



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

Licenciatura en Ciencias Genómicas

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

**Dinámica Proteómica en Tumores de Cáncer
Cérvico Uterino**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciado en Ciencias Genómicas

P R E S E N T A

LUIS FERNANDO DELGADILLO SILVA

Tutor: Dr. Sergio Encarnación Guevara

Asesor: Candidato a Dr. Alberto Checa Rojas



Cuernavaca, Mor

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Resumen	4
Agradecimientos	5
Introducción	8
1. Generalidades del Cáncer	8
○ Tumorigénesis	9
○ Microambiente	10
○ Cáncer cérvico uterino (CaCu)	12
○ Clasificación del CaCu	13
○ Generalidades del Virus del Papiloma Humano (HPV)	14
○ Ciclo de vida del HPV	16
○ Vías de señalización	17
2. Estudios proteómicos en CaCu	20
○ Proteómica	20
○ Proteómica en cáncer	21
○ Proteómica en cáncer cérvico uterino	22
3. Modelos de estudio en CaCu	24
○ Líneas celulares	24
○ El modelo murino y el caso del ratón atómico <i>Nu/Nu</i>	25
Justificación	28
Hipótesis	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares	29
Material y métodos	30
○ Diseño de metodología	30
○ Cultivo Celular	31
○ Tumores de CaCu	31
○ Extracción de las muestras, cuantificación	31
○ Electroforesis de doble dimensión	31
○ Análisis de geles	32
○ Identificación de proteínas por espectrometría de masas	32
○ Construcción de redes de interacciones proteína-proteína	32

○ Análisis de enriquecimiento de GOs	33
○ Análisis de enriquecimiento de vías de interacción	33
Resultados	35
Discusión e integración de resultados	47
○ Volumen tumoral a través del tiempo	47
○ Perfiles proteómicos	47
○ Proteínas con expresión constante	52
○ Proteínas sub-expresadas	55
○ Proteínas sobre-expresadas	58
○ Proteínas oscilantes sobre-expresadas	59
○ Proteínas oscilantes sub-expresadas	62
○ Interacciones funcionales Proteína-Proteína (IPP) de cada categoría	63
○ Ontologías Génicas: Señalización	64
○ Análisis de sobrerrepresentación de vías moleculares	65
Conclusiones	68
○ Modelo de las adaptaciones del desarrollo tumoral a través del tiempo	68
Perspectivas	71
Bibliografía	72
Apéndice A: Información extra	77
Apéndice B: Protocolos	86
Apéndice C: Geles	89
Apéndice D: Proteínas identificadas	99
Apéndice E: Resultados suplementarios	110

Resumen

El cáncer cérvico uterino (**CaCu**) es el segundo cáncer más común en mujeres y la primera causa de muerte asociada a cáncer en países subdesarrollados. El agente etiológico del CaCu es el Virus del Papiloma Humano (**HPV**), presente en el 99.7% de los casos, el cual altera distintas vías de señalización celular, sin embargo poco se ha estudiado del CaCu a nivel de proteínas y aun se desconoce su dinámica proteómica. En este estudio se aborda la expresión proteómica durante el desarrollo tumoral, en tumores de línea celular HeLa inoculadas en ratones hembras atímicos de la cepa *Nu/Nu*. En el presente trabajo se identificaron 31 proteínas y se describen sus posibles funciones en el desarrollo tumoral. Las proteínas con una expresión constantes, están involucradas en la resistencia al estrés, el transporte vesicular y el incremento de las vías de activación de NF- κ B, que controla la supervivencia y proliferación celular; las proteínas sub-expresadas están relacionadas en la vía TNF- α , que puede activar las vías de MAPK, NF- κ B, que controlan la activación de la apoptosis por medio de caspasas; las proteínas sobre-expresadas están involucradas en un mayor rendimiento energético; las proteínas oscilantes sobre-expresadas están involucradas en la vía VEGF y NO, encargadas del evento biológico de angiogénesis; y las proteínas oscilantes sub-expresadas están relacionadas al remodelamiento del citoesqueleto.

Agradecimientos

Como empezar a numerar a todas las personas que han hecho posible este trabajo. Empecemos por las personas que han forjado todo lo que soy. Agradezco tanto a mi familia, que ha sido el soporte y las bases bajo las cuales he crecido. A mis hermanas Elena, Nayeli y Victoria, son mis angelitos, mis niñas consentidas, debo agradecer por su amistad incondicional. A mi Papá por apoyarme en la carrera y siempre estar fomentado mi superación personal y a mi Mamá, quien sin lugar a duda, es a la persona a la que más le debo, la que más lecciones me ha dado, a una de esas pocas personas que admiro y considero un ejemplo, a quien ha sido el pilar de mi familia y del lugar al que llamo hogar.

El laboratorio de proteómica, en el centro de Ciencias Genómicas, ese pequeño universo que ha sido mi casa por ya dos años, como agradecer tanto en tan poco espacio. Recuerdo que estuve a punto de dejar pasar la oportunidad de conocer la investigación experimental y dedicarme a la computacional, y fue allí cuando el Dr. Sergio Encarnación aceptó a ser mi tutor y me permitió entrar al laboratorio, y allí también fue cuando Alberto Checa comenzó a enseñarme técnicas para desarrollar este proyecto. Aprovecho para agradecerle a ambos por su guía y su compañía y para decir que no solo han sido solamente unos excelentes (tutor y asesor) en el final de mi licenciatura, sino que ha sido grandes amigos, que me han enseñado poco a poco el significado de la responsabilidad y el compromiso con la ciencia, agradezco a ellos dos por su guía. Pero en este laboratorio, no ha habido nadie a quien no le deba algo del aprendizaje que he obtenido a lo largo de este tiempo. Andrés, Abigail, Juan y Albero Ramírez, me han enseñado mucho de las metodologías experimentales, y me ayudaron cuando no lograba ni hacer una extracción correcta, aquí también entran los consejos del Sacrosanto (Gabriel) y su manejo experto de la electroforesis bidimensional y bajo la misma línea, agradezco a Magdalena, quien con muchos regaños, me permitió ser meticuloso en mis experimentos. Y qué decir de todos los compañeros de laboratorio, muchas gracias a Roció que siempre procuro hacerme notar cuando mi comportamiento no era de alta etiqueta, a Martin, Mitzy, loatzin, por esas cenas de Navidad (Andres, Abigail y Checa) en septiembre y de los seminarios de pasillo, siempre, discutiendo acerca del artículo que acaba de salir en science o nature. Y quiero agradecer al Dr. Sergio Encarnación, por darme la oportunidad de entrar a su laboratorio, por ser un tutor a lo largo de mi desarrollo en el laboratorio, aun con el conocimiento de mis carencias de experiencia en la investigación experimental.

También debo de agradecer a todas las personas del IBT que han participado de este trabajo, a la Dra. Mata, a la Dra. Marcela, a la Dra. Rosa y a todos los IBTianos que me han enseñado, y como olvidar a la maquinita de café que siempre me ayuda en esos días de mucho sueño.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de la licenciatura, con los cuales compartí momentos muy especiales, a todos los de la 4ta (en especial a Isaac, Akram, Willy, Stephanie, Zarco, Mine, Pao, Dani, Sol, Rodrigo, Paz, Robert, Soto, Silvia y bueno a todos en realidad), siempre serán recordados con un cariño muy especial y arriba Genómicas.

También les dedico este trabajo a mis queridos amigos de Jalisco, a Tontle, Giossepe, Manolo, Fredy, Elenita, Mariana, Gera, Kathya, Mónica, Luis, Chava, Paco, David, Thusch, Rafael, Adriana y a esa chica de monterrey Sam, y por ultimo en especial a Kendra mi mejor amiga.

Por último, quiero agradecer a Grecia quien me ha enseñado el significado de muchas cosas y que se ha vuelto una persona muy especial en mi vida.

Estoy seguro que estoy olvidando muchos nombres y pido una disculpa a los que no logre recordar en estos últimos momentos pero saben que aquí están, acompañándome, todos, en este camino.

“Todo nuestro conocimiento tiene su origen en nuestras percepciones”

Leonardo da Vinci

Introducción

Generalidades del cáncer

En un organismo pluricelular hay células capaces de proliferar y participar en el mantenimiento y reparación tejidos a lo largo de su vida. Las células que componen un organismo, están reguladas por sistemas de control que mantienen la organización celular, las interacciones inter-celulares, la diferenciación, proliferación y muerte, permitiendo la homeostasis del organismo [1,2]. Cuando una célula es alterada en algún componente celular, las células son capaces de contrarrestar el daño por medio de sistemas de reparación, o por activación de la muerte celular programada llamada apoptosis, sin embargo, hay ocasiones en las que las alteraciones celulares no son reparadas, así la célula es capaz de sobrevivir y acumular alteraciones sucesivas que le permiten superar todas las barreras de control celular y concluir en el desarrollo de un cáncer [1,3].

Los tumores se desarrollan en cualquier individuo, y con mayor frecuencia en los de edad avanzada. La mayoría de los tumores no representa un riesgo, debido a que suelen ser localizados, de tamaño pequeño y no son capaces de invadir otros tejidos; a estos se les denominan **tumores benignos**. Un tumor benigno puede causar la muerte si crece de manera que obstruya algún órgano o presione algún nervio vital, o si este secreta un exceso de sustancias biológicas activas, como hormonas. En contraste, las células de un **tumor maligno** o mejor definido como cáncer, se encuentran fuera de los sistemas de control celular, 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) [1,2].

Existen más de 100 tipos de cáncer, puede haber subtipos y presentar diferentes grados de malignidad, esta complejidad presupone que las alteraciones sobre las células cancerosas deben de ser muy variadas. Se ha propuesto que la mayoría de los cánceres presentan esencialmente alteraciones en diez funciones básicas de la célula (fig. 1) [4]:

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1.- Autosuficiencia en señales de crecimiento | 6.-invasión de tejidos y metástasis |
| 2.-insensibilidad a señales de anticrecimiento | 7.-angiogénesis sostenida |
| 3.-evasión del sistema inmune | 8.-inestabilidad genómica |
| 4.-potencial replicativo ilimitado | 9.-evasión de apoptosis |
| 5.-promoción tumoral por inflamación | 10.-desregulación metabólica |

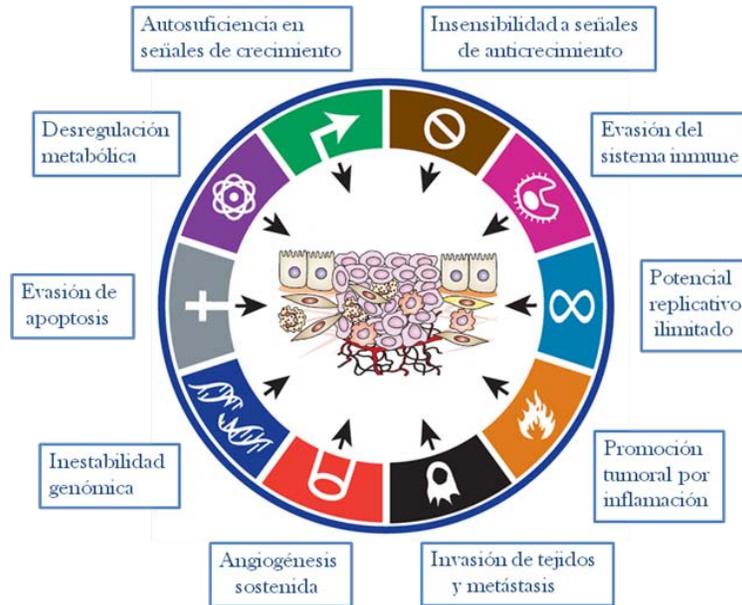


Figura 1. Las 10 características distintivas del cáncer. Imagen adaptada de ref. 4.

Tumorigénesis

La tumorigénesis es un proceso lento y progresivo de múltiples etapas, las cuales suceden a lo largo de décadas. Entre las células normales y las altamente malignas hay una serie de alteraciones que reflejan los cambios adquiridos por las células 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 puede deber a varias razones, incluyendo: 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: La metaplasia es la transformación de un tipo de tejido en otro, este fenómeno puede ser visto como un desplazamiento de células incapaces de soportar un estrés por aquellas con una mayor resistencia. En este tipo de crecimiento las células son prácticamente normales a excepción de las que se encuentran en una capa celular a la cual no pertenecen y no realizan todas las funciones normales.
- Displasia: se refiere a 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 disturbios citológicos y cambios en tamaño, forma y organización. Este tipo de alteración representa una progresión hacia una transformación maligna y es considerado un crecimiento anormal.

- Papilomas, pólipos: Estas células tienen un crecimiento anormal, a veces son llamadas displasias de alto grado y su aparición puede evolucionar a neoplasias. Este tipo de células aun respetan la laminilla basal, pero presentan una división celular acelerada y suelen formar estructuras visibles llamadas papilomas o pólipos y se les considera como tumores benignos.
- Neoplasia: Estas células han sobrepasado todas las barreras de control celular. Este crecimiento anormal 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 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 (fig. 2) [1,3].

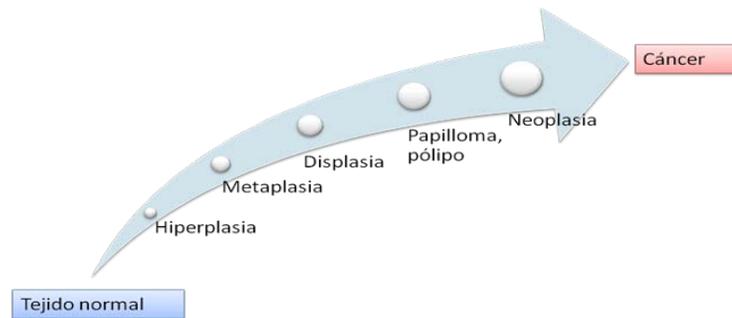


Figura 2. Distintas alteraciones del crecimiento celular. Desde un tejido normal hasta un cáncer hay una serie de alteraciones en el crecimiento, sin embargo, no todas son consideradas como cáncer. Las alteraciones del crecimiento celular no se han probado como eventos secuenciales hasta el desarrollo de un cáncer, pero queda la pregunta si existen vías comunes hacia el desarrollo tumoral.

Microambiente

La tumorigénesis es un proceso complejo de múltiples etapas, las cuales no pueden ser entendidas si separamos a las células tumorales del contexto en el que se desarrollan. Nos referiremos a las células y componentes celulares adyacentes a las neoplásicas como el microambiente tumoral [5].

Cuando las células tumorales sobrepasan la laminilla basal, se involucran en un conjunto de nuevas interacciones, una de las primeras sucede con la estructura de soporte llamada matriz extracelular (**ME**), la cual es un reservorio dinámico de moléculas que promueven la proliferación celular, movimiento, diferenciación, polarización celular y metabolismo de la misma. Durante la tumorigénesis y la invasión de la ME, suele haber un reclutamiento de distintas células, como fibroblastos, células del sistema inmune y células endoteliales [6].

Los fibroblastos son células predominantes en la ME, los cuales están encargados de la síntesis, deposición y remodelación de la ME. Los fibroblastos producen colágenos, proteoglicanos, enzimas proteolíticas y sus inhibidores, y secretan de forma paracrina factores de proliferación y supervivencia celular y bajo ciertas condiciones factores apoptóticos. En cada órgano existen fibroblastos con funciones específicas, por lo cual los fibroblastos procedentes de diferentes órganos producen diferentes moléculas, asociadas al órgano de procedencia [7]. Esto es importante de notar, debido a que los fibroblastos asociados a tumores muestran una mayor proliferación, expresan α -actina de músculo liso, y son rodeados por acumulaciones de colágenos fibrilares. A esta condición se le conoce como desmoplasia y suele ser acompañada por el reclutamiento de células inflamatorias, una constante degradación de la ME y la promoción de angiogénesis [8].

Cuando un tejido sufre de daño, las células deterioradas son removidas por la inducción de apoptosis, mientras que la regeneración del tejido es gracias a la proliferación celular [3]. La relación funcional entre las células cancerosas y las células inflamatorias; leucocitos (mononucleares: linfocitos y monocitos, y polimorfonucleares: neutrófilos, basófilos y eosinófilos), células dendríticas, macrófagos, asesinas naturales (**NK**) y mastocitos, es la contribución al desarrollo tumoral debido a la liberación de potentes mediadores de inflamación, proliferación, migración, remodelación de ME, integridad genómica y angiogénesis. Sin embargo, el sistema inmune puede tanto favorecer el desarrollo tumoral como inhibir su crecimiento ya que hay ocasiones en el que el sistema inmune logra detectar a las células cancerosas y mostrar una respuesta adaptativa en contra de ellas, mediada por linfocitos B y T [9-11] *nota: para mayor información revisar apéndice A sección Sistema inmune.*

Los vasos sanguíneos son esenciales en la oxigenación, transporte de nutrientes y remoción de desechos celulares, cuando hay daño en tejido, se activa el proceso biológico de angiogénesis, que se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. En el desarrollo tumoral, no se sabe si la angiogénesis es promovida única y exclusivamente por la secreción de factores angiogénicos por parte del tumor, ya que también puede haber liberación de estos factores de la ME. Cuando se lleva a cabo la formación de un nuevo capilar, las células endoteliales secretan factores de proliferación cerca de las células no endoteliales, igualmente liberan factores de crecimiento que atraen células peri-endoteliales llamadas pericitos y células de músculo liso, que en conjunto forman lo que se denomina muralla celular. Una vez que se encuentran en posición, estas células liberan moléculas como factor de crecimiento vascular endotelial (**VEGF**) y angiopoitina-1 (**Ang-1**), que promueven la supervivencia y proliferación de las células endoteliales. El desarrollo tumoral está acompañado por la proliferación coordinada de células estromales y endoteliales, lo que hace notar una dependencia a estas células en la tumorigénesis (fig. 3) [12, 13].

Otro componente del microambiente son las hormonas. Estudios extensivos han mostrado la relación entre el desbalance hormonal y la aparición y progresión de algunos tipos de cáncer [14].

Reguladores críticos como TGF- β , IGF-1 y VEGF, son alterados con la administración de altas cantidades de hormonas sexuales, mostrando su relación como reguladores parácrinos de células epiteliales y estromales, así como sus funciones en la regulación de proliferación y supervivencia celular [15, 16].

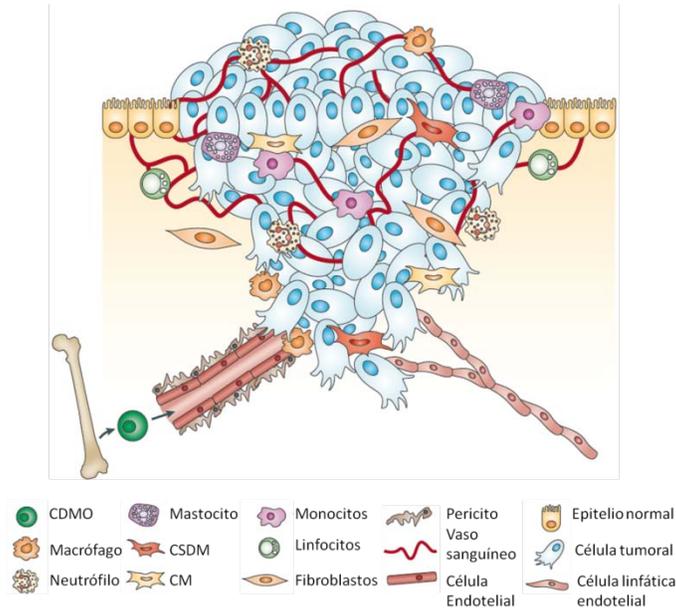


Figura 3. El microambiente de las células tumorales. Las células cancerosas se ven involucradas en un complejo microambiente que incluye células derivadas de la médula espinal (CDMO), células supresoras derivadas de mieloides (CSDM), células mesenquimales (CM), células endoteliales, células epiteliales, hormonas y matriz extracelular, entre otras. Imagen modificada de ref. 11.

Cáncer cérvico uterino (CaCu)

El cáncer cérvico uterino (**CaCu**) es una alteración originada en el epitelio cervical y del cuello uterino, se manifiesta a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución en grados leve, moderada y severa. Estas lesiones pueden llegar a evolucionar en un cáncer *in situ* (cuando se circunscribe a la superficie epitelial) o un cáncer invasor (cuando las células invasoras traspasan la membrana basal) [17].

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 ocupó el primer lugar con un 13.9% de las muertes registradas por cáncer [18]. 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 [19].

Clasificación del CaCu

Dentro del cáncer cérvico uterino hay cuatro tipos de cáncer que pueden identificarse:

1. Carcinoma escamoso: proviene del epitelio escamoso cervical y es el más frecuente con aproximadamente el 80% de los casos.
2. Adenocarcinoma cervical: cuenta para un 15% de los casos y proviene de las glándulas productoras de mucosa del endocérvix.
3. Carcinoma adenoescamoso: constituido por células de origen escamosas y glandulares ~1-5%
4. Carcinoma neuroendocrinos: derivado de células neuroendocrinas cervicales, cuenta para un ~0.1-1%

Los distintos tipos de cáncer cérvico uterino presentan características clínicas muy similares, sin embargo, los carcinomas adenoescamoso y neuroendocrinos son detectados de manera ineficiente por los programas de rutina, por lo que suelen ser detectados en fases avanzadas [20].

Nota: Para mayor información revisar apéndice A sección Tipos de tumores.

Hay varios sistemas de clasificación para el CaCu que tienen una terminología uniforme para la correcta comunicación entre profesionales, proveer un correcto diagnóstico, y así mejorar el tratamiento. A continuación se describen brevemente tres sistemas de clasificación del CaCu:

El Sistema de clasificación **FIGO** (International Federation of Obstetricians and Gynaecologists) fue el primer sistema desarrollado para la clasificación del CaCu en 1958 y su última actualización fue en el 2010. Este sistema se basa en tres factores:

- Alcance del tumor: si las células se encuentran en la superficie del cuello uterino o si han invadido otros tejidos circundantes.
- Propagación a nódulos linfáticos próximos.
- Propagación del cáncer a órganos distantes (metástasis).

La clasificación por etapas o estadios se basa en la revisión clínica y no en evidencia quirúrgica. Para asignar la etapa de la enfermedad, se combina la información sobre el tumor, los ganglios linfáticos y la propagación del cáncer, proceso conocido como agrupación de estadios. Los estadios se describen usando los números romanos del I al IV, con sub-etapas indicadas por números y letras [21]. *Nota: para ver criterios de clasificación revisar apéndice A sección Sistema FIGO.*

En 1968, se acuñó el concepto de neoplasia intraepitelial cervical (**NIC**), con diferentes grados, NIC-I, NIC-II y NIC-III. El diagnóstico y clasificación de NIC por histopatología se lleva a cabo por una biopsia cervical, y se valora si una muestra tisular cervical presenta algún tipo de NIC y en qué grado, esto en función de las características histológicas de diferenciación, maduración y estratificación de la muestra y si hay anomalías nucleares. Para el diagnóstico NIC se toma en cuenta la proporción del espesor epitelial de las células maduras y diferenciadas. En general entre más avanzada sea la fase NIC, suelen tener un mayor espesor epitelial las células indiferenciadas

en contraste con la capa de células maduras diferenciadas [22]. *Nota: para ver criterios de clasificación revisar apéndice A sección Sistema NIC.*

Por último, la clasificación más reciente fue desarrollada en 1988 conocida como el Sistema Bathesda. Esta clasificación introdujo el concepto de lesiones escamosas intraepiteliales, subdividiéndose en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (**LSIL**) y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (**HSIL**), también contempla la categoría de células escamosas atípicas (**ASC**). Esta clasificación se basa en el examen de Papanicolaou y se sustenta en dos conceptos: la diferenciación escamosa de las células vaginales y los cambios morfológicos celulares que ocurren en estas células cuando hay patología. Esta técnica se basa en el estudio de las características morfológicas del núcleo, citoplasma y relación núcleo-citoplasma de las células que son tomadas del endo- y ecto-cérvix, y fondo del saco vaginal [22, 23]. *Nota: para mayor información revisar apéndice A sección Sistema Bathesda.*

Generalidades del Virus del Papilloma Humano (HPV)

El agente etiológico del CaCu, es el Virus del Papiloma Humano (**HPV**), que se encuentra presente en $\geq 99.7\%$ de los tumores y causa la mayoría de las lesiones intraepiteliales. Sin embargo, existen otros factores tanto exógenos como endógenos que contribuyen al desarrollo y progresión del CaCu [20].

Los HPVs son virus que pertenecen a la familia *Papovaviridae*, sin envoltura, con un tamaño pequeños (55 nm de diámetro), de DNA y sin etapa de RNA, con tropismo a los epitelios escamosos. Tienen una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros que contiene el genoma viral. Los capsómeros están compuestos de dos proteínas estructurales: la proteína L1 y la proteína de cápside menor L2 [20, 24].

El genoma de los HPVs es una molécula circular sencilla de doble cadena de DNA, que contiene entre 6800 y 8000 pares de bases (pb) y asociada a histonas. El genoma de los HPVs presenta entre 8 y 10 marcos de lectura abiertos (ORF) – E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, L1 y L2 – y se divide en las regiones de: control, temprana y tardía (Figura 4 y Tabla 1) [20, 24].

Se han identificado más de 120 tipos de HPVs que infectan al ser humano y aproximadamente un tercio de estos presentan un tropismo al epitelio escamoso del tracto genital [20]. Los HPVs se agrupan basándose en sus asociaciones clínicas como de alto riesgo (asociados frecuentemente al desarrollo de cáncer) y de bajo riesgo (asociados principalmente a verrugas genitales) [24]. *Nota: para mayor información revisar apéndice A sección Asociaciones clínicas del HPV.*

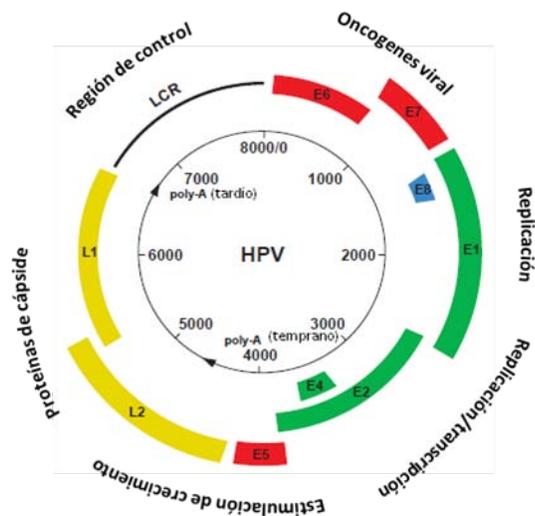


Figura 4. Organización genómica del HPV (figura adaptada Ref. 24)

Tabla 1. Proteínas del HPV y su función (tabla adaptada de Ref. 24).

Región genómica	Tamaño/ peso molecular	Proteína	Función
Región de control larga LCR	400, 1,000 pb	-	Origen de replicación y regulación de la expresión génica del HPV. Contiene el centro promotor p97 con secuencias potenciadoras y silenciadoras que regulan la transcripción de los ORFs.
Región temprana /Proteínas Tempranas Involucradas en la replicación viral y la oncogénesis	68-85 kD	E1	Helicasa, esencial para la replicación viral y el control de la transcripción de los genes virales.
	48 kD	E2	Factor de transcripción viral, esencial para la replicación y control de la transcripción, participa en la segregación y formación de la cápside
	Desconocido	E3	Función no conocida sólo se encuentra presente en algunos HPVs
	10-44 kD	Fusión E1^E4	Se une a proteínas del citoesqueleto
	14 kD	E5	Interacciona con los receptores de EGF/PDF- β promoviendo proliferación.
	16-18 kD	E6	Asociado a la degradación de p53 y la activación de la telomerasa.
	10 kD	E7	Interacciona principalmente con pRB y transactivador de promotores dependientes de E2F.
	20 kD	Fusión E8^E2C	Proteína de represión de replicación
Región tardía /Proteínas de cápside	57 kD	L1	Proteína mayoritaria de la cápside
	43-53 kD	L2	Proteína minoritaria de la cápside

Ciclo de vida del HPV

Para entender la relación del HPV con el desarrollo y progresión del cáncer cérvico uterino, necesitamos entender su ciclo de vida y como afecta a la célula hospedera. El ciclo de replicación del HPV es poco común, ya que la mayoría de los virus producen viriones en la célula originalmente infectada, pero el HPV completa la formación de viriones hasta después de que la célula original ha experimentado mitosis y una de las células hijas se ha diferenciado [25].

La infección de HPV suele ser en las capas superiores de los epitelios escamosos, sin embargo, la capa basal puede ser infectada cuando es expuesta por alguna lesión. Una vez que el HPV ha infectado a alguna célula, su genoma puede permanecer en forma episomal (como elemento extracromosomal) o integrarse al genoma del hospedero [25].

Los productos del HPV asociados a la transformación son las oncoproteínas E6 y E7 por su potencial transformador e inmortalizador. E6 y E7 por separado tienen capacidades inmortalizadoras limitadas, pero existe una sinergia cuando las dos están presentes. Las células inmortalizadas con los oncogenes E6 y E7, presentan una baja tasa de tumorigénesis en ratones desnudos, lo que indica la necesidad de otras alteraciones para la progresión a un cáncer [26, 27].

Los genes virales E5, E6 y E7 poseen actividad proliferativa, al interrumpir vías de señalización celular. E5 estimula el crecimiento celular al formar un complejo con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGF**), la proteína factor β derivada de plaquetas (**PDF- β**) y el receptor del factor 1 de crecimiento (**IGF-1**) promoviendo su función proliferativa [28]. E6 promueve la degradación de p53 y la proteína pro-apoptótica BAK, que resultan en una evasión de las vías de señalización apoptóticas y un incremento en la inestabilidad genómica. Se ha postulado que la oncoproteína E6 es responsable de la activación de la telomerasas y de la inhibición de las cinasas de la familia SRC encargadas de varias vías de señalización involucradas en diferenciación, adhesión y transcripción [29]. E7 degrada la proteína RB, el cual libera el factor de transcripción E2F y estimula la actividad de la cinasa INK4A, lo que resulta en la progresión de la fase G1 a la fase S, en el ciclo celular. E7 estimula los genes ciclina A y ciclina E de la fase S y parece bloquear la función de los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 [30]. Estudios recientes han demostrado la interacción de E7 con deacetilasas de histonas (**HDACs**), así como con E2F6 que es un represor transcripcional de los promotores dependientes de E2F, lo anterior mediante la formación de complejo del grupo polycomb (PcG). Se ha visto que las interacciones entre HDACs-RB-E7 son esenciales para mantener la forma episomal del HPV, lo que promueve la producción viral en la fase S de células diferenciadas. Este conjunto de alteraciones, tienen como objetivo permitir la producción viral en células en las cuales no es normalmente posible. De esta manera el HPV interfiere con las vías de señalización y corrompe los controles celulares, promoviendo la transformación de células normales a células cancerosas (Figura 5) [20-30]. *Nota: para ver todas las interacciones reportadas de las proteínas E6 y E7 ver apéndice A, sección Interacciones de E6 y E7.*

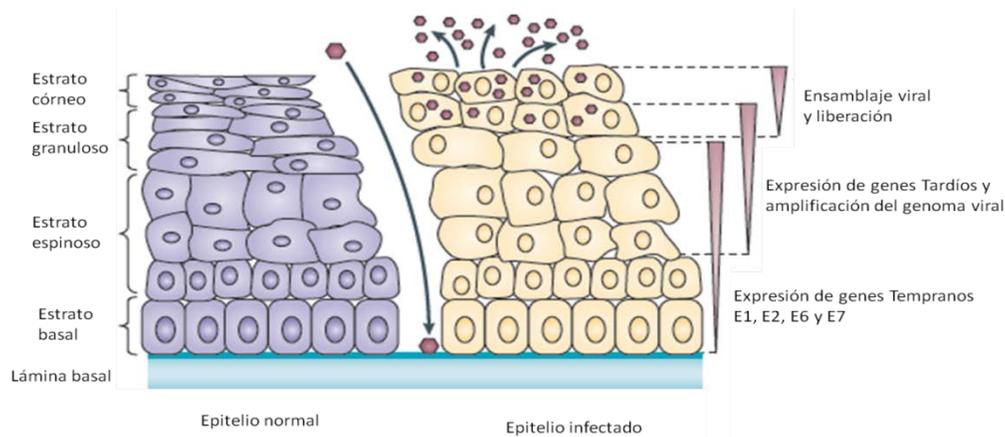


Figura 5. Ciclo de vida del HPV. Una vez que el virus del papiloma humano (HPV) infecta a los epitelios en el estrato basal, el genoma viral se establece en el núcleo de la célula hospedera en forma episomal, con pocas copias, donde se replica en sincronía con la replicación del DNA en el ciclo celular. Cuando una célula de la capa basal se divide, una célula hija migra fuera de la capa basal y experimenta diferenciación, este evento en células HPV+ induce la fase productiva del ciclo viral, que requiere la maquinaria de síntesis de DNA de la célula hospedera. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7, interrumpen varias vías de señalización celular, lo que desregula el ciclo celular, en consecuencia, células terminalmente diferenciadas experimenten la fase S una vez más permitiendo que el genoma viral sea amplificado en células que de otra manera no sería posible. Las proteínas tardías L1 y L2 encápsidan los genomas virales y los nuevos virus son liberados en las capas superiores del epitelio (imagen adaptada de ref. 27).

Vías de señalización celular

Las vías de señalización celular son parte de los complejos sistemas de comunicación inter- e intracelulares, que coordinan las actividades celulares bajo distintos estímulos. Las vías de señalización celular, proveen a las células la habilidad de distinguir y responder correctamente a la información del microambiente, en eventos celulares que incluyen la proliferación, reparación de tejidos, respuesta inmune y homeostasis de un tejido normal. La comunicación celular se lleva a cabo por medio de la transducción de señales, proceso que consiste de dos etapas:

- 1) En la primera una molécula señal se une a un receptor.
- 2) El receptor sufre una alteración que activa a un segundo mensajero, lo que permite que se transmita la señal.

En cada paso, la señal puede ser amplificada, lo que significa que una molécula señal puede causar una amplia gama de respuestas. En la mayoría de las enfermedades como diabetes, enfermedades autoinmunes, enfermedades del corazón y en particular cáncer, surgen como consecuencia de los defectos en la correcta comunicación de estas vías [2].

Para llevar a cabo el proceso de transducción de señales se requiere de una maquinaria especializada, una parte de esta, son los receptores, divididos en intracelulares y extracelulares.

Los **receptores extracelulares**, son proteínas integrales transmembranales, extendidas a lo largo de la membrana plasmática celular, con un dominio expuesto hacia el exterior de la célula y otro hacia el interior. La transducción de señales, inicia con la unión del receptor con su ligando (molécula señal), lo que provoca cambios conformacionales del receptor, que resultan en la activación de su actividad intrínseca (cinasa, fosfatasa, fosfodiesterasa, etc) o la de las enzimas asociadas al receptor o la exposición de sitios de unión para proteínas de señalización intracelular, permitiendo la propagación de la señal a través del citoplasma [31].

En células eucariotas, la mayoría de receptores se activan por la interacción con su ligando, como las tirosina cinasas y las fosfatasas. Algunas tienen actividad enzimática y catalizan la formación de mensajeros secundarios como AMP cíclico (**cAMP**) e inositol trifosfato (**IP3**) los cuales cumplen varias funciones como la liberación de calcio intracelular al citoplasma. Otras proteínas activadas interactúan con proteínas adaptadoras que facilitan la señalización al coordinar los complejos de señalización en respuesta a un estímulo particular. Existen enzimas que se asocian a receptores, también a proteínas adaptadoras, las cuales son responsables de la producción de varias moléculas mensajeras secundarias. Como parte del proceso de transducción de señales muchas proteínas adaptadoras y enzimas son activadas por la unión de mensajeros secundarios específicos. Estas proteínas tienen dominios de unión específica, por ejemplo, los dominios de unión a Ca^{2+} por parte de las anexinas, que permite su unión a membrana y la activación de señalización celular desde la membrana plasmática. PIP3, y otros fosfoinosítoles, tienen la misma función en dominios homólogos de Pleckstrina, como en la proteína cinasa Akt [32-33].

Existe una amplia diversidad de dominios receptores extracelulares, los cuales llevan a cabo la integración de las señales extracelulares y permiten la respuesta fisiológica: Las proteínas G acopladas a receptores de tirosina e histidina cinasas, integrinas, de canales iónicos y tipo Toll [34].
nota: para mayor información revisar Apéndice A sección Receptores extracelulares.

Los **Receptores intracelulares**, son proteínas solubles localizadas en núcleo y citoplasma. Los ligandos típicos de receptores nucleares son hormonas lipídicas, como las hormonas esteroideas y derivados de vitaminas A y D. Los ligandos de receptores intracelulares deben pasar por la membrana plasmática, para unirse a su receptor citoplasmático o nuclear, e iniciar la transducción de señales [35].

La respuesta celular a la transducción de señales incluye la activación génica y cambios metabólicos. Debido a que los genes transcritos pueden incluir factores transcripcionales, un mayor número de genes pueden ser activados. De esta manera, un estímulo puede disparar grandes cambios en la expresión génica, lo que implica importantes cambios en el proteoma celular. La desregulación de las vías de señalización celular en células cancerosas es muy frecuente, por lo cual su entendimiento permitirá conocer mejor su biología y la fabricación de fármacos dirigidos capaces de inhibir únicamente a las células que presenten estas alteraciones [2].

“El conocimiento no es suficiente, debemos aplicar. La voluntad no es suficiente, debemos hacer”

Goethe.

Estudios proteómicos en CaCu

Proteómica

Con la secuenciación del genoma humano, el análisis de la expresión génica en condiciones médicas ha despertado un enorme interés, especialmente en la investigación del cáncer. El estudio de la expresión génica nos permite entender mejor el comportamiento celular tanto en una célula normal como en la célula cancerosa. Sin embargo, frecuentemente no se observa una correlación directa entre la expresión génica a nivel de mensajero con la expresión a nivel proteico. 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 es indispensable conducir estudios de los perfiles proteómicos y de cómo las proteínas se relacionan y controlan los distintos procesos celulares, que nos permitan entender la biología del desarrollo tumoral [36]. El término proteoma se refiere a las proteínas expresadas en una célula, tejido u organismo y el término proteómica se define como el estudio e identificación del proteoma en una condición dada [37].

La proteómica utiliza técnicas de extracción y separación de proteínas para su posterior estudio. La extracción proteica puede ser de un tejido, un fluido o una fracción celular y en general se utilizan métodos específicos para el tejido o fracción de interés. La separación del proteoma se lleva a cabo por distintas metodologías, entre las que destacan la electroforesis en geles de dos dimensiones (**2-D**), la cual separa a las proteínas por dos propiedades fisicoquímicas: El punto isoeléctrico (**pI**) y el peso molecular (**pM**) (Figura 6) [37].

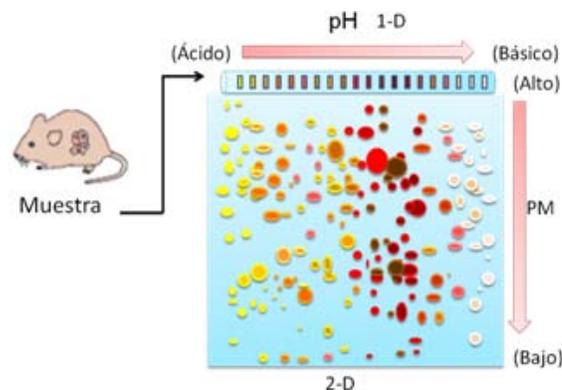


Figura 6. Electroforesis de 2-D. Separación del proteoma por medio de electroforesis bidimensional. Una vez que el proteoma de la muestra biológica a analizar ha sido obtenido, es separada primero por punto isoeléctrico 1-D y después por peso molecular 2-D.

Una vez separadas las proteínas de una muestra compleja, la identificación proteica se basa principalmente en espectrometría de masas (**MS** por sus siglas en inglés) [37]. Un espectrómetro de masas es un instrumento capaz de separar iones moleculares por la diferencia en su proporción

de masa y carga (m/z). Generalmente un espectrómetro de masas consiste en tres componentes: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector de iones. EL MALDI-TOF (**M**atrix-assisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **T**ime-of- **F**light), es un espectrómetro de masas capaz de detectar iones; en una mezcla de iones con la misma carga, los cuales al ser acelerados, aquellos iones con una mayor masa tardan más tiempo en viajar en el vacío, que aquellos iones de menor masa (time-of-flight). Gracias a este principio, la resolución que se alcanza es alta (menos de 1 Dalton de diferencia), este proceso es de gran sensibilidad y precisión. El MALDI-TOF da como resultado la huella digital de la proteína la cual se basa en el peso molecular de los péptidos **PMF** (peptide-mass fingerprinting) [38].

El PMF consiste en un proceso en el cual las proteínas digeridas por proteasas como la tripsina, producen una mezcla de péptidos, los cuales pueden ser identificados por MS y los valores de sus masas dan como resultado una “huella” única de la proteína digerida. Estos valores, son comparados contra las masas de la digestión teórica *in silico*, realizada de las secuencias de genes y genomas reportados, los cuales son almacenados en bases de datos, lo que permite identificar la proteína analizada [37].

Proteómica en cáncer

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, a continuación se describen brevemente algunos estudios proteómicos del cáncer realizados fundamentalmente para la detección de proteínas diferencialmente expresadas las cuales en la mayoría de los casos fueron propuestas como biomarcadores [39].

Cáncer colorectal: se han propuesto cuatro biomarcadores: apolipoproteína C1, complemento C3a des-arg, α 1-antitrypsin y transferrina [40].

Cáncer de mama: Se analizaron 122 carcinomas mamarios invasivos comparándolos contra 167 muestras provenientes de pacientes sanos, logrando identificarse dos biomarcadores: Calciclina y Calgranulina A. Estos biomarcadores además se confirmaron mediante inmunohistoquímica [41].

Cáncer de pulmón: Comparando el suero de 30 pacientes con carcinoma broncogénico primario contra 12 pacientes sanos se identificaron 5 biomarcadores corroborándolos mediante el uso de chips de proteínas [42].

Cáncer de próstata: Analizando y comparando el suero de 246 hombres con cáncer de próstata y 99 hombres sanos. Tres proteínas fueron identificadas como biomarcadores: PC-1, PC-2, PC-3. Comprobadas con el uso de chips de proteínas [43].

Cáncer de ovario: Con el uso de tejidos microdisectados de tumores invasivos y no invasivos. Se identificaron proteínas diferencialmente expresadas que incluyen las proteínas FK506, inhibidor de disecación Rho, proteína-G y glioxilasa, los cuales fueron propuestos como biomarcadores para distinguir entre cáncer de ovario invasivo y no invasivo [44].

Proteómica en cáncer cérvico uterino

El perfil proteómico del CaCu ha sido abordado en varios estudios:

- En el 2005 Yoon Pyo Choi et al., analizaron seis biopsias de cáncer escamoso cervical y utilizaron la línea celular HaCat como control, en su procedimiento separaron la sección citoplasmática y nuclear; encontraron 5 proteínas reprimidas y 26 sobre-expresadas en la fracción nuclear, y 11 proteínas reprimidas y 22 sobre-expresadas en la fracción citoplasmática [45].
- En el 2005, Su Mi Baea y Chang-Hun Lee, usaron geles 2-D y MALDI-TOF MS, para analizar 33 biopsias de cáncer escamosos cervical y 17 biopsias de individuos sanos, identificaron 12 proteínas sobre-expresadas y 11 reprimidas [46].
- En el 2008 Xueqiong Zhu y Jieqiang Lv, utilizaron 10 biopsias de cáncer escamoso cervical y su tejido normal adyacente, comparando sus perfiles proteómicos y encontraron 8 proteínas sobre-expresadas, y 11 proteínas reprimidas [47].
- En el laboratorio de Proteómica del CCG, 2006-2010, se estableció la cinética de crecimiento de la línea celular HeLa en ratones desnudos *Nu/Nu* [48].
- En el laboratorio de Proteómica del CCG, 2006-2010, se estableció el “Núcleo central” del proteoma de seis líneas de cáncer cérvico uterino [49].
- Por último En el en el 2011 se analizaron 5 proteínas identificadas en varios estudios proteómicos, estableciendo los niveles de expresión en etapas secuenciales del CaCu, evaluando su posible aplicación clínica como biomarcadores y su implicación en la prognosis [50].

Los distintos estudios proteómicos del CaCu muestran incongruencias entre las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas [45-47]. Esto puede deberse principalmente al uso de diferentes estadios del desarrollo tumoral, dado a que cada estudio, utilizó diferentes nomenclaturas del CaCu y también, a que las biopsias utilizadas contienen componentes estromales diferenciales, además, no se tomaron en cuenta factores como la edad, estado hormonal, raza, diferencias genéticas y medio ambientales de los pacientes. Esta variación experimental no permite comparar los resultados. Las proteínas diferencialmente expresadas en el desarrollo del CaCu deben ser integradas al estudiar tiempos específicos en una dinámica controlada.

“La realidad está determinada no por lo que los científicos o alguien más dice o cree, sino por lo que la evidencia nos revela”

Alan Hale

Modelos de estudio en CaCu

El estudio de la biología del cáncer puede ser abordado por medio de biopsias, las cuales representan el estado patológico real de un tumor *in vivo* y puede ayudar a definir cuáles son los cambios biológicos generales en un tumor. Sin embargo, la interpretación de los resultados debe ser tomada con precaución, por la compleja heterogeneidad que una biopsia implica. Este tipo de muestras representan solo un punto de la evolución del desarrollo tumoral y no reflejan su dinámica a través del tiempo. Bioéticamente las muestras humanas de tumores no son sujetas a experimentación controlada, por lo cual el uso de modelos es necesario, los cuales permiten:

- Obtener 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 fenómeno del cáncer.

Entre los modelos que destacan son el uso de líneas celulares y modelos murinos, 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 [51].

Líneas celulares

Las líneas celulares son referidas como modelos *in vitro* y han sido utilizadas en la investigación biomédica por más de 60 años y han aportado valiosos conocimientos en el entendimiento de la biología del cáncer. Las líneas celulares cancerosas conservan las marcas del cáncer, son de un solo tipo celular, se propagadas de manera rápida, son genéticamente 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:

- Permiten tener un control preciso del medio ambiente: pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂ y humedad, entre otras.
- Control sobre densidad celular.
- Composición homogénea de la muestra: células con un fenotipo y genotipo muy similar y un número casi ilimitado de material de trabajo, lo que ayuda a superar el grave problema de la heterogeneidad del uso de biopsias.
- 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, en comparación con el uso de animales de prueba.

- 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 consistentes. 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 resultado *in vivo*.
- Los complejos sistemas hormonales de un sistema vivo no pueden ser incluidos en este tipo de cultivos.
- El crecimiento celular tridimensional no puede ser totalmente reproducido.
- El microambiente no puede estar presente en este tipo de cultivos.

Entre las líneas celulares que mas aportes a la biología han ofrecido es la línea celular HeLa, que fue obtenida de una mujer de 31 años de ascendencia africana, de un adenocarcinoma cervical que presenta HPV-18. El análisis citogenéticos muestra que la línea suele presentar un número modal de 82 cromosomas con un rango de 70 a 164 cromosomas [52]. Las células HeLa han sido cultivadas por más de 50 años y son un modelo de estudio esencial en la biología. Una de las características que destacan de esta línea, es el hecho de que, en modelos de ratón inmunocomprometidos son capaces de formar tumores [51-53].

El modelo murino y el caso del ratón atímico *Nu/Nu*

La especie animal más utilizada en experimentación científica es el ratón (*Mus musculus*). El cual a su vez se ha convertido en uno de los sistemas modelo de experimentación de mayor uso para el entendimiento de los mecanismos moleculares del cáncer y también en el 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 uso del modelo del ratón tiene tanto ventajas como desventajas, pero con una cuidadosa planeación y la correcta interpretación de los resultados obtenidos en el ratón, lo vuelven una herramienta indispensable en el estudio del cáncer [51].

El descubrimiento del ratón “nude” fue un punto de inflexión sumamente importante para la investigación del cáncer. El primer ratón *Nu/Nu* fue descubierto en 1937 por el criador Miroslav Holub, desde entonces más de 70 cepas de ratones desnudos han sido generadas y las diferencias inmunológicas han sido descritas [¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.].

Originalmente fueron descritos como ratones *Nu* (por las primeras dos letras de la palabra *Nude*), pero posteriormente se les llamo Hfh11nu, cuando el gene homologo *HNF-3/forkhead* del cromosoma 11 fue identificado como el causante de esta condición. En el 2000, este gene fue identificado como miembro de la familia génica *Fox* y la nomenclatura cambio nuevamente a *Foxn1nu* [51].

Este tipo de ratón es llamado *ratón desnudo atímico*, debido a la presencia de dos copias defectuosas del gene *Nu*, que no permiten el desarrollo normal del timo, lo que imposibilita la correcta formación de linfocitos T maduros y por lo tanto la incapacidad de montar 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 tejidos, 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. Sin embargo, es conveniente mencionara que las células B complementarias del sistema inmune están presentes y son funcionales [51].

Adicionalmente, los ratones *Nu/Nu*, presentan niveles elevados de macrófagos, células NK y una respuesta normal por células del sistema independientes a las células T. No se ha reportado un defecto en la producción células LAK (*lymphokine-activated killer*). Gracias a estas características, los ratones desnudos son un excelente modelo para el estudio de tejidos cancerosos trasplantados o la inoculación con células formadoras de tumores [3, 51].

Cuando una línea celular cancerosa es inoculada en ratones *Nu/Nu*, se le conoce como cultivo *in vivo*, o tumor xenógrafo el cual ofrece las ventajas de ambos modelos, tabla 2 [53]:

Tabla 2. 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 ₂ 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

El estudio del cáncer cérvico uterino ha sido abordado con metodologías genómicas a nivel transcriptómico para establecer los cambios de expresión génica a nivel de mensajero, no obstante, frecuentemente existe baja correlación entre la expresión génica a nivel de mensajero y la expresión proteica [36,54-56]. Los estudios proteómicos han identificado proteínas diferencialmente expresadas en el CaCu, sin embargo, existe inconsistencia entre los estudios y la mayoría de estas proteínas carece de comprobación experimental, además presentan una heterogeneidad intrínseca a los pacientes (edad, estado hormonal, genética, medio ambiente del individuo), o a las biopsias (contenido estromal diferencial, distintas etapas de desarrollo, tipo de cáncer) y del tipo de control utilizado en cada estudio, ya sean líneas celulares, biopsias no cancerosas o tejido adyacente no canceroso. Esta diversidad de análisis no permite identificar aquellos cambios necesarios en el desarrollo y progresión tumoral. Como resultado, la biología de la dinámica del desarrollo tumoral a nivel de proteoma permanece desconocida [45,47].

Una manera de evitar la heterogeneidad humana es con el uso de líneas celulares, lo que permite estudiar las características del CaCu, sin embargo, durante el desarrollo tumoral, la presencia del microambiente es esencial, el cual se compone de la ME, células endoteliales, estromales e inflamatorias, así como las complejas interacciones de estas y las células tumorales. Debido a esto los modelos *in vitro* son incapaces de ofrecer las complejas interacciones autócrinas y parácrinas del microambiente, así como las estructuras tridimensionales que los tumores adquieren y que son responsables en gran parte del desarrollo tumoral [5, 6, 9, 51,52].

Para entender los cambios del proteoma durante el desarrollo tumoral de las células cancerosas, es indispensable el uso de un modelo biológico dinámico que reproduzca las complejas interacciones del microambiente a lo largo de este proceso y minimice al mismo tiempo la variación entre las muestras. Una resolución parcial, es generando tumores de células HeLa inoculadas en ratones de la cepa *Nu/Nu*, que recrean las complejas interacciones del microambiente, condiciones de espacio, nutrientes, estructura y desarrollo tumoral a través del tiempo. En conjunto, esto permitirá tener un ambiente controlado, una variación genética baja de los ratones utilizados como hospederos para la inoculación de las células cancerosas, las cuales también tendrán una variación genética baja, la presencia del microambiente, un sistema hormonal y un desarrollo tumoral controlado en tiempo y espacio, lo que permitirá minimizar la variación entre las muestras analizadas, y como resultado serán establecidos cuáles son los cambios en el proteoma durante el desarrollo tumoral a través del tiempo [37,51,53].

Hipótesis

Los cambios en la expresión del proteoma permiten a las células cancerosas adaptarse a su microambiente durante el desarrollo tumoral, y estos cambios pueden ser identificados en tumores derivados de la línea celular HeLa (HPV-18+) en ratones hembras de la cepa *Nu/Nu*.

Objetivo General

Analizar los perfiles proteómicos durante el desarrollo de tumores derivados de la línea celular HeLa (HPV-18+), utilizando geles de 2-D y la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas por medio de espectrometría de masas.

Objetivos Particulares

1. Definir el perfil proteómico del desarrollo tumoral a los 30, 45 y 50 días, posterior a la inoculación de la línea celular HeLa en ratones *Nu/Nu*.
2. Establecer las diferencias en la expresión proteica entre los tres tiempos de la línea analizados.
3. Identificar mediante espectrometría de masas las proteínas diferencialmente expresadas, entre los tres tiempos de la línea celular HeLa.
4. Proponer las posibles funciones biológicas de las proteínas identificadas durante el desarrollo tumoral.

Material y métodos

Diseño de metodología:

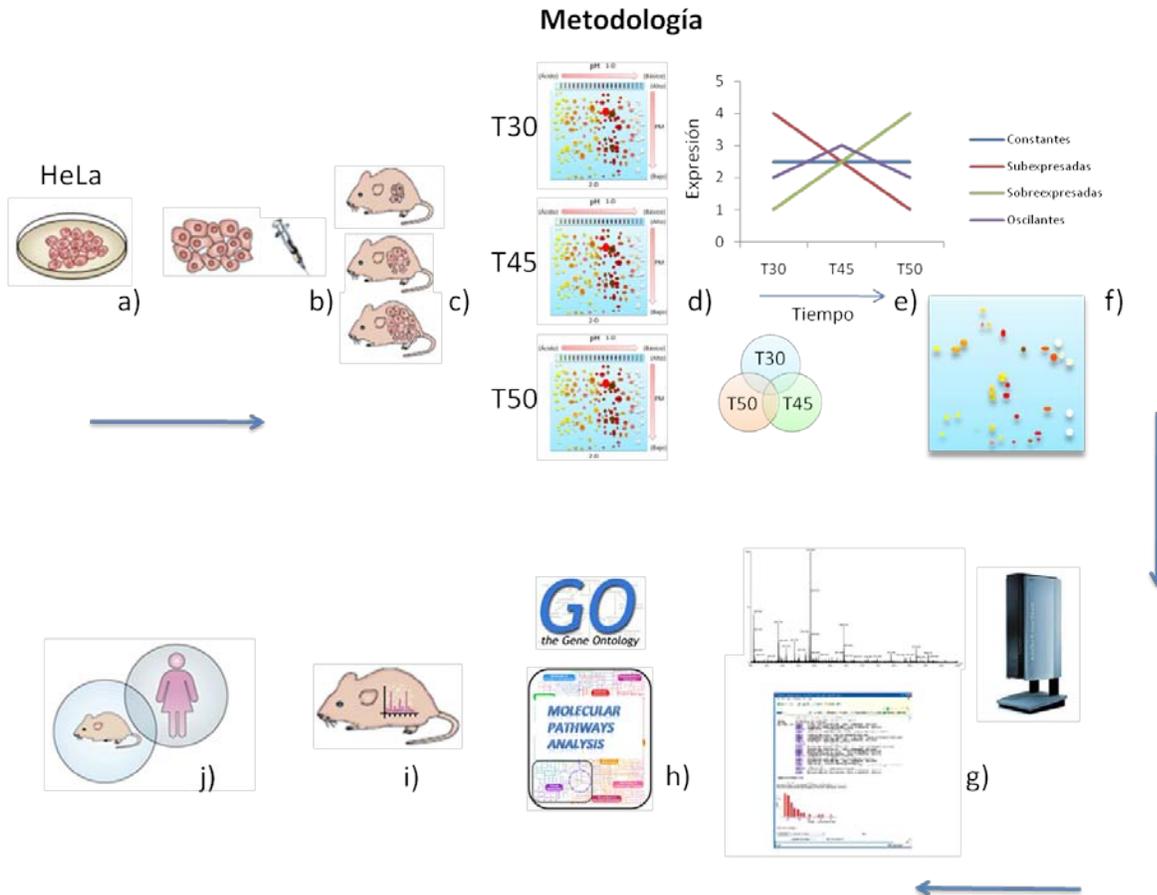


Figura 7. Metodología. a) Las células Hela fueron cultivadas hasta un 70-80% de confluencia, b) cosechadas e inoculadas en ratones hembra de la cepa *Nu/Nu*. c) Se cosecharon los tumores a tres tiempos (30, 45 y 50 días posteriores a la inoculación). d) Se obtuvo el perfil proteómico de cada tiempo. e-f) Se compararon los perfiles proteómicos para encontrar las proteínas diferencialmente expresadas en el desarrollo tumoral. g) Las proteínas fueron identificadas por medio de MALDI-TOF y el uso de PMF con MASCOT. h) Se analizaron los resultados por medio de un enfoque de redes y el uso de GOs y rutas de interacciones. i-j) Análisis de la literatura para entender y proponer aquellos cambios que suceden a lo largo del desarrollo tumoral del modelo y su posible intersección con el desarrollo tumoral del CaCu en el humano.

Cultivo celular

La línea celular HeLa se cultivo 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 cm³ (Nunclon, Dinamarca) con una concentración constante de CO₂ al 5%, una temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad.

Tumores de CaCu

Las células en cultivo en fase exponencial a una confluencia aproximada de 80-90% fueron cosechadas con solución de verseno. Se colocaron las células en tubos de 50mL y se centrifugo a 1,500xg por 5 minutos. Se retiro 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 resuspendiadas y se agregaron 2μL de azul tripano, se agito sutilmente y se incubo por 30 segundos, después se colocaron los 12μL en la cámara Neubauer y se observo al microscopio. Se contaron las células presentes en los cuadrantes y el número de células fue estimado con la formula:

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

Una vez contadas las células se procedió a la inoculación, bajo condiciones de esterilidad, de ratones *Nu/Nu* hembras con un rango de edad de 4 a 8 semanas. Se inyectaron intradérmicamente un número aproximado de 1x10⁷ 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, agregando un coctel de inhibidores de proteasas (Roche Germany, AC). La extracción proteica se realizo mediante extracción fenólica y su cuantificación se llevo 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.* [57]. La primera dimensión fue preparada con un gradiente de anfólitos 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 comparadas utilizando el software PDQuest 8.01 (Bio-Rad, CA). Para comparar las tres replicas experimentales pertenecientes a los tres tiempos (3 geles T30, 3 geles T45 y 3 geles T50) se utilizó el software PDQuest 8.01 (Bio-Rad, AC), con el cual se obtuvo una imagen virtual que resume la información de las replicas experimentales en un solo gel virtual llamado “gel maestro”. Se tomo como identidad electroforética valida, 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, se procedió a la identificación de las proteínas, se utilizó el protocolo descrito por Encarnación S., *et al.* Las proteínas fueron recortadas de geles 2-D, alquiladas, reducidas y digeridas con tripsina [57]. Después fueron montadas en la placa de análisis del MALDI-TOF, donde se obtuvieron los espectros de masas. Una vez obtenidas las PFM, se obtuvieron las identidades proteicas con el uso de MASCOT y la base de datos SwissProt 2010_11, con los siguientes parámetros de búsqueda:

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	: ± 200 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 se construyeron de manera bioinformática con 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 de cada categoría como: constantes, sobre-expresadas, sub-expresadas y oscilantes. Agregando conexiones a los nodos ingresados con los siguientes parámetros [58, 59]:

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 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 llevo 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 3, 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 tomo como punto de corte un valor $p < 1 \times 10^{-9}$ para las proteínas constantes, sobre-expresadas, sub-expresadas y oscilantes [60].

Análisis de enriquecimiento de vías de interacción

El análisis de enriquecimientos de rutas de interacción, se llevo 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 tomo como punto de corte un valor $p < 1 \times 10^{-7}$ y un solapamiento de vía mínimo de 5, para las proteínas constantes, sobre-expresadas, sub-expresadas y oscilantes [60].

“Para obtener un completo entendimiento de la biología del cáncer y ser capaces de llevar esta información a la clínica, se requiere de una substancial información acerca del proteoma a través del curso de esta enfermedad”

Anónimo 2010

Resultados

Los tiempos a los cuales los tumores fueron cosechados se realizaron en base a la cinética de crecimiento tumoral de la línea celular HeLa, la cual muestra en los días 1 al 25 un crecimiento lento (estos tiempos no fueron tomados debido a que es un periodo en el que el tumor se establece), pero, durante los días 30 a 50 se observó un crecimiento muy acelerado, siendo entre los días 45-50 días, cuando se encontró el mayor cambio [48]. Se tomó como referencia los volúmenes de los tumores con la fórmula $V=3.1614/6 \times L \times W \times H$ [61]. Los ratones *Nu/Nu* hembras fueron inoculados dentro de un rango de edad de 4-8 semanas. El volumen promedio para los tumores de 30 días fue de $V = 73.3 \text{ mm}^3 \pm 36.82 \text{ mm}^3$, para 45 días $V = 136.13 \text{ mm}^3 \pm 36.18 \text{ mm}^3$ y a los 50 días una media de $V = 448.6 \text{ mm}^3 \pm 186.18 \text{ mm}^3$. *Nota, para mayor información revisar Apéndice E: Resultados suplementarios, Tabla 1 Medidas de los tumores.*

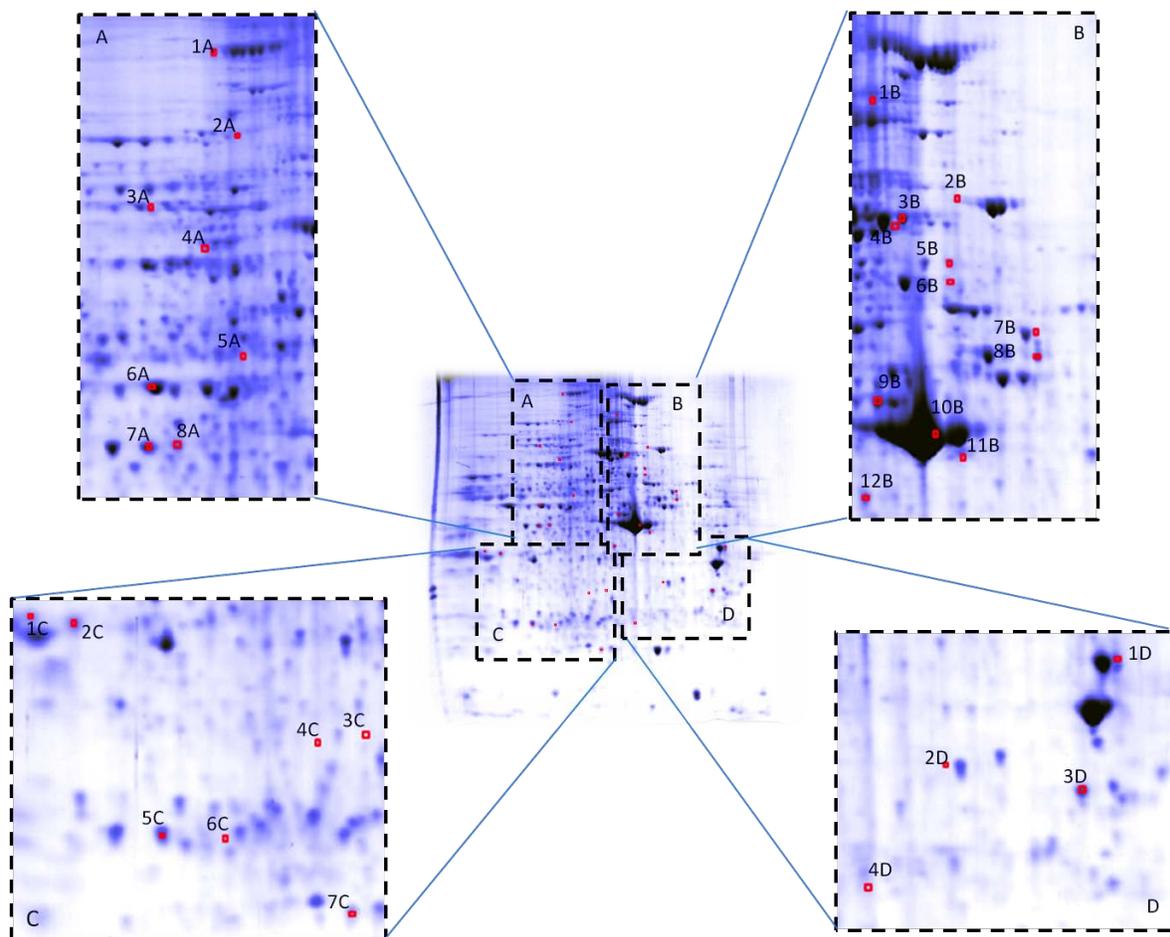
Una vez colectados los tumores y medido sus parámetros, se obtuvieron sus perfiles proteómicos por geles de 2-D. Se analizaron 120 entidades electroforéticas como diferencialmente expresadas, y se identificaron 31 proteínas por medio de MALDI-TOF las cuales fueron agrupadas dependiendo del patrón de expresión a través del tiempo como: constantes, sobre-expresadas, sub-expresadas, oscilantes sobre-expresadas, oscilantes sub-expresadas (ver tabla 3, Figuras 8-13). *Nota: Para observar individualmente cada proteína identificada ver apéndice D, Proteínas identificadas.*

Tabla 3. Proteínas identificadas por medio de MALDI-TOF, MASCOT y la base de datos Swissprot_2011

Expresión	Nombre	Identificador de Swissprot	Puntaje MASCOT	valor-p
Constantes	Proteína de choque térmico mitocondrial de 60kDa	CH60_HUMAN	74	3.30E-03
	Esteroido 21-Hidroxilasa	CP21A_HUMAN	67	3.70E-03
	Enolasa- α	ENOA_HUMAN	92	3.80E-05
	Ferritina de cadena ligera 1	FRIL1_MOUSE	89	7.50E-05
	Beta inhibidor de disociación de GDP Rab	GDIB_HUMAN	83	3.40E-04
	Girdina	GRDN_HUMAN	73	3.50E-03
	Dominio homólogo a pleckstrina contenedor del miembro 2 familia A	PKHA2_HUMAN	66	2.30E-02
	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
	Subunidad 1 del Factor de iniciación eucariótico 3	EIF3I_HUMAN	83	3.00E-04
	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa	GRP78_HUMAN	189	8.20E-15
	Proteína beta de choque termico-1	HSPB1_HUMAN	123	3.30E-08
	Factor de iniciación eucariótico 4A-1	IF4A1_HUMAN	134	2.90E-09
	Cadena alfa 3 de tropomiosina	TPM3_HUMAN	65	2.00E-02

Sobre- expresadas	Gliceraldehído 3 fosfato	G3P_HUMAN	79	8.40E-04
	Glutación S-transferasa Mu 3	GSTM3_HUMAN	81	5.70E-04
Oscilantes Sobre- expresadas	Anexina A5	ANXA5	65	2.10E-02
	N(G), N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1	DDAH1_HUMAN	64	3.70E-02
	FAM50A	FA50A_HUMAN	65	3.70E-02
	Proteína cognado de choque térmico de 71 kDa	HSP7C_HUMAN	134	2.60E-09
	Proteína de choque térmico 1A/1B de 70 kDa	HSP71_HUMAN	78	9.40E-04
	Fosforilasa de nucleósido Purina	PNPH_MOUSE	109	8.20E-07
	Vimentina	VIME_HUMAN	166	1.60E-12
Oscilantes Sub- expresadas	Actina alfa de musculo cardiaco 1	ACTC_HUMAN	85	2.20E-04
	Factor de degradación de insulina	IDE_MOUSE	90	6.70E-05
	Creatina cinasa tipo M	KCRM_MOUSE	91	5.10E-05
	Triosa fosfato isómerasa	TPIS_MOUSE/ HUMAN	70	7.00E-03
	Cadena beta de tropomiosina	TPM2_MOUSE/ HUMAN	71	5.30E-03

Figura 8. Proteínas identificadas y su posición en gel 2-D.



Sección A	SwissprotID	Sección B	SwissprotID	Sección C	SwissprotID	Sección D	SwissprotID
1A	CO6A2_MOUSE	1B	HSPB1_HUMAN	1C	G3P_HUMAN	1D	TPM2_MOUSE/HUM
2A	FA50A_HUMAN	2B	GRP78_HUMAN	2C	ANXA2_HUMAN	2D	ANXA5
3A	DDX3X_HUMAN	3B	HSP7C_HUMAN	3C	PNPH_MOUSE	3D	TPM3_HUMAN
4A	DDAH1_HUMAN	4B	HSP71_HUMAN	4C	CP21A_HUMAN	4D	GSTM3_HUMAN
5A	GDIB_HUMAN	5B	PKHA2_HUMAN	5C	TPIS_HUMAN		
6A	ENOA_HUMAN	6B	CH60_HUMAN	6C	TPIS_MOUSE/HUM		
7A	KCRM_MOUSE	7B	VIME_HUMAN	7C	FRIL1_MOUSE		
8A	IDE_MOUSE	8B	GRDN_HUMAN				
		9B	IF4A1_HUMAN				
		10B	ACTS_HUMAN				
		11B	ACTC_HUMAN				
		12B	EIF31_HUMAN				

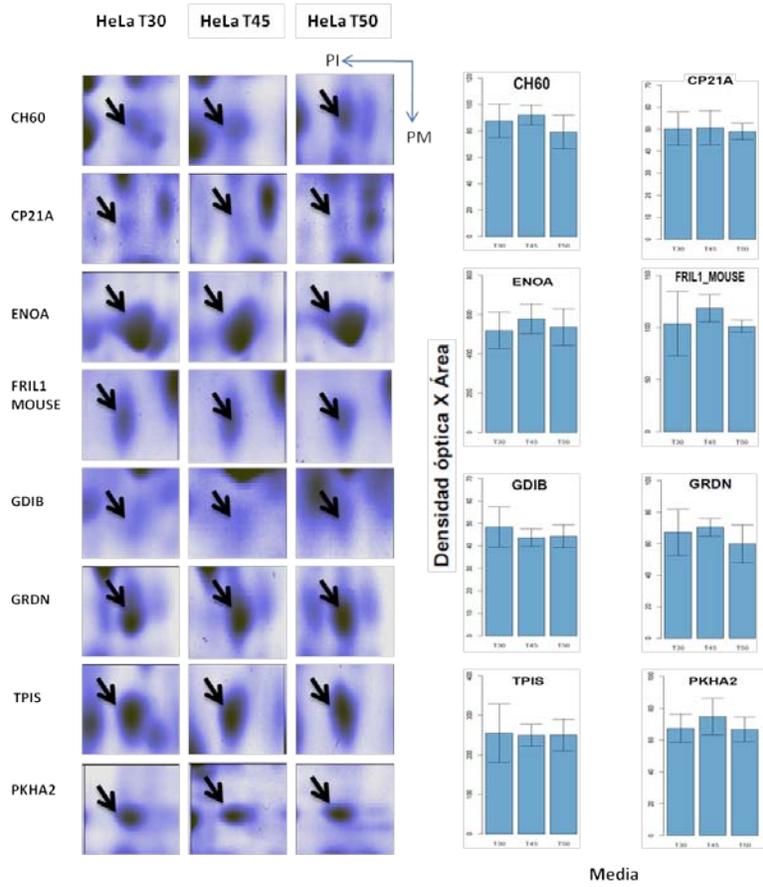


Figura 9. Proteínas Constantes. Se muestra la identidad electroforética identificada, y su media con barras de error.

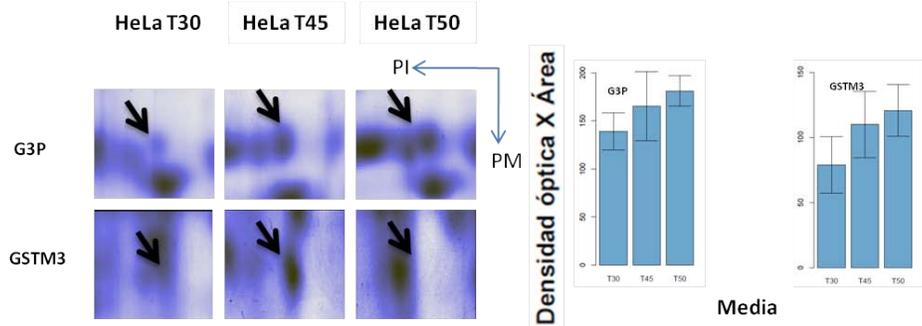


Figura 10. Proteínas Sobre-expresadas. Se muestra la identidad electroforética identificada, y su media con barras de error.

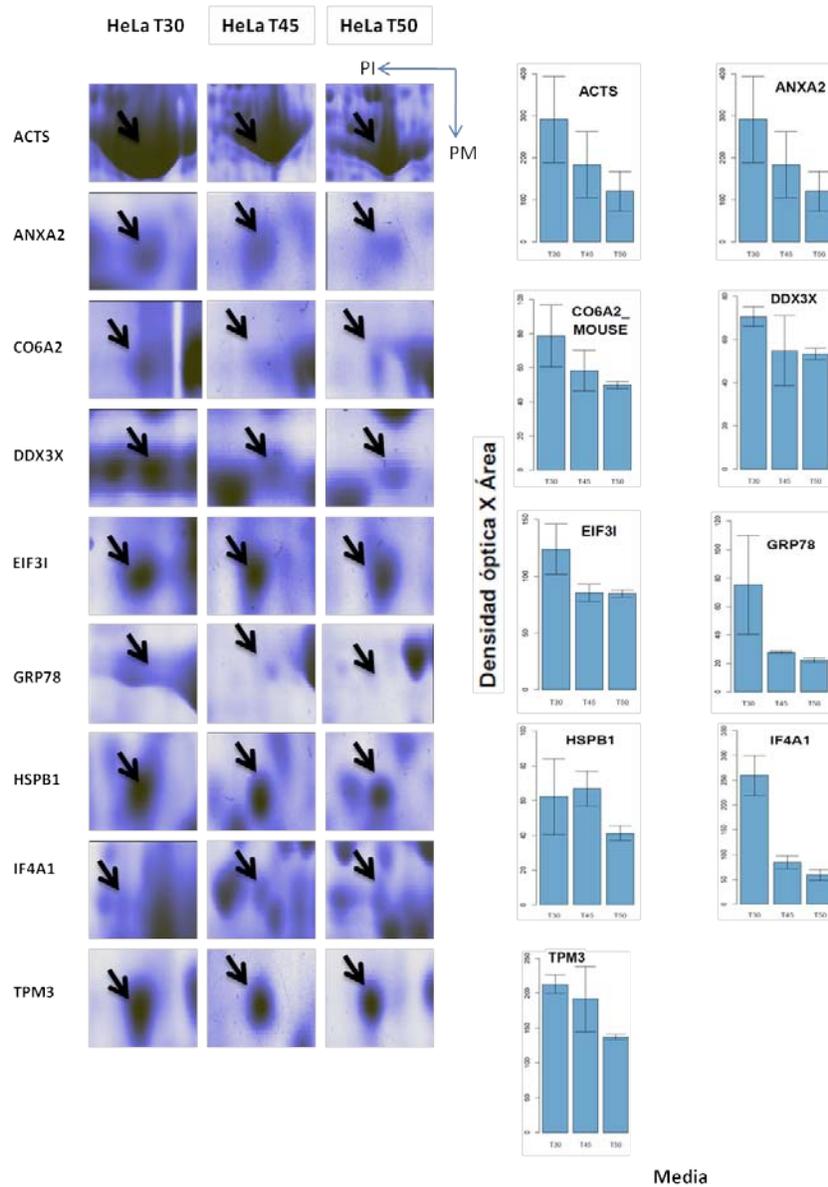


Figura 11. Proteínas Subexpresadas. Se muestra la identidad electroforética identificada, y su media con barras de error.

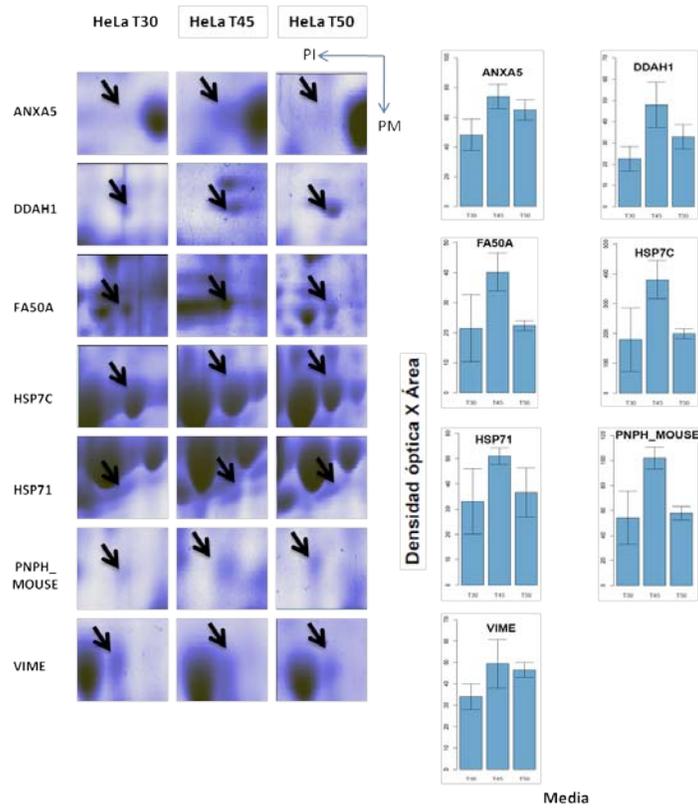


Figura 12. Proteínas Oscilantes Sobre-expresadas. Se muestra la identidad electroforética identificada, y su media con barras de error.

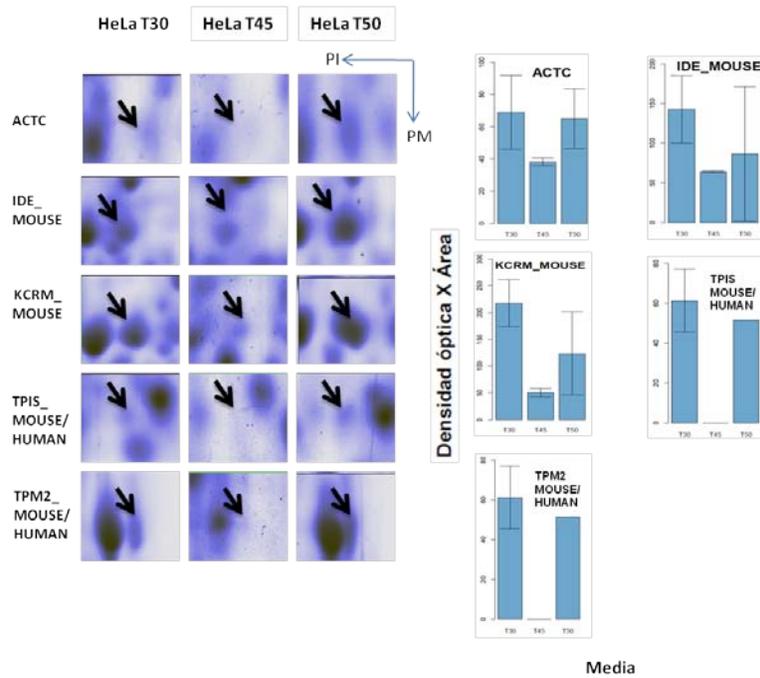


Figura 13. Proteínas Oscilantes Sub-expresadas. Se muestra la identidad electroforética identificada, y su media con barras de error.

Para entender el comportamiento del proteoma en el desarrollo tumoral, se uso un enfoque de redes de las proteínas identificadas en cada categoría. Este análisis consistió en interacciones Proteína-Proteína utilizando como anzuelo¹ a las proteínas identificadas, agrupándolas según su expresión, en Cytoscape con ayuda del plug-in BisoGenet para la generación de redes, con expansión a un vecino e interacciones proteína-proteínas (PPI) (ver tabla 4), aquí las proteínas fueron tomadas como solo pertenecientes al ser humano, esto nos permitió recuperar mayor información y consideramos que, si bien la proteína diferencialmente expresada tiene un origen murino, es probable que esta proteína desarrolle un papel funcional similar en el humano.

Tabla 4. Número de nodos obtenidos por medio de Cytoscape y BisoGenet.

Categoría	Anzuelos usados	Nodos totales
Constantes	8	110
Sub-expresadas	9	348
Sobre-expresadas	2	88
Oscilantes Sobre-expresadas	7	336
Oscilantes Sub-expresadas	5	75

Con las redes formadas, se buscó aquellas proteínas con las cuales interactúan las proteínas encontradas en este análisis, 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 tomando las primeras 10 funciones mejor representadas obteniendo los siguientes resultados (ver tablas 5-9).

Tabla 5. Ontologías Génicas de las proteínas Constantes.

Termino de Ontología Génica	Categoría nivel	Tamaño de grupo	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q
GO:0023034 intracellular signaling pathway	BP 3	1699	75 (4.4%)	1.04E-028	4.19E-026
GO:0010033 response to organic substance	BP 3	1072	61 (5.7%)	1.71E-028	4.19E-026
GO:0023014 signal transmission via phosphorylation event	BP 3	736	52 (7.1%)	2.21E-028	4.19E-026
GO:0012501 programmed cell death	BP 3	1321	66 (5.0%)	8.50E-028	1.21E-025
GO:0010941 regulation of cell death	BP 3	1115	61 (5.5%)	1.48E-027	1.68E-025
GO:0007165 signal transduction	BP 3	2445	87 (3.6%)	1.98E-027	1.88E-025
GO:0050790 regulation of catalytic activity	BP 3	1044	58 (5.6%)	2.10E-026	1.56E-024
GO:0006793 phosphorus metabolic process	BP 3	1492	68 (4.6%)	2.20E-026	1.56E-024
GO:0023060 signal transmission	BP 3	2770	90 (3.2%)	1.10E-025	6.92E-024
GO:0043412 macromolecule modification	BP 3	1991	76 (3.8%)	4.82E-025	2.74E-023

¹Proteína 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.

Tabla 6. Ontologías Génicas de las proteínas Sub-expresadas.

Termino de Ontología Génica	Categoría nivel	Tamaño de grupo	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q
GO:0012501 programmed cell death	BP 3	1321	143 (10.8%)	1.78E-044	1.18E-041
GO:0010941 regulation of cell death	BP 3	1115	126 (11.3%)	1.35E-040	4.48E-038
GO:0035466 regulation of signaling pathway	BP 3	1124	122 (10.9%)	2.22E-037	4.90E-035
GO:0023034 intracellular signaling pathway	BP 3	1699	151 (8.9%)	1.10E-036	1.83E-034
GO:0007010 cytoskeleton organization	BP 3	579	85 (14.7%)	3.92E-035	5.20E-033
GO:0007165 signal transduction	BP 3	2445	182 (7.4%)	6.72E-035	7.42E-033
GO:0010646 regulation of cell communication	BP 3	1275	126 (9.9%)	1.72E-034	1.63E-032
GO:0023014 signal transmission via phosphorylation event	BP 3	736	93 (12.6%)	3.54E-033	2.93E-031
GO:0023060 signal transmission	BP 3	2770	190 (6.9%)	7.47E-032	5.50E-030
GO:0019538 protein metabolic process	BP 3	2969	197 (6.6%)	2.50E-031	1.66E-029

Tabla 7. Ontologías Génicas de las proteínas Sobre-expresadas.

Termino de Ontología Génica	Categoría nivel	Tamaño de grupo	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q
GO:0006793 phosphorus metabolic process	BP 3	1492	58 (3.9%)	1.40E-023	8.06E-021
GO:0023014 signal transmission via phosphorylation event	BP 3	736	41 (5.6%)	9.08E-022	2.60E-019
GO:0012501 programmed cell death	BP 3	1321	52 (3.9%)	4.55E-021	8.71E-019
GO:0010033 response to organic substance	BP 3	1072	47 (4.4%)	9.11E-021	1.12E-018
GO:0007165 signal transduction	BP 3	2445	69 (2.8%)	9.79E-021	1.12E-018
GO:0043412 macromolecule modification	BP 3	1991	62 (3.1%)	2.37E-020	2.26E-018
GO:0010035 response to inorganic substance	BP 3	316	28 (8.9%)	4.26E-020	3.49E-018
GO:0002764 immune response-regulating signaling pathway	BP 3	105	19 (18.1%)	8.52E-020	5.73E-018
GO:0023060 signal transmission	BP 3	2770	72 (2.6%)	8.99E-020	5.73E-018
GO:0023051 regulation of signaling process	BP 3	866	41 (4.7%)	3.66E-019	2.10E-017

Tabla 8. Ontologías Génicas de las proteínas Oscilantes sobre-expresadas.

Termino de Ontología Génica	Categoría nivel	Tamaño de grupo	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q
GO:0012501 programmed cell death	BP 3	1321	137 (10.4%)	4.59E-043	2.57E-040
GO:0010941 regulation of cell death	BP 3	1115	116 (10.4%)	6.44E-036	1.80E-033
GO:0019538 protein metabolic process	BP 3	2969	193 (6.5%)	6.88E-033	1.29E-030
GO:0044260 cellular macromolecule metabolic process	BP 3	5344	272 (5.1%)	3.58E-032	5.02E-030
GO:0048518 positive regulation of biological process	BP 3	2465	170 (6.9%)	4.13E-031	4.62E-029
GO:0023014 signal transmission via phosphorylation event	BP 3	736	87 (11.8%)	1.62E-030	1.51E-028
GO:0048519 negative regulation of biological process	BP 3	2193	157 (7.2%)	4.28E-030	3.43E-028
GO:0010033 response to organic substance	BP 3	1072	104 (9.7%)	2.49E-029	1.73E-027
GO:0043412 macromolecule modification	BP 3	1991	147 (7.4%)	2.77E-029	1.73E-027
GO:0031325 positive regulation of cellular metabolic process	BP 3	1141	107 (9.4%)	5.75E-029	3.22E-027

Tabla 9 Ontologías Génicas de las proteínas Oscilantes sub-expresadas.

Termino de Ontología Génica	Categoría nivel	Tamaño de grupo	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q
GO:0007010 cytoskeleton organization	BP 3	579	32 (5.5%)	4.61E-020	2.48E-017
GO:0048659 smooth muscle cell proliferation	BP 3	80	14 (17.5%)	4.57E-016	1.23E-013
GO:0010035 response to inorganic substance	BP 3	316	21 (6.6%)	8.11E-015	1.46E-012
GO:0010941 regulation of cell death	BP 3	1115	34 (3.0%)	1.72E-013	2.31E-011
GO:0010033 response to organic substance	BP 3	1072	33 (3.1%)	3.37E-013	3.00E-011
GO:0051017 actin filament bundle assembly	BP 3	60	11 (18.3%)	4.32E-013	3.00E-011
GO:0003012 muscle system process	BP 3	261	18 (6.9%)	4.38E-013	3.00E-011
GO:0051050 positive regulation of transport	BP 3	343	20 (5.8%)	4.45E-013	3.00E-011
GO:0009888 tissue development	BP 3	895	30 (3.4%)	6.24E-013	3.73E-011
GO:0012501 programmed cell death	BP 3	1321	36 (2.7%)	7.64E-013	4.11E-011

Una vez que se obtuvieron los GOs sobrerrepresentados, el evento de señalización celular fue el que mayor número de veces se encontró, por lo cual se procedió a buscar aquellas vías de interacciones biológicas que puedan estar involucradas con las proteínas identificadas, utilizando para esto, el programa ConsecusPathDB (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>) y el análisis de enriquecimientos de rutas de interacción. Solo se tomaron las 10 vías de interacciones mejor representadas (ver tablas 10-14 y métodos).

Tabla 10. Vías de interacción de las proteínas Constantes.

Nombre de la vía de interacción	Tamaño de la vía	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q	Fuente de la vía
MAPK signaling pathway	161	16 (10.0%)	4.08E-09	2.67E-06	Wikipathways
IL-6 Signaling Pathway	100	11 (11.0%)	4.6E-07	7.50E-05	Wikipathways

Tabla 11. Vías de interacción de las proteínas Sub-expresadas

Nombre de la vía de interacción	Tamaño de la vía	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q	Fuente de la vía
TNF-alpha-NF-κB Signaling Pathway	187	42 (22.6%)	3.30E-019	7.49E-017	Wikipathways
MAPK signaling pathway	161	35 (21.9%)	1.01E-015	1.14E-013	Wikipathways
keratinocyte differentiation	59	20 (37.7%)	2.12E-014	1.93E-012	BioCarta
Integrin	27	15 (55.6%)	3.29E-014	2.49E-012	INOH
EGFR1 Signaling Pathway	177	34 (19.2%)	1.52E-013	9.87E-012	Wikipathways
IL6	71	21 (29.6%)	1.20E-012	6.81E-011	NetPath
B cell receptor signaling	37	14 (40.0%)	7.25E-011	3.01E-009	INOH
Translation Factors	50	16 (32.0%)	1.62E-010	5.64E-009	Wikipathways
RIG-I/MDA5 mediated induction of IFN-alpha/beta pathways	50	16 (32.0%)	1.62E-010	5.64E-009	Reactome
Apoptosis	83	20 (24.1%)	2.55E-010	8.26E-009	Wikipathways

Tabla 12. Vías de interacción de las proteínas Sobre-expresadas.

Nombre de la vía de interacción	Tamaño de la vía	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q	Fuente de la vía
Integrin	27 (27)	7 (25.9%)	3.90E-008	4.06E-006	INOH

Tabla 13. Vías de interacción de las proteínas Oscilantes Sobre-expresadas.

Nombre de la vía de interacción	Tamaño de la vía	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q	Fuente de la vía
TNF-alpha-NF-κB Signaling Pathway	187	44 (23.7%)	7.94E-022	1.69E-019	Wikipathways
Toll Like Receptor 3 (TLR3)	71	22 (31.4%)	2.97E-014	1.41E-012	Reactome

Cascade					
Caspase cascade in apoptosis	56	19 (35.8%)	1.14E-013	4.88E-012	PID
Apoptosis Modulation and Signaling	91	24 (26.4%)	1.54E-013	5.98E-012	Wikipathways
MAPK signaling pathway	161	31 (19.4%)	3.78E-013	1.35E-011	Wikipathways
MyD88-independent cascade initiated on plasma membrane	71	21 (29.6%)	4.45E-013	1.46E-011	Reactome
keratinocyte differentiation	59	18 (34.0%)	1.51E-012	4.29E-011	BioCarta
Activated TLR4 signalling	88	22 (25.0%)	5.26E-012	1.40E-010	Reactome
FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	38	15 (39.5%)	9.04E-012	2.15E-010	Wikipathways
NFkB and MAP kinases activation mediated by TLR4 signaling repertoire	67	19 (28.4%)	1.36E-011	2.83E-010	Reactome

Tabla 14. Vías de interacción de las proteínas Oscilantes Sub-expresadas.

Nombre de la vía de interacción	Tamaño de la vía	Candidatos contenidos	Valor-p	Valor-q	Fuente de la vía
erk and pi-3 kinase are necessary for collagen binding in corneal epithelia	34	6 (19.4%)	6.43E-007	0.000192	BioCarta

“A Dios no le importan nuestras dificultades matemáticas. El integra empíricamente”
Albert Einstein

Discusión e integración de resultados

Volumen tumoral a través del tiempo.

El volumen tumoral medio obtenido a los 30 días y comparándolo contra el de 45 días fue 1.857 veces mayor, y el volumen de 45 días y 50 días, el volumen de 50 días es 3.295 veces mayor. Los tiempos de cosechas entre 30 y 45 días, implican un intervalo de 15 días, pero entre 45 y 50 días, solo 5, solo un tercio del tiempo y sin embargo, es en esta pequeña ventana de tiempo el volumen tumoral se triplica, este comportamiento tumoral indica cambios importantes durante este tiempo (Figura 14) [48, 61]. Para obtener una visión global de los cambios celulares que estén tomando lugar durante esos tiempos se procedió a obtener los perfiles proteómicos.

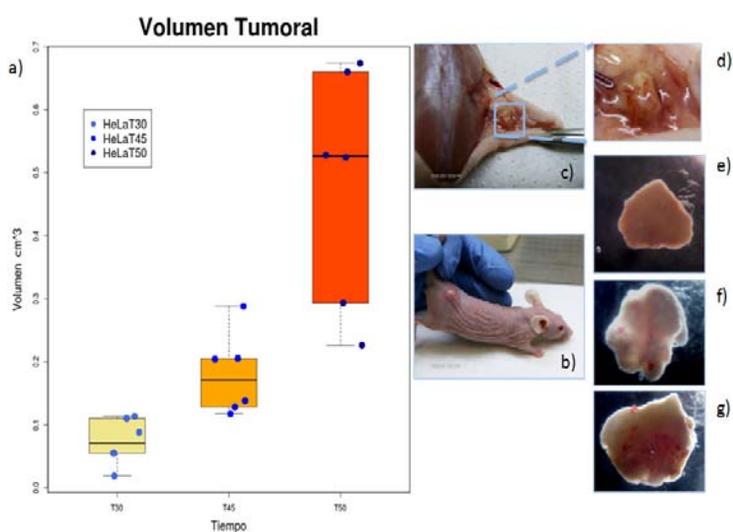


Figura 14. Cinética de crecimiento tumoral de la línea celular HeLa. a) cada punto del gráfico muestra el volumen tumoral de muestras a lo largo del tiempo. A los 30 días el volumen tumoral alcanza una media de $V = 73.3 \text{ mm}^3$, a los 45 días $V = 136.13 \text{ mm}^3$, y a los 50 días $V = 448.6 \text{ mm}^3$. b) Se muestra un ratón inoculado con la línea celular HeLa, c) el tumor inoculado intradérmicamente es cosechado en el mismo lugar, d-g) se muestran los tumores de 20, 30, 45 y 50 días. Figura adaptada de [ref. 48].

Perfiles proteómicos.

Una vez cosechados los tumores, se procedió a definir el proteoma de cada tumor (3 replicas experimentales por cada tiempo), y se establecieron los perfiles proteómicos de cada muestra para identificar las proteínas diferencialmente expresadas en la dinámica del CaCu usando 2D-PAGE (Apéndice C: Geles e imágenes 8-13). Posteriormente se procedió a su comparación para obtener las proteínas diferencialmente expresadas en cada tiempo. Al comparar los geles digitales, en el tiempo 30 (**T30**) se encontraron 824 spots con un coeficiente de correlación medio² (CCM) de $\text{CCM} = 0.710$, en el tiempo 45 (**T45**), 763 spots con un $\text{CCM} = 0.723$ y en el tiempo 50 (**T50**) 1012 spots con un $\text{CCM} = 0.724$ (Figura 15). En cuanto a los perfiles proteómicos, al comparar las replicas agrupadas de T30 contra T45 se obtuvo un $\text{CCM} = 0.701$, T45 contra T50 un $\text{CCM} = 0.713$ y T30 contra T50 un $\text{CCM} = 0.729$. Estos resultados indican que las replicas se encuentran dentro del

² El coeficiente de correlación medio se define como la proporción entre la desviación estándar y la media, de una serie de datos, entre más acercado a uno, significa una mayor reproducibilidad.

rango en el cual la variación experimental no interfiere para obtener resultados con significado biológico [62].

Se compararon todas las replicas agrupándolas por tiempo (T30, T45, T50) y se normalizaron con una regresión lineal local para cada gel. Se encontraron 610 entidades electroforéticas compartidas entre todos los tiempo y por medio de una prueba *t-student* con una $\alpha=0.05$, 120 identidades electroforéticas mostraron una expresión diferencial conforme al tiempo. *Nota: cada gel utilizado para el establecimiento del perfil proteómico, así como el gel maestro se pueden consultar en el apéndice C sección Geles.*

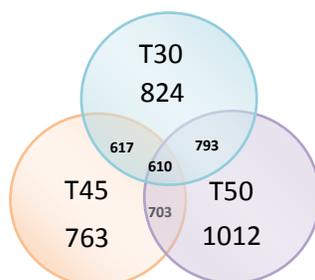


Figura 15. Diagrama de Venn de los perfiles proteómicos. Comparando los perfiles proteómicos encontramos 610 entidades electroforéticas comunes a los 3 tiempos (30, 45 y 50 días), T30 y T45 comparten 617, T45 y T50 comparten 703, y entre el T50 y el T30 se comparten 793.

Localizadas las identidades electroforéticas diferencialmente expresadas y aquellas con una expresión constante en todos los tiempos, se procedió a su identificación, por medio de espectrometría de masas (MALDI-TOF), hasta el momento se han identificado 31 proteínas (Figuras 16-23). Posteriormente agrupamos a las proteínas de acuerdo a su comportamiento de expresión, tomando como referencia la expresión que muestra al T30, y haciendo categorías, con los siguientes criterios:

- Constantes: muestra una expresión constantes (su expresión es prácticamente igual en los 3 tiempos)
- Sobre-expresadas: muestran un aumento en su expresión conforme al tiempo (al comparar su expresión al T30, hay una aumento para el T45 y 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, al T45 aumenta y al T50 disminuye.
- 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.*

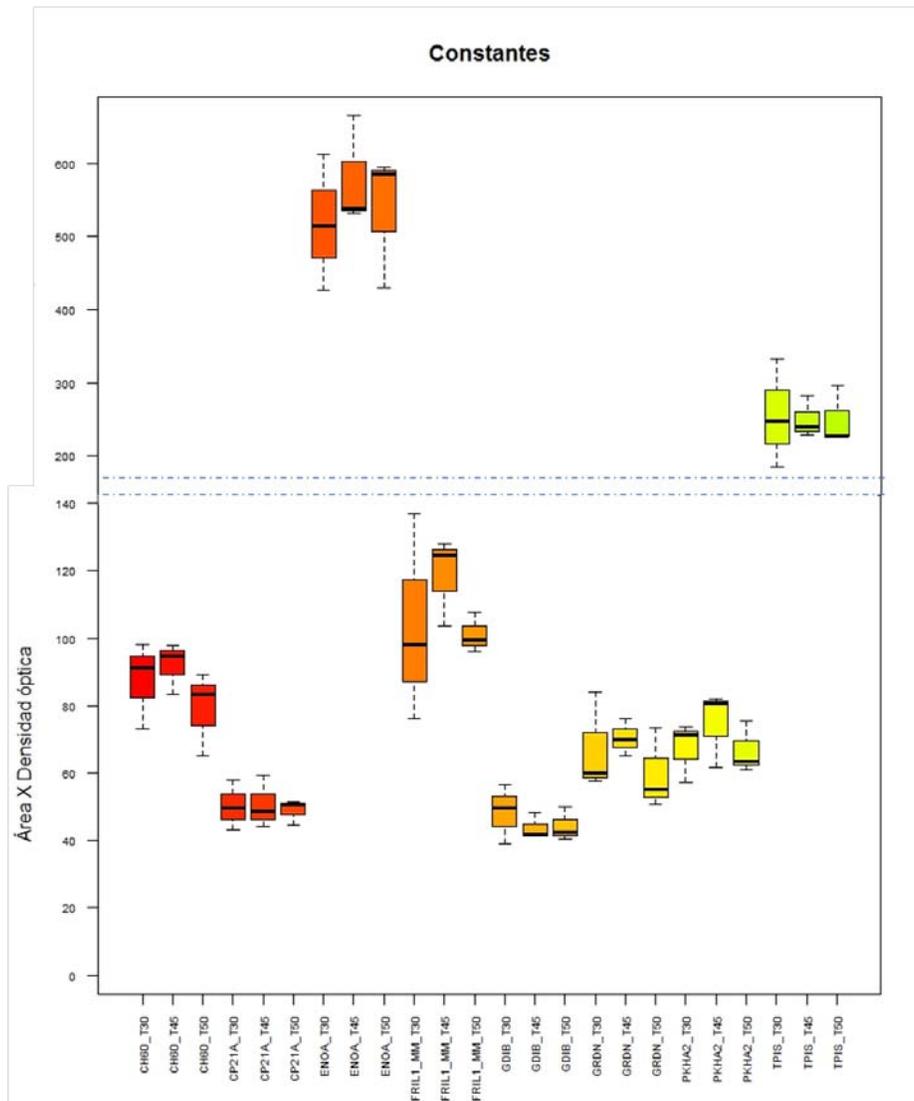


Figura 16. Proteínas con una expresión constante a través del desarrollo tumoral. En el eje de las X tenemos a cada proteína agrupada en T30, T45 y T50, en el eje de las Y tenemos la densidad óptica por el área y cada diagrama de caja agrupa las replicas de cada tiempo que presentaron una expresión constante.

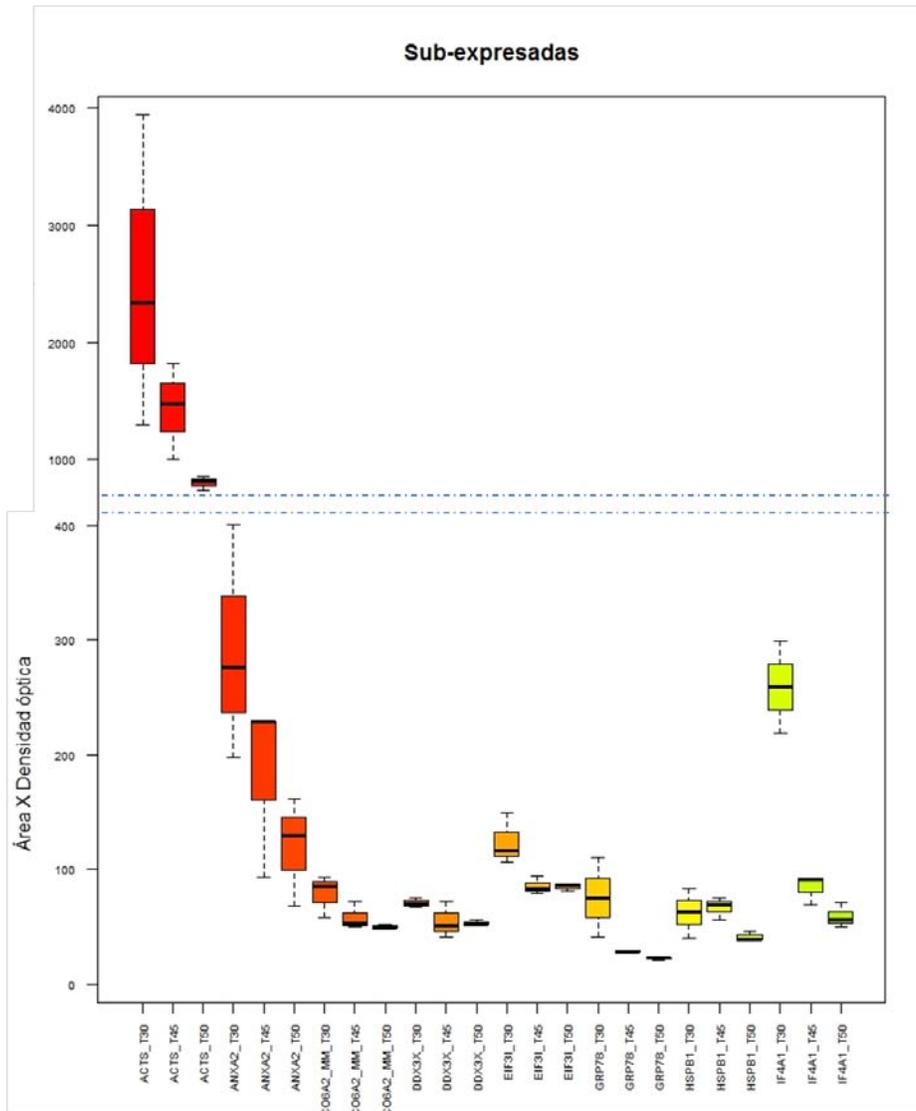


Figura 17. Proteínas Sub-expresadas a través del desarrollo tumoral. En el eje de las X tenemos a cada proteína agrupada en T30, T45 y T50, en el eje de las Y tenemos la densidad óptica por el área y cada diagrama de caja agrupa las replicas de cada tiempo de las proteínas que mostraron una sub-expresión conforme al tiempo.

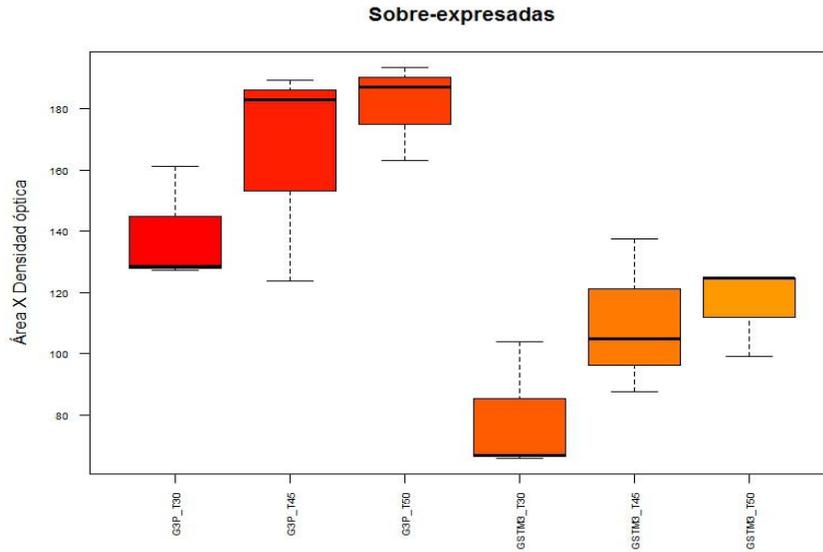


Figura 18. Proteínas Sobre-expresadas a través del desarrollo tumoral. En el eje de las X tenemos a cada proteína agrupada en T30, T45 y T50, en el eje de las Y tenemos la densidad óptica por el área y cada diagrama de caja agrupa las replicas de cada tiempo de las proteínas que mostraron una sobre-expresión conforme al tiempo.

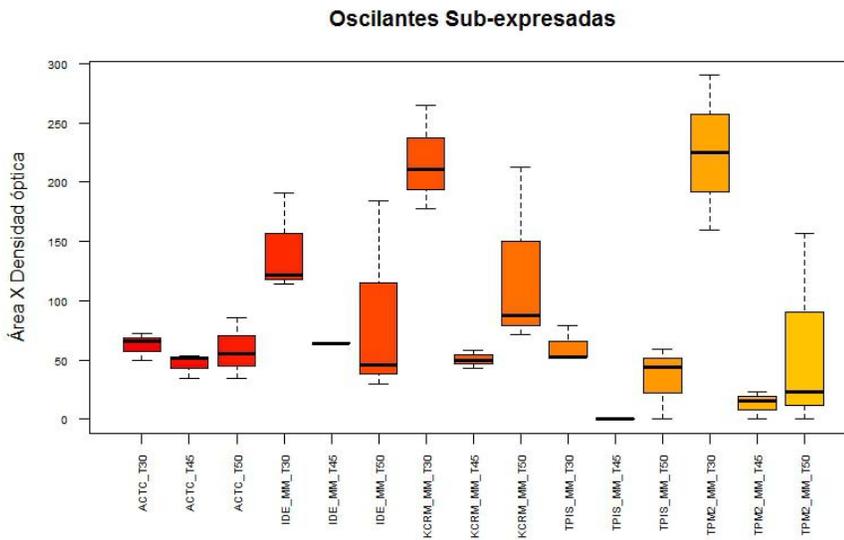


Figura 19. Proteínas Oscilantes Sub-expresadas a través del desarrollo tumoral. En el eje de las X tenemos a cada proteína agrupada en T30, T45 y T50, en el eje de las Y tenemos la densidad óptica por el área y cada diagrama de caja agrupa las replicas de cada tiempo de las proteínas que mostraron una oscilación en su expresión, llegando al punto mínimo al T45.

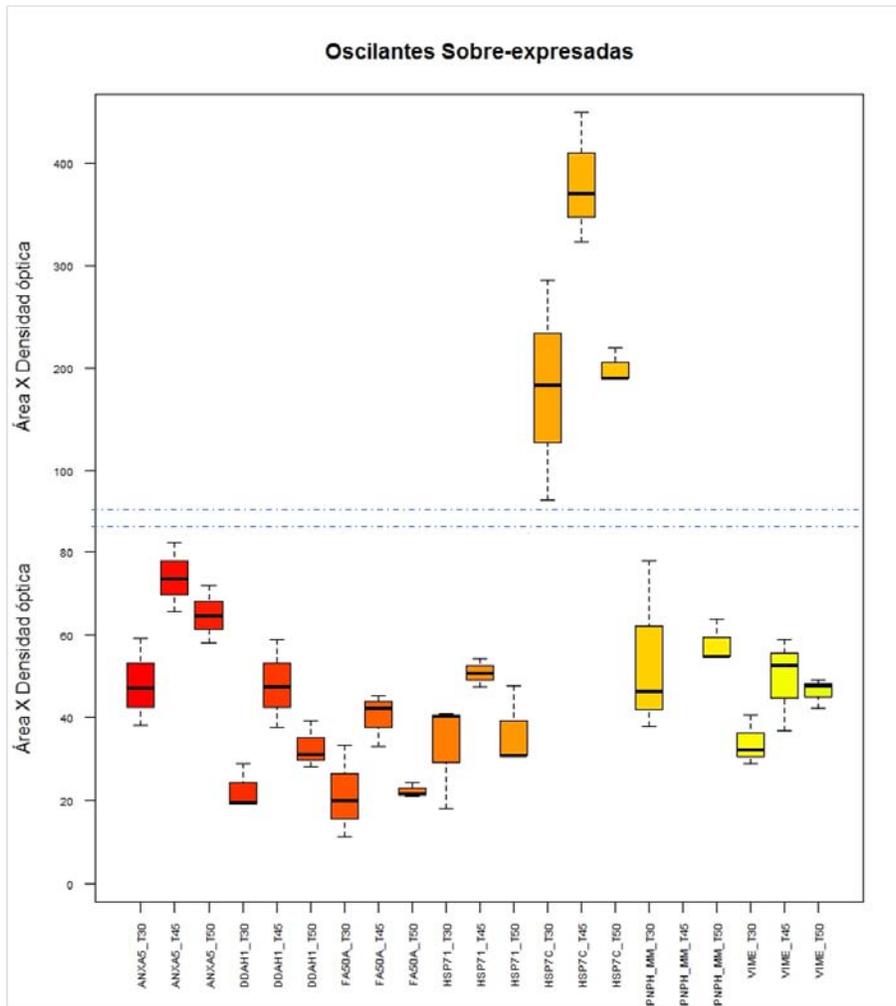


Figura 20. Proteínas Oscilantes Sobre-expresadas a través del desarrollo tumoral. En el eje de las X tenemos a cada proteína agrupada en T30, T45 y T50, en el eje de las Y tenemos la densidad óptica por el área y cada diagrama de caja agrupa las replicas de cada tiempo de las proteínas que mostraron una oscilación en su expresión, llegando al punto máximo al T45.

Proteínas con expresión constante

Encontramos tres grupos de funciones en las proteínas constantes. Dos proteínas –ENOA, TPIS– son parte de la glicolisis y participan en la producción de energía celular (Figuras 27 y 32) [63-66]. Tres proteínas asociadas en resistencia a estrés mitocondrial CH60, CP21A, FRIL1 (Figuras 25, 26, 28) [67-76] y 3 proteínas asociadas a comunicación vesicular y citoesqueleto GDIB, PKHA2, GRDN (ver Figuras 29, 30 y 31)[77-86].

Proteínas asociadas a glicolisis

La expresión de α -enolasa (**ENOA**) durante el desarrollo tumoral tuvo una expresión constante (Figura 27) durante la dinámica del proteoma, esta enzima de la ruta glicolítica cataliza la deshidratación de 2-fosfo-D-Glicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP), y su reacción reversa durante la gluconeogénesis. La α -enolasa en la superficie celular actúa como receptor de

plasminógeno, el cual es capaz de activar a la plasmina la cual tiene un papel crucial en el proceso de fibrinólisis³, al activar las proto-colagenasas en su forma activa degradando fibrinas, laminina y fibronectina de la ME. Como resultado la α -enolasa podría estar involucrada en los altos niveles de glicolisis y a la vez estar aumentando la habilidad de las células tumorales de remodelar e invadir la ME, lo que a su vez favorece el desarrollo de vasos sanguíneos y metástasis [63, 64]

La triosa fosfato isómeras (**TPIS**) (Figura 32) cataliza la interconversión de isómeros de triosas fosfato (dihidroxiacetona fosfato y D-gliceraldehído). En humanos, cambios en su expresión y correcta actividad han sido relacionados con una serie de condiciones patológicas. La expresión constante de TPIS puede estar involucrada en los altos requerimientos energéticos y de síntesis/degradación proteica en tumores [65, 66].

Proteínas asociadas a estrés mitocondrial

Bajo condiciones normales, la proteína de choque térmico mitocondrial de 60 kDa (**CH60**) actúa como chaperona en el plegamiento de proteínas mitocondriales. Aunque se ha visto su presencia en citoplasma y su secreción, algunos estudios muestran que la sobre-expresión de la CH60 es clave en el avance del cáncer de vejiga mientras que otros estudios en carcinoma urotelial no muestran esa relación [67, 68]. Cuando la CH60 es secretada se ha demostrado que es capaz de activar la señalización por CD14, la cual es una mediadora en la producción y activación de Interleucinas en macrófagos. La CH60 mostro una expresión constante en nuestro análisis (Figura 25), y consideramos que puede contribuir al desarrollo tumoral por medio de la inflamación y su función de ayuda al correcto plegamiento de proteínas [69].

La proteína esteroide 21-Hidroxilasa (**CP21A**) (Figura 26) 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. A pesar de que la CP21A se expresa normalmente en las glándulas adrenales de los riñones, también, se ha sugerido que tiene actividad en tumores dependientes de hormonas [70]. Stikkelbroeck investigo la prevalencia en tumores testiculares con hiperplasia adrenal y reporto diferencias significativas en la talla del tumor de aquellos portadores de deleciones CP21A, los cuales mostraron tumores de mayor tamaño [71]. Otro estudio conducido en tumores de ovario, mostro la asociación del alelo CP21A-15 con síndrome poliquístico de ovario [72]. La relación entre el desarrollo tumoral y esta proteína no es directa, pero se puede inferir que participa en procesos mitocondriales, detoxificación, producción de lípidos y hormonas, estimulando el crecimiento tumoral.

La cadena ligera de ferritina (**FRIL**) (Figura 28) es un importante regulador de la concentración intracelular de hierro [73]. El aumento de ferritina ha sido reportado en varios tipos de cáncer, como colorectal, mama y melanoma [74, 75]. Durante la inflamación, el factor nuclear kappa de cadena ligera de células B activadas (**NF- κ B**) es antagonista de la apoptosis inducida por el Factor de Necrosis Tumoral- α (**TNF- α**) al desactivar a la cinasa pro-apoptótica c-Jun N-terminal (**JNK**). La actividad antiapoptótica de NF- κ B incluye la supresión de la acumulación de especies reactivas de

³ La fibrinólisis consiste en la degradación de las redes de fibrina formadas en la coagulación sanguínea.

oxígeno (**EROs**) y la FRIL ha sido identificada como un mediador esencial de la actividad antioxidante y protectora de NF- κ B al suprimir la formación de EROs, por medio del secuestro de hierro y como consecuencia la desactivación de la cinasa JNK [76]. Es importante destacar que el espectro de masas de esta proteína dio la mayor identidad contra la FRIL de origen murino. Esta proteína presentó una expresión constante, por lo cual debe ser una de las proteínas que el microambiente está aportando durante el desarrollo tumoral.

Proteínas asociadas a transporte vesicular

La proteína Beta inhibidor de la disociación de GDP Rab (**GDIB-2**) presentó una expresión constante (Figura 29) y es parte de la familia Rab, las cuales son esenciales en varios pasos de formación, anclaje, transporte y fusión vesicular. Las proteínas GDIB pueden interactuar con una gran variedad de proteínas Rab y ayudan a su liberación de las de membranas cuando están unidas a GDP [77, 78]. Se ha reportado la formación del complejo GDIB-Rab5 por medio de la intervención de la p38 MAPK la cual regula a la proteína GDIB en el ciclo citosólico de Rab5 y modula la endocitosis [79]. La proteína GDIB-2 ha sido encontrada en suero de pacientes con cáncer pancreático y gástrico [80]. En una línea celular de adenocarcinoma de ovario se observó que la GDIB-2 se encontraba sobre-expresada comparada con una línea no carcinogénica de ovario y su sobre-expresión se asoció a la resistencia al fármaco anti-cáncer paclitaxel utilizado en el tratamiento de cáncer de ovario [81, 82]. Esta evidencia manifiesta que la GDIB-2 se encuentra involucrada en procesos de tráfico vesicular y resistencia a estrés en el desarrollo tumoral.

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, que se encuentran involucradas en el remodelamiento del citoesqueleto y en movilidad celular. Se ha encontrado en fibroblastos que Akt fosforila a GRDN en respuesta a factores de crecimiento como EGF, y que GRDN fosforilada se acumula en los bordes de migración de las células, con función de migración Akt-dependiente. En células COS7, la GRDN cuando es sobre-expresada aumenta la fosforilación de Akt sin necesidad de factores de crecimiento [83]. 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 [84]. La GRDN se ha reportado como sobre-expresada en diferentes tipos de cáncer como colorectal, mama, pulmón y cérvico-uterino [85]. En el desarrollo tumoral encontramos una expresión constante de GRDN (Figura 31) e inferimos que actúa en la migración, comunicación celular, angiogénesis y como activadora de la cinasa Akt.

El dominio homólogo a Pleckstrina contenedor del miembro 2 familia A (**PKHA2**) es una proteína adaptadora que regula la sensibilidad a insulina por la unión a PtdIns(3,4)P₂, en la vía de señalización de PI3K. En ratones mutantes para PKHA2, con incapacidad de unir PtdIns(3,4)P₂, se observó una sobre-activación conjunta de PI3K y Akt, y una mayor sensibilidad a insulina. Adicionalmente se ha reportado que PKHA2 interacciona con al menos 4 proteínas con dominio PDZ, que incluyen a PTPN13, MUPP1, Sintropina y Utopina, e intervienen en varias vías de señalización celular y procesos de reorganización de citoesqueleto [33]. Se ha reportado que la

sobre-expresión de PKHA2 en leucemias de células B, potencializa la adhesión a fibronectina y laminina, promoviendo la metástasis, mientras que su interferencia, muestra una alta inhibición de adhesión [86]. En el desarrollo tumoral vemos una expresión constante de PKHA2 (Figura 30) 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 [4,33].

Proteínas sub-expresadas

Algunas proteínas pueden funcionar como inhibidores del desarrollo tumoral, por lo cual la pérdida de su expresión, podría ser considerada como ventajosa. Entre las proteínas sub-expresadas encontramos tres tipos de funciones: tres proteínas están involucradas en la traducción, DDX3X, EIF3 e IF4A1 (Figuras 36, 37 y 40) [87-91], dos en señalización mediada por calcio, ANXA2 y GRP78 (Figuras 34 y 38) [32, 92] y 4 en eventos de citoesqueleto; ACTS, CO6A2, HSPB1 y TPM3 (Figuras 33, 35, 39 y 41) [93-99].

Proteínas asociadas a traducción

El factor de iniciación eucariótico 4A-1 (**IF4A1** o **DDX2A**) es una helicasa de RNA ATP-dependiente que ayuda en la traducción tipo cap-dependiente por el complejo eIF4F. Poco se han explorado de las funciones de IF4A1 en cáncer, sin embargo, se encontrado como sobre-expresado en carcinoma hepatocelular primario, en líneas de melanoma y en melanomas primarios. Se ha visto que los tumores expuestos a periodos de hipoxia, son capaces de adaptar su expresión génica del tipo cap-dependiente a un tipo cap-independiente. Este cambio permite que los mRNAs con secuencias IRES (Sitio de Entrada Ribosomal Interno) sean preferencialmente traducidos y este tipo de mRNAs generalmente provienen de genes pro-crecimiento, pro-angiogénicos y de supervivencia (HIF1 α , VEGF, BCL-2, entre otros). Durante el desarrollo de tumores derivados de células HeLa, observamos una sub-expresión tiempo dependiente de IF4A1 (Figura 40), lo cual sugiere un posible cambio en la expresión tipo cap-dependiente a un tipo cap-independiente en estos tumores [87]. Una de los fenómenos observados en células bajo estrés, es la inhibición de la traducción tipo cap-dependiente, por medio del secuestro de los factores de traducción como IEF4 en gránulos insolubles de estrés y el bloqueo de respuestas pro-inflamatorias por la interrupción de las vías de señalización de TNF- α y la activación NF- κ B [88].

La Helicasa de RNA ATP-dependiente DDX3X (**DDX3X**) interactúa con el complejo eIF4F y promueve la expresión tipo cap-dependiente. La DDX3X es sub-expresada en hepatocarcinomas, en especial aquellos con virus de hepatitis B. Para entender la función de DDX3X, se uso siRNA en la línea celular NIH3T3 de fibroblastos, y se observo una entrada prematura la fase S y una proliferación celular mayor, esto fue correlacionado con los bajos niveles de p21^{waf} y los niveles elevados de Ciclina D1 en células *knock-out* para DDX3X. También se ha observado la activación de DDX3X por el receptor TLR4 por la vía de señalización de TRIF y TKB1 para la transcripción del complejo AP-1. Adicionalmente, en ausencia de DDX3X, las Caspasas 6 y 9, no pueden ser activadas, lo que protege a las células de la apoptosis [89]. Es importante notar que la proteína DDX3X encontrada en este estudio tiene un origen murino, por lo cual los cambios asociados a

esta proteína deben de estar sucediendo en células del microambiente (Figura 36.), los cuales sugiere un cambio a una traducción tipo cap-independiente, la inhibición de apoptosis por medio de caspasas, además, de la pérdida de expresión del complejo AP-1.

El complejo EIF3 está conformado por 13 subunidades y es responsable de la interacción entre el complejo de pre-iniciación 43S, el complejo de mRNA y eIF4F durante la traducción. La proteína Subunidad 1 del Factor de iniciación eucariótico 3 (**EIF3I**) es parte del complejo eIF3 e interactúa con el receptor tipo II TGF- β . Estudios en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, con el inhibidor Currumina, y en la línea celular de CaCu HeLa con dicitratoytterbium (III), muestran una inhibición de la fosforilación de mTOR, y una sub-expresión del gene TGF- β , lo que resultan en una menor proliferación, identificando la sub-expresión de EIF3I como la responsable; lo que sugiere su relación con la expresión de genes apoptóticos [90,91]. En el desarrollo tumoral observamos una sub-expresión de la proteína EIF3I conforme al tiempo (Figura 37), no tenemos claro porque está sucediendo, pero podría ser una adaptación a una menor síntesis proteica y a la transcripción de genes asociados a la apoptosis.

Proteínas asociadas a tráfico vesicular y señalización mediada por calcio

Entre las proteínas sub-expresadas identificadas en este estudio se encuentran la ANXA2 y la GRP78 (Figura 34. ANXA2_HUMAN., Figura 38. GRP78_HUMAN.), las cuales tienen papeles importantes en el tráfico vesicular y las vías de señalización celular mediadas por calcio.

La Anexina A2 (**ANXA2**) participa en procesos celulares, como movilidad celular, remodelamiento de citoesqueleto, endocitosis e interacciones de la ME y sus funciones son dependientes de las condiciones y tiempo de expresión. La ANXA2 en superficie de membrana funciona como receptor de proteasas (catepsina B, plasminógeno y activador de plasminógeno) y de proteínas remodeladoras de la ME (colagenasa tipo 1 y tenascina C). Se ha asociado a la ANXA2 con potencial metastático: la inhibición de ANXA2 en la superficie celular de la línea celular 1542CP3TX de cáncer de próstata, disminuyo su capacidad de invasión, por la falta de unión de proteasas en superficie celular. Otro estudio en ratón, con la misma línea mostro que la sobre-expresión de ANXA2 y la activación de moléculas de adhesión a leucocitos promueven la metástasis [32]. La ANXA2 funciona como co-receptor de TLR4 para la detección de la Glicoproteína $I\beta_2$ (**GPI- β_2**) la cual promueve la activación/fosforilación de la MAPK p38, la producción del Factor Tisular (**TF**) en monocitos y la activación de NF- κ B, que en conjunto activan vías pro-inflamatorias y pro-coaguladoras [34]. Es probable que la ANXA2 esté disminuyendo su expresión (Figura 34) al funcionar como una señal pro-coagulante, lo cual puede inhibir el crecimiento tumoral, además, este comportamiento puede estar relacionado con la evasión del sistema inmune [34].

La proteína Regulada por Glucosa de 78 kDa (**GRP78**) se encuentra en el retículo endoplásmico (**RE**), y pertenece a la familia de las HSP70, que ayudan al correcto plegamiento de proteínas [92]. En condiciones normales, la GRP78 está unida a las proteínas transmembranales PERK, IRE1 y ATF6 manteniéndolas en su forma inactiva, pero cuando hay acumulación de proteínas mal plegadas, GRP78 libera a estas proteínas y desencadena la respuesta de proteínas mal plegadas (**RPMP**) que activan a las cinasas Akt y PI3K, las cuales activan a NF- κ B. Estudios anteriores muestran que la

activación de NF- κ B se dispara por la proteína ATF6, en tanto que las proteínas PERK e IRE1 parecen tener blancos en otras vías de señalización [92]. En cáncer la proteína GRP78 solo ha sido estudiada a nivel de expresión, encontrándola sobre-expresada en cáncer hepatocelular y gástrico [66]. En este estudio se ve una sub-expresión conforme al tiempo del desarrollo tumoral (Figura 38) y su relación funcional en el desarrollo tumoral puede ser por su capacidad de inhibir la RPMP por medio de la señalización de ATF6, que activa señales de reciclado de nutrientes por autofagia y activación de NF- κ B, lo que confiere una resistencia a apoptosis. Así la sub-expresión de GRP78 puede promover la supervivencia de las células tumorales a través de la autofagia, conforme el volumen del tumor aumenta y es más difícil obtener nutrientes.

Proteínas asociadas a citoesqueleto

Varias proteínas asociadas a citoesqueleto se ven sub-expresadas en este estudio, ACTS, COL6A2, HSPB1 y TPM3 (Figuras 33, 35, 39 y 41). Se podría pensar que la pérdida de la expresión de proteínas encargadas de la estructura de citoesqueleto, es una vía directa en la adquisición de una mayor movilidad y por consecuencia una capacidad de invasión mayor.

La Actina alfa de musculo esquelético (**ACTS**) participa en la movilidad celular, estructura e integridad de citoesqueleto. La proteína ACTS ancla físicamente los complejos de adhesión focal asociados a Integrinas con el citoesqueleto, lo que permite una adhesión focal. En el desarrollo tumoral encontramos una sub-expresión de ACTS (Figura 33), lo que podría estar relacionado con la pérdida de uniones celulares, una mayor capacidad de movimiento, proliferación y pérdida de uniones célula-matriz [93].

La colagenasa cadena alfa-II(VI) (**COL6A2**), participa en la formación de microfilamentos celulares, aporta fuerza de tensión a la matriz extracelular y su expresión es clave en el desarrollo embrionario [REF]. La expresión génica de COL6A2 está regulada por citocinas como el Factor de Crecimiento Transformante-h (TGF-h) que promueve la expresión de la COL6A2, se ha reportado que la citocina TNF- α , reduce la expresión de la COL6A2 a nivel de mRNA [94]. Una de las funciones alternas de la COL6A2 es su capacidad de unión a metaloproteasas (MMP) en la ME, impidiendo su activación. En cáncer la sub-expresión de COL6A2 es parte de los cambios adquiridos hacia un estado menos diferenciado, sin embargo su sobre-expresión suele estar relacionada con una mayor resistencia a diferentes drogas [95, 96]. En la dinámica del proteoma encontramos una sub-expresión en el tiempo (Figura 35), esto puede permitir que las metaloproteasas en la ME sean activadas, lo que, puede traducirse, en facilitar la invasión de la ME por las células tumorales [97].

La proteína beta de choque térmico-1 (**HSPB1**) es una chaperona independiente de ATP, que reduce el daño por especies reactivas de oxígeno (ERO), óxido nítrico (**ON**), y confiere estabilidad a la F-actina y resistencia celular a la citocina TNF- α . La HSPB1 en mitocondria incrementa el potencial de membrana y se une al complejo pro-apoptótico Smac/Diablo inhibiendo su activación. La HSPB1 se ha reportado sobre-expresada en varios tipos de cáncer; mama, próstata, ovario, colon, cervical y esófago [98]. En el 2011 Lomnytska, mediante un análisis de inmunohistoquímica estudio la expresión de la HSPB1 en muestras de NIC-I, II, carcinoma *in situ* e

invasivo. Encontrando que la expresión en los NIC-I y II se encontraban sobre expresada comparadas con el tejido normal, pero la expresión en el carcinoma *in situ* e invasivo, estaba sub-expresada con respecto a las precursoras. Por último, observó que la sub-expresión de HSPB1 en pacientes con CaCu invasivo resultaron en una pobre prognosis. En nuestro estudio hemos obtenido un comportamiento similar al que muestra la HSPB1, al ser sub-expresada conforme al desarrollo del CaCu (Figura 39) [50]. La sub-expresión de HSPB1 no es clara, ya que es una chaperona, pero, su sub-expresión podría estar relacionada con un mayor potencial invasivo, ya que está provee de estabilidad al citoesqueleto celular [98].

La Cadena alfa 3 de tropomiosina (**TPM3**) es parte de las proteínas estructurales que forman el citoesqueleto de actina y participa en la contracción muscular. La sub-expresión de las isoformas de la TPM se asocian a un fenotipo transformante, 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 ayudan a la evasión de la apoptosis [99]. En la línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón transformados (NIH3T3 v-ki-ras), una sub-expresión de las isoformas TPM1 y TPM2 permiten una mayor tasa de formación de tumores en ratones desnudos [100]. Estudios que usaron los inhibidores específicos de MEK1 (PD98059) y Ras-ERK (UO126), siguieron que la sub-expresión de las TPMs está a cargo de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK, al menos en cultivo celular [99]. En este estudio se observó una sub-expresión de la TPM3 conforme al tiempo (Figura 41), lo cual puede ser parte de la adquisición de una mayor capacidad de invasión [100].

Proteínas sobre-expresadas

Encontramos como proteínas sobre-expresadas a la Gliceraldehído 3 fosfato (**G3P**) y la Glutatio S-transferasa Mu 3 (**GSTM**) (Figuras 42 y 43) [101-106]. La G3P participa en la glicolisis y la GSTM3 es una enzima que ayuda a la detoxificación celular.

La G3P se encuentra en citoplasma, núcleo, mitocondria y vesículas. La G3P en citoplasma lleva a cabo la reacción de conversión de gliceraldehído 3 fosfato a D-glicerato 1,3, bifosfato en presencia de NAD⁺ [101]. Bajo estrés oxidativo, es modificada y ayuda al cambio de metabolismo para la producción de NADPH en el ciclo de las pentosas. Cuando la G3P es internalizada a mitocondria se une al canal VDAC1, que induce un estado pro-apoptótico por la liberación de las proteínas Citocromo-c y Factor Inductor de apoptosis [102]. Bajo condiciones prolongadas de estrés, la G3P es nitrosilada y translocada al núcleo en donde se une a Siah (una E3 ubiquitin ligasa) y activa genes apoptóticos como p53 [103]. La G3P se ha reportado sobre-expresada en varios tipos de cáncer [66]. Durante el desarrollo tumoral observamos un aumento gradual en los tiempos analizados (Figura 42), posiblemente por sus múltiples funciones y también por el alto consumo de glucosa observado en los tumores [4].

La proteína GSTM3 pertenece a las enzimas que catalizan la conjugación del glutatión (GSH) con sustancias electrofílicas. Uno de sus papeles más importantes es mediar la detoxificación de moléculas foráneas, por lo cual las GSTs confieren resistencia a varias drogas anti-cáncer [104]. En

la mayoría de los estudios con líneas celulares tumorales con resistencia *in vitro* a agentes quimioterapéuticos se ha observado una sobre-expresión de varias formas de GSTs, en comparación con las no resistentes, adicionalmente, la sobre-expresión de GSTs se ha reportado en varios tipos de cáncer (colon, mama, riñón, ovario y pulmón) en comparación con los tejidos no afectados [105]. Las GSTs (GSTP y GSTM) regulan la señalización de TNF- α al inhibir a TRAF2 la cual activa JNK y p38 pero no a NF- κ B, además, atenúan la auto-fosforilación de TRAF2-ASK-1 (cinasa apoptótica) [106, 107]. Por estudios de interacciones Proteína-Proteína en queratinocitos humanos inmortalizados que expresan la oncoproteína E7 de HPV-16, se ha observado que E7 interactúa con GSTP1, los autores proponen que la GST es activada por la oncoproteína E7, minimizando la oxidación de la GST, la cual inhibe la señalización por JNK [108]. En este estudio, se observó que la proteína GSTM3, aumenta su expresión gradualmente del T30 hasta el T50 (Figura 43), esto puede deberse a sus capacidades de detoxificación pero, también a su utilidad para evitar la apoptosis por la inactivación de TNF- α [106].

Proteínas oscilantes sobre-expresadas

En el presente estudio observamos proteínas con una sobre-expresión en el tiempo T45 en comparación a los tiempos T30 y T50. Analizamos la expresión de dos proteínas relacionadas con resistencia a estrés HSP7C, HSP71 (Figuras 47 y 48) [109-113]; dos con formación de vesículas y comunicación intracelular ANXA5 y VIME (Figuras 44 y 50) [114-122]; dos con funciones metabólicas DDHA1 y PNPH (Figuras 45 y 49) [123-131]; y la proteína FA50A (Figura 46) la cual no se le ha asociado una función biológica [132].

Proteínas asociadas con resistencia a estrés

La proteína cognado de choque térmico de 71 kDa (**HSP7C**) ayuda al correcto plegamiento de proteínas, participa en la degradación de agregados polipéptidicos y funciona como una ATPasa en el ciclo de ensamblaje y desensamble en la comunicación endosomal por vesículas revestidas de clatrina (VRC) [109]. Masayuki en el 2010, mediante siRNA y el uso del fármaco KNK437, inhibió la expresión de HSP7C en células umbilicales endoteliales, observando una baja activación de Akt y sus moléculas efectoras, incluyendo eNOS. La relación funcional se demostró por la regulación negativa de PI3K, donde su actividad decayó a menos un 40% con la interferencia de HSP7C, y como resultado produjo un bloqueo de la vía VEGF/PI3K/Akt en la activación de angiogénesis en células endoteliales [110]. En algunos estudios se reporta a la HSP7C como sobre-expresada en cáncer hepatocelular y gástrico [66]. En nuestro estudio la expresión corresponde a un pico máximo al tiempo T45 (Figura 47), y sugerimos que podría estar involucrada en procesos de transporte vesicular, resistencia a falta de oxígeno y a promoción de angiogénesis.

La proteína de choque térmico 1A/1B de 70 kDa (**HSP71**), se ha visto expresada en varios tipos de cáncer y es un regulador de crecimiento, supervivencia y resistencia a fármacos. La HSP71 ayuda al correcto plegamiento de proteínas y minimiza la respuesta de estrés del retículo endoplasmático (**RE**) [111]. Al interferir la expresión de HSP71 y HSP7C por medio de siRNAs, se demostró una interrupción en la activación de Akt y sus moléculas efectoras. Los autores sugieren una

coordinación de estas dos proteínas en la activación de Akt por medio de la vía PI3K. En ese mismo estudio, se interfirió la expresión de HSP71 durante el desarrollo del pez cebra, lo cual no permitió la correcta formación de vasos sanguíneos [112]. Experimentos para probar la relación entre la activación de Akt y el bloqueo de HSP71, se procedió a usar CUEH con la expresión de una forma siempre activa de Akt y el bloqueo de HSP71, observando que solo se recuperó una parte de la migración y formación de tubos de las CUEH, lo que implica que HSP71 interviene en otros mecanismos durante la angiogénesis [110, 112]. En estudios en línea celular de carcinoma hepático expuestas a una atmósfera con bajo oxígeno (1% de O₂), se demostró la sobre-expresión de la HSP71, por la activación del HIF- α y su interacción con los elementos de respuesta a hipoxia con un efecto directo en el promotor de HSP71 [113]. En nuestro análisis del desarrollo tumoral observamos la sobre-expresión al T45 de HSP71 y HSP7C (Figura 47 y

Figura 48) que consideramos se pueden relacionar con la angiogénesis tumoral.

Proteínas asociadas a la comunicación intracelular

La Anexina A5 (**ANXA5**) está presente en núcleo, membranas y extracelularmente, y tiene una alta afinidad a membranas con fosfatidilserina (PS), participa en el tráfico de vesículas, división celular, apoptosis, señalización por calcio y regulación de crecimiento [114]. La respuesta inicial a daño vascular es la formación de plaquetas⁴, y su adhesión al colágeno de los vasos afectados, lo que dispara los niveles de PS en superficie de membrana, que promueve el ensamblaje de protrombinasa y su conversión a trombina [115-116]. La ANXA5 se une a la PS, lo que previene la formación de protrombinasa esta inactivación es fundamental en la angiogénesis [117]. La PS en membrana activa la fagocitosis por macrófagos, al unirse a receptores como MFG-E8, beta-2-glicoproteína-1, Anexina A1 y A2 [118]. La ANXA5 inhibe la fagocitosis de células dañadas, al unirse al PS en la superficie celular [115]. Algunos estudios de cáncer hepatocelular y colorectal reportan la sobre-expresión de ANXA5, mientras que otros una sub-expresión [66]. En cáncer pancreático, gástrico y cérvico uterino se reporta una sobre-expresión, mientras que en cáncer de ovario una sub-expresión [66]. En este estudio observamos una sobre-expresión al T45 en comparación con los T30 y T50 (Figura 44), consideramos que la ANXA5 funciona como moduladora de la respuesta inmune y la angiogénesis, principalmente durante este tiempo [115-117].

La Vimentina (**VIME**) es una proteína intermediaria de filamentos de soporte, que participa en la integridad estructural, adhesión, migración, supervivencia, señalización celular, la sobre-expresión de VIME ha sido reportada en varios tipos de cáncer y se relaciona con una mayor capacidad de invasión y el fenómeno de transición epitelial-mesenquimal [119]. En ratones *knock-out* para VIME se ha observado que estos se desarrollan normalmente, pero muestran una deficiente reparación de heridas [120]. Por otro lado se ha demostrado la interacción de la VIME con la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, en sitios de adhesión focal de células endoteliales, y que cuando se inhibe la expresión de VIME con iRNAs se pierde su adhesión focal [121]. Otro estudio probó la relación funcional de la VIME

⁴Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos pequeño, irregulares y carentes de núcleo, de 2-3 μm de diámetro, derivados de la fragmentación de megacariocitos. Las plaquetas son fundamentales en la hemostasia y una fuente de factores de crecimiento.

en el desarrollo tumoral al estudiar el efecto de VIME en la línea de carcinoma colorectal LS174T en ratones *Nu/Nu* monitoreando la angiogénesis durante el desarrollo tumoral. Adicionalmente, se ha observado una supresión casi total del crecimiento tumoral al interferir la VIME e inhibir la formación de vasos sanguíneos y en este mismo estudio se encontró que células endoteliales asociadas a tumores de colon se encontraban sobre-expresando la VIME, pero no en el caso de células endoteliales normales [122]. La relación de la VIME con el desarrollo tumoral (Figura 50) muestra una sobre-expresión en el tiempo T45 con una función que podría estar involucrada en la angiogénesis [122].

Proteínas con funciones metabólicas

La N(G),N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1 (**DDAH1**) cataliza la reacción: N-omega, N-omega'-metil-L-arginina + H₂O \rightleftharpoons dimetilamina + L-citrulina. La inhibición de la actividad de DDAH causa la acumulación dimetilarginina asimétrica (ADMA), que bloquea la síntesis de óxido nítrico (NO) por la Oxido Nítrico Sintasa (**NOS**) [123]. La regulación de NO por parte de DDAH tiene efectos pleiotrópicos en la biología tumoral, al tener una correlación entre la actividad de NOS y el grado de tumoral en cáncer de mama, ovario, de cabeza, cuello y tumores neuronales [124-127]. Los tumores derivados de la línea celular de glioma C6 que sobre-expresan iNOS (Sintasa inducible de Óxido nítrico) y eNOS (Sintasa endotelial de Óxido nítrico), tienen una actividad superior de DDAH, lo que reduce el ADMA y aumenta la producción de NO y VEGF, esta alteración no aumenta el crecimiento *in vitro* pero si *in vivo*, aumentando el crecimiento tumoral, lo que sugiere que la ruta DDAH/ADMA afecta el desarrollo tumoral, al promover la vascularización tumoral [128, 129]. En nuestro estudio observamos que al tiempo T45 (Figura 45) una sobre-expresión de DDAH1 al compararlo con los tiempos T30 y T50, lo cual puede estar promoviendo la angiogénesis tumoral durante este tiempo y el T50 [128, 129].

La enzima Fosforilasa de nucleósido Purina (**PNPH**) se localiza en mitocondria y citosol, cataliza la conversión de inosina en hipoxantina y de guanosina a guanina. Estas reacciones ocurren en la vía de recuperación de purinas, las cuales metabolizan a las purinas y sus ribosas a adenosina. Se ha reportado la sobre-expresión de PNPH en cáncer oral y de colon [130]. La adenosina funciona como una molécula señal y como sensor del estado energético celular; en tumores con altas cantidades de adenosina se ve incrementada la angiogénesis, ya que estimula la proliferación de células endoteliales [131]. Sin embargo, no hay estudios que prueben la relación de la PNPH y la angiogénesis por lo cual, deben de realizarse los experimentos correspondientes para establecer el papel funcional de PNPH [130, 131]. La PNPH detectada en este estudio tiene es de origen murino (Figura 49), lo que significa que proviene del microambiente tumoral y debido a su expresión específica en células endoteliales, puede estar relacionada con la angiogénesis [130].

La proteína FA50A tuvo una sobre-expresión al T45 en comparación con T30 y T50 (Figura 46), pero no existen reportes concretos de su función. Se considera que puede ser un factor transcripcional o una proteína de unión a DNA [132].

Todas las proteínas identificadas en este estudio que presentaron una sobre-expresión durante el tiempo T45 en comparación con los T30 y T50 están involucradas con la respuesta a estrés por

hipoxia y la angiogénesis [109-131], a excepción de la FA50A que no se le ha asignado una función clara. Con estas evidencias proponemos que estas proteínas podrían estar jugando un papel importante en el desarrollo tumoral al estimular la angiogénesis. Es necesario llevar a cabo los experimentos adecuados para rastrear el proceso angiogénico en este modelo para poder comprobar que en el T45 del desarrollo tumoral se está llevando a cabo este fenómeno de importancia vital en el desarrollo del CaCu.

Proteínas oscilantes sub-expresadas

Tres proteínas están involucradas en vías de producción energética la IDE, KCRM y TPIS (Figuras 52, 53 y 54) [65, 137-143]; de las cuales 2 proteínas están involucradas con citoesqueleto y movilidad celular ACTC1 y TPM2 (Figura 51 y 55) [133-136].

Proteínas de citoesqueleto y movilidad celular

La actina alfa de musculo cardiaco 1 (**ACTC1**), es constituyente mayoritario de la maquinaria contráctil. Las formas beta y gamma coexisten en la mayoría de los tipos de células lo que permite una correcta estructuración del citoesqueleto y sirve como un mediador de la movilidad interna celular [133]. Varios estudios en cáncer han encontrado una sobre-expresión de ACTC1, como en cáncer de vejiga, esófago y mama [66]. En el desarrollo tumoral encontramos una oscilación en la expresión con una menor expresión en el tiempo T45 (Figura 51), lo que puede ser un indicio de una menor estructura del citoesqueleto celular, sin embargo no es fácil relacionar su efecto en la biología general del desarrollo tumoral, mas estudios deben de ser llevados a cabo para entender las razones de esta comportamiento.

La Cadena beta de Tropomiosina (**TPM2**) es una proteína de unión a actina en citoesqueleto. La TPM2 junto con el complejo Troponina, se asocian con actina en las fibras musculares y regula la contracción muscular, por otro lado la función de TPM2 en células no musculares se conoce muy poco y puede incluir funciones estructurales aparte de la formación de microfilamentos [99]. Se ha investigado la presencia de TPM2 en líneas celulares de próstata (LNCaP, PC3, y DU 145) y de mama (MCF-7, BT-20, MDA-MB-231, BT-474, T-47D, y ZR-75.1) demostrando que la sub-expresión de TPM2 se asociada a una mayor agresividad tumoral [134, 135]. Estudios realizados en tumores asociados al Sistema Nervioso Central revelan que tumores de astrocitos de bajo grado expresan TPM2, mientras que los altamente malignos no lo hacen [136]. Estos estudios sugieren una correlación inversa entre la expresión de TPM2 y la capacidad invasiva [134-136]. Parece haber incongruencia con los estudios en tumores y líneas celulares cancerosas ya que la expresión que encontramos en este estudio, es una sub-expresión del tiempo T45 en comparación del T30 y T50 (Figura 55), lo cual sin embargo nos deja la pregunta: ¿en qué procesos puede estar involucrada la TPM2 en el desarrollo tumoral para hacer que la progresión del tumor sea orientado a un tipo más agresivo?

Proteínas involucradas en vías de energía celular

El Factor de Degradación de Insulina (**IDE**) metaloproteasa citoplasmática de la familia de las inverzincina que participan en la degradación de la insulina y proteínas ricas en hojas β -plegadas,

como la proteína β -Amiloide, Amilina, Glucagón, Factor natriurético atrial, Calcitonina, Factor de Crecimiento Similar a insulina I y II y el Factor de Crecimiento transformador α [137-139]. Ratones *knock-out* de IDE muestran niveles altos de insulina en sangre, de la proteína β -amiloide en cerebro y la proteína precursora Amiloide de cerebro [140]. La hormona insulina es crucial en el metabolismo y esencial en el crecimiento de tejidos sanos y neoplásicos [1]. Razvant T., en el 2007, determino la cantidad de insulina presente en muestras de cáncer de mama, observando que en tumores de grado 3 encontraban insulina, mientras que los de grado 2 y tejido mamario glandular eran negativos [141]. En otro estudio se comparo la expresión de IDE, el cual estaba presente en el 92% de los carcinomas examinados en comparación con el 57% de los tejidos normales que presentaron IDE. Se analizó adicionalmente carcinomas con invasión en nodos linfáticos mostrando que la expresión IDE presenta un decremento desde el tumor primario a la metástasis de nódulos linfáticos [141]. Desafortunadamente no logramos establecer una relación directa en el desarrollo tumoral y la proteína IDE con la sub-expresión en el tiempo T45 (Figura 52), estudios funcionales deberán ser llevados a cabo para entender su papel en el desarrollo tumoral en el CaCu.

La creatina cinasa tipo M (**KRCM**) se expresa en varios tejidos y cataliza la reacción reversible de fosforilación de creatina para dar fosfocreatina (FC) y adenosina difosfato, esta enzima es importante en el metabolismo energético al desempeñar dos papeles fundamentales: la FC funciona como amortiguador energético en el consumo rápido de ATP y como transportador de energía en el circuito de FC entre sitios intracelulares de consumo y producción de ATP [142]. Durany, en el 2000, estudio la actividad de la KRC encontrando una mayor actividad en cáncer de mama al compararlo con tejido normal, y en un caso se encontró una menor actividad en la neoplasia, en comparación con su tejido normal [143]. Esto puede ser un indicio de su oscilación en el desarrollo tumoral. En este estudio puede pensarse que existe un comportamiento similar, debido a que su expresión decae en el tiempo T45 en comparación con la expresión al tiempo T30 y T50 (Figura 53). Esta proteína fue identificada mediante espectrometría de masas como de origen murino, por lo cual es posible que sea una de las proteínas aportadas por el microambiente [143].

La triosa fosfato isómerasa (**TPI**) fue identificada nuevamente, pero al buscar a que organismo pertenece, los espectros obtenidos por MALDI-TOF no fueron suficientes para establecer si eran de origen humano o murino (Figura 54). No surge una explicación directa de cómo la TPI presenta este comportamiento, mas estudios deben ser llevados a cabo para entenderlo [1]

Interacciones funcionales Proteína-Proteína (IPP) de cada categoría

Para conocer cuáles son las proteínas que interactúan con las proteínas que se identificaron, se uso un enfoque bioinformático de redes de las interacciones proteína-proteína (**IPP**) con base a las proteínas identificadas en cada categoría (ver tabla 5 y métodos). Las proteínas usadas en la búsqueda de las IPP, fueron tomadas como solo de origen humano, esto permite la obtención de

una mayor información de las bases de datos, siendo probable que las proteínas de origen murino desempeñen un papel funcional similar dado su homología con el humano.

Se obtuvieron en promedio 191 interacciones por categoría y se analizaron cada categoría por separado en donde se obtuvo el promedio de IPP por proteína (Apéndice E: Figura 1). Las proteínas con mayor número de interacciones fueron las proteínas oscilantes sobre-expresadas (en promedio 48 IPP) y las sobre-expresadas (en promedio 44 IPP), seguidas por las proteínas sub-expresadas (en promedio 38 IPP), las proteínas oscilantes sub-expresadas presentaron en promedio 15 IPP y por último las proteínas constantes (en promedio 13 IPP) (para mayor información revisar Apéndice E: Resultados suplementarios, Figura: Análisis de las interacciones Proteína-Proteína)

Ontologías Génicas: Señalización

Con las redes formadas y la búsqueda de las IPP, se busca encontrar aquellas proteínas que estén relacionadas con las identificadas en este análisis con el objetivo de obtener un panorama general de las funciones biológicas, en las cuales estas proteínas están involucradas durante el desarrollo tumoral, se procedió a hacer un análisis de enriquecimiento de Ontologías Génicas⁵. Para esto se utilizaron todas las proteínas de las redes formadas de cada categoría (para revisar las ontologías génicas ver tablas 5 a 9) [60].

Al analizar los 10 GOs mejor representados en cada categoría, encontrados que las funciones en las que están involucradas las proteínas, son esencialmente 4: Señalización, Metabolismo, Regulación de la Apoptosis y Citoesqueleto. El evento GO de citoesqueleto, solo se encontró en la categoría de proteínas oscilantes sub-expresadas y una sola vez en proteínas sub-expresadas mientras que el evento GO de señalización, fue observado el mayor número de veces entre las categorías (Figura 21).

⁵ 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.

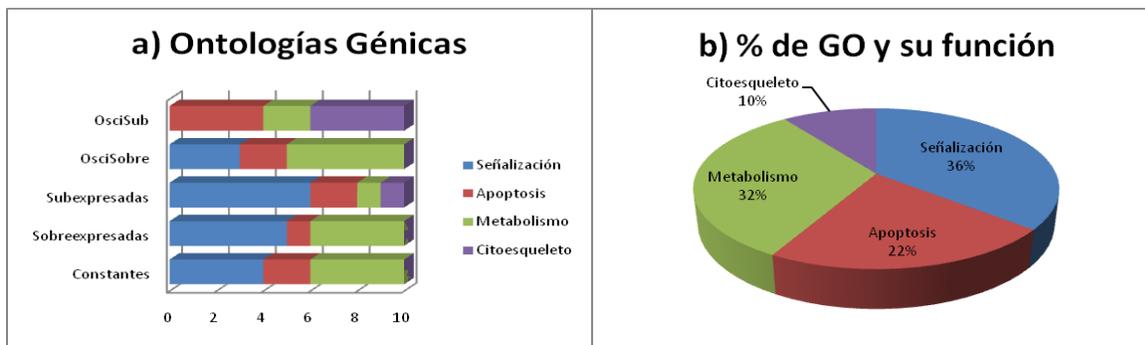


Figura 21. Ontologías Génicas. Los 10 GOs mejor representados por las proteínas de cada categoría, resultan evidentes 4 grupos de funciones: Señalización, Apoptosis, Metabolismo, y Citoesqueleto.

a) En las proteínas Oscilantes Sub-expresadas no se encontró GOs relacionados con Señalización, y en las proteínas de expresión constantes sobre-expresadas y oscilantes sobre-expresadas, no hay GOs asociados con citoesqueleto y en las proteínas sub-expresadas solo se encuentra un GO relacionado al citoesqueleto.

b) Al agrupar el total de los GOs de este análisis en la función que está involucrado, encontramos que el evento celular de Señalización, ésta presente el mayor número de veces.

Análisis de sobrerrepresentación de vías moleculares

Posterior al análisis de GOs nos preguntamos ¿Cual es la relación que tiene la señalización celular en el desarrollo tumoral? Para esto se procedió a realizar un análisis de enriquecimientos de rutas de interacciones moleculares. Utilizando todos los nodos de las redes extendidas de cada una de las 5 categorías de expresión, lo que nos permitió obtener una visión de las vías moleculares que pudieran estar involucradas en el desarrollo tumoral del CaCu (para ver las vías de interacciones encontradas revisar tablas 10-14). Para el análisis de este enriquecimiento se tomaron las 10 vías mejor representadas.

Al analizar las vías sobrerrepresentadas de cada categoría, encontramos 4 puntos importantes (Figura 22):

- 1) La categoría de proteínas sub-expresadas contiene el mayor número de vías sobrerrepresentadas.
- 2) La vía de interacciones moleculares de las MAPK se encuentra sobrerrepresentada en tres categorías de expresión –Constantes, Sub-expresadas, Oscilantes sobre-expresadas–.
- 3) Hay una intersección de las vías 3 vías de interacciones moleculares en la categoría de proteínas Sub-expresadas y Oscilantes sub-expresadas, una intersección de dos vías, en las categorías Constantes y Sub-expresadas, y una intersección de la vía de interacción de las Integrinas en las Sobre-expresadas y Sub-expresadas.
- 4) Por último, solo se encontró como única vía sobrerrepresentada en las proteínas Oscilantes Sub-expresadas a la vía ERK-PI3K.

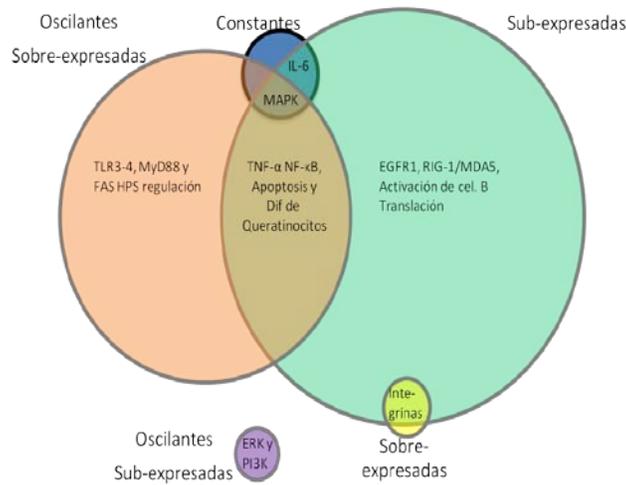


Figura 22. Vías de interacciones moleculares sobre-representadas en las categorías de expresión.

El círculo azul representa las vías sobre-representadas en la categoría de proteínas constantes.

El círculo rojo representa las vías sobre-representadas en la categoría de las proteínas Oscilantes Sobre-expresadas.

El círculo verde representa las vías sobre-representadas en la categoría de las proteínas Sub-expresadas.

El círculo amarillo representa las vías sobre-representadas en la categoría de las proteínas Sobre-expresadas.

El círculo morado representa las vías sobre-representadas en la categoría de las proteínas Oscilantes Sobre-expresadas. *Nota: a cada círculo que representa una categoría de las proteínas, se le ha dado un valor cuantitativo en el radio el cual es proporcional al número de vías sobrerrepresentadas.*

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 desarrollo tumoral, por lo cual se deben de llevar a cabo los experimentos correspondientes para comprobar que esto realmente está sucediendo.

“La vida, es el arte de dibujar suficientes conclusiones de premisas insuficientes”

Samuel Butler

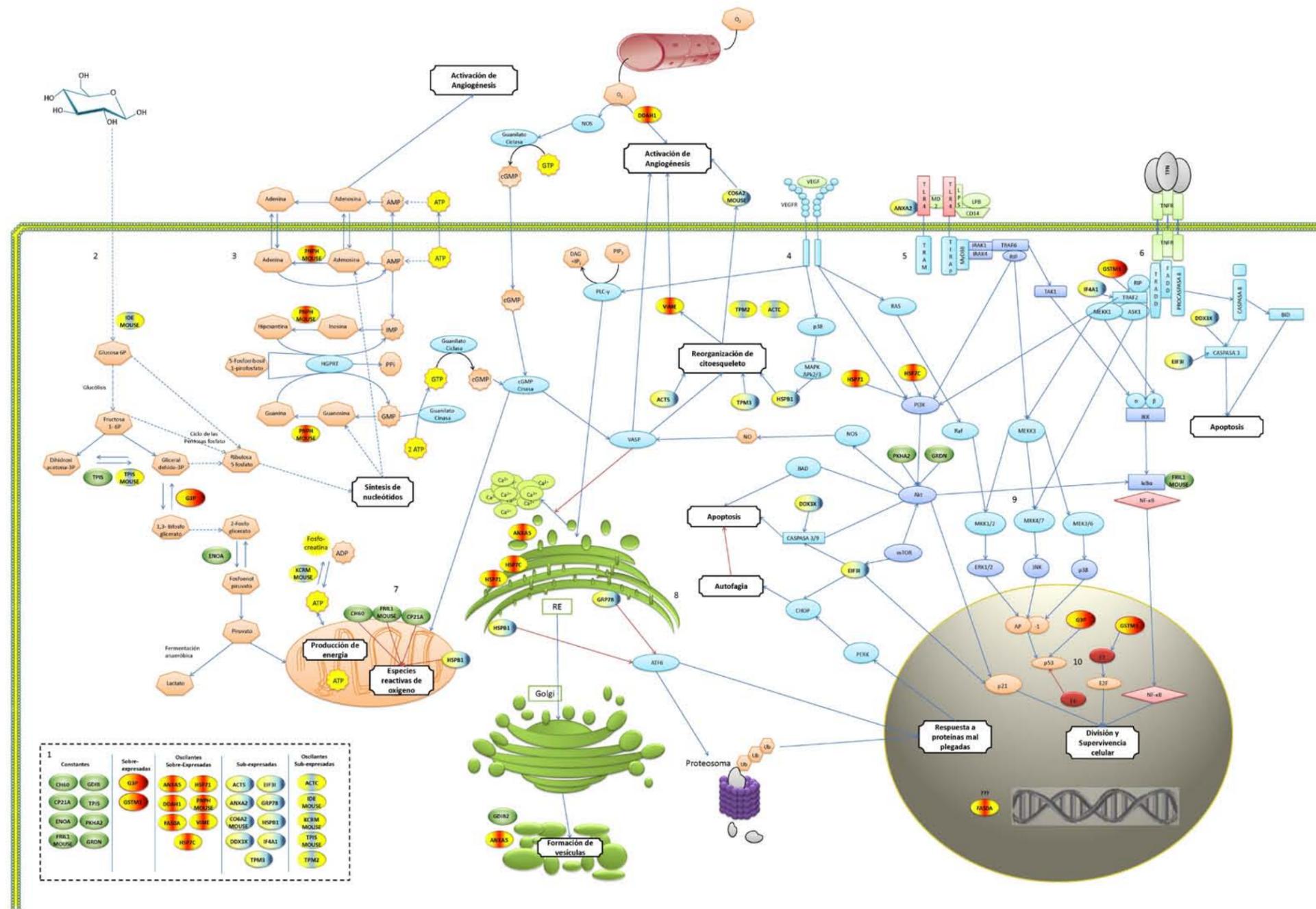
Conclusiones

Modelo de las adaptaciones del desarrollo tumoral a través del tiempo

Las proteínas identificadas durante el desarrollo del CaCu, han sido categorizadas de acuerdo al comportamiento de expresión que mostraron, cada categoría se asociada a distintas vías de señalización celular. Las funciones de estas proteínas en el desarrollo tumoral han sido descritas y se han entrelazado con diferentes eventos celulares:

Con los experimentos llevados a cabo en esta investigación, la revisión bibliográfica y el uso de herramientas bioinformáticas, concluimos:

- 1) La participación de las proteínas clasificadas por nosotros como de expresión constante y la activación de NF- κ B como vía principal de supervivencia y proliferación celular a través del desarrollo tumoral son elementos fundamentales en el desarrollo tumoral.
- 2) Consideramos que entre el T45 y T50, es un momento clave en la angiogénesis tumoral por medio de VEGF y NO, junto con las proteínas identificadas como oscilantes y que son expresadas particularmente en este periodo de tiempo, con lo cual justificamos el crecimiento acelerado observado en esa ventana de tiempo del crecimiento tumoral.
- 3) Las proteínas relacionadas con apoptosis en la vía de caspasas reducen su expresión, también aquellas que están involucradas con reorganización de citoesqueleto, lo cual sugerimos que en este estudio podría estar asociado a la transición epitelio-mesénquima.
- 4) Las proteínas sobre-expresadas potencializan el estado energético celular y promueven la supervivencia celular en conjunto con las oncoproteínas E6 y E7, lo que permite el uso de la vía de inflamación TNF- α y sus propiedades de proliferación por medio de la vía de señalización del brazo TRAF6.



1. Proteínas identificadas, agrupadas de acuerdo a su perfil de expresión en el tiempo.
2. Incremento en las vías energéticas asociadas a la glucosa.
3. Ciclo de las purinas y su participación en la angiogénesis.
4. Activación de angiogénesis convergente a VASP y el receptor VEGF.
5. Activación de los receptores TLR4 con su participación en la activación de la vía PI3K, NF-κB, y AP-1.
6. Vía de TNF-α y su participación en la inducción de PI3K, NF-κB y AP-1.
7. Alta resistencia a ROS y producción de energía.
8. Activación de la respuesta a proteínas mal plegadas.
9. Co-activación de Akt y NF-κB para la supervivencia celular
10. Bloqueo de apoptosis por p53 y desregulación de E2F por las oncoproteínas E6 y E7

“Después de dos semanas trabajando en un proyecto, uno mismo se da cuenta si tendrá o no futuro”

Bill Budge

Perspectivas

Este trabajo muestra un enfoque proteómico del desarrollo tumoral a través del tiempo y sugiere el uso de vías de señalización celular diferencial dependientes del estado de desarrollo tumoral. Hasta el momento, no se han identificado todas las proteínas diferencialmente expresadas, consideramos importante identificar las proteínas de los perfiles proteómicos del desarrollo tumoral 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.

- Establecer los perfiles dinámicos de tiempos anteriores al T30 y posteriores al T50
- La obtención del perfil proteómico de un cérvix no afectado como control.
- Realizar cortes histológicos con detección inmunohistoquímicas de las proteínas diferencialmente expresadas para establecer la localización y expresión en tiempo en las estructuras tumorales.
- Validar la función de las proteínas identificadas como indispensables en el desarrollo tumoral por medio de la interrupción de la expresión de las proteínas con el uso de RNA de interferencia o morfolinós y para su evaluación de su función biológica.
- Expandir este enfoque a líneas celulares HPV 16+ (SiHa) y HPV- (C33A) y lograr establecer los cambios comunes al desarrollo tumoral y aquellos específicos de HPV 18 o 16.
- Una vez obtenidos los datos experimentales proteómicos, de la expresión espacio-temporal, a lo largo del desarrollo tumoral del cáncer cérvico uterino, se podría crear modelos matemáticos que nos ayuden a predecir vías alteradas que podrían servir como blancos terapéuticos inhibiendo o sobre-expresando proteínas fundamentales de estas vías.

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. 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
6. 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
7. 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
8. Willis RA. 1967. **The unusual in tumour pathology**. Can. Med. Assoc. J. 97:1466–79
9. Lisa M. Coussens & Zena Werb. **Inflammation and cancer**. Nature, vol. 420 December 2002
10. 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.
11. Johanna A. Joyce. **Microenvironmental regulation of metastasis**. Nature Reviews CanCer vol. 9 April 2009. doi:10.1038/nrc2618
12. Folkman J. 2003. **Fundamental concepts of the angiogenic process**. Curr. Mol. Med. 3:643–51
13. Carmeliet P, Jain RK. 2000. **Angiogenesis in cancer and other diseases**. Nature 407:249– 57
14. Lukanova A, Kaaks R. 2005. **Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses**. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14:98–107.
15. Hansen RK, Bissell MJ. 2000. **Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones**. Endocr. Relat. Cancer 7:95–113
16. Xie B, Tsao SW, Wong YC. 1999. **Sex hormone-induced mammary carcinogenesis in female Noble rats: expression of TGF- β 1 and its receptors, TGF- α , and EGF-R in mammary carcinogenesis**. Breast Cancer Res. Treat. 58:227–39
17. Ministerio de salud. **Guía Clínica**. Examen de medicina preventiva, MINSAL, 2008
18. Peter B. and Bernard L., **World Cancer Report 2008**. Naturaprint, pag. 418 - Section 5 - Cancer Site by Site, 2008.
19. SINAIS. Mortalidad 2008 <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/> 2008. Ref Type: Internet Communication, consulta 2011.
20. Eileen M. Burd. **Human Papillomavirus and Cervical Cancer**. Clinical microbiology reviews, Henry Ford Hospital, Detroit, Michigan Jan. 2003
21. FIGO. **Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium**. International Journal of Gynecology and Obstetrics 105 (2009) 103–104
22. Karla R. Dzul-Rosado, Marylin Puerto-Solís, María del R. González-Losa. **Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección**. Rev Biomed 2004; 15:233-241.
23. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. **The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology**. JAMA 2002;287:2116.
24. Prendiville . Davies et al., **The health professional's hpv handbook**. Professor, London, UK, 2005. Taylor & Francis
25. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N et al. **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer**. J Clin Pathol 2002;55
26. Hawley-Nelson, P., Schiller, J. T. et. al., **HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes**. EMBO J. 1989, 8
27. Cary A. Moody, Laimonis A. Laimins. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation**. Nature Reviews Cancer, 2010, 10.
28. Hwang, E. S., Nottoli, T. & Dimairo, D. **The HPV 16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells**. Virology 211, 227–233 (1995).
29. 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)
30. 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).
31. Lester A. Rubenstein, Randy J. Zauhar, Richard G. Lanzara. **Molecular dynamics of a biophysical model for β 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
32. S. Mussunoor and GI Murray. **The role of annexins in tumour development and progression**. J Pathol 2008; 216: 131–140
33. Stephan Wullschlegler, 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

34. 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
35. 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
36. 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
37. Daniel c. Liebler, et al., **Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology.** Liebler © Humana Press, Inc., Totowa, NJ
38. Aebersold R, Mann M. **Mass spectrometry-based proteomics.** *Nature* 2003; 422: 198-207
39. 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.
40. DG Ward, et al.,. **Identification of serum biomarkers for colon cáncer by proteomic analysis.** *British Journal of Cancer* (2006) 94, 1898 – 1905
41. 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
42. Xueyuan Xiao, Xiuping Wei and Dacheng He, **Proteomic approaches to biomarker discovery in lung cancers by SELDI technology.** *Science in China Series C: Life Sciences* Volume 46, Number 5, 531-537, DOI: 0.1360/02yc0208
43. 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
44. 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
45. Yoo Pyo, et al., **Proteomics analysis of progressive factors in uterine cervical cancer.** 2005 *Proteomics* 2005, 5, 1481–1493, DOI 10.1002/pmic.200401021.
46. 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
47. Xueqiong Zhu. et al., **Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer.** *Gynecologic Oncology* 112 (2009) 248–256
48. Alberto Checa, et al. **Análisis del secretoma en líneas celulares de cáncer cérvico uterino.** Tesis doctoral (resultados no publicados).
49. Juan Carlos Higareda-Almaraz, María del Rocío Enríquez-Gasca, Magdalena Hernández-Ortiz, Osbaldo Resendis-Antonio and Sergio Encarnación-Guevara **Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective.** *BMC Systems Biology* 2011, 5:96, doi:10.1186/1752-0509-5-96.
50. 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
51. Beverly A. Teicher. **Tumor Models in Cancer Research.** Second Edition Humana Press 2011.
52. John R. Masters. **HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly.** *Nature reviews cancer* volume 2 april 2002
53. 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
54. Yan Chen, Christine Miller, **Identification of Cervical Cancer Markers by cDNA and Tissue Microarrays.** *Cancer Research* 63, 1927–1935, April 15, 2003
55. 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.
56. Yick-Fu Wong¹, 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)].
57. 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
58. 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.
59. 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.
60. Atanas Kamburov, Ralf Herwig, et. al. **ConsensusPathDB--a database for integrating human functional interaction networks.** *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue):D623-D628
61. Mary M. Tomayko and Patrick Reynolds. **Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 1989. 24(3)148-154.
62. Mark P. Molloy, et al. **Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics** *Proteomics* 2003, 3, 1912–1919.
63. Ko-Jiunn Liu and Neng-Yao Shih. **The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells.** National Institute of Cancer Research, National Health Research Institutes, Taipei, Taiwan, 2007 MedUnion Press.

64. Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA. **The role of an enolase related molecule in plasminogen binding to cells.** *Eur J Biochem* 227: 407-415, 1995.
65. Robert J, Van Rymenant M, Lagae F. **Enzymes in cancer. III. Triosephosphate isomerase activity of human blood serum in normal individuals and in individuals with various pathological conditions.** *Cancer* 1961; 14:1166-1174.
66. Yasuhiro Kuramitsu and Kazuyuki Nakamura. **Proteomic analysis of cancer tissues: Shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers.** *Proteomics* 2006, 6, 5650–5661 DOI 10.1002/pmic.200600218
67. Urushibara M, Kageyama Y, Akashi T, et al. (January 2007). **HSP60 may predict good pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in bladder cancer.** *Jpn. J. Clin. Oncol.* 37 (1): 56–61. doi:10.1093/jjco/hyl121. PMID 17095522.
68. Le Bret T, Watson RW, Molinié V, et al. (September 2003). **Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma.** *Cancer* 98 (5): 970–7. doi:10.1002/cncr.11594. PMID 12942564.
69. 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
70. Ryan KJ, Engel LL (March 1957). **Hydroxylation of steroids at carbon 21.** *J. Biol. Chem.* 225 (1): 103–14. PMID 13416221.
71. 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
72. Witchel, S.F. and Aston. **The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 13, 1315-1317 *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000
73. Le NT, Richardson DR. **The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells.** *Biochim Biophys Acta* 2002;1603:31^46.
74. Vaughn CB, Weinstein R, Bond B, et al. **Ferritin content in human cancerous and noncancerous colonic tissue.** *Cancer Invest* 1987;5:7 ^10.
75. Guner G, Kirkali G, Yenisey C, Tore IR. **Cytosol and serum ferritin in breast carcinoma.** *Cancer Lett* 1992;67:103^12.
76. Can G. Phan, Concetta Bubic, et al., **Ferritin Heavy Chain upregulation by NF-κB inhibits TNFα-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species.** *Cell*, Vol. 119, 529-542, November 12, 2004.
77. Schimmoller, F., Smon, I., and Pfeffer, S. R. **Rab GTPases, directors of vesicle docking.** (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 22161-22164.
78. Pfeffer, S.R., Dirac-Svejstrup, A.B. and Soldati, T. **Rab GDP Dissociation Inhibitor: putting Rab GTPases in the right place.** *J. Biol. Chem.*, (1995) 270(29), 17057-17059.
79. Valeria Cavalli, Francis Vilbois, et al., **The Stress-Induced MAP Kinase p38 Regulates Endocytic Trafficking via the GDI:Rab5 Complex.** *Molecular Cell*, Vol. 7, 421–432, February, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press
80. Zhi-Ling Sun, et al., **Serum proteomic-based analysis of pancreatic carcinoma for the identification of potential cancer biomarkers.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1774 (2007) 764–771
81. 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.
82. 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
83. 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
84. 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
85. 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
86. 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
87. Deborah Silvera, et al., **Translational control in cancer.** *Nature Reviews Cancer* 254, April 2010, Volume 10, doi:10.1038/nrc2824.
88. Woo Jae Kim, Sung Hoon Back, Vit Kim, Incheol Ryu, and Sung Key Jang. **Sequestration of TRAF2 into Stress Granules Interrupts Tumor Necrosis Factor Signaling under Stress Conditions.** *Molecular and cellular biology*, Mar. 2005, p. 2450–2462 Vol. 25, No. 6 doi:10.1128/MCB.25.6.2450–2462.2005
89. 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
90. H.Y. Fang, S.B. Chen. **Proteomic identification of differentially expressed proteins in curcumin-treated MCF-7 cells.** Volume 18, Issues 8-9, 15 June 2011, Pages 697-703 doi:10.1016/j.phymed.2010.11.012
91. Liming Shen, et al., **A proteomic investigation into the human cervical cancer cell line HeLa treated with dicitratoytterbium (III) complex.** *Chemico-Biological Interactions* 181 (2009) 455–462. doi:10.1016/j.cbi.2009.07.013.

92. 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
93. 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
94. Franck Verrecchia, Alain Mauviel. **TGF-h and TNF-a: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression.** *Cellular Signalling* 16 (2004) 873–880, doi:10.1016/j.cellsig.2004.02.007
95. Christian Freise, et al. **The alpha 2 chain of collagen type VI sequesters latent proforms of matrix-metalloproteinases and modulates their activation and activity.** *Matrix Biology* 28 (2009) 480–489 doi:10.1016/j.matbio.2009.08.001
96. Cheryl A. Sherman-Baust, et al. **Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells.** *Cancer Cell*, April 2003 · vol. 3
97. Randolph Stone II, et al. **Identification of Genes Correlated with Early-Stage Bladder cancer progression.** *Cancer Prev Res* 2010;3:776-786, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0189
98. Andre-patrick arrigo. **Anti-apoptotic, tumorigenic and metastatic Potential of HSP27 (HSPB1) and α -crystallin (hspb5): emerging targets for the Development of new anti-cancer therapeutic Strategies.** *Heat Shock Proteins in Cancer*, Chapter 4, 73–92. 2007, Springer.
99. 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.
100. 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.
101. 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
102. A. Tarze, A. Deniaud, et al., **GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization.** *Oncogene* (2007) **26**, 2606–2620. doi:10.1038/sj.onc.1210074
103. Makoto R. Hara, Nishant Agrawa, et al., **S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 bindin.** *Nature Cell Biology* 7, 665 - 674 (2005). doi:10.1038/ncb1268.
104. R Franco and JA Cidlowski. **Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant.** *Cell Death and Differentiation* (2009) 16, 1303–1314; doi:10.1038/cdd.2009.107
105. Tew, K. D. **Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance.** *Cancer Res.* 54 (16):4313–4320; 1994.
106. Kenneth D. Tew, Yefim Manevich, Christina Grek, Ying Xiong, Joachim Uys, Danyelle M. Townsend. **The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer.** *Free Radical Biology & Medicine* 51 (2011) 299–313. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.013
107. Wu, Y., et al. **Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals.** *Oncogene* 25 (42):5787–5800; 2006.
108. Mileo, A. M., et al. **Human papillomavirus-16 E7 interacts with glutathione S-transferase P1 and enhances its role in cell survival.** *PLoS One* 4 (10):e7254; 2009.
109. 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
110. 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.
111. Hartl FU, Hayer-Hartl M. **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.** *Science.* 2002;295:1852–1858.
112. 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
113. 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.
114. S. Mussunoor and GI Murray. **The role of annexins in tumour development and progression.** *J Pathol* 2008; 216: 131–140
115. Hugo O. van Genderen, Heidi Kenis, et al. **Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 (2008) 953–963.
116. D.A. Lane, H. Philippou, J.A. Huntington, **Directing thrombin, Blood.** 106 (8) (2005) 2605–2612.
117. W.L. van Heerde, S. Poort, C. van 't Veer, C.P. Reutelingsperger, P.G. de Groot, **Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cell-mediated thrombin formation.** *Biochem. J.* 302 (1) (1994) 305–312.
118. J. Savill, I. Dransfield, C. Gregory, C. Haslett, **A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.** *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 965–975.
119. K Vuoriluoto. **Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer.** *Oncogene* (2011) 30, 1436–1448; doi:10.1038/onc.2010.509
120. Eckes, B., et al., **Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin.** 2000 *J. Cell Sci.* 113, 2455-2462.

121. Daisuke Tsuruta and Jonathan C. R. Jones. **The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress.** *Journal of Cell Science* 116, 4977-4984 doi:10.1242/jcs.00823.
122. 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.
123. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P (December 1996). **Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase.** *Br. J. Pharmacol.* 119 (8): 1533–40. PMID 8982498.
124. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riverosmoreno V, Moncada S (1994) **Nitric-oxide synthase activity in human gynecological cancer.** *Cancer Res* 54: 1352 – 1354
125. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA (1995) **Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors.** *Cancer Res* 55: 727 – 730
126. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, Ziche M (1998) **Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer.** *J Natl Cancer Inst* 90: 587 – 596
127. Reveneau S, Arnould L, Jolimoy G, Hilpert S, Lejeune P, Saint-Giorgio V, Belichard C, Jeannin JF (1999) **Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors.** *Lab Invest* 79: 1215 – 1225
128. Dong ZY, Staroselsky AH, Qi XX, Xie KP, Fidler IJ (1994) **Inverse correlation between expression of inducible nitric-oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma-cells.** *Cancer Res* 54: 789 – 793
129. V Kostourou¹, SP Robinson¹, JE Cartwright¹ and GSTJ Whitley. **Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis.** *British Journal of Cancer* (2002) 87(6), 673 – 680
130. 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
131. Jozef Spychala. **Tumor-promoting functions of adenosine.** *Pharmacology & Therapeutics* 87 (2000)
132. Mazzarella R., et al., **Differential expression of XAP5, a candidate disease gene.** Pengue G., Yoon J., Jones J., Schlessinger D. *Genomics* 45:216-219(1997)
133. Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. **Identification of Common Differentially Expressed Genes in Urinary Bladder Cancer.** *PLoS ONE* 6(4): e18135. doi:10.1371/journal.pone.0018135.
134. Bhattacharya B, Prasad GL, Valverius EM, Salomon DS, Cooper HL. **Tropomyosins of human mammary epithelial cells: consistent defects of expression in mammary carcinoma cell lines.** *Cancer Res* 1990;50:2105±2112.
135. Wang FL, Wang Y, Wong WK, Liu Y, Addivola FJ, Liang P, Chen LB, Kantoff PW, Pardee AB. **Two differentially expressed genes in normal human prostate tissue and in carcinoma.** *Cancer Res* 1996 Vol. 56. 3634-3637. August 15.1996
136. David M. Helfman, Patrick Flynn, Protiti Khan and Ali Saeed. **Tropomyosin as a Regulator of Cancer Cell Transformation.** *Tropomyosin Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, Volume 644, Section IV, 124-131, DOI: 10.1007/978-0-387-85766-4_10
137. 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.
138. Gehm BD and Rosner MR. **Regulation of insulin, epidermal growth factor, and transforming growth factor- α levels by growth factor-degrading enzymes.** *Endocrinology* 128: 1603-1610, 1991.
139. 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.
140. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ and Guenette S. **Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4162-4167, 2003
141. Razvan T. et al. **Immunohistochemical demonstration of the zinc metalloprotease insulin-degrading enzyme in normal and malignant human breast: Correlation with tissue insulin levels.** *International journal of oncology* 30: 73-80, 2007.
142. 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
143. 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

Apéndice A: Información extra

FIGO

Se presentan en la una tabla los criterios utilizados por FIGO (International Federation of Obstetricians and Gynaecologists) para la clasificación de cáncer cérvico uterino (tabla 1).

Tabla 15, Criterios de Estadios para la clasificación FIGO 2010.

Estadio I	El carcinoma se encuentra estrictamente confinado al cérvix
IA	Carcinoma invasivo que puede ser diagnosticado solo por microscopia, con una profundidad ≤ 5 mm y una extensión máxima de 7mm
IA 1	Invasión de estroma ≤ 3 mm de profundidad y una extensión de ≤ 7 mm
IA 2	invasión de estroma de 3-5mm de profundidad y una extensión no mayor de 7mm
IB	Lesión limitada al cérvix, con diagnostico macroscópico
IB1	lesión visible ≤ 4 cm
IB2	Tumor ≥ 4 cm
Estadio II	Carcinoma invasor fuera del cérvix, sin llegar a la pared pélvica o tercio inferior de la vagina
IIA	Sin invasión a los tejidos próximos al cuello uterino (parametrio)
IIA1	lesión visible no mayor a 4cm
IIA2	lesión visible mayor a 4cm
IIB	Con invasión parametrial
Estadio III	Tumor que se extiende a la pared pélvica o tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o riñones no funcionales
IIIA	Invade un tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica
IIIB	Se extiende a la pared pélvica y/o presencia de hidronefrosis o riñones no funcionales
Estadio IV	EL carcinoma se ha diseminado fuera de la pelvis y ha involucrado las mucosas del recto y a la vejiga y/o órganos distantes
IVA	Invade órganos adyacentes, vejiga y recto
IVB	Presenta metástasis en órganos distantes

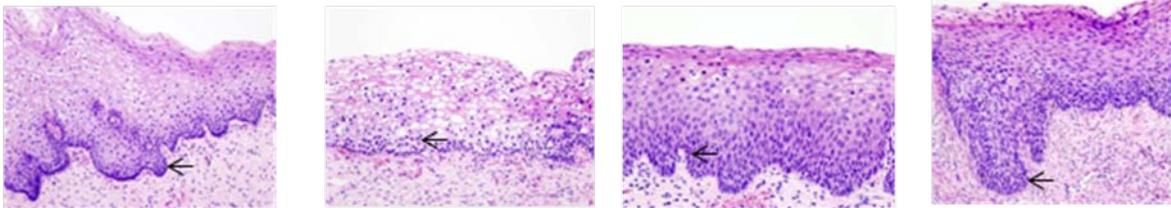
NIC

Se resumen los criterios de clasificación entre los distintos NIC tabla 2 y figura 1:

Tabla 16. Criterios utilizados para la clasificación de NIC

Tipo	Características
NIC I	Maduración correcta, anomalías nucleares escasas, figuras mitóticas mínimas, cambio de espesor de las capas celulares
NIC II	Cambios displásicos restringidos a dos tercios inferiores, más anomalías citogenéticas y con más figuras mitóticas
NIC III	la estratificación y diferenciación se ven alteradas, bastantes figuras mitóticas y anomalías citogenéticas aparecen en todo el tejido

Figura 23. Cortes histológicos de epitelio cervical normal, NIC I, NIC II y NIC III*



a) Epitelio cervical normal, hay una diferenciación normal y un orden claro en la laminilla basal (flecha)

b) NIC I, las células displásicas se confinan al tercio inferior, puede observar la alteración del grosor de las capas.

c) NIC II, las células displásicas se confinan a los dos tercios inferiores, hay invaginaciones anormales de la laminilla basal (flecha)

d) NIC III, las células displásicas se encuentran en todo el tejido, hay violación de la laminilla basal (flecha).

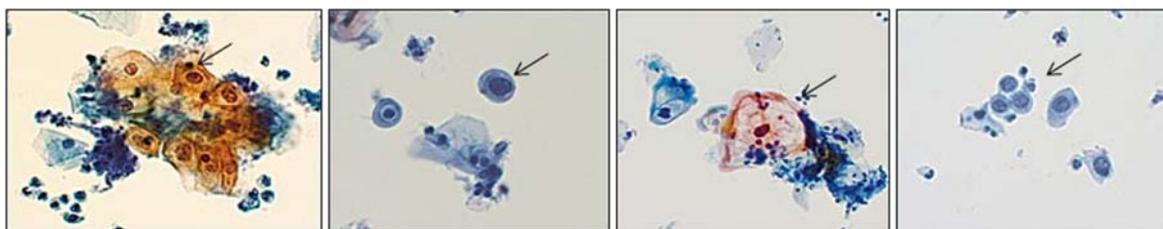
*Imágenes tomadas de http://es.wikipedia.org/wiki/Neoplasia_cervical_intraepitelial#cite_note-Agorastos-0

Bathesda

Tabla 17. Sistema de clasificación Bethesda 2010

Anormalidades de células epiteliales clasificación Bethesda
Células escamosas atípicas (ASC)
ASC de significancia indeterminada (ASC-US)
ASC que no descarta HSIL (ASC-H)
Lesión escamosas intraepitelial de bajo grado (LSIL) Involucrando: HPV/displasia media/NIC I
Lesión escamosas intraepitelial de alto grado (HSIL) Involucrando: Displasia media y severa, carcinoma in situ, NIC II y NIC III

Figura 24 Diferentes especímenes y clasificaciones de acuerdo al sistema Bathesda 2010



<p>Especímen cervical interpretado como células escamosas atípicas de significancia indeterminada (ASC-US). En este espécimen, las características citológicas son sugestivas, pero no diagnósticas, para LSIL.</p>	<p>En esta citología el espécimen muestra una sola célula parabasal atípica (flecha). La célula tiene varias características de una HSLIL –célula con una proporción mayor de núcleo/citoplasma- pero debido a que es solo una célula se clasifico como ASC-H.</p>	<p>Efectos citopáticos del HPV -atipia nuclear y cavitación citoplasmática perinuclear- la manifestación morfológica de una lesión intraepitelial con producción de HPV (flecha). El núcleo es más grande que uno normal, este espécimen se clasifica como LSIL</p>	<p>Características citológicas de un proporción núcleo/citoplasma alterada, característica de HSIL. Las células HSIL son de un tamaño menor que las células LSIL</p>
--	--	--	---

*imágenes tomadas de <http://www.aafp.org/afp/2003/1115/p1992.html>

Debido a que el sistema NIC y Bathesda surgieron de manera simultánea se presenta una comparación, sin embargo, no se profundizara entre las diferencias y similitudes de estos métodos y solo se presenta este cuadro de comparación sencilla (tabla 5).

Tabla 18 Comparación del sistema Bathesda y NIC

Sistema Bathesda 1999	NIC	Interpretación
Dentro de los límites normales	Normal	no hay anormalidades celulares
ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado)		Células escamosas con anormalidades mayores a aquellas atribuibles a cambios por reacciones y que no tienen criterio para ser una lesión intraepitelial
LSIL (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado)	NIC1	células poco anormales; estos cambios suelen deberse al HPV
HSIL (lesión escamosa intraepitelial de alto grado)	NIC2/3	Células mediana o altamente anormales
Carcinoma	Carcinoma escamoso invasivo	La posibilidad de desarrollar cáncer invasivo es alta

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 mesoderma 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 19. 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 [18].

Asociaciones clínicas del HPV

Asociación clínica	Tipo de HPV
Verrugas en planta de pies	1, 2, 4, 63
Verrugas comunes	1, 2, 3, 4, 7, 10, 26, 27, 28, 29, 41, 57, 65, 77
Verrugas planas	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Otras lesiones cutáneas (cistos epidermoides, carcinoma laríngeo)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Displasia epidermoide verruciforme	2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatosis respiratoria recurrente	6, 11
hiperplasia epitelial focal de cavidad oral	13, 32
Papilomas conjuntivos	6, 11, 16
Condiloma acuminata	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Neoplasia intraepitelial cervical	
No específica	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Bajo riesgo	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Alto riesgo	6, 11, 16, 18, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Carcinoma cervical	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Interacciones de E6 y su efecto

Proteína Asociada	Función celular de la proteína asociada	Degradación (+/-)	Posibles consecuencias de la interacción en la célula.
AMF-1/Gps2	Aumenta la actividad de p300	+	Supresión de Gps2; actividad de activación transcripcional
Bak	Miembro de la familia Bcl-2; proteína pro-apoptóticas	+	Efecto anti-apoptóticos
CBP/p300	co-activador de p53; regulación en la modulan de las señales en control del ciclo celular, diferenciación y respuesta inmune	-	Represión de la transcripción dependiente de p53
c-myc	Factor de Transcripción; inducción de la apoptosis	+	Posiblemente contrarresta la apoptosis inducida por myc
E6AP	Transducción de señales en proliferación mediante la degradación de las cinasa Blk de la familia Src	+	Desregulación de la transducción de señales en células en proliferación; factor esencial para las acciones de degradación de E6
E6TPI	Proteína GAP (proteína activadora de GTPasas) regulador negativo de Rab	+	Inhibidor de las señales mitogénicas mediadas por Rab
ERC55 (E6BP)	Proteína de unión a Calcio (diferenciación de células epiteliales y en la inhibición de la apoptosis)	-	Inhibición de la diferenciación terminal de las células epiteliales; inhibición de apoptosis independiente de p53
hDLG/Sap97	Homólogo de humano de la proteína supresora de tumores <i>disc</i> de Drosophila, importante para la formación de las polaridades en la diferenciación de las células epiteliales.	+	Afecta la adhesión celular, la polaridad y la proliferación, contribuyendo a la invasividad de las célula transformadas
hScrib	Homólogo de humano de la proteína supresora de tumores de Drosophila Scrib, que controla la formación de las uniones celulares y el crecimiento epitelial	+	Posible pérdida de la adhesión epitelial y la polaridad

Factor regulatorio interferón 3 (IRF3)	Inducción del mRNA del interferón β ; transactivador de los interferones	-	Respuesta celular inadecuada a la infección viral (no hay interferencia con la replicación viral, ni incremento del MHC-I, ni activación de células NK)
MAGI -1/2/3	Formación de un complejo con β -catenina; regulación del supresor de Tumores PTEN	+	Posiblemente afección en la señalización de Akt; la inhibición de la apoptosis dependiente de p53
Mcm7	Iniciación y permiso de la replicación del DNA	+	Anulación del punto de arresto la fase G1
Mupp1	Multiple proteínas PDZ posible rol en transducción de señales.	+	Posible disrupción del ensamblaje de los complejos de señalización en las membranas de las células epiteliales
Paxilina	Proteína de Adhesión focal; tiene un papel en la adhesión y la regulación de la actina del citoesqueleto	-	Disrupción de las interacciones de la matriz extracelular
p53	Proteína supresora de tumores; regula la respuesta celular a eventos mitogénicos	+	Pérdida del control del Ciclo celular; efectos anti apoptóticos.
XRCC1	Proteína de reparación de DNA	-	Interfiere con la eficacia de la reparación de DNA.

Interacciones de E7 y su efecto

Proteína Asociada	Función celular de la proteína asociada	Posibles consecuencias de la interacción en la célula.
Miembros de la Familia de AP1	Factores de Transcripción	Inhibición de la actividad transcripcional de IRF-1
α-glucosidasa	Enzima de control en rutas glicolíticas	Activación alostérica que da como resultado el agotamiento del glucógeno; promueve la hiperproliferación celular
Complejo de las Ciclinas A y E	Actividad de cinasa	Activación de la ciclina A seguida de la activación de la ciclina E
Cinasa de histonas H1	Actividad de cinasa	Posible interferencia con la transición de fases G2/M del ciclo celular
hTid-1	Proteína homóloga supresora de tumores en <i>Drosophila</i> Tid56	Posible activación de E2F en respuesta a dominios-J
IGFBP-3 (insulin like growth factor binding protein)	Blanco transcripcional de p53 limita la disponibilidad de IGFs.	Decremento de las cantidades de IGFBP
IRF-1 (interferón-γ induced transcriptional factor)	Regula la expresión de IFN-8	Posible inhibición de IRF-1 mediada por la activación del promotor IFN- β por el reclutamiento de las desacetilasas en el promotor
Mi2β	Desacetilasa de Histonas	Decremento de la actividad transcripcional de IRF-1
Mpp2	Factor de Transcripción	Decremento de la actividad transcripcional de IRF-1
Cinasa de Piruvato M2 (M2-PK)	Modulación de la actividad glicolítica de la enzima M2	Cambo en el equilibrio de la forma tetramérica de alta afinidad, a la forma dimérica de baja afinidad por el sustrato de M2-PK
pRb	Regulación del control del ciclo celular mediante la formación de complejos de los factores de transcripción E2F.	Fosforilación de pRb y la liberación de E2F, ubiquitinación y subsecuente degradación.

pRB- proteínas asociadas-	Regulación del control celular	Activación de genes específicos para la progresión del ciclo celular
p21^{CIP-1}	Inhibidor de Ciclinas dependiente de cinasas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular.
p27^{KIP-1}	Inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular.
p48	Proteína reguladora de interferón (unión a DNA, componente de ISGF3)	Inhibición de la vía de señal de interferon mediante la translocación nuclear de p48 después de la estimulación de IFN- α
ATPasa Subunidad 4	Subunidad S4 del proteosoma-26S	Degradación de pRB mediante el proteosoma.
TAF110 (TATA box-binding-protein-associated factor)	Involucrada en la iniciación de la transcripción; coactivador de la regulación de la transcripción	Modulación de la transcripción
Proteína de unión a caja TATA	Involucrada en la iniciación de la transcripción	Posible interferencia con la activación de los promotores dependientes de p53

Células del sistema inmune y funciones de las moléculas que producen

Célula	Moléculas producidas	Función
Linfocitos	Sintetizan y exportan factor epidermal de crecimiento unido a heparina (HB-EGF) y factor de crecimiento de fibroblasto (FGF)	Son encargadas de la respuesta humoral, respuesta a antígenos proteicos y participan en la inmunidad innata (asesinas naturales) al reconocer lo propio de lo ajeno y dado las moléculas que producen son potenciadores del crecimiento de fibroblastos.
Monocitos	Producción de interleucinas, IL-1B, IL-6 y TNF- α , MCP-1	Son células encargadas de la fagocitación de agentes foráneos y restos celulares, también ayudan a reclutar células T
Neutrófilos	Liberan lisozimas, mieloperoxidasa, proteínas cationicas, elastasa, colagenasa, proteinasa 3. Producción de PG, LT, PAF. También liberan especies intermediarias reactivas de oxígeno y nitrógeno con efectos citotóxicos (peróxido de hidrógeno, radicales hidroxil, oxígeno radical libre).	Principales fagocitadores de agentes patógenos y remodelado de ME. Involucrada en la vasoactivación. Mediadoras de respuesta inmune sistémica.
Basófilos	Producción de histamina, heparina, serotonina, leucoitreno C4,	Regulación de la respuesta inflamatoria y activación de linfocitos T de memoria.
Eosinófilos	Producen MBP, ECP, EPO, EDN. También sintetizan PAF, LTC-4, citocinas (IL-3, IL-5, GM-SCF) y quioquinas (eotacina) y óxido nítrico	Reguladores de la respuesta inflamatoria y sustancias vasoactivadoras, también se han visto involucradas en fagocitosis.
Células dendríticas	Producción de citocinas (interleuquina-1, 6, 12) y quemocinas inflamatorias. Expresión de moléculas (CD40, CD80 y MHC-III-A), estimuladoras de adhesión para linfocitos T.	Presentadoras de antígeno e importantes remodeladoras de la ME
Mastocitos	Productoras de histamina, proteasas (tripsina y quimasa), TNF, interleuquina (IL-1), GM-CSF, PAF, VEGF, quioquinas (IL-8, MIP-1, RANTES) y prostaglandinas D2 y leucotrienos C4	Promueven inflamación por la producción de tripsina, que incrementa la permeabilidad endotelial, lo que recluta células inflamatorias. La quimasa es una enzima que actúa fuertemente sobre la ME, al digerir colágeno IV y activar metaloproteinasas.

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 ligando 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 receptor, lo que activa el residuo aspartato para la señalización.

Las Integrinas, son producidas por una amplia gama de células, las cuales tienen un papel central en la unión de las células a la matriz extracelular y son transductores de señales de componentes extracelulares como fibronectina y colágeno. La unión del ligando en el dominio extracelular de la integrina cambia su conformación, lo que agrupa a la membrana celular e inicia la transducción de señales. Las integrinas carecen de actividad cinasa, por lo cual, la transducción de señales se lleva a cabo por una variedad de proteínas adaptadoras. La proteína cinasa unida a integrina, es una de las principales proteínas que actúa como coordinadora de la señalización por integrinas. Se ha visto la cooperación entre las integrinas y los RTC en la señalización celular, son capaces de determinar la supervivencia celular o apoptosis, así como en ocasiones la diferenciación celular.

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 μL de muestra con 36 μL 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

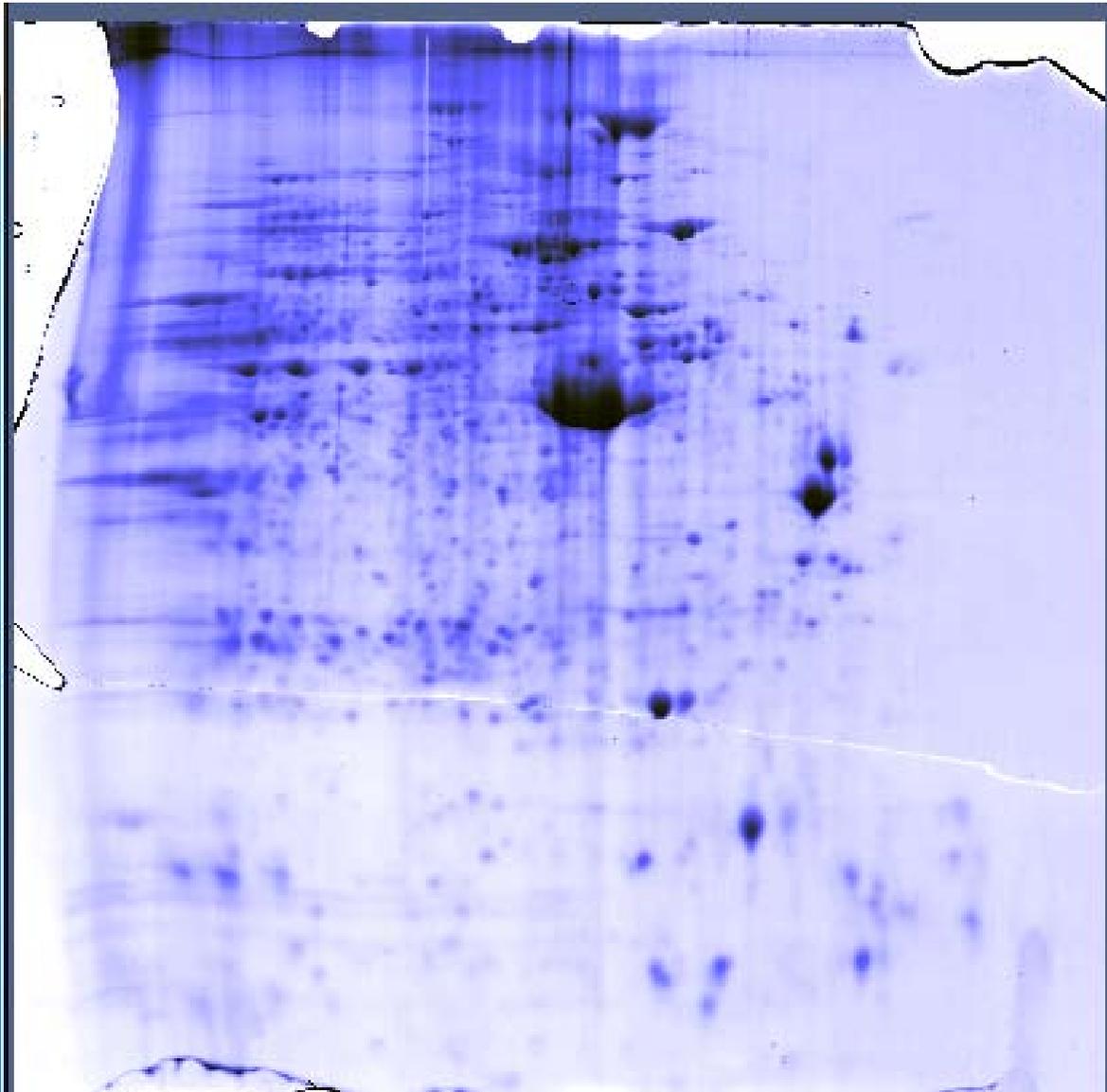
Solución de Bradford:

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

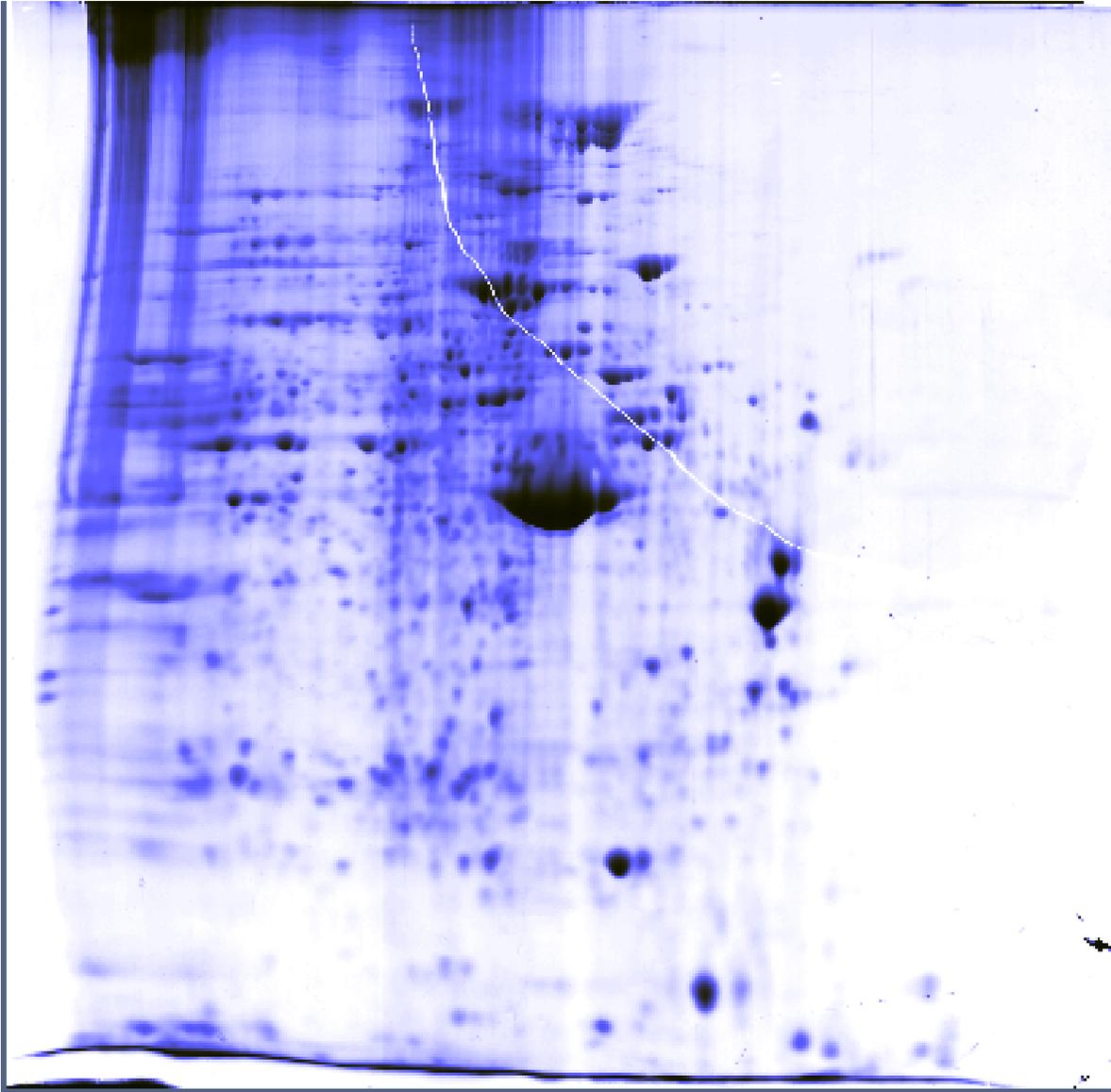
En un tubo eppendorf agregar 990 μL de Agua MiliQ y 10 μL de HCl 12 N

Apéndice C: Geles

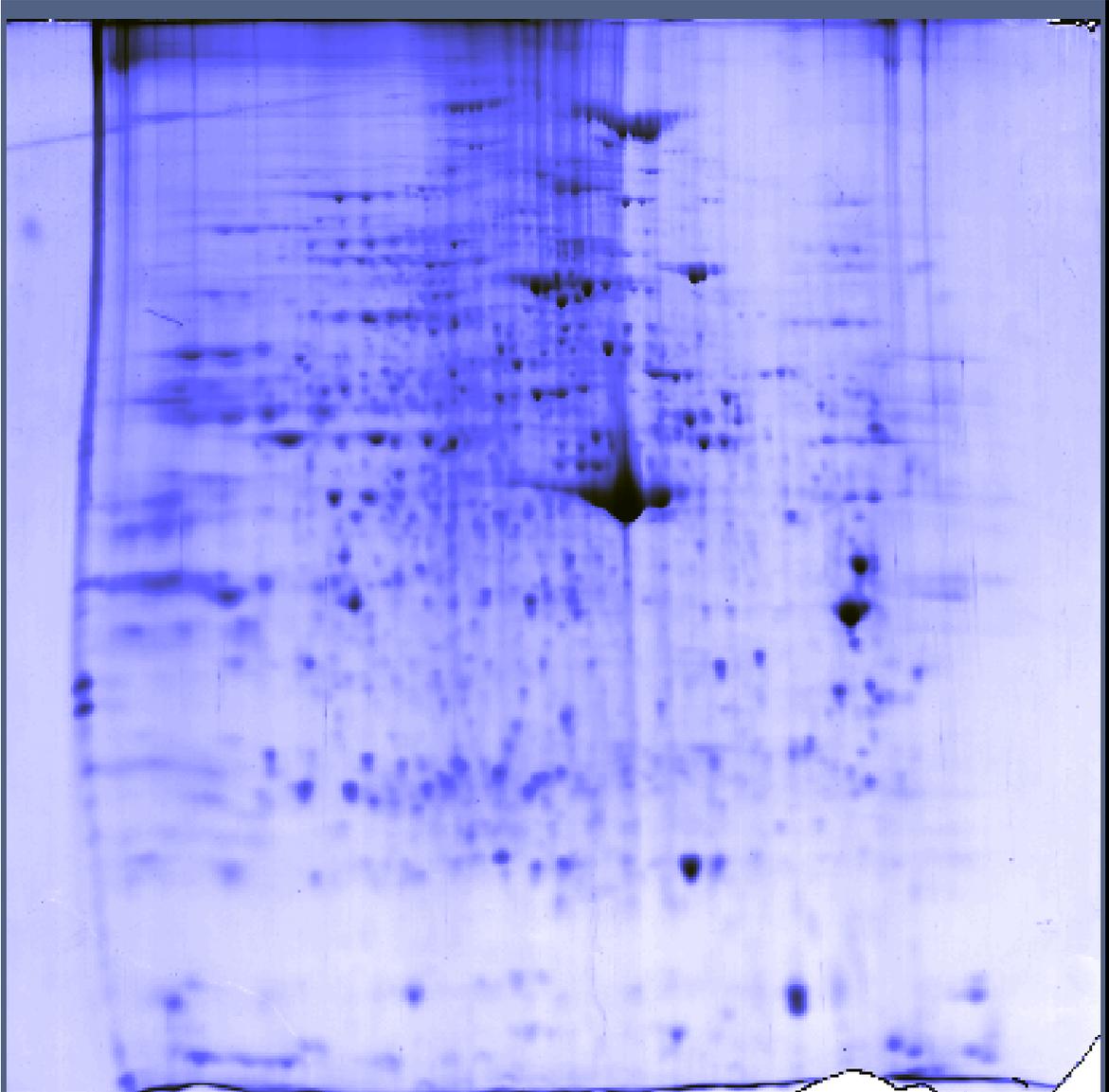
Tumor HeLa T30 replica experimental 1



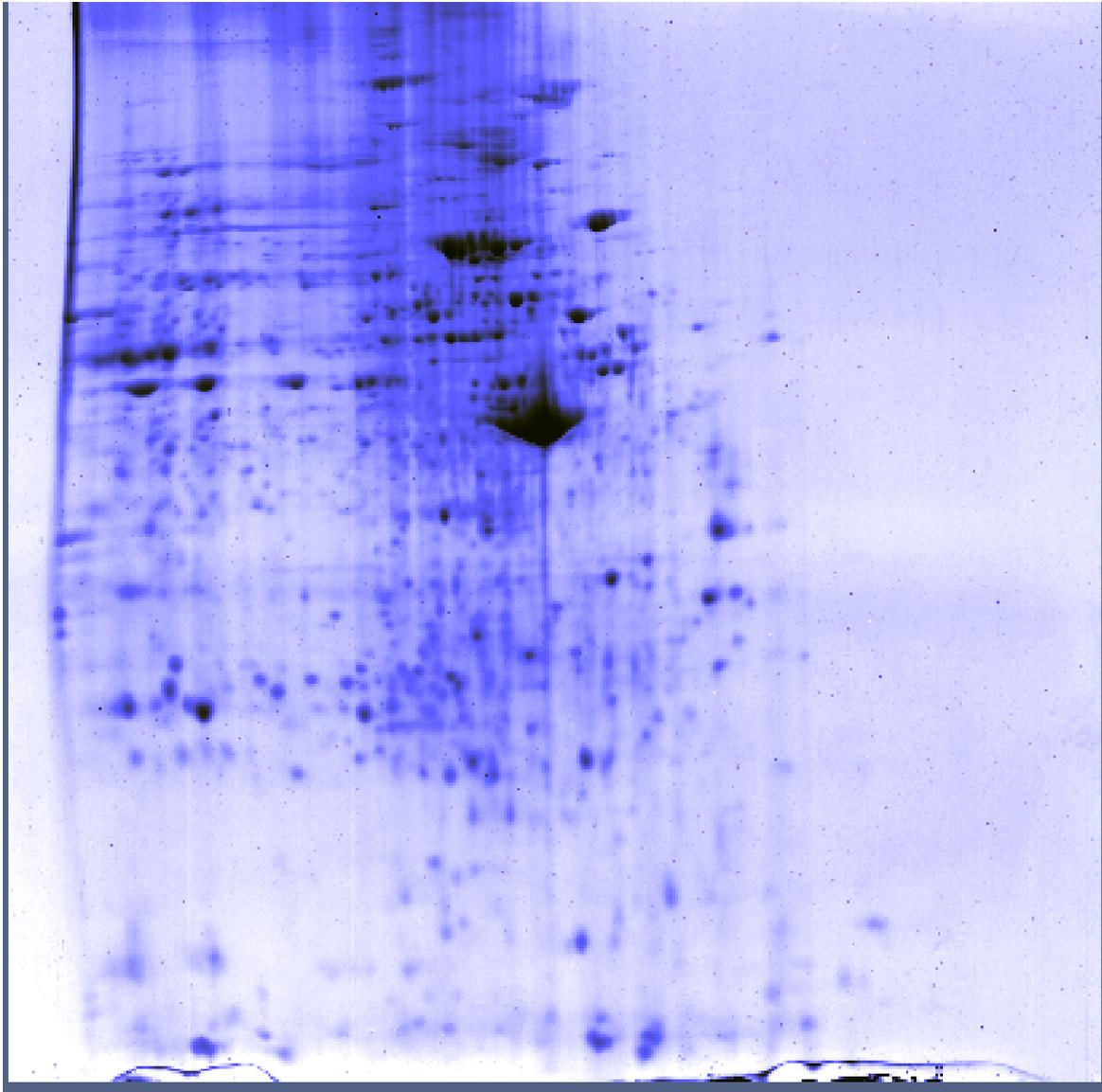
Tumor HeLa T30 replica experimental 2



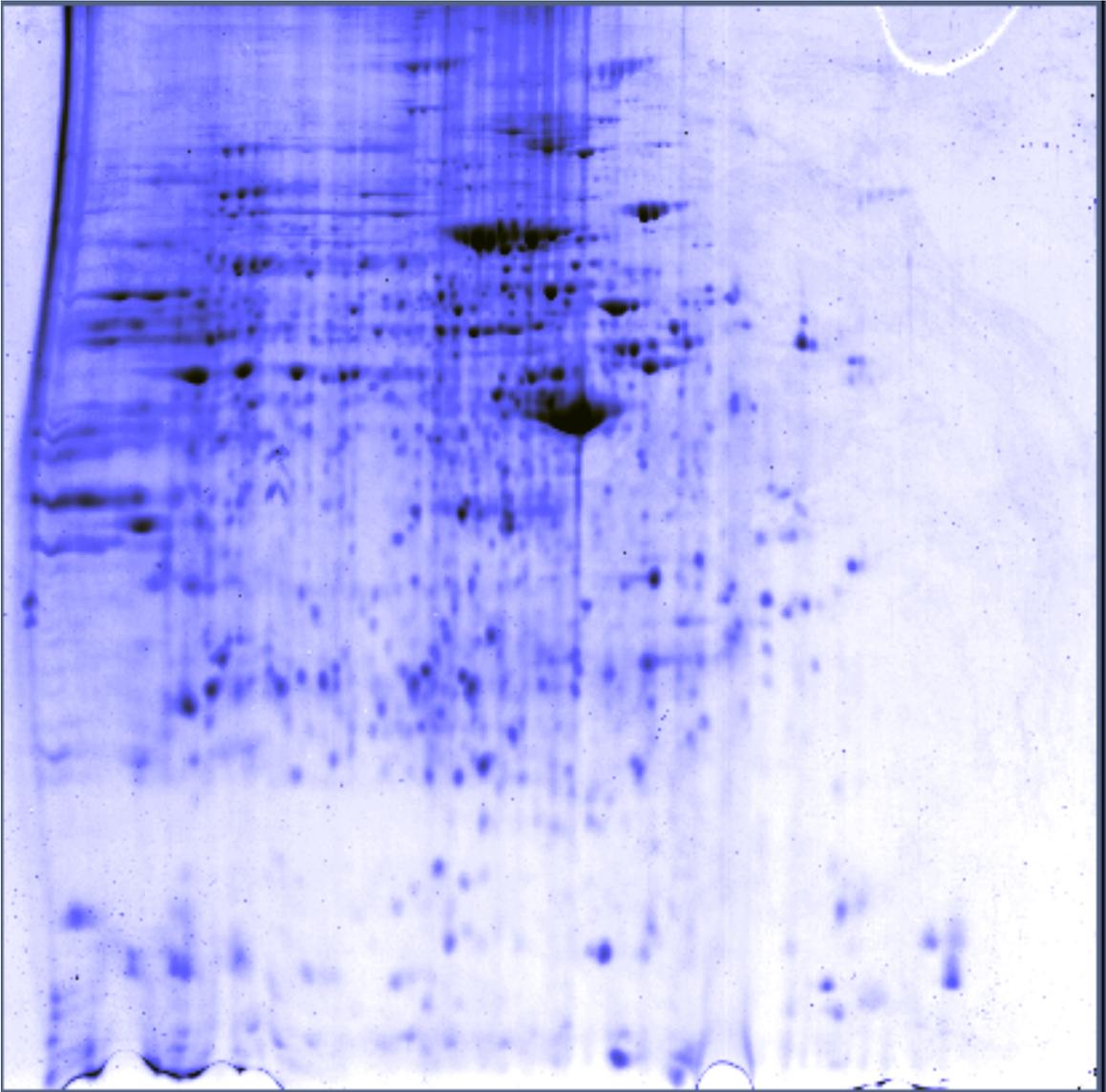
Tumor HeLa T30 replica experimental 3



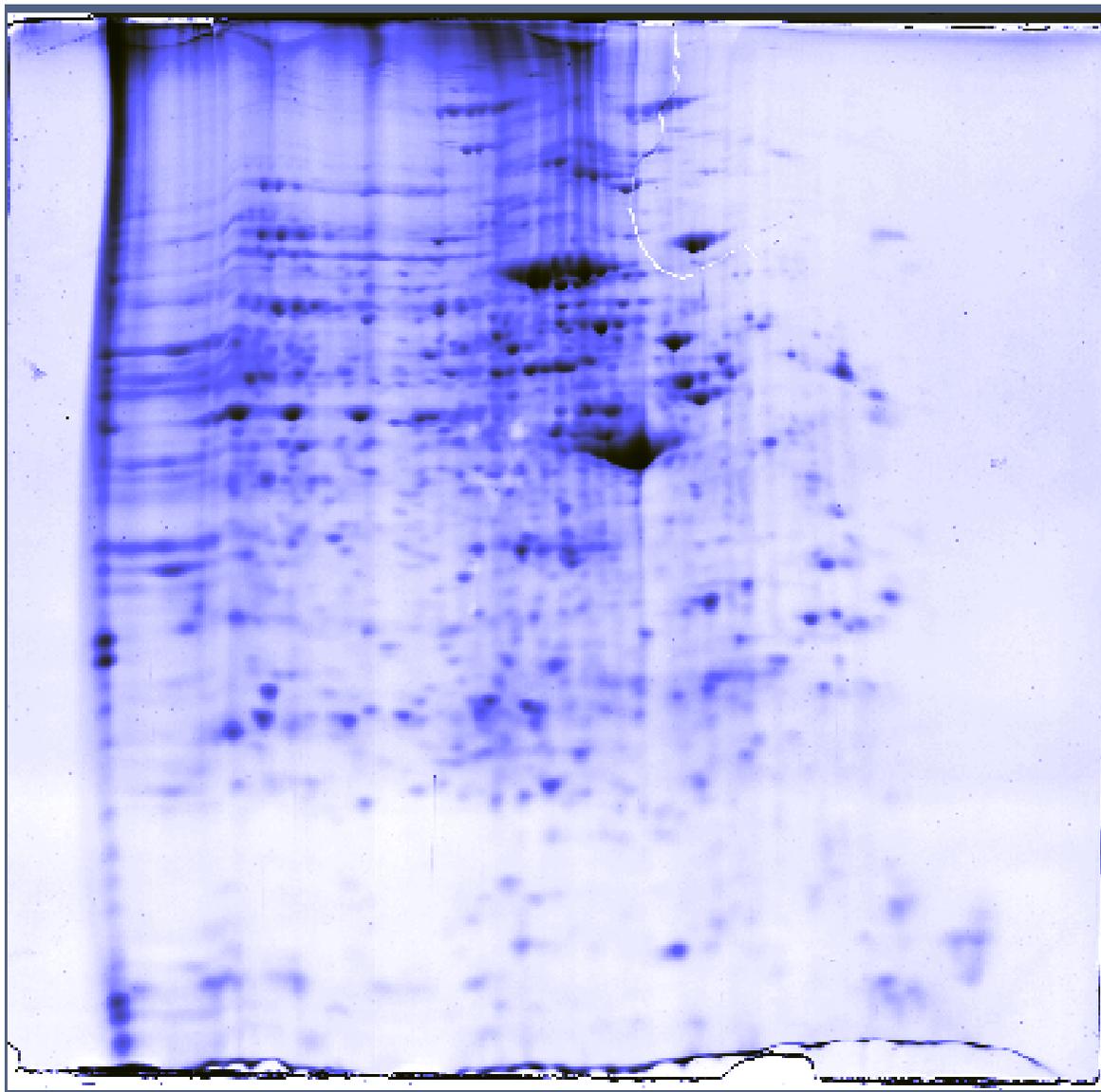
Tumor HeLa T45 replica experimental 1



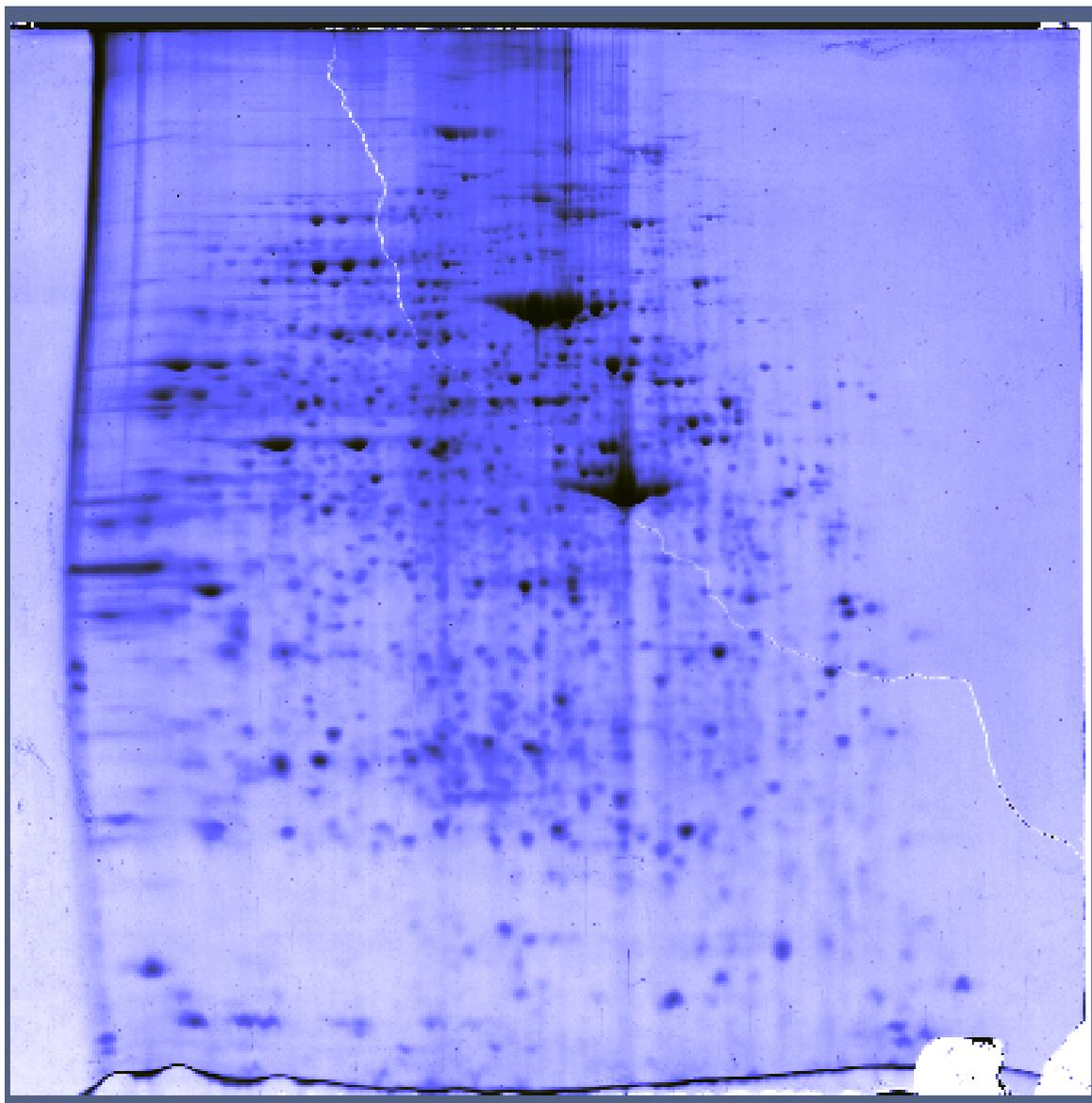
Tumor HeLa T45 replica experimental 2



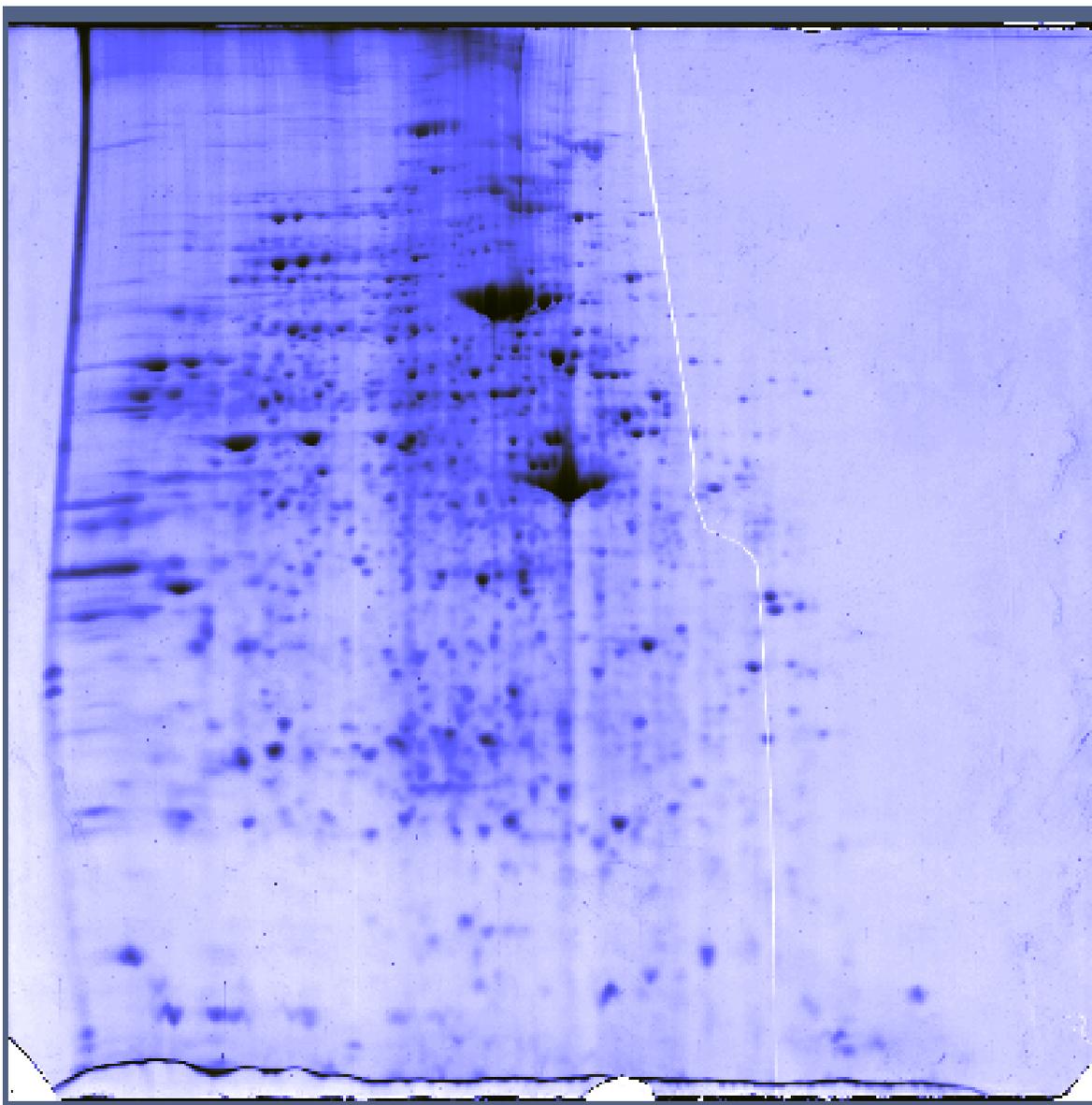
Tumor HeLa T45 replica experimental 3



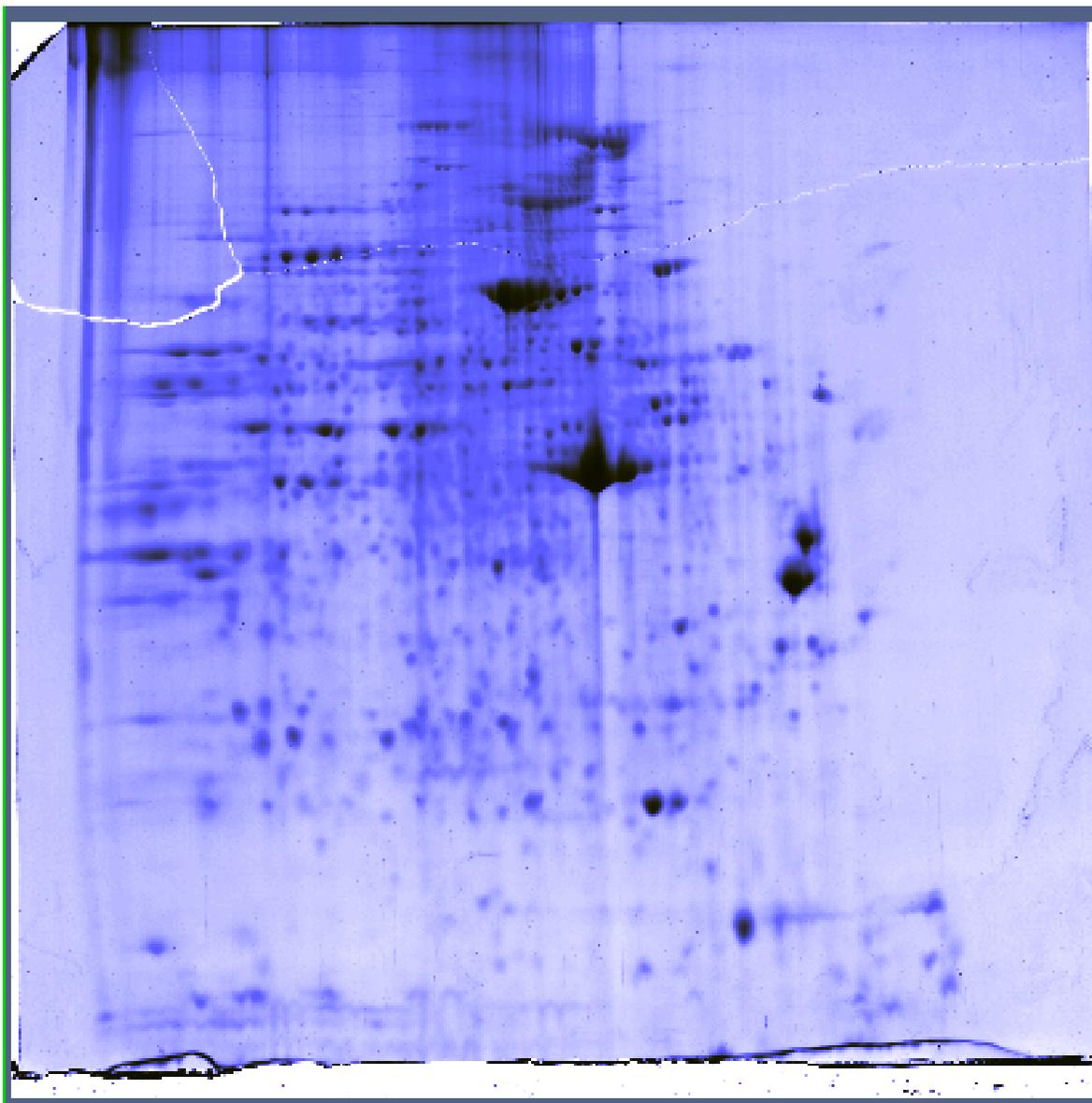
Tumor HeLa T50 replica experimental 1



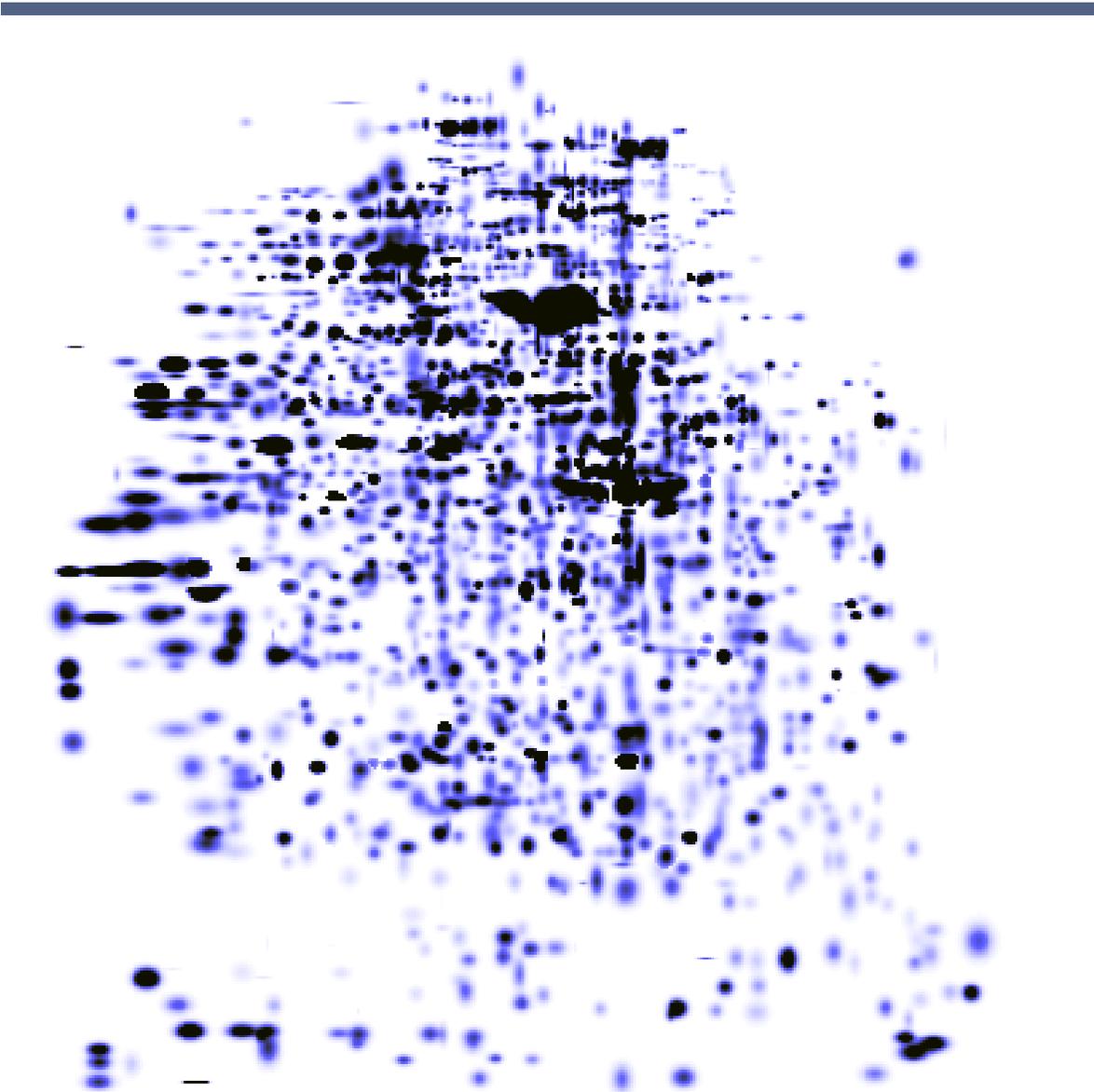
Tumor HeLa T50 replica experimental 2



Tumor HeLa T50 replica experimental 3



Gel Maestro



Apéndice D: Proteínas identificadas

Proteínas identificadas

Constantes

Figura 25. CH60_HUMAN.

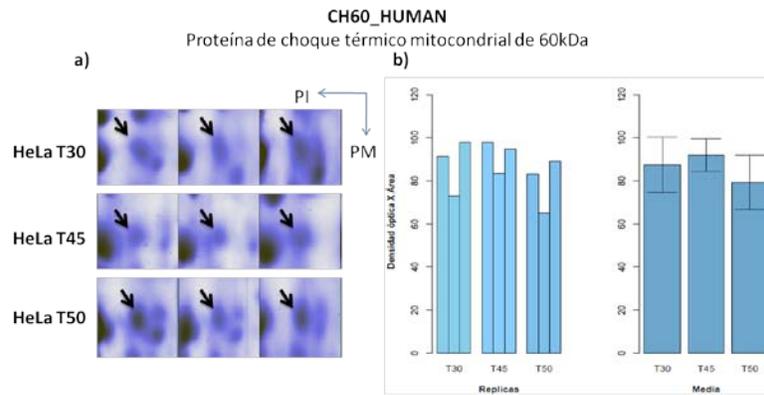


Figura 26. CP21A_HUMAN.

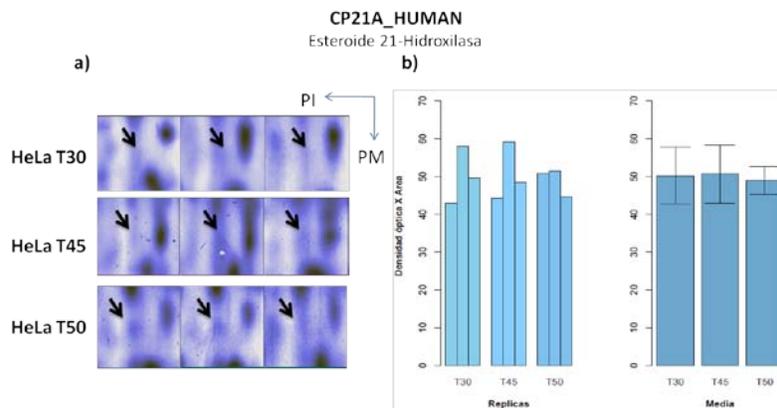


Figura 27. ENOA_HUMAN.

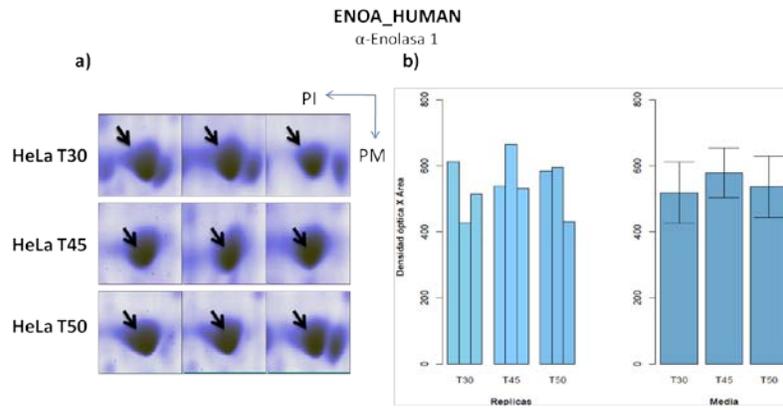


Figura 28. FRIL2_MOUSE.

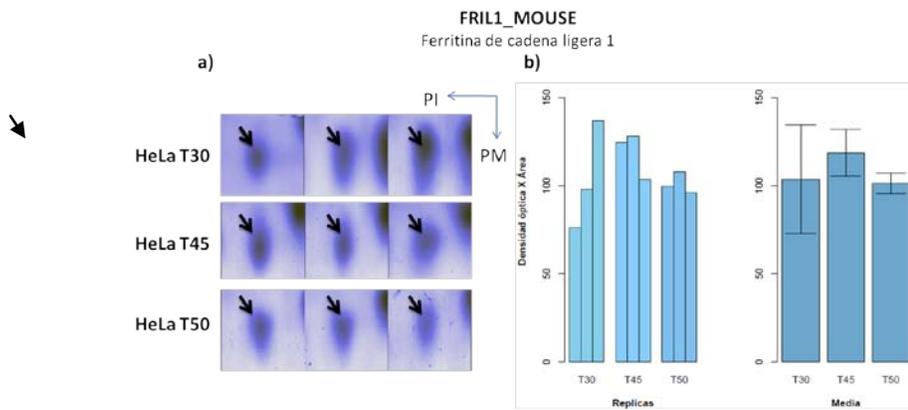


Figura 29. GDIB_HUMAN.

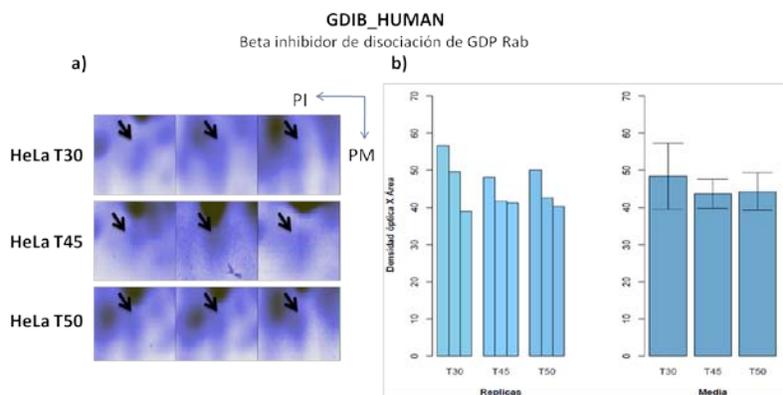


Figura 30. GRDN_HUMAN.

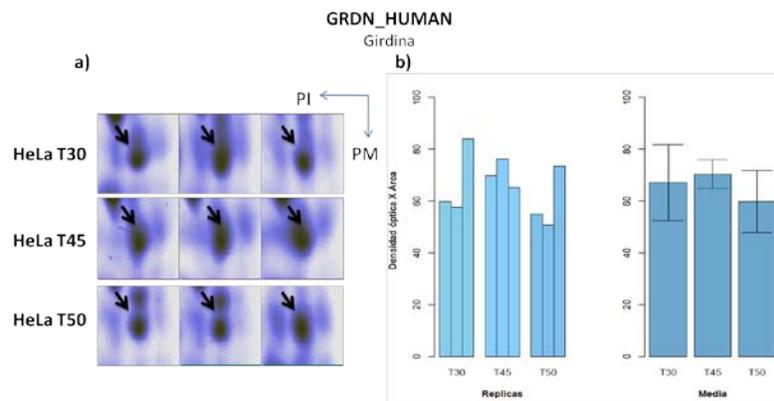


Figura 31. PKHA2_HUMAN.

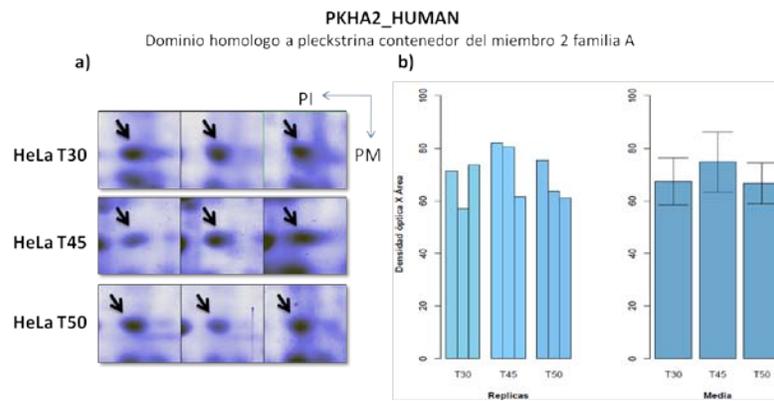
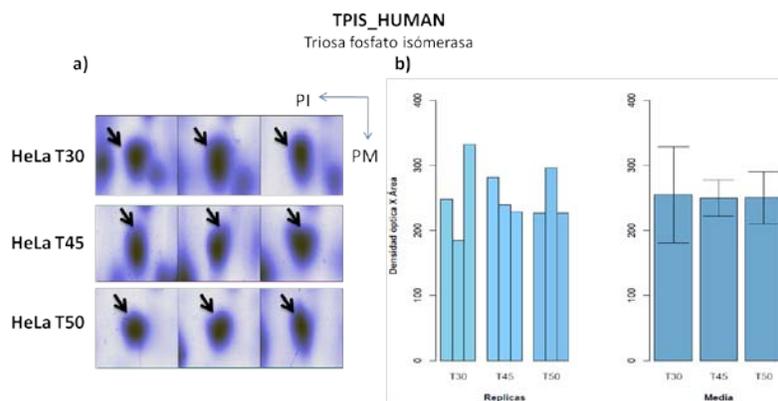


Figura 32. TPIS_HUMAN.



Sub-expresadas

Figura 33. ACTS_HUMAN.

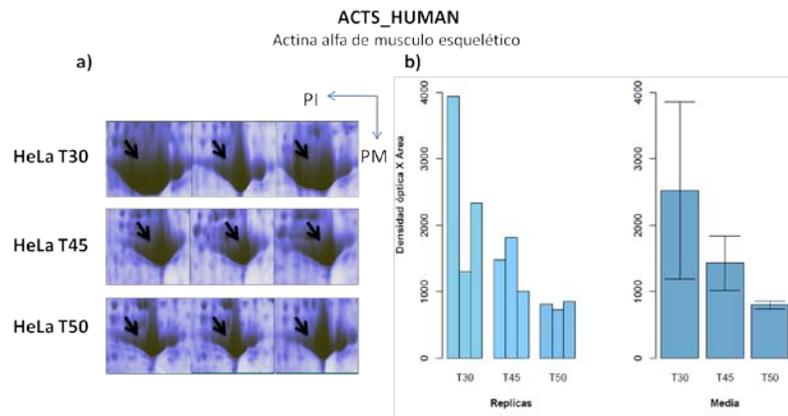


Figura 34. ANXA2_HUMAN.

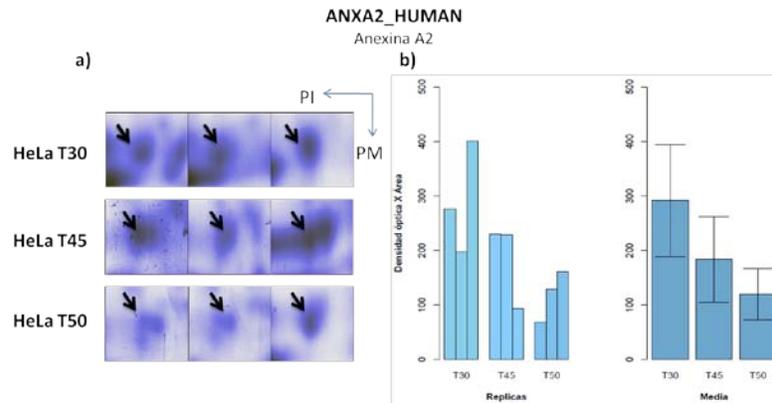


Figura 35. CO6A2_MOUSE.

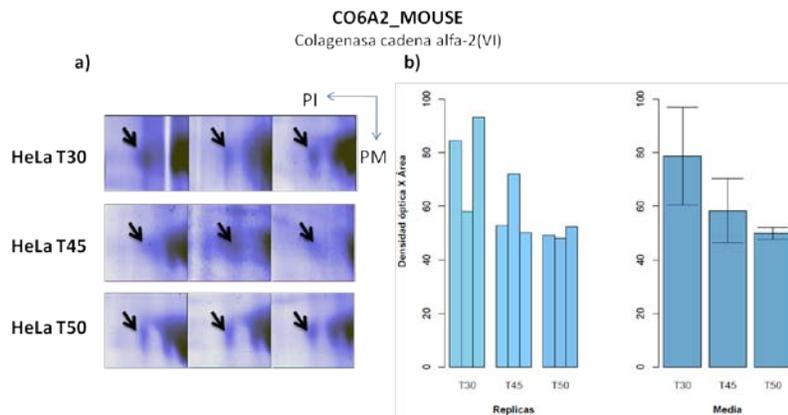


Figura 36. DDX3X_MOUSE.

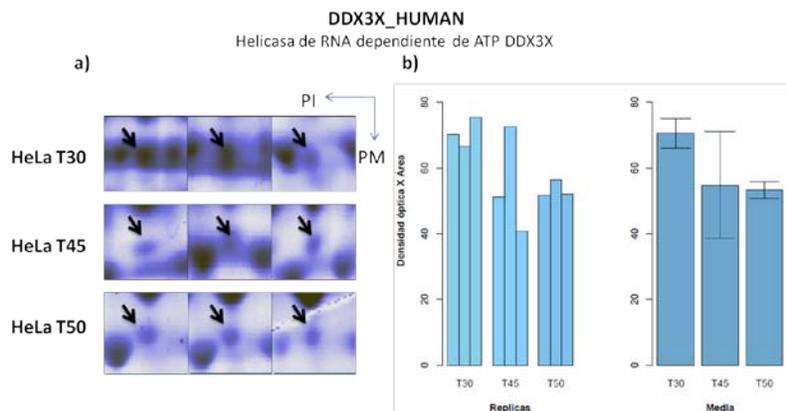


Figura 37. EIF3I_HUMAN.

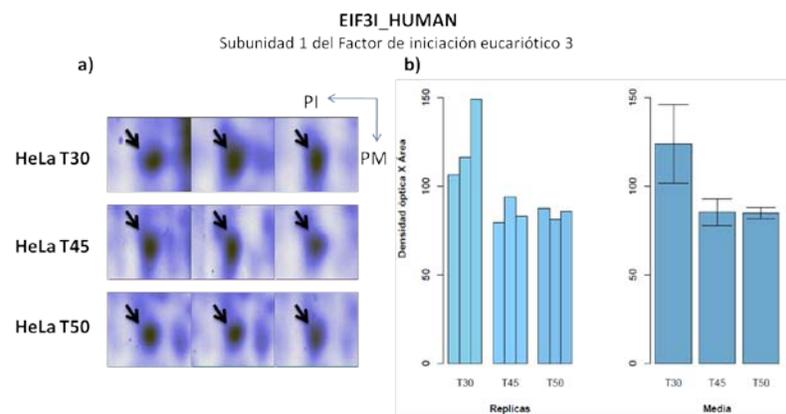


Figura 38. GRP78_HUMAN.

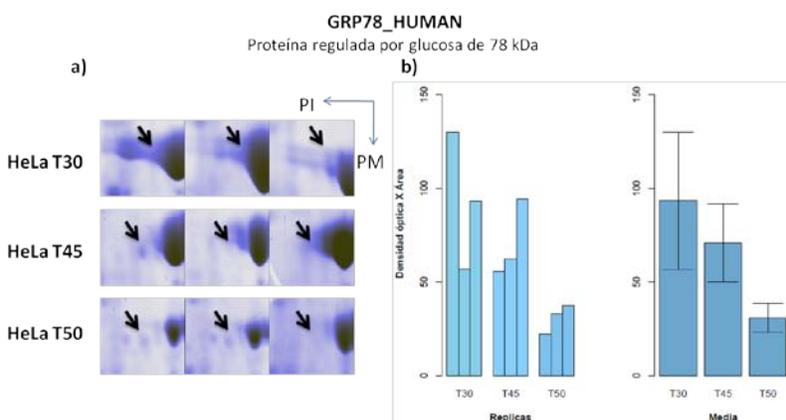


Figura 39. HSPB1_HUMAN.

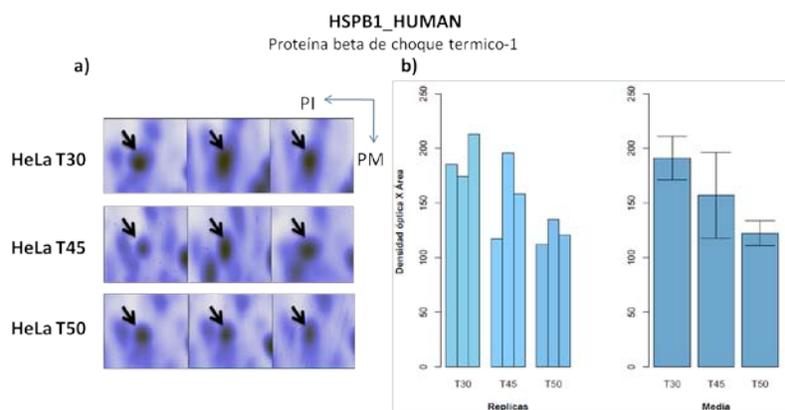


Figura 40. IF4A1_HUMAN.

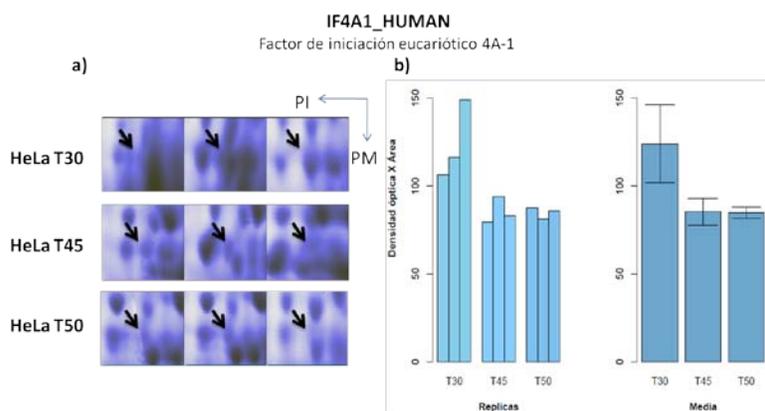
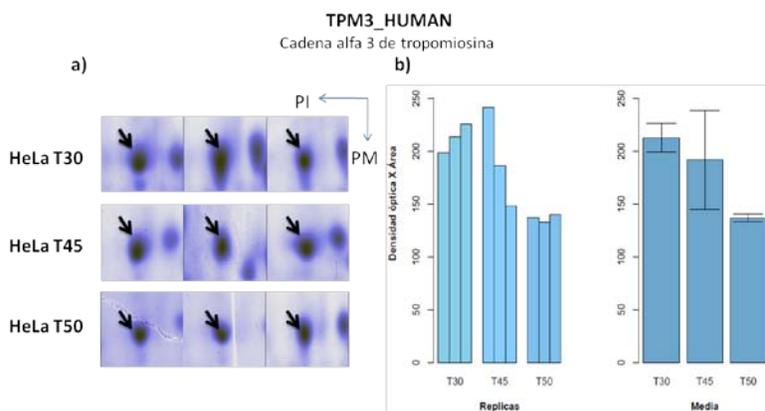


Figura 41. TPM3_HUMAN.



Sobre-expresadas

Figura 42. G3P_HUMAN.

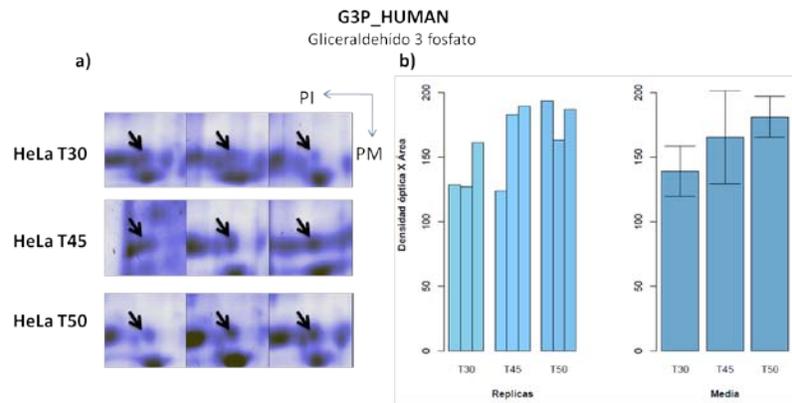
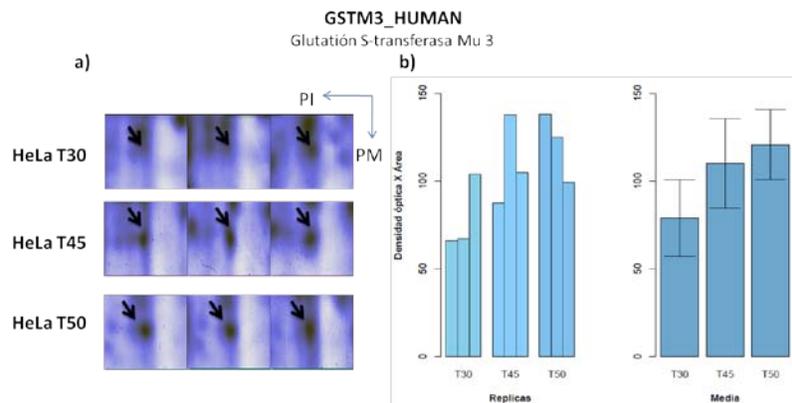


Figura 43. GSTM3_HUMAN.



Oscilantes sobre-expresadas

Figura 44. ANXA5_HUMAN.

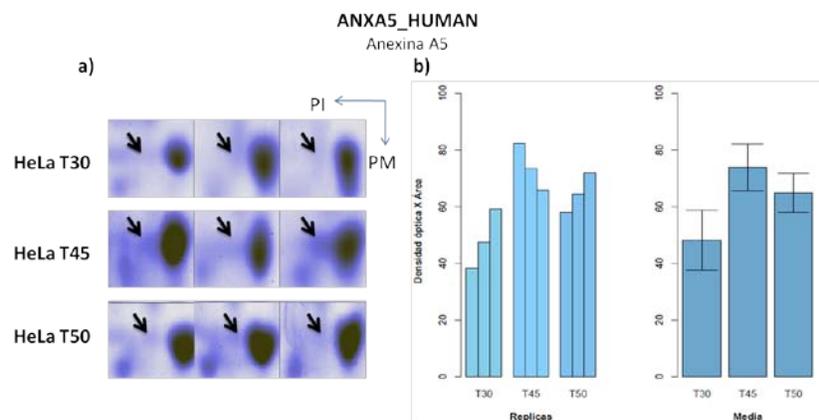


Figura 45. DDAH1_HUMAN.

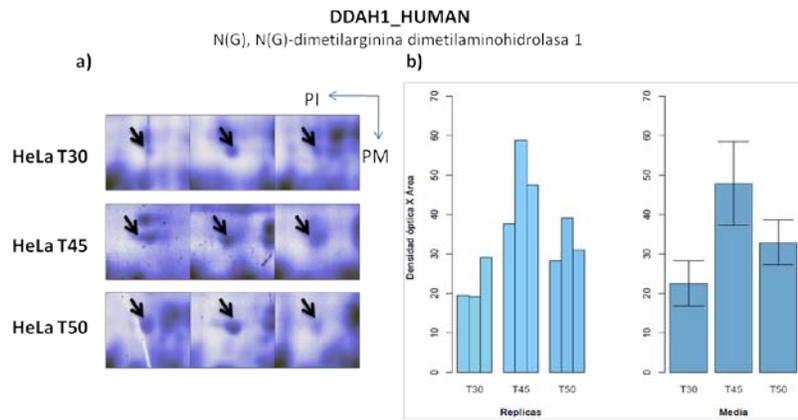


Figura 46. FA50A_HUMAN.

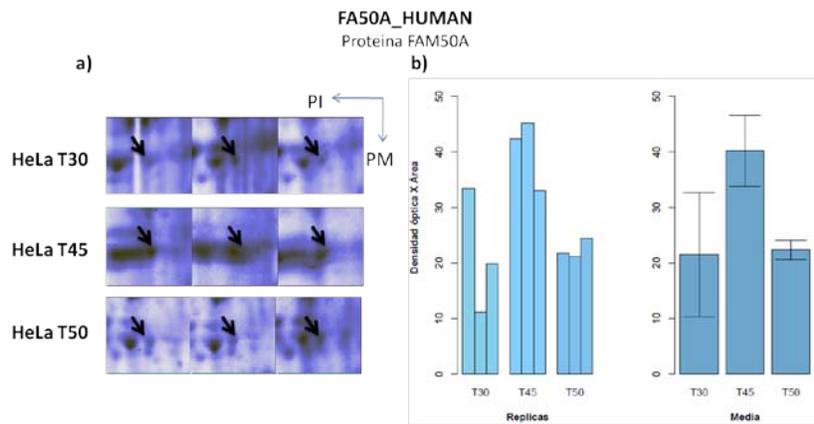


Figura 47. HSP7C_HUMAN.

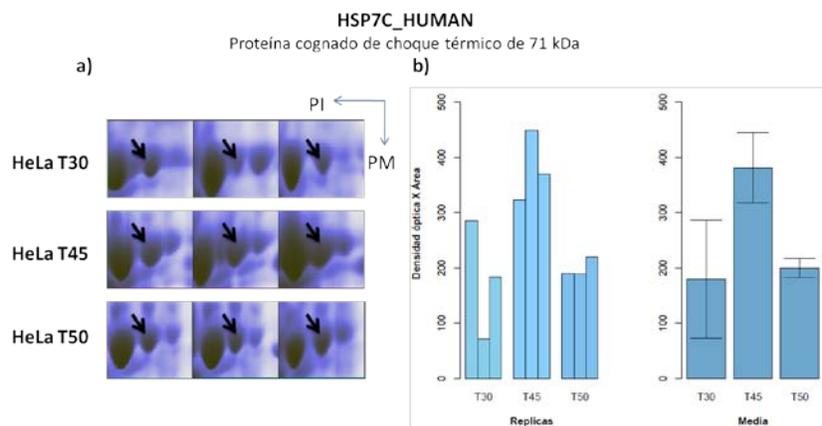


Figura 48. HSP71_HUMAN.

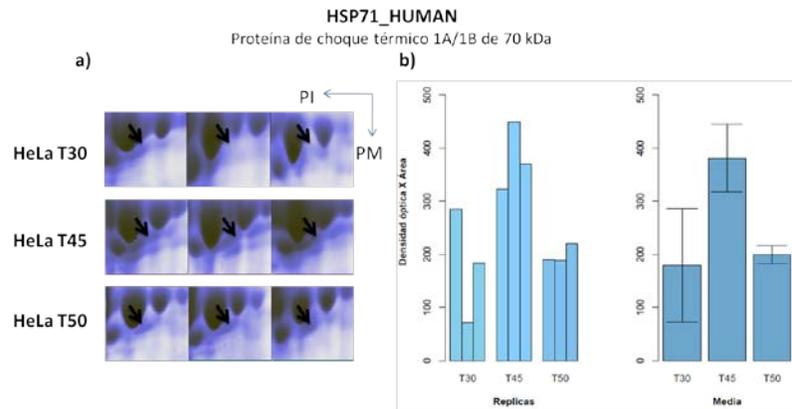


Figura 49. PNPH_MOUSE.

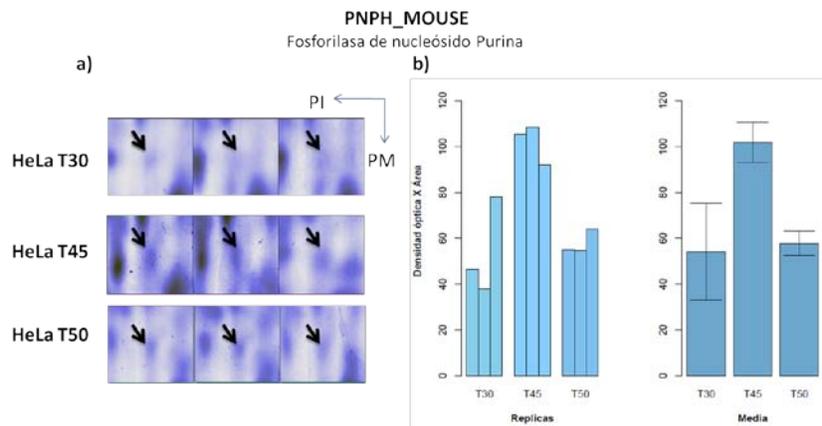
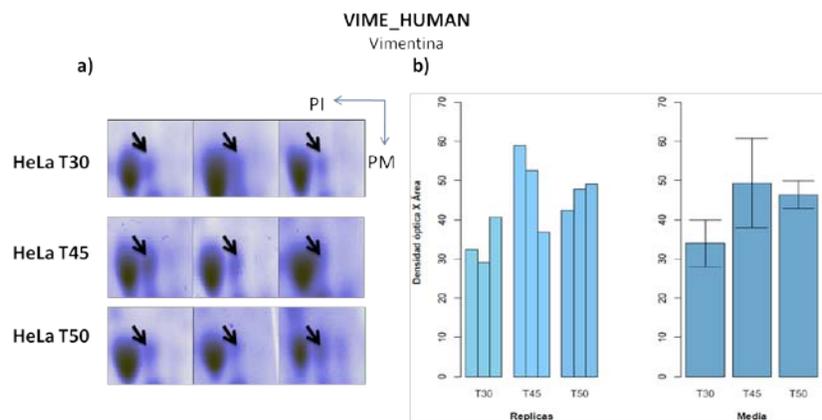


Figura 50. VIME_HUMAN.



Oscilantes sub-expresadas

Figura 51. ACTC_HUMAN.

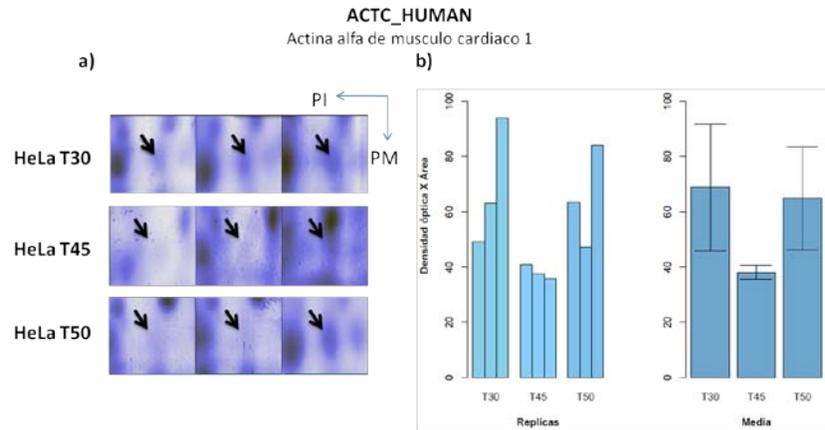


Figura 52. IDE_MOUSE.

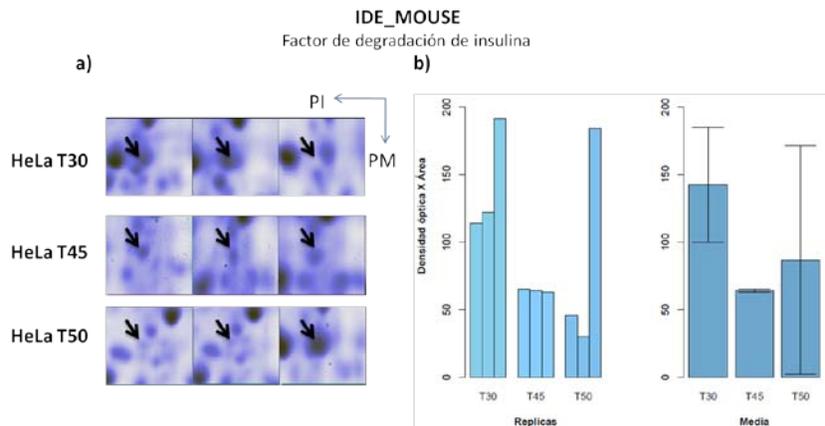


Figura 53. KCRM_MOUSE.

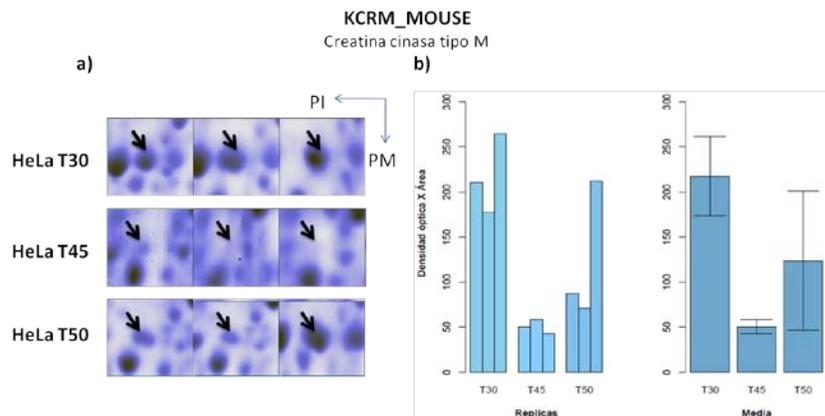


Figura 54. TPIS_MOUSE/HUMAN.

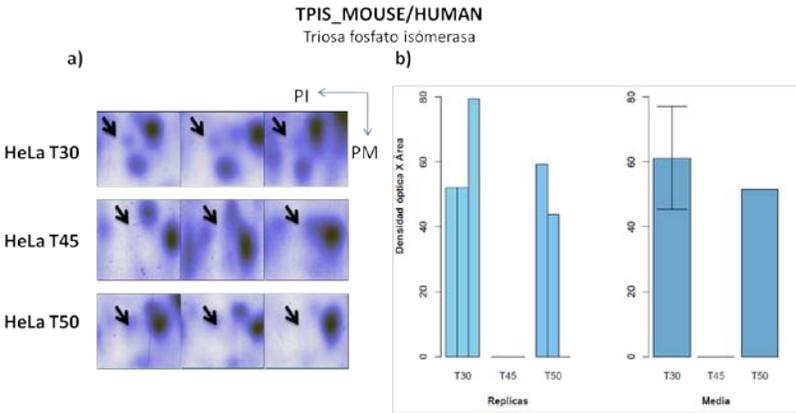
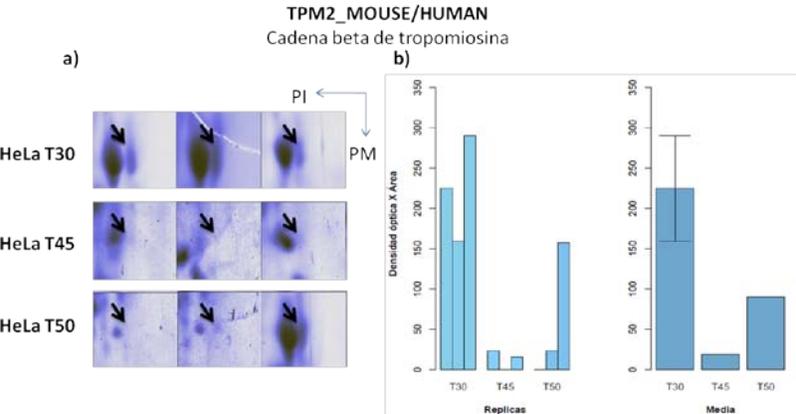


Figura 55. TPM2_MOUSE/HUMAN.



Apéndice E: Resultados suplementarios

Tabla 1 Medidas de los tumores a T30, T45 y T50 de la línea celular HeLa.

HeLaT30	Ancho cm	Largo cm	Grueso cm	Volumen cm ³	Promedio mm ³	Desviación mm ³
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
HeLaT45						
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
HeLaT50						
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

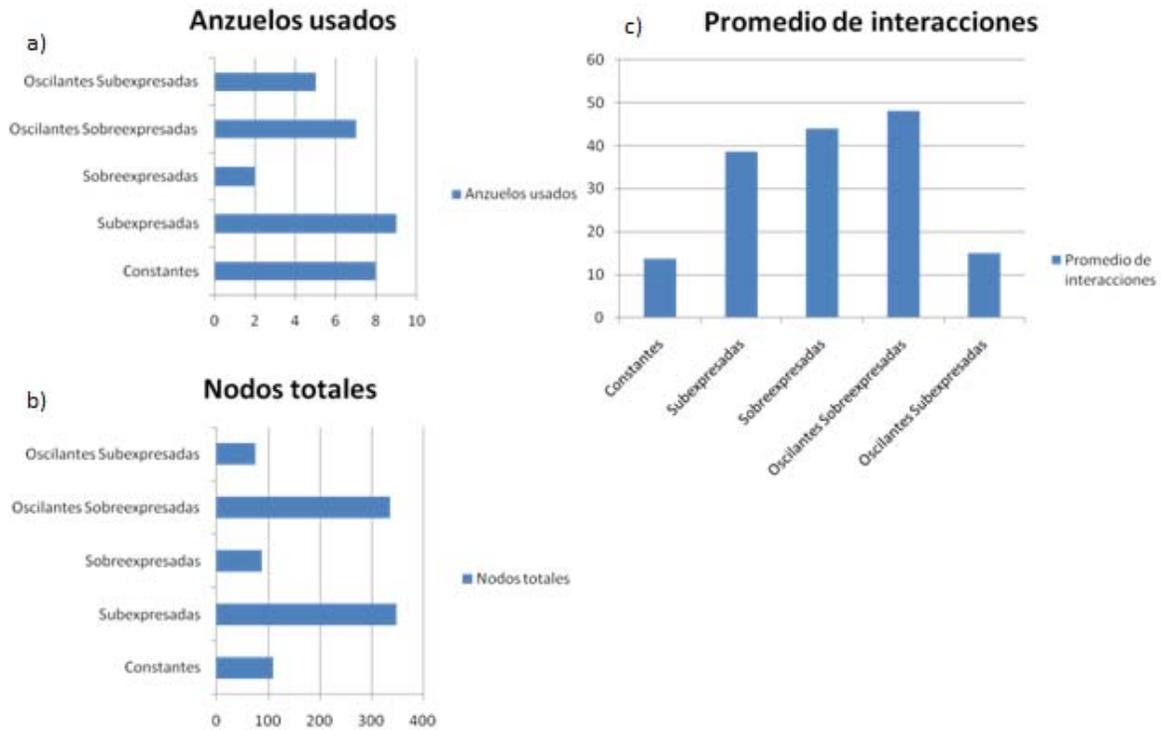


Figura 1. Análisis de las interacciones Proteína-Proteína. a) Se usaron entre 2 y 9 proteínas anzuelo, con un promedio de 6 anzuelos por categoría. b) Las interacciones de cada categoría van desde las 75 a 348. c) El promedio de interacciones por nodo en cada categoría vario entre 13 y 48, siendo las proteínas sobre-expresadas y oscilantes sobre-expresadas las de mayor promedio en interacciones, lo que puede implicar un papel funcional más complejo en el desarrollo tumoral.