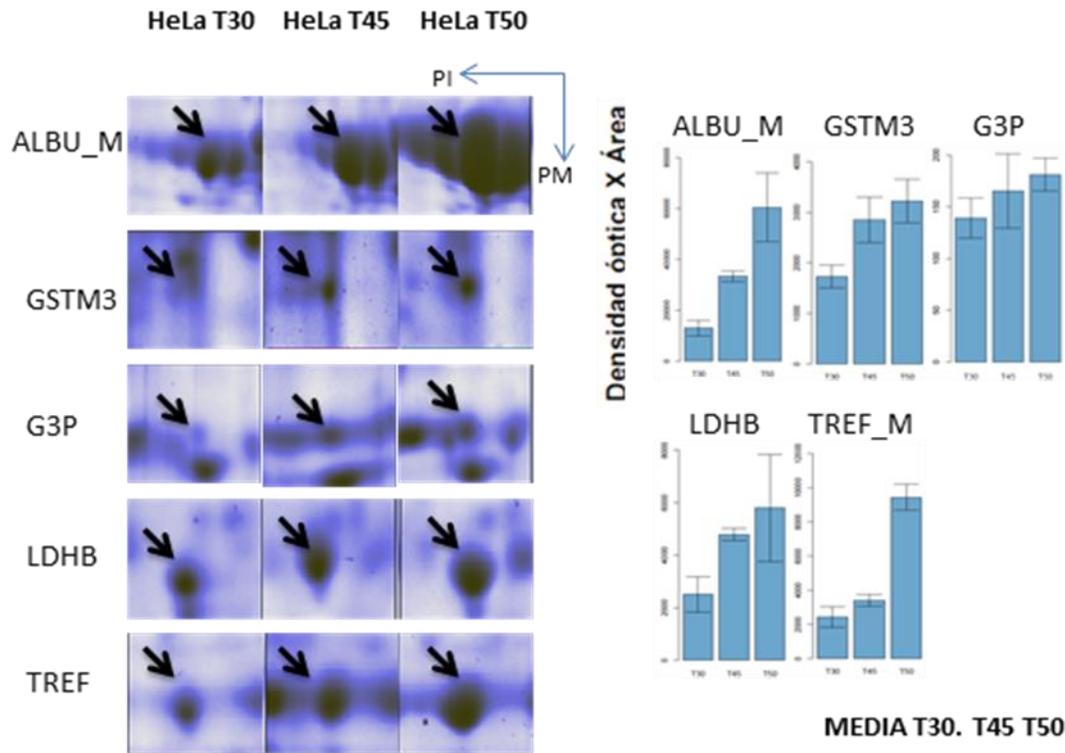


Figura 9. Proteínas Subexpresadas HeLa.

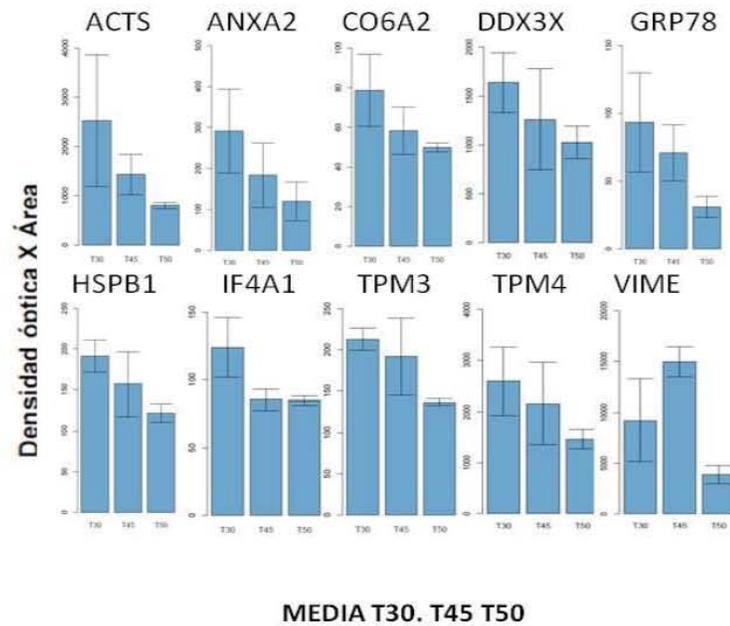
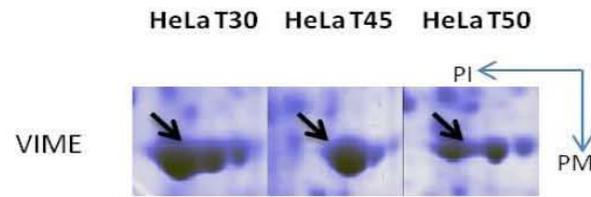
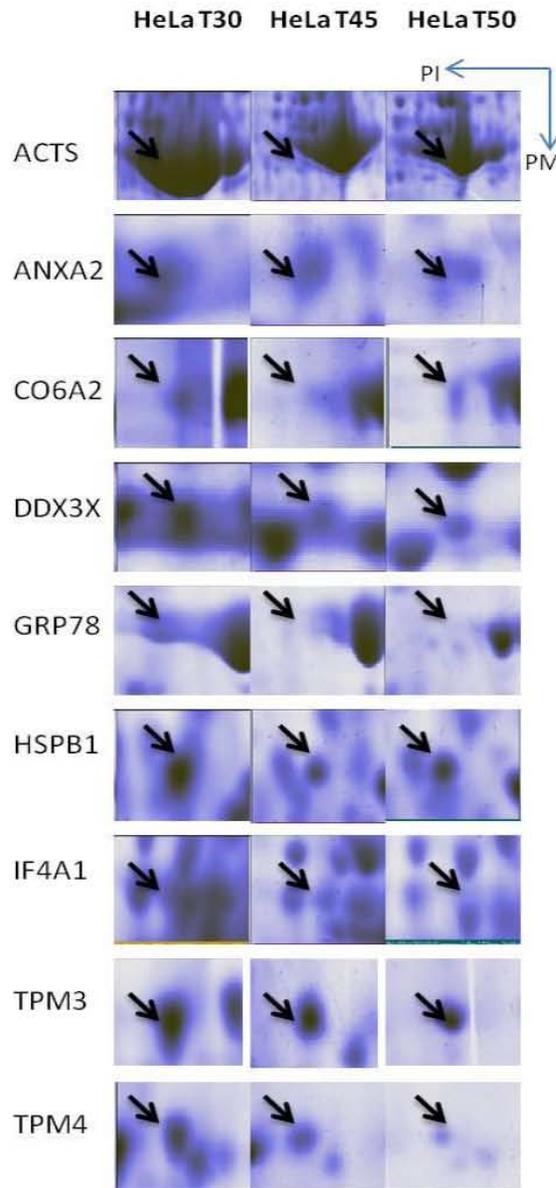


Figura 10. Proteínas Oscilantes Sobre-expresadas HeLa.

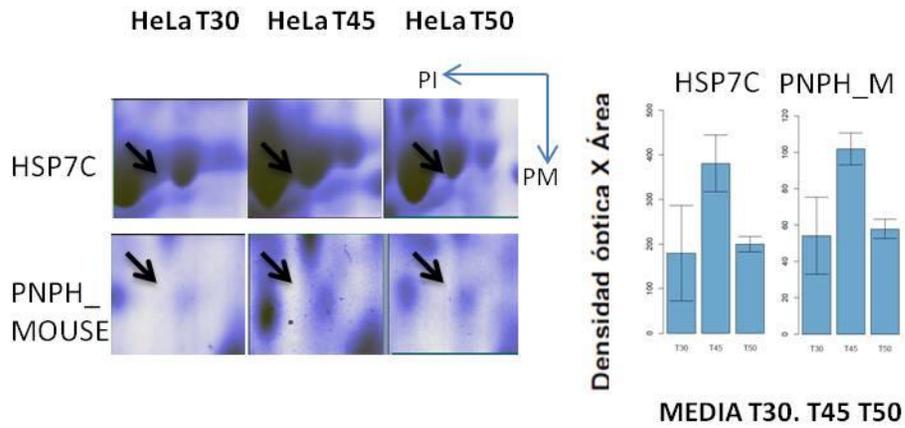


Figura 11. Proteínas Oscilantes Sub-expresadas HeLa.

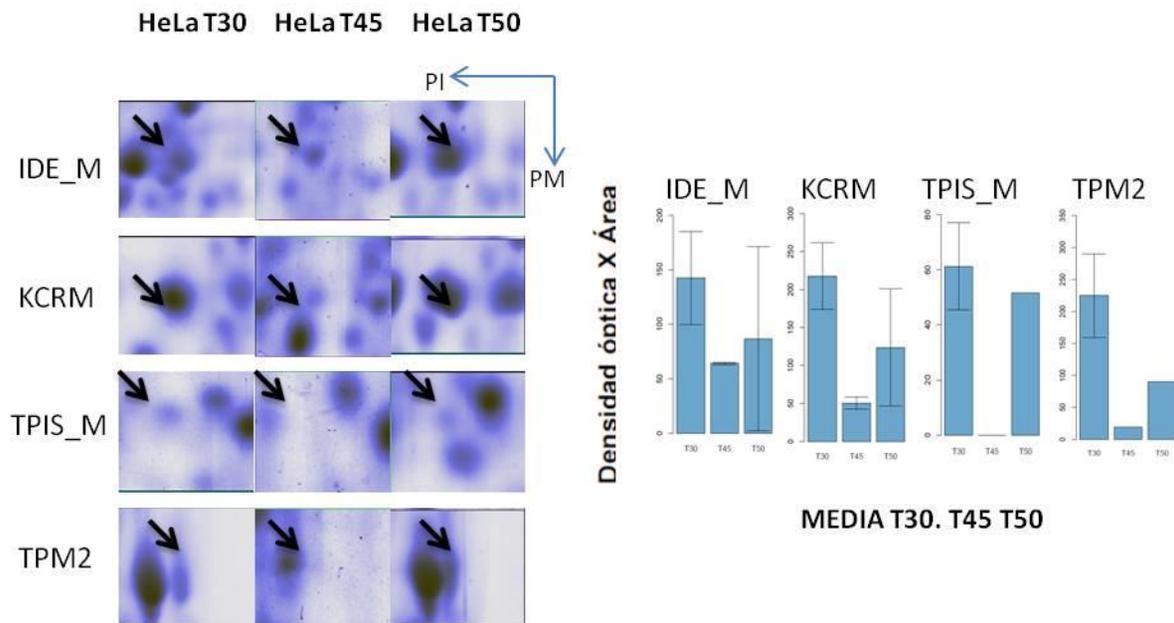
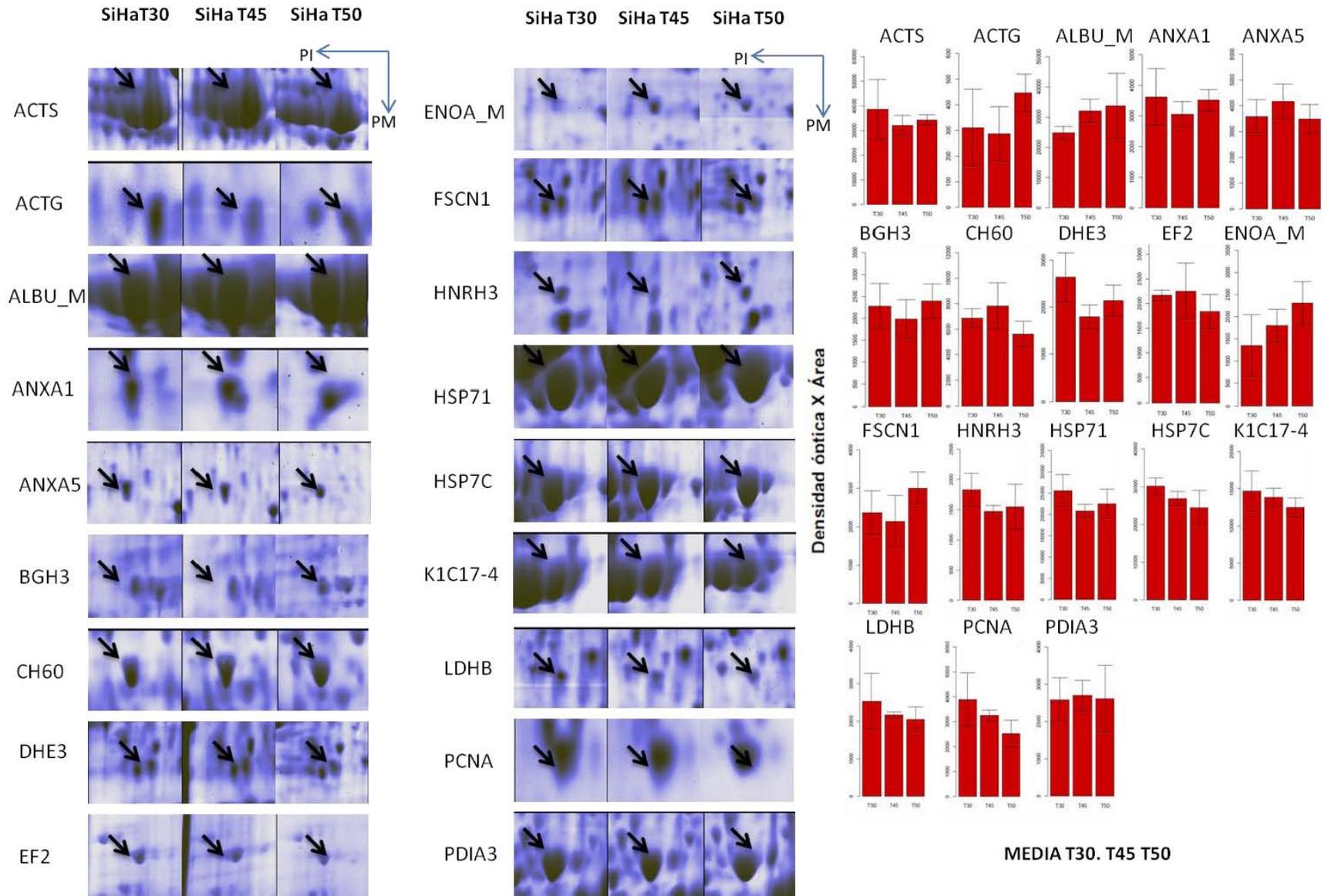


Tabla 6. Se muestran las 49 proteínas identificadas por MALDI-TOF, MASCOT y la base de datos Swissprot\_2011 para los tumores de la línea celular SiHa.

Expresión	Nombre	Identificador Swissprot	Puntaje MASCOT	valor-p
	Actina alfa de musculo esquelético	ACTS_HUMAN	122	3.70E-07
	Actina citoplásmica 1	ACTG_HUMAN	107	4.00E-07
	Albumina sérica	ALBU_MOUSE	84	2.30E-04
	Anexina A1	ANXA1_HUMAN	132	3.40E-08
	Anexina 5	ANXA5_HUMAN	102	4.10E-06
	Proteína ig-h3 inducida por TGF-β	BGH3_HUMAN	83	3.60E-04
	Proteína de choque termico mitocondrial de 60kDa	CH60_HUMAN	122	3.70E-07
Constantes	Glutamato deshidrogenasa 1 mitocondrial	DHE3_HUMAN	80	7.40E-04
	Factor de elongación 2	EF2_HUMAN	184	2.60E-14
	Enolasa-α	ENOA_MOUSE	70	6.70E-03
	Fascina	FSCN1_HUMAN	108	8.60E-06
	Ribonucleoproteina nuclear heterogenea H3	HNRH3_HUMAN	153	2.70E-10
	Proteína Iα/1B de choque térmico de 70kDa	HSP71_HUMAN	183	2.70E-13
	Proteína de choque térmico de 71kDa	HSP7C_HUMAN	134	2.60E-09
	Citoqueratina 17 tipo 1-4	K1C17_HUMAN	192	2.60E-10
	Cadena B de la L-lactato dehidrogenasa	LDHB_HUMAN	111	5.20E-07
	Antígeno nuclear de proliferación celular	PCNA_HUMAN	114	2.60E-07
	Proteína disulfuro-isomerasa A3	PDIA3_HUMAN	135	1.70E-08
	Prohibitina	PHB_HUMAN	131	5.20E-09
	Peroxiredoxina-4	PRDX4_HUMAN	80	7.40E-04
	Sub-unidad de proteosoma beta 4	PSB4_HUMAN	75	2.20E-03
	Sub-unidad de proteosoma 1	PSA1_HUMAN	90	2.30E-05
	Tropomiosina alfa cadena 3	TPM3_MOUSE	102**	4.10E-06
	Serotransferrina	TREF_MOUSE	114	2.10E-06
Sub	Subunidad beta mitocondrial de la ATP sintasa	ATPB_HUMAN	174	1.30E-12
Expresadas	RNA helicasa ATP-dependiente	DDX3X_HUMAN	134	2.10E-08
	Proteína regulada por glucosa de 75kDa	GRP75_HUMAN	75	2.20E-03
	Citoqueratina 17 tipo 1-3	K1C17	176	3.30E-12
	RuvB1-like helicasa de DNA	RUVB1_HUMAN	137	1.10E-08

	Subunidad Z de complejo-T	TCPZ_HUMAN	158	8.60E-11
	Alfa TROPOMIOSINA cadena 4	TPM4_HUMAN	106*	1.60E-06
	Vimentina	VIME_HUMAN	147	1.30E-10
Sobre expresadas	Actina citoplasmática 1	ACTB_HUMAN	101	4.00E-06
	Anexina A3	ANXA3_HUMAN	168	8.60E-12
	Apolipoproteína A-I	APOA1_MOUSE	93*	3.30E-05
	Proteína intracelular canal de cloro 1	CLIC1_HUMAN	83	3.60E-04
	Subunidad 3-factor de inicio de traducción eucariótico	EIF3I_HUMAN Y MOUSE	99	7.50E-05
	Enolasa-α	ENOA_HUMAN	81	2.10E-04
	Enolasa-α	ENOA_HUMAN-2	114	2.60E-07
	Proteína regulada por glucosa de 78kDa	GRP78_HUMAN	154	2.60E-11
	Glutación transferasa Pi1	GSTP1_HUMAN	74	5.40E-03
	Proteína beta de choque termico-1	HSPB1_HUMAN	108	1.00E-06
	Citoqueratina 17 tipo 1	K1C17	154	2.60E-11
	Citoqueratina 8, tipo 2	K2C8_HUMAN	172	3.40E-12
	Fosfoglicerato mutasa 1	PGAM1_HUMAN	135*	2.10E-09
	Peroxiredoxina-2	PRDX2_HUMAN	121	5.20E-08
	Subunidad 5 de proteosoma	PSA5_HUMAN	96	1.20E-04
	Proteína nuclear de unión a GTP RAN	RAN	113	2.40E-07
	Triosafofato isómerasa	TPIS_HUMAN	81	5.00E-04

Figura 12. Proteínas Constantes SiHa.



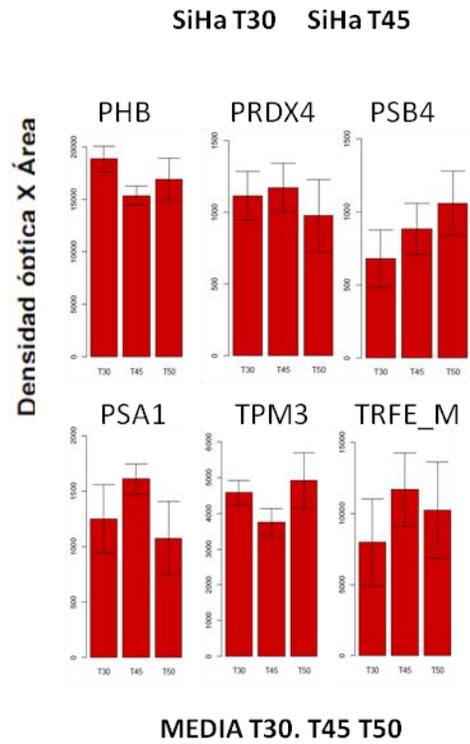
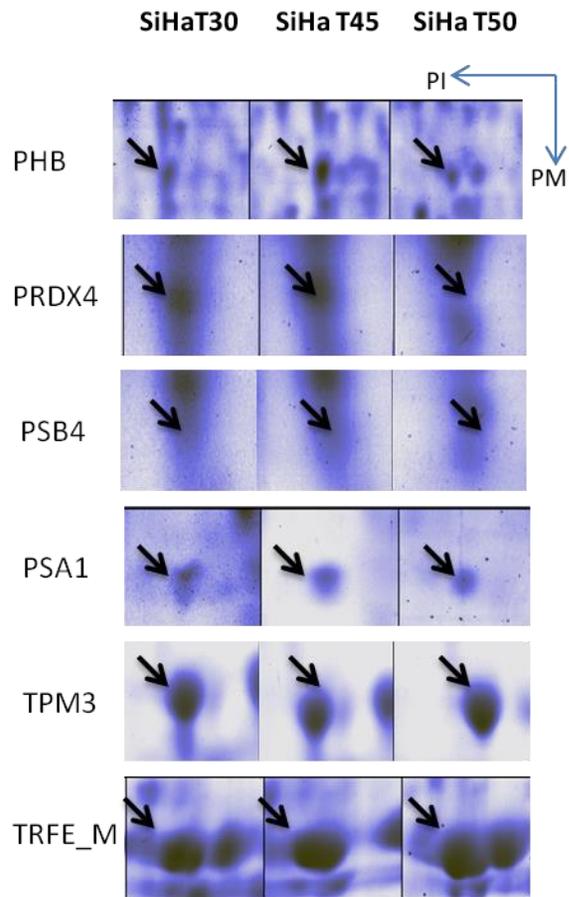


Figura 13. Proteínas Sobre-expresadas SiHa.

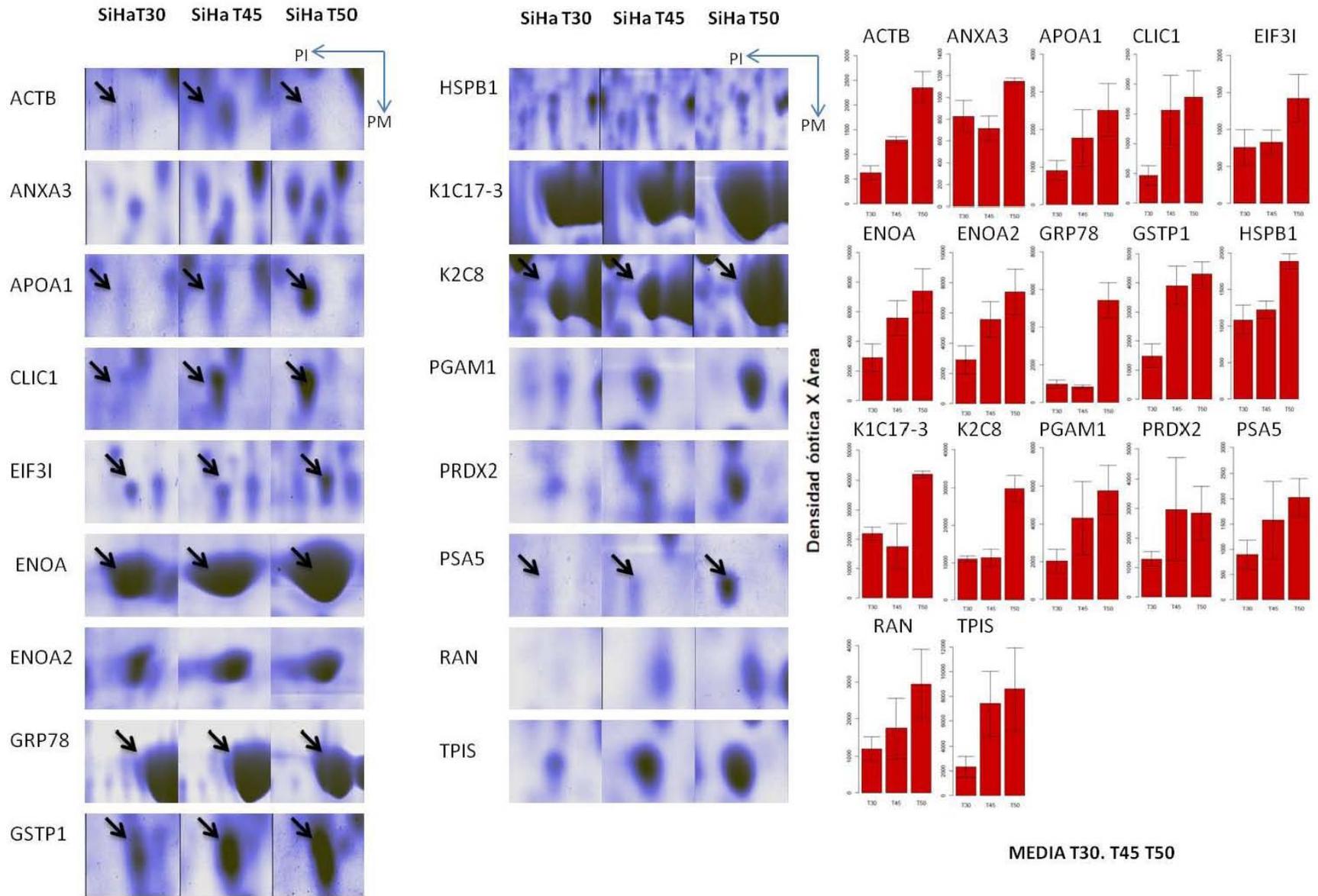
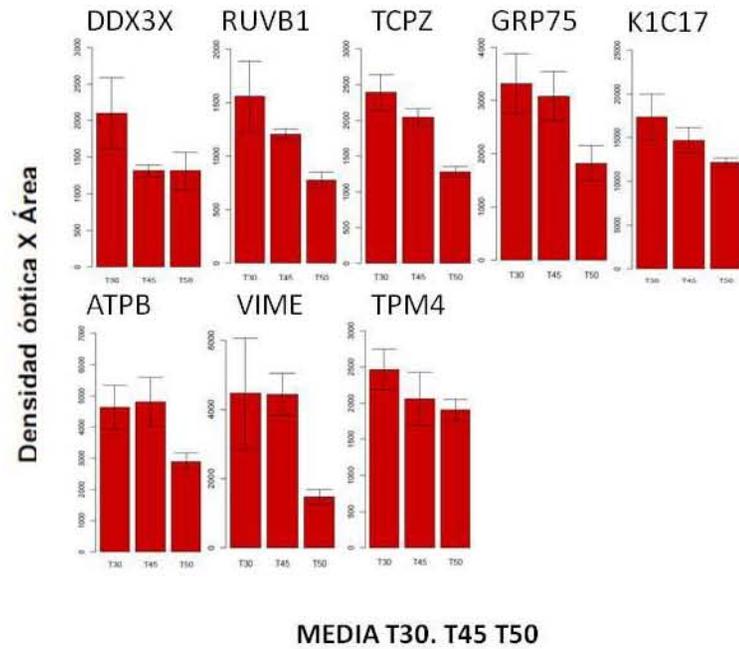
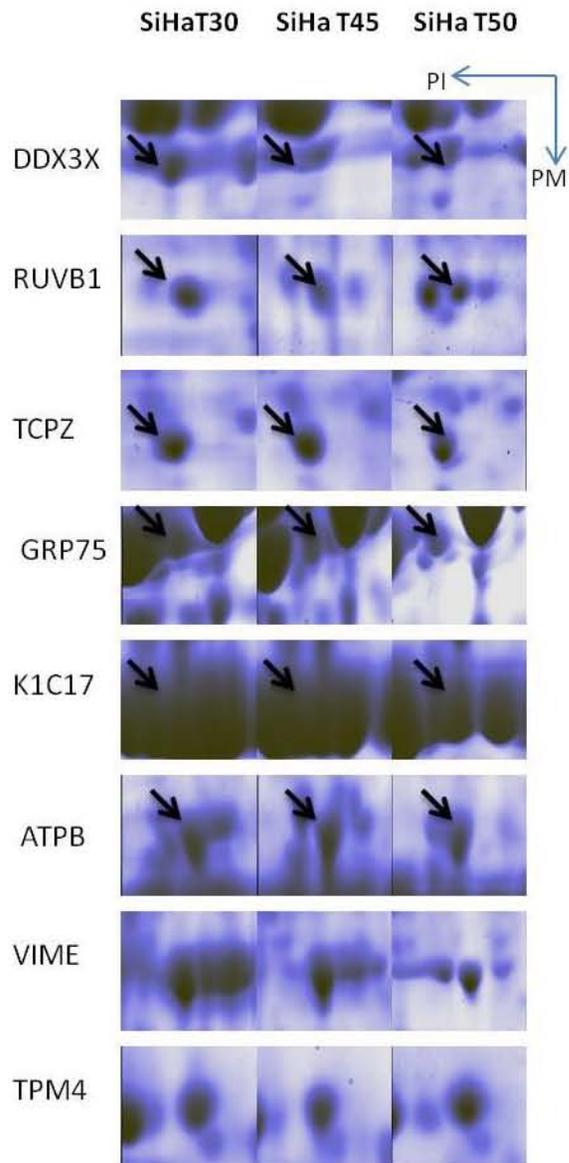


Figura 14. Proteínas Sub-expresadas SiHa.



Una vez identificadas las proteínas, rastreamos el interactoma de estas con el objetivo de entender un poco más del comportamiento del proteoma durante el DT, para esto se usó un enfoque de redes de las proteínas identificadas consistió en interacciones Proteína-Proteína utilizando como anzuelo<sup>1</sup> a las proteínas identificadas, en Cytoscape con ayuda del plug-in BisoGenet para la generación de redes, con expansión a un vecino e interacciones proteína-proteínas (PPI), aquí las proteínas identificadas como pertenecientes al ser humano fueron usadas, ya que estamos buscando las interacciones en células cancerosas [165].

Con el objetivo de obtener un panorama general de las funciones biológicas en las cuales están relacionadas se procedió a hacer un análisis de Ontología Génica. Una vez que se obtuvieron los GOs sobrerrepresentados, el GO “*Response Signalling*” fue el que mayor número de veces se encontró tanto para HeLa (17%) como para SiHa (21%)”. Con esta información, nos preguntamos cuáles podrían ser aquellas vías de señalización que pueden estar involucradas con las proteínas que identificamos, por lo cual procedimos a rastrear aquellas vías de señalización sobrerrepresentadas en el interactoma de las proteínas identificadas. Para este fin utilizamos la herramienta ConsecusPathDB (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>) para el análisis de enriquecimientos de rutas de interacción y encontramos que las vías sobrerrepresentadas para HeLa fueron las de Regulación del DNA y RNA, Sistema inmune y Receptores tipo Toll (13%, 10% y 7%), mientras que para SiHa fueron de Regulación del DNA y RNA, Sistema inmune y Virus y patógenos (16%, 9% y 7%).

## Resultados de los Western blots.

Para corroborar algunos de los resultados sobresalientes que encontramos por medio de los perfiles proteómicos de los tumores, llevamos a cabo el western blot tanto en HeLa como en SiHa, contra las siguientes proteínas: Vimentina, GSTM3, GSTP1, NFkB-p65, TRAF6, ERK 1/2 ( ), pERK ½), JNK, pJNK, p38 ( ) y pp38.

## Tratamiento con morfolinis anti GSTM3, GSTP1 y control

Una vez analizados los resultados de las proteínas identificadas en las líneas celulares, decidimos llevar a cabo el ensayo funcional durante el DT de las proteínas GSTP1 y GSTM3,. Para esto llevamos a cabo la inhibición traduccional de estas proteínas con el uso de morfolinis y utilizamos 6 líneas celulares: 4 líneas de cáncer cérvico uterino: HeLa (HPV-18+), CaLo (HPV-18+), SiHa (HPV-16+), Caski (HPV-16+)); 1 de colon: (colo205); y 1 de cáncer de mama (MDA-231). Se hizo el ensayo por duplicado para cada línea, para el tratamiento con el Morfolino GST-control, GSTM3 y GSTP1. Cuatro líneas (SiHa, CaSki, CaLo, Colo2015) celulares respondieron al tratamiento GSTP1 y 3 al GSTM3 (HeLa, SiHa, CaSki).

---

<sup>1</sup>Proteína anzuelo: se refiere a la proteína que se utiliza en este análisis para buscar en las bases de datos todas las interacciones Proteína-Proteína que esta presenta.

# Discusión e integración de resultados

---

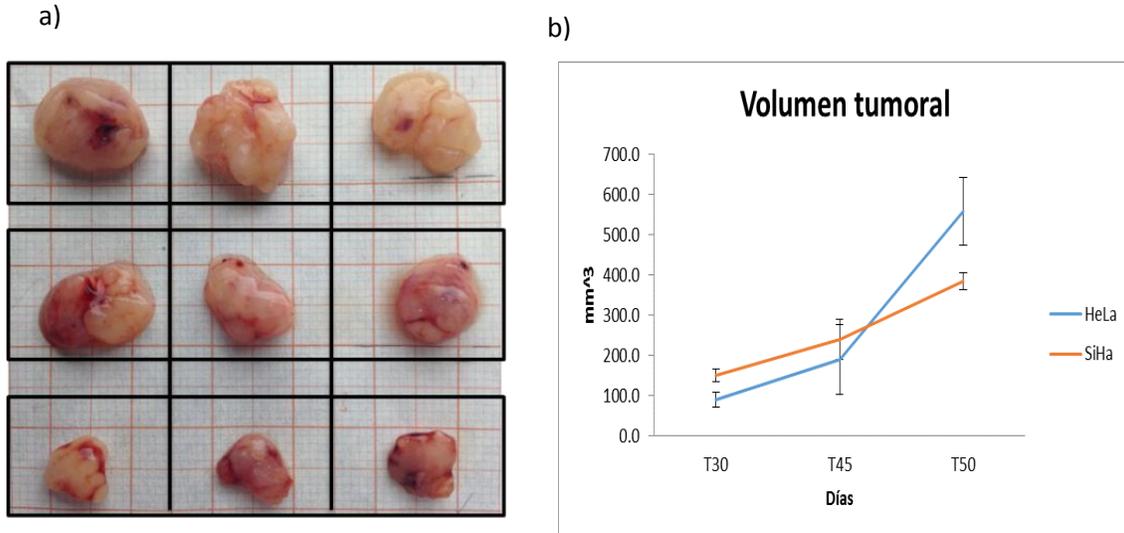
## **Volumen tumoral de HeLa y SiHa a los 30, 45 y 50 días.**

Para generar tumores derivados de las líneas celulares HeLa y SiHa,  $1 \times 10^7$  células de cada línea fueron inoculadas subdermicamente en ratones *Nu/Nu* hembras de 6-8 semanas y se colectaron 3 replicas biológicas a los 30, 45 y 50 días post-inoculación.

La media aritmética del volumen tumoral para HeLa a los 30 días fue de  $90.86 \text{ mm}^3$ , a los 45 días fue de  $228.35 \text{ mm}^3$  y a los 50 días fue de  $544.55 \text{ mm}^3$ . Al comparar el volumen de 30 contra 45 días, encontramos que es 2.51 veces mayor y el volumen del tumor de 45 contra los 50 días, fue de 2.38 veces mayor (**Figura 15**). En el intervalo de tiempo de 15 días que hay entre los tumores a 30 y 45 días, encontramos que el volumen se duplico mientras que en el intervalo de 5 días entre los tiempos 45 y 50 también se duplico el volumen tumoral, lo que implica que la tasa de crecimiento de los 45 a 50 días es tres veces mayor que la tasa de los días 30 a 45.

Para saber si esta cinética de crecimiento tumoral es una particularidad de la línea celular HeLa, o sucede en otras, decidimos usar la línea celular SiHa y seguir el mismo proceso llevado a cabo en HeLa. En los tumores de la línea celular SiHa la media aritmética de los volúmenes a los 30 días fue de  $150.17 \text{ mm}^3$ , a los 45 días de  $240.82 \text{ mm}^3$  y a los 50 días de fue  $383.93 \text{ mm}^3$ . Al comparar el volumen de los tumores T30 contra T45, fue 1.603 veces mayor; y al comparar el volumen del T45 control el T50, fue 1.59 veces mayor. Este resultado confirma que al menos en estas dos líneas celulares, el desarrollo tumoral acelera su tasa de crecimiento en los días 45 a 50 y que es al menos 3 veces mayor que la tasa del desarrollo de los 30 a 45 días. Este comportamiento de crecimiento diferencial en el desarrollo tumoral, indica importantes cambios celulares en este intervalo de tiempo (**Figura 15**) [57, 69].

Para obtener una visión global de los cambios celulares que tienen lugar durante esos tiempos se procedió a obtener los perfiles proteómicos.



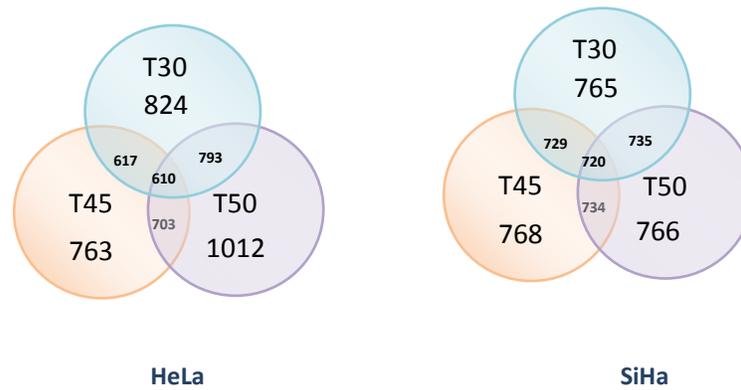
**Figura 15. Cinética de crecimiento tumoral de las líneas celulares HeLa y SiHa.** a) Se muestran los tumores obtenidos de la línea celular SiHa para una comparación visual b) Se muestra la comparación de la cinética de crecimiento de HeLa y SiHa.

### Perfiles proteómicos.

Al comparar las replicas de los perfiles proteómicos de los T30, T45, y T50 (30, 45 y 50 días) para HeLa y SiHa, se encontró que el coeficiente de correlación medio (**CCM**) fue superior a 0.7 en todos los casos, por lo cual las réplicas se encuentran dentro del rango en el que la variación experimental no interfiere para obtener resultados con significado biológico [70].

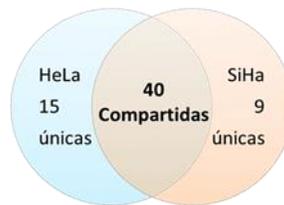
Tiempo	Línea	
	HeLa Spots y CCM	SiHa Spots y CCM
<b>T30</b>	824 y 0.710	765 y 0.731
<b>T45</b>	763 y 0.723	768 y 0.836
<b>T50</b>	1012 y 0.724	766 y 0.756

Entre los perfiles proteómicos de HeLa encontramos 610 entidades electroforéticas compartidas entre todos los tiempos mientras que para SiHa encontramos 93. Por medio de una prueba t-student con una  $\alpha=0.05$ , 120 identidades electroforéticas mostraron una expresión diferencial comparando por pares el T30 contra T45, T45 contra T50 y T30 contra T50 para HeLa, mientras que para SiHa fueron 213 identidades electroforéticas diferencialmente expresadas.



**Figura 16. Diagrama de Venn de los perfiles proteómicos.** Comparando los perfiles proteómicos encontramos 610 entidades electroforéticas comunes a los 3 tiempos (30, 45 y 50 días), T30 y T45 comparten 617, T45 y T50 comparten 703, y entre el T50 y el T30 se comparten 793.

Después de comparar los perfiles proteómicos, decidimos identificar aquellas identidades electroforéticas presentes en ambas líneas celulares y que fuera expresada en los tres tiempos de cada línea. Hasta el momento se han identificado 55 proteínas (**Tabla 11**) del proteoma de HeLa y 49 del proteoma de SiHa (**Tabla 12**). Encontramos 40 proteínas que se encuentran tanto en HeLa como en SiHa, y de estas proteínas compartidas, 16 proteínas tienen la misma dinámica de expresión a través del desarrollo tumoral. Identificamos 15 proteínas presentes en HeLa pero no en SiHa y 9 proteínas presentes en SiHa pero no en HeLa (**Figura 17**)



**Figura 17. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas.** De las proteínas identificadas, 40 fueron encontradas en ambas líneas celulares. Identificamos 15 proteínas presente solo en HeLa, en SiHa 6.

Posteriormente agrupamos a las proteínas de acuerdo a su expresión, tomando como referencia la expresión que muestra al T30 como punto de comparación, de esta manera cada proteína identificada pertenece a una de 5 categorías:

- **Constantes:** muestra una expresión constantes
- **Sobre-expresadas:** muestran un aumento en su expresión conforme al tiempo (al comparar su expresión al T30, hay una aumento para el T45 y/o al T50)
- **Sub-expresada:** decremento su expresión conforme al tiempo, (disminuye su expresión al comparar su expresión al T30, hay una disminución para el T45 y T50)
- **Oscilante sobre-expresada:** Esta categoría incluye a las proteínas que al tiempo T30 tienen una expresión menor al T45, pero que el T50 es menor que T45.
- **Oscilante sub-expresada:** Esta categoría incluye a las proteínas que al tiempo T30 tienen una expresión, al T45 disminuye y al T50 aumenta. *Nota: para consultar cada proteína individualmente ver apéndice D sección Proteínas identificadas.*

## Posibles funciones de las proteínas identificadas en los perfiles proteómicos.

Las proteínas identificadas, fueron agrupadas de acuerdo al hallmark que puedan estar desempeñando tanto en HeLa como en SiHa (Tabla 7 y Tabla 8) y encontramos que el hallmark de resistencia a la muerte celular, la autosuficiencia en señales de crecimiento y la insensibilidad a señales de anti crecimiento son los tres más representados tanto en HeLa como en SiHa. Al agrupar las proteínas identificadas por su función bioquímica encontramos que están involucradas en la desregulación metabólica, evasión de la apoptosis, invasión de tejidos y metástasis, angiogénesis e inestabilidad genómica.

**Tabla 7. Proteínas identificadas en HeLa y su agrupación por Hallmark en el que participan.** El color verde significa expresión constante, el rojo sobreexpresión y el azul sub-expresión.

										
HeLa	Autosuficiencia en señales de crecimiento	Insensibilidad a señales de anti crecimiento	Potencial replicativo ilimitado	Invasión de tejidos y metástasis	Angiogénesis sostenida	Evasión de apoptosis	Desregulación metabólica	Evasión del sistema inmune	Inestabilidad genómica	Promoción tumoral por inflamación
Sobre-expresadas	0	0	0	0	2	2	3	2	0	1
Constantes	11	6	0	9	8	15	5	6	7	2
Sub-expresadas	0	1	0	3	1	5	0	0	2	0
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>22</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>3</b>
	CLIC1_HUMAN	ANXA1_HUMAN	BGH3_HUMAN	ALBU_MOUSE	GSTM3_HUMAN	G3P_HUMAN	GSTM3_HUMAN	EF2_HUMAN	GSTM3_HUMAN	
	CP21A_HUMAN	ANXA1_HUMAN	FSCN1_HUMAN	TRFE_MOUSE	PSA5_HUMAN	LDHB_HUMAN	LDHB_HUMAN	EIF3I_HUMAN	CH60_HUMAN	
	GDIB_HUMAN	PDIA3_HUMAN	TCPZ_HUMAN	ANXA3_HUMAN	ANXA1_HUMAN	TPIS_HUMAN	ANXA5_HUMAN	HNRH3_HUMAN	PRDX2_HUMAN	
	GRDN_HUMAN	PDIA3_HUMAN	K1C17_HUMAN	ANXA5_HUMAN	ANXA5_HUMAN	ATPB_HUMAN	APOA1_MOUSE	PCNA_HUMAN		
	PKHA2_HUMAN	PHB_HUMAN	K2C8_HUMAN	APOA1_MOUSE	CH60_HUMAN	DHE3_HUMAN	ATPB_HUMAN	PHB_HUMAN		
	RAN	RUVB1_HUMAN	ACTS_HUMAN	ATPB_HUMAN	FSCN1_HUMAN	ENOA_HUMAN	PSA1_HUMAN	RUVB1_HUMAN		
	PHB_HUMAN	ACTS_HUMAN	ANXA2_HUMAN	BGH3_HUMAN	GSTO1_HUMAN	PGAM1_HUMAN	PSA5_HUMAN	RAN		
	PRDX4_HUMAN		CO6A2_MOUSE	HSP71_HUMAN	HSP71_HUMAN	TPIS_HUMAN	PSB4_HUMAN	DDX3X_HUMAN		

PSA1\_HUMAN  
PSA5\_HUMAN  
PSB4\_HUMAN

HSPB1_HUMAN	K1C17_HUMAN	PDIA3_HUMAN
TPM3_HUMAN	K2C8_HUMAN	PHB_HUMAN
TPM4_HUMAN	ANXA2_HUMAN	PRDX2_HUMAN
VIME_HUMAN		PRDX4_HUMAN
		PSA1_HUMAN
		PSA5_HUMAN
		PSB4_HUMAN
		K1C17_HUMAN
		K2C8_HUMAN
		ANXA2_HUMAN
		DDX3X_HUMAN
		GRP78_HUMAN
		HSPB1_HUMAN
		VIME_HUMAN

IF4A1\_HUMAN

**Tabla 8. Proteínas identificadas en SiHa y su agrupación por Hallmark en el que participan.** . El color verde significa expresión constante, el rojo sobreexpresión y el azul sub-expresión.

SiHa	 Autosuficiencia en señales de crecimiento	 Insensibilidad a señales de anti crecimiento	 Potencial replicativo ilimitado	 Invasión de tejidos y metástasis	 Angiogénesis sostenida	 Evasión de apoptosis	 Desregulación metabólica	 Evasión del sistema inmune	 Inestabilidad genómica	 Promoción tumoral por inflamación
Sobre-expresadas	3	1	0	3	2	6	2	3	2	2
Constantes	4	5	0	5	11	12	3	4	4	1
Sub-expresadas	0	1	0	4	2	3	1	1	2	0
Total	7	7	0	12	15	21	6	8	8	3
	CLIC1_HUMAN	ACTB_HUMAN		ACTB_HUMAN	ANXA3_HUMAN	GRP78_HUMAN	ENOA_HUMAN	APOA1_MOUSE	EIF3I_HUMAN	GSTM3_HUMAN
	RAN	ACTG_HUMAN		HSPB1_HUMAN	APOA1_MOUSE	GSTM3_HUMAN	PGAM1_HUMAN	GSTM3_HUMAN	RAN	PRDX2_HUMAN
	PSA5_HUMAN	ACTS_HUMAN		K2C8_HUMAN	ALBU_MOUSE	GSTP1_HUMAN	DHE3_HUMAN	PSA5_HUMAN	EF2_HUMAN	CH60_HUMAN
	PHB_HUMAN	ANXA1_HUMAN		ACTG_HUMAN	ANXA5_HUMAN	HSPB1_HUMAN	ENOA_MOUSE	ANXA5_HUMAN	HNRH3_HUMAN	
	PRDX4_HUMAN	PDIA3_HUMAN		ACTS_HUMAN	ANXA5_HUMAN	K2C8_HUMAN	LDHB_HUMAN	LDHB_HUMAN	PCNA_HUMAN	
	PSA1_HUMAN	PHB_HUMAN		BGH3_HUMAN	ATPB_HUMAN	PRDX2_HUMAN	ATPB_HUMAN	PSA1_HUMAN	PHB_HUMAN	
	PSB4_HUMAN	RUVB1_HUMAN		FSCN1_HUMAN	BGH3_HUMAN	ANXA1_HUMAN		PSB4_HUMAN	DDX3X_HUMAN	
				TPM3_MOUSE	FRIL1_MOUSE	ANXA5_HUMAN		ATPB_HUMAN	RUVB1_HUMAN	
				K1C17	HSP71_HUMAN	CH60_HUMAN				
				TCPZ_HUMAN	HSP71_HUMAN	FSCN1_HUMAN				
				TPM4_HUMAN	HSP7C_HUMAN	HSP71_HUMAN				
				VIME_HUMAN	K1C17_HUMAN	HSP7C_HUMAN				
					TRFE_MOUSE	K1C17_HUMAN				
					ATPB_HUMAN	PDIA3_HUMAN				
					ANXA2_HUMAN	PHB_HUMAN				
						PRDX4_HUMAN				
						PSA1_HUMAN				

PSB4\_HUMAN

DDX3X\_HUMAN

GRP75\_HUMAN

VIME\_HUMAN

## Desregulación metabólica.

En cáncer la glicolisis es frecuentemente alterada y aún en condiciones de normoxia existe un alto consumo de glucosa y producción de lactato, fenómeno conocido como glicolisis anaeróbica. Tanto en HeLa como en SiHa identificamos proteínas involucradas en la glicolisis, pero por su expresión, reflejan un flujo de carbono diferente en la glicolisis.

Durante el DT de HeLa, se expresa de manera constante las proteínas que transforman la Fructosa-1-6-bisfosfato hasta piruvato en reacciones reversibles (TPIS, PGAM1 y ENOA), a excepción de dos proteínas que son sobreexpresadas: la Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (**G3P**) y la Lactato Deshidrogenasa (**LDBH**). Esto tiene consecuencias importantes en el flujo de carbono; La G3P cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato (**G3F**) en D-glicerato 1,3, bifosfato, con el uso de NAD<sup>+</sup> y su reducción a NADH [71]. En G3F es un esqueleto de carbono intermediario entre la síntesis de nucleótidos y la glicolisis, por lo cual la sobreexpresión de G3P nos habla de un mayor flujo de carbono a la producción de piruvato que a la síntesis de nucleótidos. La LDBH cataliza la reacción reversible del piruvato a lactato, utilizando NAD<sup>+</sup> y produciendo NADH [72,73]. La sobreexpresión de esta proteína indica que el piruvato es preferencialmente utilizado para producir poder reductor en vez de ATP, en mitocondria. Estas dos proteínas son sobreexpresadas en HeLa y son productoras de NADH.

En SiHa, durante el DT, las proteínas de la glicolisis muestran una expresión muy diferente a HeLa. Las proteínas que catalizan reacciones reversibles durante la glicolisis son sobreexpresadas (TPIS, PGAM1, ENOA), mientras que la G3P y la LDBH, muestran una expresión constante. Esto podría indicar que el flujo de carbono, a diferencia de HeLa, está dirigido a la producción de esqueletos de carbono y ATP, pero una menor producción de poder reductor (NADH) [71-73].

Tanto en HeLa como en SiHa, identificamos una proteína que conecta la glicolisis con la glutamonólisis: la glutamato deshidrogenasa 1 mitocondrial (**DHE3**) que produce  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de Glutamato, el cual es uno de esqueletos de carbonos derivados de la fructosa-6-fosfato, y que es un intermediario anaplerótico del ciclo de Krebs y el ciclo de la urea. La DHE3, ayuda a la co-existencia de la glutamonólisis y la glicolisis, lo que permite una flexibilidad metabólica-energética mediada por los esqueletos de carbono [74].

Otra proteína mitocondrial identificada es la ATP sintasa (**ATPB**), que es subexpresada en SiHa y se expresa de manera constante en HeLa. La ATPB normalmente se encuentra en mitocondria y es la principal generadora de ATP [75]. En diferentes tipos de cáncer se ha reportado la sobre-expresión de la ATPB y su localización en la membrana plasmática, donde se le asociada a la resistencia de fármacos anti-cáncer, acidificación del microambiente, angiogénesis, evasión de sistema inmune y metabolismo del colesterol [75-78] La subexpresión durante el DT en SiHa de la ATPB, podría estar relacionado al uso de la glicolisis para la producción de ATP, y la expresión constante en HeLa, a la producción preferencial de NADH.

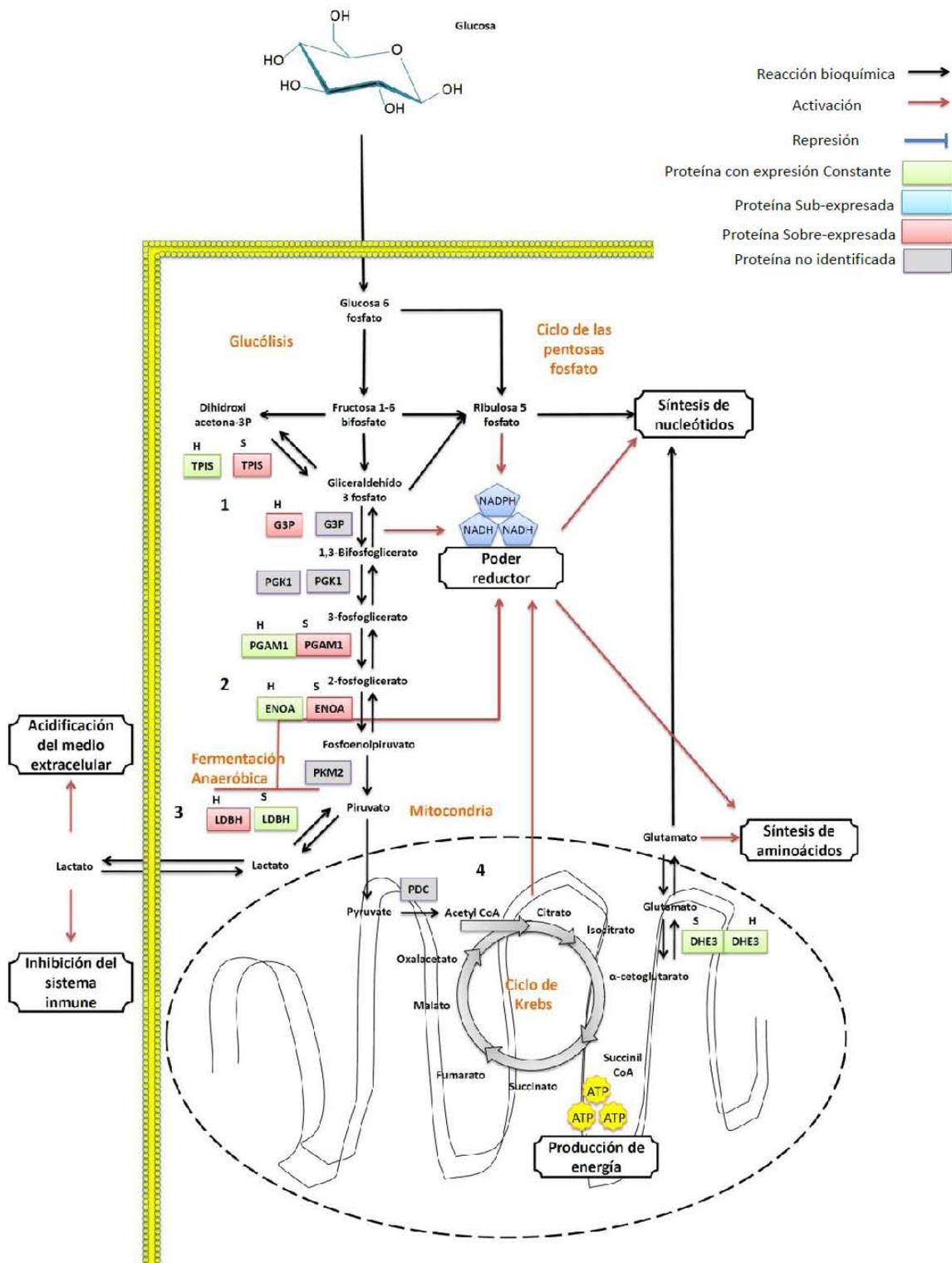
Estas diferencias de expresión entre HeLa y SiHa podrían estar relacionadas con las diferencias de volumen tumoral, parece que HeLa utiliza la glicolisis con mayor eficiencia para la obtención de

poder reductor por medio de NADH que SiHa. Esto podría explicar en parte, por qué HeLa muestra un mayor crecimiento tumoral al tiempo 50, que lo registrado en SiHa, ya que el NADH es indispensable en las reacciones anabólicas.

Por último, en HeLa identificamos dos proteínas relacionadas a la desregulación metabólica pero de origen murino: El Factor de Degradación de Insulina (**IDE**) es una metaloproteasa citoplasmática la cual participa en la degradación de la insulina y proteínas ricas en hojas  $\beta$ -plegadas (como la proteína  $\beta$ -Amiloide y Glucagón) y La creatina cinasa tipo M (**KRCM**) que cataliza la reacción reversible de fosforilación de creatina a fosfocreatina (FC) y adenosina bifosfato [79-83]. Ambas proteínas muestran una expresión oscilante subexpresada en HeLa, esto nos puede hablar del impacto del DT en el metabolismo del hospedero.

**Figura 18. Desregulación metabólica en el DT de HeLa y SiHa.** Se esquematiza el uso diferencial de la glicolisis en el DT de HeLa y SiHa:

1. Observamos que en HeLa, la TPIS, PGAM1 y ENOA no muestra cambios durante el DT, mientras que G3P y LDBH son sobre-expresadas.
2. La G3P es una enzima clave para el inicio de la fase de generación de energía de la glicolisis, mientras que la LDBH toma el piruvato y los convierte en lactato generando NADH, el cual no puede ser procesado en la mitocondria y debe ser utilizado en reacciones de reducción de sustratos en citosol. Observamos la expresión constante de la CH60, DHE3, ATPB y CP21A, mientras que la HSPB1 es sub-expresada, estas proteínas están relacionadas en mantener la homeostasis de la mitocondria. En conjunto los cambios de expresión en HeLa sugieren un aumento de la fase de generación de energía de la glicolisis, una evasión de la respiración en mitocondria y una mayor producción de Lactato durante el DT.
3. En SiHa la TPIS, PGAM1 Y ENOA, son sobre-expresadas, lo que indica una mayor glicolisis. La LDBH muestra una expresión constante, por lo cual suponemos que hay una producción constante de Lactato. Encontramos la HSPB1 sobre-expresada, la CH60 Y DHE3 constantes y la ATPB sub-expresada. Esto sugiere una alta producción de Piruvato, y como la LDBH es constante, la respiración mitocondrial podría ser evadida lo que en turno puede inducir la sobre expresión de la HSPB1 y la sub-expresión de la ATPB.



## Evasión de la apoptosis.

Durante el desarrollo tumoral identificamos 18 proteínas (ANXA1, ANXA2, ANXA5, CH60, GRP75, GRP78, GSTM3, GSTMO1, GSTP1, HSP71, HSP7C, HSPB1, PDIA3, PRDX2, PRDX4, PSA1, PSA5 y PSB4) divididas en 3 grupos: 1) Anexinas, 2) Chaperonas y Proteosoma, y 3) Peroxidasas y Glutación S-transferasas, los cuales están involucrados en la resistencia a estreses bioquímicos y la desregulación de las vías de señalización de TNF- $\alpha$ , TLR4, VEGF, y evasión de la apoptosis (Figura 22).

### Anexinas

Las anexinas pertenece a la súper familia de proteínas de unión a calcio en membranas, estas proteínas tiene diversas funciones: tráfico vesicular, respuesta a glucocorticoides, migración celular, respuesta inmune, activación de apoptosis e inhibición de proliferación celular.

La expresión que muestran las anexinas identificadas en el DT, pueden co-inhibir la respuesta inmune y mantener un ambiente pro-inflamatorio alrededor de las células cancerosas. La anexina A1 (**ANXA1**) y A5 (**ANXA5**) son expresadas de manera constante en HeLa y SiHa durante el DT; La ANXA1 inhibe a la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2), la cual produce Ácido araquidónico lo que promueve la inflamación [84]. La fosfatidilserina (**PS**) es una señal que promueve la fagocitosis de células dañadas por parte del sistema inmune, la anexina A5 se une en membranas con PS e inhibe su fagocitosis; debido al apantallamiento del PS en la superficie celular y otras posibles señales de fagocitosis, por lo cual la ANXA5 es un inhibidor de la respuesta inmune y de la apoptosis [85]. La Anexina A2 (**ANXA2**) es subexpresada en el DT de HeLa y funciona como correceptor de TLR4 de la Glicoproteína I  $\beta_2$  (**GPI- $\beta_2$** ) la cual promueve la activación/fosforilación de las vías MyD88 y TIR, que activan la MAPK p38, la producción del Factor Tisular (**TF**) y la activación de NF- $\kappa$ B en monocitos, por lo cual su sub-expresión indica una menor activación del sistema inmune [86, 87].

### Chaperonas y Proteosoma

Las proteínas de choque térmico reciben su nombre puesto que son expresadas en condiciones de estrés, como la elevación de la temperatura. Una de sus funciones características es que asisten al correcto plegamiento de otras proteínas, por lo cual también se les conoce como chaperonas.

Durante el DT de HeLa y SiHa encontramos varias chaperonas (HSP71, HSP7C, GRP78, PDIA3) que evitan la respuesta de proteínas mal plegadas (**RPMP**) en el retículo endoplasmático (**RE**). La RPMP regula negativamente a las cinasas Akt, PI3K, y a NF- $\kappa$ B, para inhibir la síntesis proteica, aumentar la autofagia, y en situaciones de estrés severo, activar la apoptosis.

La proteína Regulada por Glucosa de 78 kDa (**GRP78**) y la proteína Disulfido-isomerasa A3 (**PDIA3**) mostraron una expresión constante en el DT de HeLa y SiHa. Estas dos proteínas, además de sus funciones chaperonas en el RE, inhiben la RPMP; La GRP78 inhibe a las proteínas PERK, IRE1 y ATF6, y cuando hay acumulación de proteínas mal plegadas, la GRP78 libera a estas proteínas, lo que activa a la RPMP [88, 89]. La PDIA3 en el RE ayuda a la correcta formación de puentes disulfuro en las proteínas, y además de inhibir la RPMP, en citoplasma se asociada a mTORC y NF- $\kappa$ B, lo que inhibe la autofagia [90]. En cáncer cérvico uterino su sobreexpresión correlaciona con

una mayor metástasis [91]. Estas dos chaperonas inhiben la RPMP por su función chaperona, pero también como reguladoras de mTORC, y NF- $\kappa$ B para inhibir la RPMP y promueven la supervivencia celular.

La proteína de choque térmico 1A/1B de 70 kDa (**HSP71**) y la proteína cognado de choque térmico de 71 kDa (**HSP7C**), que tienen una expresión oscilante sobreexpresadas en HeLa y una expresión constante en SiHa son chaperonas que inhiben la RPMP y promueven la angiogénesis: Al interferir la expresión de HSP71 y HSP7C por medio de siRNAs en células CUEH hay una interrupción en la activación de Akt y la inhibición de la migración y formación de tubos de las CUEH. La relación funcional se demostró, que es por la regulación negativa de PI3K, donde su actividad decayó  $\geq 40\%$  con la interferencia de HSP7C, como resultado se produjo un bloqueo de la vía VEGF/PI3K/Akt en la activación de angiogénesis en células endoteliales [92-95].

Las chaperonas también participan en ayudar a funciones mitocondriales y del citoesqueleto. La proteína regulada por glucosa de 75 kDa (**GRP75**), como chaperona en mitocondria/RE/citoplasma al unirse a proteínas mal plegadas y como inhibidora de apoptosis al unirse a p53 e inhibir sus funciones pro-apoptóticas [88 y 96]. Durante el DT de SiHa, encontramos una sub-expresión de la GRP75, no se explica fácilmente, porque el tumor subexpresa a esta proteína, aun cuando tiene funciones que ayudan a la supervivencia celular.

La proteína beta de choque térmico-1 (**HSPB1**) es una chaperona independiente de ATP que confiere estabilidad a la F-actina, resistencia a la citocina TNF- $\alpha$ , inhibe la activación de caspasas y de activa la cinasa p38. La HSPB1 participa directamente en la inhibición de la apoptosis por su función chaperona, pero también participa en la regulación de Akt y su función de promover la supervivencia celular [98,97]. En nuestro estudio la HSPB1 en HeLa tuvo una expresión constante mientras que fue sobreexpresada en SiHa. Esta proteína podría estar relacionada con un mayor potencial invasivo, ya que está provee de estabilidad al citoesqueleto celular y ayuda a evadir la apoptosis al inhibir la apoptosis.

La proteína de choque térmico mitocondrial de 60 kDa (**CH60**) actúa como chaperona en mitocondria. Aunque se ha visto su presencia en citoplasma y su secreción. La CH60 se ha reportado como sobre-expresada en varios tipos de cáncer (esófago, colorectal y vejiga) [99]. Se ha demostrado que cuando la CH60 es secretada activa la señalización por CD14 en células del sistema inmune, la cual activa la producción de Interleucinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-10) en macrófagos. La CH60 también activa la señalización en células B por medio del receptor TLR4 [96,100]. Nosotros encontramos a la CH60 con una expresión constante en HeLa y SiHa. Consideramos que puede contribuir al DT como chaperona mitocondrial y al activar señales pro-inflamatorias al ser secretada [57].

Por último, identificamos a las subunidades 1 y 5 tipo  $\alpha$ , y la subunidad  $\beta$  del proteosoma. El cual participa en el reciclado de proteínas, degradación de proteínas dañadas, la regulación del ciclo celular, la autofagia, presentación de antígenos por MHC I, resistencia a drogas anti-cáncer, la

señalización de TNF- $\alpha$  y activación de NF- $\kappa$ B [101-104]. Durante el DT de HeLa y de SiHa, identificamos a las subunidades  $\alpha$  1 y 5 con una expresión constante, mientras que la subunidad  $\beta$  4 que, mostro una expresión constante en SiHa, pero una sobreexpresión en HeLa. Debido a que identificamos componente del 20S podemos asumir que el proteosoma es activo durante el DT de ambas líneas y probablemente tenga una mayor actividad en el DT de HeLa.

### Peroxidasas y Glutación S-transferasas

Las peroxidasas catalizan la reacción general: PRDX(reducida) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\rightarrow$  PRDX(oxidada) + 2H<sub>2</sub>O y por lo cual tienen un papel importante la neutralización de peróxidos. Durante el DT de HeLa y SiHa identificamos a la peroxiredoxina 2 y 4, **PRDX2** y **PRDX4**.

La PRDX2 durante el DT de HeLa es constante y es sobreexpresada en SiHa. Además de su actividad peroxidasa, la PRDX2 regula positivamente la angiogénesis (al mantener reducido/activo al receptor 2 de VEGF y potenciar su función), regula negativamente a PDGFR y la fosfolipasa Cy1 productora de Ácido araquidónico, y al ser secretada al medio, activa macrófagos y la producción de citocinas [105,106]. En cultivos celulares de HeLa y SiHa la PRDX2 es secretada, por lo cual en tumores derivados de estas, puede que sea secretada y de esta manera active macrófagos circundantes al tumor, los cuales, al producir citocinas pro-inflamatorias y angiogénicas, pueden beneficiar el DT [57].

La PRDX4 se expresa de manera constante en HeLa y SiHa durante el DT y se encuentra principalmente en el Retículo Endoplasmático (**ER**) donde participa en el balance redox del RE [107]. La PRDX4, además de proteger a las células contra estrés oxidativo, activa la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, ya que la PRDX4 secuestra a NFKB y reduce a la sub-unidades p50 y NF- $\kappa$ B-p65, modulando su activación de manera positiva [108]

Las proteínas Glutación S-transferasas citosólicas (**GSTs**) son una familia de enzimas divididas en 6 clases:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\omega$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\zeta$ , las cuales conjugan el glutatió reducido (GSH: tripéptido Glutamato-Glicina-Cisteína) con una amplia variedad de compuestos electrofílicos endógenos y exógenos. Por lo que las GSTs son de gran importancia, ya que reducen posibles compuestos tóxicos, como fármacos anti-cáncer (cisplatín, melfalan, mitomicina C, etc.) [109].

La GSTs de la clase Mu y Pi, han sido reportadas como reguladoras en vías de señalización celular [109]. La GSTP1 bloquea la formación del complejo TRAF2-ASK1, el cual modula al receptor TNF- $\alpha$ , para la activación de la apoptosis. Otra de las interacciones funcionales de GSTP1, es con la cinasa c-Jun N-terminal (JNK); La GSTP1 inhibe a la JNK y no es capaz de fosforilar a las proteínas Jun, las cuales activan la apoptosis [110]. Además de este papel regulatorio de TNF- $\alpha$ , la GSTP1 interacciona con la oncoproteína E7 de HPV-16, lo que aumenta su potencial para promover la supervivencia celular y evadir la apoptosis [111]. En el DT de HeLa (HPV-18), no logramos detectar la GSTP1, pero en SiHa (HPV-16) la encontramos sobre-expresada por medio de geles 2D y en Western Blot encontramos una tendencia a la sobre-expresión en SiHa (Figura 21). Al analizar cortes de tumores de cáncer cérvico uterino, en el Atlas de Proteínas Humano (The Human Protein Atlas: <http://www.proteinatlas.org/>), encontramos que la GSTP1 está presente hasta en el 92% de los casos analizados: 8% débil, 25% moderado y 58% intenso (Figura 20). Esta sobreexpresión

podría deberse por sus diversas funciones, y es posible que también este cooperando con la E7 del HPV-16 para promover la supervivencia celular durante el DT de SiHa.

Polimorfismos de la proteína GSTM3 se han asociado a un mayor riesgo de desarrollo de cáncer cérvico uterino, cáncer oral y esofágico [112-114]. La GSTM3 aparte de su función como Glutación transferasa, posee la actividad enzimática de convertir la Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), a Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la cual promueve la inflamación e inhibidor del sistema inmune [115,116]. Durante el DT de HeLa, encontramos la sobre-expresión de la GSTM3 por medio de los geles 2-D y en Western blot, una tendencia de sobreexpresión. En SiHa, también encontramos la tendencia a sobreexpresión de la GSTM3 por Wester blot (Figura 21) y al analizar cortes de tumores de cáncer cérvico uterino, en el Atlas de Proteínas Humano (The Human Protein Atlas: <http://www.proteinatlas.org/>), encontramos que la GSTM3 está presente hasta un 50% de los casos analizados: 25% débil, 8% moderado y 17% intenso (Figura 19). Pensamos que la sobreexpresión de la GSTM3, es debido a sus funciones como Glutación transferasa y PGE<sub>2</sub> Sintasa, lo que de manera indirecta permite a las células tumorales evadir la apoptosis, evadir al sistema inmune y promover el crecimiento tumoral por inflamación.

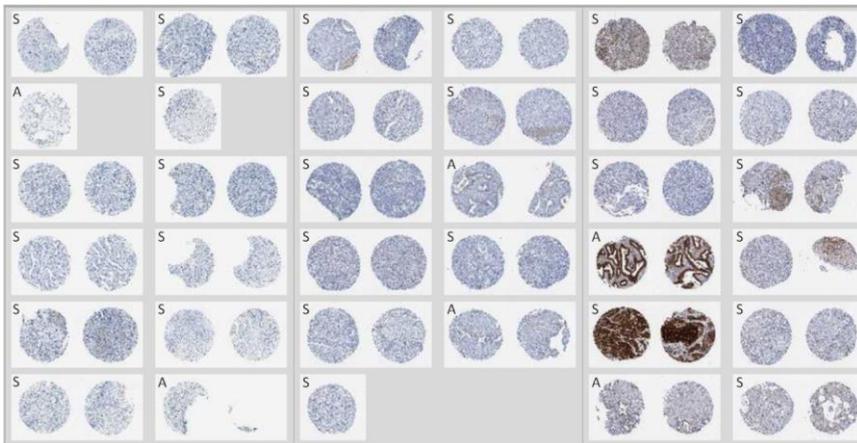


Figura 19. Cortes del Atlas de Proteínas Humano contra GSTM3. Se muestran los cortes con inmunotinciones del Atlas de Proteínas Humano contra GSTM3, donde S es para carcinoma escamoso y A es para Adenocarcinoma.

La Glutación S-transferasa O-1 (GSTO1), además de su función enzimática, modula a los receptores de Ryanodina (RYA), que son canales de calcio en el RE y se sugiere que al ser sobreexpresada inhibe la apoptosis mediada por receptores-RYA. Otra importante función de la GSTO1, es que parece activar la producción de citocinas pro-inflamatoria IL1 $\beta$  [117, 118]. Durante el DT de HeLa, encontramos a la GSTO1 con una expresión constante. Pensamos que ayuda, al igual que la GSTM3, a evadir la apoptosis, al sistema inmune y promover el desarrollo tumoral por inflamación.

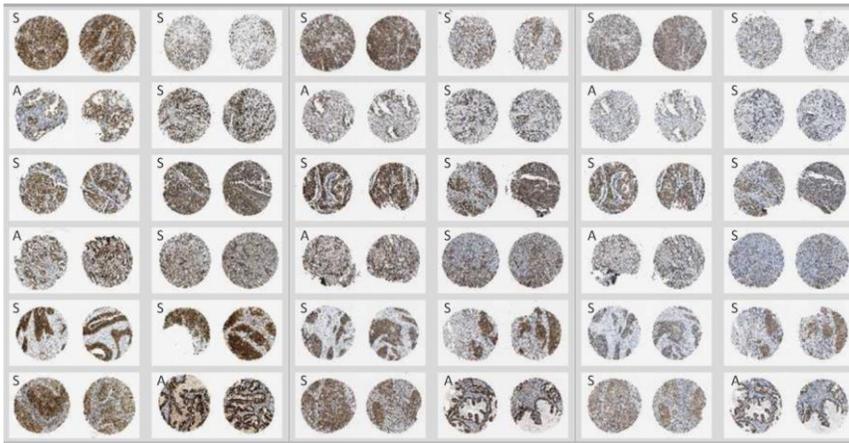


Figura 20. **Cortes del Atlas de Proteínas Humano contra GSTP1.** Se muestran los cortes con inmunotinciones del Atlas de Proteínas Humano contra GSTP1, donde S es para carcinoma escamoso y A es para Adenocarcinoma.

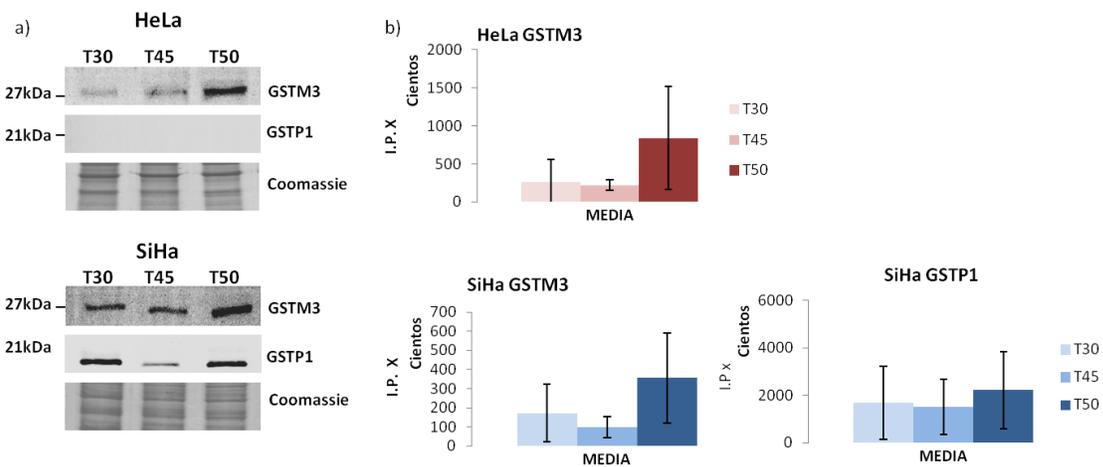
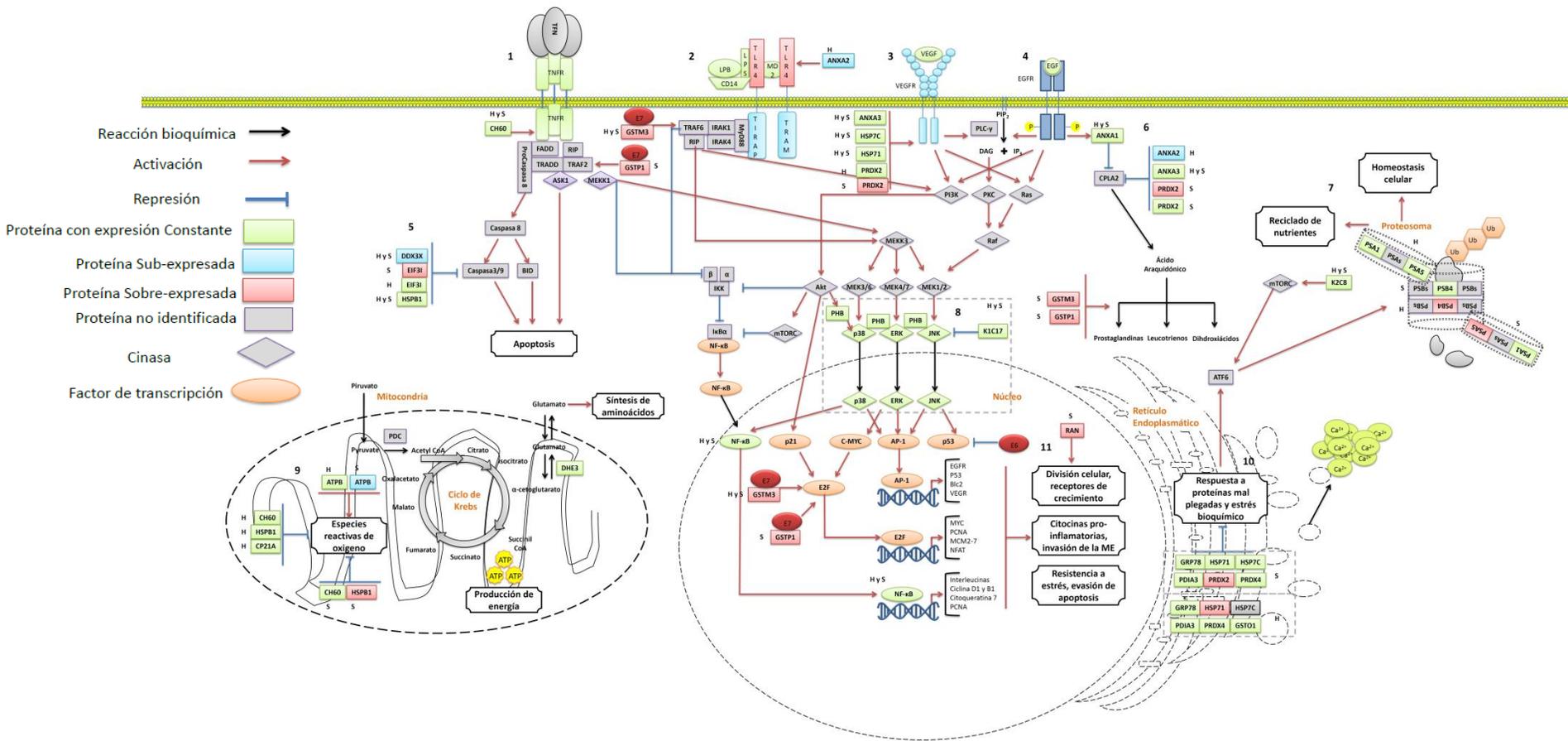


Figura 21. **Western Blot de HeLa y SiHa contra GSTM3 y GSTP1.** a) Se muestra la banda obtenida por western blot para tumores de HeLa y SiHa a T30, T45 y T50 días. b) Se muestra las gráficas que representan el promedio de tres réplicas de la intensidad de píxeles de cada tiempo (T30, T45 Y T50) de los western blots contra GSTM3 y GSTP1 de HeLa y SiHa.

La expresión de chaperonas, disulfuro isomerasas, proteosoma, peroxidasas y GSTs muestra que los tumores expresan un arsenal de proteínas contra diferentes estreses bioquímicos, de esta manera logran mantener su homeostasis y logran neutralizan la presencia de especies reactivas de oxígeno, peróxidos, compuestos exógenos y de manera indirecta inhiben al sistema inmune, la autofagia, la apoptosis activada por receptores tipo TNF y la RPMP, y al mismo tiempo promueven la supervivencia celular y angiogénesis al activar a VEGF, EGFR, NF-κB, Akt y ATF6 (Figura 22).



**Figura 22. Evasión de la apoptosis.**

1. Durante el DT de SiHa parece que se sobre-activa la proteína TRAF2 adaptadora de TNF- $\alpha$ , en sus funciones ya que sobre-expresa la GSTP1.
2. Tanto HeLa como SiHa sobre-expresan la GSTM3, por lo cual pensamos sobre-activan las funciones de TRAF6 adaptadora de TLR4.
3. El receptor VEG si está activo en células tumorales, la ANXA3, HSP7C, HSP71 y PRDX2 de ambas líneas contribuirían a su activación.
4. El receptor EGF, fosforila directamente a la ANXA1, además de activar varias vías de señalización (PI3K, PKC y Ras)
5. La evasión de la apoptosis también ocurre a nivel de caspasas, ya que varias proteínas expresadas en el DT reprimen a estas.
6. El receptor EGF activa a la PLC- $\gamma$ , pero varias proteínas tienen un efecto inhibitorio en sus funciones apoptóticas, permitiendo solo la síntesis de prostaglandinas
7. La actividad del proteosoma durante el DT debe aportar resistencia a la falta de nutrientes al reciclarlos.
8. La activación de las vías mediadas por los receptores de TNF- $\alpha$ , TLR4, VEGF y EGF, parecen co-activar las cinasas p38, ERK y JNK
9. También a nivel mitocondrial varias proteínas están encargadas de minimizar y neutralizar las especies reactivas de oxígeno.

## Invasión de tejidos y metástasis

Durante el desarrollo tumoral encontramos que 12 proteínas están involucradas en la regulación del citoesqueleto celular y remodelamiento de matriz celular: ACTB, ACTG, ACTS, BGH3, CO6A2, FSCN1, K1C17, K2C8, TCPZ, TPM3, TPM4 Y VIME (Figura 23).

La actina es una de las principales proteínas que conforman el citoesqueleto, y los procesos de polimerización, de-polimerización para la formación de Filamentos de Actina (**F-actina**) y su unión a otras proteínas son regulados por las Proteínas de unión a actina (**PUAs**).

Durante el DT de SiHa identificamos a la actina  $\beta$  (**ACTB**) como sobreexpresada, a la actina  $\gamma$  (**ACTG**) con una expresión constante y a La Actina alfa de musculo esquelético (**ACTS**) con una expresión constante en SiHa y con una subexpresión en HeLa. La actina  $\beta$  y  $\gamma$  (**ACTB** y **ACTG**) son los principales componentes de los filamentos de actina (**F-actina**) y forman parte de las adhesiones focales entre las células y la de la Matriz extracelular (**ME**) al interaccionar con los colágenos de esta. La ACTS se expresada en musculo esquelético y participa en la movilidad celular y en anclar físicamente los complejos de actina asociados a Integrinas con el citoesqueleto, lo que permite una adhesión focal [119]. La proteína ACTS, es la actina más abundante en ambos proteomas. No entendemos porque la ACTS, que es expresada en musculo esquelético es tan abundante en los tumores, esto debe aportar estabilidad al citoesqueleto, aumentar la pérdida de uniones célula-matriz y una mayor capacidad de movimiento y proliferación.

Durante el DT de HeLa y SiHa identificamos seis PUAs: La proteína ig-h3 inducida por TGF- $\beta$  (**BGH3**), La colagenasa cadena alfa-II(VI) (**COL6A2**) y la proteína Fascina (**FSCN1**). La Cadena alfa 3 de tropomiosina (**TPM3**) La cadena alfa 4 de tropomiosina (**TPM4**) y la vimentina (**VIME**). Los cambios de expresión de estas proteínas están asociados a la desregulación de las uniones intercelulares e intracelulares, a la degradación e invasión de la Matriz extracelular (**ME**) y angiogénesis. Las PUAs BGH3, FSCN1 y TCPZ, controlan las adhesiones focales, formación de invadepodios y la estabilización de la F-actina y filamentos de tropomiosina. La proteína BGH3 tiene 4 dominios, uno permite la unión a integrinas y otros parecidos a las fascilinas, funcionan como puente entre varios componentes de la ME, como colágenos e integrinas [120-122]. La FSCN1 es una PUA que regula el anclaje de los F-actina en forma paralela y ordenada, promoviendo la formación de Podosomas, Filopodas e Invadepodias [123,124]. La TCPZ es una chaperona que ayuda al plegado de actina y tropomiosina, y ayudan en el proceso de estabilización de tropomiosina [125,126]. Las proteínas BGH3 y FSCN1 estabilizadoras de F-actina son constantes durante el DT, mientras que la TCPZ que ayuda a la estabilización de la tropomiosina es subexpresada en SiHa, pero constante en HeLa.

La TPM3, TPM4 y VIME son proteínas estructurales del citoesqueleto, la TPM3 y la TPM4 en conjunto con la troponina, regulan la interacción de la F-actina y los filamentos de miosina en la contracción muscular. La sub-expresión de las isoformas de la TMP se asocian a un fenotipo transformado, estos cambios contribuyen a los re-arreglos de los microfilamentos y alteraciones morfológicas que incrementan la movilidad celular, disminuyen la adhesión focal, aumentan el crecimiento y promueven la evasión de la apoptosis [127]. En HeLa la TPM3 y TPM4 son

subexpresadas y en SiHa la TPM3 se expresa de manera constante, pero la TPM4 es subexpresada. Estudios que usan los inhibidores específicos de MEK1 (PD98059) y Ras-ERK (UO126), sugieren que la sub-expresión de las TPMs está a cargo de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK, al menos en cultivo celular. En concordancia con esto, nosotros encontramos por western blot que la cantidad total de ERK1/2 es menor conforme al DT en HeLa y SiHa (Figura 37). Esto es importante de notar ya que hay tratamientos anti cáncer que atacan la activación de ERK (5-Iodotubercidin, UO126), pero nuestros resultados indican que la expresión de ERK es diferente durante el DT, por lo cual su uso no racional, puede llevar a un fenotipo transformante [127, 128].

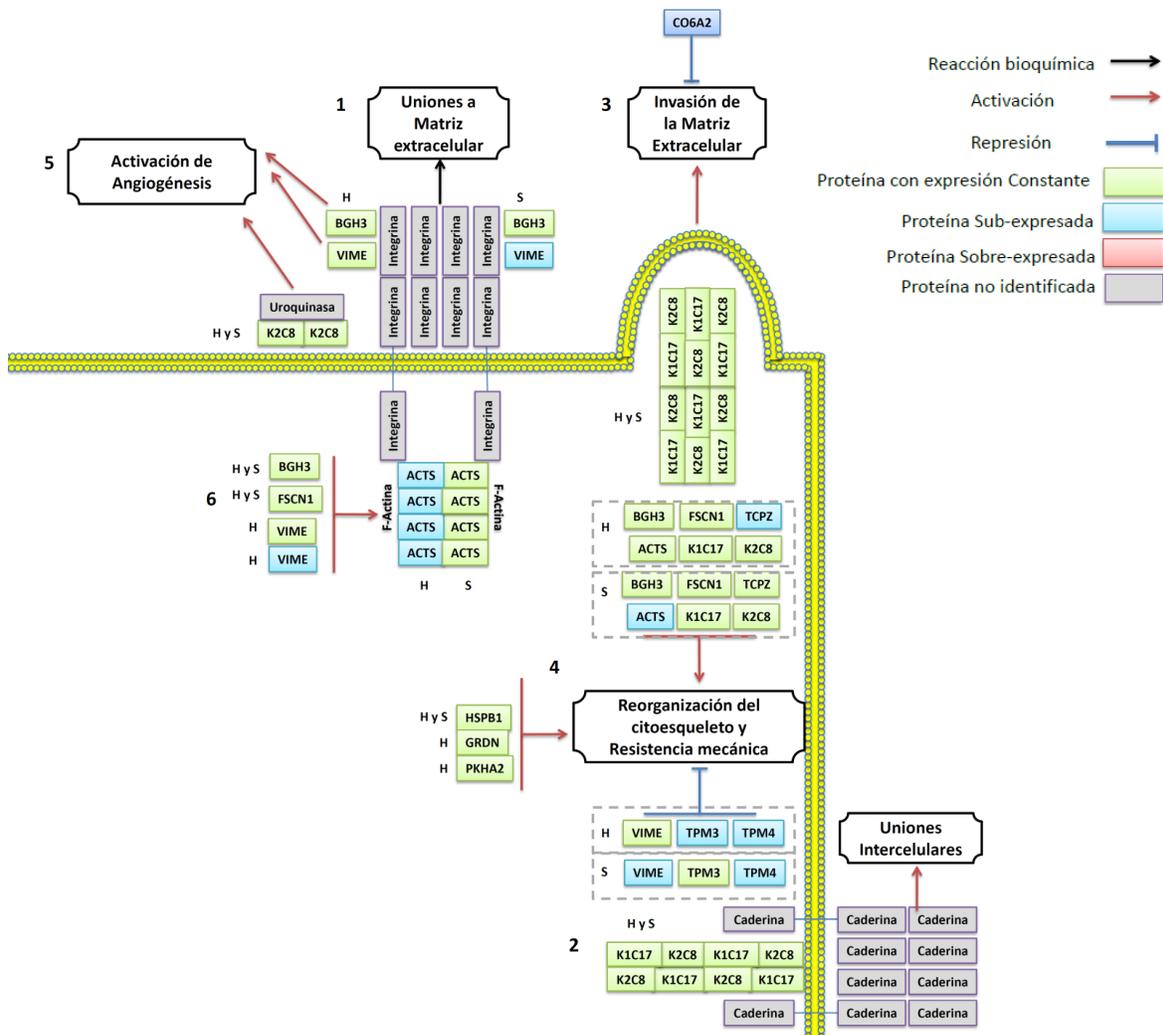
La VIME es la principal proteína de filamentos intermedios, participa en la integridad estructural del citoesqueleto, adhesión, migración y señalización celular. La sobreexpresión de VIME en cáncer está relacionada con un mayor potencial de metástasis y el fenómeno de transición epitelial-mesenquimal [129]. La inhibición de la expresión de VIME en el DT, en la línea de carcinoma colorectal LS174T, reduce considerablemente el volumen tumoral, además de una afectar negativamente la angiogénesis [130]. Nosotros encontramos que la VIME muestra una subexpresión durante el DT de HeLa y SiHa por geles 2D, pero por western blot, encontramos que en HeLa la VIME es altamente procesada, encontramos hasta 6 productos derivados del procesamiento de esta. En cambio, en SiHa solo encontramos dos productos. Esto puede correlacionar con el mayor volumen presentado por HeLa al T50 en comparación a SiHa.

Aparte de las actinas, identificamos las citoqueratinas K2C8 y K1C17, proteínas del citoesqueleto que forman Filamentos Intermedios (**FI**). La función principal de las queratinas es dar estabilidad y resistencia mecánica contra fuerzas de compresión y tensión exógenas [131]. Las queratinas, aparte de su función mecánica, regulan vías de señalización celular; la citoqueratina 8 tipo II (**K2C8**) inhibe la apoptosis al modular la respuesta a TNF: Resultados *in vitro* muestran que la K2C8 interacciona directamente con el receptor tipo 2 de TNF (TNFR2). Otra función de la K2C8 es que su dominio ectoplásmico, es un receptor-activador de la uroquinasa la cual juega un papel importante en la remodelación e invasión de la ME. La citoqueratina 17 tipo 1, (**K1C17**) tiene actividades únicas, ya que aumenta la capacidad de migración, resistencia contra la tensión del citoesqueleto, incrementa la dinámica de los FI y aumentan la biosíntesis de proteínas [132-134]. Durante el DT de HeLa identificamos a la K1C17 y K2C8 como constantes, con una abundancia mucho mayor en SiHa que en HeLa, además de que observamos al menos 5 isoformas que varían de punto isoelectrónico.

Los cambios de expresión de las actinas, están relacionadas a la sustitución de las formas  $\gamma$  y  $\beta$  por la ACTS, además de que las PUAs que ayudan a la formación de F-actina son subexpresadas, pero las que en la formación de invadepodias son contantes. Las citoqueratinas, que forman los Fis son altamente abundantes en HeLa y SiHa, y en particular en SiHa son sobreexpresadas. Estos cambios del citoesqueleto, están relacionados a la invasión de tejidos, evasión de la apoptosis, angiogénesis y a la obtención de un citoesqueleto con mayor resistencia mecánica (Figura 23).

Figura 23. **Invasión de tejidos y metástasis.**

1. Los filamentos de actina, aparte de dar estructura al citoesqueleto, se asocian a las integrinas para la formación de uniones a la Matriz Extracelular (ME).
2. De la misma manera los Filamentos de citoqueratinas forman además de estructura para el citoesqueleto, uniones intercelulares por su asociación a caderinas.
3. Los mismos filamentos de citoqueratinas, también forman parte de los invadiopodios que invaden la ME.
4. La proteínas que identificamos en SiHa y HeLa asociadas al citoesqueleto, claramente muestran una sub expresión de aquellas proteínas de estructuración de actinas, lo que permite una reorganización del citoesqueleto y podría proporcionar una mayor resistencia mecánica.
5. Las proteínas que forman parte del citoesqueleto, también pueden activar la angiogénesis cuando se encuentran de manera extracelular.



## Torrente Sanguíneo

Durante el desarrollo tumoral encontramos que 5 proteínas relacionadas al torrente sanguíneo y a la angiogénesis: ALBU, ANXA3, APOA1, TREF, FRIL y TPM2 (**Figura 24**).

La albumina (**ALBU**), La apolipoproteína A-1 (**APOA1**), la serotransferrina (**TRFE**) y las La cadena ligera de ferritina (**FRIL**), todas de origen murino y provienen del torrente sanguíneo. La ALBU transporta moléculas hidrofóbicas en el torrente sanguíneo (hormonas esteroideas, lípidos, etc.) y se ha reportado, que algunos tumores la consumen como fuente de aminoácidos y energía [135]. La ALBU en el DT de HeLa aumenta de concentración y en SiHa se mantiene constante. La apolipoproteína A-1 (**APOA1**) forma parte del de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que transportan colesterol y fosfolípidos. La APOA1 induce la producción de PGE<sub>2</sub> y de IL-10 en monocitos *in vitro*, las cuales inhiben la diferenciación en células dendríticas (**CD**) [136, 137]. Debido a que nosotros encontramos una sobreexpresión de la APOA1 en SiHa y una expresión constante en HeLa, nos sugiere que la APOA1 ayuda al metabolismo del colesterol y que pueda tener un efecto inhibitor del sistema inmune.

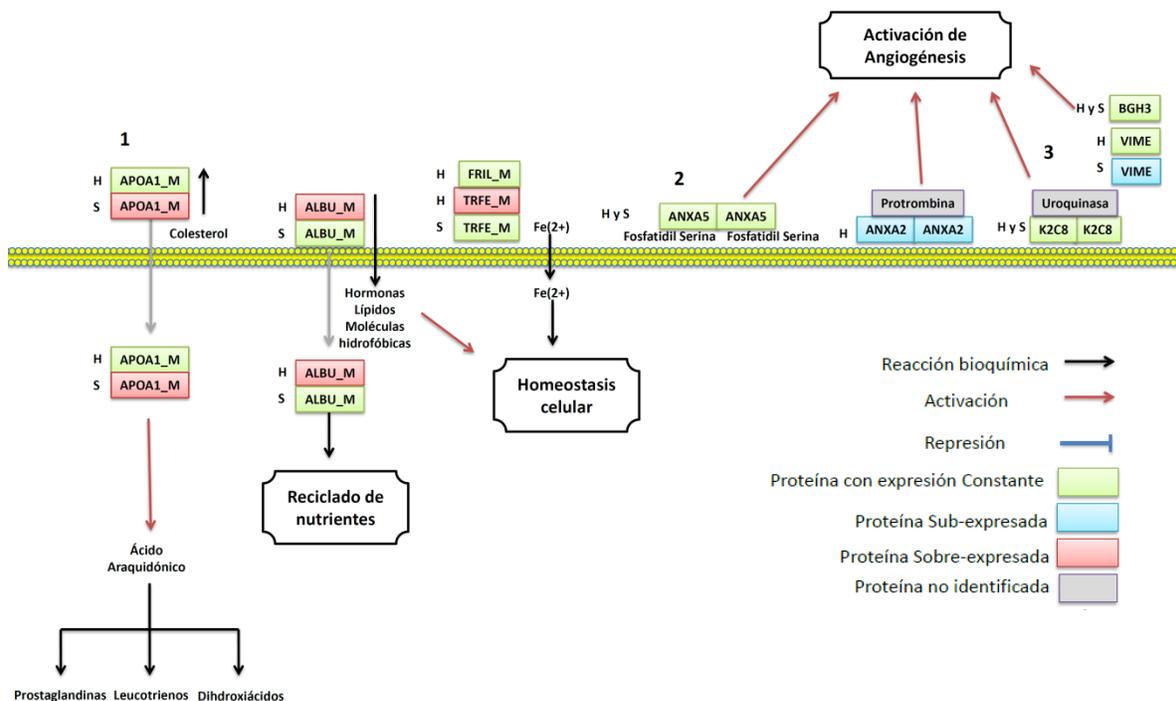
La **TRFE**, es esencial en el transporte de hierro del torrente sanguíneo a las células [138]. La TRFE ha sido reportado como sobre-expresada en una gran variedad de tumores (páncreas, gástrico, hepatocelular) [139]. En nuestro estudio encontramos a la TRFE de ratón con una expresión constante durante el DT de SiHa y sobe expresada en HeLa, y el tumor debe utilizarla para la toma de hierro. La **FRIL** también participa en el metabolismo intracelular de hierro [138]. El aumento de ferritina ha sido reportado en varios tipos de cáncer, como colorectal, mama y melanoma [140, 141]. La FRIL por medio del secuestro de hierro desactiva a la cinasa pro-apoptótica JNK y aumenta la actividad antioxidante y protectora de NF-κB al suprimir la formación de EROs [142]. La FRIL es de origen murino y presenta una expresión constante en HeLa, por lo cual debe ser una de las proteínas que el microambiente está aportando durante el DT.

La Cadena beta de Tropomiosina (**TPM2**) es una proteína de unión a actina en citoesqueleto. La TPM2 junto con el complejo Troponina, regulan la contracción muscular, pero la función de la TPM2 en células no musculares se conoce muy poco [127]. En HeLa encontramos una sub-expresión del tiempo T45 en comparación del T30 y T50, sin embargo, fue identificada como de origen murino y no surge una explicación directa de cómo está funcionando la TPM2 en el DT.

La anexina A3 (**ANXA3**), al igual que las anexinas descritas, pertenece a la súper familia de proteínas de unión a calcio en membranas. En adenocarcinoma colorectal, carcinoma pancreático y de pulmón, también ha sido reportada como sobre-expresada, mientras que se ha reportado como sub-expresado en carcinoma prostático y renal. La ANXA3, se cree que promueve la angiogénesis, ya que en estudios en células HUVEC tratadas con medio condicionado (**MC**) obtenido de HEK 293 que sobre-expresan la ANXA3, migran y forman tubos. Se observó que el MC contenía una alta concentración de VEGF, lo que sugiere que la sobreexpresión de ANXA3 está ligada a la producción de VEGF [143, 144]. En SiHa durante el DT encontramos a la ANXA3 como sobre-expresada, mientras que en HeLa como constante. Esto puede deberse a sus papeles pro-angiogénicos.

**Figura 24. Torrente sanguíneo**

1. Varias proteínas identificadas en esta sección, no promueven directamente la angiogénesis, sino que están presentes en el torrente sanguíneo, pero aun así tienen importantes funciones celulares.
2. La ANXA5 y ANXA2, cuando se encuentran de manera extracelular pueden promover la angiogénesis.
3. Como se había mencionado, proteínas del citoesqueleto que se encuentren de manera extracelular, también pueden contribuir al desarrollo de angiogénesis.



## Inestabilidad genómica.

Durante el desarrollo tumoral encontramos que 9 proteínas relacionadas con la transcripción y traducción del RNA: DDX3X, EF2, EIF3I, IF4A1, RUVB1, HNRH3, PCNA Y PNPB (**Figura 25**).

El proceso de traducción es esencial para las células e identificamos 5 proteínas involucradas en este proceso. En la traducción del mRNA a proteína, uno de los primeros eventos es la unión de complejo de traducción EIF3 (**EIF3I**) al mRNA el cual es expresado de forma constante en el DT de HeLa y sobreexpresada en SiHa: La proteína eIF4E se une al 7-metil guanósina ó estructura cap del mRNA. Una vez que el eIF4E logra unirse al cap mRNA, entonces el complejo eIF4F (**IF4A1**) que es subexpresada en HeLa y está asociado a la traducción tipo cap-dependiente y el complejo EIF3 pueden unirse al mRNA para formar el complejo de pre-iniciación 43S para la traducción [145]. Ya en posición el complejo de traducción, el cap del mRNA tiene que ser desdoblado, esto es llevado a cabo por helicasas de RNA, como la Helicasa de RNA ATP-dependiente DDX3X (**DDX3X**) que es

subexpresada en HeLa y SiHa interactúa con el complejo eIF4F y promueve la traducción al desdoblamiento del cap del mRNA para el inicio de la traducción [146].

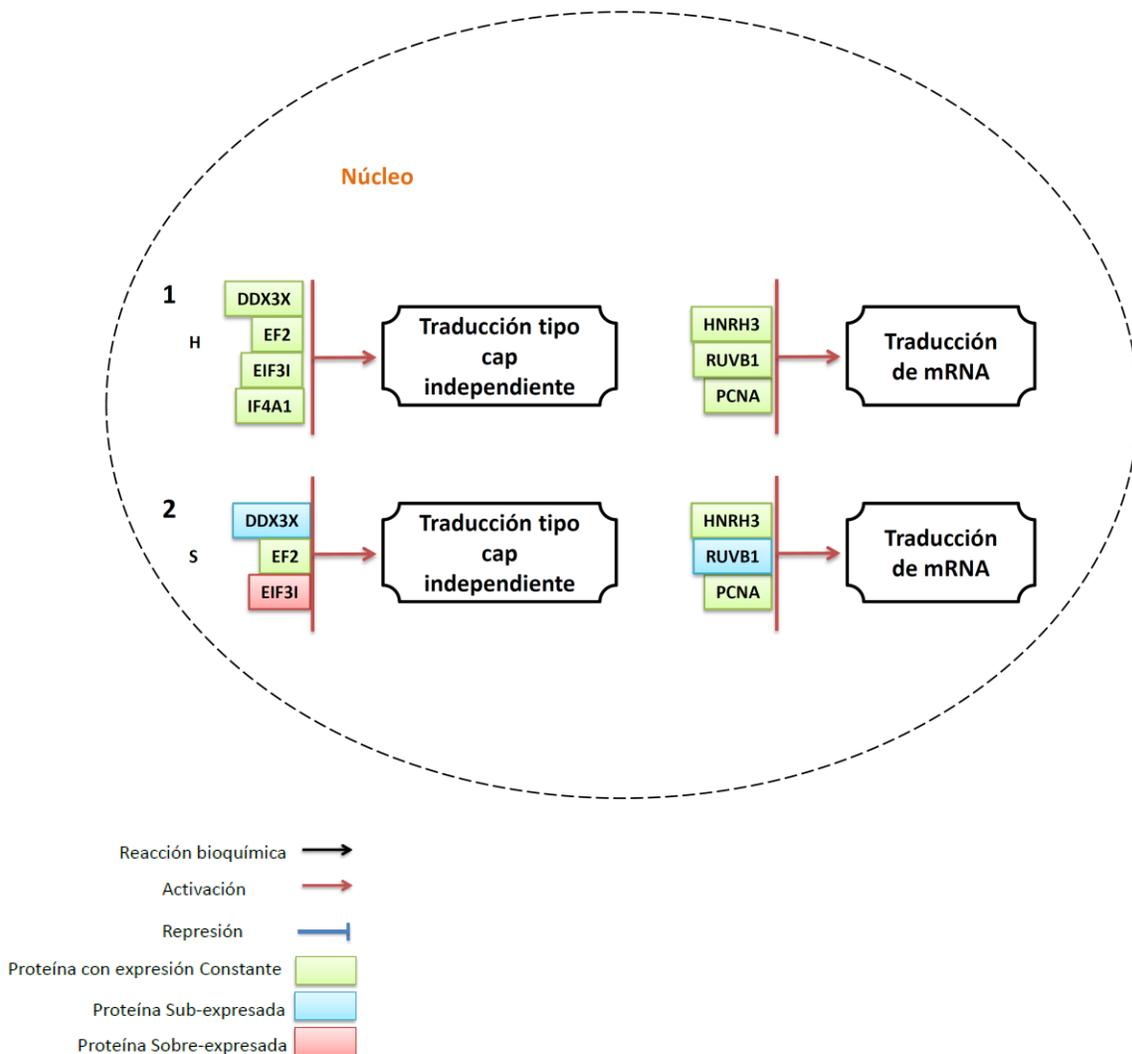
En la traducción del mRNA, la proteína eEF2 (**EF2**) que es constante en el DT de HeLa y SiHa, controla la translocación. Debido a su función preponderante de la eEF2, la cual es la principal reguladora de la traducción de la proteína en la elongación, esta finamente controlada por las cinasas eEF2 y AMPK que censan el estado de la célula permitiendo o inhibiendo la traducción proteica [145, 147, 148].

Estos cambios de expresión pueden estar involucrados en un cambio de la traducción tipo cap-dependiente a uno cap-independiente

Otro evento importante durante la traducción del mRNA es el empalme alternativo, en este proceso participa la proteína hnRNP H3 (**HNRH3**) la cual se expresa de manera constante durante el DT en HeLa y SiHa, y que es parte de la subfamilia de las hnRNPs H y H', las cuales promueven el corte en pre-mRNA y poliadenilación y que parecen estar involucradas en un arresto del empalme en condiciones de estrés por calor [149, 150].

Otro evento importante en la célula es la replicación del DNA, errores en este proceso pueden causar mutaciones e inestabilidad genómica. Identificamos a la proteína Antígeno nuclear de proliferación celular (**PCNA**) y a la proteína **RUVB1** que participan en este proceso: la PCNA, que se expresa de manera constante en el DT de HeLa y SiHa, funciona como una mordaza de avance para la pol II, que coordina la replicación, reparación, ciclo celular y dinámica de la cromatina. La PCNA participa en la estabilidad genómica, ya que censura daños a DNA y para repararlo puede promover la recombinación de cromátidas [151]. En tejido sano de cérvix, suele ser negativo para PCNA, sin embargo en cáncer cérvico uterino hay una correlación entre la expresión de PCNA y el grado de lesión maligna [152]. La proteína RUVB1 y su homólogo RUVB2, pertenecen a la familia AAA<sup>+</sup>, de las ATPasas y participan en el remodelamiento de cromatina, la regulación transcripcional y la reparación de DNA. La RUVB1 ayuda a regular la transcripción al unirse a complejos de remodelación de cromatina y al interaccionar directamente con la RNA pol II y varios factores de transcripción [153]. Otra función de la RUVB1 y B2, es la capacidad de regular a mTORC1 de forma positiva [154]. Durante el DT de SiHa hay una sub-expresión de RUVB1 y una expresión constante en HeLa. Pensamos que está involucrada en procesos de estabilidad genómica e insensibilidad a señales de anti crecimiento.

Por últimos identificamos a la enzima Fosforilasa de nucleósido Purina (**PNPH**) que se localiza en mitocondria y citosol. La PNPH cataliza la conversión de inosina en hipoxantina y de guanosina a guanina [155, 156]. Bajo este estudio la PNPH tiene un origen murino, lo que significa que proviene del microambiente tumoral y debido a su expresión específica en células endoteliales, puede estar relacionada con la angiogénesis.



**Figura 25. Inestabilidad genómica**

1. Se agrupan las proteínas identificadas en HeLa y su posible relación con una mayor traducción tipo cap-independiente.
2. De la misma manera se agrupan las proteínas de SiHa involucradas en la traducción tipo cap-independientes.

### Autosuficiencia en señales de crecimiento.

Durante el desarrollo tumoral encontramos que 4 proteínas relacionadas a la autosuficiencia en señales de crecimiento: CLIC1, CP21A, GDIB, GRDN, PKHA2, PHB Y RAN (**Figura 26**).

La proteína **CLIC1** ("Chloride intracellular channel protein 1") en células CHO ("Chinese hamster ovary"), está anclada en la membrana durante la fase G2/M y cuando el canal es bloqueado con inhibidores selectivos (IAA-94), las células se detienen en la fase M. La CLIC1 se ha reportado como sobreexpresada en cáncer de colon, vejiga y gástrico [25-26]. En el desarrollo tumoral de HeLa

muestra una expresión constante, pero en SiHa observamos una sobreexpresión, esta proteína puede estar involucrado en la regulación del ciclo celular y avance entre las fases G2/M.

La proteína esteroide 21-Hidroxilasa (**CP21A**) es parte de las enzimas citocromos P450, las cuales están involucradas en varios procesos, como la asistencia en el catabolismo de drogas y detoxificación, participación en la producción de colesterol, hormonas y lípidos [22]. Pacientes con mutaciones de CP21A y tumores testiculares desarrollan tumores de mayor talla en comparación de pacientes con alelos normales [23]. En HeLa muestra una expresión constante, se puede inferir que participa en procesos mitocondriales, detoxificación, producción de lípidos y hormonas, estimulando el crecimiento tumoral.

La proteína Beta inhibidor de la disociación de GDP Rab (**GDIB-2**) pertenece a la familia Rab y se expresa de forma constante en HeLa. Las proteínas GDIB son moduladoras de la endocitosis y ayudan a su liberación de las de membranas cuando están unidas a GDP [157]. En una línea celular de adenocarcinoma de ovario la GDIB-2 se encontraba sobreexpresada y su sobreexpresión se asoció a la resistencia al fármaco anti-cáncer paclitaxel [158, 159]. La GDIB-2 en el DT de HeLa puede estar involucrada en el tráfico vesicular y la autosuficiencia en señales de crecimiento.

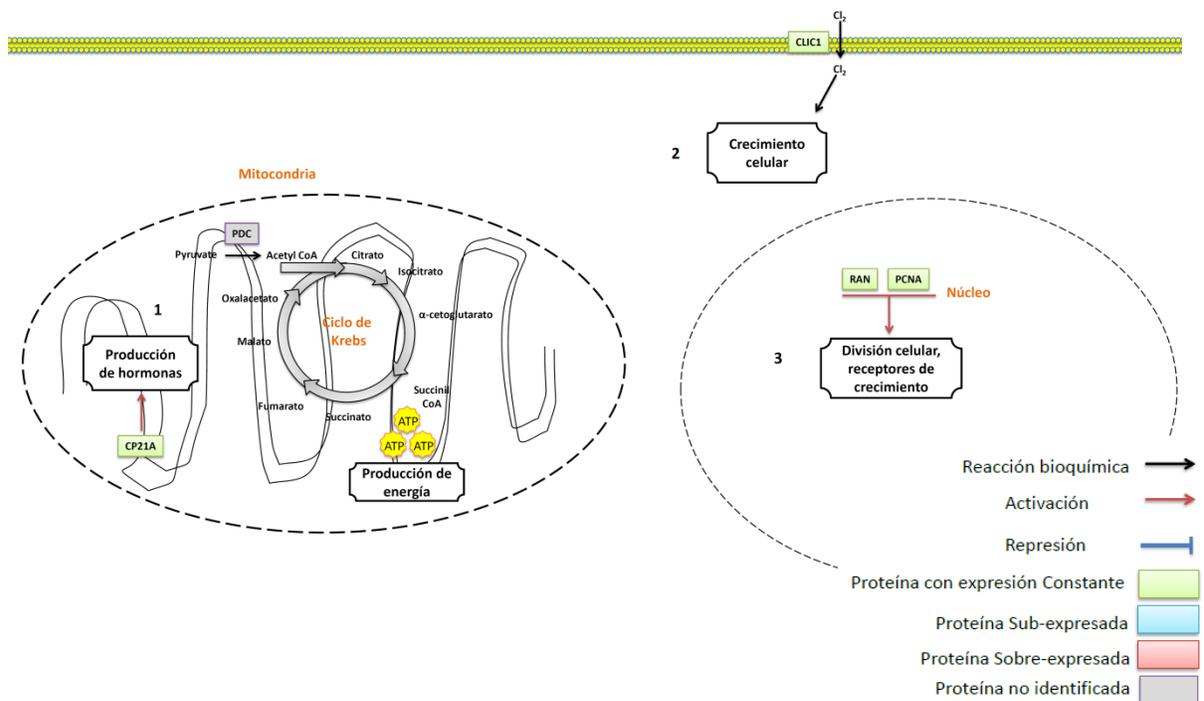
La proteína de soporte de Filamento de Actina Girdina (**GRDN**) es expresada de manera ubicua en mamíferos y se asocia con Actina, Proteínas G heterotriméricas y Dinamina participando en la movilidad celular [160]. La fosforilación de GRDN mediada por Akt en células endoteliales promueve la migración dependiente de VEGF y la formación de tubo por parte de estas. Experimentos con iRNAs en ratón muestran que la inhibición de GRDN no permite el remodelamiento correcto de vasos sanguíneos y es indispensable en la vasculogénesis [161]. La GRDN se ha reportado como sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer como colorectal, mama, pulmón y cérvico uterino [162]. En el DT de HeLa encontramos una expresión constante de GRDN e inferimos que actúa en la comunicación celular y como activadora de la cinasa Akt.

El dominio homólogo a Pleckstrina contenedor del miembro 2 familia A (**PKHA2**) regula la sensibilidad a insulina por la unión a  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ , en la vía de señalización de PI3K. En ratones mutantes para PKHA2, con incapacidad de unir  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ , se observó una sobre-activación conjunta de PI3K y Akt, y una mayor sensibilidad a insulina [9]. Se ha reportado que la sobreexpresión de PKHA2 en leucemias, potencializa la metástasis [24]. En el DT vemos una expresión constante de PKHA2 en HeLa, que es un regulador negativo de la vía de señalización de la vía PI3K, lo cual puede ser en respuesta al alto consumo de glucosa en tumores.

La prohibitina (**PHB**) pertenece a la familia conocida como Band-7. La PHB obtiene su nombre de prohibitina ya que ratones nulos a PHB mueren en etapas embrionarias y los heterocigotos desarrollaban cáncer de mama. La PHB se encuentra en mitocondria y citoplasma. Diversos estudios muestran que la PHB participa en varias vías de señalización: Ras/ERK, PI3K, Akt y TGF- $\beta$ . Esta proteína es de interés especial en cáncer, ya que permite la intercomunicación entre las vías de señalización mencionadas. La expresión de PHB ha sido reportada en varios tipos de cáncer (próstata, hígado, mama y colon) [163]. Durante el DT de HeLa y SiHa encontramos una expresión constante de la PHB. Esto puede deberse a que es una proteína de intercomunicación entre varias

vías de señalización, lo que puede tener efectos en la evasión de la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento e insensibilidad a señales anti crecimiento.

La mitosis es un evento fundamental, donde los cromosomas deben ser correctamente segregados, y errores en este proceso provocan translocaciones, duplicaciones o pérdidas cromosomales. La proteína nuclear de unión a GTP RAN (**RAN**) promueve la liberación del uso mitótico de los complejos inhibitorios y guiando a los cromosomas en el ensamblaje del uso mitótico por medio de un gradiente-signal posicional a través del núcleo desde el uso mitótico hasta los cromosomas [164]. Esta proteína ha sido reportada como sobre-expresada en varios tipos de cáncer (estomago, colon, páncreas, pulmón y ovario) [165]. En el DT de SiHa, encontramos a la proteína RAN sobre-expresada, mientras que en HeLa observamos una expresión constante. Esta proteína es regulador crítico de la mitosis y es probable que permita el paso de la fase M a G1 ayudando a la proliferación celular.



**Figura 26. Autosuficiencia en señales de crecimiento**

1. La CP21A puede permitir la síntesis de hormonas esteroideas, lo que podría contribuir a la autosuficiencia en señales de crecimiento.
2. La CLC1, regula el volumen celular al integrar varios estímulos, si permite el aumento del volumen celular, ayuda a la progresión del ciclo celular.
3. Las proteínas RAN y PCNA, son poli funcionales y controlan varios aspectos del ciclo celular, si están sobre-activados pueden promover la proliferación celular

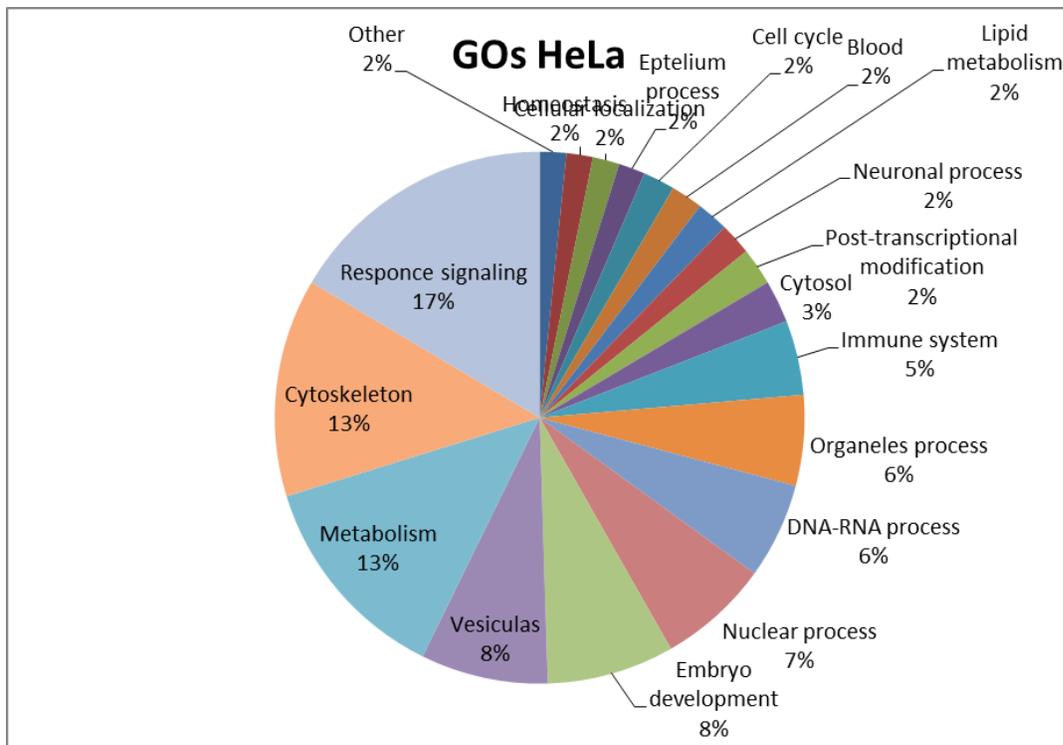
## Interacciones Proteína-Proteína (IPP) de cada categoría

Para conocer cuáles son las proteínas que interactúan con las proteínas que identificamos, se usó un enfoque bioinformático de redes de las interacciones proteína-proteína (IPP) con base a las proteínas identificadas (ver tabla 5 y métodos). Las proteínas usadas en la búsqueda de las IPP, fueron tomadas solo las de origen humano, ya que buscamos las interacciones en células humanas.

Para HeLa, al buscar las proteínas que interactúan con todas las identificadas de origen humano, para formar una red de IPP, encontramos 2028 proteínas, con 34889 conexiones, y con un promedio de 33.57 vecinos por nodo. Para SiHa, al hacer la red de IPP, encontramos una conectividad media de 34 vecinos por nodo, con 2144 nodos y 3738 conexiones.

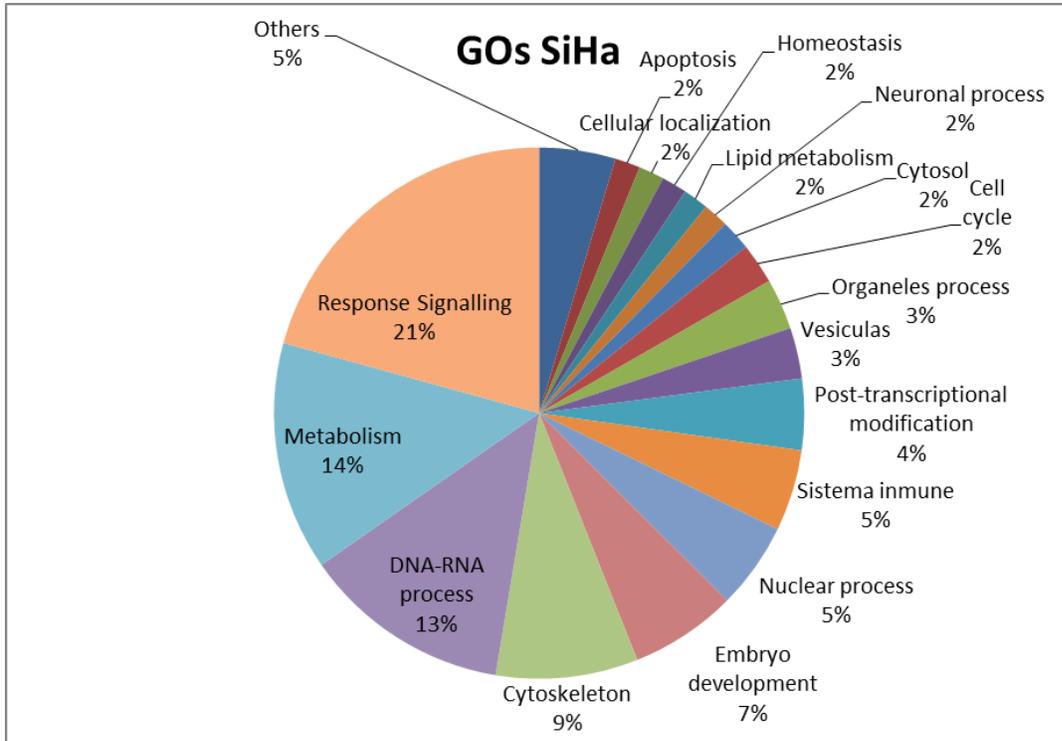
## Ontologías Génicas: Señalización

Con las redes hechas a partir de las IPPs de HeLa y SiHa, llevamos a cabo un análisis de ontologías génicas<sup>2</sup>, con el objetivo de obtener un panorama global de que funciones están llevando a cabo las proteínas identificadas y sus interactores, durante el DT [165]. Encontramos para HeLa que hay 309 GOs sobrerrepresentados y la Respuesta a estímulo (17%), Citoesqueleto (13%) y Metabolismo (13%) fueron las más importantes, pero para SiHa, los GOs más importantes fueron la Respuesta a estímulo (21%), Metabolismo (14%), Procesos de DNA-RNA (13%) y Citoesqueleto (9%) (Figura 27).



<sup>2</sup> Las ontologías génicas son un vocabulario de términos para describir las características del gen y las anotaciones de sus funciones y participación en eventos biológicos de cualquier organismo.

**Figura 27 GOs Sobrerrepresentados en HeLa.** Se muestra una gráfica de pie, donde los GOs más representados en la red de IPP de HeLa son la Respuesta a estímulos (vías de señalización), citoesqueleto (reestructuración y dinámica del citoesqueleto) y metabolismo (reacciones químicas del metabolismo).

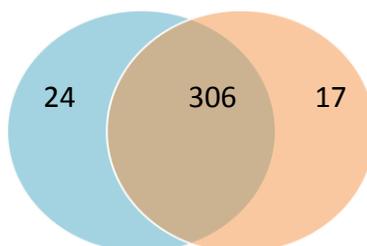


**Figura 28. GOs Sobrerrepresentados en SiHa.** Se muestra una gráfica de pie, donde los GOs más representados en la red de IPP de SiHa son la Respuesta a estímulos (vías de señalización), metabolismo (reacciones químicas del metabolismo), y procesos de DNA-RNA.

Encontramos en HeLa y SiHa 306 GOs compartidos, 24 particulares de HeLa y 17 particulares de SiHa (Figura 30). Debido a que la señalización (“Responce Signalling”), es el GO de mayor porcentaje tanto en HeLa como en SiHa, decidimos hacer un análisis de sobre-representación de vías.

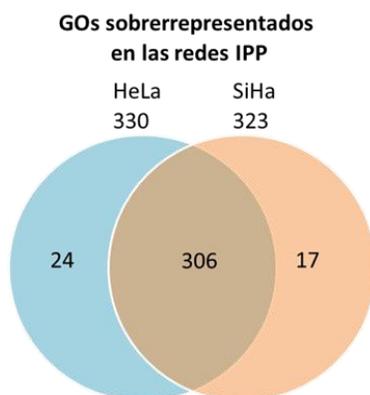
### GOs sobrerrepresentados en las redes IPP

HeLa	SiHa
330	323



**Figura 29** Diagrama de Venn para representar los GOs compartidos (306) entre HeLa y SiHa, y los pertenecientes a HeLa (24) y SiHa (17).

Encontramos en HeLa y SiHa 306 GOs compartidos, 24 particulares de HeLa y 17 particulares de SiHa (**Figura 30**). Debido a que la señalización (“Responce Signalling”), es el GO de mayor porcentaje tanto en HeLa como en SiHa, decidimos hacer un análisis de sobre-representación de vías.

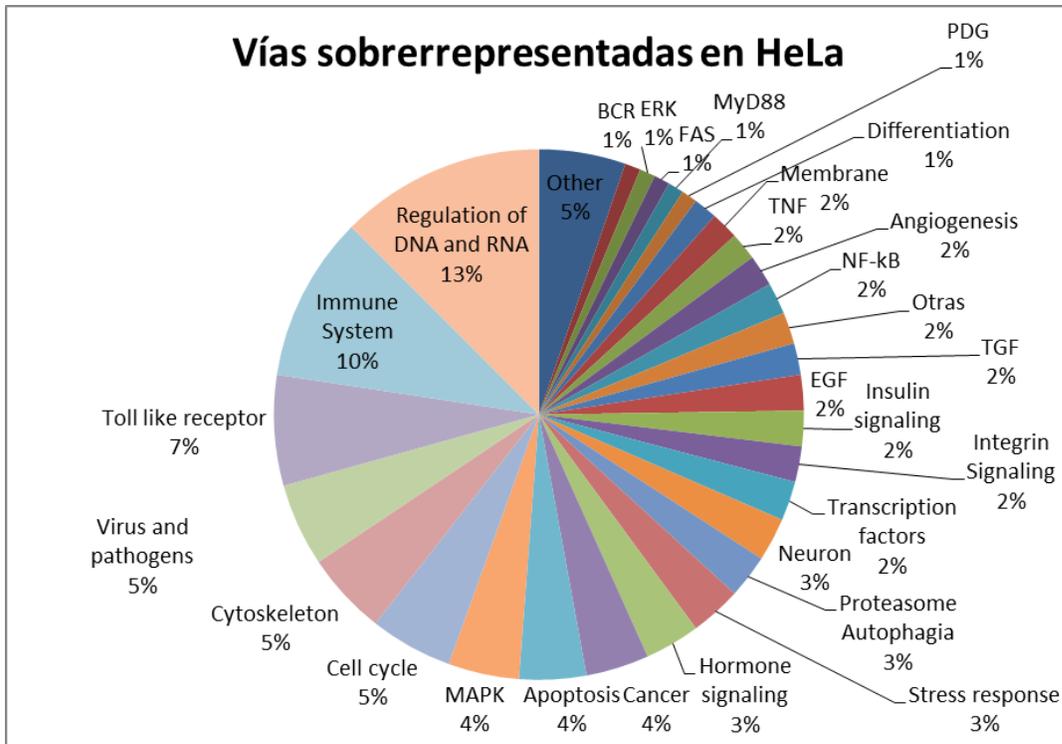


**Figura 30** Diagrama de Venn para representar los GOs compartidos (306) entre HeLa y SiHa, y los pertenecientes a HeLa (24) y SiHa (17).

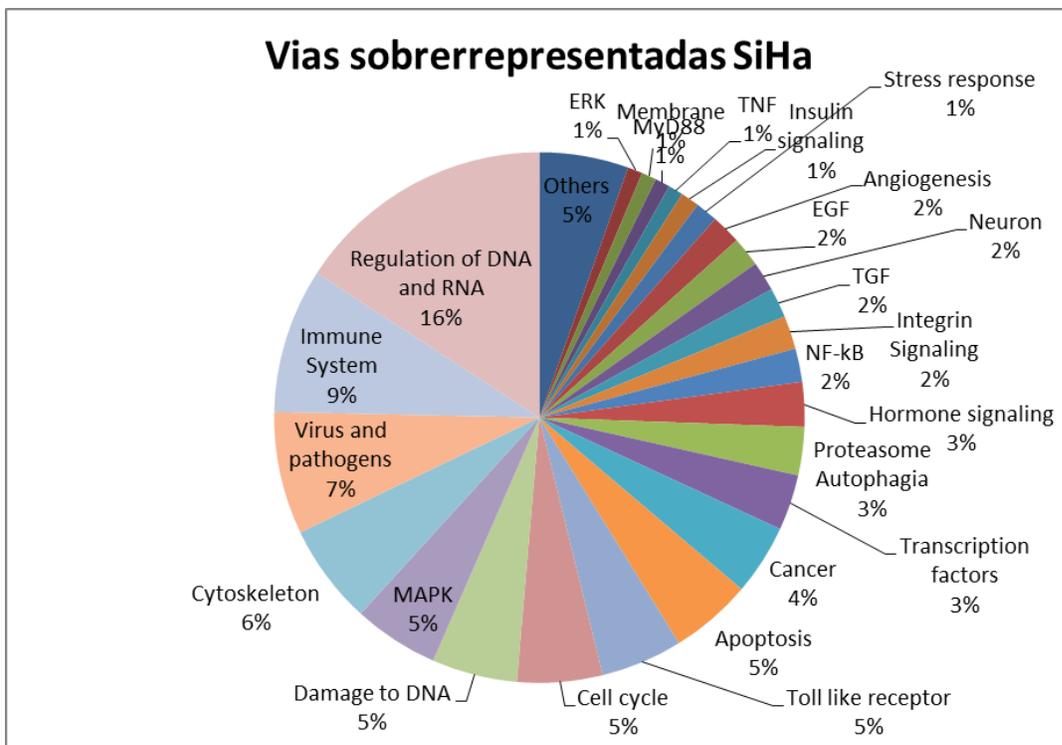
### Análisis de sobrerrepresentación de vías moleculares

Debido a que el GO más importante tanto en HeLa como en SiHa es la respuesta en señalización, nos preguntamos ¿Cuál son las vías de señalización sobrerrepresentadas? Para esto se procedió a realizar un análisis de enriquecimientos de rutas de interacciones moleculares. Utilizando la red de IPP de HeLa como para SiHa, lo que nos permitió obtener una visión de las vías moleculares que pudieran estar involucradas en el DT del CaCu (para ver las vías de interacciones encontradas revisar tablas 10-14).

Para HeLa, las vías más importantes fueron: La Regulación de DNA y RNA (13%), vías de activación del Sistema Inmune (10%), la activación de los Receptores tipo Toll- TLR (7%) (**Figura 31**), mientras que en SiHa, las vías más importantes fueron la Regulación del DNA y RNA (16%), Sistema Inmune (9%), vías asociadas a infección por Virus y Patógenos (7%) y señalización del Citoesqueleto (6%) (**Figura 32**).



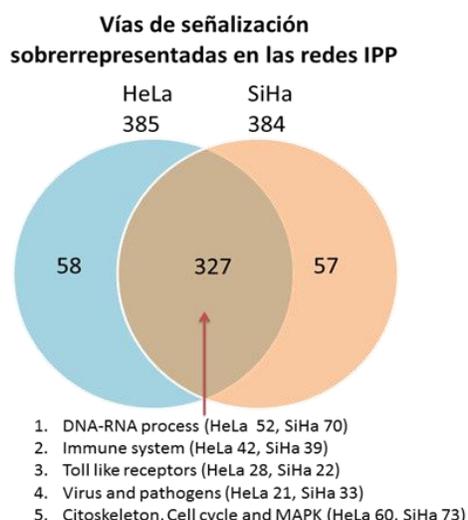
**Figura 31** Gráfica de pie donde se muestran las vías de señalización sobrerrepresentadas en la red IPP de HeLa.



**Figura 32** Gráfica de pie donde se muestran las vías de señalización sobrerrepresentadas en la red IPP de SiHa.

Al analizar las vías sobrerrepresentadas de cada línea, encontramos 4 vías de señalización altamente representadas en ambas líneas (**Figura 33**):

- 1) Las vías de señalización encargadas de la transcripción y traducción del DNA y RNA
- 2) Las vías de señalización de activación del sistema inmune
- 3) Las vías TLR ("*Toll like repector*")
- 4) Las vías activadas por la infección de virus y patógenos también
- 5) Vías de señalización de la regulación del citoesqueleto, ciclo celular y MAPK.



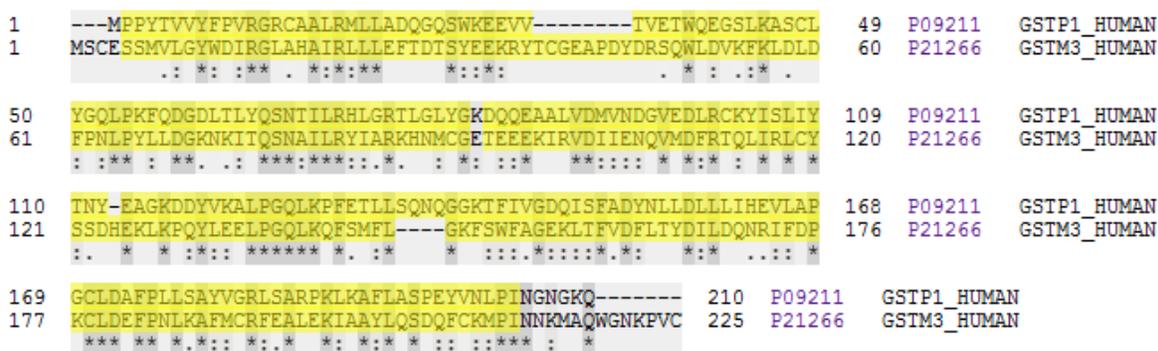
**Figura 33** Diagrama de Venn para representar las vías de señalización sobrerrepresentadas compartidas (327) entre HeLa y SiHa, y los pertenecientes a HeLa (58) y SiHa (57).

Estos resultados son una aproximación bioinformática que aportan una visión global de las vías de interacciones moleculares que podrían estar involucradas con las proteínas identificadas en la dinámica proteómica del DT, por lo cual se deben de llevar a cabo los experimentos correspondientes para comprobar que esto realmente está sucediendo en el DT.

### Ensayo funcional sobre GSTM3 y GSTP1.

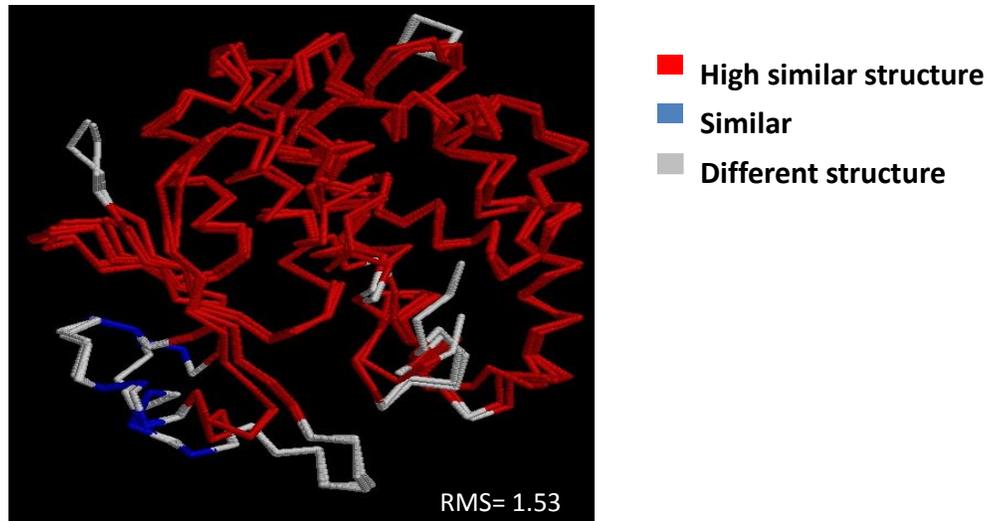
Las enzimas Glutathion S-transferasas (GSTs) son una familia de enzimas, las cuales conjugan el glutatión (GSH) con una amplia variedad de compuestos electrofílicos endógenos y exógenos. Esta característica las hace de especial interés puesto que pueden neutralizar varios xenobióticos como fármacos anti-cáncer [109]. En específico la GSTP1, posee un papel regulatorio al interactuar con TRAF2, que funciona como un transductor de señales por el receptor TNF- $\alpha$  y también con el C-terminal de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK), con esta interacción la GSTP1 regula negativamente la capacidad de JNK de fosforilar a las proteínas Jun, las cuales son responsables de activar la apoptosis [166].

Debido a que las GSTs, participan en la evasión del sistema inmune, evasión de la apoptosis, síntesis de prostaglandinas, resistencia a ROS y la GSTP1 tiene papeles regulatorios en vías de señalización, nos preguntamos si existe alguna relación entre la sobreexpresión de la GSTM3 en HeLa en comparación con la sobreexpresión de la GSTM3 y GSTP1 en SiHa. Lo primero que nos preguntamos, es qué tan similares son, para eso realizamos un alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre la proteína GSTM3 y GSTP1 y encontramos que 66 (29%) aminoácidos son idénticos entre las dos proteínas y que 70 (31%) comparten propiedades bioquímicas similares, es decir que la GSTM3 y GSTP1 comparten un total del 60% de aminoácidos similares (Figura 34).



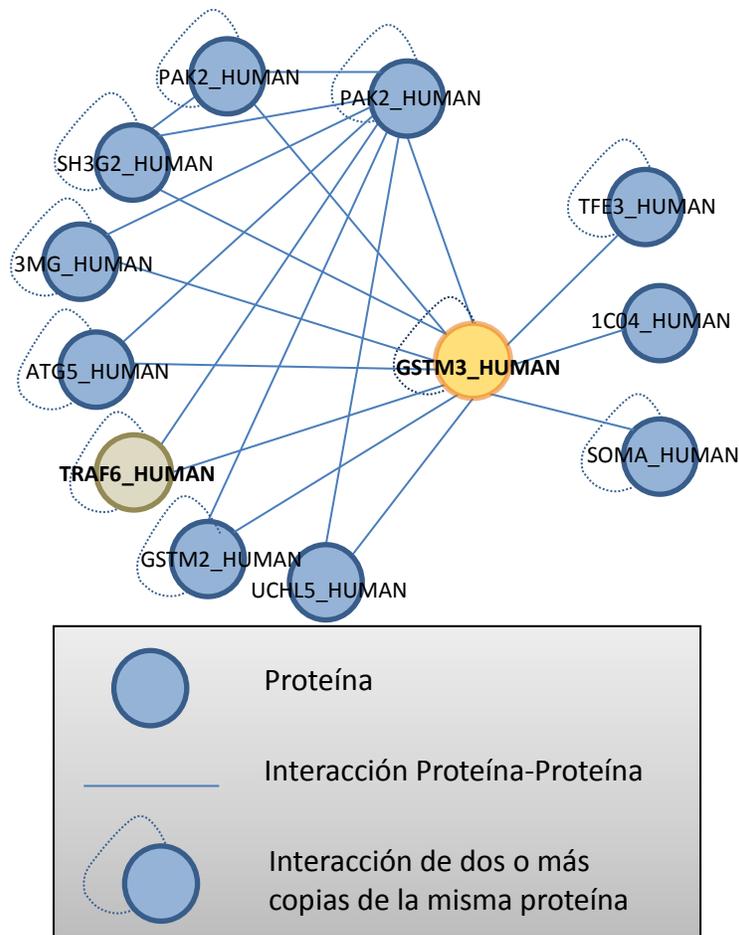
**Figura 34. Alineamiento de secuencias de GSTP1 y GSTM3.** Se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias de los aminoácidos de las proteínas GSTP1 y la GSTM3, los asteriscos representan que el aminoácido es igual en ambas proteínas, los dos puntos representan que son aminoácidos muy similares bioquímicamente y el punto representa que son aminoácidos similares.

Puesto que la secuencia de aminoácidos entre ambas proteínas es altamente similar, procedimos a hacer una súper-imposición de ambas estructuras cristalográficas (Figura 35). Esta súper-imposición de la configuración tridimensional mostro que ambas proteínas son altamente similares en estructura tridimensional y que solo tres regiones (N-Terminal, C-Terminal y un loop) variaran en estructura.



**Figura 35.** Se muestra la super-imposición de las estructuras cristalográficas de la GSTM3 y GSTP1, lo rojo son estructuras altamente similares, lo azul, medianamente similares y lo gris, diferencial. El RMS (El cuadrado de la desviación media) fue de 1.53Å, lo implica que la mayoría de los aminoácidos de la GSTM3 muestra una desviación de alrededor de 1.53Å a comparación de la GSTP1.

La GSTP1 es capaz de interactuar con el adaptador TRAF2 en sus funciones regulatorias, por lo cual nos preguntamos si la GSTM3 es capaz de interactuar con otras proteínas y cuáles son. Para esto llevamos a cabo la búsqueda bioinformática de las proteínas con las que interacciona la GSTM3 y encontramos que interacciona físicamente con varias proteínas, entre las que destacan TRAF6, ATG5, UCHL5 y UBC (Figura 36 y Tabla 9), las cuales regulan procesos de señalización celular involucradas en la supervivencia celular vía NF-κβ y la autofagia.



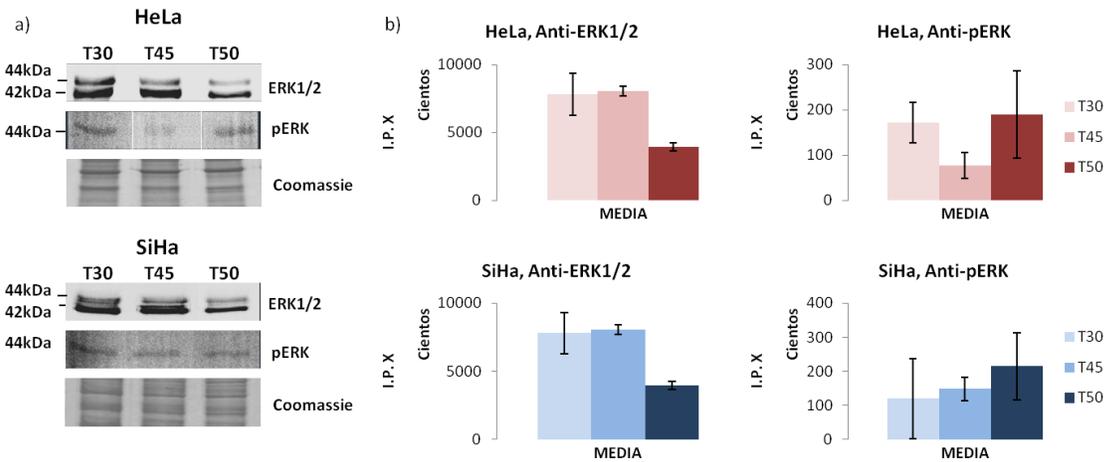
**Figura 36.** Se representa la red de interacciones proteína-proteína de la GSTM3. Es una red no dirigida, donde se muestran las proteínas que interactúa la GSTM3.

Uniprot_ID	Nombre de la proteína
<b>GSTM3_HUMAN</b>	Glutathione S-transferase Mu 3
<b>TRAF6_HUMAN</b>	TNF receptor-associated factor 6
<b>TFE3_HUMAN</b>	Transcription factor E3
<b>SH3G2_HUMAN</b>	Endophilin-A1
<b>UCHL5_HUMAN</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
<b>ATG5_HUMAN</b>	Autophagy protein 5
<b>UBC_HUMAN</b>	Polyubiquitin-C
<b>3MG_HUMAN</b>	DNA-3-methyladenine glycosylase
<b>1C04_HUMAN</b>	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-4 alpha chain

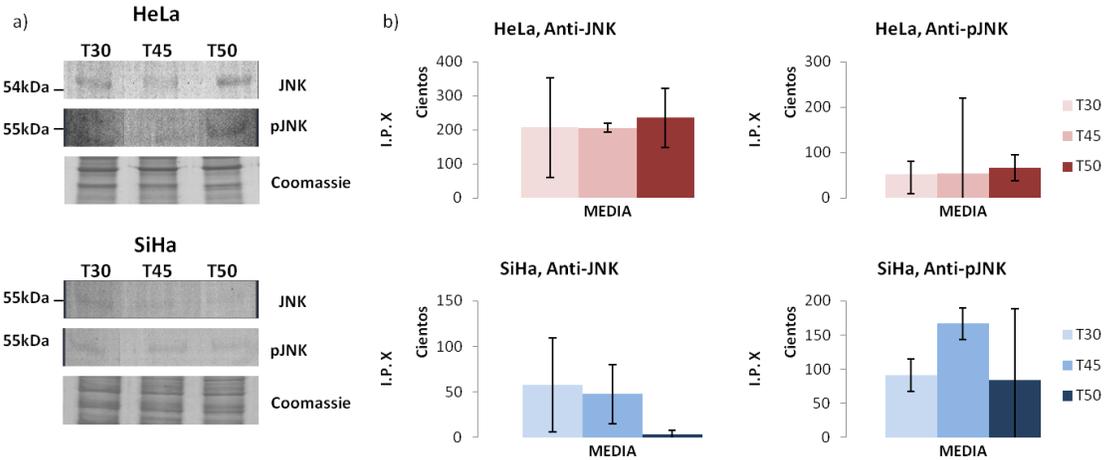
**Tabla 9.** Se muestran las proteínas con las que interacciona la GSTM3. La primera columna muestra el Uniprot\_ID y la segunda el nombre de la proteína.

Por último en el 2009 se encontró que la GSTP1 es capaz de interactuar con la oncoproteína E7 del HPV-16. Esta interacción promueve un estado de desequilibrio entre el estado oxidado y reducido de la GSTP1, favoreciendo el último en la GSTP1, lo que en turno inhibe la fosforilación de JNK y e inhibe la apoptosis [167].

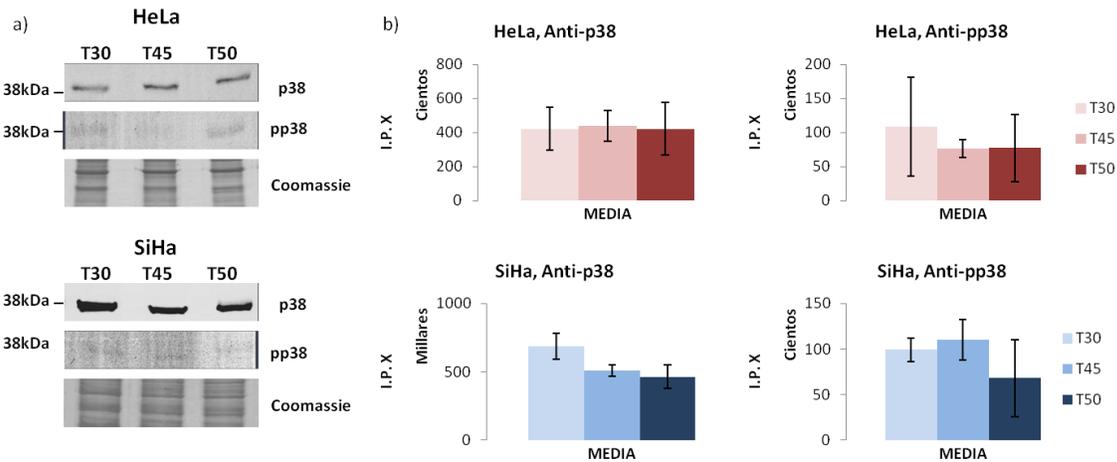
La mayoría de las proteínas identificadas en este estudio están involucradas directa o indirectamente con las cinasas ERK, JNK y p38, las cuales integran una gran cantidad de señales celulares. Durante el desarrollo tumoral encontramos que la cantidad total de ERK es menor al T50 en comparación al T30 y T45 de HeLa, en SiHa la cantidad total de ERK es constante y pERK mostro una expresión constante en ambas líneas (Figura 37). La expresión de JNK total fue constante en HeLa y hubo una disminución en SiHa al T50 en comparación contra el T30 y T45 (Figura 38) y la forma fosforilada fue constante. Por último, la expresión de p38 y pp38 fue constante tanto en HeLa como en SiHa (Figura 39).



**Figura 37. Western-Blot de HeLa y SiHa contra ERK1/2 y pERK.** a) Se muestra la banda obtenida por westernblot para tumores de HeLa y SiHa a T30, T45 y T50 días. b) Se muestra las gráficas que representan el promedio de tres réplicas de la intensidad de pixeles de cada tiempo (T30, T45 Y T50) de los Western-Blot contra GSTM3 y GSTP1 de HeLa y SiHa.

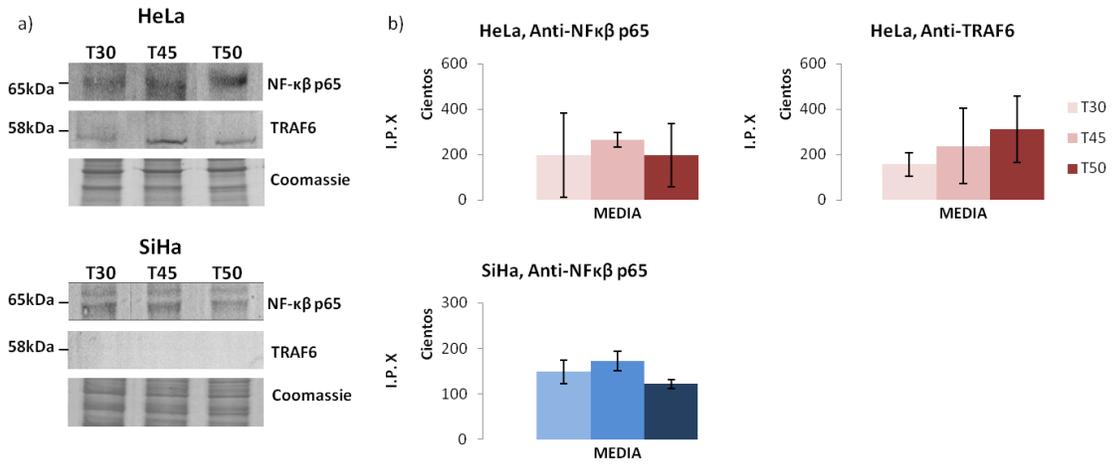


**Figura 38. Western Blot de HeLa y SiHa contra JNK y pJNK.** a) Se muestra la banda obtenida por Western-Blot para tumores de HeLa y SiHa a T30, T45 y T50 días. b) Se muestra las gráficas que representan el promedio de tres réplicas de la intensidad de pixeles de cada tiempo (T30, T45 Y T50) de los Western-Blot contra GSTM3 y GSTP1 de HeLa y SiHa.



**Figura 39. Western Blot de HeLa y SiHa contra p38 y pp38.** a) Se muestra la banda obtenida por Western-Blot para tumores de HeLa y SiHa a T30, T45 y T50 días. b) Se muestra las gráficas que representan el promedio de tres réplicas de la intensidad de pixeles de cada tiempo (T30, T45 Y T50) de los Western-Blot contra GSTM3 y GSTP1 de HeLa y SiHa.

Con esta información proponemos el modelo donde la oncoproteína E7 del HPV-18, puede estar interaccionando con la GSTM3, lo cual favorecería un estado hiperactivo reducido de la GSTM3-E7, que en turno, podría aumentar la señalización de TLR4 por TRAF6, y activar a NF- $\kappa$ B; aumentando la supervivencia celular y reduciendo la apoptosis (Figura 41). La expresión de NF- $\kappa$ B p65, fue constante tanto en HeLa como en SiHa, pero solo detectamos la proteína TRAF6 en HeLa y no en SiHa, por medio de Western-Blot.

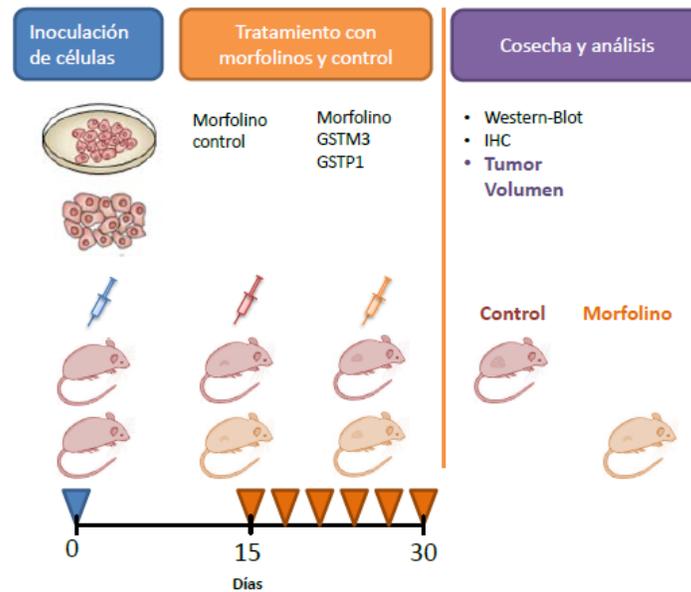


**Figura 40. Western Blot de HeLa y SiHa contra NF- $\kappa$ B p65 y TRAF6.** a) Se muestra la banda obtenida por Western-Blot para tumores de HeLa y SiHa a T30, T45 y T50 días. b) Se muestra las gráficas que representan el promedio de tres réplicas de la intensidad de pixeles de cada tiempo (T30, T45 Y T50) de los Western-Blot contra GSTM3 y GSTP1 de HeLa y SiHa.



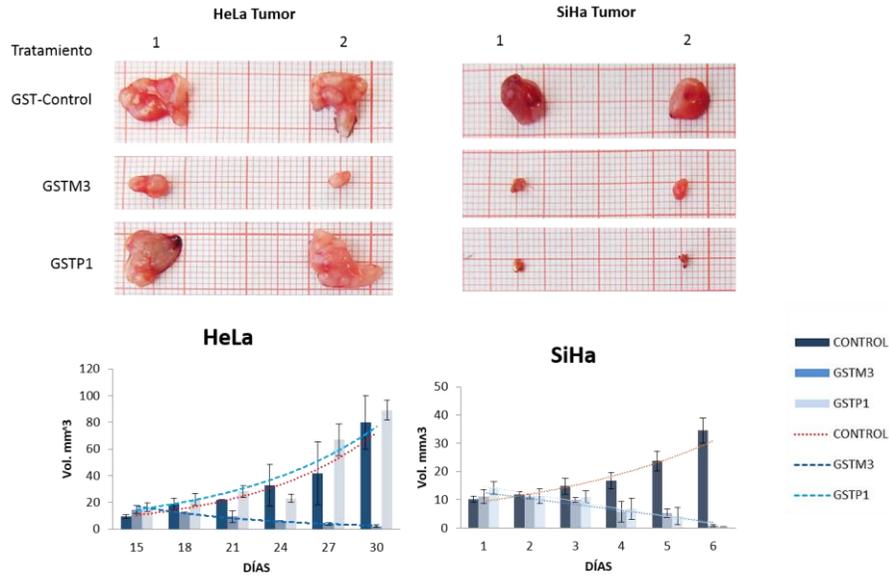
Para entender un poco más de los posibles papeles de la GSTM3 y la GSTP1 durante el desarrollo tumoral llevamos a cabo el “*Knock-down*” de estas proteínas por medio de morfolinis, los cuales son anillos de seis carbonos que sustituyen la ribosa o desoxiribosa de los ácidos nucleídos normales y son unidos por un enlace tipo fosfoamiridita, a este esqueleto se le unen las bases A, T, G y C, por lo cual pueden funcionar como RNAs de interferencia en sistemas biológicos.

Para este ensayo utilizamos 6 líneas celulares: 2 HPV18+ HeLa y CaLo, 2 HPV16+ SiHa y Caski, 2 HPV- Colo205 y MDA-231. Los morfolinis fueron administrados durante el desarrollo tumoral, iniciando la primera dosis el día 15 post-inoculación, y cada tercer día de manera intratumoral con jeringas de insulina inoculando 400ng en un volumen de 50µL por inyección (Figura 42).

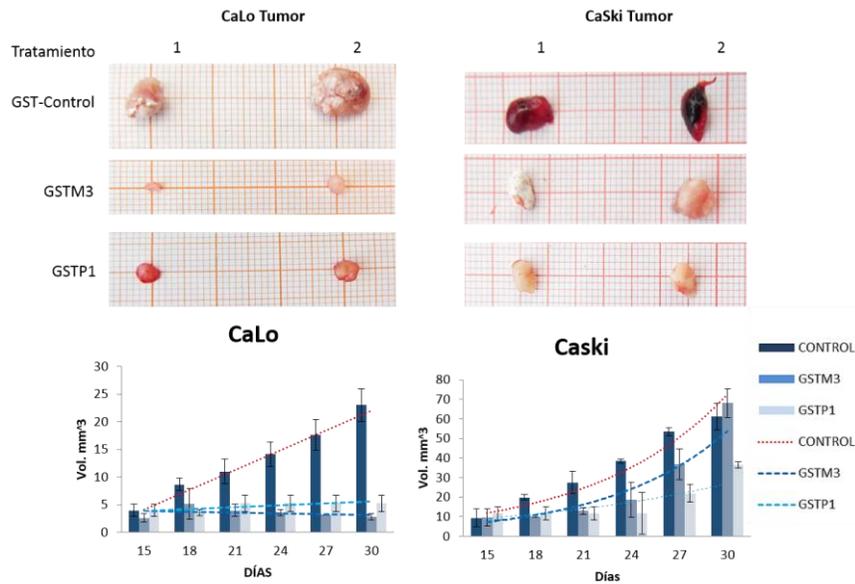


**Figura 42.** Las células fueron inoculadas como se describe en la metodología, a los 15 días post-inoculación, se inició el tratamiento con el morfolino control y los morfolinis anti GSTM3 y GSTP1, cada tercer día por 15 días. Se cosecharon los tumores para análisis posteriores.

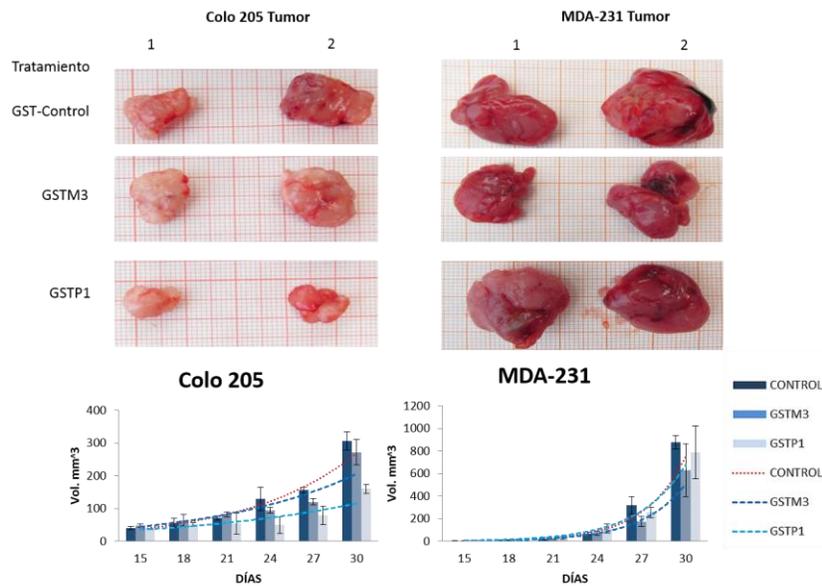
El ensayo *in vivo* contra la GSTM3 tuvo un efecto en 3 líneas celulares: HeLa, SiHa y CaLo, mientras que contra la GSTP1 tuvo efecto en 4: SiHa, Caski, CaLo y Colo205, sin embargo la línea celular MDA-231 no respondió a ninguno de los tratamientos (Figura 43-Figura 45).



**Figura 43.** Se muestran los tumores tratados con los morfolidos GST-control, GSTM3 y GSTP1 de las líneas HeLa y SiHa, donde HeLa respondió al tratamiento anti-GSTM3 con una reducción del 96% y SiHa respondió al tratamiento anti-GSTM3 con una reducción del 97% y para GSTP1 con un 98%.



**Figura 44.** Se muestran los tumores tratados con los morfolidos GST-control, GSTM3 y GSTP1 de las líneas CaLo y Caski, para CaLo, la reducción del volumen tumoral contra GSTM3 fue de 88% y para GSTP1 del 78% y para Caski, la reducción del volumen tumoral contra GSTP1 fue del 41% y no mostro reducción con el tratamiento GSTM3.



**Figura 45** Se muestran los tumores tratados con los morfolinis GST-control, GSTM3 y GSTP1 de las líneas HPV16- Colo205 y MDA-231, donde Colo205 respondió al tratamiento anti-GSTP1 con una reducción del 48% y no respondió al tratamiento anti-GSTM3. Para MDA-231, el tratamiento no tuvo efectos.

Los resultados fueron exitosos, en el caso de SiHa ambos tratamientos redujeron el volumen tumoral en más del 90%. Otro resultado importante es que las líneas celulares HPV+ son más sensibles a la inhibición de las GST, esto sugiere que esta presente el papel sinérgico de la E7 con las GSTs durante el desarrollo tumoral del cáncer cérvico uterino.

La GSTM3 y GSTP1 son sobre-expresadas en el CaCu humano (Figura 19 y Figura 20) y tienen un papel funcional importante durante el desarrollo de tumores HeLa y SiHa (Figura 43 y Figura 44), esto sugiere fuertemente que estas proteínas pueden ser implementadas como blancos terapéuticos para el tratamiento del CaCu.

# Conclusiones

---

## Modelo de las adaptaciones del Desarrollo Tumoral a través del tiempo.

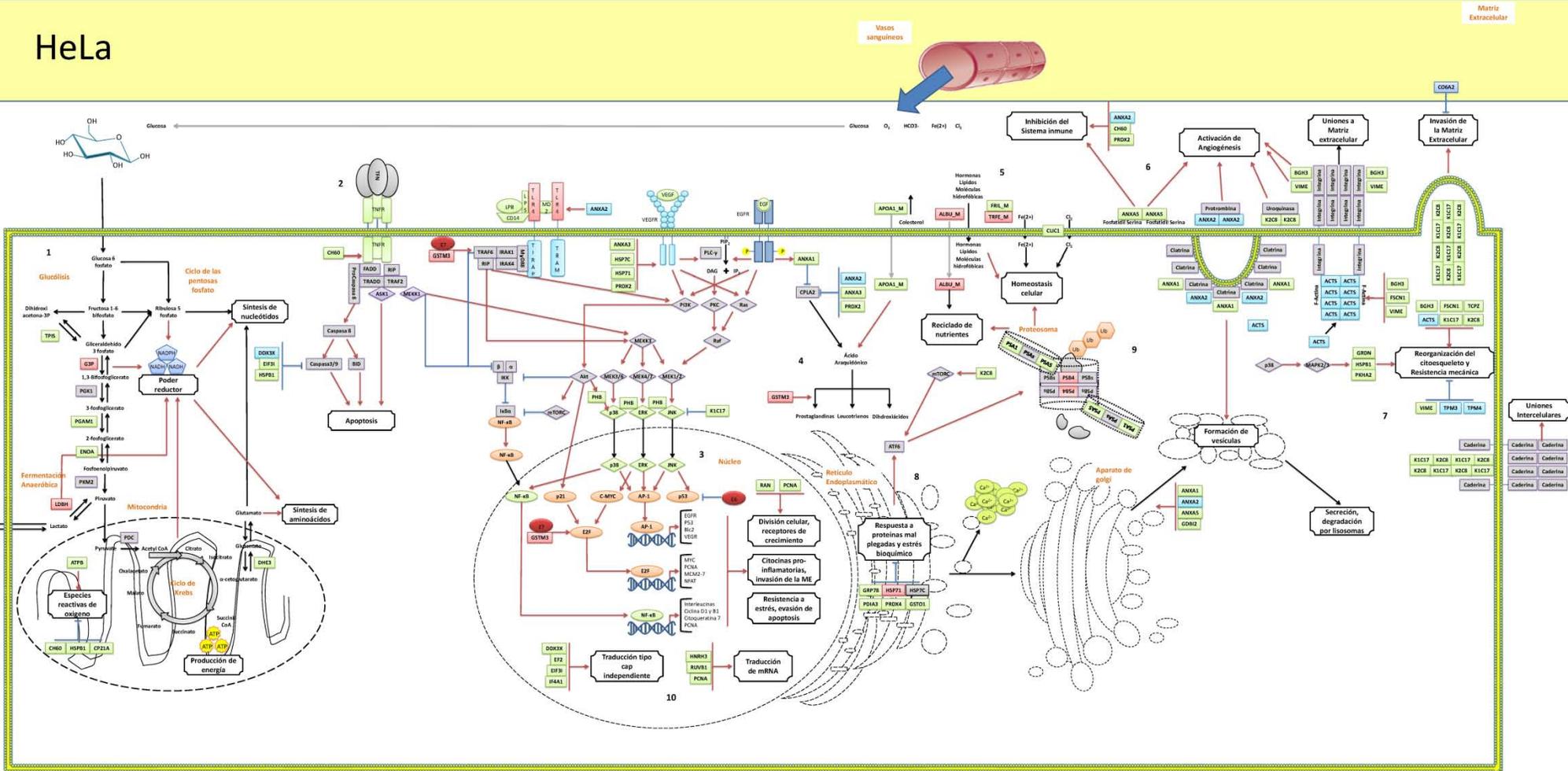
Para nuestro conocimiento, a la fecha, este es el primer estudio dinámico del desarrollo tumoral del cáncer cérvico uterino y después del análisis de la dinámica del proteoma concluimos:

1. Parece haber un uso diferencial de la glicolisis entre SiHa (obtención de esqueletos de azúcares) y HeLa (producción de NADPH por la vía de lactato)
2. Las proteínas identificadas parecen co-deregulan los receptores TNF- $\alpha$ , TLR4, VASP y EGF, y aumentan su participación en la activación de las vías Akt, p38, ERK, JNK y NF- $\kappa$ B e inhiben sus funciones apoptóticas.
3. Las vías de señalización ya mencionadas son activadoras de los factores de transcripción de NF- $\kappa$ B, p53, AP-1 y E2, y las proteínas identificadas podrían co-activar a estos factores de transcripción y bloquean la apoptosis por p53, de esta manera potencializar la capacidad proliferativa de las células cancerosas.
4. Parece ser, que los tumores son capaces de sintetizar prostaglandinas y de ser así parece haber un flujo mayoritario hacia la PGE<sub>2</sub>, la cual tiene propiedades inhibitorias del sistema inmune y promueven la proliferación celular.
5. Durante el DT, identificamos una pérdida de expresión de proteínas ancladoras de citoesqueleto, así como de la expresión de citoqueratinas las cuales están asociadas a la invasión a la ME, lo que en conjunto sugiere una mayor resistencia mecánica del citoesqueleto en células tumorales.
6. En el Hallmark de resistencia a la apoptosis, encontramos una gran cantidad de proteínas que permiten una resistencia a estreses bioquímicos, como chaperonas, peroxidasas y glutatión transferasas.
7. El papel funcional del proteosoma parece ser altamente dinámico en el DT ya que observamos la sobre-expresión de distintas subunidades del proteosoma.
8. Las distintas proteínas que identificamos y que están involucradas en el proceso de traducción, muestran cambios de expresión asociados a un posible cambio de la traducción tipo cap-dependiente a una tipo cap-independiente.
9. Las Glutatión S-Transferasa M3 y P1 son sobre-expresadas en el CaCu y por su papel funcional durante el DT de HeLa y SiHa es un posible blanco terapéutico.

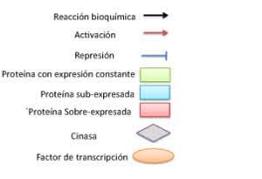
Para integrar y representar estas conclusiones, construimos una representación gráfica de la célula tumoral y las posibles funciones que están llevando a cabo las proteínas que identificamos para HeLa (Figura 46) y para SiHa (Figura 47).

Figura 46 Modelo de desarrollo tumoral de HeLa.

# HeLa



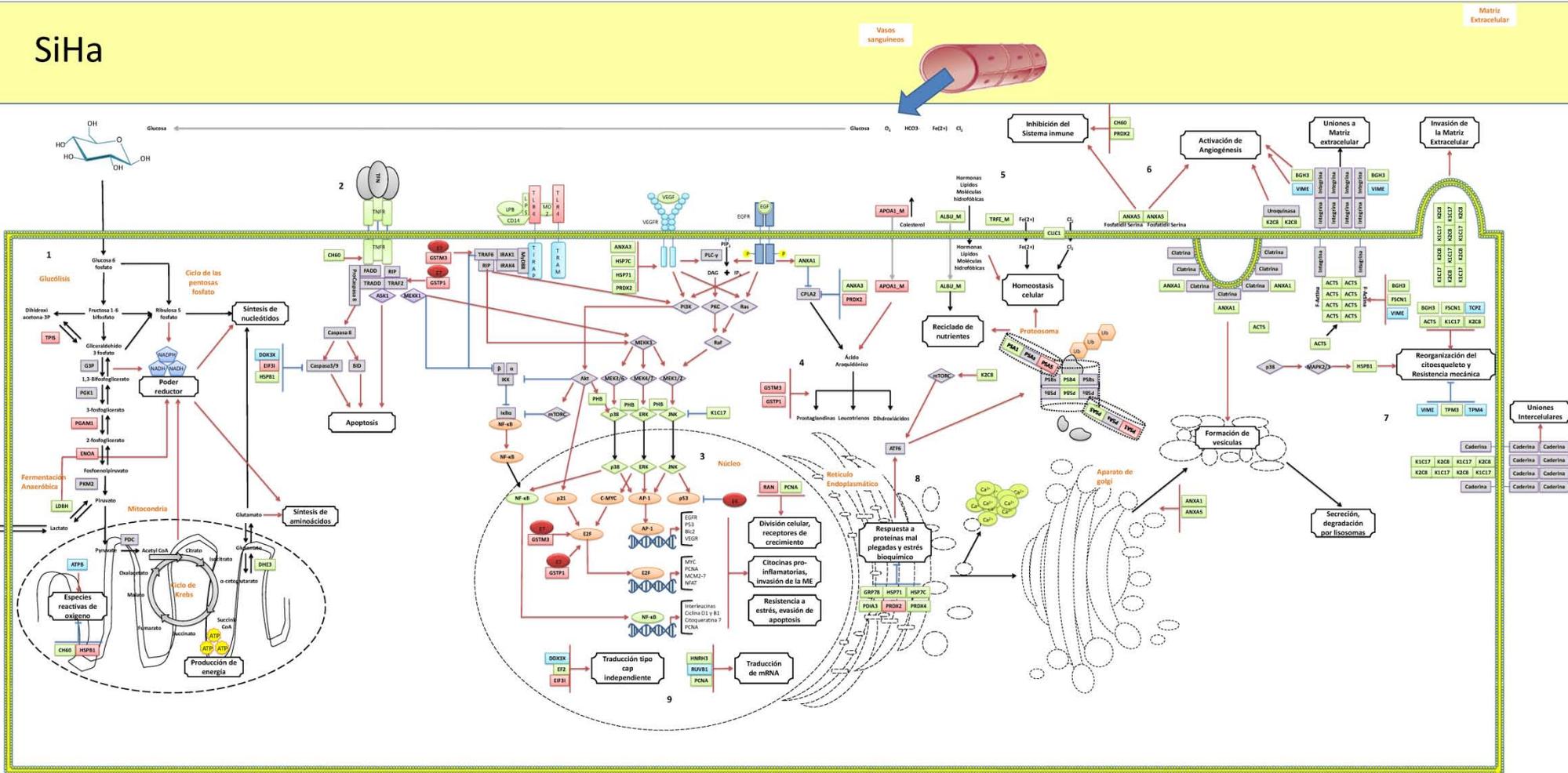
Constantes	Sub-expresadas	Sobre-expresadas	Onciomas Sobre-Expresadas
ANKA1, ANKA3, ANKA5, APOA1_M, ATRP, B0H3, CH0, CLIC1, CP2IA, DHE3, E72, E73, ENOA, FRIL_M, FSCN1, G0B, GR0N, G0T0L, HSP71, PDIA3, K1C17, K2C8, PGAM1, PH8, PNHA2, PRD2, PRD4, PSA1, PSA5, PSA8, RAN, RUVBL1, TCF2, TPS	ACTS, ANKA2, CDNA2, DDX3X, GRP78, HSP91, IRA1, TFM3, TFM4, VIME	ALBU_M, GSP, GSTM3, LDH, TRF2_M	HSP7C



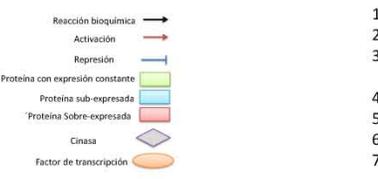
- Incremento en las vías energéticas asociadas a la glucosa.
- Co-activación de los receptores TNF- $\alpha$ , TLR4, VASP y EGF, con su participación en la activación de la vía p38, ERK, JNK y NF- $\kappa$ B.
- Vías de señalización y la activación de los factores de transcripción de NF- $\kappa$ B, AP-1 y el bloqueo de apoptosis por p53 y disregulación de E2F por las oncoproteínas E6 y E7, así como algunos de sus blancos transcripcionales.
- Síntesis de prostaglandinas.
- Componentes del torrente sanguíneo y su posible implicación en el DT.
- Proteínas involucradas en la angiogénesis y la inhibición del sistema inmune.
- Perdida de expresión de proteínas ancladoras de citoesqueleto y la invasión a la ME por filamentos de queratina que confieren mayor resistencia mecánica al citoesqueleto
- Alta resistencia a estreses bioquímicos por chaperonas, peroxididas y glutatión transferasas.
- Inducción de reciclado de nutrientes evadiendo apoptosis.
- Posible cambio de la traducción tipo cap-dependiente a una tipo cap-independiente.

Figura 47 Modelo de desarrollo tumoral de SiHa.

# SiHa



Constantes	Sub-expresadas	Sobre-expresadas
ACTS, ACTG, ALRU_M, ANKAL, ANKAS, BGN3, CHD3, DHE3, E2F, PSCN1, GRP78, HNRH3, HSP71, HSP7C, K1C17, LDH8, PCNA, PDA3, PHB, PRDX4, PSA1, PSB4, TPM3, TBE_M	ATB6, DDX3X, G8P73, RUVB3, TCEP, TPM4, VIME	ACTR, ANKAL, APOD1_M, CLUC3, E2F3, ENO4, GSTM3, GSTP1, PCAM1, PRDX2, PSAS, RAN



1. Incremento en las vías energéticas asociadas a la glucosa.
2. Co-activación de los receptores TNF- $\alpha$ , TLR4, VASP y EGF, con su participación en la activación de la vía p38, ERK, JNK y NF- $\kappa$ B.
3. Vías de señalización y la activación de los factores de transcripción de NF- $\kappa$ B, AP-1 y el bloqueo de apoptosis por p53 y desregulación de E2F por las oncoproteínas E6 y E7, así como algunos de sus blancos transcripcionales. Síntesis de prostaglandinas.
4. Componentes del torrente sanguíneo y su posible implicación en el DT.
5. Proteínas involucradas en la angiogénesis y la inhibición del sistema inmune.
6. Pérdida de expresión de proteínas ancladoras de citoesqueleto y la invasión a la ME por filamentos de queratina que confieren mayor resistencia mecánica al citoesqueleto
7. Alta resistencia a estreses bioquímicos por chaperonas, peroxidadas y glutatión transferasas.
8. Inducción de reciclado de nutrientes evadiendo apoptosis.
9. Posible cambio de la traducción tipo cap-dependiente a una tipo cap-independiente.

# Perspectivas

---

Este trabajo muestra un enfoque proteómico que aborda el desarrollo tumoral a tres tiempos distintos y sugiere que los cambios proteómicos están inhibiendo la capacidad apoptótica de las vías de señalización celular y a la vez favoreciendo su papel proliferativo. Hasta el momento, no se han identificado todas las proteínas diferencialmente expresadas, consideramos importante identificar las proteínas de los perfiles proteómicos del DT para ensamblar de manera global los cambios del proteoma y su función en las adaptaciones que el tumor adquiere a lo largo de su desarrollo.

Es importante considerar la expansión del trabajo de las siguientes maneras.

1. Llevar a cabo la inhibición de la GSTM3 *in vitro* para caracterizar sus efectos en ciclo celular o apoptosis, así como su impacto en las vías de señalización.
2. Llevar a cabo el interactoma de la GSTM3 para confirmar el modelo.
3. Ampliar el rango de tiempo en el DT: 20, 25, 35 y 40 días, para terminar el modelo de cambios de expresión.
4. Llevar a cabo los perfiles proteómicos de cancer cérvico uterino HPV- (C33A)
5. Verificar la acidificación en el microambiente tumoral *in vivo*
6. Corroborar la actividad anti- óxidos, hipoxia y estrés por proteínas mal plegadas de las proteínas identificadas que confieren resistencia a estrés bioquímico.
7. Llevar a cabo los experimentos para aprobar o nulificar el cambio de traducción tipo cap-dependiente a tipo cap-independiente.
8. Probar la hipótesis de resistencia mecánica al inhibir la expresión de las citoqueratinas.
9. Completar el modelo con la identificación de más proteínas y metabolitos.
10. De las proteínas que surjan en intersecciones importantes por sus funciones, llevar a cabo ensayos funcionales.

# Referencias

---

1. R. Ruddon, et al., **Cancer Biology**. 4th edition. Oxford 2007
2. Robert A. Wienberg, et al. **The Biology of Cancer**. Garland Science Taylor & Francis Group, 2007.
3. Malcolm R. Alison, et al., **The Cancer Handbook**. Second edition. John Wiley & Son, 2007
4. Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. Cell 144, March 4, 2011, Elsevier Inc.
5. Lester A. Rubenstein, Randy J. Zauhar, Richard G. Lanzara. **Molecular dynamics of a biophysical model for  $\beta$ 2-adrenergic and G protein-coupled receptor activation**. Journal of Molecular Graphics and Modelling 25 (2006) 396–409, doi:10.1016/j.jmkgm.2006.02.008
6. S. Mussunoor and GI Murray. **The role of annexins in tumour development and progression**. J Pathol 2008; 216: 131–140
7. Miyuki Bohgaki et al. **The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-b2Glycoprotein I antibodies**. International Immunology, Vol. 16, No. 11, pp. 1633–1641 2004. doi:10.1093/intimm/dxh166. October 2004
8. Beato M, Chavez S and Truss M (1996). **Transcriptional regulation by steroid hormones**. *Steroids* 61 (4): 240–251. doi:10.1016/0039-128X(96)00030-X
9. Stephan Wullschlegel, et al. **Role of TAPP1 and TAPP2 adaptor binding to PtdIns(3,4)P2 in regulating insulin sensitivity defined by knock-in analysis**. Biochem. J. (2011) 434, 265–274 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20102012
10. Thea D. Tlsty1 and Lisa M. Coussens. **Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development**. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224 ANRV268-PM01-05
11. Edgardo V et al. **The Tumor Microenvironment: Key to Early Detection**. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, Volume 43, Issue 5 & 6 December 2006 , pages 393 – 425
12. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, et al. 2004. **Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds**. PLoS Biol. 2:E7
13. Willis RA. 1967. **The unusual in tumour pathology**. Can. Med. Assoc. J. 97:1466–79
14. Lisa M. Coussens & Zena Werb. **Inflammation and cancer**. Nature, vol. 420 December 2002
15. Karin E. de Visser, Alexandra Eichten and Lisa M. Coussens. **Paradoxical roles of the immune system during cancer development**. Nature Cancer Reviews. January 2006 Vol 6.
16. Johanna A. Joyce. **Microenvironmental regulation of metastasis**. Nature Reviews CanCer vol. 9 April 2009. doi:10.1038/nrc2618
17. Folkman J. 2003. **Fundamental concepts of the angiogenic process**. Curr. Mol. Med. 3:643–51
18. Carmeliet P, Jain RK. 2000. **Angiogenesis in cancer and other diseases**. Nature 407:249– 57
19. Lukanova A, Kaaks R. 2005. **Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses**. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14:98–107.
20. Hansen RK, Bissell MJ. 2000. **Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones**. Endocr. Relat. Cancer 7:95–113
21. Xie B, Tsao SW, Wong YC. 1999. **Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in female Noble rats: expression of TGF- $\beta$ 1 and its receptors, TGF- $\alpha$ , and EGF-R in mammary carcinogenesis**. Breast Cancer Res. Treat. 58:227–39
22. Ryan KJ, Engel LL (March 1957). **Hydroxylation of steroids at carbon 21**. J. Biol. Chem. 225 (1): 103–14. PMID 13416221.
23. Stikkelbroeck NM, Otten BJ, Pasic A, Jager GJ, Sweep CG, Noordam K, Hermus. **High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia**. J Clin Endocrinol Metab 86:5721-5728
24. Jennifer L. Costantini, et al., **TAPP2 links phosphoinositide 3-kinase signaling to B-cell adhesion through interaction with the cytoskeletal protein utrophin: expression of a novel cell adhesion-promoting complex in B-cell leukemia**. Blood 2009 114: 4703-4712, doi:10.1182/blood-2009-03-213058
25. Stefania Averaimo, Rosemary H. Milton, Michael R. Duchon, Michele Mazzanti. **Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): Sensor and effector during oxidative stress**. 2010 Federation of European Biochemical Societies. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.073
26. Stella M. Valenzuela, et al. **The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle**. Journal of Physiology (2000), 529.3, pp. 541–552
- 27.
28. Ministerio de salud. **Guía Clínica**. Examen de medicina preventiva, MINSAL, 2008
29. Peter B. and Bernard L., **World Cancer Report 2008**. Naturaprint, pag. 418 - Section 5 - Cancer Site by Site, 2008.
30. SINAIS. Mortalidad 2008 <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/> 2008. Ref Type: Internet Communication, consulta 2011.
31. Eileen M. Burd. **Human Papillomavirus and Cervical Cancer**. Clinical microbiology reviews, Henry Ford Hospital, Detroit, Michigan Jan. 2003
32. Hwang, E. S., Nottoli, T. & Dimaio, D. **The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells**. Virology 211, 227–233 (1995).

33. Oda, H., Kumar, S. & Howley, P. M. **Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6: AP-mediated ubiquitination.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 9557–9562 (1999)
34. Zerfass, K. et al. **Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation.** Virol. 69, 6389–6399 (1995).
35. Francis S. Collins, et al., **A vision for the future of genomics research A blueprint for the genomic era.** NATURE, VOL 422. 24 APRIL 2003.
36. Jeanette J. McCarthy, Howard L. McLeod, Geoffrey S. Ginsburg. **Genomic Medicine: A Decade of Successes, Challenges, and Opportunities.** 12 June 2013 Vol 5 Issue 189 189sr4.
37. CG Acevedo Rocha, et al. **Microarreglos de ADN y cáncer cérvico uterino: identificación de marcadores tumorales.** ISSN-0300-9041 Volumen 75, Núm. 4, abril, 2007
38. Thangarajan Rajkumar, et al. **Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis.** BMC Cancer 2011, 11:80.
39. Giuseppe Russo, et al. **Advantages and limitations of microarray technology in human cancer.** Oncogene (2003) 22, 6497–6507. doi:10.1038/sj.onc.1206865
40. J.P.A. Baak, et al. **Genomics and proteomics in cancer.** European Journal of Cancer 39 (2003) 1199–1215
41. Martin DB, Nelson PS. **From genomics to proteomics: Techniques and applications in cancer research.** Trends Celi Biol 2001; 11: S60-S6. Hanash S. **Disease proteomics.** Nature 2003; 422:226-32
42. Daniel c. Liebler, et al., **Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology.** Liebler © Humana Press, Inc., Totowa, NJ
43. A. F. Maarten Altelaar, Javier Munoz and Albert J. R. Heck. **Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics.** NATURE REVIEWS | GENETICS VOLUME 14 | JANUARY 2013 doi:10.1038/nrg3356
44. Emanuel F. Petricoin, Kathryn C. Zoon, Elise C. Kohn, J. Carl Barrett and Lance A. Liotta. **CLINICAL PROTEOMICS: TRANSLATING BENCHSIDE PROMISE INTO BEDSIDE REALITY.** NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY VOLUME 1 | SEPTEMBER 2002. doi:10.1038/nrd891
45. Damien Besson, et al., **A Quantitative Proteomic Approach of the Different Stages of Colorectal Cancer Establishes OLFM4 as a New Nonmetastatic Tumor Marker.** *Molecular & Cellular Proteomics* 10: 10.1074/mcp.M111.009712, 1–14, 2011
46. Aebersold R, Mann M. **Mass spectrometry-based proteomics.** Nature 2003; 422: 198-207
47. Smith L, Lind MJ, Welham KJ, Cawkwell L.. **Cancer proteomics and its application to discovery of therapy response markers in human cancer.** Cancer Biology Proteomics Group Cancer 2006; 107(2):232–241.
48. DG Ward, et al.,. **Identification of serum biomarkers for colon cáncer by proteomic analysis.** British Journal of Cancer (2006) 94, 1898 – 1905
49. Melinda E. Sanders et al. **Differentiating Proteomic Biomarkers in Breast Cancer by Laser Capture Microdissection and MALDI MS.** Journal of Proteome Research 2008, 7, 1500–1507
50. jinong li, et al, **Detection of prostate cancer using serum proteomics pattern in a histologically confirmed population.** The journal of urology, the journal of urology 2004
51. Jones MB, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC, et ai. **Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer.** Proteomics 2002; 2: 76-84
52. Y.F Wong, T.H Cheung, K.W.K Lo, V.W Wang, C.S Chan, T.B Ng, T.K.H Chung, S.C Mok. **Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix.** Cancer Letters Volume 211, Issue 2, 10 August 2004, Pages 227–234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2004.02.014>
53. Yoo Pyo, et al., **Proteomics analysis of progressive factors in uterine cervical cancer.** 2005 Proteomics 2005, 5, 1481–1493, DOI 10.1002/pmic.200401021.
54. Bae SM, Lee CH, Cho YL, Nam KH, Kim YW, Kim CK, et al. **Two dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients.** Gynecol Oncol 2005;99:26–35
55. Xueqiong Zhu. et al., **Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer.** Gynecologic Oncology 112 (2009) 248–256
56. Hilal Arnouk, Mark A. Merkley, Robert H. Podolsky, Hubert Stöppler, Carlos Santos, Manuel Álvarez, Julio Mariategui, Daron Ferris, Jeffrey R. Lee, and William S. Dynan. **Characterization of molecular markers indicative of cervical cancer progression.** Proteomics Clin. Appl. 2009, 3, 516–527. DOI 10.1002/prca.200800068
57. Alberto Checa, et al. **Análisis del secretoma en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.** Tesis doctoral (resultados no publicados).
58. M.I. Lomnytska, S Becker, et al. **Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value.** British Journal of Cancer (2011) 104, 110 – 119
59. Beverly A. Teicher. **Tumor Models in Cancer Research.** Second Edition Humana Press 2011.
60. John R. Masters. **HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly.** Nature reviews cancer volume 2 april 2002
61. Friz Friedl, Ikuo Kimura, Toyoro Osato, and Yohei Ito. **Studies on a New Human Cell Line (SiHa) Derived from Carcinoma of Uterus. I. Its Establishment and Morphology.** Proc Soc Exp Biol Med November 1970 135:543–545
62. W.C.G. van Staveren, D.Y. Weiss Solís, A. Hébrant, V. Detours, J.E. Dumont, C. Maenhaut. **Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?.** Biochimica et Biophysica Acta 1795 (2009) 92–103

63. Yan Chen, Christine Miller, **Identification of Cervical Cancer Markers by cDNA and Tissue Microarrays**. *Cancer Research* 63, 1927–1935, April 15, 2003
64. Yick Fu Wong, Zachariah E. Selvanayagam, Nien Wei, *et al.* **Expression Genomics of Cervical Cancer: Molecular Classification and Prediction of Radiotherapy Response by DNA Microarray**. *Clin Cancer Res* 2003;9:5486-5492.
65. Yick-Fu Wong<sup>1</sup>, Tak-Hong Cheung *et al.* **Genome-wide gene expression profiling of cervical cancer in Hong Kong women by oligonucleotide microarray**. *Int. J. Cancer*: 118, 2461–2469 (2006)].
66. Encarnación S, *et al.*, **Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes**. *Biol Proced Online* 2005, 7: 117-135
67. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, and Ideker T. **Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks**. *2003 Genome Research* 13:2498-04.
68. Martin A, Ochagavia ME, Rabasa LC, Miranda J, Fernandez-de-Cossio J, Bringas R. **A new tool for gene network building, visualization and analysis**. *BMC Bioinformatics*, 10:91, 2010.
69. Mary M. Tomayko and Patrick Reynolds. **Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice**. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1989. 24(3)148-154.
70. Mark P. Molloy, *et al.* **Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics** *Proteomics* 2003, 3, 1912–1919.
71. Carlos Tristan, Neelam Shahani, Thomas W. Sedlak, Akira Sawa. **The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments**. *Cellular Signalling* 23 (2011) 317–323. doi:10.1016/j.cellsig.2010.08.003
72. Karin Fischer, *et al.*, **Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells**. *BLOOD*, 1 MAY 2007 \_ VOLUME 109, NUMBER 9. doi:10.1182/blood-2006-07-035972
73. WEIDONG ZHOU, LANCE A. LIOTTA and EMANUEL F. PETRICOIN **Cancer Metabolism: What we Can Learn from Proteomic Analysis by Mass Spectrometry** *CANCER GENOMICS & PROTEOMICS* 9: 373-382 (2012)
74. Stephen J. Ralph<sup>1</sup>, Sara Rodríguez-Enríquez, Jiri Neuzil<sup>3</sup>, Rafael Moreno-Sánchez. **Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger** *Molecular Aspects of Medicine* Volume 31, Issue 1, February 2010, Pages 29–59. doi:10.1016/j.mam.2009.12.006
75. Wen-juan Wang, Xiao-xing Shi, Yi-wen Liu, Yi-qing He, Ying-zhi Wang, Cui-xia Yang, and Feng Gao. **The Mechanism Underlying the Effects of the Cell Surface ATP Synthase on the Regulation of Intracellular Acidification During Acidosis**. *Journal of Cellular Biochemistry* 114:1695–1703 (2013). DOI 10.1002/jcb.24511
76. An I. Jonckheere, Jan A. M. Smeitink and Richard J. T. Rodenburg. **Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology**. *J Inherit Metab Dis* (2012) 35:211–225, DOI 10.1007/s10545-011-9382-9
77. Pierre Vantourout, Laurent O. Martinez, Aurelie Fabre, Xavier Collet, Eric Champagnea. **Ecto-F1-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes**. *Molecular Immunology* 45 (2008) 485–492. doi:10.1016/j.molimm.2007.05.026
78. Pierre Vantourout, Claudia Radojkovic, Laetitia Lichtenstein, Véronique Pons, Eric Champagne, Laurent O Martinez .**Ecto-F1-ATPase: A moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor**. *World J Gastroenterol* 2010 December 21; 16(47): 5925-5935. doi:10.3748/wjg.v16.i47.5925
79. Bennett RG, Hamel FG and Duckworth WC. **Characterization of the insulin inhibition of the peptidolytic activities of the insulin-degrading enzyme-proteasome complex**. *Diabetes* 46: 197-203, 1997.
80. Gehm BD and Rosner MR. **Regulation of insulin, epidermal growth factor, and transforming growth factor- $\alpha$  levels by growth factor-degrading enzymes**. *Endocrinology* 128: 1603-1610, 1991.
81. Hamel FG, Gehm BD, Rosner MR and Duckworth WC **Identification of the cleavage sites of transforming growth factor alpha by insulin-degrading enzymes**. *Biochim Biophys Acta* 1338: 207-214, 1997.
82. Wallimann T, Wyss M, Bridiczka D, Nicolay K and Eppenberger M. **Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis**. (1992) *Biochem J* 281: 21–40
83. N Durany *et al.* **Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase, creatine kinase and enolase activity and isoenzymes in breast carcinoma**. *British Journal of Cancer* (2000) 82(1), 20–27 bjoc.1999.0871
84. Masakiyo Sakaguchi, Nam-ho Huh. **S100A11, a dual growth regulator of epidermal keratinocytes**. *Amino Acids* (2011) 41:797–807 DOI 10.1007/s00726-010-0747-4
85. D.A. Lane, H. Philippou, J.A. Huntington, **Directing thrombin, Blood**. 106 (8) (2005) 2605–2612.
86. Miyuki Bohgaki *et al.* **The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-b2Glycoprotein I antibodies**. *International Immunology*, Vol. 16, No. 11, pp. 1633–1641 2004. doi:10.1093/intimm/dxh166. October 2004
87. Jennifer F. A. Swisher, Nicholas Burton, Silvia M. Bacot, Stefanie N. Vogel and Gerald M. Feldman. **AnnexinA2 tetramer activates human and murine macrophages through TLR4**. *BLOOD*, 21 JANUARY 2010, VOLUME 115, NUMBER 3. doi:10.1182/blood-2009-06-226944
88. Renu WADHW, *et al.* **Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mtHsp70 and HSP60**. *Biochem. J.* (2005) 391, 185–190, doi:10.1042/BJ20050861.
89. Amy S. Leev. **GRP78 Induction in Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications**. *Cancer Res* 2007;67:3496-3499. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0325

90. Ramírez-Rangel, I., Bracho-Valdés, I., Vázquez-Macías, A., Carretero- Ortega, J., Reyes-Cruz, G. and Vázquez-Prado, J. Regulation of mTORC1 complex assembly and signaling by GRp58/ERp57. *Mol. Cell. Biol.* 31 (2011) 1657-1671.
91. Chia-Jung Liao, Tzu-I Wu, et al., **Glucose-regulated protein 58 modulates cell invasiveness and serves as a prognostic marker for cervical cancer.** Japanese Cancer Association Cancer Sci, vol. 102 , no. 12 , 2255–2263, doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02102.x
92. Guang Hu et al. **A novel endothelial-specific heat shock protein HspA12B is required in both zebrafish development and endothelial functions in vitro.** *Journal of Cell Science* 119, 4117-4126 doi:10.1242/jcs.03179
93. Wen-Jie Huang, et al. **Transcriptional upregulation of HSP70-2 by HIF-1 in cancer cells in response to hypoxia.** *Int. J. Cancer:* 124, 298–305 (2009). DOI 10.1002/ijc.23906D.
94. Sherri L. Newmyer and Sandra L. Schmid. **Dominant-interfering Hsc70 Mutants Disrupt Multiple Stages of the Clathrin-coated Vesicle Cycle In Vivo.** *The Journal of Cell Biology*, Volume 152, Number 3, February 5, 2001 607–620
95. Masayuki Shiota, et al. **Heat Shock Cognate Protein 70 Is Essential for Akt Signaling in Endothelial Function.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30:491-497 December 17, 2009 doi: 10.1161/ATVBAHA.109.193631.
96. Sunil C. Kaul, Custer C. Deocaris, Renu Wadhwa. **Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer.** *Experimental Gerontology* 42 (2007) 263–274. doi:10.1016/j.exger.2006.10.020
97. Andre-patrick arrigo. **Anti-apoptotic, tumorigenic and metastatic Potential of HSP27 (HSPB1) and  $\alpha$ -crystallin (hspb5): emerging targets for the Development of new anti-cancer therapeutic Strategies.** *Heat Shock Proteins in Cancer*, Chapter 4, 73–92. 2007, Springer.
98. Madhavi J. Rane, Yong Pan, Saurabh Singh, David W. Powell, Rui Wu, Timothy Cummins, Qingdan Chen, Kenneth R. McLeish, and Jon B. Klein. **Heat Shock Protein 27 Controls Apoptosis by Regulating Akt Activation.** Vol. 278, No. 30, Issue of July 25, pp. 27828–27835, 2003. DOI 10.1074/jbc.M303417200
99. Amir Kol, Andrew H. Lichtman, Robert W. Finberg, Peter. **Cutting Edge: Heat Shock Protein (HSP) 60 activates the Innate Immune Response: CD14 Is an essential Receptor for HSP60 Activation of Mononuclear Cells.** *J Immunol* 2000;164:13-17.
100. Michal Cohen-Sfady, et al. **Heat Shock Protein 60 Activates B Cells via the TLR4-MyD88 Pathway.** *The Journal of Immunology*, 2005, 175: 3594–3602.
101. Michael Karin and Yinon Ben-Neriah. **PHOSPHORYLATION MEETS UBIQUITINATION: The Control of NF- $\kappa$ B Activity.** *Annual Review of Immunology* 2000. 18:621–663.
102. V Spataro, C Norbury and AL Harris. **The ubiquitin-proteasome pathway in cancer.** *British Journal of Cancer* (1998) 77(3), 448-455
103. Elke Kru"ger and Peter-M Kloetzel. **Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme.** *Current Opinion in Immunology* 2012, 24:77–83. DOI 10.1016/j.coi.2012.01.005
104. Jasmin N Dynek1,3, Tatiana Goncharov, Erin C Dueber, Anna V Fedorova, Anita Izrael-Tomasevic, Lilian Phu, Elizabeth Helgason, Wayne J Fairbrother, Kurt Deshayes, Donald S Kirkpatrick and Domagoj Vucic. **c-IAP1 and Ubch5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signaling.** *The EMBO Journal* (2010) 29, 4198–4209. doi:10.1038/emboj.2010.300.
105. Dong Hoon Kang, Doo Jae Lee, Kyung Wha Lee, Yoon Sun Park, Joo Young Lee, Sang-Hee Lee, Young Jun Koh, Gou-Young Koh, Chulhee Choi, Dae-Yeul Yu, Jaesang Kim, and Sang Won Kang. **Peroxiredoxin II Is an Essential Antioxidant Enzyme that Prevents the Oxidative Inactivation of VEGF Receptor-2 in Vascular Endothelial Cells.** *Molecular Cell* 44, 545–558, November 18, 2011 ©2011 Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.molcel.2011.08.040
106. Min Hee Cho, et al., **Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II.** *Nature Letters.* Vol 435 | 19 May 2005 | doi:10.1038/nature03587
107. Timothy J. Tavender and Neil J. Balleid. **Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H2O2 produced during disulphide formation.** *Journal of Cell Science* 123, 2672-2679. doi:10.1242/jcs.067843
108. Jin, D.-Y, Chae, H. Z, Rhee, S. G, Jeang, K.-T. **Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF- $\kappa$ B activation.** *J. Biol. Chem.* 272: 30952-30961, 1997.
109. John D. Hayes, Jack U. Flanagan, and Ian R. Jowsey. **GLUTATHIONE TRANSFERASES,** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005. 45:51–88 doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
110. Y Wu1, Y Fan, B Xue, L Luo, J Shen, S Zhang, Y Jiang and Z Yin. **Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals.** *Oncogene* (2006) 25, 5787–5800. doi:10.1038/sj.onc.1209576
111. Mileo AM, Abbruzzese C, Mattarocci S, Bellacchio E, Pisano P, et al. **Human Papillomavirus-16 E7 Interacts with Glutathione S-Transferase P1 and Enhances Its Role in Cell Survival.** *PLoS ONE* 4(10): e7254. doi:10.1371/journal.pone.0007254
112. Hariom Singh, MSc; Rekha Sachan, MS; S. Devi, BScN; Sachchida N. Pandey, MSc; B. Mittal, **Association of GSTM1, GSTT1, and GSTM3 gene polymorphisms and susceptibility to cervical cancer in a North Indian population.** *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:303.e1-303.e6., doi: 10.1016/j.ajog.2007.09.046
113. Christiane F.S. Marques, Sergio Koifman, Rosalina J. Koifman, Paolo Boffetta, Paul Brennan, Ana Hatagima. **Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: Results from a case-control study in Rio de Janeiro.** *Oral Oncology* (2006) 42, 632– 637. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.11.003
114. Meenu Jain, Shaleen Kumar, Punita Lal, et al. **Role of GSTM3 Polymorphism in the Risk of Developing Esophageal Cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:178-181. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0542
115. Carsten T. Beuckmann, Ko Fujimori, Yoshihiro Urade, and Osamu Hayaishi. **Identification of Mu-Class Glutathione Transferases M2-2 and M3-3 as Cytosolic Prostaglandin E Synthases in the Human Brain.** *Neurochemical Research, Vol. 25, No. 5, 2000, pp. 733–738*
116. Magis Mandapathil, Miroslaw J. Szczepanski, Lang and Theresa L. Whiteside, Jonas T. Johnson, Elieser Gorelik, Stephan Marta Szajnik, Jin Ren, Edwin K. Jackson. **Adenosine and Prostaglandin E2 Cooperate in the Suppression of Immune Responses Mediated by Adaptive Regulatory T Cells.** *J. Biol. Chem.* 2010, 285:27571. doi: 10.1074/jbc.M110.127100

117. Astrid K. Whitbread, Amir Masoumi, Natasha Tetlow, Erica Schmuck, Marjorie Coggan, and Philip G. Board. **Characterization of the Omega Class of Glutathione Transferases.** METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 401 0076-6879/05. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)01005-0.
118. Philip G. Board, Deepthi Menon. **Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology.** Biochimica et Biophysica Acta 1830 (2013) 3267–3288, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
119. David H. Craig, Beatrice Haimovich, and Marc D. Basson. **Alpha-actinin-1 phosphorylation modulates pressure-induced colon cancer cell adhesion through regulation of focal adhesion kinase-Src interaction.** Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Dec;293(6):C1862-74. Epub 2007 Sep 26. doi:10.1152/ajpcell.00118.2007
120. Yongliang Zhao and TOM K Hei. **Role of Beta ig-h3 Gene in Carcinogenesis.** From: Cancer Drug Discovery and Development: Transforming Growth Factor- $\beta$  in Cancer Therapy, vbl I: Basic and Clinical Biology Edited by: Sonia B. Jakowlew © Humana Press Inc.. Totowa, NJ.
121. Divya Bhagirath, Nitin Abrol, Rehan Khan, Manoj Sharma, Amllesh Seth, Alpana Sharma. **Expression of CD147, BIGH3 and Stathmin and their potential role as diagnostic marker in patients with urothelial carcinoma of the bladder.** Clinica Chimica Acta 413 (2012) 1641–1646. doi:10.1016/j.cca.2012.05.005
122. Richard G. et al., **BIG-H3 a novel secretory protein inducible by transforming growth factor  $\beta$ , is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts *in vitro*.** The society for investigative Dermatology. SSDI0022-202X(95)00061-0
123. Asier Jayo, Maddy Parsons. **Fascin: A key regulator of cytoskeletal dynamics.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 42 (2010) 1614–1617. doi:10.1016/j.biocel.2010.06.019
124. Cristian M Ortiz, Tetsuo Ito, Yosuke Hashimoto, Satoshi Nagayama, Akira Iwai, Shigeru Tsunoda, Fumiaki Sato, Miguel Martorell, Jose Angel Garcia, Ana Perez and Yutaka Shimada. **Effects of small interfering RNAs targeting fascin on human esophageal squamous cell carcinoma cell lines.** Ortiz *et al.* *Diagnostic Pathology* 2010, 5:41. <http://www.diagnosticpathology.org/content/5/1/41>
125. Hiroshi KUBOTA, Gillian HYNES and Keith WILLISON. **The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1) Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol.** Eur. J. Biochem. 230, 3-16 (1995).
126. HIROSHI KU BOTA. **FUNCTION AND REGULATION OF CYTOSOLIC MOLECULAR CHAPERONE CCT.** Copyright 2002, Elsevier Science (USA). *Vitamins and Hormones* All rights reserved. *Volume 65*.
127. David M. Helfman, Patrick Flynn, Protiti Khan and Ali Saeed. **Tropomyosin as a Regulator of Cancer Cell Transformation.** Tropomyosin, edited by Peter Gunning. c2008 Landes Bioscience and Springer Science & Business Media.
128. Braverman RH, Cooper HL, Lee HS et al. **Anti-oncogenic effects of tropomyosin: isoform specificity and importance of protein coding sequences.** Oncogene 1996; 13:537-545.
129. Johanna Ivaska, et al. **Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling.** Experimental cell research 313(2007)2050–2062. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.040. |
130. Judy R. van Beijnum. **Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature.** Blood . June 22, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-02-004291.
131. Thomas M. Magin, Preeethi Vijayaraja, Rudolf E. Leube. **Structural and regulatory functions of keratins.** EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 313 (2007) 2021–2032 doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.005.
132. J. Kirfela, T. M. Magin and J. Reichelt. **Keratins: a structural scaffold with emerging functions.** CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 56–71 1420-682X/03/010056-16.
133. **Wera Roth, Mechthild Hatzfeld, Maik Friedrich, Sören Thiering and Thomas M. Magin. Keratin function and regulation in tissue homeostasis and pathogenesis.** BioMol Concepts, Vol. 3 (2012), pp. 161–173 • Copyright © by Walter de Gruyter • Berlin • Boston. DOI 10.1515/BMC.2011.060
134. Nataša Obermajer<sup>1</sup>, Bojan Doljak<sup>2</sup> and Janko Kos **Cytokeratin 8 ectoplasmic domain binds urokinase-type plasminogen activator to breast tumor cells and modulates their adhesion, growth and invasiveness.** *Molecular Cancer* 2009, 8:88 doi:10.1186/1476-4598-8-88
135. Eva Frei. **Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells.** Frei Diabetology & Metabolic Syndrome 2011, 3:11.
136. Kwang Dong Kim, Ho Yong Lim, Hee Gu Lee, Do-Young Yoon, Yong-Kyung Choe, Inpyo Choi, Sang-Gi Paik, Young-Sang Kim, Young Yang, Jong-Seok Lim. **Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation.** Biochemical and Biophysical Research Communications 338 (2005) 1126–1136. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.065
137. **Chen YT, Chen CL, Chen HW, Chung T, Wu CC, Chen CD, Hsu CW, Chen MC, Tsui KH, Chang PL, Chang YS, Yu JS. Discovery of novel bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics using iTRAQ technology.** *J Proteome Res.* 2010 Nov 5;9(11):5803-15. doi: 10.1021/pr100576x. Epub 2010 Sep 17.
138. Ningning Zhao and Caroline A. Enns. **Iron Transport Machinery of Human Cells: Players and Their Interactions.** Current Topics in Membranes, Volume 69, Elsevier Inc. ISSN 1063-5823, doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00003-3.
139. Stella Sun, Nikki P. Y. Lee, et al. **Oncoproteomics of hepatocellular carcinoma: from cancer markers' discovery to functional pathways.** Liver International ISSN 1478-3223. DOI:10.1111/j.1478-3231.2007.01533.x
140. Vaughn CB, Weinstein R, Bond B, et al. **Ferritin content in human cancerous and noncancerous colonic tissue.** Cancer Invest 1987;5:7 ^10.
141. Guner G, Kirkali G, Yenisey C, Tore IR. **Cytosol and serum ferritin in breast carcinoma.** Cancer Lett 1992;67:103^12.

142. Can G. Phan, Concetta Bubici, et al., **Ferritin Heavy Chain upregulation by NF- $\kappa$ B inhibits TNF $\alpha$ -induces apoptosis by suppressing reactive oxygen species.** *Cell*, Vol. 119, 529-542, November 12, 2004.
143. Na Wu, Shuqing Liu, Chunmei Guo, Zhijie Hou, Ming-Zhong Sun. **The role of annexin A3 playing in cancers.** *Clin Transl Oncol* (2013) 15:106–110. DOI 10.1007/s12094-012-0928-6
144. Jae Eun Park, Do Hee Lee, Jung A. Lee, Sung Goo Park, Nam-Soon Kim, Byoung Chul Park, Sayeon Cho. **Annexin A3 is a potential angiogenic mediator.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337 (2005) 1283–1287. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.004
145. Sarah Thornton, Nisha Anand, Dan Purcell, Jonathan Lee. **Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis.** *J Mol Med* (2003) 81:536–54. DOI 10.1007/s00109-003-0461-8
146. Martina Schroöder. **Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation.** *Biochemical Pharmacology* 79 (2010) 297–306
147. Shai White-Gilbertson, David T. Kurtz, Christina Voelkel-Johnson. **The role of protein synthesis in cell cycling and cancer.** *MOL CELLULAR ONCOLOGY* 3 (2009) 402–408. doi:10.1016/j.molonc.2009.05.003
148. E. A. Martinova. **mTOR Kinase and Its Role in the Cell Stress Response.** *ISSN 1990\_7478, Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2012, Vol. 6, No. 1, pp. 9–15.* © Pleiades Publishing, Ltd., 2012. *Original Russian Text © E.A. Martinova, 2011, published in Biologicheskie Membrany, 2011, Vol. 28, No. 6, pp. 446–452.*
149. D. Mahe, P. Mahl, R. Gattoni, N. Fischer, M.G. Mattei, J. Stevenin, J.P. Fuchs. **Cloning of human 2H9 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. Relation with splicing and early heat shock-induced splicing arrest.** *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 1827–1836.
150. B. Honore. **The hnRNP 2H9 gene, which is involved in the splicing reaction, is a multiply spliced gene,** *Biochim. Biophys. Acta* 1492 (2000) 108–119.
151. Helle D. Ulrich & Tomio Takahashi. **Readers of PCNA modifications.** *Chromosoma* (2013) 122:259–274. DOI 10.1007/s00412-013-0410-4
152. Madhumati Goel, Kavita Somani, Anju Mehrotra, Uma Singh, Raj Mehrotra. **Immunohistochemical Expression of Cell Proliferating Nuclear Antigen (PCNA) and p53 Protein in Cervical Cancer.** *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* (September-October 2012) 62(5):557–561 DOI 10.1007/s13224-012-0180-6
153. Sabine Gorynia, Tiago M. Bandejas, Pedro M. Matias, Filipa G. Pinho, Colin E. McVey, Peter Donner, and Maria Arménia Carrondo. **RuvBL1 and RuvBL2 and Their Complex Proteins Implicated in Many Cellular Pathways.** *Macromolecular Crystallography. Chapter 5.* ISBN 978-94-007-2530-0 (e-book)
154. Sang Gyun Kim, Gregory R. Hoffman, George Poulgiannis, Gwen R. Buel, Young Jin Jang, Ki Won Lee, Bo-Yeon Kim, Raymond L. Erikson, Lewis C. Cantley, Andrew Y. Choo, and John Blenis. **Metabolic Stress Controls mTORC1 Lysosomal Localization and Dimerization by Regulating the TTT-RUVBL1/2 Complex.** *Molecular Cell* 49, 172–185, January 10, 2013 ©2013 Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.003>
155. Vannoni, et al. **Enzyme Activities Controlling Adenosine Levels in Normal and Neoplastic Tissues.** *Medical Oncology*, vol. 21, no. 2, 187–195, 2004, Doi: 1357-0560/04/21:187–195
156. Jozef Spychala. **Tumor-promoting functions of adenosine.** *Pharmacology & Therapeutics* 87 (2000)
157. Schimmoller, F., Smon, I., and Pfeffer, S. R. **Rab GTPases, directors of vesicle docking.** (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 22161-22164.
158. Haixing Wang, Maureen T. Kachman, Donald R. Schwartz, Kathleen R. Cho and David M. Lubman. **Comprehensive proteome analysis of ovarian cancers using liquid phase separation, mass mapping and tandem mass spectrometry: A strategy for identification of candidate cancer biomarkers** *Proteomics* 2004, 4, 2476–2495, DOI 10.1002/pmic.200300763.
159. Dong Hyeon Lee, Kwanghoe Chung, Ji-Ae Song, Tae-heon Kim, Haeyoun Kang, Jin Hyong Huh, Sang-geun Jung, Jung Jae Ko, and Hee Jung An. **Proteomic Identification of Paclitaxel-Resistance Associated hnRNP A2 and GDI 2 Proteins in Human Ovarian Cancer Cells.** *Journal of Proteome Research* 2010, 9, 5668–5676
160. Atsushi Enomoto, Jiang Ping, and Masahide Takahashi. **Girdin, a Novel Actin-Binding Protein, and Its Family of Proteins Possess Versatile Functions in the Akt and Wnt Signaling Pathways.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1086: 169–184 (2006). doi: 10.1196/annals.1377.016
161. Tomoya Kitamura et al., **Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/ PKB substrate Girdin.** *Nature Cell Biology* volume 10, number 3, Marzo 2008, Doi: 10.1038/ncb1695
162. Jiang P, et al., **An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells.** *Cancer Res* 2008; 68: 1310-1318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5111
163. Suresh Mishra, Sudharsana R. Ande, and B. L. Grégoire Nyomba . **The role of prohibitin in cell signaling.** *FEBS Journal* 277 (2010) 3937–3946. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07809.x
164. B Booth Quimby and Mary Dasso. **The small GTPase Ran: interpreting the signs B Booth Quimby and Mary Dasso.** *Current Opinion in Cell Biology* 2003, 15:338–344.
165. Atanas Kamburov, Ralf Herwig, et. al. **ConsensusPathDB—a database for integrating human functional interaction networks.** *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue):D623-D628
166. Y Wu, Y Fan, B Xue, L Luo, J Shen, S Zhang, Y Jiang and Z Yin. **Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals.** 2006 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/06 *Oncogene* (2006) 25, 5787–5800
167. Mileo AM, Abbruzzese C, Mattarocci S, Bellacchio E, Pisano P, et al. (2009) **Human Papillomavirus-16 E7 Interacts with Glutathione S-Transferase P1 and Enhances Its Role in Cell Survival.** *PLoS ONE* 4(10): e7254. doi:10.1371/journal.pone.0007254

# Apéndice A: Información extra

## Tipos de tumores

La mayoría de los tumores humanos provienen de tejidos epiteliales. Un epitelio está formado por una o más capas de células que se recubren las paredes de las cavidades, órganos, conductos y la piel, estas células sirven como barrera al exterior y constituyen mucosas y glándulas, también forman el parénquima de muchos órganos como el hígado. Algo común en los epitelios es que están sujetos a la laminilla basal (también llamada membrana basal); la cual separa las células epiteliales del tejido conectivo de sostén, llamado estroma. La laminilla basal es una matriz especializada formada principalmente por proteínas fibrosas (elastina, fibronectina, colágeno), aminoglucanos y proteoglucanos. Es vital en la adhesión celular e influye en la diferenciación celular [2].

Aquellos tumores que derivan de epitelios se les denomina carcinomas, la mayoría de los carcinomas pueden ser clasificados en dos de las mayores categorías asociadas a su función biológica original. Los tumores que surgen de los epitelios encargados del recubrimiento de protección se les llaman **carcinomas escamosos**, mientras que aquellos tumores que derivan de epitelios especializados en la secreción de alguna sustancia en los ductos o cavidades que recubren, son denominados **adenocarcinomas** [2].

Los tumores malignos que surgen de tejidos no epiteliales se clasifican según su origen. Los **sarcomas** provienen de tejidos conectivos derivados del mesodermo del embrión (hueso, cartílago, grasa, músculos y vasos sanguíneos entre otros). El segundo grupo de tumores no epiteliales provienen de tejidos **hematopoyéticos**. Por último tenemos al grupo de tumores que provienen de células del sistema nervioso central y periférico, nombrados **neuro-ectodermales** (tabla 20) [2].

Tabla 10. Origen y clasificación de los distintos tipos de cáncer.

Origen	Tejido del que derivan	Clasificación	Tejidos de incidencia
Epitelial*	Epitelial de recubrimiento	Carcinoma	Cérvix, esófago, piel, laringe
	Epitelial de secreción	Adenocarcinoma	Colon, mama, páncreas, endometrio
	Tejido conectivo	Sarcoma	Hueso, fibroblastos, endotelios
No epitelial	Células hematopoyéticas	Hematopoyético	Eritrocitos, linfocitos
	Células neurales	Neuro-ectodermal	Astroцитos, glías, neuronas

\*Los tumores epiteliales son responsables de más del 80% de los casos de muerte asociada a cáncer [29].

## Receptores extracelulares de vías de señalización celular

Las **proteínas G acopladas a receptores (PGAR)** son una familia de proteínas transmembranales integrales las cuales están acopladas a proteínas heterotriméricas G que consisten en las

subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$ ,  $G\gamma$ . La transducción de señales de PGAR inicia con una proteína G inactiva acoplada a su receptor, y una vez que la PGAR se une con un ligando, una molécula de GTP se une y provoca la disociación de la subunidad  $G\alpha$ , esta disociación expone sitios en las subunidades que pueden interactuar con otras moléculas. La proteína G disociada, inicia la señalización de varios efectores como fosfolipasas y canales iónicos, los cuales permiten la liberación de segundos mensajeros. La fuerza de amplificación total de la señalización es determinada por el periodo en el cual el ligado interactúa con su receptor y el complejo receptor-efector.

**Los receptores tirosina (RTC)** son proteínas transmembranales con un dominio intracelular cinasa y un dominio extracelular de unión a ligando. En los cuales la transducción de señales, por medio de RTC, necesitan formar dímeros en las membranas citoplasmática; este dímero es estabilizado por la unión de ligando al receptor. La interacción entre los dominios citoplasmáticos estimula la autofosforilación de las tirosinas dentro de los dominios de las RTC, lo que causa cambios conformacionales. Los dominios receptores de cinasas son subsecuentemente activados y se inicia la cascada de señalización por fosforilación que pueden facilitar la activación de varios procesos celulares como diferenciación celular y metabolismo.

**Las cinasas específicas de histidina (CH)**, son proteínas transmembranales de dos dominios que esencialmente trabajan transfiriendo un grupo fosfato de un ATP a un residuo de histidina dentro de una cinasa, luego transferido a un residuo de aspartato, en el dominio aceptor, lo que activa el residuo aspartato para la señalización.

**Receptores de tipo Toll (TLR)** son proteínas fundamentales en la respuesta del sistema inmune innato. Son proteínas que funcionan en forma de homodímeros. Los TLR, pueden depender también de correceptores para mostrar la máxima sensibilidad al ligando. Los TLRs no tienen dominios catalíticos y llevan a cabo la transducción de señales por medio de proteínas cinasas adaptadoras que median la señalización de los TLRs. Se han identificado cuatro moléculas adaptadoras que están involucradas en la señalización. Estas proteínas son conocidas como MyD88, Tirap, Trif y Tram. Estos adaptadores activan otras moléculas dentro de la célula, lo que incluye ciertas proteínas cinasas (IRAK1, IRAK4, TBK1, y IKKi) lo que amplifica la señal y lleva a la transcripción de genes que están involucrados en el proceso de respuesta inflamatoria.

**Los receptores de compuertas de canales iónicos**, tienen su sitio de unión en las compuertas y después de la unión de un ligando, la conformación del canal iónico cambia para abrir el canal en la membrana celular y permitir el paso de los iones, lo cual permite la respuesta. Un ejemplo de este mecanismo, se encuentra en la sinapsis neuronal, en el cual el flujo hacia el interior de las células a través de estos canales induce un potencial de acción en la membrana, por la despolarización de las membranas de las células post-sinápticas, los canales vuelven a ser abiertos.

# Apéndice B: Protocolos

---

## Protocolo de extracción proteica para tumores

1. Se agrega de 1 a 5 mL de Coctel de inhibidores de proteasas (Roche Germany, AC), dependiendo del tamaño del tumor.
2. Se sumerge el mortero y pistilo en nitrógeno líquido X al menos 30 segundos, retirar del nitrógeno líquido.
3. Se vierte dentro del mortero nitrógeno líquido hasta cubrir un 50% de su capacidad, se sumerge el tumor en el nitrógeno líquido y con el pistilo se golpea sutilmente el tumor hasta fracturarlo y poder macerarlo hasta polvo lo más fino posible, se agrega nitrógeno líquido conforme se vaya evaporando. Se recupera muestra en un tubo de 30 a 50 mL.
4. Se sónica en hielo la muestra de 3 a 10 veces, con pulsos de 10 segundos a máxima potencia, dejando reposar la muestra al menos 1 minuto en hielo.

*Nota: La muestra debe ser una suspensión uniforme sin grumos.*

5. Se agrega a la muestra 5 volúmenes de acetona al 100% y se deja precipitar toda la noche o al menos 2 horas a -70 °C.
6. Se centrifuga a 7,000 g X 15 minutos de 0 a 10 °C, se decanta cuidadosamente.
7. Se agrega de 5 a 15 mL de buffer de extracción (dependiendo del botón), se da vortex vigorosamente por intervalos de 15 a 30 segundos, hasta disolver por completo el botón, se deja reposar en hielo por al menos 1 minuto entre cada vortex. Una vez disuelto el botón por completo se deja incubar la muestra con el buffer de extracción por 10 a 20 minutos en hielo.
8. Se agrega 0.83 volúmenes de fenol equilibrado y se da vortex vigorosamente por intervalos de 1 minuto, dejando reposar la muestra por 1 minuto en hielo, hasta cumplir 30 minutos (la muestra no debe calentarse por ningún motivo).
9. Se centrifuga a 7,000 g X 15 minutos con una temperatura de 5 a 15 °C, se recupera la fase fenólica en un tubo nuevo, sin arrastrar buffer de extracción.
  - a. Si el buffer de extracción del lavado, se encuentra muy turbio, se repiten los pasos 7 a 9, recolectando el fenol en un solo tubo.
  - b. Bucle de extracción: Tanto la fase fenólica como el buffer de extracción deben de ser prácticamente translucidos, sino es así se lava el fenol con buffer de extracción.
10. Se agregan 5 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol, se deja precipitar toda la noche o al menos 2 horas a -70 °C.
11. Se centrifuga a 7,000 g X 15 minutos de 0 a 4 °C, se decanta cuidadosamente.
12. Se agrega de 5 a 10 mL de acetato de amonio 0.1 M en metanol dependiendo del botón, se da vortex vigorosamente por intervalos de 15 a 30 segundos y se deja reposar por al menos 1 minuto en hielo, hasta disolver completamente el botón. Una vez disuelto completamente el botón, se incuba a -70 °C de 10 a 15 minutos.
  - a. Se repiten pasos 11 y 12 hasta eliminar todos los residuos de fenol

- b. Cada lavado n + 1, se agregan 0.7 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol del lavado n.
13. Se centrifuga a 7,000 g X 15 minutos de 0 a 4 °C, se decanta cuidadosamente.
14. Se agrega de 15 a 30 mL de acetona al 80%, se da vortex vigorosamente por intervalos de 15 a 30 segundos dejando reposar por al menos 1 minuto en hielo, hasta disolver completamente el botón. Una vez disuelto completamente el botón, incubar a -70 °C de 10 a 15 minutos.
- a. Se repiten los pasos 13 y 14 hasta eliminar todos los residuos de acetato de amonio 0.1 M en metanol (no se recomienda más de 4 lavados).
- b. Cada lavado n + 1, agregar 0.7 volúmenes de acetona al 80% del lavado n.
15. Se centrifuga a 7,000 g X 15 minutos de 0 a 4 °C, se decanta cuidadosamente.
16. Con 1 a 3 mL de acetona al 80%, se recupera cuidadosamente toda la muestra y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
17. Se centrifuga a 13.4 rpm X 10 minutos, se decanta acetona.
18. Se deja evaporar la acetona X 30 minutos en hielo (destapar tubo).
19. La pastilla se seco en Speed-Vac por un minuto
20. Se agrega de 50 µL a 1.4 mL de buffer de solubilización.
21. Se cuantifica por método de Bradford ácido.

## Soluciones

### Buffer de extracción (200 mL)

Conc. Final	Reactivo	Cantidad/200ml
0.7 M	Sacarosa	47.922 g
0.5 M	Tris-Base	12.11 g
0.1 M	KCl	1.4 g
30 mM	HCl (12 N)	0.48 mL
50 mM	EDTA (292.24 g/mol)	2.9224 g
2% v/v	B-Mercaptoetanol	4 mL
12 mg/mL	PVPP	2.4 g

### Buffer de solubilización.

Conc. Final	Reactivo	Cantidad/5ml
7 M	Urea RT	2.1033 g
2 M	Thiourea RT	0.761 g
4%	CHAPS	0.2 g
2 mM	TBP	0.05 mL
2%	Anfolinas 3-10pH	0.1 mL
60 mM	DTT	0.04627 g

\* Cuando esté listo filtrar con filtro de 0.45 µm y almacenar a -70°C.

## **Protocolo de cuantificación por Bradford ácido.**

1. Acidificar 4  $\mu\text{L}$  de muestra con 36  $\mu\text{L}$  de HCl 0.12 N y dejar reposar por 10 minutos.
2. Agregar 1.4 mL de solución de Bradford.
3. Vortexear por 30 segundos
4. Cuantificar absorbancia a 595 nm.
5. Interpolar valores de absorbancia para estimar la concentración de la muestra

## **Soluciones**

### **Solución de Bradford:**

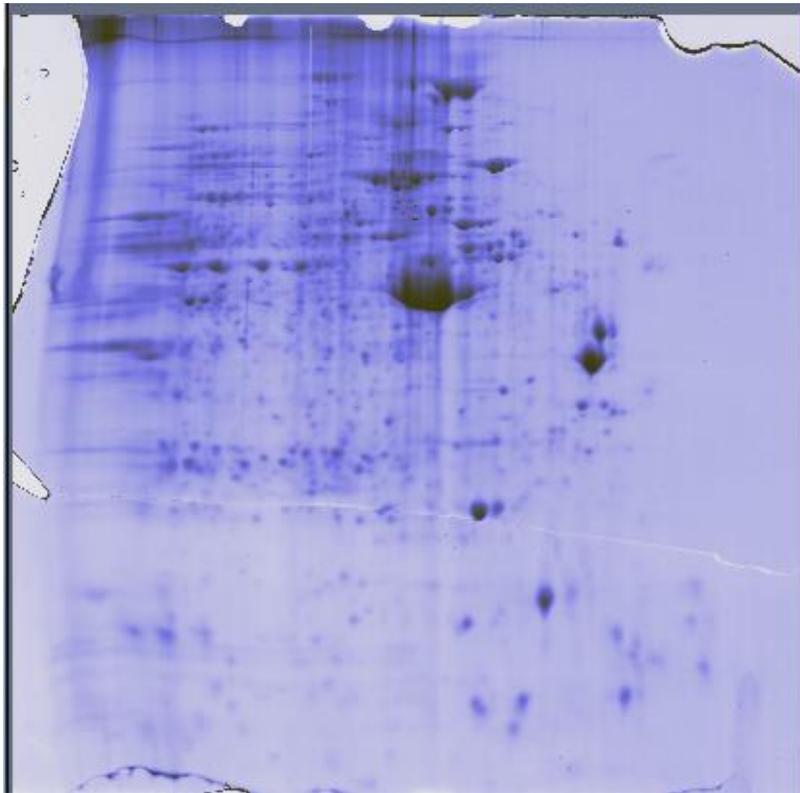
1. Diluir Bradford Dye (Bio-Rad, AC) en agua MiliQ con una razón de 1:3.
2. Filtrar con papel Watman.
3. HCl 0.12 N

En un tubo eppendorf agregar 990  $\mu\text{L}$  de Agua MiliQ y 10  $\mu\text{L}$  de HCl 12 N

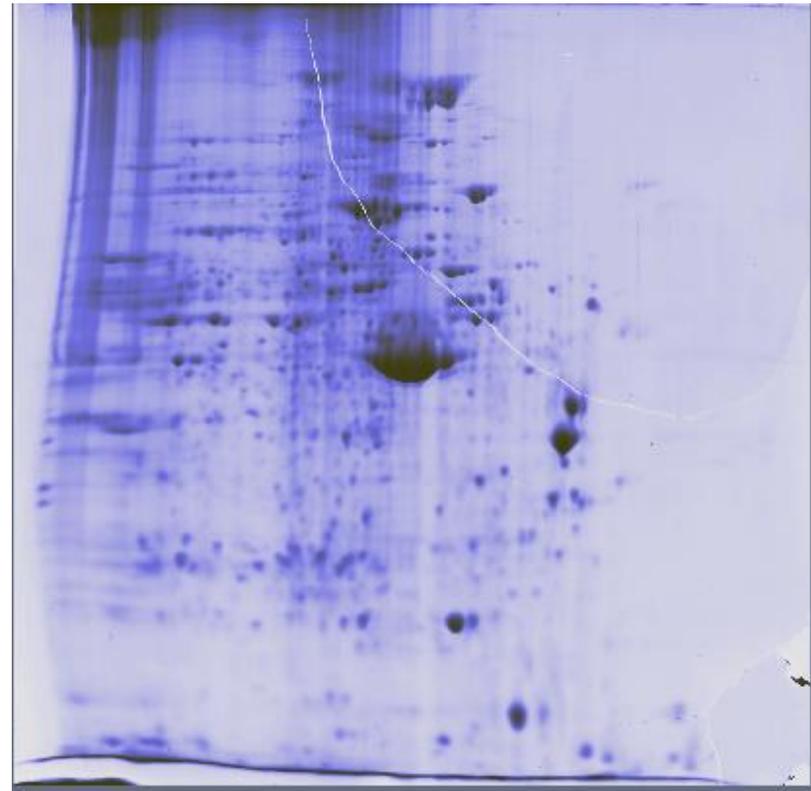
# Apéndice C: Geles

---

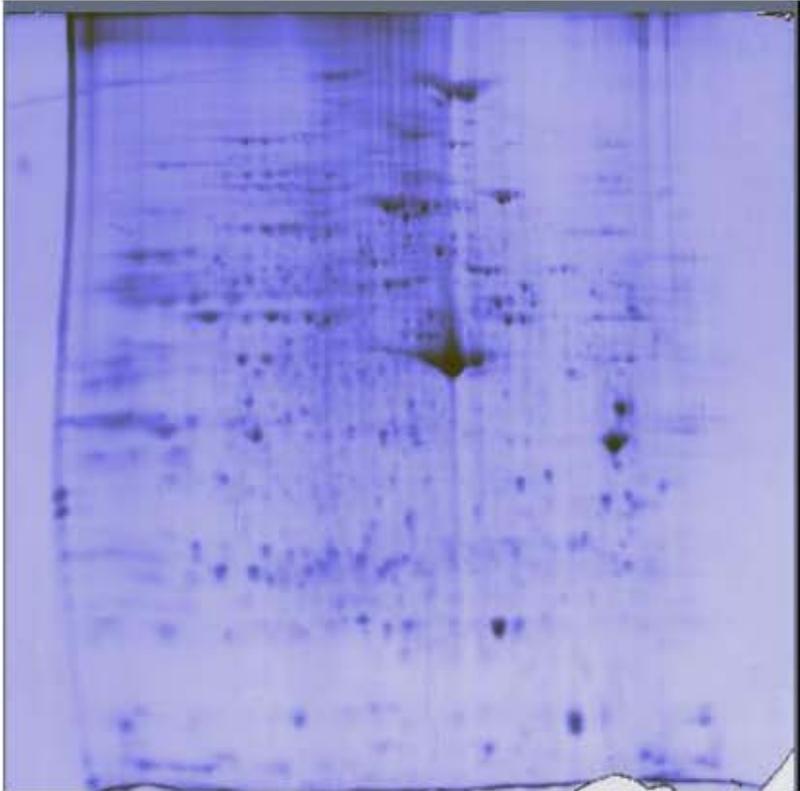
Tumor HeLa T30 replica experimental 1



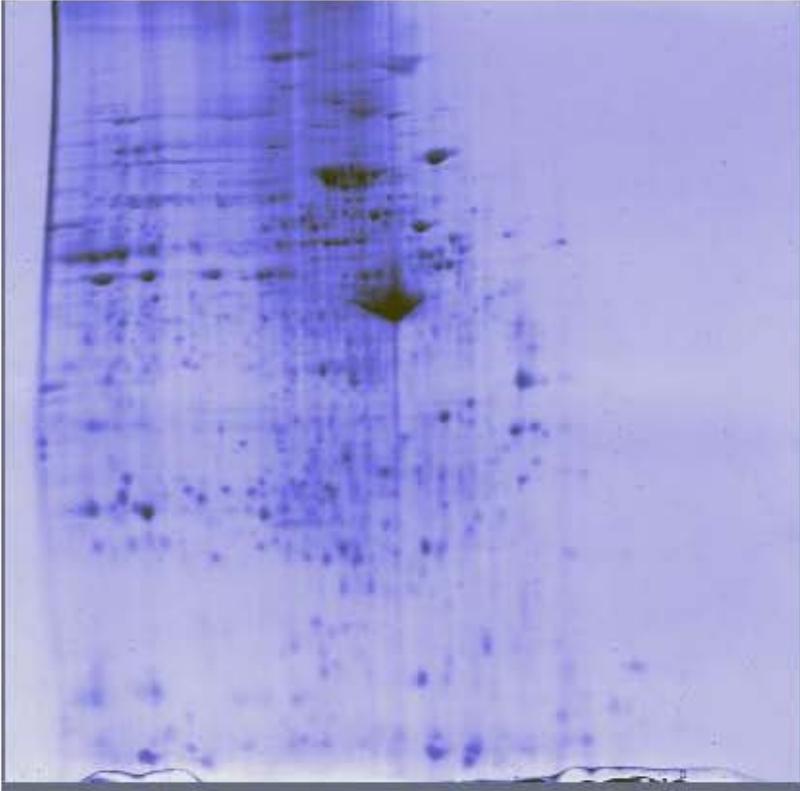
Tumor HeLa T30 replica experimental 2



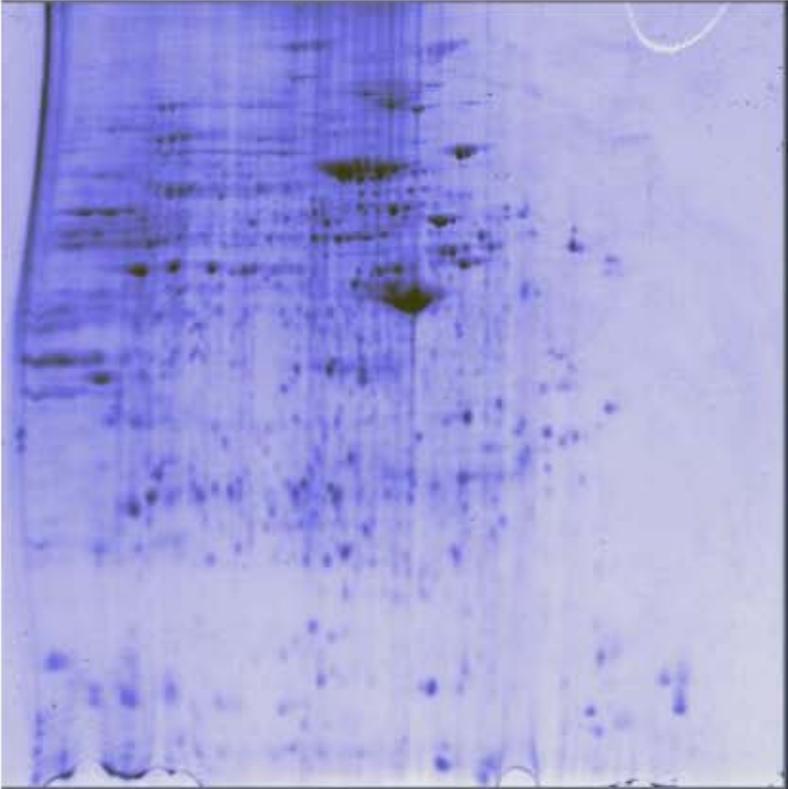
Tumor HeLa T30 replica experimental 3



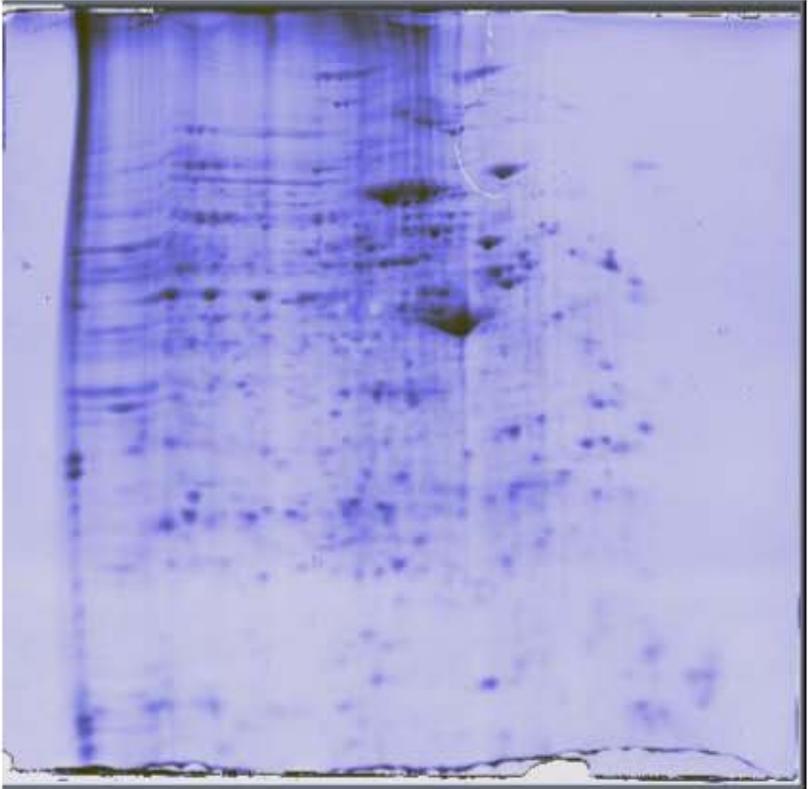
Tumor HeLa T45 replica experimental 1



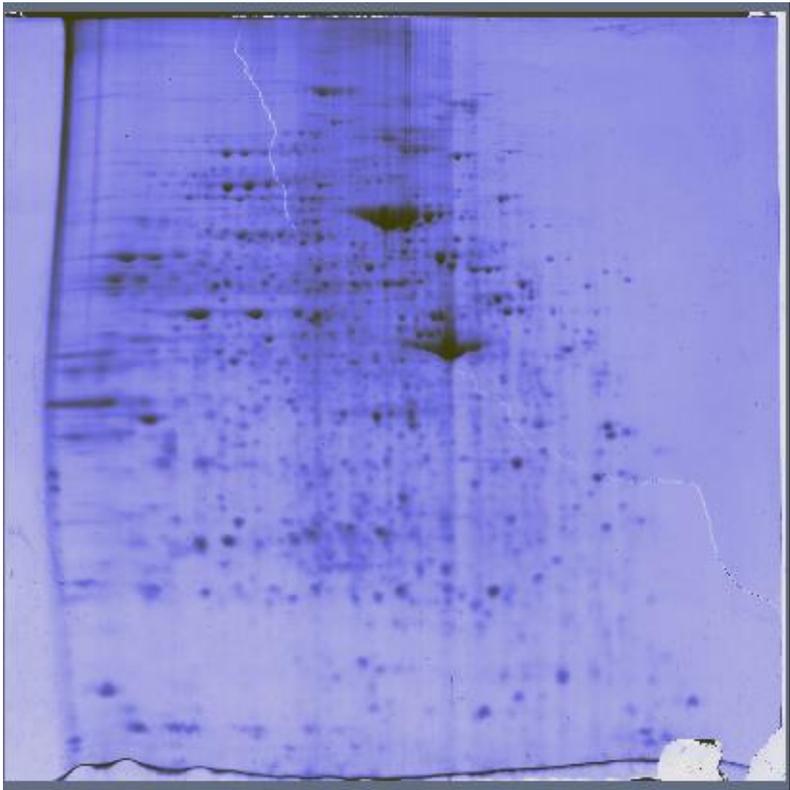
Tumor HeLa T45 replica experimental 2



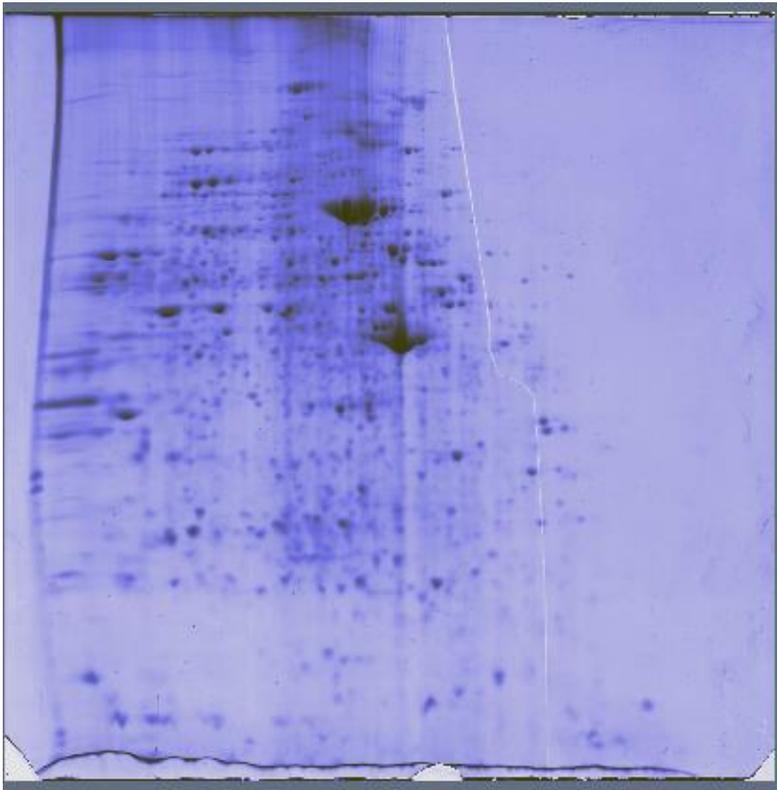
Tumor HeLa T45 replica experimental 3



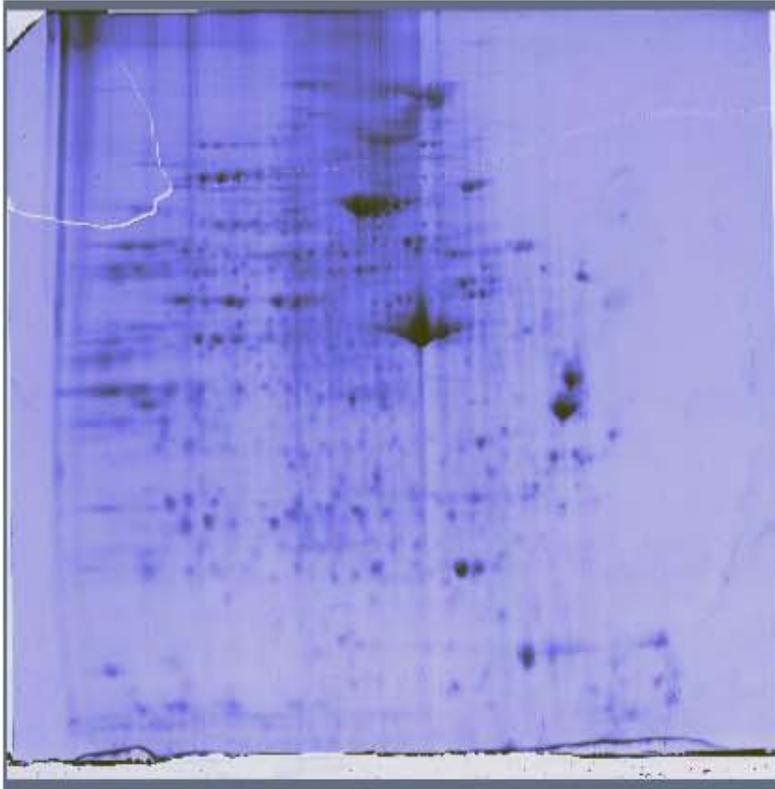
Tumor HeLa T50 replica experimental 1



Tumor HeLa T50 replica experimental 2



Tumor HeLa T50 replica experimental 3



Gel Maestro HeLa

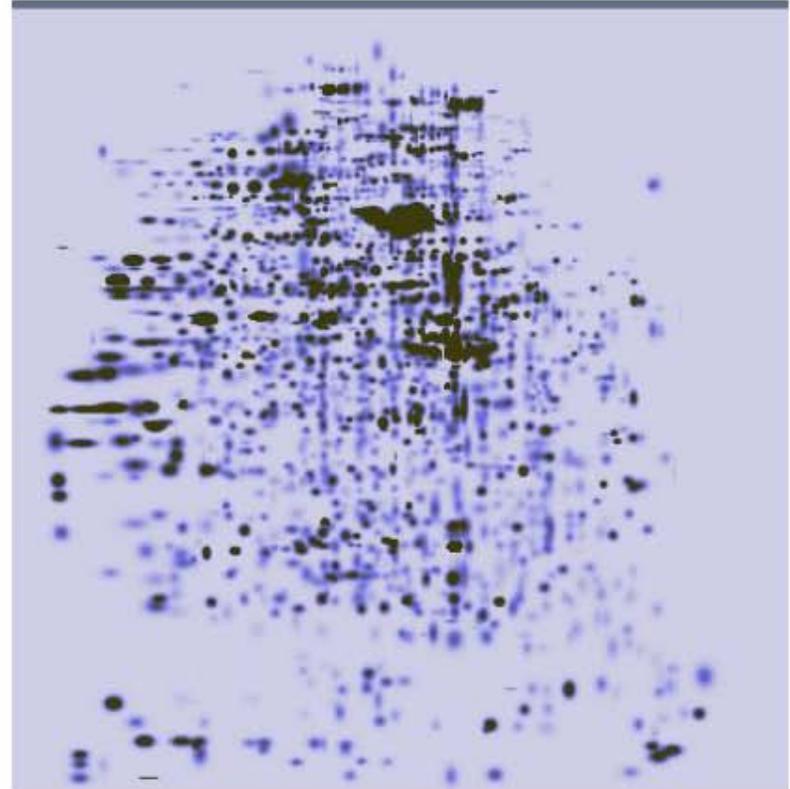
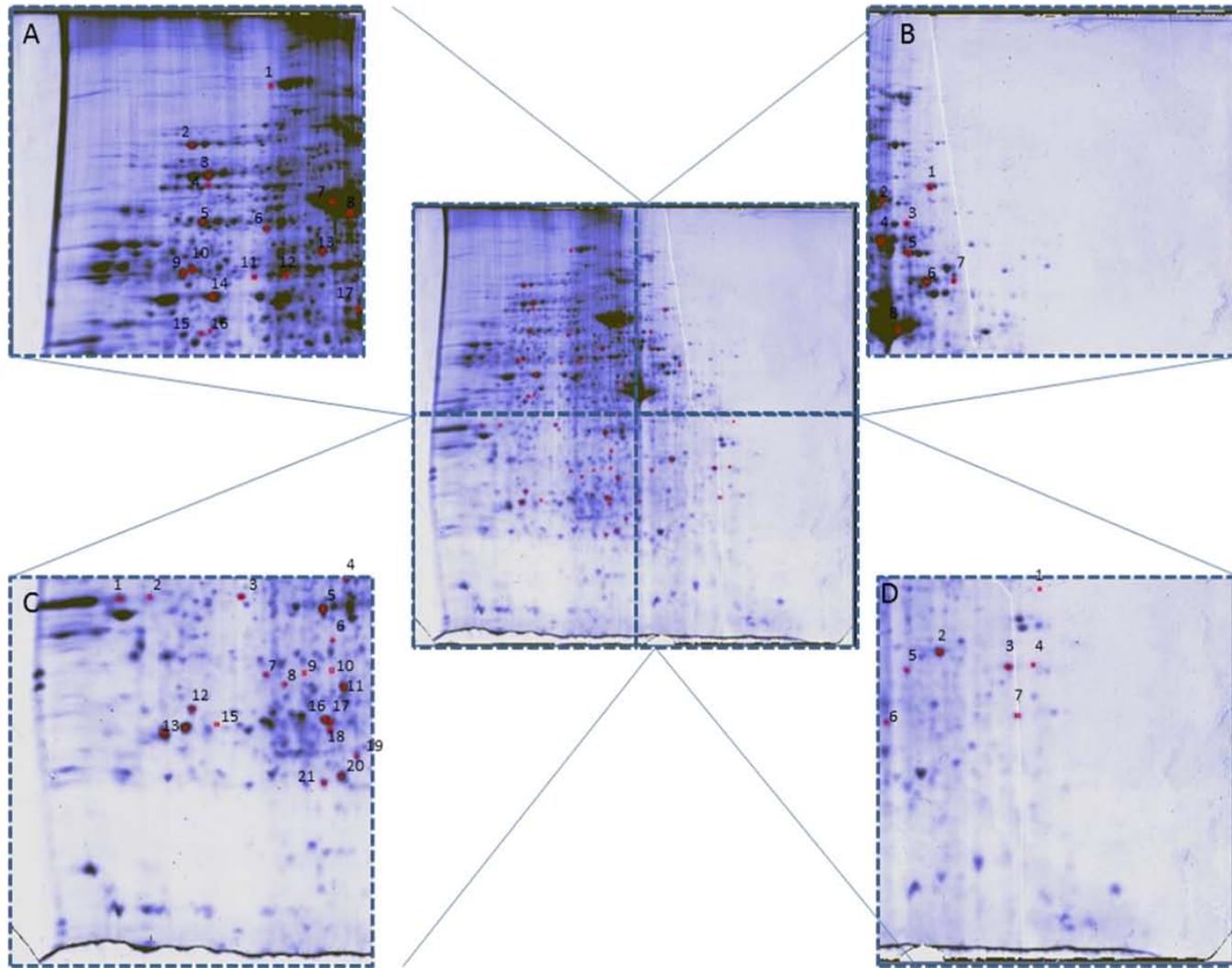
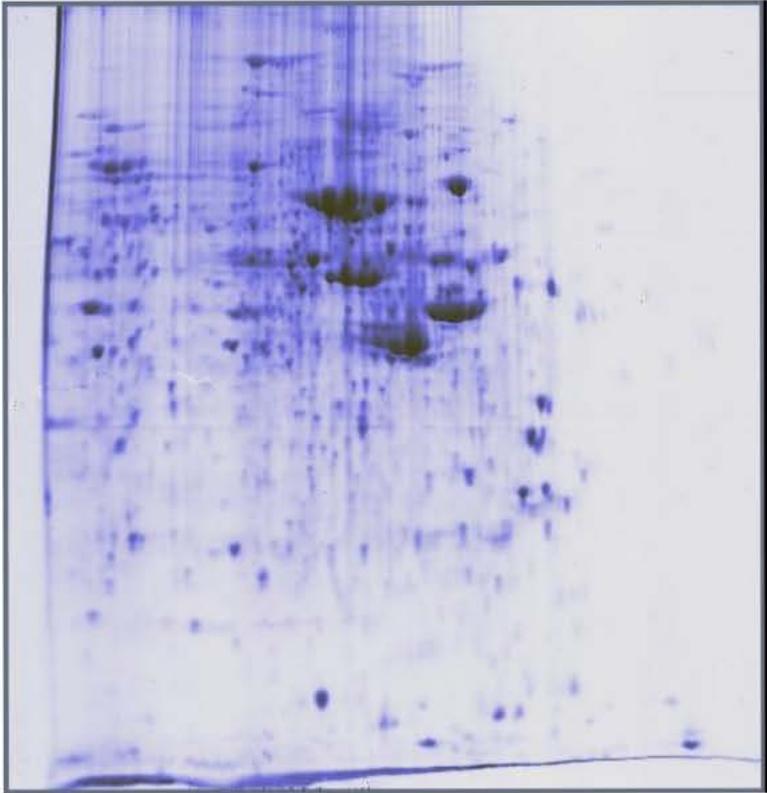


Figura 48. Proteínas identificadas y su posición en gel 2-D HeLa.

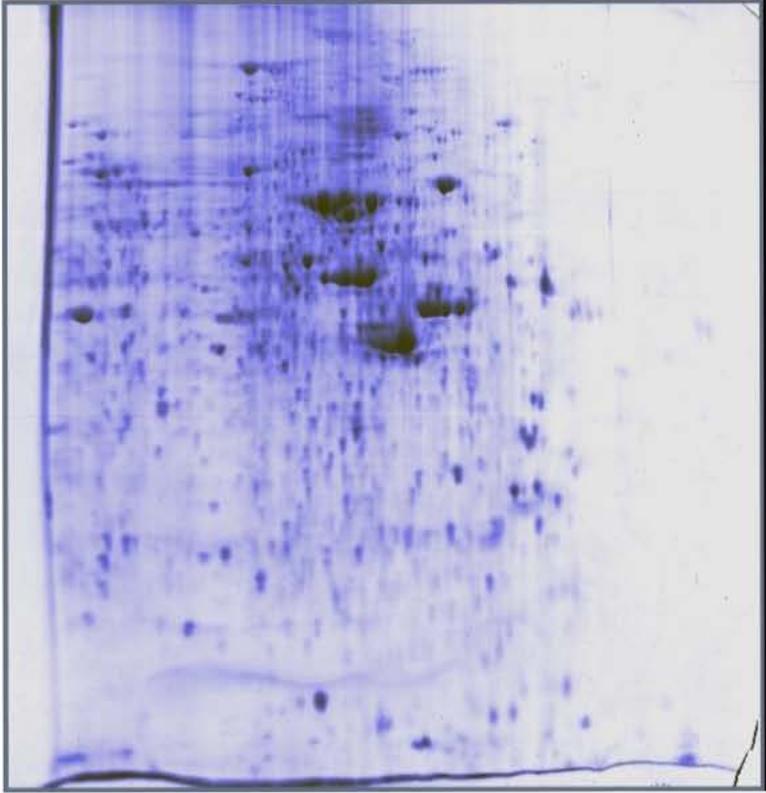


A	B	C	D
1 CO6A2_MOUSE	GRP78_HUMAN	G3P_HUMAN	TPM2_MOUSE
2 EF2_HUMAN	HSP7C_HUMAN	ANXA2_HUMAN	ANXA5_HUMAN
3 TRFE_MOUSE	PKHA2_HUMAN	ANXA1_HUMAN	TPM3_HUMAN
4 DDX3X_HUMAN	CH60_HUMAN	EIF3I_HUMAN	TPM4_HUMAN
5 BGH3_HUMAN	VIME_HUMAN	LDHB_HUMAN	CLIC1_HUMAN
6 TCPZ_HUMAN	GRDN_HUMAN	ANXA3_HUMAN	GSTM3_HUMAN
7 ALBU_MOUSE	ACTS_HUMAN	PSA1_HUMAN	PSA5_HUMAN
8 HSP71_HUMAN	TPIS_HUMAN	GSTO1_HUMAN	
9 DHE3_HUMAN		CP21A_HUMAN	
10 FSCN1_HUMAN		PNPH_MOUSE	
11 RUVA_HUMAN		PHB_HUMAN	
12 GDIB_HUMAN		PGAM1_HUMAN	
13 PDIA3_HUMAN		RAN_HUMAN	
14 ENOA_HUMAN		TPIS_HUMAN	
15 KCRM_MOUSE		TPIS_MOUSE	
16 IDE_MOUSE		HSPB1_HUMAN	
17 IF4A1_HUMAN		PRDX4_HUMAN	
18		PSB4_HUMAN	
19		APOA1_MOUSE	
20		PRDX2_HUMAN	
21		FRIL1_MOUSE	

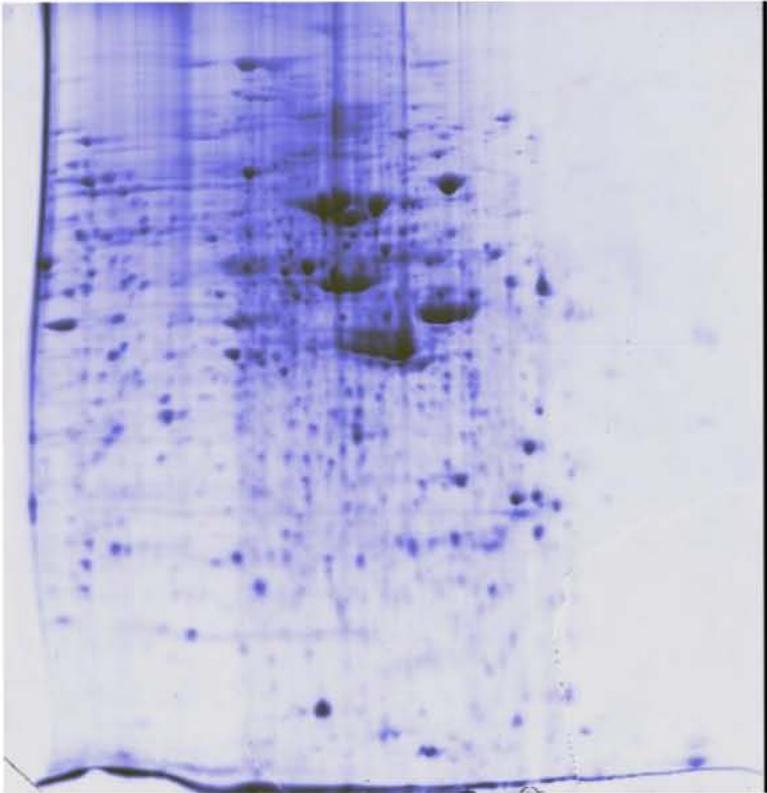
Tumor SiHa T30 replica experimental 1



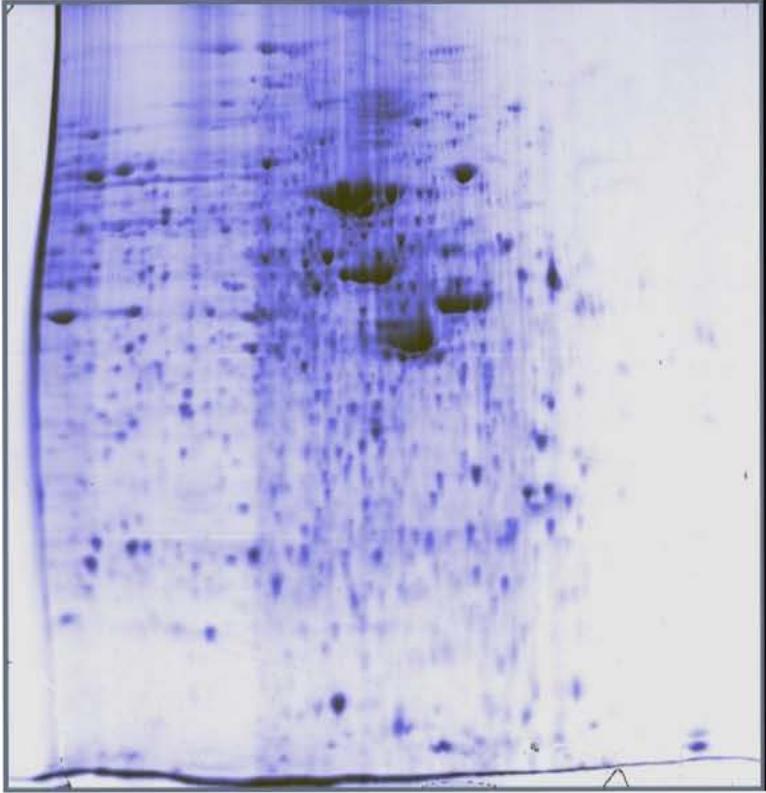
Tumor SiHa T30 replica experimental 2



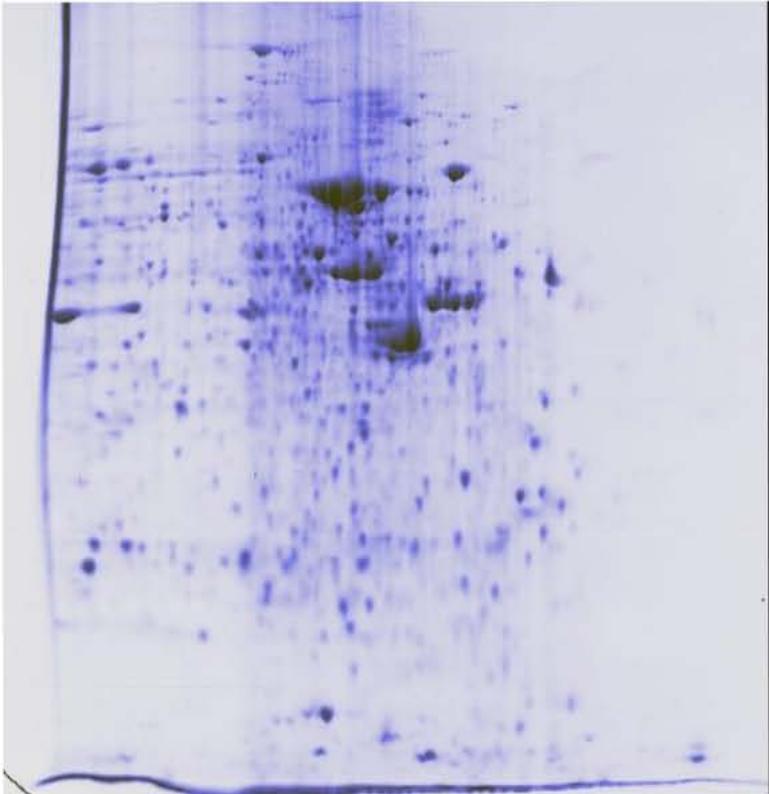
Tumor SiHa T30 replica experimental 3



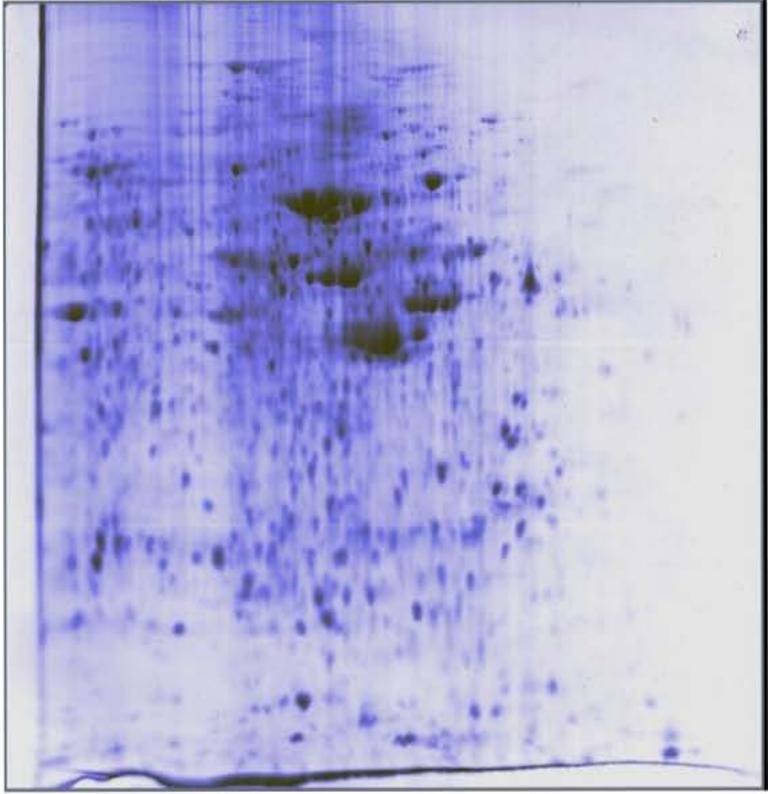
Tumor SiHa T45 replica experimental 1



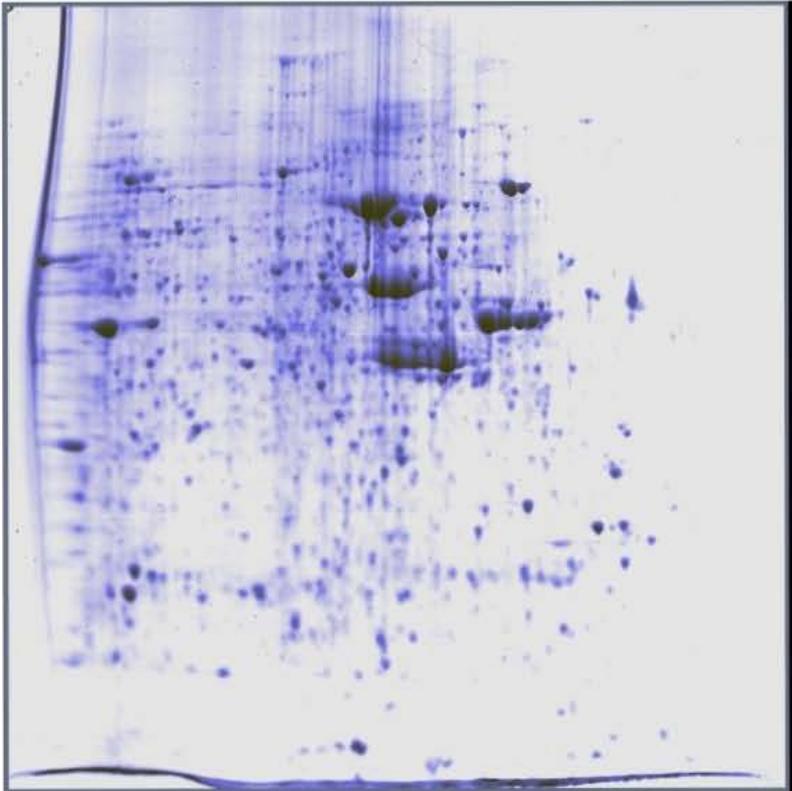
Tumor SiHa T45 replica experimental 2



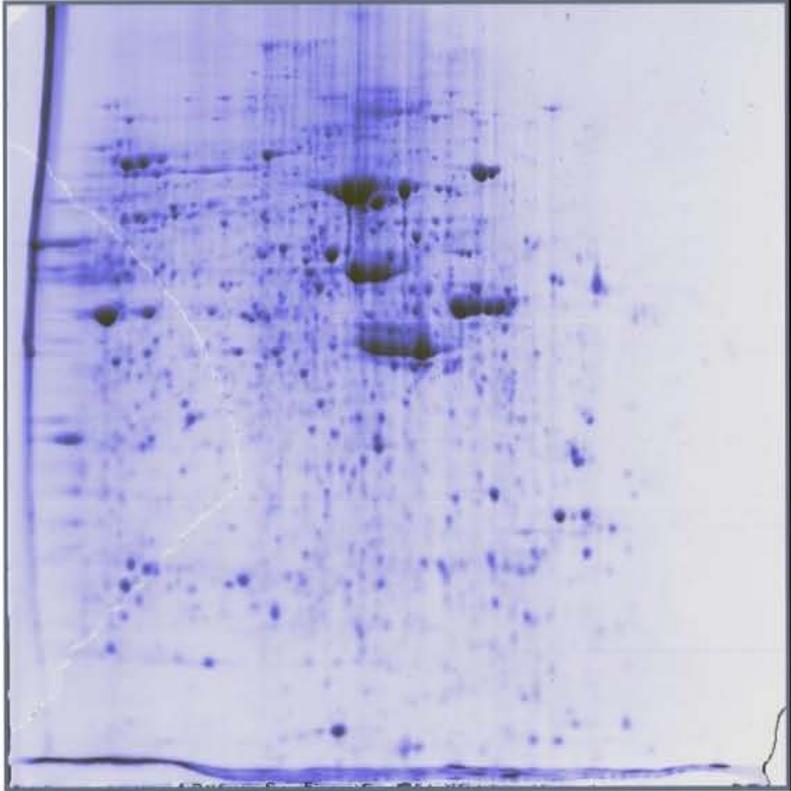
Tumor SiHa T45 replica experimental 3



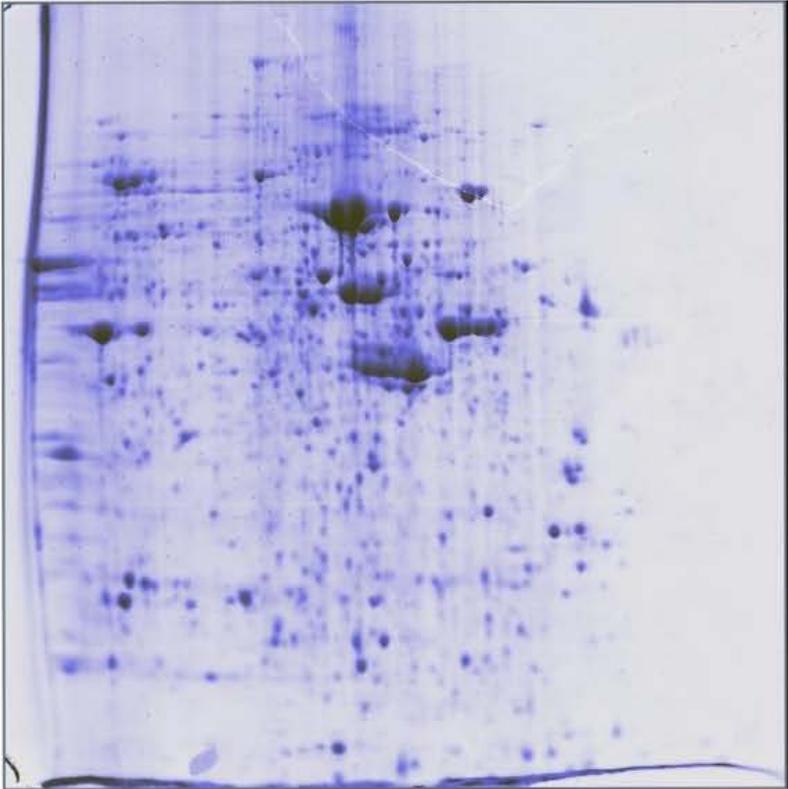
Tumor SiHa T50 replica experimental 1



Tumor SiHa T50 replica experimental 2



Tumor SiHa T50 replica experimental 3



Gel Maestro SiHa

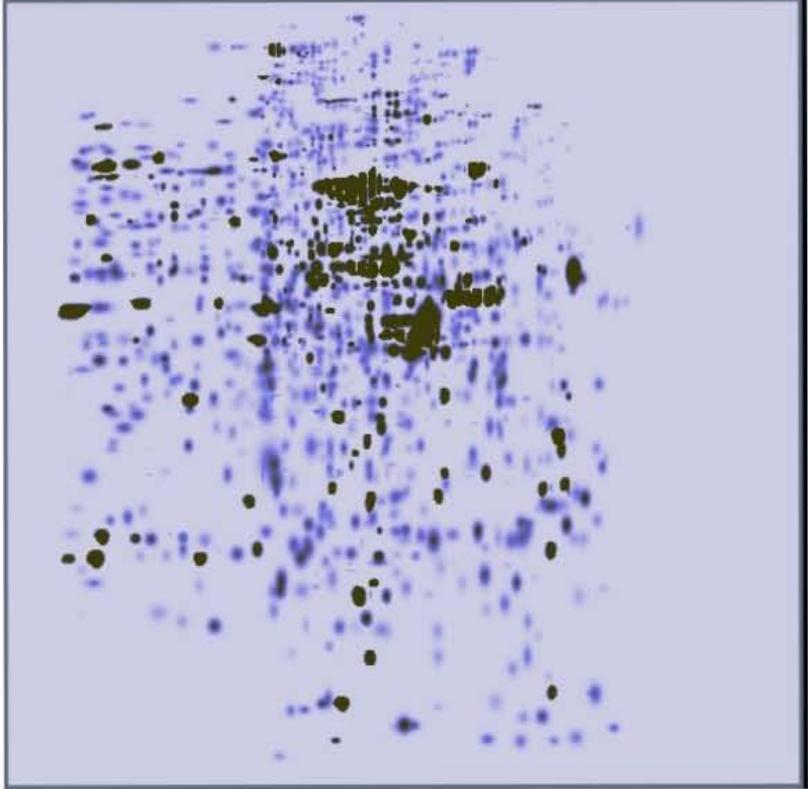
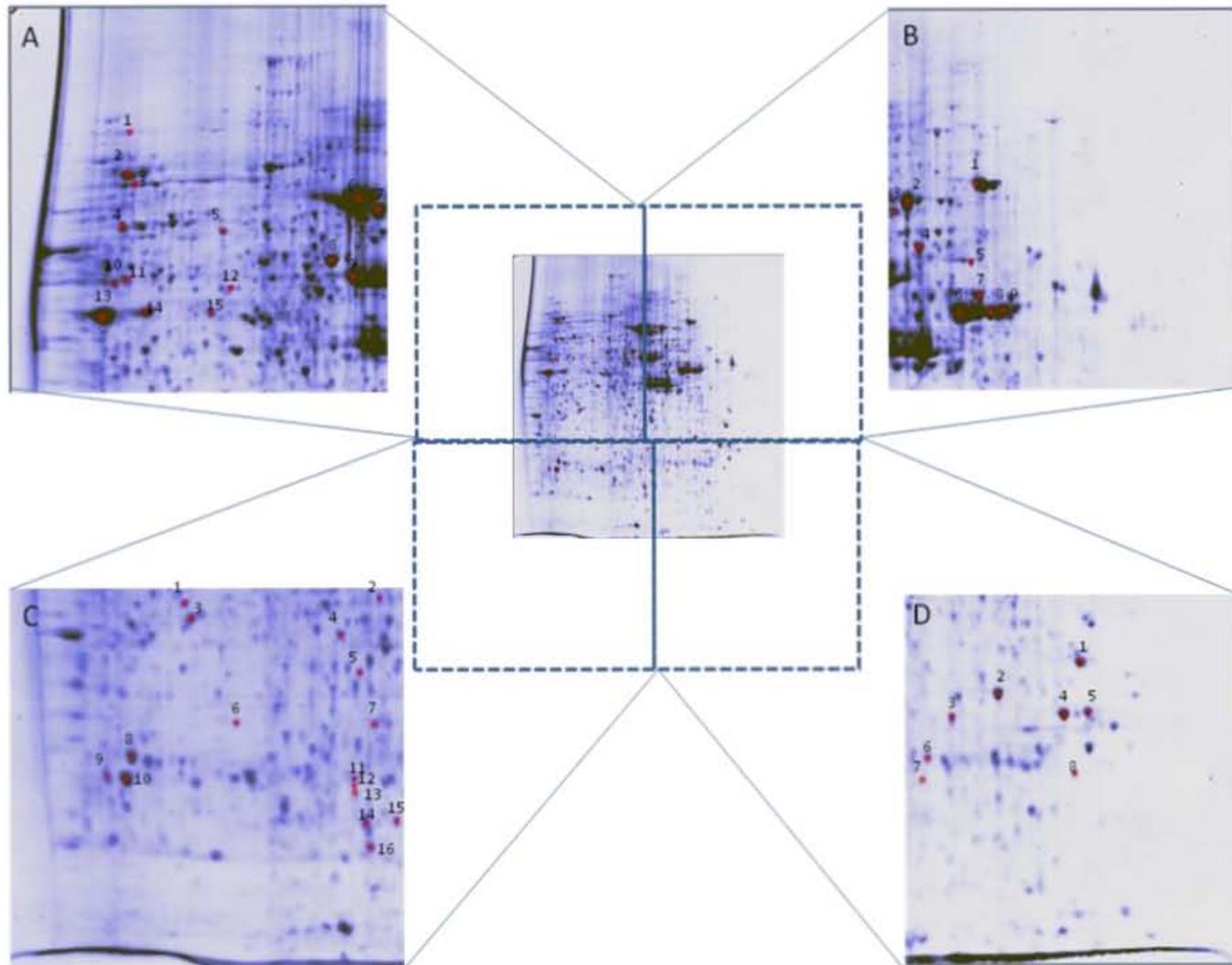


Figura 49. Proteínas identificadas y su posición en gel 2-D SiHa.



A	B	C	D
1 EF2_HUMAN	GRP78_HUMAN	HNRH3_HUMAN	PCNA_HUMAN
2 TREF_MOUSE	HSP7C_HUMAN	EIF3I_HUMAN	ANXA5_HUMAN
3 DDX3X_HUMAN	GRP75_HUMAN	ANXA1_HUMAN	CLIC1_HUMAN
4 BGH3_HUMAN	CH60_HUMAN	LDHB_HUMAN	TPM3_MOUSE
5 TCPZ_HUMAN	VIME_HUMAN	ANXA3_HUMAN	TPM4_HUMAN
6 ALBU_MOUSE	K1C17	PSA1_HUMAN	ACTG_HUMAN
7 HSP71_HUMAN	ATPB_HUMAN	PHB_HUMAN	ACTB_HUMAN
8 PDIA3_HUMAN	K1C17	PGAM1_HUMAN	PSA5_HUMAN
9 K2C8_HUMAN	K1C17_HUMAN	RAN	
10 DHE3_HUMAN		TPIS_HUMAN	
11 FSCN1_HUMAN		HSPB1_HUMAN	
12 RUVB1_HUMAN		PRDX4_HUMAN	
13 ENOA_HUMAN		PSB4_HUMAN	
14 ENOA_HUMAN-2		GSTP1_HUMAN	
15 ENOA_MOUSE		APOA1_MOUSE	
16		PRDX2_HUMAN	

# Apéndice D: Proteínas identificadas

**Tabla 11. Proteínas identificadas en HeLa**

Identificador Swissprot	Puntaje MASCOT	valor-p	SSP	Media T30	DesEst T30	Media T45	DesEst T45	Media T50	DesEst T50	T30-1	T30-2	T30-3	T45-1	T45-2	T45-3	T50-1	T50-2	T50-3
ANXA1_HUMAN	134	2.10E-08	2325	1865.10	819.01	2226.47	284.47	1785.30	39.51	1583.30	1224.20	2787.80	2517.20	1948.70	2213.50	1825.20	1746.20	1784.50
ANXA3_HUMAN	148	1.00E-10	5222	1776.40	678.02	2754.67	669.96	2323.10	255.28	1430.60	1341.00	2557.60	3441.70	2719.10	2103.20	2383.30	2043.10	2542.90
ANXA5_HUMAN	65	2.10E-02	7227	3509.67	1532.51	5106.23	748.53	5059.80	1342.72	2426.30	2839.60	5263.10	5956.30	4816.60	4545.80	5806.60	5863.10	3509.70
APOA1_MOUSE	165	2.70E-11	5135	1502.53	428.83	2560.20	381.92	1972.13	395.98	1793.80	1010.10	1703.70	2186.90	2950.20	2543.50	1841.60	2416.90	1657.90
ATPB_HUMAN	126	2.00E-05	7528	4676.10	1227.22	5893.30	3038.60	6607.03	586.69	3585.7	4437.5	6005.1	2811.9	5980.8	8887.2	6985.5	6904.4	5931.2
BGH3_HUMAN	135	6.20E-07	1624	2941.37	771.91	3644.30	1054.03	4388.03	2202.49	2999.80	2141.90	3682.40	2737.00	3395.40	4800.50	5229.80	6045.50	1888.80
CH60_HUMAN	74	3.30E-03	6643	8456.13	2667.74	12558.17	1254.27	15212.77	6054.17	9991.60	5375.70	10001.10	13901.50	12355.30	11417.70	18051.90	19325.60	8260.80
CLIC1_HUMAN	80	4.80E-03	6224	2528.20	1109.72	2360.33	269.01	2022.97	320.65	2188.00	1628.40	3768.20	2425.60	2590.70	2064.70	2332.20	2044.70	1692.00
CP21A_HUMAN	67	3.70E-03	4222	1317.07	179.96	1374.17	140.96	1284.90	224.60	1121.30	1354.60	1475.30	1307.40	1536.10	1279.00	1387.70	1439.70	1027.30
DHE3_HUMAN	150	2.50E-08	1528	4476.60	3156.85	6127.20	1702.82	3780.67	1017.12	7936.30	1752.50	3741.00	8092.40	5200.30	5088.90	4244.60	4483.10	2614.30
EF2_HUMAN	178	3.90E-11	1724	2862.37	956.68	2660.07	556.69	4106.03	1962.39	2673.20	2014.40	3899.50	3245.40	2597.50	2137.30	4844.20	5592.30	1881.60
EIF3I_HUMAN	81	4.60E-03	5322	3242.80	1123.89	2258.57	81.77	2238.73	175.59	2518.30	2672.60	4537.50	2251.60	2343.60	2180.50	2391.70	2277.50	2047.00
ENOA_HUMAN	92	3.80E-05	2427	11404.97	1659.64	14828.60	712.12	15107.87	2462.03	11813.20	9579.30	12822.40	15650.50	14439.50	14395.80	15980.40	17014.80	12328.40
FRIL1_MOUSE	89	7.50E-05	4125	2632.83	1001.21	3121.37	398.20	2692.10	355.76	1873.20	2257.90	3767.40	3515.80	3128.80	2719.50	2722.30	3031.80	2322.20
FSCN1_HUMAN	126	2.00E-05	1529	2592.37	861.47	4878.50	4689.14	2408.47	839.43	2630.00	1712.70	3434.40	10287.10	2394.10	1954.30	2730.50	3039.20	1455.70
GDIB_HUMAN	83	3.40E-04	3528	1262.07	154.31	1209.37	172.58	1158.23	225.93	1440.20	1169.40	1176.60	1408.40	1118.40	1101.30	1366.60	1190.00	918.10
GRDN_HUMAN	73	3.50E-03	8529	1755.97	571.33	1883.07	148.82	1556.73	165.34	1514.40	1345.10	2408.40	1999.50	1934.30	1715.40	1505.60	1423.00	1741.60
GSTO1_HUMAN	89	6.80E-04	3224	1722.73	563.94	2172.73	61.92	1924.13	266.21	1386.50	1407.90	2373.80	2230.70	2180.00	2107.50	2215.10	1864.50	1692.80
HSP71_HUMAN	78	9.40E-04	5637	8999.17	873.77	9924.87	437.08	10809.70	1693.69	8498.20	8491.20	10008.10	9471.90	9958.60	10344.10	11597.50	11966.00	8865.60
PDIA3_HUMAN	165	1.70E-11	4627	4127.73	879.90	5911.90	1046.01	5440.57	2264.07	3271.00	5029.10	4083.10	6680.00	4720.60	6335.10	6648.40	6844.60	2828.70
PGAM1_HUMAN	73	3.50E-03	1126	2798.63	1034.33	3264.13	61.00	2478.20	575.12	2614.40	1868.80	3912.70	3194.00	3293.50	3304.90	2198.20	3139.70	2096.70
PHB_HUMAN	136	1.40E-08	5225	3560.77	1653.04	3925.70	772.73	3417.00	577.41	2451.10	2770.60	5460.60	4817.20	3447.80	3512.10	3803.90	3693.80	2753.30
PKHA2_HUMAN	66	2.30E-02	7629	1744.07	397.37	1993.90	354.65	1760.73	312.56	1771.70	1333.60	2126.90	2326.80	2034.00	1620.90	2062.50	1781.30	1438.40

PRDX2_HUMAN	75	1.90E-02	5134	3462.00	538.53	4914.57	1090.03	4166.27	642.56	2841.60	3808.90	3735.50	5920.60	5066.60	3756.50	4509.00	4564.80	3425.00
PRDX4_HUMAN	107	1.10E-05	5133	1860.23	352.63	2515.87	273.67	1868.37	397.45	1628.00	1686.70	2266.00	2302.10	2824.30	2421.20	2159.70	2029.80	1415.60
PSA1_HUMAN	73	2.10E-02	3225	2592.90	1508.84	2207.73	664.57	2167.87	264.93	1370.70	2128.70	4279.30	1969.40	2958.60	1695.20	1887.00	2203.30	2413.30
PSA5_HUMAN	81	4.00E-03	8144	2322.70	1322.27	2340.57	241.26	1926.60	370.91	1473.70	1648.20	3846.20	2364.10	2569.20	2088.40	2272.90	1971.70	1535.20
PSB4_HUMAN	85	1.80E-03	4129	1923.63	1161.28	1903.17	307.79	1294.60	379.35	717.30	2019.70	3033.90	1609.30	2223.20	1877.00	1644.60	1347.70	891.50
RAN	73	2.60E-02	1125	5142.33	2118.80	6325.80	1256.09	5832.33	987.68	3898.5	3939.7	7588.8	5346.5	7742	5888.9	5780.3	6845	4871.7
RUVB1_HUMAN	85	1.80E-03	2531	947.33	620.20	1278.13	125.26	938.20	206.27	642.10	538.90	1661.00	1420.80	1186.20	1227.40	1097.50	1011.90	705.20
TCPZ_HUMAN	109	8.20E-07	3634	1870.30	393.10	2108.00	209.42	2570.87	841.55	1730.00	1566.60	2314.30	2322.70	1904.30	2097.00	3173.10	2930.20	1609.30
TPIS_HUMAN	102	4.10E-06	1123	6009.80	2255.02	6574.37	1320.25	6890.77	1327.15	5304.40	4191.80	8533.20	8076.00	5595.80	6051.30	6193.80	8421.20	6057.30
ACTS_HUMAN	172	4.10E-13	6431	47648.83	16413.50	36467.00	8420.39	23297.67	2882.68	61194.10	29395.90	52356.50	44564.30	37079.70	27757.00	22316.30	21033.80	26542.90
ANXA2_HUMAN	68	9.90E-03	1320	6825.27	2969.09	4791.33	2121.86	3212.50	1185.08	5838.10	4475.50	10162.20	6568.30	5363.70	2442.00	1873.40	3638.10	4126.00
CO6A2_MOUSE	103	3.30E-06	3827	2020.40	645.88	1563.03	257.99	1304.43	74.77	2055.90	1357.50	2647.80	1531.60	1835.30	1322.20	1348.00	1347.20	1218.10
DDX3X_HUMAN	104	2.60E-06	2724	1637.73	304.15	1261.77	518.41	1023.97	165.85	1742.70	1295.00	1875.50	853.40	1845.00	1086.90	958.80	900.60	1212.50
GRP78_HUMAN	189	8.20E-15	7612	6064.57	4459.72	5984.50	3058.16	1727.33	1177.12	2923.30	11169.10	4101.30	2455.60	7860.80	7637.10	1167.40	934.70	3079.90
HSPB1_HUMAN	136	1.40E-08	4127	2667.37	1320.98	2922.70	185.96	3385.33	712.24	1545.70	2333.00	4123.40	3125.30	2883.00	2759.80	3551.80	3999.60	2604.60
IF4A1_HUMAN	134	2.90E-09	5426	6004.87	948.73	2225.27	232.93	1556.17	410.79	6268.50	4952.20	6793.90	1967.60	2287.30	2420.90	1529.80	1979.50	1159.20
TPM3_HUMAN	65	2.00E-02	8248	4614.03	767.06	4343.53	1474.16	3654.07	637.68	3856.10	4596.10	5389.90	5987.90	3902.40	3140.30	4113.90	3922.20	2926.10
TPM4_HUMAN	106	1.60E-06	8247	2589.80	663.46	2162.10	799.30	1467.47	191.81	2208.20	2205.30	3355.90	2920.00	1327.00	2239.30	1502.10	1260.70	1639.60
VIME_HUMAN	171	4.30E-12	6525	9236.07	4031.27	14943.13	1489.90	3913.60	900.58	13386.00	8987.20	5335.00	15210.10	13337.80	16281.50	4163.00	4663.20	2914.60
ALBU_MOUSE	126	2.00E-05	4628	13023.43	3003.43	33365.40	2029.65	60393.50	13422.58	9936.8	13197.4	15936.1	32649.9	35655.9	31790.4	66190.1	69943.7	45046.7
G3P_HUMAN	79	8.40E-04	321	3421.77	830.03	4287.07	756.81	4925.57	343.55	2969.70	2915.90	4379.70	3494.90	4363.60	5002.70	5290.70	4608.70	4877.30
GSTM3_HUMAN	81	5.70E-04	6128	1727.23	223.80	2855.70	449.85	3221.23	429.39	1653.50	1549.60	1978.60	2464.60	3347.30	2755.20	3412.80	3521.50	2729.40
LDHB_HUMAN	106	1.40E-05	4318	2509.73	671.76	4786.73	233.60	5797.53	2034.85	1735.20	2860.40	2933.60	4538.20	4820.20	5001.80	6683.50	7239.20	3469.90
TRFE_MOUSE	73	2.60E-02	2723	2436.43	605.55	3408.50	351.76	9434.67	753.03	2336.60	1887.00	3085.70	3058.50	3405.00	3762.00	9011.00	10304.10	8988.90
HSP7C_HUMAN	134	2.60E-09	6640	4191.50	2269.37	9750.03	395.66	5466.40	341.62	5997.60	1644.20	4932.70	9296.30	10023.20	9930.60	5197.20	5351.30	5850.70
PNPH_MOUSE	109	8.20E-07	5223	1453.67	701.08	2687.53	282.09	1510.90	17.64	1203.10	912.30	2245.60	2976.10	2674.10	2412.40	1497.20	1530.80	1504.70
IDE_MOUSE	90	6.70E-05	2426	3532.53	1385.86	1723.80	126.37	2292.57	2169.44	2667.90	2798.70	5131.00	1869.70	1648.90	1652.80	1254.60	837.10	4786.00
KCRM_MOUSE	91	5.10E-05	1428	5186.13	1531.23	1372.87	204.42	3337.97	1997.90	4590.90	4041.90	6925.60	1462.10	1517.50	1139.00	2388.00	1992.30	5633.60
TPIS_MOUSE	70	7.00E-03	2121	1502.60	1130.94	2031.20		1184.97	276.89	947.80	756.20	2803.80	2031.20			1100.70	1494.20	960.00

TPM2_MOUSE	71	5.30E-03	8328	5344.93	1993.16	590.75	205.27	2332.00	2373.33	4868.60	3633.10	7533.10	735.90	445.60	653.80	4010.20
------------	----	----------	------	---------	---------	--------	--------	---------	---------	---------	---------	---------	--------	--------	--------	---------

**Tabla 12. Proteínas identificadas en SiHa**

Identificador Swissprot	Puntaje MASCOT	valor-p	Media T30	DesEst T30	Media T45	DesEst T45	Media T50	DesEst T50	T30-1	T30-2	T30-3	T45-1	T45-2	T45-3	T50-1	T50-2	T50-3
ACTS_HUMAN	122	3.70E-07	38672.87	12109.62	32128.57	4010.37	34332.97	2117.95	32621	52616	30782	28267	36273	31846	34202	36514	32284
ACTG_HUMAN	107	4.00E-07	310.43	150.73	286.43	105.63	447.00	72.42	179.70	276.30	475.30	164.50	350.20	344.60	527.60	426.00	387.40
ALBU_MOUSE	84	2.30E-04	24795.87	2156.48	32034.90	3921.21	33690.17	10813.78	25200.60	22465.70	26721.30	35999.90	31945.80	28159.00	22488.70	34512.50	44069.30
ANXA1_HUMAN	132	3.40E-08	3621.63	923.53	3057.57	419.43	3517.53	349.09	2610.90	4421.50	3832.50	2579.20	3362.30	3231.20	3613.50	3808.60	3130.50
ANXA5_HUMAN	102	4.10E-06	3587.80	654.46	4171.63	670.86	3489.53	559.67	2834.20	3915.80	4013.40	3646.20	4927.30	3941.40	3978.70	3610.70	2879.20
BGH3_HUMAN	83	3.60E-04	2273.73	515.34	1985.43	443.09	2393.33	391.71	2860.80	1896.00	2064.40	1907.00	1586.80	2462.50	2832.40	2267.90	2079.70
CH60_HUMAN	122	3.70E-07	6878.37	730.47	7829.80	1802.77	5622.30	994.25	6042.00	7201.90	7391.20	6315.40	9823.90	7350.10	6759.10	5192.80	4915.00
DHE3_HUMAN	80	7.40E-04	2640.43	522.86	1797.27	247.72	2139.90	333.64	3112.60	2730.20	2078.50	2043.30	1547.90	1800.60	2217.20	2428.10	1774.40
EF2_HUMAN	184	2.60E-14	2165.43	109.99	2250.53	568.24	1840.63	347.82	2270.10	2175.40	2050.80	2906.50	1909.10	1936.00	1465.60	1903.70	2152.60
ENOA_MOUSE	70	6.70E-03	1346.77	700.77	1798.47	366.15	2306.57	488.69	1259.20	2087.20	693.90	1800.10	1431.50	2163.80	1933.30	2859.70	2126.70
FSCN1_HUMAN	108	8.60E-06	2368.73	562.97	2136.60	681.36	3003.27	418.87	2650.60	2735.10	1720.50	2167.10	1440.50	2802.20	3317.00	3165.20	2527.60
HNRH3_HUMAN	153	2.70E-10	1827.20	273.28	1471.17	96.31	1547.50	375.96	1863.70	2080.40	1537.50	1475.00	1373.00	1565.50	1827.10	1695.30	1120.10
HSP71_HUMAN	183	2.70E-13	25594.10	3780.18	20830.23	1472.30	22524.20	3422.15	21568.70	29068.60	26145.00	22383.50	20652.10	19455.10	24469.80	24530.00	18572.80
HSP7C_HUMAN	134	2.60E-09	30144.83	2193.76	26819.93	1890.32	24420.63	4543.62	27991.50	32376.90	30066.10	25176.70	26397.30	28885.80	28174.10	25718.50	19369.30
K1C17_HUMAN	192	2.60E-10	14700.97	2712.26	13857.93	1202.35	12488.87	1254.08	15575.60	16868.00	11659.30	15123.80	13718.80	12731.20	13120.00	13302.00	11044.60
LDHB_HUMAN	111	5.20E-07	2533.37	744.36	2168.33	86.79	2046.77	331.85	2345.70	3353.60	1900.80	2071.80	2239.90	2193.30	2426.00	1904.70	1809.60
PCNA_HUMAN	114	2.60E-07	3886.47	1071.27	3254.73	217.41	2526.83	531.56	3007.70	3571.90	5079.80	3478.50	3241.40	3044.30	3065.70	2511.90	2002.90
PDIA3_HUMAN	135	1.70E-08	18853.20	1215.36	15363.17	899.16	16913.97	1991.38	19498.50	17451.30	19609.80	16249.50	15388.30	14451.70	17538.00	18518.60	14685.30
PHB_HUMAN	131	5.20E-09	2585.33	589.62	2697.03	403.67	2611.73	891.49	2135.70	3252.90	2367.40	2295.80	2692.20	3103.10	3620.60	1930.10	2284.50
PSA1_HUMAN	90	2.30E-05	1248.93	307.17	1609.87	136.03	1075.20	331.27	1068.00	1603.60	1075.20	1525.70	1766.80	1537.10	1373.70	1133.10	718.80
TPM3_MOUSE	102**	4.10E-06	4579.87	340.30	3755.13	377.57	4915.43	775.39	4504.00	4283.90	4951.70	3691.70	4160.40	3413.30	5475.30	5240.60	4030.40
TREF_MOUSE	114	2.10E-06	7975.97	3062.06	11712.00	2566.37	10234.20	3392.63	11484.00	6604.70	5839.20	14252.90	11762.20	9120.90	6337.30	11835.40	12529.90
ATPB_HUMAN	174	1.30E-12	4633.60	708.41	4806.33	780.84	2889.47	286.18	3992.10	5393.90	4514.80	4623.40	5662.40	4133.20	2979.50	3119.80	2569.10
DDX3X_HUMAN	134	2.10E-08	2101.83	487.09	1312.73	76.83	1314.57	253.17	2664.00	1835.90	1805.60	1244.60	1396.00	1297.60	1437.50	1482.80	1023.40

GRP75_HUMAN	75	2.20E-03	3316.50	562.63	3077.10	465.16	1818.20	330.00	2773.50	3896.90	3279.10	3488.60	2572.40	3170.30	1716.80	2187.00	1550.80
K1C17	176	3.30E-12	17383.87	2609.60	14693.57	1421.69	12178.77	480.77	14944.80	17071.00	20135.80	16135.20	14652.80	13292.70	12259.60	12614.00	11662.70
RUVB1_HUMAN	137	1.10E-08	1558.97	331.12	1208.17	49.26	775.37	75.42	1359.90	1941.20	1375.80	1241.60	1151.60	1231.30	820.40	817.40	688.30
TCPZ_HUMAN	158	8.60E-11	2391.67	249.60	2042.13	117.60	1279.07	76.23	2263.60	2232.10	2679.30	2050.90	2155.10	1920.40	1346.00	1295.10	1196.10
TPM4_HUMAN	106*	1.60E-06	2460.47	282.69	2057.77	366.84	1904.40	147.80	2184.70	2447.10	2749.60	2476.90	1901.30	1795.10	1797.70	2073.10	1842.40
VIME_HUMAN	147	1.30E-10	4466.83	1602.48	4439.43	610.38	1479.73	212.31	6316.50	3586.80	3497.20	4270.10	3931.60	5116.60	1407.20	1313.20	1718.80
ACTB_HUMAN	101	4.00E-06	625.20	144.37	1295.33	61.60	2354.73	323.61	616.10	773.90	485.60	1255.70	1366.30	1264.00	2691.10	2045.60	2327.50
ANXA3_HUMAN	168	8.60E-12	827.80	143.91	715.23	114.98	1149.93	28.07	676.10	844.90	962.40	847.20	636.60	661.90	1151.10	1177.40	1121.30
APOA1_MOUSE	93*	3.30E-05	909.33	262.50	1772.57	753.18	2513.83	708.91	836.00	1200.70	691.30	906.40	2273.40	2137.90	2021.10	2194.10	3326.30
CLIC1_HUMAN	83	3.60E-04	464.90	161.04	1562.10	590.45	1782.03	443.71	321.10	638.90	434.70	882.20	1946.00	1858.10	2261.50	1385.90	1698.70
EIF3I_HUMAN	99	7.50E-05	757.03	240.09	827.37	164.00	1418.23	325.82	484.30	850.30	936.50	642.40	884.70	955.00	1794.40	1224.50	1235.80
ENOA_HUMAN	81	2.10E-04	13972.77	2948.32	22504.47	2187.51	42801.30	1634.96	13067.80	17267.50	11583.00	20008.40	24087.80	23417.20	43938.90	40927.70	43537.30
ENOA_HUMA2	114	2.60E-07	2896.87	943.63	5586.13	1169.98	7411.30	1482.10	2509.10	3972.60	2208.90	5104.80	6920.00	4733.60	6101.30	7112.60	9020.00
GRP78_HUMAN	154	2.60E-11	975.83	219.27	832.73	85.12	5417.27	931.48	925.80	785.90	1215.80	739.80	906.90	851.50	4909.60	4849.90	6492.30
GSTP1_HUMAN	74	5.40E-03	1487.63	415.55	3905.73	671.05	4307.23	411.65	1019.70	1813.60	1629.60	3202.10	3976.50	4538.60	4719.00	3895.70	4307.00
HSPB1_HUMAN	108	1.00E-06	1083.77	202.00	1221.53	118.27	1885.70	100.80	1082.90	1286.20	882.20	1309.60	1267.90	1087.10	1769.40	1948.00	1939.70
K1C17	154	2.60E-11	21871.13	2239.79	17487.90	7746.82	42040.53	1149.65	23911.50	22227.30	19474.60	25771.00	16271.40	10421.30	43349.00	41192.30	41580.30
K2C8_HUMAN	172	3.40E-12	10981.20	796.29	11326.63	2281.73	29800.17	3620.02	10063.60	11389.20	11490.80	13175.20	12028.20	8776.50	30703.90	32882.70	25813.90
PGAM1_HUMAN	135*	2.10E-09	2038.97	629.36	4312.10	1948.68	5768.03	1291.59	1652.90	2765.20	1698.80	2688.80	3774.30	6473.20	6195.10	4317.00	6792.00
PRDX2_HUMAN	121	5.20E-08	1290.37	251.32	2961.93	1731.26	2852.03	905.70	1217.40	1570.10	1083.60	1205.70	3013.00	4667.10	2520.90	2158.50	3876.70
PSA5_HUMAN	96	1.20E-04	892.80	284.71	1580.50	762.59	2025.77	376.98	918.30	1163.90	596.20	708.50	2122.60	1910.40	2444.30	1712.90	1920.10
RAN	113	2.40E-07	1202.30	335.93	1745.97	819.94	2951.50	951.81	1397.40	1395.10	814.40	1392.90	1161.70	2683.30	3863.20	1964.10	3027.20
TPIS_HUMAN	81	5.00E-04	2334.50	850.53	7416.60	2611.26	8598.30	3344.19	1724.60	3306.10	1972.80	4646.00	7771.60	9832.20	10923.90	4765.80	10105.20

# Apéndice E: WesternBlots.

Figura 50. Westernblot anti-Vimentina tumores HeLa.

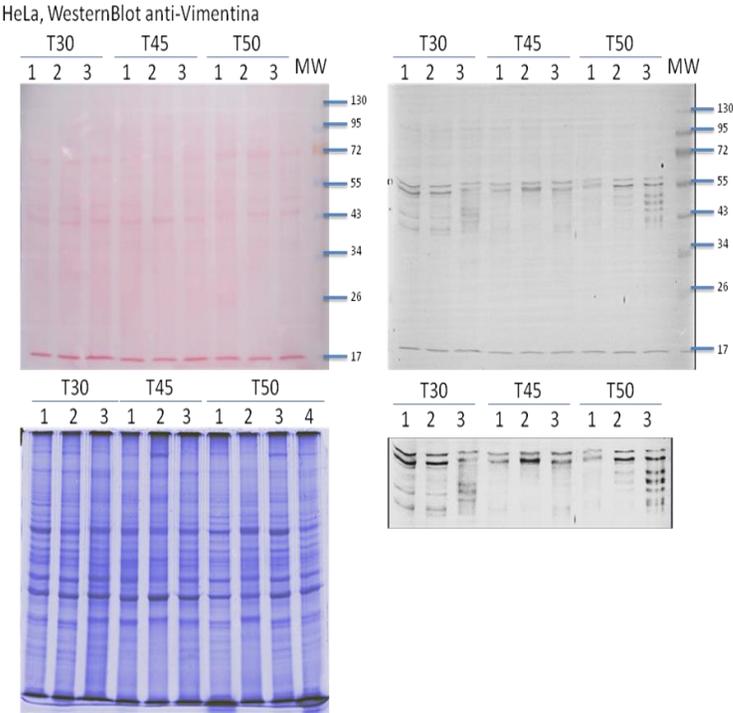


Figura 51. Westernblot anti-Vimentina tumores SiHa.

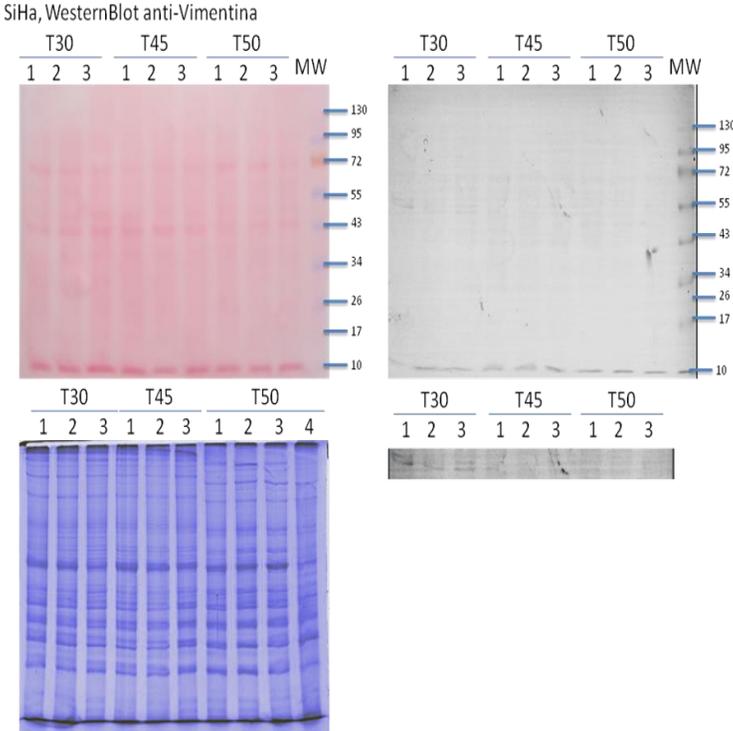


Figura 52. Westernblot anti-GSTM3 tumores HeLa.

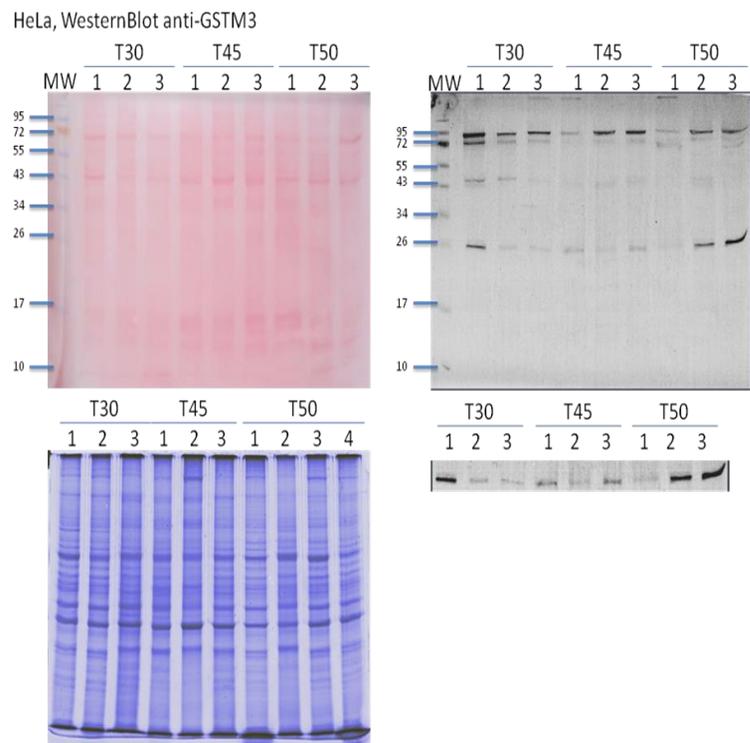


Figura 53. Westernblot anti-GSTM3 tumores SiHa.

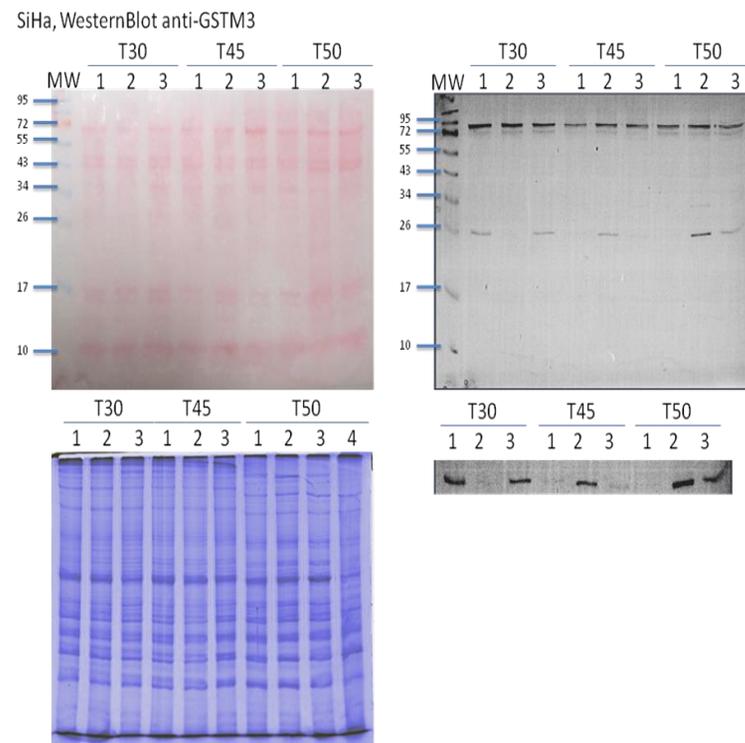


Figura 54. Westernblot anti-GSTP1 tumores HeLa.

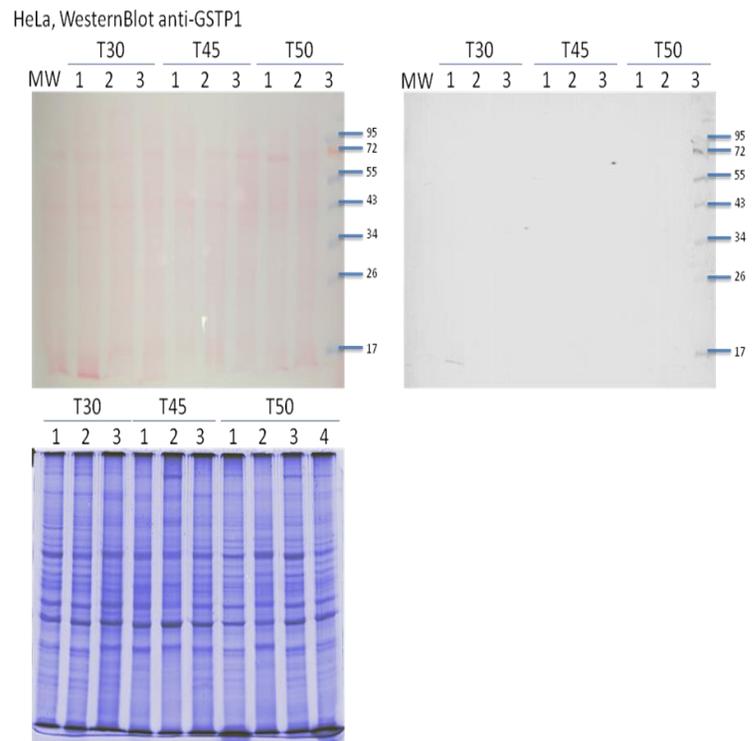


Figura 55. Westernblot anti-GSTP1 tumores SiHa.

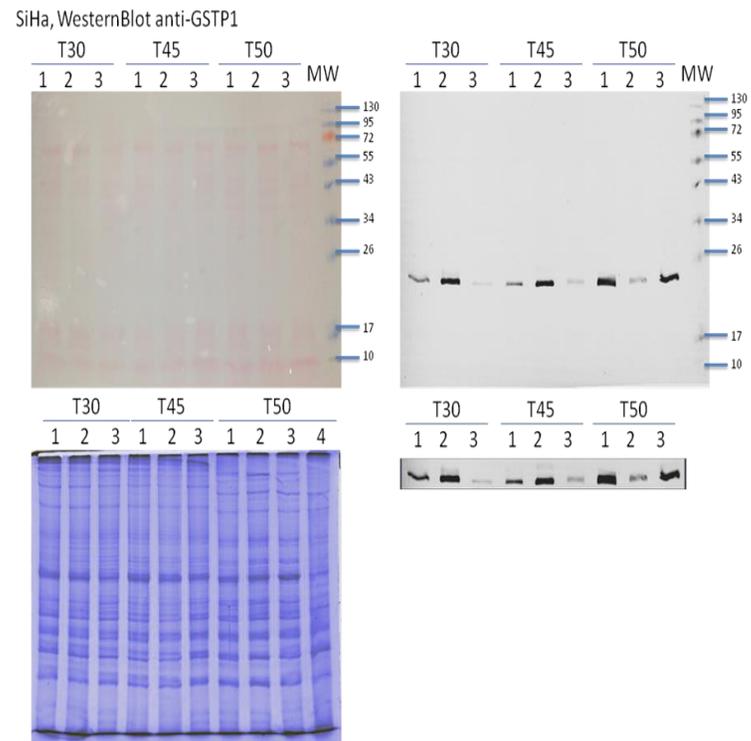


Figura 56. Westernblot anti-TRAF6 tumores HeLa.

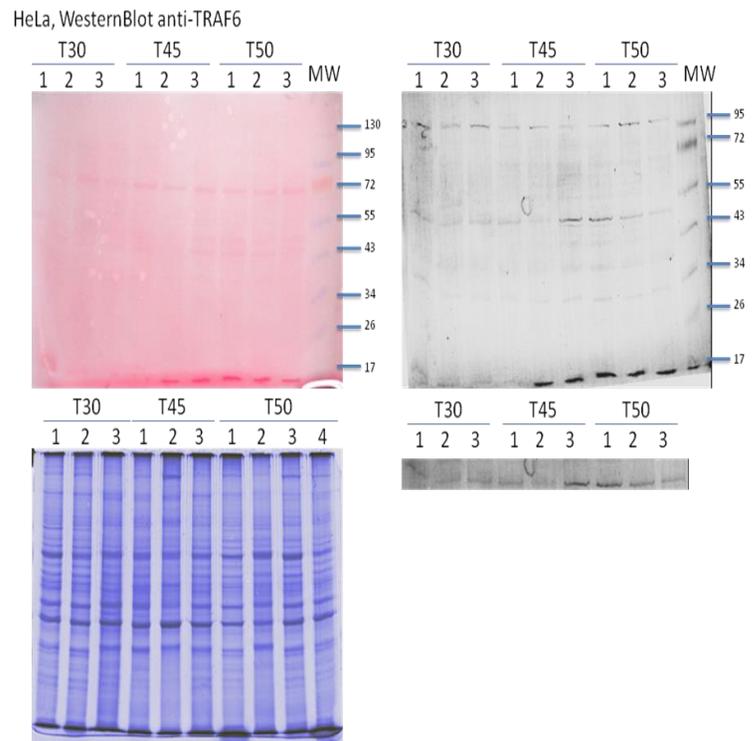


Figura 57. Westernblot anti-TRAF6 tumores SiHa.

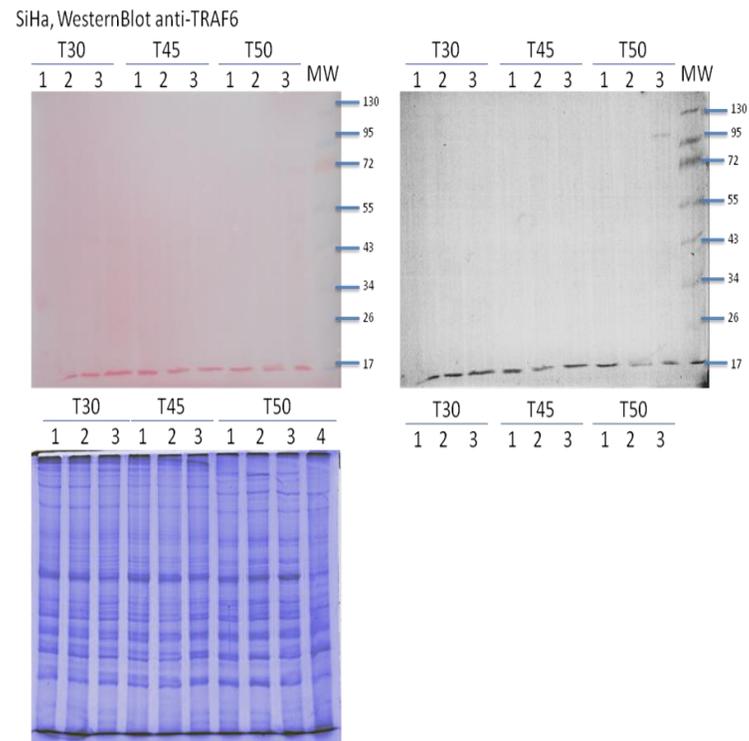


Figura 58. Westernblot anti-NFκB p65 tumores HeLa.

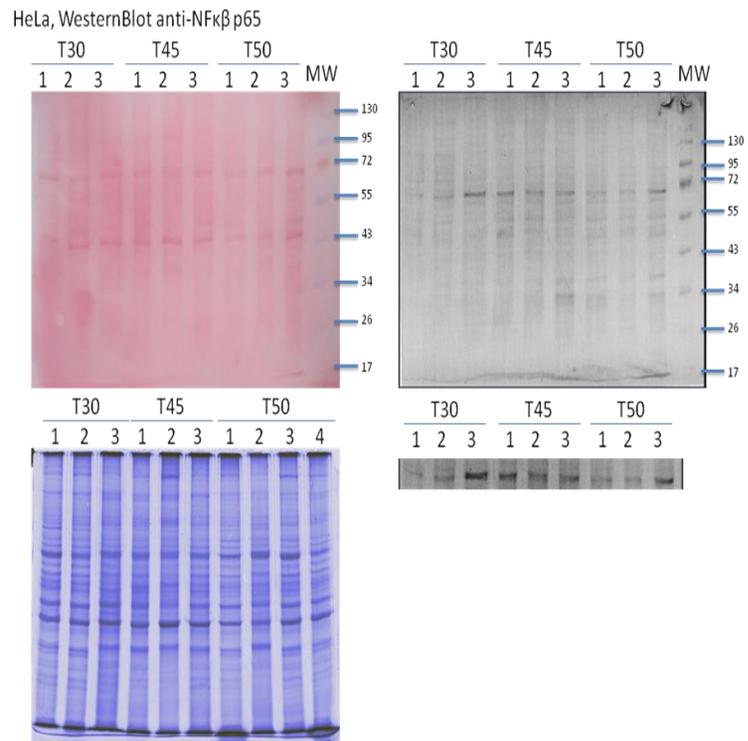


Figura 59. Westernblot anti-NFκB p65 tumores siHa.

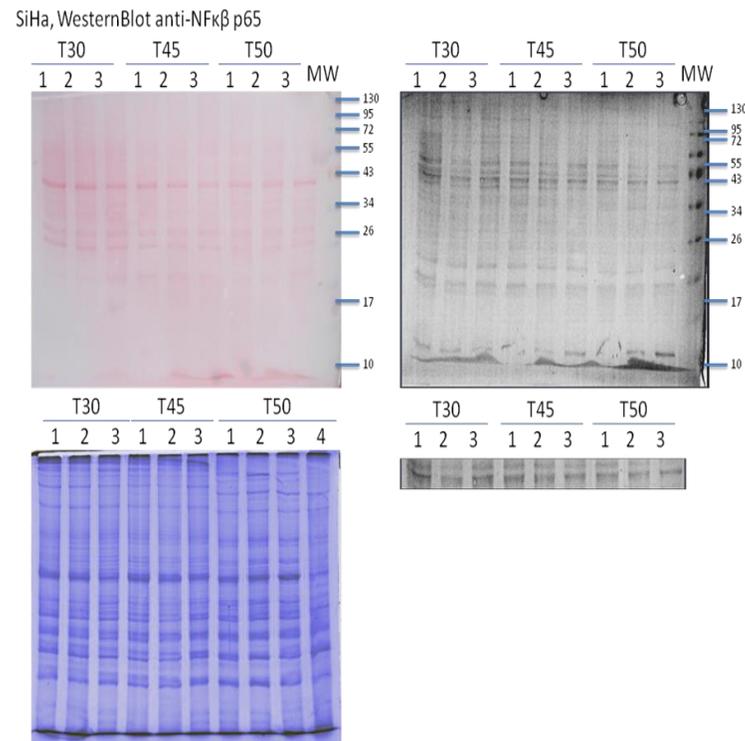


Figura 60. Westernblot anti-ERK1/2 tumores HeLa. 10

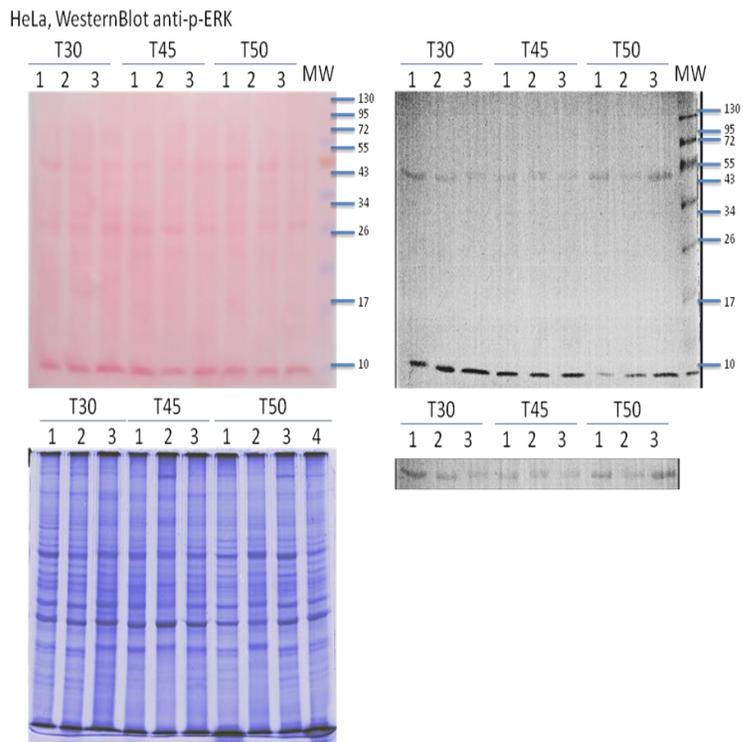


Figura 61. Westernblot anti-ERK1/2 tumores SiHa.

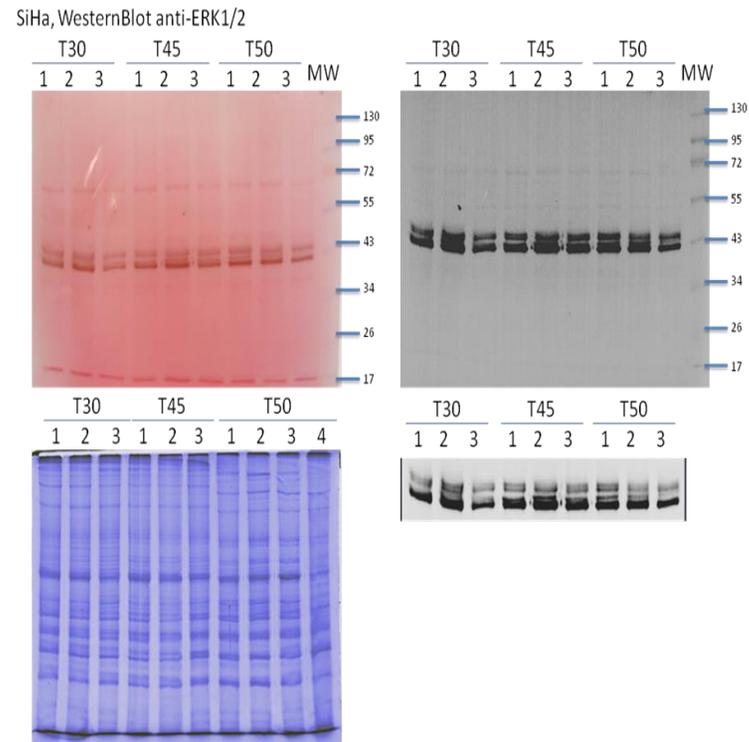


Figura 62. Westernblot anti-pERK1/2 tumores HeLa.

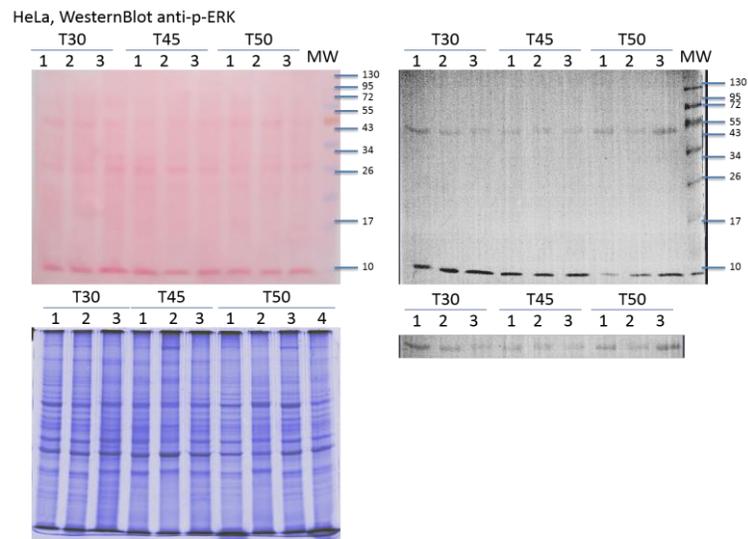


Figura 63. Westernblot anti-pERK1/2 tumores SiHa.

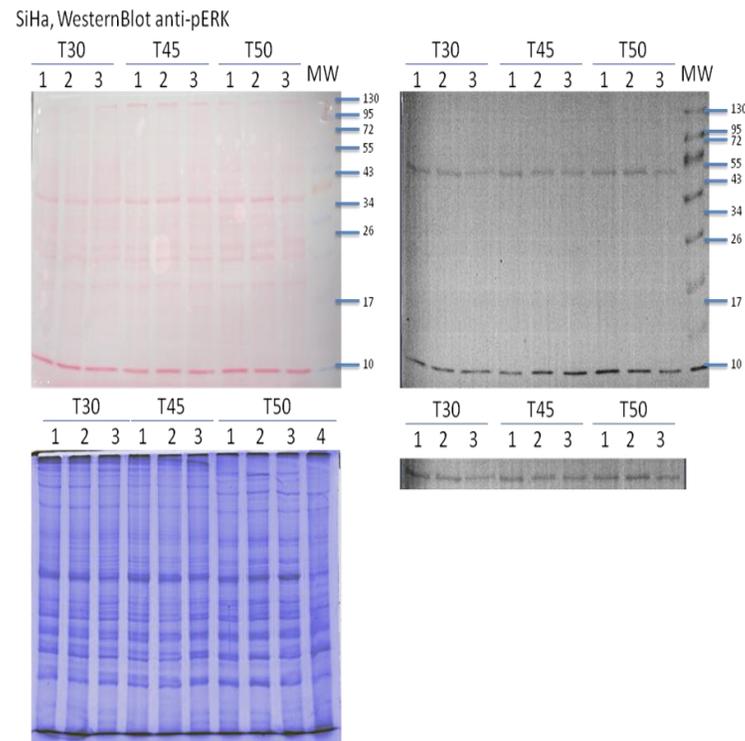


Figura 64. Westernblot anti-JNK tumores HeLa.

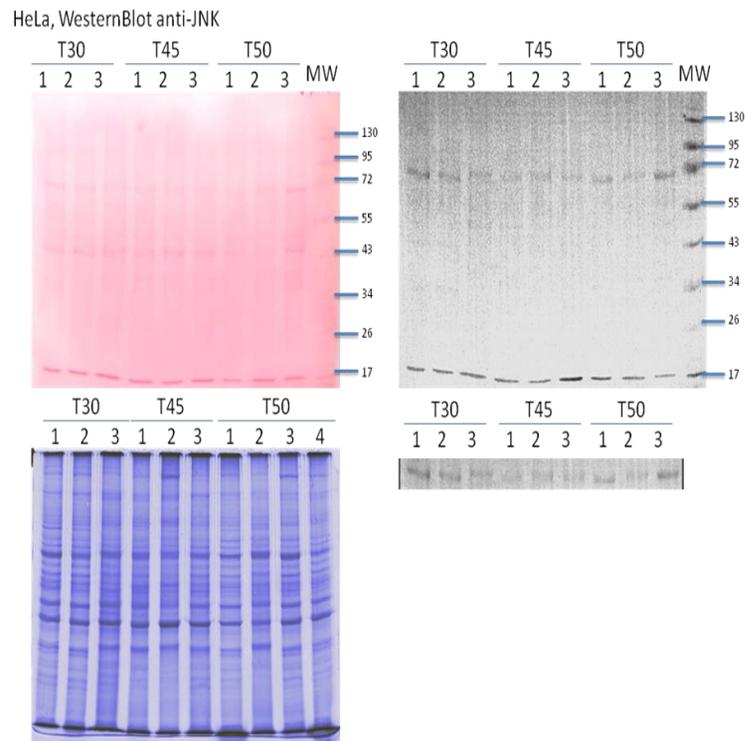


Figura 65. Westernblot anti-JNK tumores SiHa.

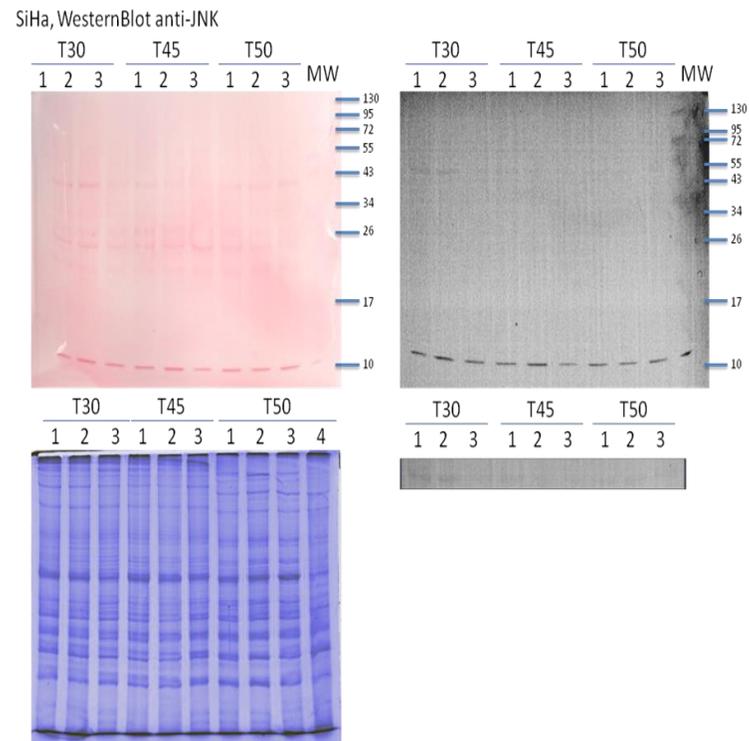


Figura 66. Westernblot anti-pJNK tumores HeLa.

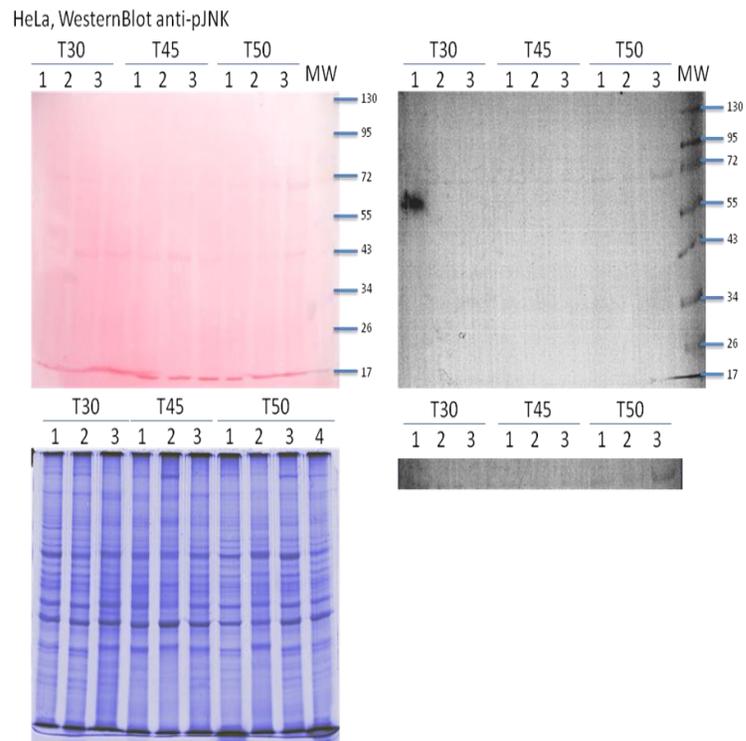


Figura 67. Westernblot anti-pJNK tumores SiHa.

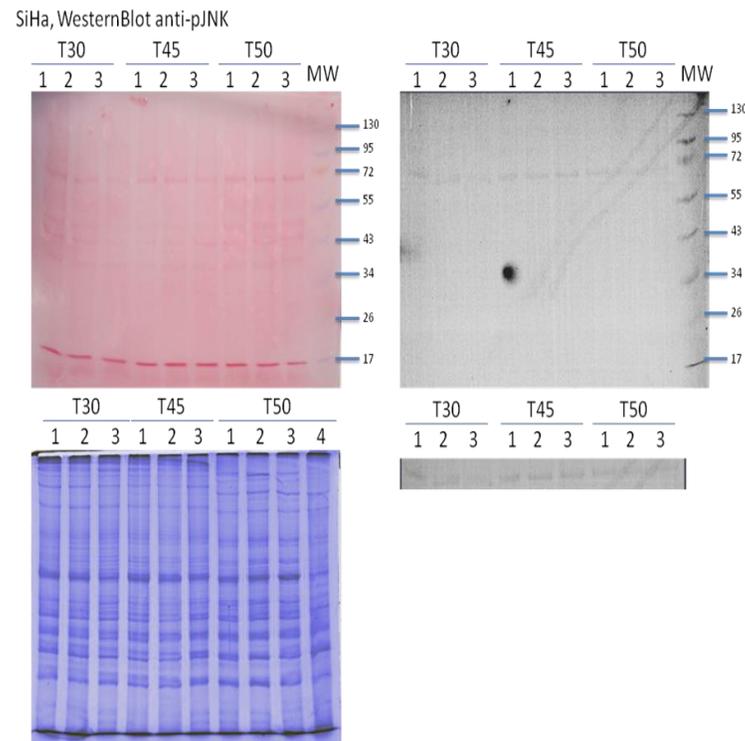


Figura 68. Westernblot anti-p38 tumores HeLa.

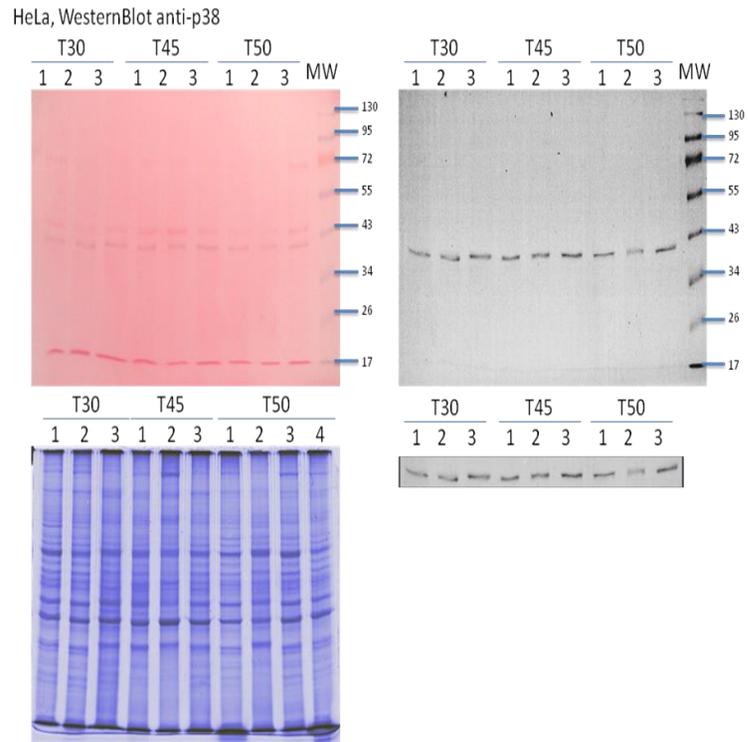


Figura 69. Westernblot anti-p38 tumores SiHa.

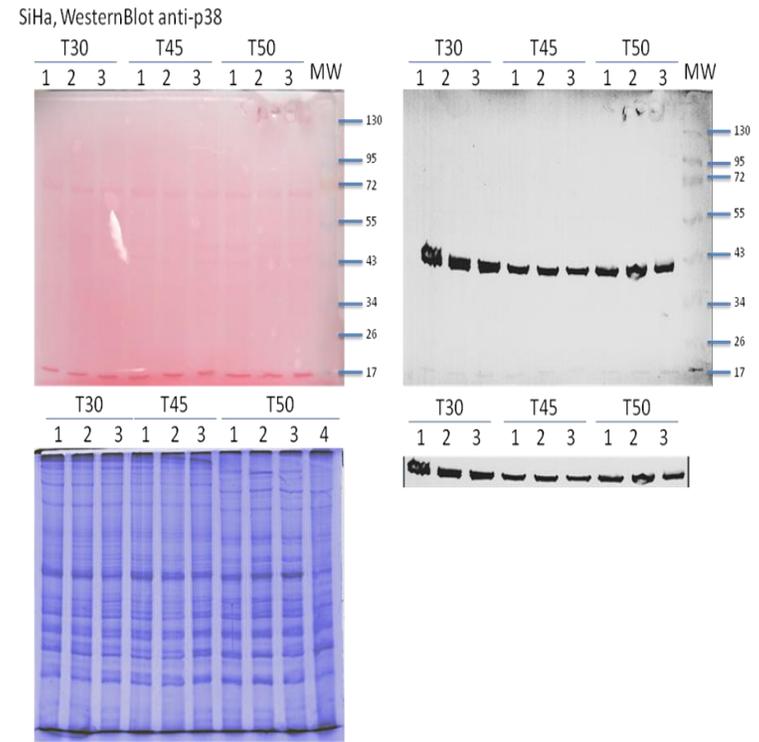


Figura 70. Westernblot anti-pp38 tumores HeLa.

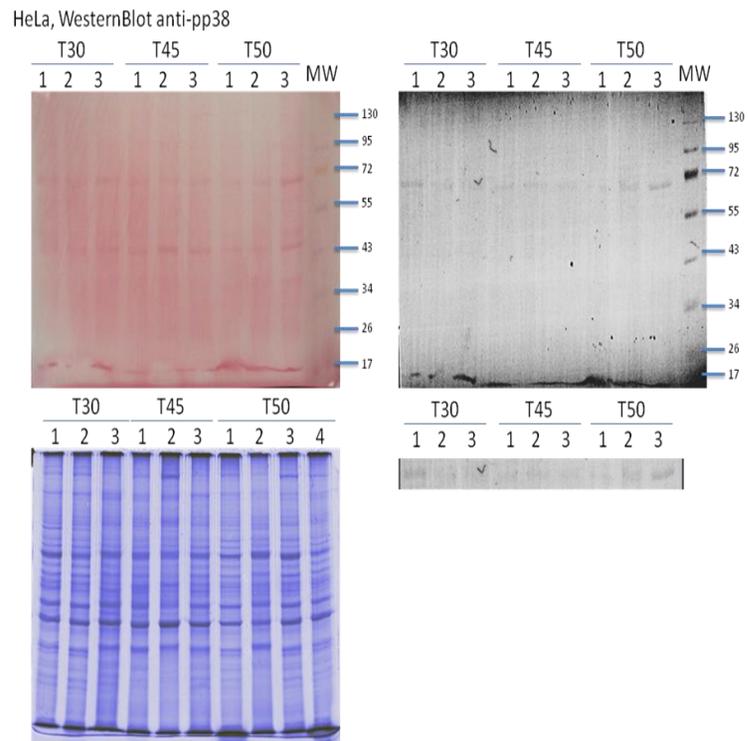
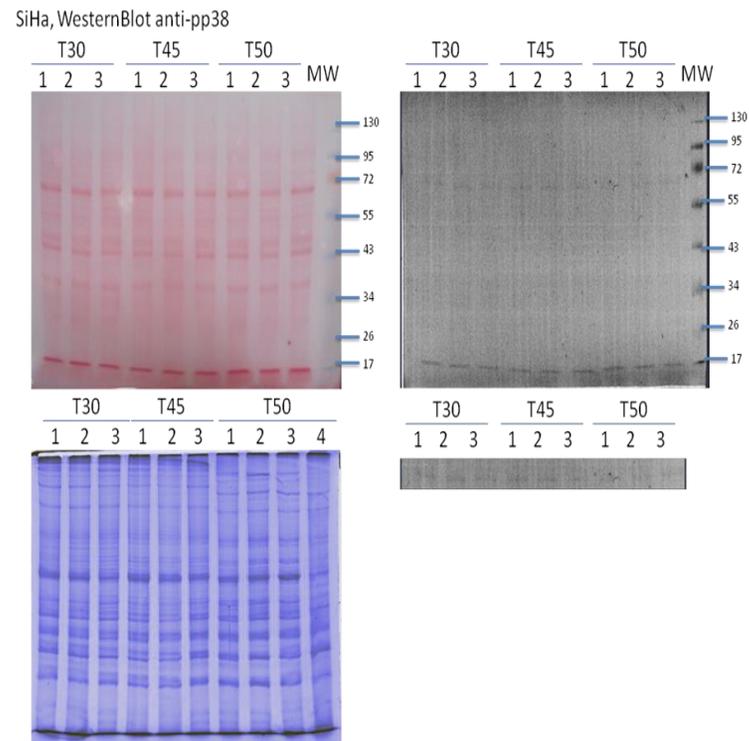


Figura 71. Westernblot anti-pp38 tumores SiHa.



# Apéndice F: Tratamiento Morfolinos

Tabla 13. Volumen día a día de los tumores tratados con morfolinos.

		dia 15	dia 18	dia 21	dia 24	dia 27	dia 30
<b>HeLa</b>	GSTM3	12.5663706	12.5663706	6.28318531	6.28318531	3.14159265	1.57079633
	GSTM3	16.7551608	12.5663706	12.5663706	6.28318531	4.71238898	3.14159265
	GSTP1	18.8495559	25.1327412	31.4159265	25.1327412	58.6430629	83.7758041
	GSTP1	14.1371669	18.8495559	25.1327412	20.943951	75.3982237	94.2477796
	CONTROL	8.37758041	21.9911486	21.9911486	21.9911486	25.1327412	65.9734457
	CONTROL	10.4719755	15.7079633	21.9911486	43.9822972	58.6430629	94.2477796
<b>Calo</b>	GSTM3	3.14159265	7.06858347	4.71238898	3.14159265	3.14159265	3.14159265
	GSTM3	2.0943951	3.14159265	3.14159265	3.92699082	3.14159265	2.35619449
	GSTP1	3.14159265	3.14159265	6.28318531	4.1887902	4.1887902	4.1887902
	GSTP1	4.71238898	3.92699082	4.1887902	6.28318531	6.28318531	6.28318531
	CONTROL	4.71238898	9.42477796	9.42477796	12.5663706	15.7079633	25.1327412
	CONTROL	3.14159265	7.85398163	12.5663706	15.7079633	19.6349541	20.943951
<b>SiHa</b>	GSTM3	12.82817	10.4719755	10.4719755	8.37758041	6.28318531	0.52359878
	GSTM3	9.42477796	11.7809725	9.42477796	3.14159265	4.1887902	1.04719755
	GSTP1	12.5663706	9.42477796	12.5663706	4.1887902	2.0943951	0.52359878
	GSTP1	15.7079633	13.0899694	9.42477796	9.42477796	6.28318531	0.52359878
	CONTROL	9.42477796	12.5663706	16.7551608	18.8495559	26.1799388	37.6991118
	CONTROL	10.9955743	10.9955743	12.82817	14.6607657	21.2057504	31.4159265
<b>Casky</b>	GSTM3	12.82817	10.4719755	14.1371669	12.5663706	31.4159265	62.8318531
	GSTM3	6.54498469	9.81747704	11.7809725	25.1327412	42.4115008	73.3038286
	GSTP1	9.42477796	9.42477796	14.1371669	19.242255	25.1327412	37.6991118
	GSTP1	14.1371669	14.1371669	9.42477796	4.1887902	18.8495559	35.3429174
	CONTROL	6.28318531	18.8495559	23.5619449	37.6991118	54.9778714	65.9734457
	CONTROL	12.5663706	20.943951	31.4159265	39.2699082	51.8362788	56.5486678
<b>Colo205</b>	GSTM3	43.9822972	76.96902	87.9645943	87.9645943	113.097336	299.4985
	GSTM3	51.31268	51.31268	76.96902	100.530965	127.234502	245.044227
	GSTP1	36.6519143	54.9778714	31.4159265	31.4159265	58.6430629	150.796447
	GSTP1	39.2699082	47.1238898	76.96902	67.0206433	98.9601686	169.646003
	CONTROL	43.9822972	65.9734457	67.0206433	155.508836	150.796447	285.884931
	CONTROL	36.6519143	47.1238898	75.3982237	103.672558	163.362818	326.725636
<b>MDA-231</b>	GSTM3	4.1887902	10.4719755	18.3259571	58.6430629	141.371669	462.861318
	GSTM3	5.23598776	7.85398163	15.7079633	84.8230016	207.345115	795.870139
	GSTP1	10.4719755	15.7079633	21.9911486	84.8230016	285.884931	622.035345
	GSTP1	6.28318531	13.0899694	37.6991118	141.371669	224.623875	955.044167
	CONTROL	6.28318531	10.4719755	29.3215314	75.3982237	373.849526	921.533845
	CONTROL	4.1887902	7.85398163	14.6607657	58.6430629	263.893783	835.663646

# Apéndice F: Resultados extras

Tabla 14. Medidas de los tumores a T30, T45 y T50 de la línea celular HeLa.

HeLaT30	Ancho cm	Largo cm	Grueso cm	Volumen cm <sup>3</sup>	Promedio mm <sup>3</sup>	Desviación mm <sup>3</sup>
1	0.8	0.3	0.7	0.08796459		
2	0.6	0.9	0.4	0.11309734		
3	0.3	0.5	0.7	0.05497787		
4	0.6	0.2	0.3	0.01884956		
5	1	0.3	0.7	0.10995574		
6	0.5	0.7	0.3	0.05497787	73.3038285	36.820574
<b>HeLaT45</b>						
1	0.8	0.8	0.3	0.10053097		
2	0.7	0.8	0.7	0.20525072		
3	0.7	0.5	0.7	0.1282817		
4	0.8	0.7	0.4	0.11728613		
5	1.1	0.8	0.3	0.13823008		
6	0.9	0.9	0.3	0.1272345	136.135682	36.1806375
<b>HeLaT50</b>						
1	1.4	0.9	1	0.65973446		
2	0.8	1	0.7	0.29321531		
3	1.2	0.9	0.4	0.22619467		
4	1.2	1.2	0.7	0.52778757		
5	1.3	1.1	0.7	0.52412237		
6	1.1	0.9	1.3	0.67387162	484.154334	186.184441
<b>SiHaT30</b>						
1	0.9	0.8	0.4	0.15079645		
2	1.6	1.5	0.5	0.62831853		
3	1.4	0.9	0.4	0.26389378	347.669587	249.5408
<b>SiHaT45</b>						
1	1.3	1	0.5	0.3403392		
2	1.6	0.9	0.9	0.67858401		
3	1.4	1.1	0.5	0.40317106	474.031425	179.9119
<b>SiHaT50</b>						
1	1.9	1.4	1.1	1.53205002		
2	1.5	1.5	1.1	1.29590697		
3	1.8	0.6	1.1	0.62203535	1149.99744	472.2276