UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EFECTO DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

DIANA JAZMÍN GARAY BAQUERO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

BOGOTÁ, D. C

2010

EFECTO DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

DIANA JAZMÍN GARAY BAQUERO

Tesis de grado para optar por el título de

Maestría en Ciencias – Bioquímica

Directora

YADI ADRIANA UMAÑA PÉREZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

BOGOTÁ, D. C

2010

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS 6
ÍNDICE DE TABLAS 8
JUSTIFICACIÓN 9
INTRODUCCIÓN 11
1. MARCO TEÓRICO 14
1.1 CÁNCER Y CARCINOGÉNESIS 14
1.1.1 Factores que promueven el crecimiento celular 15
1.1.2 Mutación de genes reguladores del crecimiento celular en cáncer 17
1.1.3 Interacción célula – célula 18
1.1.4 Interacción célula – sustrato 18
1.2 METÁSTASIS 19
1.2.1 Eventos asociados a metástasis 19
1.3 PROTEÍNAS DE MEMBRANA Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN 24
1.3.1 Proteómica de Membrana 25
1.3.2 Fosfoproteómica y señalización 26
1.4 MODELO BIOLÓGICO 28
1.4.1 El cuello uterino 28
1.4.2 Líneas celulares de carcinoma de cuello uterino 30
1.4.3 Cáncer cervical e interacción con el Virus de Papiloma Humano (VPH) 31
1.5 PROTEÓMICA Y CÁNCER 34
1.5.1 Electroforesis de dos dimensiones 35
1.5.2 Cromatografía Líquida 37
1.5.3 Espectrometría de Masas (MS) 38
2. OBJETIVOS 41
2.1 OBJETIVO GENERAL 41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 41
3. HIPÓTESIS 42
4. METODOLOGÍA 43

4.1 CARACTERÍZACIÒN FUNCIONALDE LAS LÍNEAS CELULARES 43
4.1.1 Ensayo de proliferación 43
4.1.2 Ensayo de Migración e Invasión Celular 44
4.1.3 Evaluación de los niveles de expresión del receptor IGF-IR 45
4.2 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS LÍNEAS CELULARES 46
4.2.1 Caracterización del proteoma general 46
4.2.2 Análisis comparativo de los proteomas de extractos enriquecidos en proteínas de membrana 47
4.2.3 Análisis Bioinformático 50
4.2.4 Análisis Estadístico 51
5. RESULTADOS 52
5.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS LÍNEAS CELULARES 52
5.1.1 Ensayo de Proliferación Celular 52
5.1.2 Ensayo de Migración e Invasión Celular 52
5.1.3 Evaluación de los niveles de expresión del receptor del sistema IGF-IR 58
5.2 ANÁLSIS PROTEÓMICO DE LAS LÍNEAS CELULARES 58
5.2.1 Caracterización del proteoma general 58
5.2.2 Análisis comparativo de los proteomas de extractos enriquecidos en proteínas de membrana 64
6. DISCUSIÓN 73
6.1. EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO II PROMUEVE PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICAL 73
6.2 PROTEÓMICA COMPARATIVA DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL 75
6.2.1 Implementación de la electroforesis bidimensional para estudios proteómicos comparativos en células de cáncer cervical 76
6.2.2 Perfiles generales de expresión de proteínas de las líneas HeLa y C33-A 77
6.2.3 Relación entre las proteínas de membrana y procesos de motilidad celular 78
7. CONCLUSIONES 95
8. PERSPECTIVAS 97
9. ANEXOS 98
9.1 ANEXO A 98

9.2 ANEXO B 99
10. FINANCIACIÓN DEL ESTUDIO 102
11. PRODUCTOS RELACIONADOS CON EL ESTUDIO 103
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 104

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del epitelio cervical normal 30

Figura 2. Interrelaciones de la oncoproteómica con otras tecnologías en la lucha contra el cáncer 40

Figura 3. Reducción del MTT por actividad mitocondrial 43

Figura 4. Representación esquemática de las cámaras de Boyden modificada 45

Figura 5. Estructura del reactivo de marcación con biotina 47

Figura 6. Representación esquemática de la marcación de biotina de la superficie celular 48

Figura 7. Diagrama de flujo de información para identificación y anotación de proteínas 51

Figura 8. Población celular inicial óptima para el ensayo de proliferación en HeLa 52

Figura 9. Efecto del sistema IGF en proliferación celular de la línea celular HeLa 53

Figura 10. Ensayos de Migración de las líneas HeLa y C33-A 55

Figura 11. Ensayos de Invasión de las líneas HeLa y C33–A 57

Figura 12. Evaluación de los niveles de expresión de IGF-IR de las líneas celulares en estudio 58

Figura 13. Evaluación del protocolo de separación bidimensional 59

Figura 14. Perfiles proteómicos bidimensionales de las líneas celulares HeLa y C33-A 61

Figura 15. Comparación entre los proteomas generales de HeLa y C33-A 62

Figura 16. Proteínas diferencialmente expresadas 63

Figura 17. Imagen superpuesta del proteoma de cada una de las líneas celulares 64

Figura 18. Verificación del enriquecimiento en proteínas de membrana 65

Figura 19. Perfil proteómico de extractos enriquecidos en proteínas de membrana 66

Figura 20. Comparación proteoma general y enriquecido en proteínas de membrana 68

Figura 21. Comparación entre los proteomas enriquecidos en proteínas de membrana de HeLa y C33-A 68

Figura 22. Separación tipo SDS-PAGE de extractos enriquecidos en proteínas de membrana 69

Figura 23. Espectros de masas asignados por fracción 70

Figura 24. Validación del proteoma de HeLa con literatura 77

Figura 25. Comparación el número de proteínas encontradas en proteoma general respecto al enriquecido en proteínas de membrana, para cada línea celular 79

Figura 26.Distribución de proteínas de acuerdo a su anotación por ubicación y función molecular en cada línea celular 84

Figura 27. Redes de Señalización 92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Correlación entre la terminología displasia/carcinoma *in situ* 34

Tabla 2. Principios de separación en cromatografía de proteínas 37

Tabla 3. Resumen de parámetros para identificación usados en MASCOT® 70

Tabla 4. Proteínas identificadas usando Proteome Software Scaffold por fracción en cada línea celular y organizada por peso molecular 82

Tabla 5. Proteínas expresadas exclusivamente por cada línea celular 86

Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas en las líneas celulares HeLa y C33-A 89

EFECTO DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

EFFECT OF INSULIN – LIKE GROWTH FACTOR SYSTEM IN THE EXPRESSION OF MEMBRANE PROTEINS IN CERVICAL CANCER CELLS

PALABRAS CLAVE

Cáncer cervico-uterino, proteínas de membrana, invasión, electroforesis bidimensional, GeLC - MS/MS

KEY WORDS

Cervical cancer, membrane proteins, invasion, bidimensional electrophoresis, GeLC-MS/MS.

RESUMEN

En el mundo, el cáncer de cuello uterino es considerado como la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, cerca del 80% de los casos reportados se presentan en países en vía de desarrollo. La metástasis es la causa principal de muerte en la mayoría de pacientes de cáncer; este evento multi-pasos incluye degradación de la matriz extracelular, invasión local y angiogénesis. La motilidad celular depende de la respuesta adaptativa al ambiente, determinada por elementos moleculares claves en la membrana plasmática y citoesqueleto, considerados importantes blancos terapéuticos. Mediante ensayos funcionales fueron establecidos los potenciales invasivos de dos líneas celulares de cáncer de cervico-uterino, HeLa, adenocarcinoma y C33-A epidermoide. Con el objetivo de identificar cualquier asociación existente entre la capacidad invasiva y los perfiles proteómicos de membrana, fueron obtenidos extractos enriquecidos en proteínas de membrana por biotinilación de superficie celular. Las fracciones enriquecidas fueron analizadas mediante electreforesis bidimensional y una estrategia multidimensional:

GeLC-MS/MS. Hela mostró un alto potencial invasivo respecto a C33-A. 56 proteínas fueron identificadas en fracciones de alto peso molecular, 22 proteínas expresadas por ambas líneas celulares, 34 y 22 proteínas expresadas exclusivamente por C33-A y HeLa, respectivamente. Proteínas expresadas por HeLa, estuvieron asociadas con procesos de motilidad celular, correlacionando con el comportamiento observado en los ensayos funcionales. Las proteínas expresadas principalmente por C33-A estuvieron relacionadas con regulación del ciclo celular, metabolismo, respuesta a estrés y evasión de sistema inmune. Estos resultados sugieren una relación directa entre el potencial invasivo de células de cáncer cervico-uterino y la expresión de proteínas de membrana.

ABSTRACT

Worldwide, cervical cancer is the second bigger cause of female cancer mortality, however nearly 80% of all reported cases come from developing countries. Metastasis is the primary cause of death for most cancer patients; this multistep event includes extracellular matrix degradation, local invasion and angiogenesis. To migrate, cells must modify its shape and stiffness to interact with the surrounding tissue structures. Cellular motility depends on the adaptive response to environment that extensively relies on key molecular elements of the plasma membrane and cytoskeleton, and therefore usually considered as tumor targets. Through Boyden modified chamber assays, it was established the invasive potential of two cervical cancer cell lines, HeLa, an adenocarcinoma cell line; and C33-A a epidermal cell line. In order to identify any association between invasiveness and membrane related protein profile, an enriched protein membrane extract was obtained by cell surface biotin labeling. Enriched fractions were analyzed by bidimensional electrophoresis and a multidimensional approach: GeLC-MS/MS. HeLa shows a higher invasive index respect to C33-A cells. It was identified 56 proteins in high molecular weight fractions, 22 proteins were expressed in both cell lines, 34 and 22 proteins were expressed only by C33–A and HeLa, respectively. Differentially or exclusively expressed proteins in HeLa are mainly involved in cytoskeleton remodeling and associated with cell motility, according to the results in functional assays. These results suggest a direct relationship of potential invasion of cervical cancer cells and expression profiles of membrane proteins

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de cuello uterino es el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres, siendo un problema de salud pública a nivel mundial, acentuado en países en vía de desarrollo, donde se registra cerca del 80% de los casos reportados. La causa principal de muerte en la mayoría de pacientes con cáncer es la metástasis, proceso multi-pasos que involucra eventos de degradación de la matriz extracelular, migración, invasión local y angiogénesis. Para migrar, las células deben modificar su forma y rigidez e interactuar con las estructuras de tejidos cercanos, en este proceso la membrana celular y el citoesqueleto juegan un rol central. La expresión anormal de proteínas de membrana, tiene un profundo significado, en cuánto determina por ejemplo, diferencias fenotípicas y funcionales entre células normales y tumorales. De hecho, el 70% de los blancos conocidos para medicamentos existentes corresponde a proteínas de membrana. En consecuencia, definir proteomas de membrana es una tarea capital para entender el rol de esta estructura celular en procesos biológicos y su posible papel como blancos de acción terapéutica.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo funcional y proteómico de dos líneas celulares de cáncer cervical con tejido de origen e índice de invasiviad diferente: HeLa, línea de adenocarcinoma cervical infectada con VPH tipo 18, reportada como una línea altamente invasiva y C33-A una línea de carcinoma cervical de morfología epitelial, poco invasiva, sin infección reportada por VPH. El estado funcional en la célula se evaluó en respuesta a estimulación con los ligandos del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina, IGF, ampliamente relacionado con progresión tumoral cervical. En concordancia con lo anterior, nuestros resultados indican que particularmente IGF-II promueve procesos de proliferación, migración e invasión en la línea celular HeLa, en comparación con la insulina y el IGF-I. Por su parte C33-A, parece no responder a la estimulación por parte del sistema IGF.

Las diferencias moleculares a nivel de membrana que podrían relacionarse con la capacidad invasiva de las líneas celulares en estudio, se evaluaron mediante una estrategia proteómica comparativa de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana usando separación multidimensional (SDS-PAGE / cromatografía en fase reversa) y electroforesis de dos dimensiones (2DE). En primer lugar se realizó una caracterización 2DE en la expresión general de proteínas en comparación con los proteomas de fracciones enriquecidas en membrana de cada línea celular. Posteriormente se realizó un análisis multidimensional de las fracciones de mayor peso molecular de los extractos enriquecidos en membrana, donde se identificaron 56 proteínas, de las cuales, 22 fueron expresadas por las dos líneas celulares, 24 y 22 proteínas fueron expresadas únicamente por C33-A y HeLa, respectivamente. El análisis bioinformático de dichas proteínas, sugieren que las proteínas expresadas exclusivamente por HeLa están involucradas principalmente en remodelamiento de citoesqueleto y asociadas con motilidad celular, de acuerdo a lo observado en los ensayos funcionales. Adicionalmente, de manera interesante, se identificaron marcadores tumorales reportados con anterioridad.

Dentro de las perspectivas más importantes de este trabajo es la identificación de proteínas activadas por la estimulación específica por IGF-II mediante el análisis de fosfoproteomas de ambas líneas celulares. En este punto se avanzó en la obtención fosfoproteoma general de HeLa y C33-A estimulado con IGF-II, los cuáles fueron marcados con SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture), una aproximación que permitirá la cuantificación de proteínas activadas.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es el segundo tipo de cáncer más frecuente en mujeres, siendo un problema de salud pública a nivel mundial, acentuado en países en vía de desarrollo. En el año 2005, se registraron, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 500000 casos nuevos, de los cuales el 90% correspondía a países en desarrollo, en donde, para ese mismo año, se registró el 95% de las 260000 defunciones causadas por esta enfermedad, convirtiendo al cáncer de cuello uterino en una de las amenazas más graves para la vida de la mujer [1]. América Latina y el Caribe tienen algunas de las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervical más altas del mundo, sólo superadas por las de África Oriental y Melanesia [2]. En Colombia, el panorama no es alentador, este tipo de cáncer representa la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, dado que la detección de la enfermedad en un alto porcentaje es logrado en estadios muy avanzados [3].

La causa subyacente primaria del cáncer de cuello uterino es la infección por una o varias cepas oncogénicas del virus del papiloma humano (VPH) [4-6], perteneciente a la familia *Papovaviridae*. Un acumulado de 11 estudios caso-control desarrollados en 9 países, coordinados por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), identificó ADN de VPH en 96,6% de los casos de cáncer cervical y 15,6% de las pacientes control [7-8]. Aproximadamente 40 distintos tipos de VPH han sido caracterizados y relacionados con infección del tracto genital. Estudios epidemiológicos sugieren que al menos 14 de ellos, denominados oncogénicos o de alto riesgo están asociados con la progresión de cáncer cervical invasivo [9]. La mayoría de estos VPH de alto riesgo están filogenéticamente relacionados a los tipos VPH16 (31, 33, 35, 52 y 58) o VPH18 (39, 45, 59 y 68) [10]. La mayoría de las infecciones por el virus ceden espontáneamente; sin embargo si la infección es persistente, puede desarrollarse un tumor premaligno, y éste sin un tratamiento adecuado, puede transformarse en cáncer. Dado que las lesiones precursoras

causadas por el VPH normalmente tardan entre 10 y 20 años en convertirse en un cáncer invasivo, los casos de cáncer cervical pueden prevenirse mediante la detección precoz y el tratamiento anticipado de las lesiones precancerosas[1].

La agresividad de un tipo dado de cáncer está determinada por su capacidad de migrar e invadir barreras tisulares para colonizar otros sitios distantes a los de origen. Éste proceso, es denominado metástasis y es considerado como la principal causa de muerte en pacientes con cáncer. La metástasis involucra una serie de pasos, entre los que se encuentran la degradación de la matriz extracelular (MEC), invasión local y angiogénesis, fenómenos en que la dinámica de la membrana plasmática y el remodelamiento del citoesqueleto juegan un rol fundamental[11]. La membrana celular es central en procesos conducentes a metástasis dado que media la interacción con otras células y con la matriz extracelular, además de regular la señalización intracelular por parte de mensajeros externos[12] como hormonas y factores de crecimiento. En este punto, hace varios años, se reconoce el papel de los factores de crecimiento en carcinogénesis.

El sistema de señalización inducido por la familia de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) es esencial en el crecimiento y diferenciación de muchos tejidos, además de estar implicado en varias condiciones patofisiológicas; dentro de las cuáles existe una amplia evidencia de su vinculación con la progresión tumorogénica [13].

El creciente interés en el estudio de los IGFs y su rol en el proceso de carcinogénesis, se basa en la evidencia de que altas concentraciones de IGF-I están asociadas con un mayor riesgo de incidencia de cáncer de seno, endometrial, próstata, colorectal y pulmón. IGF-II más que IGF-I, parece jugar un papel significativo en el cáncer cervical; se sabe que la presencia de VPH está asociada con elevados niveles del receptor de crecimiento epidermal (EGF-R) e IGF-II en células epiteliales cervicales, e IGF-II circulante en mujeres con neoplasia intraepitelial cervical (CIN) [14]. Diversos esfuerzos son dedicados a detectar y controlar el fenotipo metastático; sin embargo, la principal limitación para su tratamiento es la heterogeneidad tumoral; esto se traduce en el hecho de que la distribución y activación de los receptores de membrana que median la respuesta a estímulos hormonales en la mayoría de tumores, cambie de un tipo celular a otro, así como la capacidad invasiva obtenida tras la estimulación.

En este trabajo, se pretende identificar proteínas cuya expresión y/o activación diferencial a nivel de subproteoma de membrana y, fosfoproteoma inducido por la participación del sistema IGF, puedan jugar un rol central en la manifestación del

fenotipo invasivo de dos líneas celulares derivadas de cáncer cervical, cuyos grados de invasividad *in vitro* son significativamente diferentes. La identificación de estas proteínas y sus redes de señalización tendrían un impacto en el entendimiento de los mecanismos patológicos, siendo un paso importante en la búsqueda de blancos de acción terapéutica para la detección, control y/o tratamiento del proceso de metástasis.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. CÁNCER Y CARCINOGÉNESIS

El cáncer es una familia compleja de enfermedades causadas por defectos moleculares en el funcionamiento celular. Está caracterizado por un crecimiento celular anormal resultado de múltiples cambios en la expresión génica, que conducen, en último término, a un desequilibrio del balance entre la proliferación y muerte celular, dando como resultado una población de células con capacidad de invadir tejidos y desplazarse a sitios distantes.

La carcinogénesis, proceso por el cual una célula normal se convierte en una célula cancerosa, involucra múltiples pasos. Para que una célula sufra mitogénesis, debe recibir una señal promotora de crecimiento proveniente del ambiente extracelular e iniciar una cascada de eventos en la célula que conlleven a la activación de la división celular. Con pocas excepciones, la mayoría de poblaciones celulares en organismos adultos, están completamente diferenciadas y no proliferan más. El cáncer aparece cuando una célula, por diversas razones, escapa del control normal al que está sometido su crecimiento y empieza a dividirse desordenadamente [15].

Por otro lado, en un tejido tumoral se desarrollan diversas subpoblaciones celulares con diferente grado de diferenciación, proliferación, invasividad y potencial metastásico, confiriéndole un carácter heterogéneo. Dichas subpoblaciones se van adaptando a las condiciones cambiantes del medio ambiente (hipoxia, agentes citotóxicos, radiación) promoviendo un proceso de selección subclonal [16], los subclones más resistentes tendrán mayores probabilidades de hacer metástasis a órganos distantes del tumor primario mediante la formación de neovasos o angiogénesis.

La heterogeneidad tumoral se debe fundamentalmente a la inestabilidad genética de las células tumorales y a la selección secuencial de subpoblaciones con mutaciones en elementos cruciales implicados en la reparación del ADN, regulación del ciclo celular y apoptosis, entre otros.

1.1.1. Factores que promueven el crecimiento celular

La organización de las células en organismos multicelulares depende de sistemas sofisticados de comunicación. Durante el desarrollo y maduración de un organismo, las células deben ser capaces de identificar el momento adecuado para crecer, dividirse, migrar, diferenciarse, sobrevivir o morir. Estos procesos están controlados por familias de factores de crecimiento, que se unen a receptores específicos sobre la superficie de la célula blanco. Una vez activados, estos receptores inician vías de señalización que determinan la respuesta de la célula. La activación aberrante de una o más de estas vías pueden conducir a división celular desordenada y posterior formación de un tumor.

Los factores extracelulares que estimulan el crecimiento incluyen factores de naturaleza peptídica, tales como, factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que se unen a receptores tirosina quinasa localizados sobre la superficie celular. Citoquinas, como la hormona de crecimiento, interleuquinas y la prolactina, también se unen a receptores de superficie que en sí mismos no tienen actividad quinasa, pero son capaces de transducir señales por medio de su interacción con otras proteínas que tienen dicha actividad [15]. Otra clase de factores de crecimiento son los que se unen a receptores transmembranales acoplados a vías de señalización intracelulares por medio de proteínas G heterotriméricas [17]. Por último, las hormonas esteroideas, como el estrógeno, se unen a receptores ubicados tanto en membrana plasmática, citosol y núcleo. Todas las clases de receptores son capaces de desencadenar cascadas de señalización que culminan en actividad mitótica o de proliferación en la célula blanco.

Aunque como se presentó anteriormente, existen numerosos receptores de factores de crecimiento, dos familias han emergido como promisorios blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer, la familia del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR). Mientras EGFR y sus relacionados son expresados sobre células tumorales derivadas de células epiteliales y contribuyen directamente al crecimiento celular del tumor, los receptores de VEGF son expresados sobre células endoteliales que delimitan los vasos sanguíneos; éstos receptores contribuyen al crecimiento del tumor estimulando el crecimiento vascular que es esencial para nutrición de la célula [15, 18].

- Sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs)

El principal rol del eje IGF es la regulación crecimiento tanto prenatal como postnatal [19], y su desregulación se ha relacionado con progresión tumoral. Algunos estudios apuntan a que la señalización dirigida por insulina – IGF, conservada en levaduras, gusanos, mosca de la fruta, ratones y humanos, está relacionada con envejecimiento y longevidad [20]. El sistema IGF está constituido por los ligandos IGF (IGF-I e IGF-II), receptores de superficie celular que median los efectos biológicos de los IGFs, incluyendo el receptor para IGF-I (IGF-IR), receptor para IGF-II y manosa-6-fosfato (IGF-IIR/M-6-P), el receptor de insulina (IR) y receptores híbridos IGF-IR e IR, además de seis proteínas de unión a IGFs (IGFBPs).

IGF-I e IGF-II comparten un 62% de homología en la secuencia de aminoácidos y presenta un 40% de homología entre IGFs y proinsulina [21], además existen varias líneas de evidencia que sugieren que estos ligandos presentan diferentes sitios de unión sobre IGF-IR [22].

IGF-IR es un receptor tipo tirosina quinasa que esta funcional y estructuralmente relacionado al IR, compartiendo un 60% de homología a nivel de secuencia primaria [13, 22]. IGF-IR es sintetizado como una única cadena pre– propéptido con un péptido señal de 30 aminoácidos que es proteolizado después de la traducción; el propéptido es glicosilado, dimerizado y transportado al aparato de Golgi donde es procesado para producir subunidades α y β [23]. Estás subunidades forman un tetrámero ($\beta - \alpha - \alpha - \beta$) unido por enlaces disulfuro, y luego es transportado a la membrana celular [22].

IGF-II se une con alta afinidad a IGF-IIR, receptor idéntico al de manosa–6-fosfato (IGF-IIR/manosa-6-fosfato), y cuya principal acción se asocia con endocitosis y tráfico intracelular de proteínas marcadas con manosa-6-fosfato (M-6-P) y se piensa tiene una función importante en la regulación de los niveles extracelulares de IGF-II fomentando su internalización.

Tras la unión del ligando a IGF-IR, este es activado resultando en la autofosforilación de tirosinas del dominio citoplasmático de la subunidad β. Una vez fosforilado, la tirosina 950 en el dominio juxtamembranal, sirve como sitio de ensamblaje de diferentes sustratos, incluyendo sustratos del receptor de insulina (IRS) 1 al 4 y la proteína adaptadora Shc [24]. Estos sustratos permiten la traducción de la señal a través de cascadas de fosforilación. Por ejemplo, IRS-1 fosforilado puede activar la

subunidad reguladora p85 la fosfatidilinositol -3 quinasa (PI3K) conduciendo a la activación de sustratos cascada abajo, incluyendo la p70 S6 quinasa y proteína B quinasa (Akt) [22, 25]. A su vez, la fosforilación de Akt, aumenta la síntesis de proteína a través de la activación de mTOR e induce los efectos antiapoptóticos de IGF-IR por medio de la fosforilación e inactivación de Bad [26]. IRS-1 también está implicado en señalización a través de otras vías inducidas por otros factores de crecimiento, citoquinas e integrinas por lo que puede estar involucrado en comunicación con otros sistemas de señalización [22].

En forma paralela a la señalización conducida por PI3K, se realiza el reclutamiento de la proteína Ras y activación de la vía Raf-1/MEK/ERK induciendo la transcripción de genes asociados con proliferación, crecimiento y sobrevivencia celular por MAPK [22].

Una tercera vía de señalización ha sido identificada, específica para IGF-I e independiente de la actividad tirosina quinasa del receptor, mediante interacción directa entre su dominio C- terminal y la proteína adaptadora 14-3-3, la cual puede interactuar con Raf, conduciendo a la activación de la vía MAPK y a la translocación mitocondrial de Raf con actividad antiapoptótica subsecuente[27].

Además de estas vías principales también se encuentra fosforilación directa de Janus quinasas involucradas en señalización mediada por citoquinas [22], activación de quinasas de adhesión focal [28], de proto–oncogenes como c-CrkII y c-CrkL, que pueden vincular a IGF-IR con señalización mediada por integrinas [29] y p130Cas y paxilina relacionados con la regulación de la motilidad y forma celular [28, 30].

La importancia relativa de estas vías en transformación maligna es probablemente dependiente de contexto celular y aún no ha sido completamente elucidada [22].

1.1.2 Mutación de genes reguladores del crecimiento celular en cáncer

En células tumorales, las moléculas encargadas de regular las vías de señalización involucradas en el crecimiento frecuentemente se encuentran mutadas, dando como resultado una señal constante de “encendido” a la célula. Dichas moléculas pueden ser positivas para la regulación del crecimiento como oncogenes causantes de cáncer, o, negativas como genes supresores de tumor. Adicionalmente, las células tumorales frecuentemente desarrollan sus propios mecanismos autocrinos promotores de crecimiento. Un ejemplo de dicho mecanismo se encuentra en células tumorales de seno, las cuales son capaces de producir el factor de crecimiento transformante alfa

(TGF-α), que se une y activa el receptor de EGF, y desencadena vías mitóticas en la célula [15].

1.1.3 Interacciones célula - célula

Así como las células normales pueden responder mitogénicamente a señales de células vecinas y forman monocapas cuando están creciendo en cultivo, también inhiben su crecimiento cuando entran en contacto con ellas, esta regulación negativa del crecimiento se da a través de la expresión en superficie celular de moléculas de adhesión celular (CAMs) y caderinas. Las moléculas de caderina sobre células adyacentes, se unen entre sí de manera calcio – dependiente, evitando que la célula entre en ciclo mitótico. En contraste, se conoce que las células cancerosas, forman focos, o acumulaciones apiladas de células en constante división; los focos aparecen como resultado de la pérdida de la inhibición por contacto. De igual forma, se ha observado que se presenta señalización intracelular por medio de la familia de las cateninas, las cuales unen a las caderinas con el citoesqueleto y a la maquinaria de transcripción. La regulación negativa normalmente generada por la interacción de estas moléculas se pierde con frecuencia en células tumorales.

Por ejemplo, la expresión de la E–caderina se encuentra mutada, reducida o ausente en una variedad de tumores humanos [31-33]. En sistemas de cultivo celular, la pérdida del gen de la E-caderina conduce a la pérdida de contactos célula – célula e incrementa la motilidad celular e invasividad [31]. La N–caderina expresada normalmente sobre células mesenquimales facilita la unión de las células tumorales al estroma durante la invasión [34]. La fosforilación aberrante de las cateninas puede conducir a la pérdida de contactos propios célula – célula, lo que se piensa, es un paso en la adquisición de propiedades invasivas de las células cancerosas. Además, se conoce que el gen supresor de tumor *apc*, mutado en cáncer humano, se asocia con β–catenina. Así, la pérdida de estos genes supresores de tumor y sus apropiadas interacciones con caderinas y cateninas permiten superar las restricciones impuestas por la inhibición por contacto, una marca distintiva de las células tumorales [15].

1.1.4 Interacciones célula – sustrato

Las señales pro–crecimiento pueden recibirse también de la matriz extracelular. Proteínas como fibronectina, componente de la matriz extracelular, se une a receptores transmembranales heterodiméricos o receptores de integrina en la

superficie celular. Estos receptores cooperan con receptores de factores de crecimiento para desencadenar vías mitogénicas. Adicionalmente, isoformas tumorales específicas y combinaciones únicas de integrinas pueden estar presentes en células tumorales, proporcionando vías alternativas para iniciar señales de crecimiento [15, 35].

1.2 METÁSTASIS

La detección clínica más temprana posible de una lesión maligna es lograda en cáncer *in situ*. Éstos son pequeños tumores que se desarrollan en los tejidos y que pueden usualmente descubrirse por medio de visualización endoscópica o directa; en éste estado el tumor es avascular, es decir, no cuenta con un sistema vascular propio que le permita obtener eficientemente oxígeno y nutrientes, éstos son adquiridos por difusión, constituyendo una limitación que resulta en un lento crecimiento tumoral, permaneciendo latentes durante años. Los eventos cruciales que desencadenan la conversión de un tumor latente a un neoplasma invasivo de rápido crecimiento, aún no son totalmente claros, sin embargo, se relacionan con vascularización estimulada por factores angiogénicos tumorales. La vascularización contribuye a la progresión e invasión del tumor al permitir su crecimiento más rápido; el incremento de la disponibilidad de nutrientes estimula la proliferación celular favoreciendo el crecimiento de células tumorales más agresivas y la aparición de subclones celulares con un fenotipo maligno. Esto genera compresión local del tejido próximo, invasión a través de la membrana basal y finalmente metástasis [36].

1.2.1 Eventos asociados a metástasis

La metástasis tumoral consiste en una serie de procesos biológicos discretos que permiten la movilidad de las células tumorales desde el neoplasma inicial hacia lugares distantes. Las células del tumor primario deben invadir el tejido que le rodea, entrar ya sea al torrente sanguíneo o al linfático, sobrevivir y eventualmente ser retenidas en la circulación, extravasar a un tejido, crecer y colonizar el nuevo sitio [34].

1.2.1.1 Angiogénesis. El crecimiento tumoral y metástasis depende de la disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento y oxígeno más allá de los límites de la difusión, la angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente y es estimulado por un interruptor angiogénico cuando el balance entre factores inductores e inhibidores favorece la inducción [34, 37-38].

La generación de nuevos vasos sanguíneos por parte del tumor se realiza a partir de capilares y vénulas del tejido invadido, mediante el incremento de la proliferación de células endoteliales; estas células están más separadas si se comparan con un vaso normal, lo que les permite ser más permeables a proteínas plasmáticas y al paso de células.

De esta forma, la angiogénesis es fundamental en el proceso de metástasis, no solo para el soporte nutricional del tumor, sino también para permitir el paso de células tumorales a otros tejidos. No obstante, la aparición de neovasos también sucede en procesos fisiológicos como en embriogénesis, los procesos de cicatrización y en patologías benignas como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y la psoriasis [39].

La extensión de la angiogénesis en tumores clínicos de pacientes es de gran impacto pronóstico en una gran variedad de tumores; lo anterior dado que tumores con un mayor número de vasos correlaciona con mayores tasas de metástasis y un pronóstico de supervivencia reducido [40].

1.2.1.2 Invasión. La matriz extracelular, de la que hacen parte la membrana basal y el estroma intersticial, mantiene la adhesión de las células y transmite señales de adhesión a través de receptores en la superficie celular. La membrana basal separa las células epiteliales del estroma subyacente, de este modo provee la primera barrera contra la invasión de crecimientos malignos. La destrucción de la membrana basal es un prerrequisito para la diseminación de células cancerosas y la pérdida de su continuidad es el signo distinguible más temprano de la invasión iniciando el proceso metastásico.

La membrana basal está compuesta de glicoproteínas colágenas y no colágenas, y proteoglicanos. Las redes están formadas por la organización de lamininas y colágeno IV; la entactina forma conexiones entre dos de estas redes. Proteoglicanos de sulfato de heparán están unidos a la membrana a través de interacciones con laminina. Otros constituyentes de la matriz extracelular como tenascina, fibronectina y formas variantes de la laminina aparecen en tumores y pueden afectar la progresión del cáncer [41].

Los cambios en la adherencia de las células tumorales a otras células y a la MEC, la degradación proteolítica del tejido próximo y motilidad impulsan físicamente a la célula tumoral a través del tejido. La adherencia de células tumorales a la MEC está mediada

por integrinas. Otros receptores tumorales para proteínas de la MEC incluyen CD44, un receptor altamente polimórfico para hialurona, receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas y proteoglicanos de superficie [34].

Los mecanismos invasivos de células tumorales a través de barreras tisulares hacia vasos linfáticos y sanguíneos parecen involucrar mecanismos tanto mecánicos como enzimáticos.

Cuando un tumor crece, la presión ejercida tiende a forzar a las células tumorales entre los espacios intercelulares, sin embargo, esto no es suficiente para explicar la invasión de barreras tisulares como la membrana basal; para que esto ocurra, se hace necesaria una degradación enzimática. Por otro lado, es bien conocido que las células tumorales secretan gran variedad de enzimas proteolíticas.

Existe una correlación positiva entre la agresividad tumoral y los niveles de proteasas para las cuatro clases conocidas: seril -, aspartil - , cisteil – y metalo proteasas [36, 41]. Por otra parte, un alto grado de degradación de la matriz extracelular es necesario para permitir el proceso invasivo de las células. Sin embargo, una degradación extrema conduciría a una pérdida total de la tracción celular lo que imposibilitaría el movimiento celular. La máxima migración es lograda con niveles intermedios de adherencia, por lo que la actividad de enzimas proteolíticas es finamente regulada a través de mecanismos como procesamiento proteolítico de precursores, cascadas de proteasas y unión a inhibidores. Muchas de las proteasas secretadas por tumores malignos exhiben una alta actividad catalítica para degradar colágeno IV lo que conduce a la penetración del estroma. La proteólisis de laminina 5 o colágeno IV por metaloproteasas expone sitios crípticos que promueven la migración celular [41].

- Metaloproteasas de matriz

El proceso de remodelación fisiológica normal, morfogénesis y reparación de los tejidos involucra una degradación precisa de la MEC; dicha remodelación también ocurre en el curso de estados patológicos como artritis, enfermedades cardiovasculares y una amplia variedad de tipos de cáncer [42]. Varios tipos de enzimas estan asociadas con la degradación de la MEC, pero el grupo más caracterizado es el de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), endoproteasas dependientes de zinc [43]. Estas son sintetizadas en forma de pre–proenzimas, las cuales presentan un péptido señal removido durante la traducción

para generar proMMPs, los propéptidos presentan un motivo “interruptor de cisteína”, en el cual un residuo de cisteína se coordina con el ion Zn^{+2} en el dominio catalítico, manteniendo las proMMPs en un estado inactivo. De acuerdo, a la estructura y preferencia por sustrato, las MMPs pueden ser clasificadas en colagenasas, gelatinasas, estromelisinas, matrilisinas, MMPs tipo membrana y otras [42].

En particular, la gelatinasa A (MMP–2) y la gelatinasa B (MMP–9) han sido especialmente involucradas en invasión y angiogénesis tumoral, éstas proteínas comparten una actividad proteolítica similar, degradando moléculas de MEC que incluyen colágenos nativos tipo IV, V XI, laminina y proteínas con centro de tipo agrecano, proteoglicanos altamente glicosilados [22, 42].

La actividad catalítica de las MMPs se encuentra altamente controlada en diferentes niveles: inicialmente su expresión es regulada a nivel transcripcional por una variedad de factores de crecimiento, citoquinas y oncogenes; por otro lado, todas son secretadas como zimógenos y requieren de procesos de activación distintos para ser convertidas a su forma enzimáticamente activa. Adicionalmente, a nivel de proteína su acción se encuentra regulada por una familia de inhibidores específicos llamados inhibidores tisulares de metaloproteasas o TIMPs, los cuales están correspondientemente distribuidos en los diferentes tejidos [44-45].

Las MMPs pueden contribuir al crecimiento tisular no sólo por la degradación de la matriz extracelular, sino también, mediante la liberación de factores de crecimiento, como factor de crecimiento fibroblástico (FGF), EGF, TGF-β y VEGF, asociados a la MEC y la generación de fragmentos bioactivos [42, 46]. Por ejemplo, MMP-9 moviliza el factor VEGF [47] e hidroliza colágeno tipo IV para generar tumstatina, un inhibidor de angiogénesis [48].

La asociación entre MMP-2 y MMP-9 con fenotipos invasivos es abundante en la literatura. Por ejemplo, se ha reportado que la inhibición de MMP-2 por TIMP-1 reduce la invasión celular *in vitro* e *in vivo* [49]. Adenocarcinomas invasivos de colon, estómago, ovario y tiroides exhiben inmunoreactividad positiva para MMP-2, mientras tejidos normales colorectal, mucosa gástrica y ovario muestran tinción reducida o negativa [50-51]. Un delicado balance entre TIMPs y MMPs puede actuar como un mecanismo de retroalimentación de control negativo o positivo para regular morfogénesis vascular e invasión [52].

Cuando se ha logrado la degradación de una zona de la MEC, las células tumorales se desplazan hacia ella por medio de pseudópodos, avanzando hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, que finalmente, favorecerán el paso hacia otros tejidos. En este proceso, como en otros que implican motilidad, intervienen tanto factores derivados del huésped, entre ellos algunos pertenecientes al sistema del complemento, péptidos del colágeno y trombospondina, así como factores dependientes de las células tumorales, como por ejemplo el factor de motilidad autocrino (AMF), el factor de dispersión y la bombesina [40].

1.2.1.3 Circulación y formación de colonias secundarias. El torrente sanguíneo es un ambiente muy hostil para células tumorales dada la velocidad del flujo sanguíneo, la presencia de células inmunes y la pérdida de sustrato. La muerte provocada por la pérdida del sustrato se conoce como anoikis [34], y se cree que contribuye a la baja eficiencia de la metástasis. Mientras las células están en el torrente sanguíneo, la expresión de múltiples receptores tirosina quinasa y componentes de señalización conducentes a mecanismos invasivos induce resistencia a anoikis *in vitro* y puede contribuir a la supervivencia en circulación de las células tumorales [34, 53].

Una vez las células tumorales llegan a un órgano en particular, se adhieren a la membrana basal directamente, por medio de receptores de laminina y trombospondina, y son cubiertas por las células endoteliales, siendo aisladas de la circulación. Posteriormente inician un proceso de invasión con degradación de la membrana basal por proteasas y locomoción de las células al interior del tejido, gracias a factores de motilidad [16]. Sin embargo, la colonización es un proceso poco eficiente; en un modelo experimental de metástasis de melanoma, la mayoría (>80%) de células tumorales inyectadas sobrevivieron en circulación y extravasaron exitosamente hacia el hígado; aunque únicamente 1 de cada 40 células formaron micrometástasis sobre el tercer día, y sólo 1 de cada 100 micrometástasis progresaron para formar metástasis macroscópica 10 días después [54]. La colonización exitosa depende de manera crucial de la interacción con el microambiente del tejido distante. Caracterización molecular de los microambientes desde los sitios de mayor metástasis indican tanto similitudes como diferencias, éstas últimas podrían contribuir al desarrollo de aproximaciones terapéuticas específicas a sitios de metástasis [34].

1.3 PROTEÍNAS DE MEMBRANA Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La membrana plasmática constituye la interface entre la célula y su ambiente local, mediando importantes procesos biológicos como recepción y transducción de señales, reconocimiento de componentes de la matriz extracelular, comunicación intercelular, motilidad y transporte de proteínas, solutos y agua. Además, está involucrada en la regulación de respuestas adaptativas celulares a su microambiente manteniendo un equilibrio crítico entre estados de proliferación, crecimiento, diferenciación, senescencia y muerte celular.

La estructura biológica de la membrana está determinada por la composición de lípidos, los cuáles conforman una bicapa fosfolipídica. Sin embargo, la mayor parte de sus funciones son llevadas a cabo por proteínas, las cuáles típicamente representan cerca del 50% de su masa [55]. Dependiendo del modo en que las proteínas se asocian con la membrana, pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: integrales o transmembranales y periféricas. Las primeras atraviesan la bicapa fosfolipídica en un número variable de tramos mediante regiones transmembranales tipo α – hélice, formadas por regiones hidrofóbicas con un alto contenido de de aminoácidos no polares[55], adicionalmente presentan un dominio extracelular con sitios de unión al ligando, y un dominio citoplasmático donde puede residir la actividad enzimática o también servir como sitio de ensamblaje a otras proteínas que se activan subsecuentemente y que conducen a un cambio en el perfil bioquímico celular y por tanto, a un efecto biológico específico [17]. Las segundas, por su parte, se encuentran asociadas a la cara interna o externa de le membrana interactuando con proteínas transmembranales o directamente con los grupos polares de los lípidos. En general, las proteínas de membrana sufren numerosas modificaciones post-traduccionales, tales como, glicosilación, fosforilación, sulfatación, isoprenilación, farnesilación, etc., lo que les confiere una microheterogeneidad extrema.

Los receptores son importantes moléculas de transducción de señales. Estas proteínas pueden ser tipo tirosina quinasa, serina/treonina quinasa, acoplados a proteínas G y receptores de neurotransmisores. La activación de estos receptores promueve diversas vías de señalización que conllevan a respuestas biológicas variables. Los diversos tipos celulares pueden responder de manera diferente a un mismo estímulo dependiendo del tipo de receptores que exprese y su abundancia relativa [56].

La unión del ligando genera un cambio conformacional del receptor, conduciendo a la formación de dímeros, activación de mensajeros primarios y/o reclutamiento de mensajeros secundarios, quienes transfieren la información del complejo ligando-receptor a otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato a residuos serina, treonina y/o tirosina, provocando una cascada de señalización por fosforilación que finalmente concluirá en la respuesta a la señal ambiental. Por otro lado, la presencia de vías de retroalimentación que regulan el proceso de señalización, como la actividad de proteínas fosfatasas, entre otras, terminan con esta señal; sin dicha regulación, las células pierden la capacidad de respuesta a nuevas señales [57].

Defectos en la regulación de las vías de señalización, biodisponibilidad de ligandos y receptores, activación aberrante de proteínas de la cadena de señalización, activación desregulada de oncogenes y supresores tumorales pueden conducir a la transformación maligna celular y al desarrollo del cáncer.

En varios organismos, incluyendo al hombre, cerca de un tercio del genoma codifica para proteínas de membrana [58-59], resaltando su crucial rol biológico. La expresión anormal de estas proteínas, tiene un profundo significado, en cuánto determina por ejemplo, diferencias fenotípicas y funcionales entre células normales y tumorales. De hecho, el 70% de los blancos conocidos para medicamentos existentes corresponde a proteínas de membrana [60-61]. En consecuencia, definir proteomas de membrana es una tarea capital para entender el rol de esta estructura celular en procesos biológicos y encontrar nuevos blancos de acción terapéutica.

1.3.1 Proteómica de Membrana

A pesar del número considerable de genes que codifican para proteínas de membrana, éstas representan una muy baja proporción en la mayoría de los perfiles proteómicos, lo que ha sido principalmente atribuido a su alta hidrofobicidad, heterogeneidad y baja abundancia, limitando significativamente su extracción, solubilización, separación e identificación[55]. La composición de los buffers usados para efectuar la electroforesis bidimensional presenta tres problemas principales frente a las proteínas de membrana: 1) El buffer lisis usado en electroforesis bidimensional tiene una baja capacidad para extraer proteínas de membrana del ambiente lipídico y mantenerlas solubilizadas en un ambiente acuoso; 2) La solubilidad de las proteínas disminuye cerca a su punto isoeléctrico, así que proteínas particularmente hidrofóbicas

tienden a agregarse durante el enfoque isoeléctrico (IEF); 3) La hidrofobicidad de las proteínas de membrana dificulta la transferencia desde la matriz de la primera dimensión a los geles 2DE [58].

Para incrementar el número de proteínas de membrana separadas sobre geles 2DE, se han implementado diversas metodologías que involucran fraccionamiento diferencial con solventes orgánicos y/o detergentes como Triton X-100, Triton X-114, dodecilmaltósido o ASB14 en el buffer de lisis para enriquecer y mejorar su solubilización. Además, se han propuesto métodos alternativos para aplicar la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida como, Blue Native PAGE (BN-PAGE), que separa en la primera dimensión las proteínas en forma nativa usando Coomassie, antes de la SDS-PAGE. El Coomassie cumple una función similar a la del SDS, en cuanto enmascara la carga propia de las proteínas, sin embargo, a diferencia del SDS mantiene la separación en condiciones nativas. Clear Native PAGE (CN-PAGE), es otra alternativa para el análisis de proteínas de membrana, en este caso se realiza una separación dependiente de la carga intrínseca de las proteínas en geles en gradiente de acrilamida. La Cloruro de bencildimetil – n – hexadecilamonio PAGE (BAC-PAGE) involucra el reemplazo del IEF por electroforesis con el detergente catiónico BAC seguido de SDS-PAGE y dSDS que usa un gel de alto y bajo porcentaje para la primera y la segunda dimensión, respectivamente. Si bien estas técnicas resultan ser más compatibles con las características de las proteínas de membrana, no logran la resolución de la 2DE convencional[58]. Otras aproximaciones incluyen delipidación, que reduce la agregación de proteínas en la primera dimensión. La biotinilación de proteínas de membrana ha sido una estrategia exitosamente usada para su enriquecimiento, la marcación sobre la superficie celular involucra el uso de biotina unida a un brazo espaciador con un grupo activo que reacciona con las proteínas de superficie y la subsecuente purificación altamente específica con avidina o derivados.[62]

1.3.2 Fosfoproteómica y señalización

La fosforilación de proteínas es uno de los mecanismos de regulación de procesos biológicos más comunes y constituye la modificación post-traduccionales (PTM) más ampliamente estudiada. Estudios recientes sugieren que un tercio de las proteínas eucariotas son fosforiladas y representan entre 2 y 4% de los proteomas eucariotas [63].

Los eventos de fosforilación inician y propagan las vías de transducción de señales. Es considerada como una modificación post-traduccional (PTM) reversible y temporal que típicamente conduce a cambios en la conformación, actividad e interacción de proteínas por un muy corto intervalo de tiempo. La fina regulación espacial y temporal de estos fenómenos depende de un estricto balance entre eventos de fosforilación / defosforilación, a cargo de quinasas y fosfatasas. Además, frecuentemente la fosforilación ocurre sobre múltiples residuos de una misma proteína, determinando la función específica dependiendo del número y sitio de fosforilación.

Entre los oncogenes más importantes conocidos hasta la fecha se encuentran las proteínas tirosina quinasa. Hay cerca de 100 tirosinas quinasa en el genoma humano, y más de 50 han sido implicadas en cáncer [64]. Dado el rol central de los eventos de fosforilación de proteínas como éstas en carcinogénesis, los estudios se han enfocado principalmente a 1) identificar sitios de fosforilación, cinética de eventos de fosforilación / defosforilación; 2) identificación de sustratos biológicos de quinasas y fosfatasas; 3) estudios de interacción proteína – proteína dependiente de fosforilación y 4) esclarecer el papel de las quinasas y sus sustratos en estados de enfermedad, particularmente en cáncer.

Las fosfoproteínas son caracterizadas generalmente usando métodos de espectrometría de masas (MS), antecedido por procesamiento proteolítico; sin embargo, su identificación es notoriamente difícil sobre todo en presencia de péptidos no modificados. Esto debido principalmente a la menor eficiencia de ionización de fosfopéptidos, que representan menores intensidades en comparación con péptidos no fosforilados; de tal manera, que el enriquecimiento en fosfoproteínas anterior a MS resulta en una mayor sensibilidad y eficiencia de identificación.

IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography), es una técnica ampliamente usada para enriquecimiento de fosfoproteínas. Iones metálicos (Fe^{3+}, Al^{3+}, Ga^{3+}, o Co^{2+}) son quelados sobre esferas recubiertas de ácido nitrilotriacético (NTA) o ácido iminodiacético (IDA) para formar una fase estacionaria a la cual los péptidos, transportados por la fase móvil, puedan unirse mediante la interacción de los grupos fosfato cargados negativamente con los cationes[63, 65]. La unión de los fosfopéptidos debe ser efectuada a un pH bajo, para evitar competencia con grupos carboxilo ionizados, debe luego elevarse el pH para lograr una elución eficiente. Adicionalmente

se han ido creando alternativas para el enriquecimiento, dependiendo de la muestra y el interés de estudio, dentro de éstas se encuentra la cromatografía de afinidad con TiO_2, elución secuencial de IMAC (SIMAC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica (HILIC), métodos químicos como β – eliminación de residuos Ser y Thr fosforiladas a pH básico, seguida de una reacción de Michael sobre los productos de la reacción dehidroalanina / metildehidroalanina, con una marcación para luego purificar por afinidad. Esta técnica ha sido denominada (BEMA) y precipitación con fosfato de calcio, entre otros.

Por otro lado, la determinación de los cambios en la regulación en sitios de fosforilación a causa de estímulos o estados celulares, debe realizarse bajo aproximaciones cuantitativas, normalizando frente a la abundancia relativa de la proteína, de tal forma que no se llegue a conclusiones erróneas. Muchas técnicas de cuantificación introducen marcación con isótopos estables, las diferencias se encuentra en el nivel en que se introduce la marcación. SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) introduce la marcación ($^{14}N/^{15}N$) o ($^{12}C/^{13}C$), en células viable en cultivo, otros como ICAT (isotope-coded affinity tags) introducen la marcación a nivel de proteína e iTRAQ (isobaric peptide tags for relative and absolute quantification) a nivel de péptidos [65].

1.4 MODELO BIOLÓGICO

1.4.1 El cuello uterino

El cuello uterino es la parte fibromuscular inferior del útero. De forma cilíndrica o cónica, mide de 3 a 4 cm de largo y 2,5 cm de diámetro. Lo sostienen el ligamento redondo y los ligamentos uterosacros, que van de las partes laterales y posterior del cuello uterino a las paredes de la pelvis ósea; la mitad inferior del cuello uterino, llamada hocico de tenca o porción vaginal, penetra en la vagina por su pared anterior, mientras la mitad superior queda por encima de la vagina. El conducto cervical desemboca en la vagina por el llamado orificio cervical externo. El tamaño y la forma del cuello uterino varían según la edad, el número de partos y el momento del ciclo hormonal de la mujer. El de las mujeres que han tenido algún hijo es voluminoso, y el orificio externo se presenta como una ancha hendidura transversal. El orificio cervical externo de las nulíparas presenta el aspecto de una pequeña abertura circular en el centro del cuello uterino. La porción supravaginal se une al cuerpo muscular del útero

en el orificio cervical interno. La porción del cuello uterino exterior al orificio externo se llama exocérvix. La porción del cuello uterino interior al orificio externo se denomina endocérvix. El conducto cervical, que atraviesa el endocérvix, conecta la cavidad uterina con la vagina y se extiende del orificio interno al externo, por el que desemboca en la vagina. Su longitud y anchura varían según la edad y el momento del ciclo hormonal de la mujer. Es más ancho en las mujeres en edad fecunda: alcanza de 6 a 8 mm de ancho [66-67].

El cuello uterino está recubierto por epitelio escamoso estratificado no queratinizante y por epitelio cilíndrico. Estos dos tipos de epitelio confluyen en la unión escamoso-cilíndrica (UEC) [66].

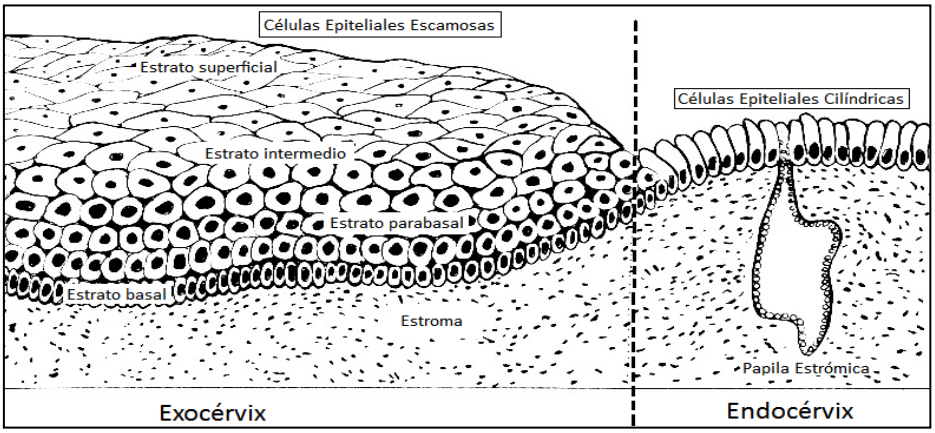
1.4.1.1 Epitelio escamoso. Recubre el exocérvix, es sensible a los estímulos hormonales y se renueva cada cinco días, por acción de los estrógenos [66]. Sufre por lo tanto las mismas transformaciones citológicas que el epitelio vaginal, contiene glucógeno y descama células superficiales. La progesterona inhibe la maduración como sucede en el embarazo. El epitelio escamoso reposa sobre una membrana basal. Durante el período reproductivo el epitelio es renovado continuamente por procesos de proliferación, maduración y descamación. El epitelio escamoso cervical contiene tres capas de células bien diferenciadas (Figura 1).

1.4.1.2 Epitelio cilíndrico. Está constituido por un estrato único de células cilíndricas altas que recubren todo el canal endocervical, carece de submucosa y por lo tanto descansa directamente sobre la capa fibrosa del cérvix, siendo muy sensible a las infecciones bacterianas y virales. Este epitelio presenta unas hendiduras (papilas) que son invaginaciones de profundidad variable. Las células endocervicales son ricas en mucina [67]. Las papilas son unidades productoras de moco y poseen dos tipos de células columnares:

- Células no ciliadas o secretoras
- Células ciliadas que no son secretoras

Las ciliadas poseen un movimiento rítmico en dirección a la vagina para movilizar la secreción formando un tapón mucoso que protege el orificio cervical externo. El moco cervical, elemento de importancia capital en el proceso reproductivo, es un hidrogel compuesto en un 98% por agua y un 2% por sólidos, sobretodo en la época preovulatoria [67].

Figura 1. Estructura del epitelio cervical normal



Tomado y adaptado de *Erazo, J. V (2007)* [67]

1.4.1.3 Zona de transformación. La zona del cuello uterino donde el epitelio cilíndrico ha sido reemplazado o está reemplazándose con el nuevo epitelio escamoso metaplásico se denomina zona de transformación (ZT). Corresponde al área del cuello uterino limitada distalmente por la UEC original y proximalmente por el límite más lejano del epitelio metaplásico. Se denomina zona de transformación anormal o atípica (ZTA) cuando en ella se observan signos de carcinogénesis cervical, como cambios displásicos. Identificar la zona de transformación tiene gran importancia en procedimientos diagnósticos como la colposcopia, pues casi todas las manifestaciones de carcinogénesis cervical ocurren en esta zona [67].

1.4.2 Líneas celulares de carcinoma de cérvix

Las líneas celulares que servirán en este trabajo como modelos biológicos son HeLa y C33-A.

1.4.2.1 Línea celular HeLa: esta es considerada la primera línea celular establecida de manera continua hace más de 50 años, se aisló a partir de un cáncer cervical glandular muy agresivo que hizo metástasis a estómago y vejiga[68]. Posee infección por el virus de papiloma humano tipo 18 (VPH-18), baja expresión de p53 y niveles normales de la proteína retinoblastoma[69-70]. Ha sido reportada como una línea celular altamente invasiva [71].

HeLa ha sido usada en toda clase de estudios bioquímicos y clínicos in *vitro*, sin embargo, sólo hasta 2004 se publicó el primer estudio extenso de su perfil proteómico en dos dimensiones. Cerca de 3000 spots se analizaron e identificaron 1200 proteínas

producto de 297 genes diferentes usando su PMF (peptide mass fingerprinter) obtenido mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (Matrix – Assisted Laser Desorption / Ionization – Time Of Fly). Aproximadamente el 42% de las proteínas identificadas estuvieron anotadas para citosol, cerca del 22% en núcleo, 10% en mitocondria, incluyendo membrana mitocondrial y 6% proteínas de membrana, siendo las más abundantes cadenas de tubulina, proteínas de choque térmico y algunas enzimas como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenesa y α-enolasa[72].

Actualmente se dispone de una extensa base de datos de las proteínas que expresa bajo diversas condiciones, además, ha sido elegida como modelo de referencia en la campaña mundial *Fixing Proteomics*[73], dedicada a solucionar los problemas que limitan el potencial de la investigación proteómica, enfocándose principalmente en el factor de reproducibilidad.

1.4.2.2 Línea celular C33 – A. Es una de las líneas derivadas por N. Auersperg de biopsias de cáncer cervical. Exhibe un cariotipo hipodiploide y morfología epitelial. Esta línea presenta un bajo índice de invasión [74], inestabilidad cariológica tras pases continuos [75-76]. Además esta línea cancerosa presenta características poco frecuentes: la proteína retinoblastoma tiene un tamaño anormal y la expresión de p53 es elevada, exhibe un punto de mutación del codón 273 donde se sustituye un residuo Arg por Cys. Estas células son negativas para ADN y ARN viral [70].

En trabajos de investigación previos realizados en el laboratorio del grupo de investigación en hormonas, se ha encontrado que la línea celular C-33 A comparativamente a la línea de carcinoma cervical SiHa, no expresa IGF-IR y sólo expresa la isoforma IR-A del receptor de insulina [77].

1.4.3 Cáncer cervical e infección con el Virus de Papiloma Humano

Los virus del papiloma humano son virus de ADN de doble hebra, de tamaño pequeño, aproximadamente 8000 pares de bases [78]. Se han identificado cerca de 100 tipos diferentes de virus de papiloma, los cuales expresan un tropismo característico. Algunos tipos son cutanotrópicos (VPHs 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 y 65); son frecuentemente aislados en lesiones cutáneas de pacientes con epidermo displasia verruciforme y algunos tumores epiteliales. Otro grupo son VPHs mucosotrópicos (VPHs 6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73, 54) y han sido identificados en lesiones benignas y malignas del tracto anogenital de ambos sexos, tejidos y lesiones de la cavidad oral,

orofaringe, laringe y esófago. Finalmente, otro grupo se encuentra presente tanto en tejidos y lesiones cutáneas como mucosas (VPHs 2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62 y 72) y su relación con lesiones malignas aún no está establecida [78].

En cada uno de estos grupos, puede realizarse una distinción entre tipos de bajo y alto riesgo. Las especies de alto riesgo, como VPH16 y VPH18, son frecuentemente encontrados en lesiones premalignas y malignas, por otro lado, las de bajo riesgo, (como VPH6 y VPH11) son rara vez halladas en este tipo de lesiones[79].

En un estudio adelantado por Choi, *et al*., [80] establecieron el perfil proteómico y la caracterización de proteínas asociadas con estados tumorales en 6 muestras patológicas de carcinoma invasivo escamoso infectadas con el virus tipo 16 o 18 y usando como control la línea celular HaCaT de queratinocitos humanos inmortalizados. El estudio se realizó independientemente sobre las subfracciones celulares de núcleo y citoplasma usando electroforesis de dos dimensiones seguido de MALDI-TOF MS. Las proteínas analizadas estuvieron involucradas en la regulación del ciclo celular, estabilidad genómica general, activación de telomerasa e inmortalización celular, sin embargo, no se encontró diferencias en la caracterización de proteínas para cáncer cervical por infección de VPH16 o VPH 18.

1.4.3.1 Funciones de las proteínas virales. El genoma viral puede ser dividido en marcos de lectura abiertos tempranos y tardíos, Los genes de expresión temprana codifican 6 proteínas (E1 – 6), relacionadas con la regulación de la replicación del ADN viral y proliferación celular [81]. Los genes de expresión tardía (L1 y L2), están relacionados con la creación de la cápside viral [81].

La proteína E1 está involucrada con el mantenimiento del genoma viral y replicación. La proteína E2 es la mayor proteína transreguladora que influye sobre la transcripción y replicación del ADN viral. Adicionalmente, en tipos de alto riesgo, E2, actúa inicialmente como un supresor del promotor de los genes E6 y E7. Se piensa, que estas proteínas trabajan juntas en mantener el genoma viral y su forma episomal en la célula [79].

La expresión de la proteína E4 es necesaria para la producción de la proteína L2, una de las dos proteínas estructurales de la cápside [82]. E4 también altera la citoqueratina citoplasmática, causando condensación de tono-filamentos en la periferia celular, facilitando la liberación de las partículas virales desde células epiteliales escamosas

superficiales [82]. E4 podría jugar un papel facilitando la amplificación del genoma viral [83].

Las oncoproteínas E5, E6 y E7, están involucradas en la transformación celular. E5, una pequeña proteína se une a una variedad de proteínas de membrana del huésped y receptores de factores de crecimiento [82], incluyendo el factor de crecimiento epidermal (EGF), receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y el receptor del factor 1 estimulante de colonia (CSF-IR) [84], posiblemente relacionada con la expresión de secuencias poliadeniladas que regulan la expresión génica viral para todos los marcos de lectura abiertos tempranos [82]. Esta proteína ha sido también relacionada con escape de apoptosis y evasión del sistema inmune por células infectadas, desregulando la presentación de antígeno por parte de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I [85].

Las oncoproteínas E6 y E7 estimulan la progresión a través del ciclo celular uniéndose a reguladores de éste, induciendo proliferación de células basales infectadas y con esto facilitan la replicación del genoma viral [79, 82]. E6 se une a p53, una proteína que actúa como supresor tumoral arrestando la célula en fase G_1 en respuesta al daño del ADN [79]. E6 forma un complejo con p53 a través de E6AP, una proteína ligasa – ubiquitina, lo que conduce a la degradación de p53 por la vía ubiquitina - proteosoma [86]. También se ha relacionado con la inactivación de varias proteínas proapoptóticas como Bak y Bax [79], conduciendo a la proliferación celular y evitando la muerte de células infectadas. Por su parte, E7, tiene una estructura y función similar a la ciclina D1, por lo que puede regular la proliferación celular a través de la inactivación de la vía de la proteína retinoblastoma, induciendo la entrada en la fase S del ciclo celular [79].

La mayoría de las infecciones por el virus ceden espontáneamente; sin embargo si la infección es persistente, puede desarrollarse un tumor premaligno, y éste sin un tratamiento adecuado, puede transformarse en cáncer. Las lesiones precursoras persistentes causadas por el VPH, normalmente tardan entre 10 y 20 años en convertirse en un cáncer invasor, siguiendo una evolución de estados patológicos que se caracteriza por una serie de manifestaciones que van desde atipia celular a diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical antes de su progresión [4]. En la tabla 1 se muestra la correlación entre la terminología displasia/carcinoma *in situ*, NIC (neoplasia intraepitelial cervical) y Bethesda, usada para reportar los diferentes estados de la enfermedad [66].

Tabla 1. Correlación entre la terminología displasia/carcinoma *in situ*, NIC (neoplasia intraepitelial cervical) y Bethesda[66]

Terminología de displasia	Terminología NIC original	Terminología NIC modificada	Sistema Bethesda Terminología LIE (1991)
Normal	Normal	Normal	Dentro de los límites normales Cambios celulares benignos (infección o reparación) ASCUS - AGUS
Atipia	Atipia coilocítica, condiloma plano, sin cambios epiteliales	NIC de bajo grado	L-LIE
Displasia o discariosis leve	NIC 1	NIC de bajo grado	L-LIE
Displasia o discariosis moderada	NIC 2	NIC de alto grado	H-LIE
Displasia o discariosis grave	NIC 3	NIC de alto grado	H-LIE
Carcinoma *in situ*	NIC 3	NIC de alto grado	H-LIE
Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical; L-LIE: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; H-LIE: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; ASCUS: células escamosas atípicas de significado incierto, AGUS: células glandulares atípicas de significado incierto

1.5 PROTEÓMICA Y CÁNCER

La definición original de proteoma se describió en 1997 por Humphery-Smith *et al.,* como el análisis de un conjunto completo de proteínas expresado por un genoma, éste provee información acerca de; 1) Cuando los productos de un gen dado son traducidos, 2) La concentración relativa de los productos del gen y 3) el grado de modificaciones post-traduccionales, información que no puede ser predicha únicamente a partir de la secuencia de aminoácidos [87]. Además debe considerarse que la expresión de proteínas refleja el estado metabólico de una célula en un

momento dado, por lo que es altamente dinámico y depende fuertemente de diversos factores.

En 1975 se publicaron de manera independiente las primeras descripciones de la separación de proteínas de *E. coli* por Patrick O'Farrell [88] y de tejidos murinos por Joachim Klose [89], combinando el enfoque isoeléctrico con la separación electroforética en geles de poliacrilamida. En contraste con otras técnicas que cuentan con un tiempo similar de desarrollo, como el Southern blotting[90] o la clonación de ADN [91], la electroforesis bidimensional solo empezó a usarse ampliamente hasta hace relativamente poco tiempo, cuando empezó a contarse con una mayor disponibilidad de secuencias genómicas, el perfeccionamiento de las técnicas de espectrometría de masas, el mejoramiento de técnicas de separación y de herramientas bioinformáticas. Hoy, es considerada como uno de los métodos más importantes para la separación de proteínas y caracterización de problemas biológicos.

Sin embargo, la electroforesis 2D presenta limitaciones como la amplia exclusión de proteínas pequeñas o muy grandes, muy básicas y altamente hidrofóbicas, presenta una variabilidad importante de gel a gel, aun cuando la separación sea óptima, por otro lado, los productos de la digestión tríptica son menores que en fase líquida, lo que limita la sensibilidad en el posterior análisis de masas[92]. De allí, ha surgido la necesidad de generar otras aproximaciones metodológicas que permitan estudiar de manera más completa los perfiles proteómicos. A continuación se presenta una breve descripción de las dos metodologías más usadas: la aproximación electroforética y la cromatográfica.

1.5.1 Electroforesis de dos dimensiones

Permite la separación de muestras complejas de proteínas de acuerdo al punto isoeléctrico (primera dimensión) y la masa molecular (segunda dimensión). Dado que las proteínas son moléculas anfotéricas su carga dependerá del pH del ambiente, y corresponderá, a la sumatoria de sus grupos ionizables, que en este caso serán las cadenas laterales y los grupos amino y carboxilo terminales. El punto isoleléctrico (pI) puede ser definido como el pH específico en el que la carga neta de la proteína es igual a cero, en cuanto el pH es mayor al pI la carga neta de la proteína tiende adquirir un mayor carácter negativo, en cuánto es menor, positivo.

La primera dimensión (IEF) permite un prefraccionamiento de la muestra de acuerdo a la carga, por lo que es crítico contar con un gradiente de pH, que originalmente se obtuvo usando mezclas de anfolitos. Vesterberg en 1969[93] logró la síntesis de una mezcla heterogénea de isómeros ácidos oligoamino – oligocarboxílicos alifáticos, el resultado fue un espectro de anfolitos de bajo peso molecular con puntos isoeléctricos muy cercanos entre sí y con un alto poder de amortiguación en su punto isoeléctrico.

El gradiente es establecido por el campo eléctrico. Cuando la mezcla es sometida al campo, los anfolitos cargados migran entre el ánodo y el cátodo a una velocidad dependiente de su carga y se alinean de acuerdo a su pI, generando así, un gradiente relativamente lineal de pH. Sin embargo, esta aproximación presentó dos limitaciones importantes: los patrones obtenidos eran dependientes del tiempo, dado que la focalización de proteínas es un proceso relativamente lento y los anfolitos se encontraban en solución, entonces el gradiente se inestabilizaba originando la pérdida de las proteínas básicas así como la parte básica del gradiente. Por otro lado, las proteínas también se comportan como anfolitos por lo que modificaban el perfil del gradiente, así que su forma dependía de la muestra.

Estos problemas se superaron con la introducción de gradientes de pH inmovilizados, generados por moléculas amortiguadoras derivadas de acrilamida copolimerizados con una matriz en gel, estos derivados son denominados Immobilines®, ácidos o bases débiles definidos por su valor pK [92].

El IEF es realizado en condiciones desnaturalizantes para lograr la mayor resolución. La completa desnaturalización y solubilización de la muestra se logra con una mezcla de úrea, tioúrea, detergentes y agentes reductores, asegurando que cada proteína estará presente en una única conformación, sin agregaciones, minimizando entonces, las interacciones intermoleculares.

Logrado el IEF, las proteínas deben ser saturadas en dodecil sulfato de sodio (SDS), reducidas y alquiladas para bloquear los grupos tiol (-SH), de tal forma que pueda efectuarse la separación electroforética en geles de poliacrilamida o SDS-PAGE, el SDS es un detergente aniónico que se incorpora homogéneamente a las proteínas, a una razón aproximada de 1,4g/g proteína[92], formando complejos aniónicos que enmascaran la carga propia de cada proteína, adicionalmente las condiciones

reductoras eliminan los enlaces disufuro, de esta forma, la separación depende mayoritariamente de la masa molecular.

1.5.2 Cromatografía Líquida

Las diferencias fisicoquímicas e incluso biológicas de las proteínas, son aprovechadas para realizar separaciones cromatográficas como se muestra en la tabla 2. Sin embargo, se centrara la atención en la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), dado que es un método altamente versátil y ampliamente aplicado, desde la desalinización efectiva de extractos proteicos hasta la combinación con otras técnicas cromatográficas para lograr la caracterización de proteínas y péptidos desconocidos. Esta aproximación multidimensional seguido de masas, es una técnica muy poderosa para lograr la identificación acertada de proteínas.

Tabla 2. Principios de separación en cromatografía de proteínas[92]

Propiedad	Técnica
Carga	Cromatografía de intercambio iónico Cromatoenfoque
Tamaño	Filtración por gel
Hidrofobicidad	*Cromatografía en fase reversa* Cromatografía de interacción hidrofóbica
Bioreconocimiento	Cromatografía de afinidad

La separación de biomoléculas por RP-HPLC depende de la interacción hidrofóbica reversible, entre las moléculas de la muestra en el eluyente (fase móvil) y el medio de la columna (fase estacionaria). La distribución de la muestra depende de las propiedades del medio, la hidrofobicidad de la muestra y la composición del eluyente. Las condiciones iniciales son principalmente acuosas, frecuentemente con un pequeño porcentaje de un modificador orgánico, típicamente acetronitrilo 3% – 5%, que asegura un equilibrio extremo donde el 100% de la muestra se encuentra unida. Existen principalmente dos tipos de medios para fase reversa (RP), uno basado en un matriz hidrofílica de sílica cubierta con un fase hidrofóbica de cadenas de carbono, típicamente hidrocarburos n – alquil o aromáticos, y una basada en una matriz truncada de polímero hidrofóbico.

La mayoría de biomoléculas presentan una hidrofobicidad suficiente para unirse fuertemente a un medio RP en medio acuoso, en la presencia de una baja concentración de modificador orgánico y se eluye usando un estrecho gradiente de concentración del modificador orgánico. Además, habitualmente la aplicación de la muestra se realiza usando un agente de partición iónica (normalmente ácido trifluoroacético, TFA) para aumentar la interacción hidrofóbica. La elución se realiza en orden creciente de hidrofobicidad [94].

1.5.3 Espectrometría de Masas (MS)

Si el proteoma de un organismo es considerado un producto de la expresión de todas las formas posibles de una proteína, incluyendo isoformas resultantes de *splicing* y modificaciones post-traduccionales, además de ser objeto de una alta variabilidad dependiente del tiempo y el ambiente, esto representa un cuerpo de información considerablemente complejo y un verdadero reto analítico.

Entre el conjunto de herramientas analíticas con las que las proteínas pueden ser estudiadas, la más versátil y eficiente para enfrentar la complejidad asociada al proteoma es la espectrometría de masas (MS), que fundamentalmente mide la razón masa carga *m/z* de iones en fase gaseosa. Básicamente, una fuente de ionización convierte las moléculas del analito a iones en fase gaseosa, que luego son separados por un analizador de masas en base a su razón *m/z*. Finalmente son registrados el número de iones de cada valor de *m/z* por un detector [95].

Un problema fundamental en MS de muestras biológicas fue lograr transferir moléculas altamente polares y no volátiles con masas de decenas de kDa a fase gaseosa sin destruirlas. Esto fue resuelto con las llamadas técnicas de ionización suave, como MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization)* e ionización por electrospray (ESI).

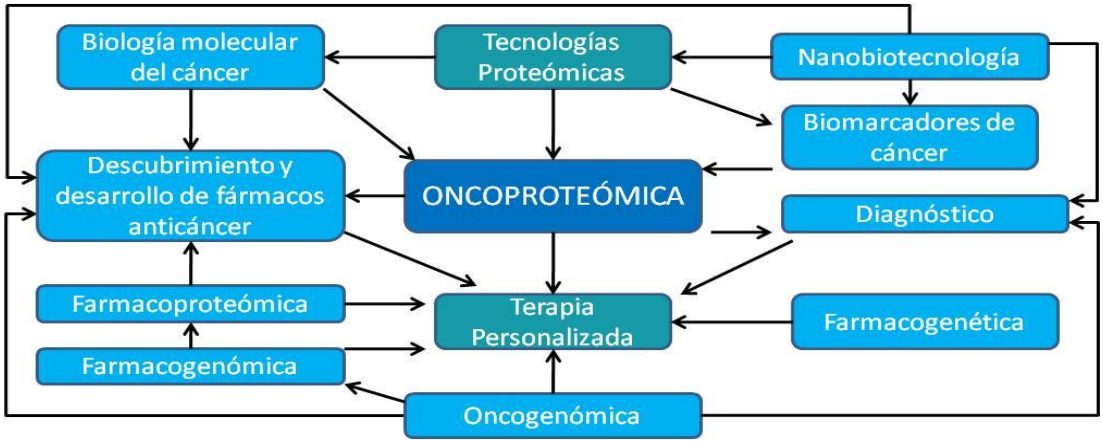
En MALDI, el analito es co - cristalizado con un exceso de una matriz que absorbe fuertemente en la región ultravioleta. Normalmente son usados ácidos aromáticos de bajo peso molecular, dicha matriz debe cumplir con requisitos como: ser soluble en solventes compatibles con el analito, ser estable en el vacío, promover la co – desorción e ionización del analito. Sobre la mezcla se hace incidir un rayo láser que

ocasiona la desorción e ionización conjunta del analito y la matriz, tanto por protonación o cationización (iones cargados positivamente) como por deprotonación (iones cargados negativamente). Los iones son luego acelerados al analizador de masas, frecuentemente tipo TOF (time of fly) [92]. MALDI – TOF es usada rutinariamente en la identificación de proteínas purificadas mediante 2DE.

Por otro lado la ionización dada por electrospray se realiza a presión atmosférica por la aplicación de la muestra en solución a un capilar estrecho bajo la acción de un campo eléctrico. Una diferencia de potencial entre el capilar y la entrada del espectrómetro genera una fuerza, que extiende el líquido hasta formar un cono denominado cono de Tyler, formado por fuerzas colúmbicas repulsivas, del cual emergen gotas que van reduciéndose de tamaño por evaporación y luego fisión hasta llegar al nivel de nanométros. Las cargas eléctricas son estadísticamente distribuidas sobre los sitios de carga potenciales del analito, posibilitando la formación de iones multicargados[92].

Los estudios proteómicos hasta la fecha han generado una amplia base de datos con un importante potencial diagnóstico, pronóstico y terapéutico para enfrentar el cáncer. Muchos de estos estudios son dirigidos para encontrar biomarcadores, entendidos como alteraciones moleculares específicas medibles propias de células malignas, sea a nivel de ADN, ARN, proteína o metabolismo[96] y que son usados con diversos fines como clasificación tumoral, determinación de diagnósticos y pronósticos así como monitoreo de la respuesta terapéutica. Para lograr tales fines, la oncoproteómica, como ha sido denominada la aplicación de la proteómica a la investigación en cáncer, ha sido usada en conjunto con otras tecnologías, dichas interacciones se muestran en la figura 2.

Figura 2. Interrelaciones de la oncoproteómica con otras tecnologías en la lucha contra el cáncer



Tomado y adaptado de *Jain, K (2008)*[96]

El principal potencial de la proteómica en la investigación en cáncer no es el derivado de experimentos individuales, sino de los estudios comparativos entre diferentes tipos y estados del cáncer; además, hay una necesidad imperativa de integrar la proteómica, la genómica y la metabolómica con el objetivo de lograr una interpretación funcional y comprehensiva de los datos clínicos y patológicos[97].

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar el perfil de expresión de proteínas de membrana que puedan estar mediando procesos de invasión celular y establecer su posible relación con el sistema de factores de crecimiento similares a la insulina en células de cáncer cervical.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y comparar la capacidad invasiva de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino, HeLa y C33 – A, mediante el índice de invasión, en estado basal e inducido por los ligandos insulina, IGF-I e IGF-II.

2. Extraer y separar las proteínas integrales y asociadas a la membrana celular de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino HeLa y C33 – A.

3. Establecer por medio de un análisis proteómico los perfiles de expresión diferencial, de las proteínas de membrana de las líneas celulares HeLa y C33 – A.

4. Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en las líneas celulares

3. HIPÓTESIS

Defectos en la regulación de las vías de señalización, biodisponibilidad de ligandos y receptores, activación desregulada de oncogenes y supresores tumorales pueden conducir a la transformación maligna celular y al desarrollo del cáncer. El sistema de factores de crecimiento similares a la insulina y las vías de señalización asociadas, han sido relacionados ampliamente con la progresión tumoral, por lo que en este trabajo se plantea cómo hipótesis central:

Diferencias del perfil de expresión de proteínas de membrana pueden promover la adquisición de un fenotipo invasivo en cáncer de cuello uterino y estar relacionados con vías de señalización asociadas a los receptores del sistema IGF

4. METODOLOGÍA

4.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS LÍNEAS CELULARES

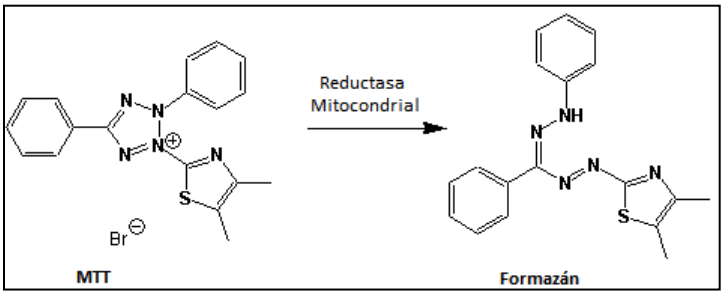
Las líneas celulares de cáncer cervical HeLa y C33-A se obtuvieron de la American Type Culture Collection ATCC (USA). Las células se cultivaron en medio RPMI completo: RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y penicilina (100 UI/mL)/ estreptomicina (100 mg/mL), se incubaron en atmósfera húmeda, CO_2 al 5% y 37ºC.

4.1.1 Ensayo de Proliferación Celular

La viabilidad celular y proliferación de las células en cultivo se evaluó mediante cuantificación espectrofotométrica usando el ensayo conocido como MTT, que se basa en la reducción metabólica mitocondrial de la sal amarilla de tetrazolio (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) para formar cristales morados de formazán. Dicha reducción celular involucra los cofactores de dinucleótido de adenina y nicotinamida NADH y NADHP (Figura 1). Los cristales de formazán son solubilizados y la solución coloreada resultante es cuantificada en un espectrofotómetro.

El ensayo colorimétrico MTT fue descrito por primera vez en 1983 por Mosmann, T. *et al.,* [98], y mejorado posteriormente. Ha sido diseñado para la cuantificación espectrofotométrica de proliferación y viabilidad celular sin la necesidad de usar isotopos radiactivos, en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas, nutrientes, anticuerpos, evaluación de citotoxicidad, actividad celular, entre otros.

Figura 3. Reducción del MTT por actividad mitocondrial

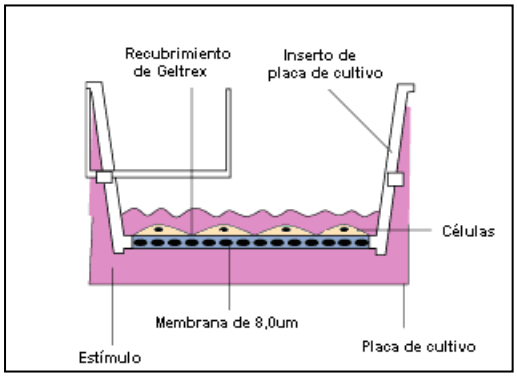


La línea HeLa se sembró en una concentración de 10 000 células/pozo en placas de cultivo de 96 pozos en medio RPMI completo, pasadas 12 horas de incubación a 37%, las células se sometieron a 12 horas de deprivación reemplazando el medio completo por medio libre de suero (SFM). Al cabo del tiempo, el medio se reemplazó por 100µl de SFM o SFM con SFB 10%, insulina, IGF-I o IGF-II éstos tres últimos en dosis de 10nM y 50nM. Las células se mantuvieron en cultivo con dichos medios durante 24, 48 y 72 horas. Culminados cada uno de los tiempos, se adicionó 10µl de la solución de MTT (5mg/ml) por cada 100µl de medio y se incubaron nuevamente por 4 horas. Cumplido este periodo, los cristales de formazán formados se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO). Los productos de la solubilización, se cuantificaron fotoespectrométricamente usando la relación de absorbancia de 650nm/570nm en un lector de microplacas (BioRad, Microplate Reader Model 680). Un incremento en el número de células viables resulta en un incremento de la actividad metabólica total en la muestra. Este incremento se correlaciona directamente con los niveles de absorbancia registrados. Este ensayo se realizó por triplicado para cada estímulo.

4.1.2 Ensayo de Migración e Invasión Celular

Los ensayos de migración se realizaron en cámaras de Boyden siguiendo las recomendaciones de la casa productora (Corning, USA). Estas cámaras cuentan con una membrana con poros de 8µm de diámetro (Figura 3). En el caso de los ensayos de invasión las membranas se recubrieron con 100µl de Geltrex™ (GIBCO), un extracto purificado de membrana basal mínima, compuesto principalmente de laminina, colágeno IV, entactina, proteoglicano sulfato de heparina. El Geltrex™ se usó en este ensayo en una concentración del 12%, previa estandarización.

Figura 4. Representación esquemática de las cámaras de Boyden modificadas. *Usadas en ensayo de invasión. Tomado y adaptado de la ficha técnica de las cámaras de invasión con matrigel BD coat (Becton Dickinson)*



Para cada línea celular en estudio, se colocaron 100µL de suspensión celular con un número aproximado de 200000 células en cada cámara o inserto. El conteo celular se realizó en cámara de Neubauer con azul de tripán 1%. Los insertos se ubicaron en una placa de cultivo de 24 pozos, donde previamente se había dispuesto 600µL del estímulo correspondiente, Insulina, IGF-I e IGF-II a una concentración final de 10nM, SFB 10% o SFM. Se permitió una incubación de 24 horas. Luego se retiró la suspensión celular, las células remanentes se retiraron con escobillones de algodón y las células que migraron o invadieron la membrana se tiñeron con cristal violeta 1%. Se fotografiaron en un aumento microscópico de 20X de microscopio invertido. Luego la membrana se retiró de la cámara y el colorante incorporado se recupero en ácido acético al 10% y se realizó lectura espectrofotométrica a 595nm. Este ensayo se realizó por triplicado.

4.1.3 Evaluación de los niveles de expresión del receptor IGF-IR

El nivel de expresión de proteína del receptor IGF-IR en cada una de las líneas celulares se evaluó mediante western blot. Este ensayo se realizó a partir de 50µg de proteína para cada línea celular en estudio. El extracto de proteína se obtuvo como se indica en el literal 4.2.1. En primer lugar las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida del 10%. Terminada la electroforesis, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa, donde se verificó la transferencia usando la tinción reversible rojo Ponceau. Los sitios inespecíficos se bloquearon con leche descremada al 5% y posteriormente se incubó durante toda la noche con anticuerpo primario anti-rabbit contra el receptor de IGF tipo I (IGF-IR) sub unidad β (IGF-IRβ C-20. Santa

Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en una relación 1:1000 en leche descremada al 1% a 4ºC. Después de tres lavados con TBS-Tween (NaCl 0,2M; KCl 0,0025; Tris-base 0,025M; Tween 20 0,05%), los blots se incubaron 1,5h con el anticuerpo secundario Pierce Goat Anti-Rabbit Poly-HRP (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) en relación 1:10000 a temperatura ambiente. Después de varios lavados el inmunocomplejo se identificó por quimioluminiscencia usando el Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminiescent kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). La densitometría de las bandas se realizó con el programa Quantity One® (Biorad). Se usó MCF-7 como línea control de expresión de IGF-IR.

4.2 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS LÍNEAS CELULARES

4.2.1 Caracterización del proteoma general

4.2.1.1 Extracción de proteína total: Las células se crecieron a confluencia en platos de 100mm en medio completo. Las células se lavaron y rasparon con buffer fosfato salino PBS frío (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; $Na_2HPO_4$4,3mM; KH_2PO_4 47mM). Se obtuvo el pellet por centrifugación a 1000rpm durante 5 minutos. Luego el pellet celular se sometió a lisis con buffer RIPA (NaCl 150mM, Tris-HCl 50mM, EDTA 2mM, Triton X-100 1%, NP-40 0,5%) y coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se incubó por 30 minutos a 4ºC y se centrifugó a 14000rpm por 20 minutos.

La proteína se precipitó usando partición de fases metanol–cloroformo, el pellet se resuspendió en buffer IEF-T (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, anfolitos 1% pH 3 - 10 no lineal, DTT 40mM). El extracto de proteína se cuantificó usando el kit Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA)

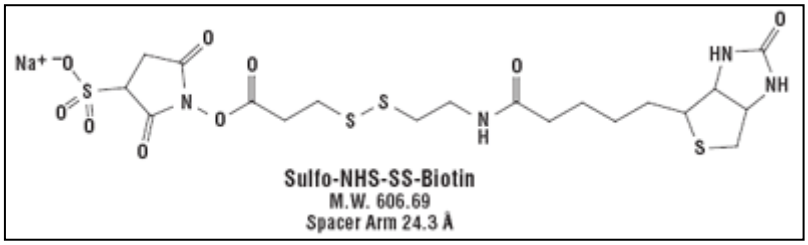
4.2.1.2 Electroforesis bidimensional (2DE)**:** El isoelectroenfoque se llevo a cabo en tiras de 18cm ReadyStrip IPG Strip (BioRad) de gradiente de pH no lineal de 3-10. Los extractos de proteína (500µg de extracto total) se llevaron a un volumen final de 325µL con buffer de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, SDS 2%, CHAPS 0,5%, Anfolitos 2%). Las tiras se rehidrataron de manera pasiva por 1 hora, al cabo de este tiempo se sometieron al siguiente programa de isolectroenfoque: 50V por 11 horas para rehidratación activa, una rampa rápida a 250V de 30min y luego a 1000V en 30min, voltaje que se mantuvo luego por una hora, paso seguido una rampa rápida a 4000V en 45min, voltaje que se mantuvo por una hora y finalmente una rampa rápida a 8000V hasta alcanzar 55000V/h. Después de la primera dimensión, las proteínas se

redujeron en buffer de equilibrio (Tris-Cl 0,375M, pH 8,8; Urea 6M, Glicerol 20%, SDS 2%) y DTT 130mM durante 15min y subsecuentemente se alquilaron durante 15min con el mismo buffer de equilibrio reemplazando el DTT por Yodoacetamida 135mM. Las proteínas se separaron en la segunda dimensión usando geles del 12% de poliacrilamida y un voltaje constante de 100V. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie coloidal G 250. Los geles se escanearon y el análisis de imágenes se realizó usando el software PDQuest (BioRad) y Progenesis SameSpot (Nonlinear Dynamics Ltd). Se obtuvieron triplicados de cada línea celular.

4.2.2 Análisis comparativo de los proteomas de extractos enriquecidos en proteínas de membrana

4.2.1.1 Enriquecimiento de proteínas de membrana: Se cultivaron aproximadamente 4,0 x 10^7 células para cada línea celular para obtener cerca de 1mg de extracto de proteína enriquecido. Dicho enriquecimiento se realizó usando el kit Pierce Cell Surface Protein Isolation (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) efectuando algunas adaptaciones a las instrucciones de los productores. Se realizó marcación sobre pellet celular, usando sulfosuccinimidil-2-(biotinamida) etil-1, 3 – ditiopropionato, cuya estructura se muestra en la figura 5.

Figura 5. Estructura del reactivo de marcación con biotina

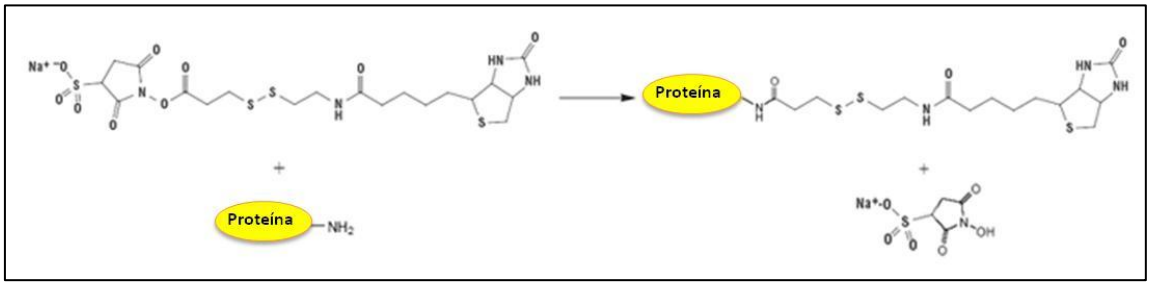


De manera general, el grupo éster N- hidroxisulfosuccinimida (NHS) del reactivo de marcación reacciona con los ε – amino de los residuos de lisina de proteínas de superficie celular para generar un producto estable. Aunque los grupos α – amino presentes sobre el N – terminal de los péptidos reaccionan con el grupo NHS, dichas aminas están ocasionalmente disponibles para la conjugación. Los ésteres NHS reaccionan con aminas primarias deprotonadas, por lo que la reacción requiere pH

neutros o básicos. En la figura 6 se presenta de manera esquemática la reacción de marcación.

Terminado el periodo de marcación, se efectúo la lisis celular con buffer RIPA y se procedió a una purificación cromatográfica por afinidad, usando resinas de NeutrAvidina Agarosa, la cual corresponde a una versión modificada de la avidina, con un punto isoeléctrico de 6,3; lo que minimiza las uniones inespecíficas.

Figura 6. Representación esquemática de la marcación de biotina de la superficie celular



La elución específica de las proteínas marcadas se logra por incubación de la resina con buffer que contiene DTT 50mM, el cual rompe el enlace disulfuro presente en el brazo espaciador del reactivo de marcación. Las proteínas endógenamente biotiniladas no son sensibles a condiciones reductoras y permanecen unidas a la resina. El extracto de proteína se precipitó usando partición de fases metanol–cloroformo, el pellet se resuspendió en buffer IEF-T y se cuantificó usando el kit Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA)

4.2.2.1 Verificación del enriquecimiento en proteínas de membrana: Se verificó el enriquecimiento mediante un western blot contra el receptor de membrana IGF-IR del extracto total y del enriquecido, siguiendo el protocolo que ya se describió con anterioridad. Dada la cantidad limitante de extracto enriquecido obtenido, se utilizaron 2,2µg de éste y 30µg del extracto total. Se realizó densitometría de las bandas obtenidas usando el software QuatityOne® (BioRad). La intensidad se normalizó por microgramo de proteína.

4.2.2.2 Caracterización bidimensional de proteomas enriquecidos en proteínas de membrana: Los extractos enriquecidos en proteínas de membrana se sometieron a separación 2DE usando las condiciones anteriormente descritas, literal 4.2.1.2. En

este caso se usaron 300µg de proteína para cada línea celular. Este ensayo se realizó por duplicado.

4.2.2.3 Análisis multidimensional de proteomas enriquecidos en proteínas de membrana: Una alícuota de 20µg del extracto enriquecido de cada línea se separó por SDS – PAGE, por duplicado, en un gel de 12,5% y 7cm, se aplicó una diferencia de 100V para lograr la separación electroforética. Se realizó tinción siguiendo el protocolo de Blue Silver [99], el cual ofrece una sensibilidad similar a la obtenida por tinción con plata. Se realizó el análisis de imágenes por Quantity One® (BioRad). A partir del análisis de imágenes, cada carril correspondiente a la separación del extracto de las líneas celulares se dividió en partes iguales y se realizó el tratamiento para la digestión tríptica de las proteínas, siguiendo el protocolo de digestión en gel establecido por Shevchenko, *et al*., [100]. En breve, los fragmentos de gel se decoloraron con acetonitrilo (ACN) 50% y NH_4HCO_3 10mM, deshidratados con ACN para ser reducidos con DTT 10mM durante 30 minutos seguido por alquilación con yodoacetamida 55mM durante 30 minutos, previa deshidratación. Cumplido este tratamiento los fragmentos se incubaron con tripsina 12,5ng/µL (Trypsin Gold, Grado espectrometría de masas, Promega) durante 16 horas. Cumplido este periodo, los péptidos se recuperaron y se llevaron a sequedad.

A continuación, se realizó una separación cromatográfica en fase reversa con gradiente de elución tipo agua – acetonitrilo. Todos los espectros de masas se adquirieron usando un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo – TOF (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester UK) acoplado al cromatógrafo líquido y equipado con una fuente nano Z - spray operando en modo iónico positivo. Las condiciones de ionización usadas incluyeron un voltaje capilar de 2,3kV, un voltaje de cono y lentes RFI de 30 V y 100V, respectivamente y una energía de colosión de 10eV. La temperatura de la fuente fue de 80ºC y el cono de gas fue establecido con N_2. Se usó Argón en la celda de colisión.

Este análisis se adelantó en colaboración con el Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ/Rede Proteômica de Rio de Janeiro, dirigido por el profesor Gilberto Domont en Rio de Janeiro, Brasil.

4.2.3 Análisis Bioinformático

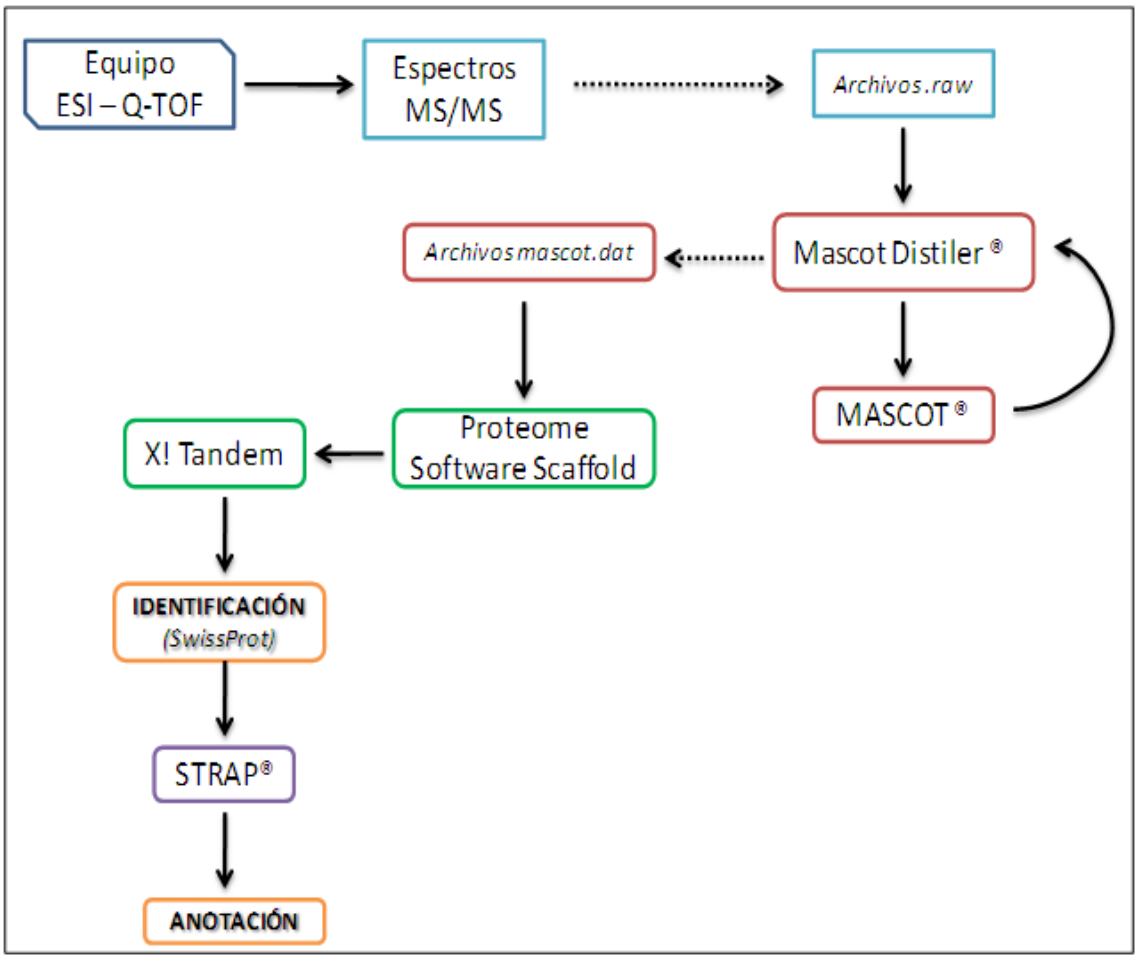
4.2.4.1 Análisis de imágenes: La densitometría de bandas provenientes de los ensayos de western blot se analizaron usando el software QuantyOne® (BioRad). Las imágenes obtenidas de cada uno de los proteomas se analizaron usando el software PDQuest Advance 8.0.1 (BioRad) para estimar el número de porteínas por gel, porcentaje de apareamiento y reproducibilidad del método que se consideró satisfactorio por encima de 70%. La expresión diferencial de proteínas se consideró a partir de una diferencia de por lo menos ±3,0 veces la intensidad.

4.2.4.2 Análisis de espectros MS/MS: Los espectros de masas tipo MS/MS de cada línea celular, obtenidos a partir del análisis multidimensional de las seis fracciones de mayor peso molecular, se analizaron usando el software libre MASCOT® para obtener archivos tipo mascot .dat que posteriormente se procesaron con el Proteome Software Scaffold (http://www.proteomesoftware.com), que facilita la organización, validación e interpretación de datos de espectrometría de masas, permitiendo identificar un mayor número de proteínas en cuanto considera incluso los espectros que no son asignados en MASCOT®. Scaffold usa algoritmos estadísticos Bayesianos desarrollados por el *Institute for Systems Biology*. Las implementaciones de estos algoritmos han sido ampliamente distribuidas bajo los nombres de PeptideProphet™ y ProteinProphet®. Usando una implementación independiente de estos algoritmos, Scaffold determina las distribuciones de los score de Mascot o SEQUEST, que dependen del tamaño de la base de datos y de las características específicas de la muestra. A partir de estas distribuciones, Scaffold traduce los scores Mascot o SEQUEST en probabilidades que determinan la confiabilidad de la identificación. El método usado por Scaffold suplementa al de Mascot, en cuánto este último proporciona un estimado de la probabilidad basado en el tamaño de la base de datos, pero no de las características de la muestra. Por incorporación de la distribución específica de la muestra, Scaffold permite un mejor estimado de la probabilidad de una correcta identificación. Adicionalmente, provee un algoritmo denominado X! Tandem que permite una identificación automática y rápida de péptidos con cualquier modificación post-traduccional y por tanto aumenta la probabilidad de identificación.

Luego de obtener la asignación peptídica, se realizó un análisis automático de las anotaciones para cada una de las proteínas identificadas usando el software STRAP® (Software Tool for Researching Annotations of Proteins)[101], herramienta bioinformática que obtiene automáticamente los términos GO (gene ontology)

asociados con proteínas en los resultados de identificación proteómica, usando las bases de datos de acceso libre UniProtK y EBI GOA. De esta manera permite, realizar la anotación automática y visualización de los datos proteómicos. En la figura 7 se presenta un resumen del flujo de información conducente a la identificación y anotación de proteínas

Figura 7. Diagrama de flujo de información para identificación y anotación de proteínas



4.2.4 Análisis Estadístico

Los datos de los resultados experimentales se evaluaron mediante el test-T de Student utilizando el programa XLSTAT Software (http://www.xlstat.com/es/home/). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

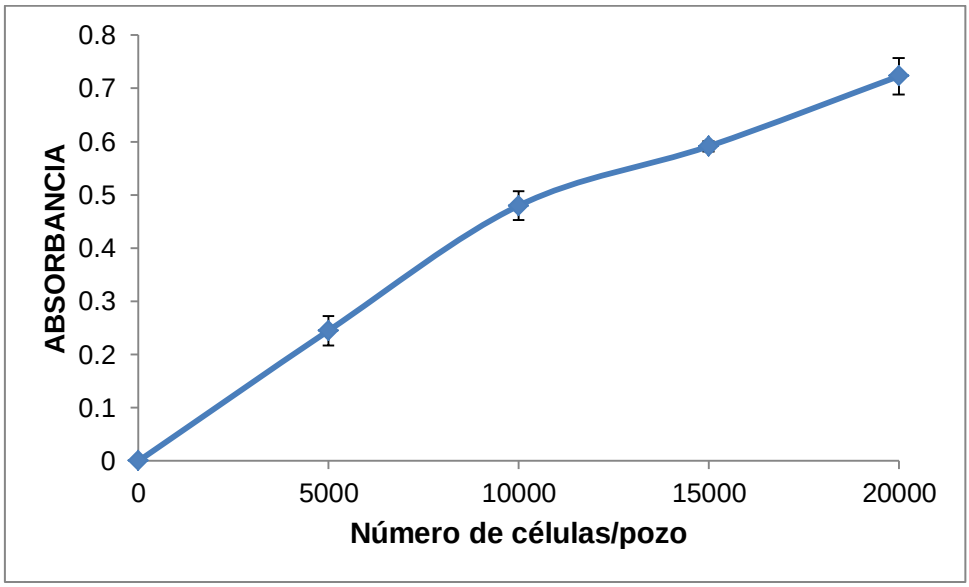
5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS LÍNEAS CELULARES

5.1.1 Ensayo de Proliferación Celular

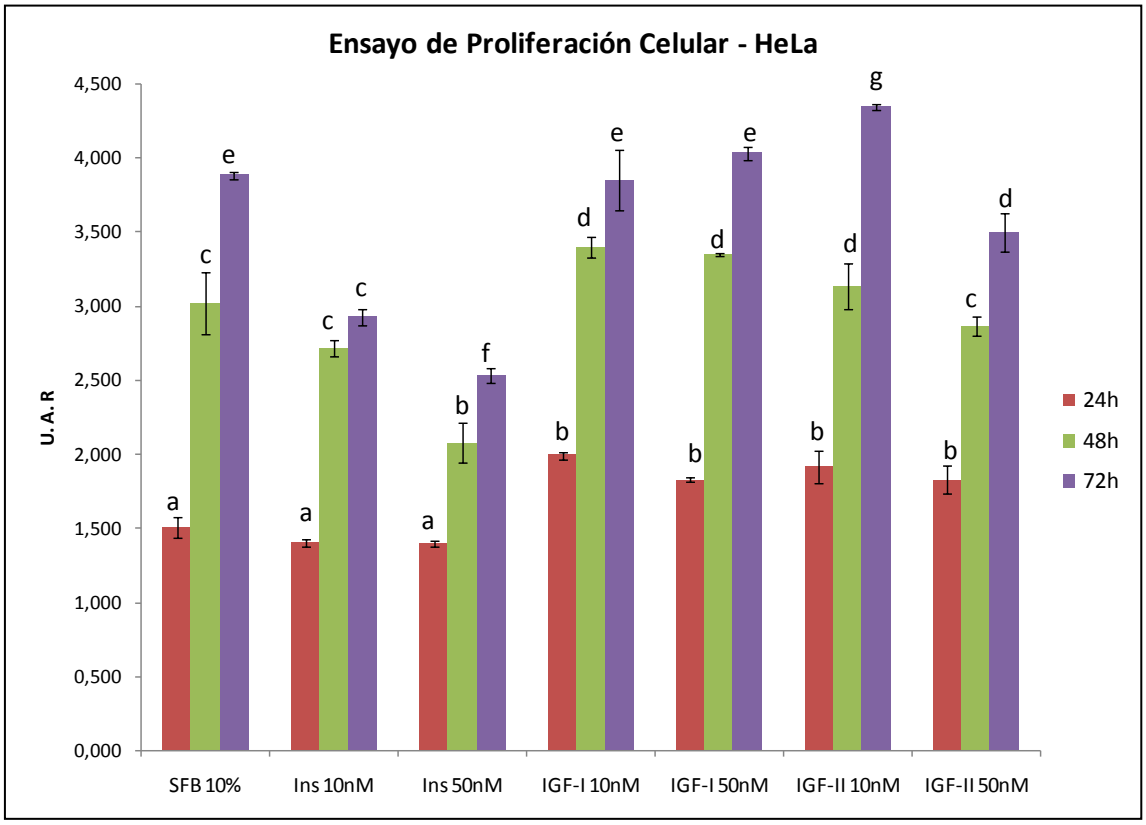
Para evaluar el efecto de la estimulación por los ligandos del sistema IGF sobre la tasa de proliferación celular, se realizó un ensayo de MTT para la línea celular HeLa. En primer lugar se evaluó la concentración celular inicial óptima, para tal efecto la línea celular HeLa se cultivó a diferentes concentraciones 5000, 10000, 15000 y 20000 células/pozo y se determinó la absorbancia asociada a dicha concentración como se muestra en la figura 8. De acuerdo a lo obtenido, se decidió realizar los ensayos con una concentración inicial de 10000 células/pozo correspondiente a una absorbancia promedio de 0,480, ubicado en el rango de absorbancia dentro de los parámetros de linealidad de Lambert – Beer y asumiendo el aumento de absorbancia por crecimiento de la población celular en el tiempo de duración del ensayo de proliferación.

Figura 8. Población celular inicial óptima para el ensayo de proliferación en HeLa. *Evaluación espectrofotométrica a 650nm/570nm de distintas concentraciones celulares: 5000, 10000, 15000 y 20000 células/pozo*



Conocida la concentración celular inicial se realizó un ensayo donde se evaluó el efecto de la estimulación por insulina, IGF-I e IG-II en concentraciones de 10nM y 50nM, usando como control células creciendo en SFM y en medio completo (SFB10%). La tasa de proliferación se evaluó durante tres días cada 24 horas. En la figura 9 se presenta la gráfica del ensayo de proliferación de HeLa, las barras corresponden a los datos normalizados contra el control SFM de cada tiempo.

Figura 9. Efecto del sistema IGF en proliferación celular de la línea celular HeLa. *Se sembraron 10000células/pozo sometidas a estimulación con insulina (Ins), IGF-I e IGF-II en dosis de 10nM y 50nM. Control positivo: SFB 10%. La tasa de proliferación se evaluó cada 24 horas durante 3 días. Las barras corresponden a los datos normalizados contra el control, células creciendo en SFM de cada tiempo. Las letras sobre las barras indican diferencia significativa respecto al control. Barras con la misma letra no hay diferencia significativa. Datos mostrados ±SEM, considerados como significativos p<0,05*



La tasa de proliferación muestra un comportamiento dependiente al tiempo, no así respecto a la dosis usada de cada ligando. IGF-I e IGF-II estimulan de manera clara la proliferación en esta línea celular, sin embargo, no presentan una diferencia

significativa entre las 24 y las 48 horas, para cada una de las dosis usadas. El mayor aumento en la tasa de proliferación se presenta a las 72h por acción del IGF-II 10nM, 4,35 veces respecto al control, superando de manera significativa incluso el estimulo inducido por el SFB 10%.

5.1.2 Ensayo de Migración e Invasión Celular

5.1.2.1 Ensayo de Migración Celular

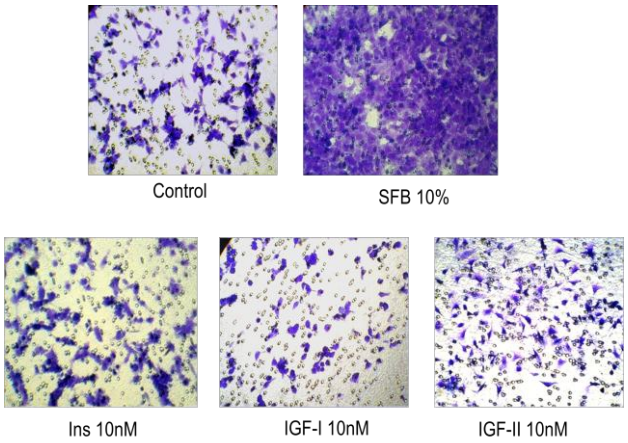
La migración celular se evaluó mediante cámaras de Boyden, usando una concentración celular de 200000 células/pozo. La capacidad quiomioatrayente de cada ligando del sistema IGF se estableció a una concentración de 10nM y se mantuvo como control SFM para migración basal y medio completo como control positivo. Las células capaces de migrar en respuesta al estímulo quedan atrapadas en la membrana del inserto, donde, son teñidas con cristal violeta para su visualización, posteriormente, se realiza una solubilización de la tinción captada por las células con DMSO y se efectúa una lectura espectrofotométrica a 595nm. En la figura 10 se muestra la fotografía de un campo representativo para cada estímulo y la migración promedio establecida según la absorbancia a 595nm.

La línea celular HeLa exhibió una alta capacidad de migración al ser estimulada con SFB 10% lo que concuerda con la literatura. A nivel del estímulo por parte de los ligandos del sistema IGF, se observa que únicamente IGF–I e IGF–II promueven de manera significativa la migración en esta línea celular. Si bien, las diferencias a nivel de absorbancia no son estadísticamente significativas entre dichos ligandos, puede notarse en las fotografías (Figura 10 A) que IGF–II promueve la migración de un mayor número de células que IGF-I, lo que concuerda con la tendencia observada en la gráfica (Figura 10 C). De tal manera, puede sugerirse a IGF-II como el ligando del sistema IGF que promueve el mayor índice de migración en HeLa.

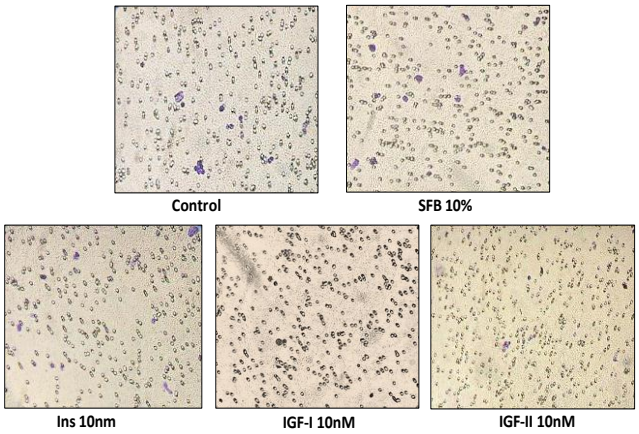
Por su parte C33-A no presenta un incremento estadísticamente significativo del índice de migración al ser estimulada con los ligandos, cómo también puede corroborarse con las fotografías en la figura 10 B.

Figura 10. Ensayos de Migración de las líneas HeLa y C33-A. *Fotografías de un campo representativo 20X. Muestra las células que lograron migrar inducidas por la acción de cada ligando y control teñidas con cristal violeta 1%. A. HeLa B. C33-A C. Migración promedio determinada espectrofotométricamente a 595nm. Datos mostrados ±SEM, considerados como significativos p<0,05*

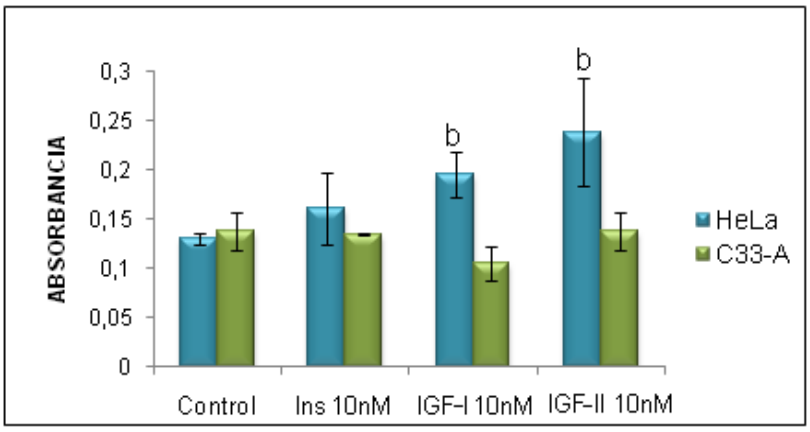
A.



B.



C.



5.1.2.2 Ensayo de Invasión Celular

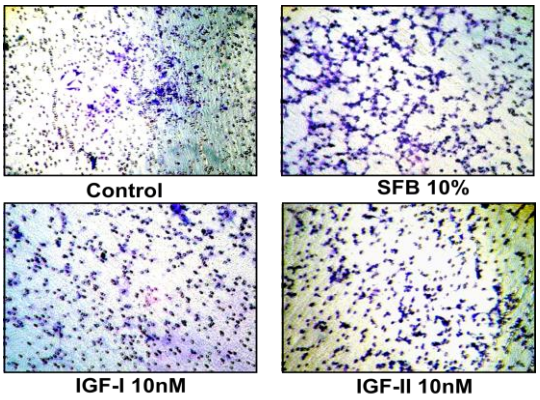
La invasión celular se evaluó usando cámaras de Boyden recubiertas con Geltrex™ y una concentración de 200000 células/pozo de cada línea celular. Se evaluó la respuesta invasiva por estimulación con IGF-I e IGF-II en una concentración de 10nM y se mantuvo como control SFM para evaluar el índice de invasión basal. De manera similar al ensayo de migración, las células que invadieron se tiñeron con cristal violeta sobre la membrana del inserto. En la figura 11 se muestra un campo representativo de cada tratamiento para las líneas celulares y la invasión promedio establecida por lectura espectrofotométrica a 595nm.

La línea celular HeLa exhibió una capacidad invasiva mucho mayor que C33–A. La invasión basal de HeLa fue 1,8 veces mayor que la de C33-A, relación que se mantuvo cercana a este valor en los demás estímulos (SFB 10%: 1,8 veces; IGF-I: 2,3 veces; IGF-II: 1,6 veces). HeLa mostró un comportamiento altamente invasivo promovido por SFB 10%, dado que puedo observarse microscópicamente grupos de células viables adheridas en el fondo del pozo de cultivo al cabo de las 24 horas de estímulo, lo que está en concordancia con lo reportado en literatura[71].

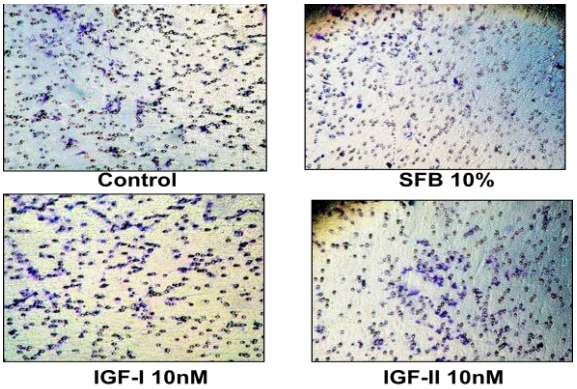
IGF-II fue el único ligando que estimuló un incremento en la invasión de manera significativa en cada una de las líneas celulares, con índices de invasión de 1,1 y 1,2 para HeLa y C33-A, respectivamente.

Figura 11. Ensayos de Invasión de las líneas HeLa y C33 –A. *Fotografías de un campo representativo 20X. Muestra las células que lograron invadir a través del Geltrex™ estimuladas por la acción de IGF-I, IGF-II y controles, teñidas con cristal violeta 1%. A. HeLa B. C33-A C. Invasión promedio determinada espectrofotométricamente a 595nm.Letras a,b representan diferencias significativas entre tratamientos con el control dentro de cada línea celular y c diferencias significativas entre mismos tratamientos entre líneas celulares. Datos mostrados ±SEM, considerados como significativos p<0,05*

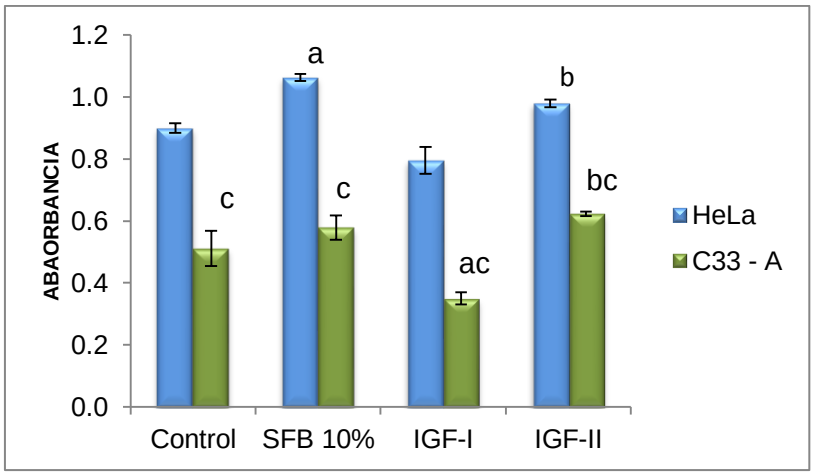
A.



B.



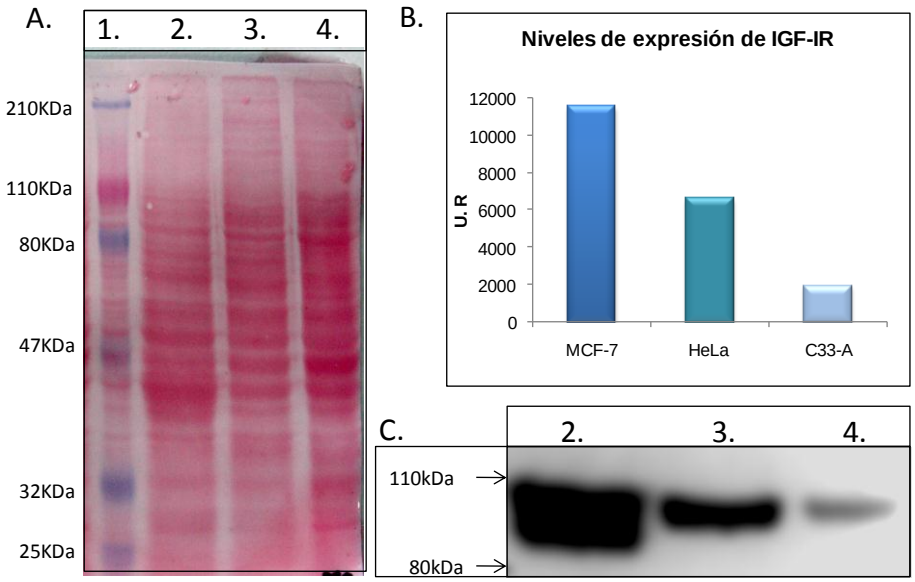
C.



5.1.3 Evaluación de los niveles de expresión del receptor del sistema IGF tipo I

La expresión de proteína del receptor IGF tipo I (IGF-IR) se evaluó mediante western blot. Se separaron por electroforesis tipo SDS-PAGE 50µg de proteína total de HeLa, C33-A y MCF-7, una línea celular de cáncer de seno usada como control, dado que sobre expresa éste receptor como ha sido reportado ampliamente en la literatura[102]. En la figura 12 se muestra el patrón de separación electroforética obtenido y el western blot para el receptor IGF-IR.

Figura 12. Evaluación de los niveles de expresión de IGF-IR de las líneas celulares en estudio. *1: Marcador de peso molecular 2: MCF-7 3: HeLa 4: C33-A. A. Patrón de separación electroforética visualizado mediante la tinción irreversible rojo Ponceau. B. Densitometría correspondiente a los niveles de expresión relativa de IGF-IR en cada línea celular C. Western blot contra IGF-IR*



Como puede verificarse en la figura 12A se separó la misma cantidad de proteína para cada una de las líneas celulares. La línea celular Hela exhibió la mitad de los niveles de expresión del receptor presentes en MCF-7 pero fue 3,4 veces superior a los presentados por C33-A (Figura 12B-C)

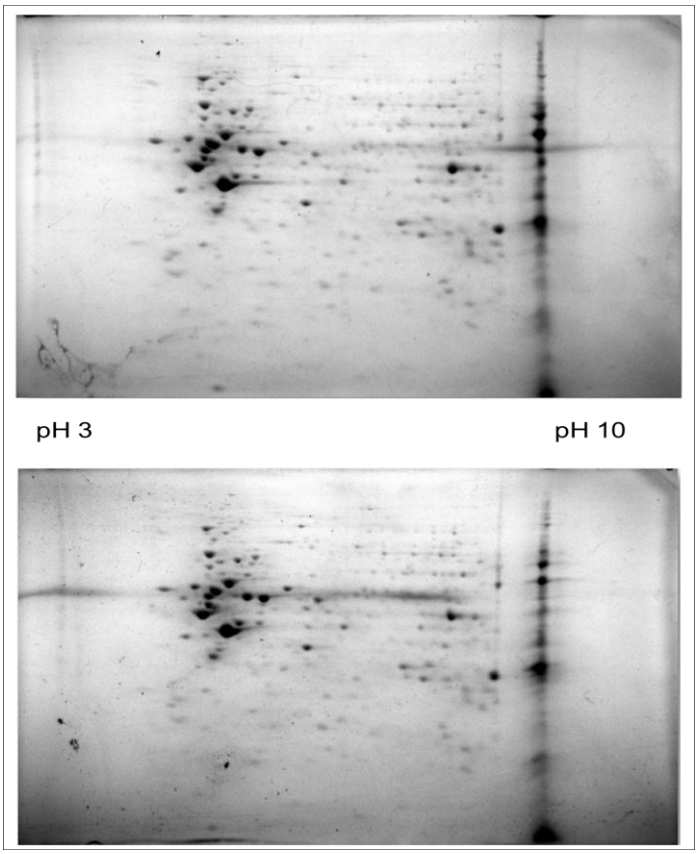
5.3 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS LÍNEAS CELULARES

5.3.1 Caracterización del proteoma general

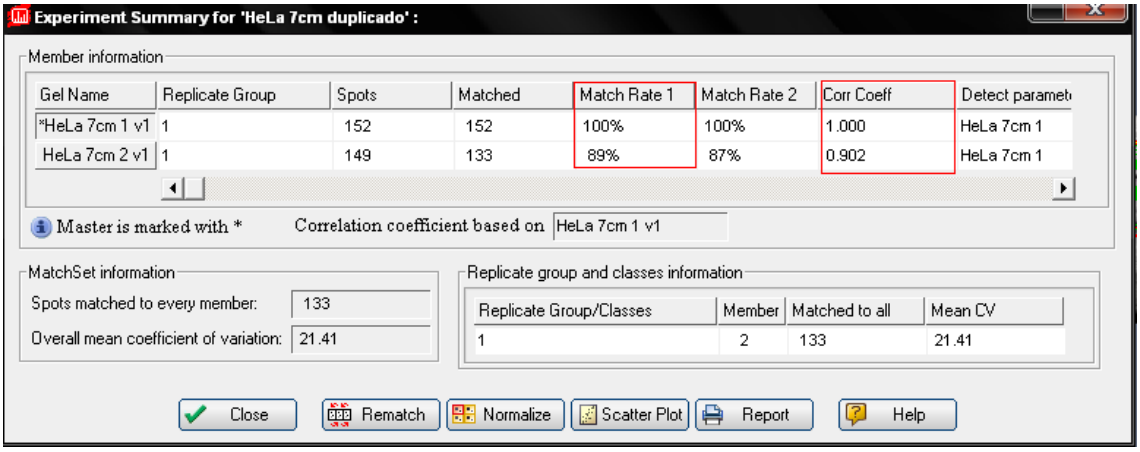
En primer lugar, se evaluaron las condiciones de isolectroenfoque, electroforesis SDS-PAGE y la reproducibilidad del protocolo aplicado. Para tal fin se realizó la separación de 120µg de proteína total de HeLa en tiras de 7cm con un gradiente de pH no lineal de 3 – 10. En la figura 13 se presentan los duplicados del proteoma obtenido.

Figura 13. Evaluación del protocolo de separación bidimensional. Duplicado de la *separación bidimensional de 120µg de proteína total de HeLa en tiras de 7cm con gradiente no lineal de 3 – 10 y geles de poliacrilamida del 12%. Tinción Coomassie Coloidal G-250 A. Duplicado de proteomas B. Reporte de comparación del análisis mediante el software PDQuest Advance 8.0.1 (BioRad)*

A.



B.

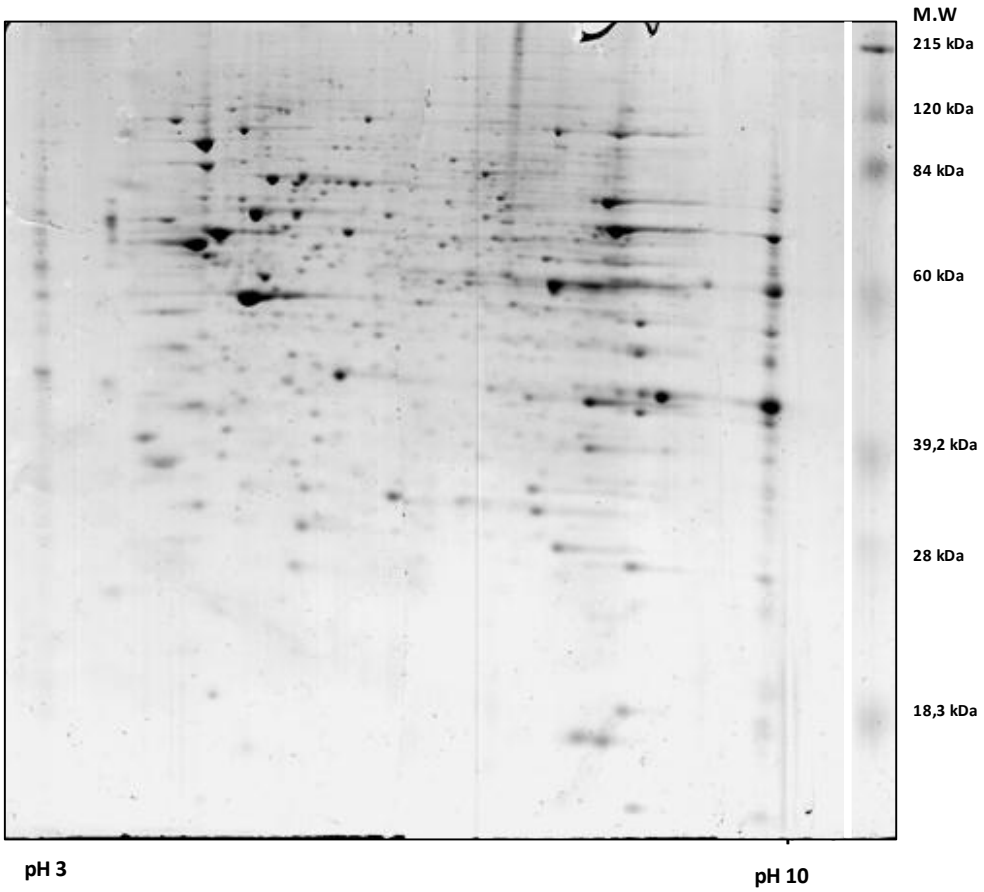


Puede observarse en la figura 13 A que el isoelectroenfoque y separación en segunda dimensión se logró de manera efectiva. El análisis de imágenes efectuado mediante el programa PDQuest Advance 8.0.1 (BioRad) permitió detectar 152 spots y 149 spots para cada gel con un porcentaje de apareamiento entre los geles del 89% (recuadro en la figura 13B). Este resultado indica que el protocolo de separación y su reproducibilidad es satisfactorio.

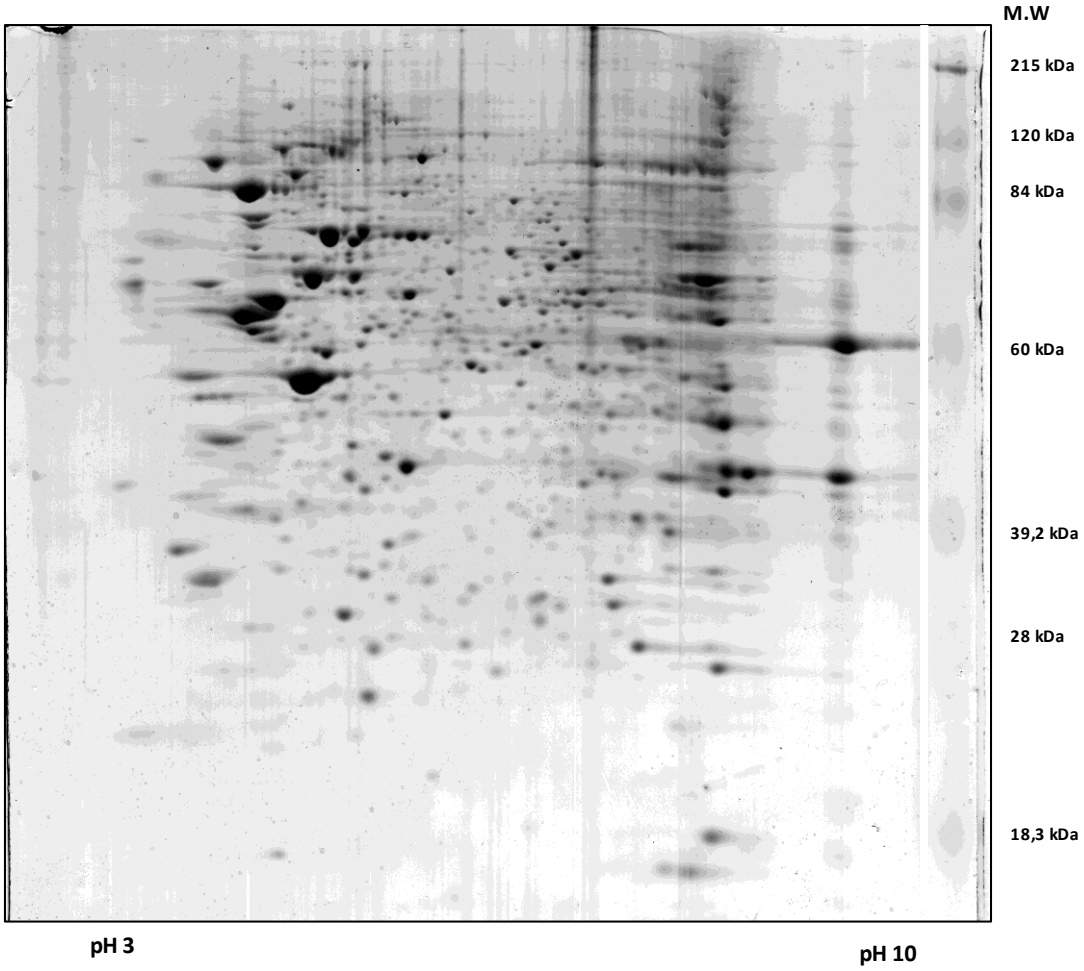
Dado que el proceso de optimización de las condiciones de separación bidimensional fue efectivo, se procedió a aplicar el protocolo en un formato más grande que permite una mayor resolución y de ésta forma, evaluar los perfiles de expresión de proteínas de las líneas celulares en estudio. Para ello, se realizó una extracción de proteína total con buffer RIPA y se separaron 500µg de proteína en dos dimensiones. En la figura 14 se muestran los proteomas de la línea celular HeLa y C33-A, respectivamente.

Figura 14. Perfiles proteómicos bidimensionales de las líneas celulares HeLa y C33-A. *Se separó un total de 500µg de proteína de cada línea celular en geles de poliacrilamida del 12% de 18cm y gradiente de pH 3-10 no lineal. Tinción Coomassie Coloidal G-250 A. HeLa B. C33-A*

A. HeLa



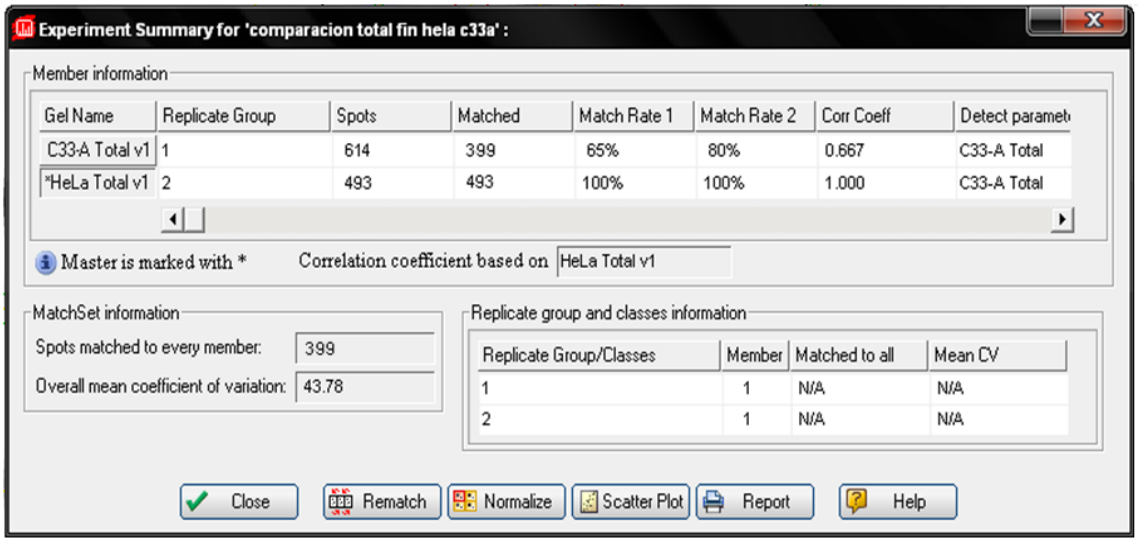
B. C33-A



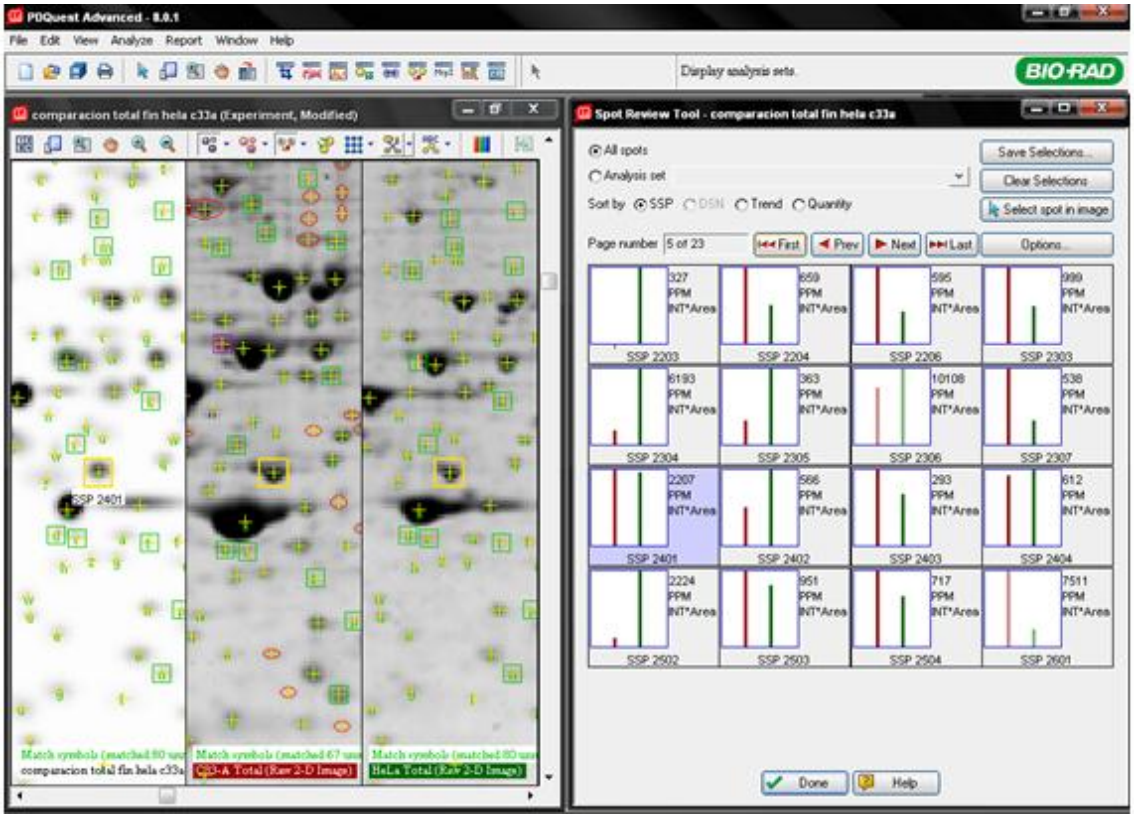
Puede observarse una excelente separación de la proteína en las dos dimensiones. Usando el software PDQuest Advance 8.0.1 (BioRad) se detectaron 614 spots y 493 spots en el proteoma general de C33-A y HeLa, respectivamente, como puede observarse en la figura 15 donde se presenta el reporte del experimento. Se encontraron 399 spots comunes a los dos proteomas, dando un porcentaje de apareamiento del proteoma de HeLa respecto al de C33-A de un 80%. En la figura 15B puede observarse con detalle una de las secciones de los geles donde es posible evidenciar la similitud de los proteomas de las líneas celulares. El recuadro de la parte derecha muestra una comparación en términos de la intensidad de cada spot, en rojo C33-A y en verde HeLa, donde se observan tanto spots con la misma intensidad como con intensidad similar.

Figura 15. Comparación entre los proteomas generales de HeLa y C33-A. A. *Reporte del experimento B. Detalle de la comparación en una sección de los proteoma. La ventana 1 corresponde al gel máster que genera una imagen virtual con los parámetros de comparación, la ventana 2 corresponde al proteoma de C33-A y la 3 al proteoma de HeLa. A la derecha aparece el recuadro de comparación de intensidad relativa de cada spot. Se subraya en azul el análisis de intensidad del spot encerrado en un recuadro amarillo en cada uno de los proteomas.*

A.

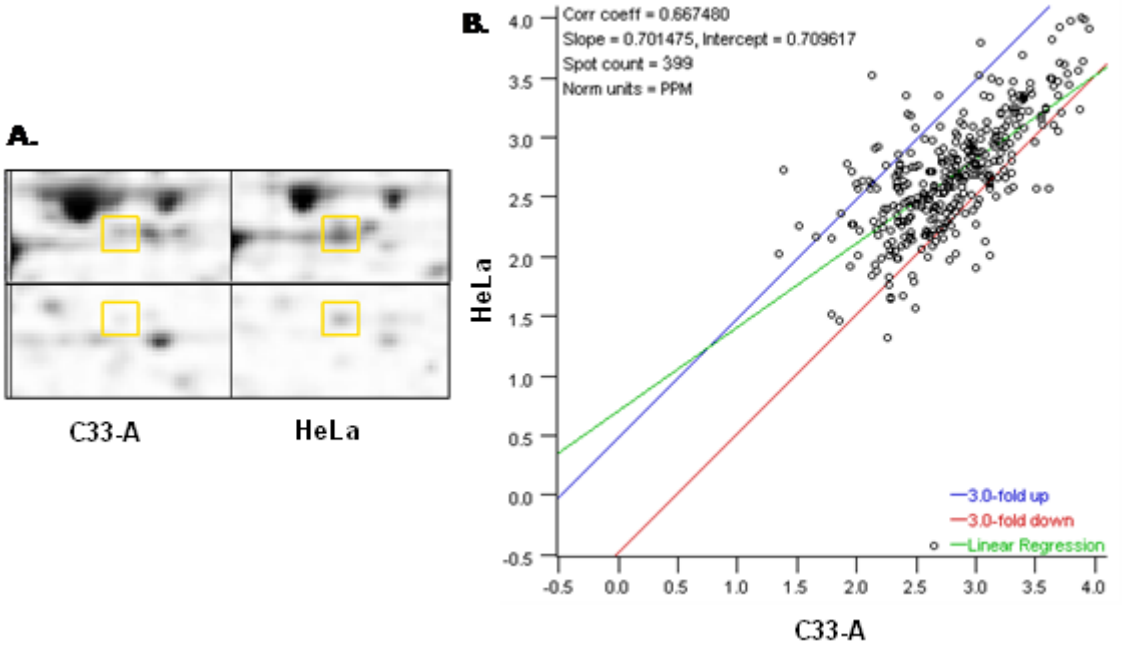


B.



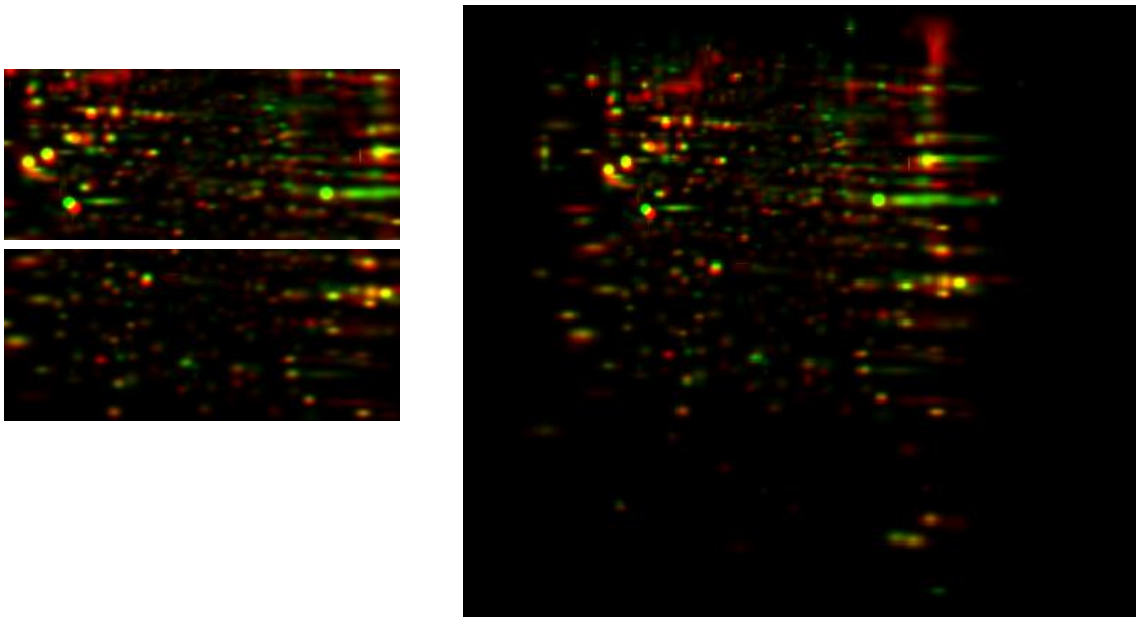
Se efectuó una cuidadosa revisión manual de cada spot para asegurar que el apareamiento se asignó de manera correcta. El análisis de imágenes permitió establecer un total de 46 proteínas expresadas diferencialmente con una diferencia de por lo menos 3,0 veces entre las líneas celulares. En la figura 16 se muestra una gráfica de distribución de la expresión diferencial de proteínas. Donde los spots ubicados dentro de la franja azul y roja presenta una intensidad similar que es mayor en cuanto más cercanos se encuentren los spots a la línea de regresión. Los spots sobre la línea azul y debajo de la línea roja presentan una diferencia en intensidad de 3 veces, de HeLa respecto a los de C33-A.

Figura 16. Proteínas diferencialmente expresadas. *A. Detalle de proteínas diferencialmente expresadas. B. Curva de dispersión de la expresión diferencial de proteínas. Los puntos sobre la línea azul y debajo de la roja indica los proteínas diferencialmente expresados por mínimo 3 veces.*



Adicionalmente en la figura 17 se presenta una imagen de los proteomas superpuestos que permite visualizar de manera general el nivel de correlación entre los proteomas. En rojo se muestra el proteoma de C33-A y en verde el proteoma de HeLa, en amarillo zonas que se sobreponen.

Figura 17. Imagen superpuesta de los proteomas de cada una de las líneas celulares. *En rojo proteoma C33-A. En verde HeLa y en amarillo zonas que se sobreponen. Se muestra el detalle de la imágen*

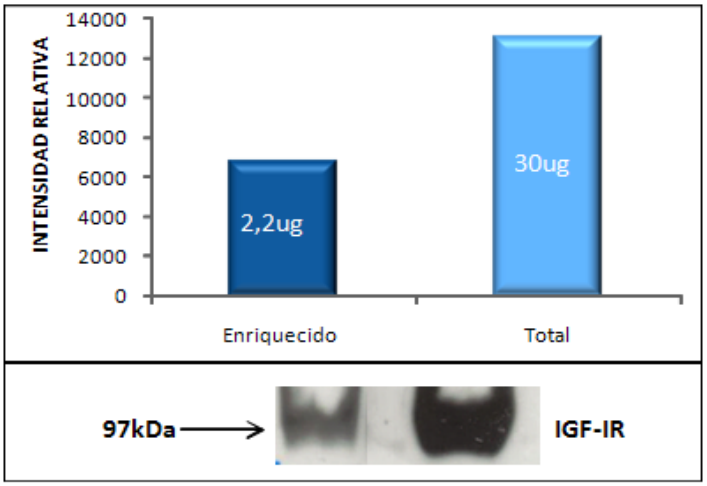


5.3.2 Análisis comparativo de los proteomas de extractos enriquecidos en proteínas de membrana

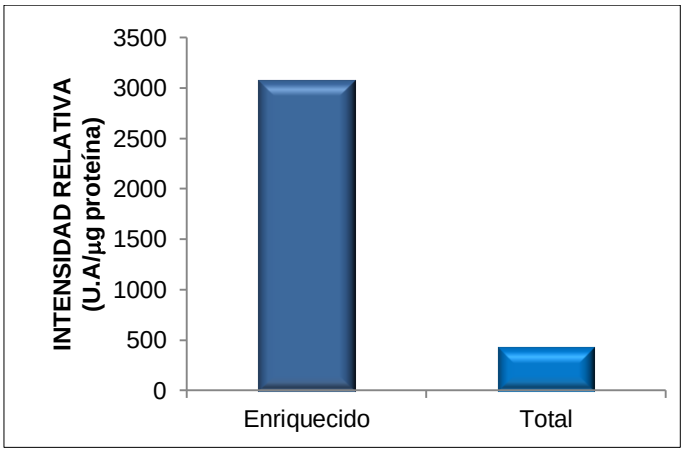
5.2.2.1 Verificación del enriquecimiento en proteínas de membrana: Con el objetivo de caracterizar los subproteomas de membrana de cada una de las líneas celulares, se realizó un enriquecimiento en proteínas de membrana mediante cromatografía de afinidad tipo biotina – avidina, usando el kit Pierce Cell Surface Protein Isolation (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). Para verificar el enriquecimiento en proteínas de membrana se realizó un western-blot contra el receptor IGF-IR. En la figura 18 se muestra el western blot contra el receptor y la comparación entre la intensidad obtenida en extracto total y enriquecido, normalizada respecto a la cantidad de proteína, este ensayo se realizó con proteína obtenida de la línea celular HeLa.

Figura 18. Verificación del enriquecimiento en proteínas de membrana. *A. Western-blot receptor IGF-IR de extracto total (30µg) y enriquecido (2,2µg) de la línea celular HeLa. B. Normalización de intensidad frente a cantidad de proteína cargada.*

A.



B.

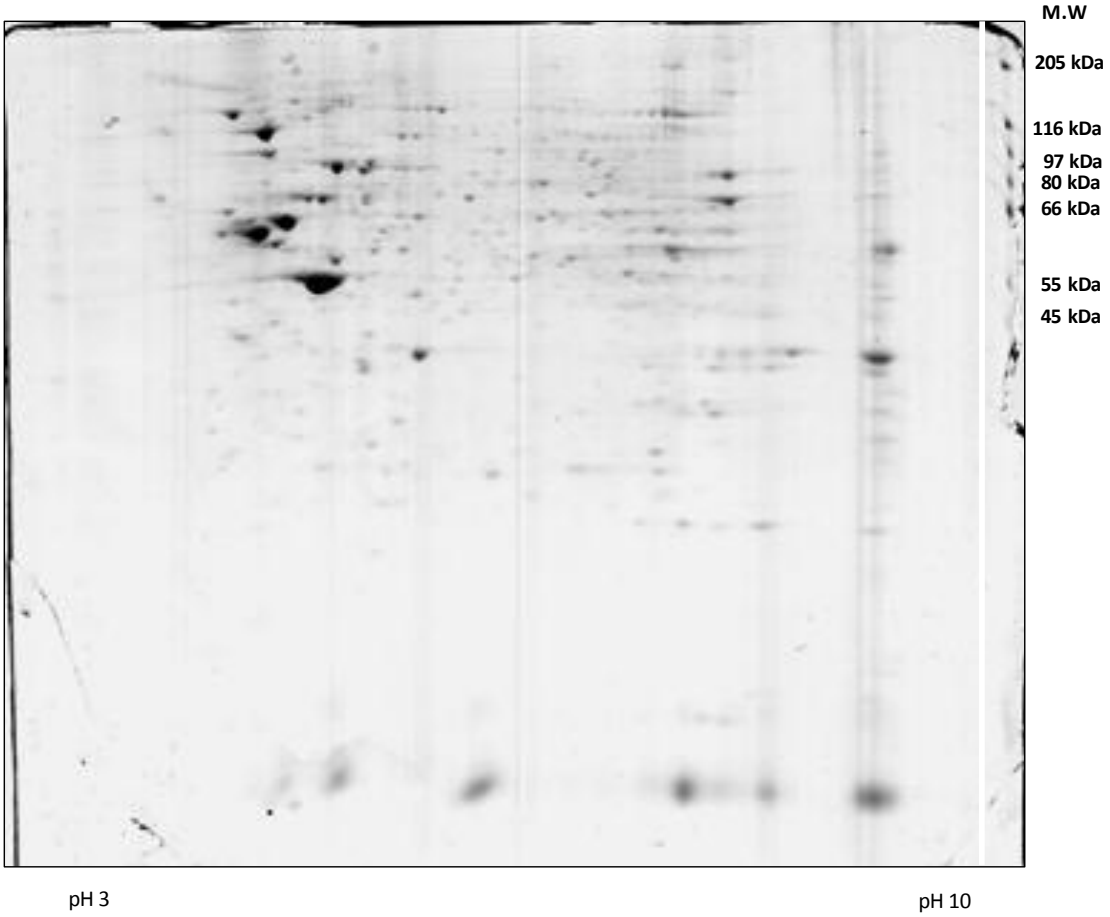


Dado que la cantidad de extracto enriquecido era limitado, se sembraron 2,2µg frente a 30µg del extracto total. Se realizó densitometria de las bandas obtenidas, usando el software QuantityOne® (BioRad). La figura 18A muestra la intensidad de cada banda de acuerdo a la cantidad de proteína. Sin embargo, como se observa en la figura 18B, al normalizar intensidad frente a la cantidad de proteína, se hace evidente el enriquecimiento que corresponde a un aumento de 7 veces de la intensidad por microgramo de proteína entre el extracto enriquecido y el total.

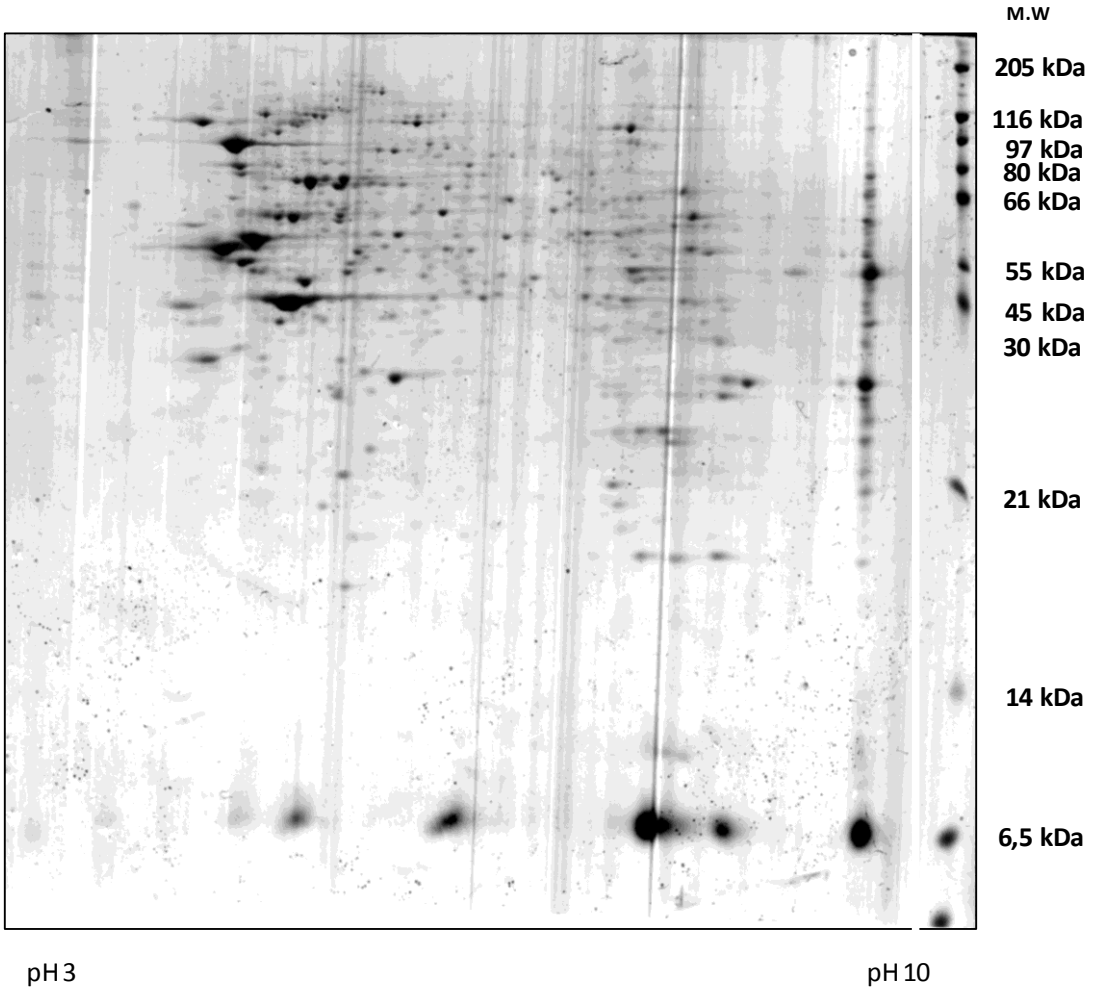
5.2.2.2 Caracterización bidimensional de proteomas enriquecidos en proteínas de membrana: Con el fin de comparar el perfil de expresión de proteínas de membrana se separaron 300µg del extracto enriquecido mediante electroforesis bidimensional usando un gradiente de pH no lineal de 3 a 10 en geles de poliacrilamida al 12% siguiendo el protocolo que se describe en la metodología. En la figura 19 se muestran los proteomas obtenidos para cada una de las líneas celulares.

Figura 19. Perfil proteómico de extractos enriquecidos en proteínas de membrana. *Separación de 300µg de extracto enriquecido mediante electroforesis bidimensional usando un gradiente de pH no lineal de 3 a 10 en geles de poliacrilamida al 12%. Tinción Coomassie Coloidal G-250 A. HeLa B. C33-A*

A.



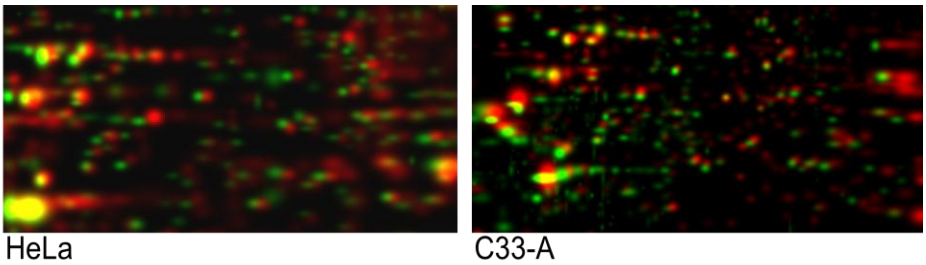
B.



Al comparar la figura 14 correspondiente a los proteomas generales con la figura 19 del proteoma enriquecido en proteínas de membrana, puede apreciarse una reducción de la complejidad del proteoma en cuánto se logra una mayor resolución de la zona de alto peso molecular. Mediante el análisis de imágenes similar al realizado para los proteomas generales mediante el software PDQuest Advance 8.0.1 (BioRad), se logró establecer un porcentaje de apareamiento del 41% con un total de 207 spots comunes entre los proteomas en la línea celular HeLa, en cuánto a C33-A se determina un apareamiento del 43% con un total de 170 spots comunes. En la figura 20 se presenta una zona de los proteomas general y enriquecido superpuestos, para cada línea celular independiente, en rojo el proteoma general, en verde el enriquecido y en amarillo los spots superpuestos. Puede verificarse como en el proteoma enriquecido en proteínas de membrana se presentan spots que en el proteoma general no fueron visibles (spots verdes).

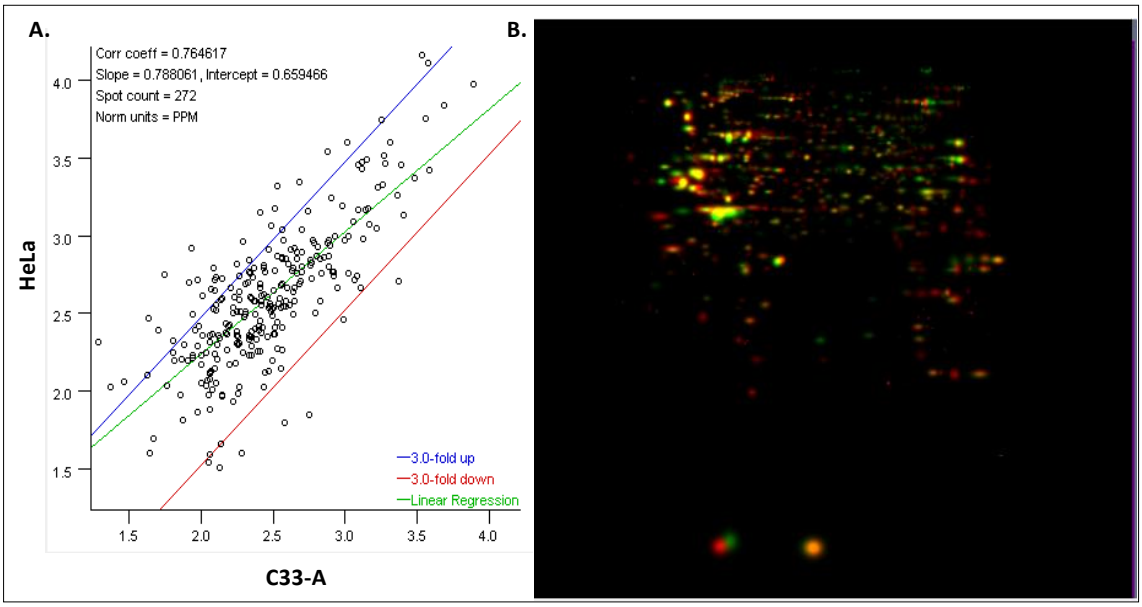
Figura 20. Comparación proteoma general y enriquecido en proteínas de membrana. *A. Detalle de una zona de los proteomas general y enriquecido superpuestos, para cada línea celular independiente. En rojo el proteoma general, en verde el enriquecido y en amarillo los spots superpuestos*

A.



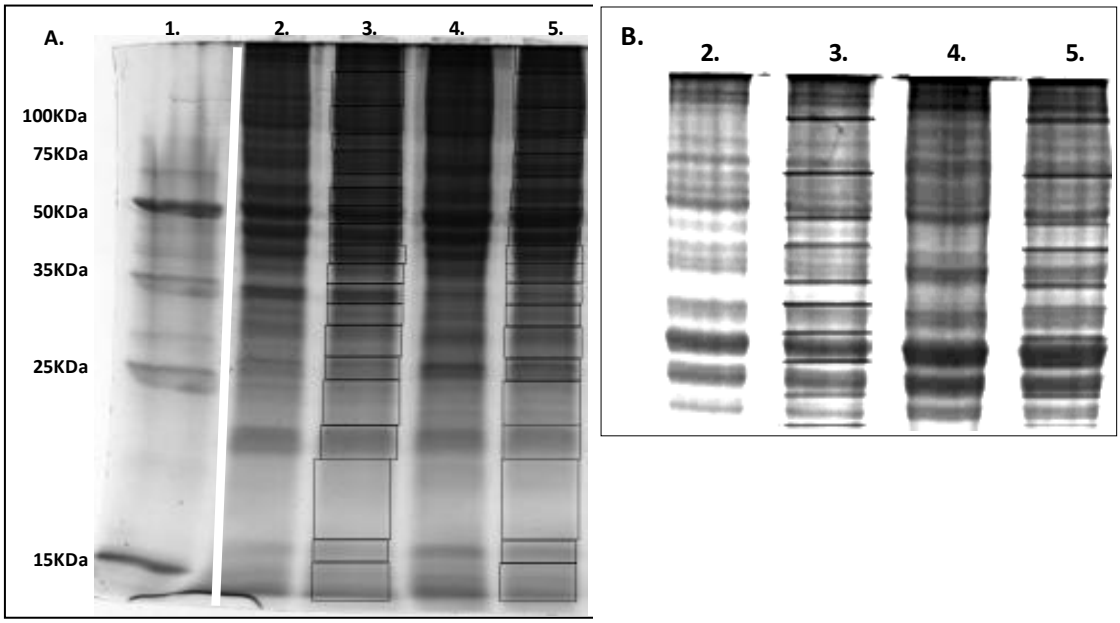
Por último se realiza una comparación entre los proteomas enriquecidos de las líneas celulares. Se establece un porcentaje de apareamiento del 58% con un total de 272 spots comunes. Por otro lado, se encontraron 86 proteínas expresadas diferencialmente con al menos una diferencia de 3 veces. En la figura 21 se muestra la curva de dispersión de expresión diferencial de spots y la imagen superpuesta de los proteomas donde rojo corresponde a C33-A, verde a HeLa y amarillo a los spots apareados.

Figura 21. Comparación entre los proteomas enriquecidos en proteínas de membrana de HeLa y C33-A. A. *Curva de dispersión de la expresión diferencial de proteínas B. Imagen superpuesta de proteomas enriquecido en proteínas de membrana en rojo C33-A, verde HeLa y amarillo spots apareados*.



5.2.2.3 Análisis multidimensional de proteomas enriquecidos en proteínas de membrana: La aproximación analítica multidimensional ha demostrado ser efectiva en la separación y análisis de proteínas de membrana. De acuerdo a lo anterior, se efectuó una separación electroforética de tipo SDS-PAGE de los extractos enriquecidos. A partir del análisis del patrón de separación electroforética se dividió en diez fracciones un carril de cada línea celular para someter a posterior separación por cromatografía líquida en fase reversa y análisis por espectrometría de masas. En la figura 22 se muestra el corrido electroforético de los extractos de cada una de las líneas celulares.

Figura 22. Separación tipo SDS-PAGE de extractos enriquecidos en proteínas de membrana. *Carril 1: Marcador de peso molecular, carriles 2 y 3: HeLa y carriles 4 y 5: C33-A. Los carriles 2 y 5 muestran los cortes que realizados para obtener las fracciones de análisis. La electroforesis se realizó usando geles de poliacrilamida del 12,5% y teñidos según el protocolo Blue Silver [99] B. Detalle de las primeras 10 fracciones.*



En la figura 22B se muestra una imagen aumentada de las primeras 10 fracciones donde puede observarse diferencias evidentes del patrón de separación entre la línea HeLa y C33-A, que sugiere perfiles proteómicos distintos. Las primeras seis fracciones de cada línea celular se sometieron a tratamiento para digestión tríptica, separación por cromatografía en fase reversa y análisis de masa tipo ESI-Q-TOF.

5.2.2.4 Identificación de proteínas: Como se describió en el literal anterior las seis fracciones de mayor peso molecular de cada línea celular, se analizaron por espectrometría de masas tipo ESI-Q-TOF (Q-TOF Ultima, Micromass, Manchester UK). Los archivos obtenidos del espectrómetro de masas son exportados con la

extensión .pkl que es utilizado en el software en línea MASCOT® (http://www.matrixscience.com/) opción MS/MS Ion Search, para el análisis de espectros producto de fragmentación tipo tandem y lograr la identificación de proteínas. Los parámetros usados para la identificación de las proteínas son resumidas en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de parámetros para identificación usados en MASCOT®

Parámetro	Opción Elegida
Base de datos	SwissProt
Enzima	Tripsina con la opción de una (1) ruptura inespecífica
Taxonomía	Homo sapiens (human)
Modificaciones fijas	Carbamidometilación (C)
Modificaciones variables	Oxidación (M) y oxidación (HW)
Tolerancia de error de la masa péptidica	0,5Da
Tolerancia de error de la masa de fragmentos iónicos	0,2Da
Carga peptídica	+1
Instrumento	ESI-QUAD-TOF
Número de reportes	Automático

Esta búsqueda se aplicó a cada una de las fracciones analizadas que corresponden a un archivo único micromass tipo .pkl. Los resultados obtenidos, se exportaron como archivos Mascot en extensión .dat para luego ser usados en el Proteome Software Scaffold, que facilita la organización, validación e interpretación de datos de espectrometría de masas, permitiendo identificar un mayor número de proteínas en cuanto considera incluso los espectros que no son asignados en MASCOT®.

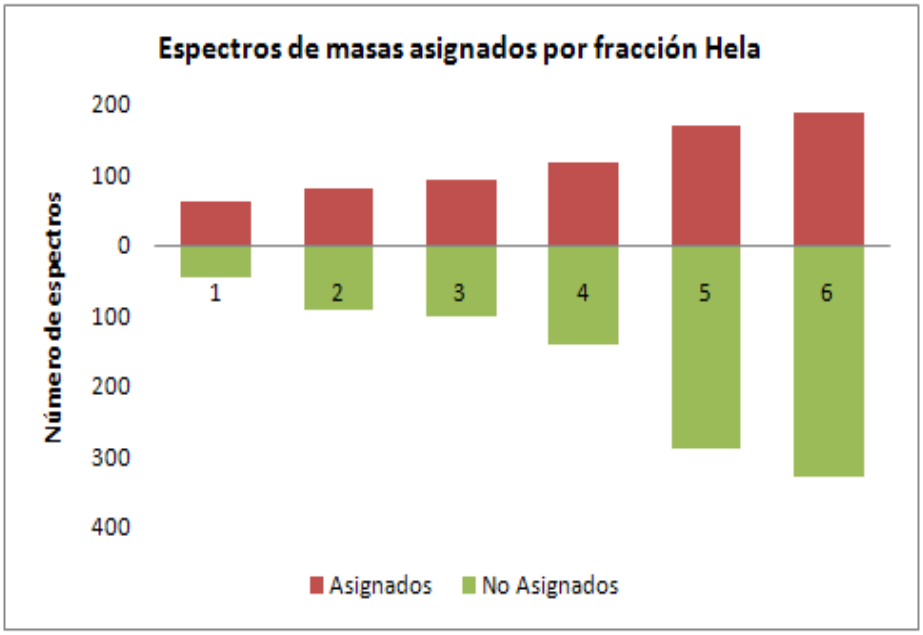
Los datos mascot.dat obtenidos para cada una de las 12 fracciones se importaron al Scaffold para generar un archivo de búsqueda único por línea celular, por ejemplo, el archivo único de búsqueda para HeLa contenía los 6 archivos mascot.dat provenientes de la búsqueda Mascot de cada fracción y se procesaron bajo la opción de análisis multidimensional.

El archivo único de búsqueda de cada línea se sometió a X! Tandem donde se consideraron 68 modificaciones post-traduccionales posibles. Tras este proceso, se identificaron 56 proteínas con un rango de probabilidad entre 80% y 100%.

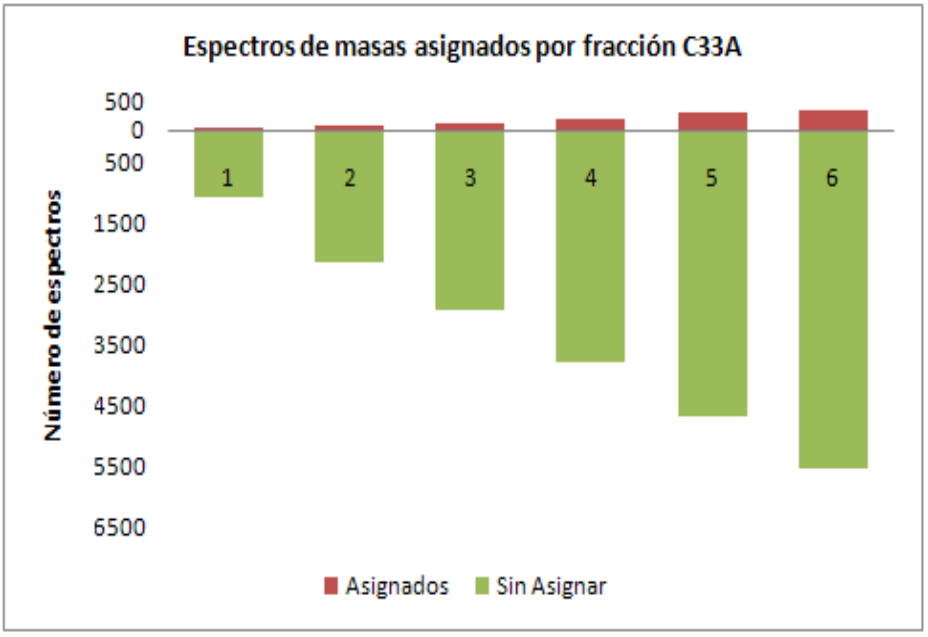
Sin embargo, no todos los espectros lograron ser identificados, de hecho una gran proporción de ellos no pudieron ser asignados. En la figura 23 se muestra la relación de los espectros asignados y los no identificados, puede evidenciarse como la mayor parte de ellos, sobre todo para el caso C33-A no pudieron ser asociados con la identificación de una proteína.

Figura 23. Espectros de masas asignados por fracción. *Cada una de las barras corresponde a las fracciones analizadas. Sobre el eje de las x se grafican los espectros asignados y debajo del eje los no asignados A. HeLa B. C33-A*

A.



B.


Espectros de masas asignados por fracción C33A
Número de espectros
500
0
500
1500
2500
3500
4500
5500
6500
1
2
3
4
5
6
Asignados
Sin Asignar

6. DISCUSIÓN

Dado que la membrana celular juega un rol central en el desarrollo de fenotipos metastáticos de células tumorales, en cuánto, media procesos de migración e invasión, en este trabajo se abordó el estudio proteómico comparativo cualitativo de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana, de dos líneas celulares de cáncer cervical con tejido de origen e índice de invasión diferentes. Este tipo de cáncer demanda una especial atención, en cuanto representa un verdadero problema de salud pública para la mujer en países del tercer mundo.

6.1. EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO II PROMUEVE PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN E INVASIÓN EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICAL

De manera particular, varias líneas de evidencia involucran ampliamente al sistema IGF en carcinogénesis y progresión tumoral en diferentes tipos celulares, sin embargo, en cáncer cervical, IGF-II más que IGF-I parece jugar un rol significativo. Por ejemplo, se ha encontrado una asociación entre la infección por VPH y elevados niveles del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R) [103]; que se correlacionó positivamente con una elevación en los niveles de IGF-II [104], por lo que la presencia de VPH estaría asociada con elevados niveles de EGF-R e IGF-II, esto en células epiteliales cervicales. Adicionalmente, se ha reportado una elevación de IGF-II circulante en mujeres con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) [14].

Oligonucleótidos antisentido para IGF-II inhibieron el efecto mitogénico inducido por EGF a través de una acción autocrina de IGF-II en la línea celular de cáncer cervical HT-3 [105]. Además, ha sido reportada que una baja regulación de IGF-IR por ARN antisentido puede revertir el fenotipo transformado en algunas líneas de cáncer cervical, incluso cuando VPH está presente [106]; estos estudios sugieren que la producción autocrina de IGF-II y la sobre-expresión de IGF-IR son importantes elementos en la regulación de la proliferación de células de carcinoma cervical[107].

Existe también evidencia que contrasta con algunos de estos resultados. En un estudio en el que se establecieron los niveles de mARN de IGF-II en muestras

citológicas cervicales, solo se encontró diferencias significativas en mujeres con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, no así, en lesión intraepitelial escamosa de alto grado o cáncer, en comparación con el grupo control[107]. Adicionalmente, trabajos anteriores adelantados en nuestro grupo han reportado que no existe una asociación directa entre los niveles séricos de IGF-I e IGF-II con la infección por VPH de alto riesgo en lesiones intraepiteliales de alto y bajo grado[108]

En este estudio se evalúo el efecto biológico de los ligandos del sistema IGF en dos líneas celulares de cáncer cervical, HeLa y C33-A, a nivel de proliferación, migración e invasión. En la línea celular HeLa, infectada con VPH tipo 18, IGF-I e IGF-II promovieron en mayor grado la tasa de proliferación, de manera dependiente al tiempo, sin embargo, no se observó una respuesta dosis – dependiente para ninguno de los péptidos. La mayor tasa de proliferación se presentó por la estimulación con IGF-II 10nM a las 72h. En cuanto a los ensayos de migración e invasión, se encuentra una mayor respuesta de las células a IGF-II.

En el caso de C33-A, una línea celular libre de infección por VPH, ha sido reportado que éstas células particularmente no presentan alguna respuesta a la estimulación por los ligandos del sistema IGF a nivel de proliferación, migración o invasión [109]. Nuestros resultados muestran que ninguno de los ligandos del eje IGF tiene un papel quimioatrayente para C33-A que pueda inducir un proceso de migración, sin embargo, a nivel de invasión, se observó un ligero aumento respecto al control, en respuesta a estimulación con IGF-II.

En este punto, debe considerarse que los ensayos de migración e invasión efectuados usando cámaras de Boyden, presentan la limitación de una baja reproducibilidad cuando se quiere realizar la medición a nivel de absorbancia, en cuanto la tinción con cristal violeta puede unirse inespecíficamente a la membrana del inserto de manera variable. Considerando lo anterior, la observación microscópica permite verificar los resultados obtenidos. Para C33-A en particular, es difícil determinar si los datos de invasión obtenidos para el tratamiento con IGF-II representan un efecto biológico real inducido por dicho ligando, dado que los datos de absorbancia se ubican en el límite de la significancia, efecto que tampoco es concluyente por la observación microscópica.

Los efectos biológicos de IGF-I e IGF-II son mediados principalmente por el receptor tipo tirosina quinasa IGF-IR, al cual cada uno de los péptidos se une con diferente afinidad [13, 22]. El nivel de expresión de éste receptor se evaluó en las líneas celulares en estudio. HeLa mostró una expresión de IGF-IR 3,4 veces mayor respecto a la de C33-A, lo que sugiere que la respuesta funcional positiva de HeLa frente a IGF-I e IGF-II puede estar favorecida por los niveles de expresión de éste receptor, lo que no ocurre para C33-A. Sin embargo, a pesar de la baja expresión de IGF-IR, C33-A exhibe una ligera respuesta en invasión frente a IGF-II. Recientes estudios demuestran que IGF-II puede activar el receptor de insulina a través de su isoforma A, IR- A, a la que puede unirse con una afinidad similar a la de la insulina [110]. Trabajos en nuestro grupo de investigación, han reportado que C33-A expresa principalmente IR-A [109]. Evidencia en otros tipos celulares apoyan la idea de que la interacción IGF-II/IR-A puede jugar un papel importante en el crecimiento tumoral, por ejemplo, IR-A es expresado en cáncer de mama [22] y coriocarcinoma, donde su activación por parte de IGF-II se asoció con propiedades metastáticas [111]. En concordancia con lo anterior, los efectos de IGF-II en C33-A podrían estar mediados por IR-A.

Estos resultados tomados en conjunto, apoyan la evidencia de que IGF-II tiene un papel fundamental en el desarrollo tumoral del cáncer cervical, en cuanto, favorece procesos mitóticos y de motilidad celular. Por otro lado, su acción es dependiente de la disponibilidad celular del receptor de IGF-IR. Sin embargo, debe considerarse que la respuesta a IGFs es además regulada por la acción conjunta de los receptores IGF-IIR, IR, receptores híbridos IR/IGF-IR, proteínas de unión a IGFs y fofatasas.

6.2 PROTEÓMICA COMPARATIVA DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL

Las interacciones entre proteínas y los eventos de señalización que originan cambios de forma celular y que además regulan procesos de migración, son mediados en gran medida por elementos moleculares presentes en la membrana plasmática, dado que de ella depende por ejemplo, la transducción de señales promovidas por mensajeros extracelulares como factores de crecimiento y hormonas, la interacción con la matriz extracelular y la comunicación intercelular. Las células en cultivo hacen contacto con la matriz extracelular a través de extensiones de la membrana plasmática, exhibiendo diversos rasgos morfológicos, desde estructuras dinámicas irregulares como lamelipodios y pseudópodos hasta protrusiones más localizadas y altamente definidas

como podosomas e invadopodios. Todos estas protrusiones de la membrana plasmática sirven como sensores del medio ambiente inmediato y mantiene las actividades polarizadas, tales como la degradación focal de la matriz extracelular. Considerando lo anterior, el estudio de los perfiles de expresión de proteínas de membrana plasmática y asociadas a ella, en células de cáncer que exhiban diferentes índices de invasión, resulta una aproximación interesante y prometedora en la comprensión de procesos conducentes a la metástasis.

Las áreas de investigación más promisorias en el campo de la proteómica en relación con estudio de procesos patológicos incluyen la determinación de la expresión alterada de proteínas, no solamente a nivel celular o tisular, sino también en relación a estructuras subcelulares, en complejos proteicos y fluidos biológicos, el desarrollo de biomarcadores diagnóstico, detección temprana de enfermedades, identificación de blancos de acción terapéutica y evaluación de efectos farmacológicos. Por otro lado, la naturaleza dinámica del proteoma de una célula justifica ampliamente la necesidad de estudiar la expresión génica asociada a enfermedades, directamente al nivel de perfiles de expresión/activación de proteínas, donde los estudios proteómicos representan una herramienta muy prometedora pero que implica grandes retos analíticos.

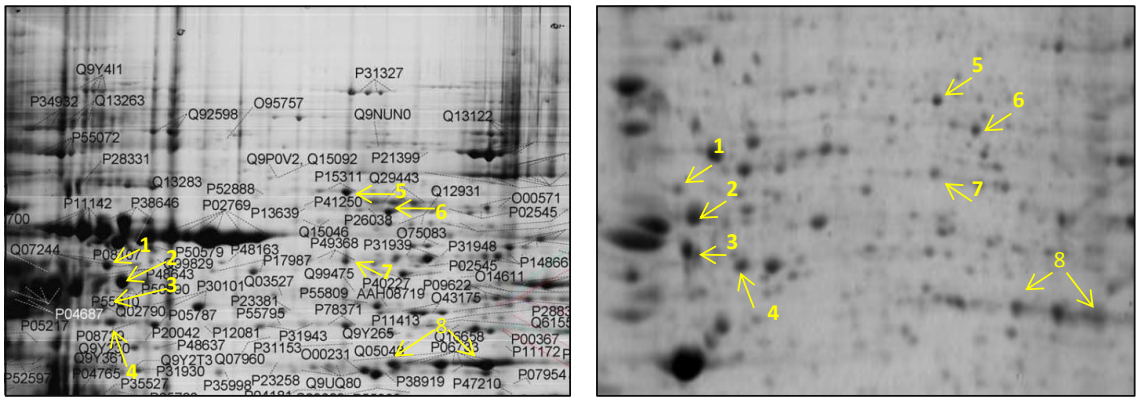
6.2.1 Implementación de la electroforesis bidimensional para estudios proteómicos comparativos en células de cáncer cervical

Una de las técnicas más ampliamente usadas, y que ha aportado un amplio cuerpo de información proteómica es la electroforesis de dos dimensiones. A nivel experimental, una de las limitaciones más importantes, son la reproducibilidad de los proteomas generados, sea por heterogeneidad entre las muestras biológicas o por las limitaciones propias de la técnica aplicada. En este trabajo, inicialmente son evaluadas las condiciones de separación y la reproducibilidad del protocolo empleado, efectuando una separación en dos dimensiones de extracto total de proteína proveniente de la línea celular HeLa. En la figura 13 puede evidenciarse una focalización óptima de las proteínas y una buena separación en la segunda dimensión. Los duplicados de los proteomas obtenidos, presentaron una correlación del 89%, donde el límite inferior aceptado es del 70%, indicando un nivel de reproducibilidad satisfactorio. Con el objetivo de alcanzar una mayor resolución en la separación de las proteínas y lograr establecer una comparación más completa de los proteomas de las líneas celulares se usaron geles de 18cm con el mismo gradiente de pH no lineal.

HeLa es una línea celular extensamente estudiada. Existen numerosos reportes de sus perfiles de expresión proteómicos bajo diversos tratamientos y condiciones, lo que ha permitido caracterizarla ampliamente. Éste hecho se aprovechó para validar los proteomas obtenidos en este estudio. El proteoma de HeLa obtenido en este trabajo se comparó con algunas publicaciones [72, 112]. A partir de dicha comparación, se lograron establecer algunos spots característicos de la línea celular, ubicados en la misma posición y que se tomaron como referencia de validación. En la figura 24 se muestra el detalle de una zona del proteoma obtenido en comparación con el reportado por Fountoulakis, M., *et al*., [72].

Figura 24. Validación del proteoma de HeLa con literatura. Señalados con flechas algunos spots de sectores característicos del proteoma de HeLa *A. Gel obtenido por Fountoulakis, M., et al.[72]. 1,0mg de proteína; IPG 4,5-9,5. B. Proteoma obtenido en este estudio, 0,5mg de proteína, IPG 3-10*

A. B.



En el estudio de Fountoulakis, M., *et al*., [72] se analizaron 3000 spots, de los cuáles se identificaron 1200 proteínas, producto de 297 genes diferentes; las proteínas más abundantes fueron cadenas de tubulina, proteínas de choque térmico, algunas enzimas como la α-enolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Aproximadamente el 42% de las proteínas identificadas estuvieron anotadas para citosol, cerca del 22% en el núcleo, 10% en mitocondria, incluyendo membrana mitocondrial y 6% proteínas de membrana. En estos resultados se demuestra la baja abundancia de las proteínas de membrana en extractos totales.

6.2.2 Perfiles generales de expresión de proteínas de las líneas HeLa y C33-A

Una vez validado el proteoma de HeLa, se aplicaron las mismas condiciones de separación para la línea celular C33-A. Las imágenes de los dos proteomas (figura

14), se compararon usando el software PDQuest Advance 8.0.1 (BioRad). El nivel de apareamiento entre los proteomas fue del 80%, se establecieron 614 proteínas en el proteoma de C33-A y 493 en el de HeLa, de los cuáles 399 fueron comunes a los dos proteomas (figura 15A). Debe considerarse que HeLa es una línea celular de adenocarcinoma cervical, mientras C33-A es de tipo carcinoma escamoso. El adenocarcinoma representa cerca del 20% de todos los tipos de cáncer cervical, adicionalmente, presenta diferencias a nivel de epidemiología, factores pronóstico, patrones de diseminación y recurrencia después de tratamiento[113]. De manera interesante, en este estudio se encuentra que los perfiles generales de expresión de proteínas difieren apenas en un 20%, en cuánto a proteínas expresadas exclusivamente en HeLa respecto a C33-A. Este es un hallazgo valioso, en cuanto, son pocos los trabajos donde se comparen estos tipos de cáncer a nivel proteómico.

6.2.4 Relación entre las proteínas de membrana y procesos de motilidad celular

El enfoque principal de este estudio considera una comparación proteómica de las dos líneas de cáncer cervical HeLa y C33-A, que permita establecer componentes moleculares importantes en procesos de motilidad celular, especialmente los relacionados con invasión.

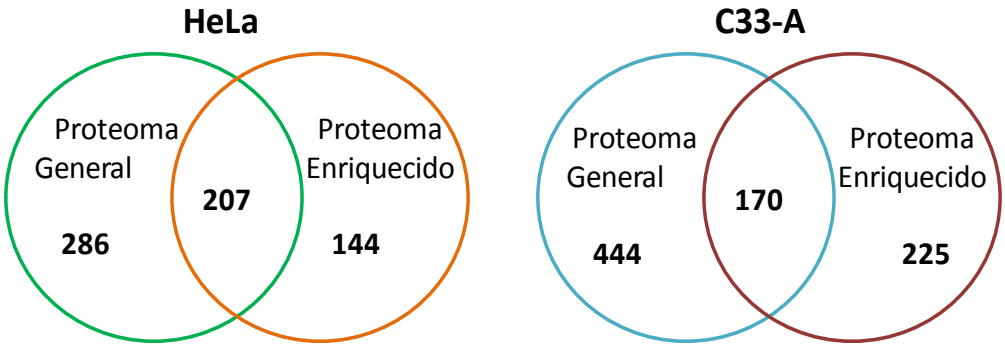
El proteoma de membrana particular de cada tipo celular está involucrado de manera crucial en la capacidad celular de migrar e invadir, requisito para alcanzar un fenotipo metastático, además de mediar la respuesta diferencial a moléculas de señalización como los factores de crecimiento. El estudio proteómico de fracciones de membrana plantea retos analíticos particulares. Si bien se ha dicho que las proteínas de membrana constituyen un tercio del genoma, éstas se encuentran en baja abundancia en la mayoría de perfiles proteómicos bidimensionales, lo que ha sido atribuido principalmente a su alta hidrofobicidad y microheterogeneidad. Para superar estas limitaciones se han planteado diversas estrategias, entre la que se cuenta, el enriquecimiento mediante purificación por afinidad, ampliamente usado y con buenos niveles de eficiencia [55, 60].

En este trabajo se aborda el estudio proteómico comparativo cualitativo de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana mediante electroforesis de dos dimensiones (2DE) y separación multidimensional de las líneas celulares seguido de ESI-Q-TOF. Para comprobar el enriquecimiento de estas fracciones se realizó un western – blot contra el receptor de membrana IGF-IR en un extracto total y en el enriquecido. Como se muestra en la figura 18, se encuentra una expresión relativa siete veces mayor

(Intensidad/µg de proteína) en la fracción de membrana, evidencia que comprueba el enriquecimiento.

El proteoma de membrana de HeLa difiere del total en cuanto se reduce significativamente su complejidad, esto se debe, por un lado, a que se evita el enmascaramiento de proteínas poco abundantes. Por otro lado, la concentración relativa de las proteínas de membrana aumenta, haciéndolas más visibles posibilitando su detección, como se observa en la figura 20A. La comparación entre el proteoma general y el enriquecido presentan una correlación del 41% y 43% para HeLa y C33-A, respectivamente. En la figura 25 se muestra la relación del número de proteínas analizadas entre los proteomas generales y los enriquecidos por línea celular.

Figura 25. Comparación el número de proteínas encontradas en proteoma general respecto al enriquecido en proteínas de membrana, para cada línea celular.



Por otra parte, la comparación entre los proteomas enriquecidos HeLa y C33-A, establece un porcentaje de apareamiento del 58% con un total de 272 proteínas comunes, 86 de las cuales presentaron una expresión diferencial de por lo menos ± 3 veces, el apareamiento es visible en sectores muy localizados (figura 21B). Las dos curvas de dispersión de expresión diferencial obtenidas a partir de la comparación entre proteomas generales y comparación entre proteomas enriquecidos (figuras 16B y 21B), demuestra que la cantidad de cada proteína difiere en un menor grado entre los proteomas enriquecidos que entre los totales, donde la pendiente de la línea de regresión es igual a 0,79 y a 0,70; respectivamente.

Estos resultados indican, por una parte, que el estudio proteómico de compartimentos específicos permite una caracterización más detallada de los perfiles de expresión de proteínas y por otra parte, la respuesta diferencial de cada una de las líneas celulares a factores de crecimiento, como la diferencia en los índices de migración e invasión

exhibidos, puede relacionase en algún grado con la variabilidad a nivel de los proteomas de membrana.

Con el objetivo de tener una mayor oportunidad de identificar un elevado número de proteínas de membrana, superando las limitaciones propias de la electroforesis bidimensional en la separación dicha proteínas, se decidió efectuar un análisis multidimensional que implicó una separación tipo SDS-PAGE en la primera dimensión, y separación posterior de algunas fracciones seleccionadas de alto peso molecular por cromatografía líquida en fase reversa en la segunda dimensión. La identificación se realizó mediante ESI-Q-TOF.

Aunque la complejidad de la muestra se redujo de manera importante en el análisis multidimensional, el número de espectros asignados fue bastante reducido. Este es un problema muy común en el análisis proteómico basado en espectrometría de masas, Na, et al., [114] reportan que entre el 80% y 90% de los datos tipo MS/MS no pueden ser asignados y son descartados, esto, porque los espectros obtenidos de los equipos son de pobre calidad. Por ejemplo, en este estudio se encontró que para el caso de HeLa en total se obtuvieron 4672 espectros de los cuales solo lograron ser asignados 448, que representa el 9,6%. Como se observa en la figura 23 el número de espectros asignados y no asignados aumenta a medida que los pesos moleculares son menores de acuerdo a la fracción analizada. Se han hecho varios esfuerzos para aumentar la calidad de los espectros a nivel del diseño de equipos y software, de hecho, en este estudio, se usó la herramienta Mascot Distiler®, ofrecida por MASCOT®, para depurar los espectros, además, permite realizar deconvoluciones. De esta manera, se generan espectros con fragmentaciones de una sola carga, +1 y de mayor calidad, aumentando la relación señal/ruido, los picos detectados, el número de espectros asignados y las proteínas identificadas.

Mediante el Proteome Software Scaffold, basado en los resultados de las búsquedas en el Mascot® de los espectros procesados por Mascot Disitiler®, fue posible identificar 44 y 56 proteínas en las fracciones analizadas de HeLa y C33-A, respectivamente, con una probabilidad de identificación entre el 80% y el 100%. El listado de estas proteínas se presenta en la tabla 4, donde puede verse de manera general como la mayor parte de ellas se agrupan de acuerdo a su peso molecular por fracción.

Las proteínas identificadas en cada línea celular se importaron con el número de acceso del SwissProt al software STRAP® (Software Tool for Researching Annotations of Proteins) que permitió realizar la anotación de todas las proteínas identificadas por

función y ubicación subcelular. En la figura 26 se presenta la distribución de la anotación de las proteínas identificadas por ubicación subcelular y función molecular.

A partir de la distribución por compartimento subcelular, se logró un total de 19% para HeLa y 16% para C33-A, de proteínas que pudieron ser marcadas por biotina: proteínas de superficie celular, membrana plasmática y matriz extracelular. Es evidente el hecho que el enriquecimiento no es tan alto como podría esperarse; sin embargo, fue mayor en comparación a otros trabajos como el de Fountoulakis, M., *et al.*, [72]. Adicionalmente, debe considerarse proteínas que son anotadas para otros compartimentos celulares, pero que, ya sea por su dinámica o por el subtipo celular, pueden localizarse temporalmente en membrana plasmática. Es el caso de la proteína disulfuro isomerasa A6, anotada para retículo endoplasmático y Golgi, pero que en células tumorales se ha encontrado asociada a la superficie celular, en procesos de evasión de sistema inmune [115]. En cuanto a las anotaciones de función celular, C33-A tiene un mayor porcentaje de proteínas relacionadas con regulación de la actividad transcripcional que HeLa, mientras esta última presenta un número mayor de proteínas relacionadas con actividad estructural y traduccional.

Tabla 4. Proteínas identificadas usando el Proteome Software Scaffold por fracción en cada línea celular y organizada por peso molecular. A. HeLa B. C33-A

A.

Probability Legend: over 95% | 80% to 94% | 50% to 79% | 20% to 49% | 0% to 19%

Bio View: Identified Proteins (44) Including 0 Decoys

#	Visible?	Starred?		Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	BioSample 1	Fraccion 2	Fraccion 3	Fraccion 4	Fraccion 5	Fraccion 6
1	☑	☆	DNA-dependent protein kinase ca...	PRKDC_HU...	469 kDa		99%					
2	☑	☆	Translational activator GCN1 OS=...	GCN1L_HU...	293 kDa		100%					
3	☑	☆	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=...	FLNA_HUMAN	281 kDa		100%	21%				
4	☑	☆	Filamin-B OS=Homo sapiens GN=F...	FLNB_HUMAN	278 kDa		100%					
5	☑	☆	Fatty acid synthase OS=Homo sa...	FAS_HUMAN	273 kDa		100%					
6	☑	☆	Myoferlin OS=Homo sapiens GN=...	MYOF_HUM...	235 kDa		100%					
7	☑	☆	Glutamate [NMDA] receptor subu...	NMD3A_HU...	125 kDa			81%	82%			69%
8	☑	☆	Sodium/potassium-transporting ...	AT1A1_HU...	113 kDa		100%					
9	☑	☆	Neutral alpha-glucosidase AB OS=...	GANAB_HU...	107 kDa			100%				
10	☑	☆	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapien...	ACTN4_HU...	105 kDa			100%				
11	☑	☆	Transportin-3 OS=Homo sapiens ...	TNPO3_HU...	104 kDa			81%				
12	☑	☆	Importin subunit beta-1 OS=Hom...	IMB1_HUM...	97 kDa		71%	81%				
13	☑	☆	Elongation factor 2 OS=Homo sap...	EF2_HUMAN	95 kDa			100%				
14	☑	☆	Endoplasmin OS=Homo sapiens G...	ENPL_HUMAN	92 kDa	★		100%				
15	☑	☆	Transitional endoplasmic reticulu...	TERA_HUM...	89 kDa			81%				
16	☑	☆	Transferrin receptor protein 1 OS...	TFR1_HUM...	85 kDa			81%				
17	☑	☆	Heat shock protein HSP 90-alpha ...	HS90A_HU...	85 kDa	★		100%				
18	☑	☆	Threonyl-tRNA synthetase, cytopl...	SYTC_HUM...	83 kDa				82%			
19	☑	☆	Heat shock protein HSP 90-beta O...	HS90B_HU...	83 kDa	★		100%		72%		
20	☑	☆	X-ray repair cross-complementin...	XRCC5_HU...	83 kDa				82%			
21	☑	☆	CD44 antigen OS=Homo sapiens ...	CD44_HUM...	82 kDa				100%			
22	☑	☆	Glycerol-3-phosphate dehydroge...	GPDM_HUM...	81 kDa					98%		
23	☑	☆	Stress-70 protein, mitochondrial ...	GRP75_HU...	74 kDa					100%		
24	☑	☆	78 kDa glucose-regulated protein...	GRP78_HU...	72 kDa	★				100%		
25	☑	☆	Heat shock cognate 71 kDa protei...	HSP7C_HU...	71 kDa	★				100%		
26	☑	☆	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B ...	HSP71_HU...	70 kDa	★				100%		
27	☑	☆	4F2 cell-surface antigen heavy ch...	4F2_HUMAN	68 kDa		100%	100%	100%	72%		
28	☑	☆	Transketolase OS=Homo sapiens ...	TKT_HUMAN	68 kDa					100%		
29	☑	☆	Moesin OS=Homo sapiens GN=MS...	MOES_HUM...	68 kDa					100%		
30	☑	☆	Calnexin OS=Homo sapiens GN=C...	CALX_HUM...	68 kDa			98%				
31	☑	☆	ATP synthase subunit alpha, mito...	ATPA_HUM...	60 kDa						100%	100%
32	☑	☆	T-complex protein 1 subunit beta ...	TCPB_HUM...	57 kDa						100%	
33	☑	☆	Polypyrimidine tract-binding prot...	PTBP1_HU...	57 kDa						100%	
34	☑	☆	ATP synthase subunit beta, mitoc...	ATPB_HUM...	57 kDa						100%	100%
35	☑	☆	Inosine-5'-monophosphate dehy...	IMDH2_HU...	56 kDa						100%	
36	☑	☆	Septin-7 OS=Homo sapiens GN=S...	SEPT7_HU...	51 kDa							99%
37	☑	☆	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo ...	TBA1B_HU...	50 kDa	★	71%				100%	100%
38	☑	☆	Elongation factor 1-alpha 1 OS=H...	EF1A1_HU...	50 kDa		100%				100%	100%
39	☑	☆	Elongation factor 1-gamma OS=H...	EF1G_HUMAN	50 kDa							100%
40	☑	☆	Tubulin alpha-4A chain OS=Homo ...	TBA4A_HU...	50 kDa	★					100%	
41	☑	☆	Tubulin beta chain OS=Homo sapi...	TBB5_HUM...	50 kDa	★					100%	69%
42	☑	☆	Alpha-enolase OS=Homo sapiens ...	ENOA_HUM...	47 kDa							100%
43	☑	☆	Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=...	SERPH_HU...	46 kDa							100%
44	☑	☆	DnaJ homolog subfamily A memb...	DNJA1_HU...	45 kDa							100%

B.

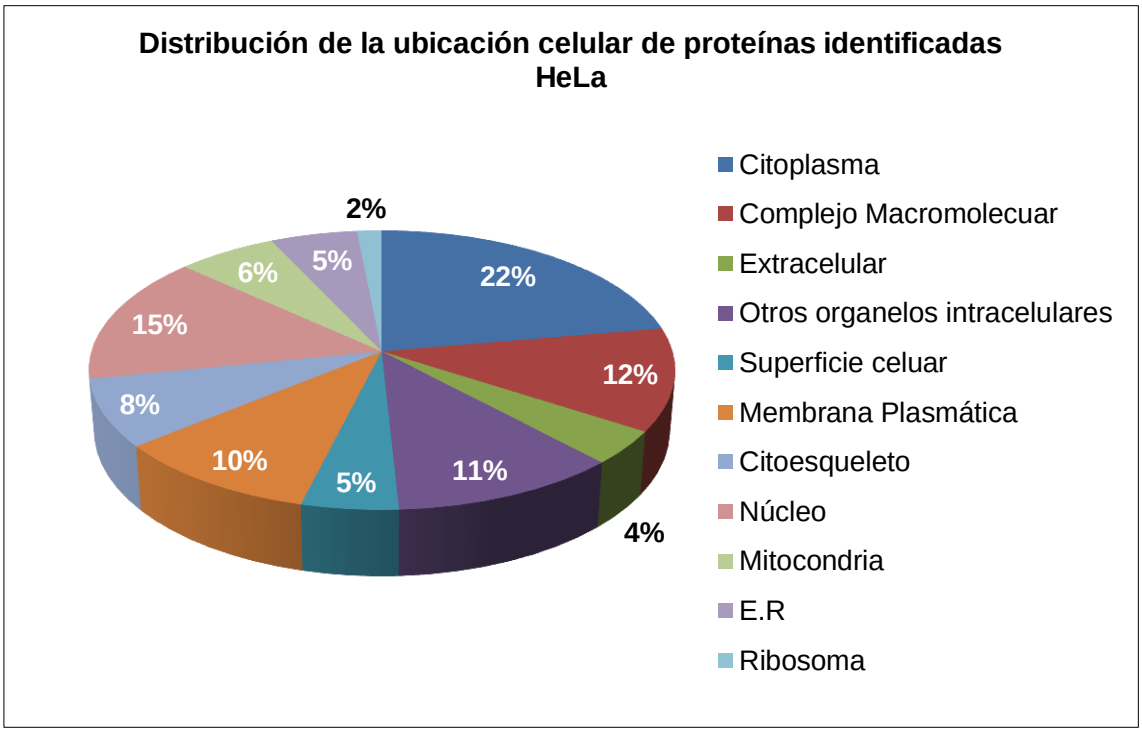
Probability Legend:
over 95%
80% to 94%
50% to 79%
20% to 49%
0% to 19%

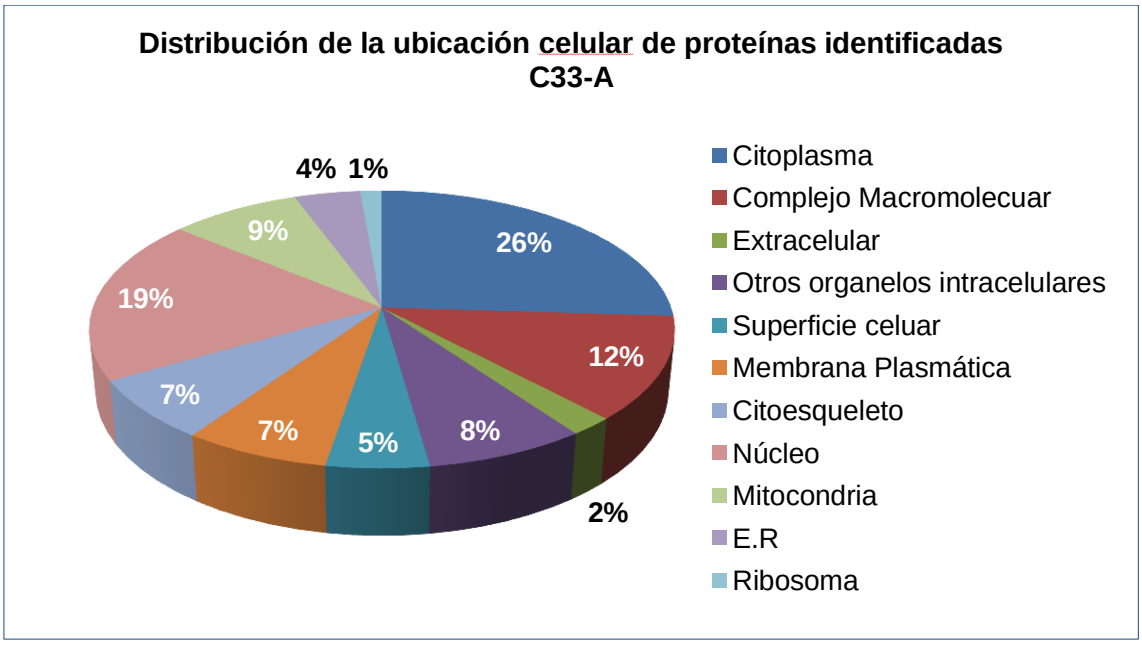
Bio View:
Identified Proteins (56)
Including 0 Decoys

#	Visible?	Starred?		Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	Fraccion 1	Fraccion 2	Fraccion 3	Fraccion 4	Fraccion 5	Fraccion 6
1	☑	☆	DNA-dependent protein kinase ca...	PRKDC_HU...	469 kDa		100%					
2	☑	☆	Translational activator GCN1 OS=...	GCN1L_HU...	293 kDa		100%					
3	☑	☆	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=...	FLNA_HUMAN	281 kDa		100%					
4	☑	☆	Fatty acid synthase OS=Homo sa...	FAS_HUMAN	273 kDa		100%					
5	☑	☆	CAD protein OS=Homo sapiens GN...	PYR1_HUM...	243 kDa		98%					
6	☑	☆	Exportin-1 OS=Homo sapiens GN...	XPO1_HUM...	123 kDa		98%	74%				
7	☑	☆	Sodium/potassium-transporting ...	AT1A1_HU...	113 kDa		100%					
8	☑	☆	Exportin-2 OS=Homo sapiens GN...	XPO2_HUM...	110 kDa		100%					
9	☑	☆	Protein unc-45 homolog A OS=Ho...	UN45A_HU...	103 kDa			99%				
10	☑	☆	Transportin-1 OS=Homo sapiens ...	TNPO1_HU...	102 kDa			100%				
11	☑	☆	Importin subunit beta-1 OS=Hom...	IMB1_HUM...	97 kDa			100%				
12	☑	☆	HEAT repeat-containing protein 2 ...	HEAT2_HU...	93 kDa			100%				
13	☑	☆	Heat shock protein HSP 90-alpha ...	HS90A_HU...	85 kDa	★		100%				
14	☑	☆	Mitochondrial inner membrane pr...	IMMT_HUM...	84 kDa			99%				
15	☑	☆	Heat shock protein HSP 90-beta O...	HS90B_HU...	83 kDa	★		100%				
16	☑	☆	Stress-70 protein, mitochondrial ...	GRP75_HU...	74 kDa	★		100%				
17	☑	☆	ATP-dependent RNA helicase DDX...	DDX3X_HU...	73 kDa			99%				
18	☑	☆	78 kDa glucose-regulated protein...	GRP78_HU...	72 kDa	★		100%				
19	☑	☆	Heat shock cognate 71 kDa protei...	HSP7C_HU...	71 kDa	★		100%				
20	☑	☆	Protein TBRG4 OS=Homo sapiens ...	TBRG4_HU...	71 kDa				100%			
21	☑	☆	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B ...	HSP71_HU...	70 kDa	★		100%				
22	☑	☆	Dolichyl-diphosphooligosaccharid...	RPN2_HUM...	69 kDa				100%			
23	☑	☆	4F2 cell-surface antigen heavy ch...	4F2_HUMAN	68 kDa		99%	61%				
24	☑	☆	Apoptosis-inducing factor 1, mito...	AIFM1_HU...	67 kDa			100%				
25	☑	☆	Serine/threonine-protein phosph...	2AAA_HUM...	65 kDa				72%	100%		
26	☑	☆	Methylcrotonoyl-CoA carboxylas...	MCCB_HUM...	61 kDa					100%		
27	☑	☆	60 kDa heat shock protein, mitoc...	CH60_HUM...	61 kDa				100%	100%		
28	☑	☆	T-complex protein 1 subunit gam...	TCPG_HUM...	61 kDa				100%			
29	☑	☆	T-complex protein 1 subunit alph...	TCPA_HUM...	60 kDa				100%			
30	☑	☆	ATP synthase subunit alpha, mito...	ATPA_HUM...	60 kDa		61%			100%	100%	100%
31	☑	☆	T-complex protein 1 subunit epsil...	TCPE_HUMAN	60 kDa	★			100%	99%		
32	☑	☆	T-complex protein 1 subunit thet...	TCPQ_HUM...	60 kDa					100%		
33	☑	☆	T-complex protein 1 subunit eta ...	TCPH_HUM...	59 kDa					100%	11%	
34	☑	☆	Bifunctional ATP-dependent dihyd...	DHAK_HUM...	59 kDa				100%			
35	☑	☆	T-complex protein 1 subunit zeta ...	TCPZ_HUM...	58 kDa				100%			
36	☑	☆	Pyruvate kinase isozymes M1/M2...	KPYM_HUM...	58 kDa				100%	100%		
37	☑	☆	T-complex protein 1 subunit delta...	TCPD_HUM...	58 kDa	★				100%		
38	☑	☆	Importin subunit alpha-2 OS=Ho...	IMA2_HUM...	58 kDa					100%	25%	
39	☑	☆	T-complex protein 1 subunit beta ...	TCPB_HUM...	57 kDa						100%	
40	☑	☆	D-3-phosphoglycerate dehydroge...	SERA_HUM...	57 kDa						100%	
41	☑	☆	ATP synthase subunit beta, mitoc...	ATPB_HUM...	57 kDa						100%	100%
42	☑	☆	Inosine-5'-monophosphate dehy...	IMDH2_HU...	56 kDa					100%	100%	
43	☑	☆	Non-POU domain-containing octa...	NONO_HUM...	54 kDa					100%		
44	☑	☆	Splicing factor U2AF 65 kDa subun...	U2AF2_HU...	54 kDa				98%			
45	☑	☆	Heterogeneous nuclear ribonucle...	HNRPK_HU...	51 kDa				100%			
46	☑	☆	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo ...	TBA1B_HU...	50 kDa	★			16%	100%	100%	100%
47	☑	☆	Elongation factor 1-alpha 1 OS=H...	EF1A1_HU...	50 kDa		100%					100%
48	☑	☆	Elongation factor 1-gamma OS=H...	EF1G_HUMAN	50 kDa							100%
49	☑	☆	Tubulin beta chain OS=Homo sapi...	TBB5_HUM...	50 kDa	★	36%			100%	100%	
50	☑	☆	Heterogeneous nuclear ribonucle...	HNRH1_HU...	49 kDa						100%	
51	☑	☆	Calreticulin OS=Homo sapiens GN...	CALR_HUM...	48 kDa					99%		
52	☑	☆	Protein disulfide-isomerase A6 OS...	PDIA6_HU...	48 kDa							100%
53	☑	☆	Histone-binding protein RBBP7 OS...	RBBP7_HU...	48 kDa							100%
54	☑	☆	Alpha-enolase OS=Homo sapiens ...	ENOA_HUM...	47 kDa							100%
55	☑	☆	DnaJ homolog subfamily A memb...	DNJA2_HU...	46 kDa							100%
56	☑	☆	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=R...	UBIQ_HUM...	9 kDa		100%					

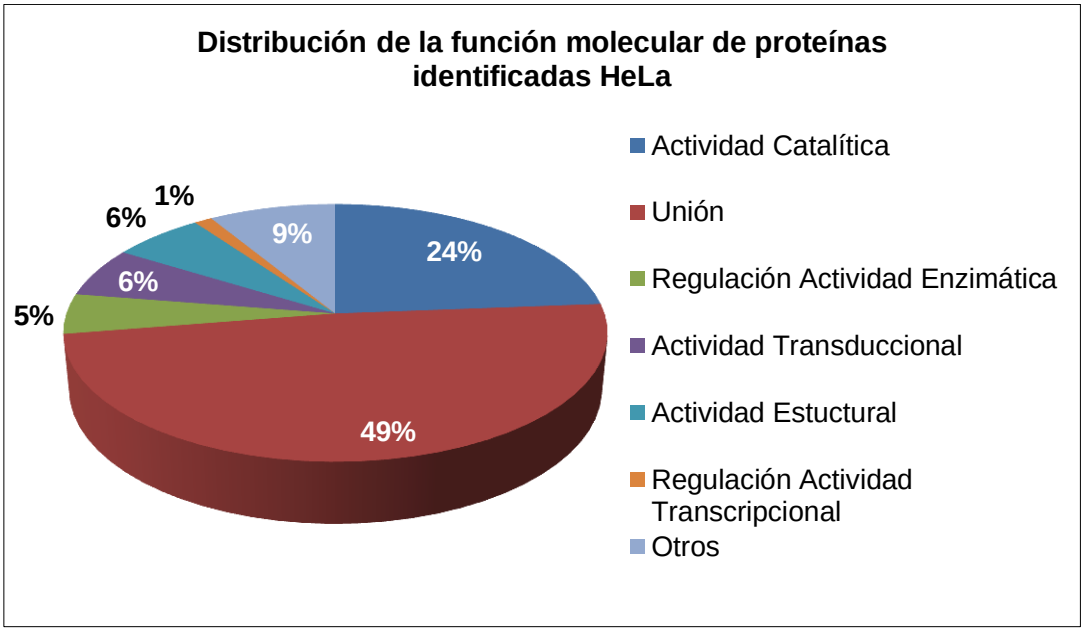
Figura 26.Distribución de proteínas de acuerdo a su anotación por ubicación y función molecular en cada línea celular. *A. Distribución según ubicación celular. B. Distribución según función molecular. Anotaciones obtenidas con el software STRAP®*

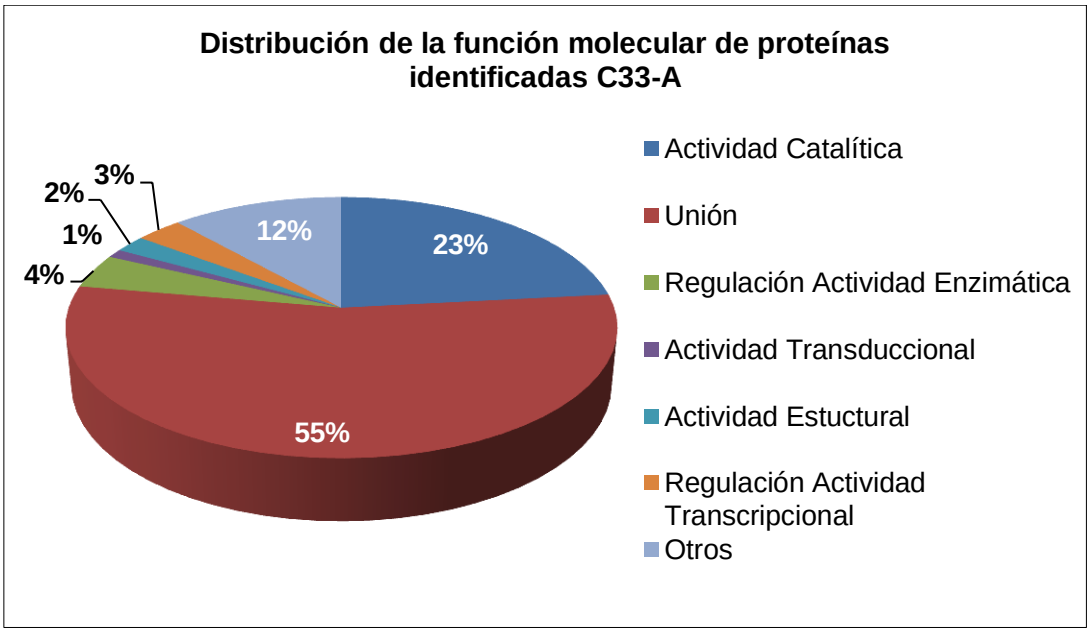
A.





B.





De las proteínas identificadas, 22 proteínas fueron comunes a las dos líneas celulares, 22 y 34 proteínas expresadas exclusivamente por HeLa y C33-A, respectivamente. Este resultado se encuentra en concordancia con los niveles de apareamiento encontrados en los perfiles bidimensionales de extractos enriquecidos, donde se estableció una correlación del 58%. En la tabla 5 se presenta el listado de proteínas expresadas exclusivamente por cada línea celular, junto con su función.

Tabla 5. Proteínas expresadas exclusivamente por cada línea celular A. HeLa B. C33-A *Abreviaturas: M. P: Membrana plasmática R. E: Retículo Endoplasmático MEC: Matriz extracelular. Resaltadas proteínas involucradas en procesos de motilidad celular.*

A.

Nombre de la Proteína SwissProt	Nombre Acceso SwissProt	Principal función asociada	Ubicación
Filamin_B	FLNB_HUMAN	Anclaje de citoesqueleto a membrana, diferenciación celular y transducción de señales	Citoesqueleto
Myoferlin	MYOF_HUMAN	Proteína de unión a fosfolípidos/calcio. Reciclamiento endocítico	M. P
Glutamate receptor subunit 3A [NMDA]	NMD3A_HUMAN	Transporte de calcio, respuesta a etanol	M. P
Neutral alpha-glucosidase	GANAB_HUMAN	Metabolismo de carbohidratos	R. E
Alpha-actinin-4	ACTN4_HUMAN	Regulación positiva de movimiento de componentes celulares	Citoesqueleto
Transportin - 3	TNPO3_HUMAN	Proteína transportadora citoplasma-núcleo	Citoesqueleto
Elongation factor	EF2_HUMAN	Biosíntesis de proteínas	Citoplasma
Endoplasmin	ENPL_HUMAN	Caperona en transporte y procesamiento de proteínas secretadas. Anti-apoptosis	R. E
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	Catabolismo de proteínas	Citoplasma
Transferrin receptor protein 1	TFR1_HUMAN	Homeóstasis del hierro	M. P
Threonyl-tARN synthetase,	SYTC_HUMAN	Biosíntesis de proteínas	Citoplasma
X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5_HUMAN	Reparación de doble hebra. Involucrada en integración viral y integración provirus	Núcleo
CD44 antigen	CD44_HUMAN	Interacción con matriz extracelular. Receptor de ácido hilaurónico, migración, crecimiento y progresión tumoral	M. P
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase,	GPDM_HUMAN	Acción de oxido-reducción. Actividad aumentada por unión a Calcio	Mitocondria
Transketolase	TKT_HUMAN	Actividad metabólica	Citoplasma
Moesin	MOES_HUMAN	Molecular de adhesión celular	M. P

Continuación Tabla 5.A

Nombre de la Proteína SwissProt	Nombre Acceso SwissProt	Principal función asociada	Ubicación
Polypyrimidine tract-binding protein	PTBP1_HUMAN	Splicing de ARN	Núcleo
Septin-7	SEPT7_HUMAN	GTPasa involucrada en citocinesis	Citoesqueleto
Tubulin alpha-4A	TBA4A_HUMAN	Movimiento basado en microtubulos	Citosol, MEC
Serpin H1	SERPH_HUMAN	Respuesta a estrés. Chaperona de unión a colágeno	R. E
DNAJ homolog subfamily A member 1	DNJA1_HUMAN	Chaperona. Importación de proteínas a mitocondria	M. P

B.

Nombre de la Proteína SwissProt	Nombre Acceso SwissProt	Principal función asociada	Ubicación
CAD protein	PYR1_HUMAN	Biosíntesis de pirimidina	Citoplasma
Exportin-1	XPO1_HUMAN	Transporte de proteínas	Citoplasma
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	AT1A1_HUMAN	Transporte iónico	M. P
Exportin-2	XPO2_HUMAN	Transporte de proteínas. Involucrada en proliferación celular	Citoplasma
Protein unc-45 homolog A	UN45A_HUMAN	Chaperona. Involucrada en proliferación	Citoplasma
Transportin-1	TNPO1_HUMAN	Trasporte de proteínas de citoplasma a núcleo	Citoplasma
HEAT repeat-containing protein 2	HEAT2_HUMAN	Chaperona	Citoplasma
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X_HUMAN	Helicasa de ADN dependiente de ATP	Núcleo
Protein TBRG4	TBRG4_HUMAN	Regulación positiva de la proliferación celular	M. P
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	RPN2_HUMAN	Proteína de unión. Glicosidación de proteínas	M. P / R. E
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1_HUMAN	Apoptosis	Mitocondria

Continuación Tabla 5.B

Nombre de la Proteína SwissProt	Nombre Acceso SwissProt	Principal función asociada	Ubicación
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	2AAA_HUMAN	Regulación negativa del crecimiento, inactivación vía MAPK	M. P
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain	MCCB_HUMAN	Degradación de aminoácidos	Mitocondria
60 kDa heat shock protein	CH60_HUMAN	Chaperona. Regulación negativa de apoptosis	Mitocondria/M.P
T-complex protein 1 subunit gamma	TCPG_HUMAN	Chaperona	Citoesqueleto
T-complex protein 1 subunit alpha	TCPA_HUMAN	Chaperona	Citoesqueleto
T-complex protein 1 subunit epsilon	TCPE_HUMAN	Chaperona	Citoesqueleto
T-complex protein 1 subunit theta	TCPQ_HUMAN	Chaperona	Citoesqueleto
T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN	Chaperona	Citoesqueleto
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM_HUMAN	Proliferación celular	Citoplasma
T-complex protein 1 subunit delta	TCPD_HUMAN	Chaperona	Citoplasma
Importin subunit alpha-2 OS	IMA2_HUMAN	Proceso metabólico de ADN	Citoesqueleto
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	SERA_HUMAN	Biosíntesis de aminoácidos	Citoplasma
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO_HUMAN	Regulación de transcripción	Núcleo
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	U2AF2_HUMAN	Regulación de transcripción	Núcleo
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_HUMAN	Proteína de unión a mARN	Citoplasma/ Núcleo
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_HUMAN	Procesamiento de mARN	Citoplasma
Calreticulin	CALR_HUMAN	Regulación positiva del ciclo celular	R.E / M. E. C
Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6_HUMAN	Homeostasis del redox celular. Evasión inmune de células tumorales	R. E/ Golgi/M. P

Continuación Tabla 5.B

Nombre de la Proteína SwissProt	Nombre Acceso SwissProt	Principal función asociada	Ubicación
Histone-binding protein RBBP7	RBBP7_HUMAN	Replicación del ADN	Núcleo
DNAJ homolog subfamily A member 2	DNJA2_HUMAN	Chaperona. Potencial ancla lipídica. Regulación positiva de la proliferación celular	M. P
Ubiquitin	UBIQ_HUMAN	Regulación de crecimiento y respuesta a estrés	Citoplasma

Adicionalmente, la abundancia relativa de las proteínas identificada se estimó usando el número de espectros asignados a cada proteína. En la tabla 6 se presenta un listado de las proteínas que estuvieron diferencialmente expresadas en las dos líneas celulares, con una diferencia de por lo menos ± 3 veces.

Tabla 6. Proteínas diferencialmente expresadas en las líneas celulares HeLa y C33-A

Nombre de la proteína SwissProt	Nombre Acceso SwissProt	Nº Espectros		Función Asociada	Ubicación
		C33-A	HeLa		
Trifunctional enzyme subunit alpha	ECHA_HUMAN	1	3	Metabolismo de ácidos grasos	Mitocondria
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71_HUMAN	1	3	Chaperona. Respuesta a estrés oxidativo	Citoplasma
4F2 cell-surface antigen heavy chain	4F2_HUMAN	1	24	Transporte. Crecimiento celular	M. P
Filamin-A	FLNA_HUMAN	4	27	Reorganización de citoesqueleto	Citoplasma
78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_HUMAN	4	17	Inhibidor de caspasas. Repuesta a inanición de Glucosa	R. E / M. P
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	RPN2_HUMAN	6	1	N- Glicosidación de proteínas	R. E / M. P
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC_HUMAN	12	4	Reparación de ADN	Núcleo

El análisis de proteínas expresadas exclusivamente y en mayor abundancia por HeLa, indica la presencia de proteínas claves relacionadas con procesos de motilidad y reestructuración del citoesqueleto. Por ejemplo la filamina A y B, han sido vinculadas en procesos de migración celular por remodelación del citoesqueleto y mediación por integrinas[116-117] Adicionalmente, Ravid, et al., [118] confirmaron a través de experimentos de co-inmunoprecipitación que la filamina A co-existe en un complejo con caveolina -1 y reveló la presencia de fosfo-Akt activa en dicho complejo. Usando la línea MCF-7 de cáncer de seno, demostraron que la filamina A tiene un papel como intermediaria en los efectos positivos de la caveolina 1 sobre la migración de células cancerosas inducida por IGF-I.

Se identificó también la proteína Mioferlina, que ha sido implicada en procesos de motilidad. Bernatchez, et al., [119] usando un análisis proteómico de microdominios de balsas lipídicas en células endoteliales identificaron la mioferlina y demostraron que su supresión resulta en pérdida de proliferación, migración y liberación de óxido nítrico en respuesta al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

De manera interesante, se identificó la proteína CD44, una molécula de adhesión célula – célula y de interacción con la matriz extracelular. Su ligando es el ácido hialurónico. En forma normal, CD44 media el migración linfocitaria, activación de linfocitos y monocitos y migración celular. Sin embargo, varios estudios indican que múltiples variantes de CD44 (CD44v) son expresadas en la superficie de células tumorales y han sido correlacionadas con comportamiento metastático. Además, favorece la migración de tumores invasivos y la señalización intracelular[120]. En el cáncer cervical la presencia de las variantes 6, 7 y 8 correlaciona con un pobre pronóstico [120-121].

Recientes estudios, reportan la formación de un complejo entre hialurona – CD44 – moesina que resulta tanto en la disociación de interacciones célula – célula e incrementada motilidad celular a través de remodelamiento de actina. Además, se ha encontrado que este complejo está asociado con el receptor II de TGF-β y clatrina en microdominios de actina, conduciendo a la activación de la señalización TGF-β[122]. La moesina fue también, encontrada en las fracciones analizadas de HeLa.

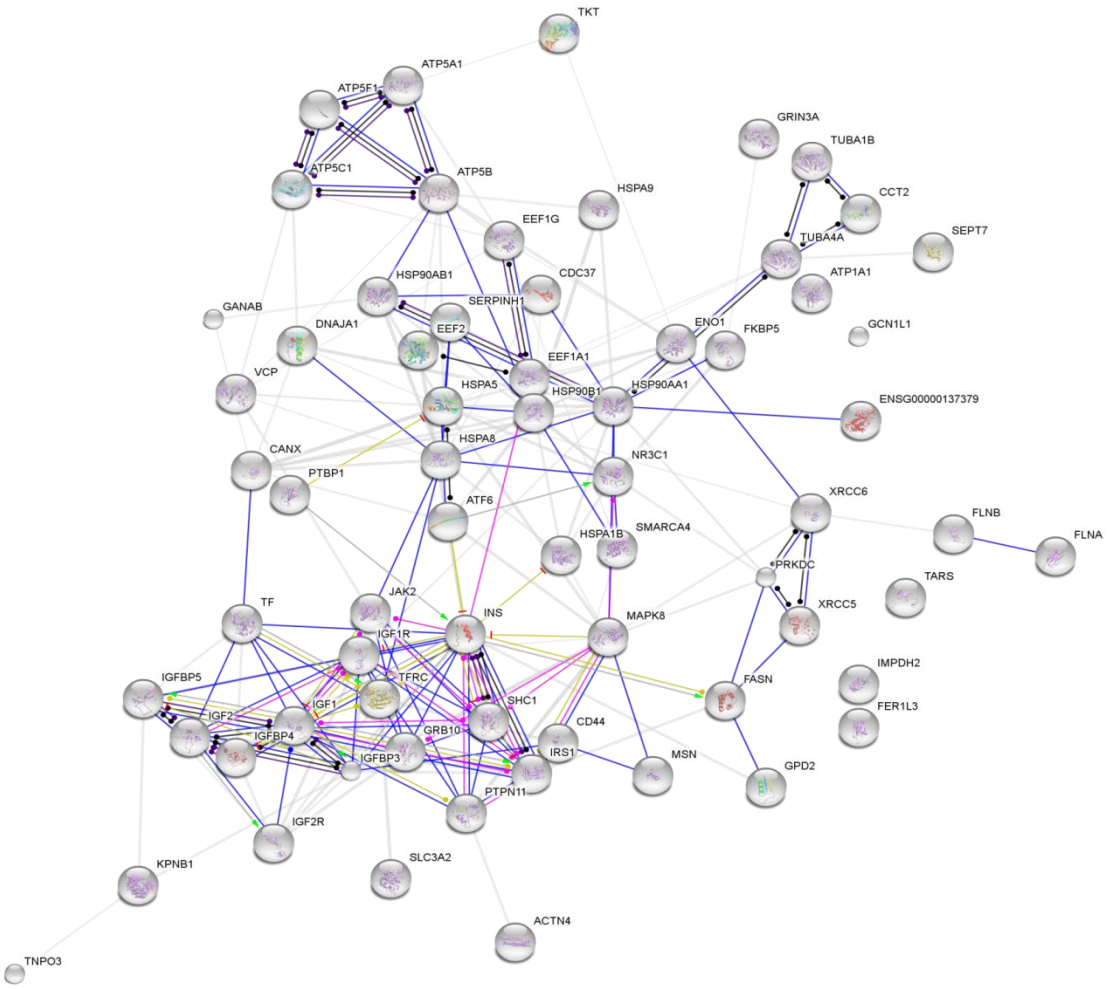
Específicamente en cáncer cervical, He, et al.,[123] lograron asociar la sobre – regulación y activación de la moesina a través de la vía Rho/ROCK-2 en metástasis de cáncer cervical promovida por el factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C).

Claramente, las proteínas exclusivamente o diferencialmente expresadas en C33-A, no mostraron mayor relación con procesos de motilidad celular, más bien con procesos mitóticos aumentados, en cuanto se encontró un número importante de proteínas relacionadas con regulación del ciclo celular, proliferación, metabolismo, respuesta a estrés oxidativo, deprivación de glucosa y síntesis de ADN. La identificación de la proteína disulfuro isomerasa A6, resulta ser un resultado notable. Esta proteína, anotada principalmente para el retículo endoplasmático, ha sido encontrada sobre la superficie de células tumorales, asociada con MICA (ligando soluble relacionado con el complejo mayor de histocompatibiliad tipo I). Este complejo transitorio genera la reducción de un enlace disulfuro de MICA que posibilita su clivaje proteolítico. MICA actúa como un antígeno propio inducido por estrés, su unión al receptor KLRK1/NKG2D conduce a la activación de las células T$\delta\gamma$ provocando la lisis celular, por tanto, representa una respuesta inmune de resistencia al cáncer [115]. En consecuencia a lo anterior, la disulfuro isomerasa A6, podría participar en la evasión inmune tumoral en C33-A. Estos resultados, tomados en conjunto, aportan valiosa información para la compresión del proceso carcinogénico en cáncer cervical libre de infección con VPH.

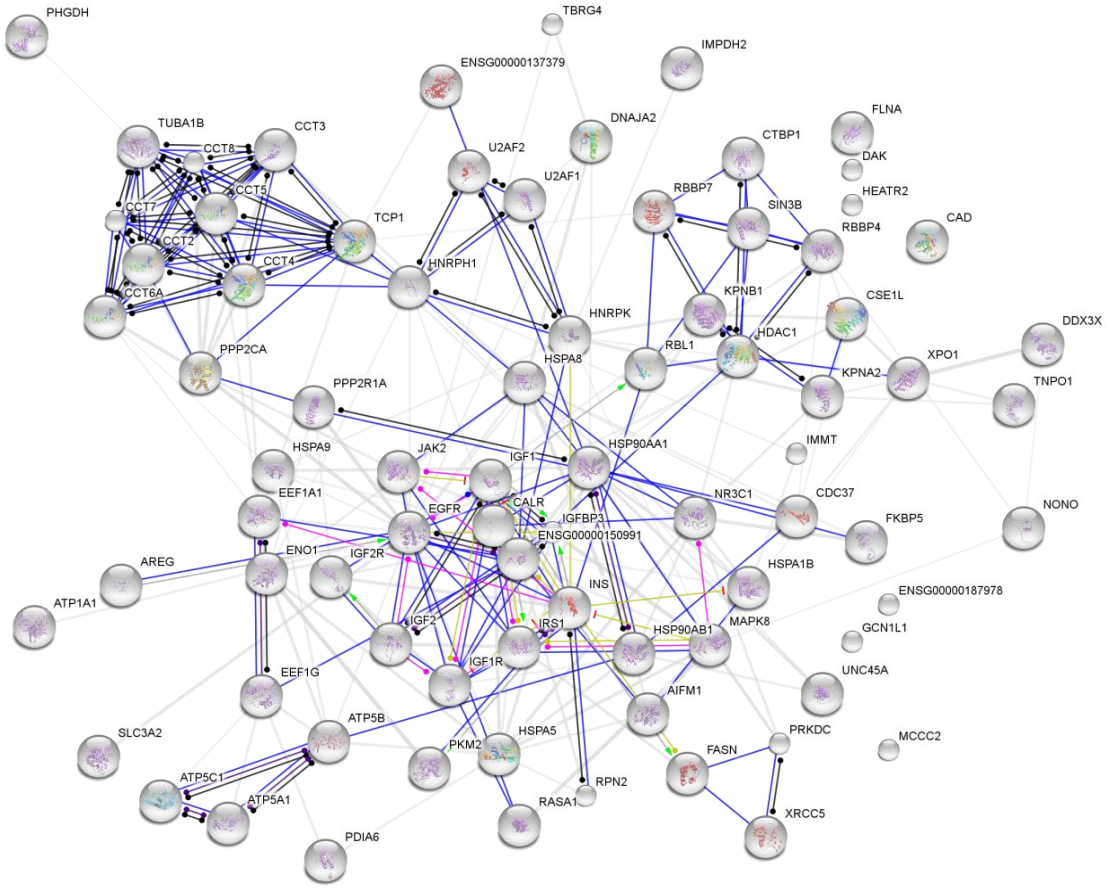
Complementario a la discusión de los resultados desarrollada, se realizó un análisis conjunto de las proteínas identificadas mediante redes de señalización, donde se incluyeron cada uno de los miembros del sistema IGF, para tal efecto, se uso la base de datos libre STRING 8.3. En la figura 27 se presentan las redes de señalización obtenidas para cada una de las líneas celulares. Las líneas

Figura 27. Redes de Señalización. *A. HeLa B. C33-A. Las redes fueron obtenidas mediante la base de datos libre STRING 8.3 incluyendo los miembros de la familia IGF. Los círculos representan cada proteína incluida y es designada con su nombre abreviado. Las líneas que vinculan proteínas corresponden a evidencia de interacción documentada en la literatura.*

A.



B.



Los resultados demuestran que en la línea celular HeLa existen elementos moleculares constitutivos de membrana celular y asociada a ella, de manera exclusiva o sobre expresadas, que posibilitan la adquisición de un fenotipo invasivo, promoviendo procesos de remodelamiento de citoesqueleto, cambios de forma, polarización celular y adhesión focal. Algunas proteínas identificadas parecen estar vinculadas de manera más directa con algunos de los miembros del sistema IGF, que C33-A. Por ejemplo, en la red de señalización de HeLa (Figura 27. A) se muestra una interacción directa entre IGFBP-3 y el complejo CD44 – Moesina, asociado con invasión celular. Estos rasgos moleculares explican en gran medida el comportamiento biológico observado a nivel de motilidad celular respecto a C33-A. Adicionalmente, aportan un marco amplio de información en la compresión del cáncer cervical.

Para lograr una aproximación cuantitativa en la evaluación de los niveles de activación de proteínas inducidas por IGF-II en cada una de las líneas celulares, que permita

establecer una relación directa entre la acción del ligando y la respuesta invasiva, debe efectuarse una marcación isotópica por incorporación de $^{13}C_6$ L – Lisina *in vitro* en cada una de las líneas celulares en estudio, seguido de enriquecimiento de fosfoproteínas mediante IMAC.

En este estudio, se realizó un avance en este punto, logrando la marcación isotópica de cultivos celulares de estas líneas y la obtención de los fosfoproteomas de cada una, para posterior análisis por MALDI-TOF. En el anexo A se muestra de manera esquemática la metodología usada y en el anexo B se muestran los fosfoproteomas obtenidos.

Los estudios proteómicos comparativos, como el aquí desarrollado, se han convertido en importantes herramientas para la comprensión de procesos patológicos, establecimiento de diferencias entre estados de salud y enfermedad, acción farmacológica y búsqueda de blancos de acción terapéutica. En este punto, este trabajo de investigación es novedoso en la comparación proteómica al nivel de los modelos biológicos usados y la aproximación del análisis de membrana, donde se inscriben pocas referencias en la literatura.

7. CONCLUSIONES

- Este estudio estableció que el factor de crecimiento similar a la insulina tipo II, IGF-II, tiene un importante papel en el desarrollo tumoral del cáncer cervical, en cuanto, favorece procesos mitóticos y de motilidad celular. Por otro lado, su acción podría ser dependiente de la disponibilidad celular del receptor de IGF-IR.

- El proteoma general de HeLa, aquí obtenido, es comparable con los existentes en literatura, lo que valida la aproximación metodológica y experimental 2DE empleada. El perfil de expresión de proteínas en el proteoma general de HeLa y C33-A se correlaciona en un 80%, mientras que en el caso de los proteomas enriquecidos en proteínas de membrana es del 58%.

- Se logró un enriquecimiento significativo de extractos en proteínas de membrana, usando cromatografía de afinidad tipo biotina-avidina, evidente a nivel de la comparación de los perfiles generales de expresión de proteínas y de los perfiles enriquecidos, estrategia que permitió lograr una reducción considerable de la complejidad y la visualización de proteínas que en los proteomas generales no son detectables.

- Mediante una separación multidimensional seguida por un análisis tipo Q –TOF, se logró identificar un total de 44 proteínas y 56 proteínas para HeLa y C33-A, respectivamente; de las cuales 22 fueron comunes a las dos líneas celulares. Para aumentar la confiabilidad de la identificación fue necesario realizar optimización de los espectros MS/MS. Algunas de las proteínas identificadas exclusivamente o sobre expresadas en HeLa, estuvieron asociadas con procesos de motilidad celular, lo que correlaciona con el comportamiento observado en los ensayos funcionales. Las proteínas expresadas principalmente por C33-A estuvieron relacionadas con regulación del ciclo celular, metabolismo, respuesta a estrés y evasión de sistema inmune.

- Para lograr una mayor identificación de proteínas usando espectros MS/MS es importante realizar un adecuado tratamiento bioinformático para depurar y mejorar la información con la que se realiza el análisis de proteínas.

- La estrategia metodológica empleada en este estudio fue exitosa para establecer diferencias moleculares asociadas a procesos de malignización en cáncer cervical y su implementación representa una herramienta prometedora en la búsqueda de nuevos blancos de acción terapéutica para el control de la enfermedad.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar análisis de masas tipo MALDI – TOF de los perfiles de expresión general de proteínas de cada una de las líneas celulares.

- Correlacionar la identificación de proteínas de los extractos enriquecidos en proteínas de membrana lograda por ESI-Q-TOF, con el análisis de masas tipo MALDI-TOF de los proteomas enriquecidos.

- Efectuar el análisis de las fracciones de bajo peso molecular del extracto enriquecido en proteínas de membrana, para complementar la caracterización lograda de las líneas celulares en estudio.

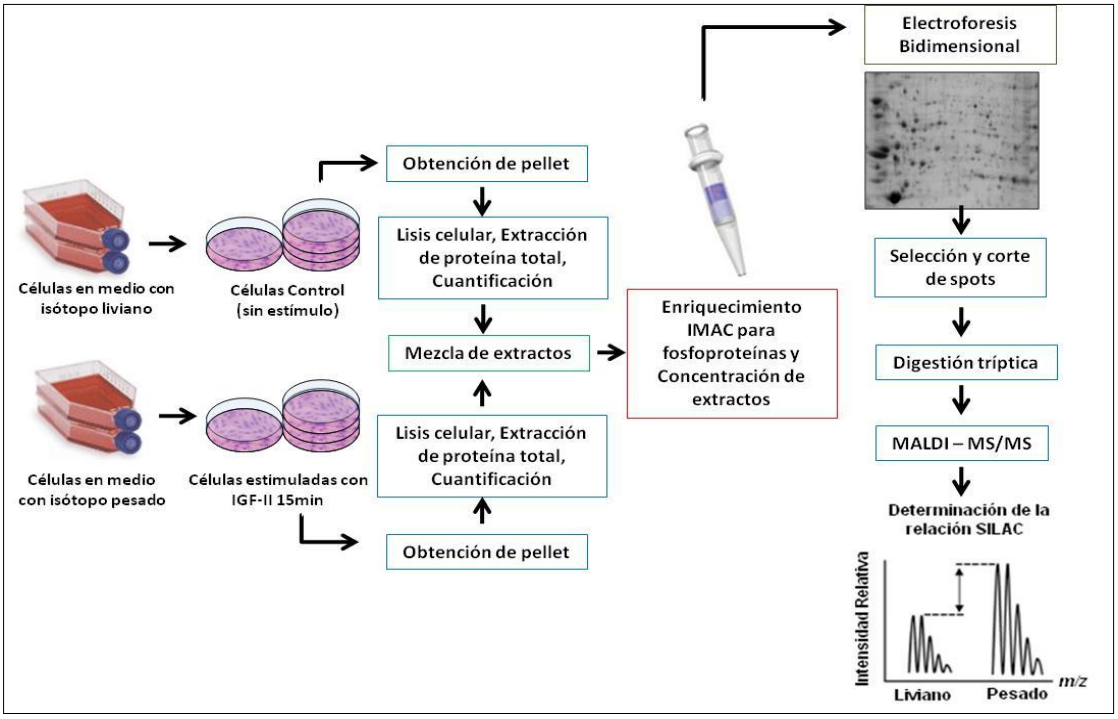
- Analizar por MALDI-TOF los fosfoproteomas inducidos por la estimulación con IGF-II en cada una de las líneas celulares.

9. ANEXOS

8.1 ANEXO A

8.1.1 Análisis cuantitativo de activación de proteínas inducidas por IGF-II

Metodología aplicada para el análisis cuantitativo de activación de proteínas inducidas por IGF-II



8.1.1.1 Marcación de líneas celulares con isótopos pesados (SILAC): Para realizar la marcación con aminoácido pesado se uso el kit Pierce® SILAC Protein Quantitation (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). Las líneas celular se cultivaron de manera independiente en dos grupos: uno con medio RPMI pesado ($^{13}C_6$ L – Lisina) suplementado con suero fetal bovino liofilizado (SFBL) al 10% y penicilina (100 UI/mL)/ estreptomicina (100 mg/mL) y otro con medio liviano (medio RPMI completo, con SFBL 10%) según las recomendaciones del fabricante para asegurar una incorporación completa del aminoácido por parte de las células en cultivo. Brevemente, el cultivo de cada línea celular se inició en botellas de 25cm^2, con una confluencia cercana al 20%

con el medio correspondiente a cada grupo (pesado o liviano) luego el cultivo se extendió a dos cajas de 75cm^2 para sembrar el número de platos necesarios para la extracción de proteína, con o sin estímulo (según figura 7). En cada etapa se realizó cambio de medio cada tercer día.

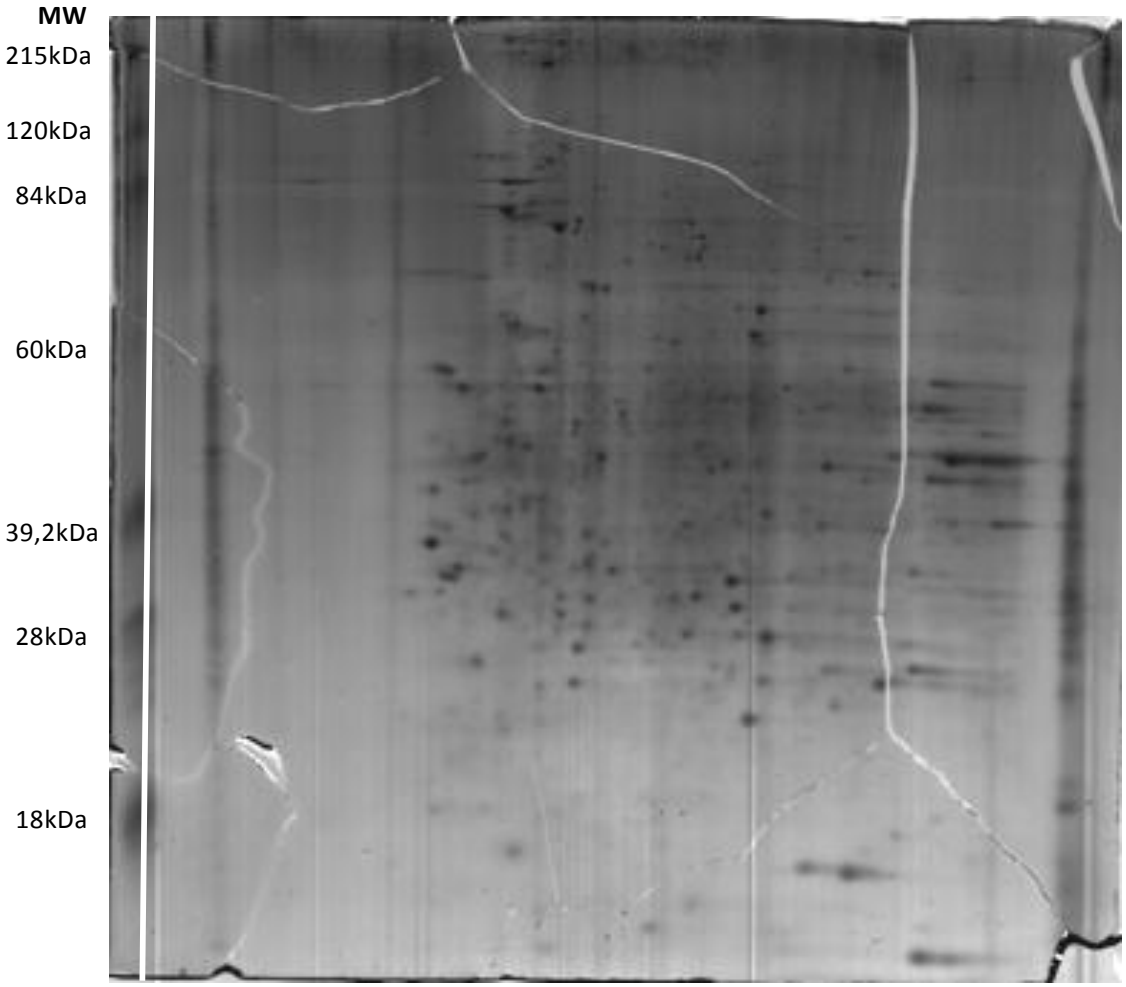
8.1.1.2 Enriquecimiento de extractos en fosfoproteínas: Para lograr el enriquecimiento en proteínas de membrana se uso el kit Pierce® Phosphoprotein Enrichment (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). De manera general, las células marcadas que estimuladas con IGF-II 10nM durante 10 minutos, y las control (sin estímulo); de acuerdo al diseño experimental (figura 7) se lisaron con buffer RIPA libre de EDTA complementado con inhibidores de proteasas (pestatina, leupetina, aprotinina a 2µg/ml, PMSF 1mM) y fosfatasas (NA_3VO_4 a 10mM); incubación por 30 minutos a 4ºC y se centrifugó a 14000rpm por 20 minutos, para extracción de la proteína total. El extracto de proteína se cuantifico usando el kit Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA).

2mg de proteína tanto de las células control y 2mg de las células estimuladas, se mezclaron para hacerlas pasar por las columnas de enriquecimiento de fosfoproteínas tipo IMAC, procedimiento que se realizó de nuevo tres veces. El pool de los extractos obtenidos se precipitaron usando partición de fases metanol–cloroformo, el pellet se resuspendió en buffer IEF-T. El extracto de proteína se cuantifico usando el kit Pierce 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA).

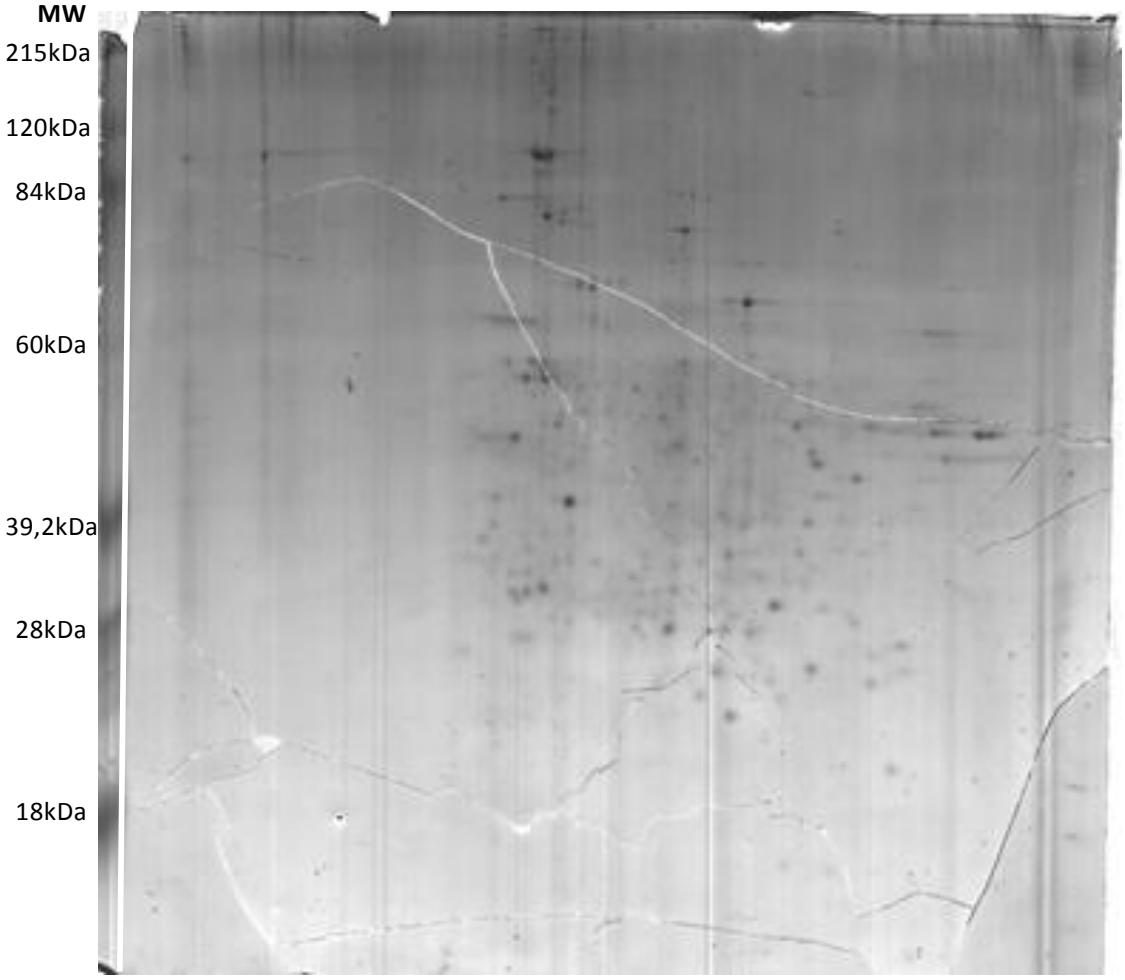
Los extractos enriquecidos en fosfoproteínas se sometieron a separación 2DE usando las condiciones anteriormente descritas, literal 4.2.1.2 . Para este caso se usaron 600µg de proteína para cada línea celular. Este ensayo se realizó por duplicado.

8.2 ANEXO B

Fosfoproteoma inducido por IGF-II en HeLa. Separación bidimensional de 300ug de proteína resultado de la mezcla de extracto enriquecido de células control y estimuladas con IGF-II 10nM por 15min.



Fosfoproteoma inducido por IGF-II en C33-A. Separación bidimensional de 300ug de proteína resultado de la mezcla de extracto enriquecido de células control y estimuladas con IGF-II 10nM por 15min.


MW
215kDa
120kDa
84kDa
60kDa
39,2kDa
28kDa
18kDa

10. FINANCIACIÓN DEL PROYECTO

Este proyecto recibió financiación de la Dirección de Investigaciones Sede Bogotá (DIB), de la Universidad Nacional de Colombia y del proyecto: *"Importancia de los receptores híbridos receptor de insulina-receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (InsR/IGF-IR) en las redes de señalización del sistema IGF"*, financiado por Colciencias (Código HERMES: 11386, Contrato 374/2008)

11. PRODUCTOS RELACIONADOS CON EL ESTUDIO

Como resultado de los avances en esta investigación fueron presentados los siguientes trabajos

Publicaciones:

- “A comparative proteomic study of cervical cancer invasión” manuscrito en preparación para ser enviado a la revista Molecular Human Reproduction

Ponencias:

- Efecto de IGF-I e IGF-II en proliferación y migración celular de adenocarcinoma cervical. XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Popayán, Octubre 6 – 10 de 2009

- A comparative proteomic study of cervical cancer invasion. Enviado y aceptado al HUPO 9th Annual World Congress, Sydney. Septiembre 19 – 23 de 2010.

- "Comparative study of the IGF system biological effects in HPV positive and negative cervical cancer cell lines“ Enviado y aceptado al 5th International Congress of the GRS-IGF Society , Nueva York, USA. October 3-7, 2010.

Conferencias:

- Aproximaciones proteómicas para el estudio de membranas. Curso Taller Proteómica: Fundamentos, Aplicaciones y Perspectivas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Mayo 10 al 14 de 2010

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS

1. OMS, *Control integral del cáncer cervicouterino: Guía de prácticas esenciales*. 2007. p. 280.
2. Lewis, J.M., *Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe*. 2004, Organización Panamericana de la Salud. p. 33.
3. Murillo, R.Q., A; Piñeros, M; Bravo, M; Cendales, R; Wiesner, C; Lizcano, L, *Modelo para el control del cáncer en Colombia*. 2006: Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología.
4. Steben, M.D.-F., E, *Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology.* Gynecologic Oncology, 2007. **107**(S2 - S5).
5. Rousseau, M.C.A., M; Villa, L. L; Costa, M. C; Rohan, T. E; Franco, E. L, *Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. , 2003. **12**(10): p. 1029 - 1037.
6. Trottier, H.M., S; Costa, M. C; Sobrinho, J. P; Duarte-Franco, E; Rohan, T. E; Ferenczy, A; Villa, L. L; Franco, E. L, *Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. , 2006. **15**(7): p. 1274 - 1280.
7. Walboomers, J.M.J., M.V; Manos, M.M; Bosch, F.X; Kummer, J.A; Shah K.V; Snijders, P.J; Peto, J; Meijer, C.J; Muñoz, N, *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.* J Pathol, 1999. **189**: p. 12 - 19.
8. Muñoz, N.B., X; de Sanjosé, S; Herrero, R; Castellsagué, X; Shah, K; Snijders, P; Meijer, C, *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.* N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518 - 527.
9. Bosch, F.X.M., M. M; Munoz, N; Sherman, M; Jansen, A. M; Peto, J; Schiffman, M.H; Moreno, V; Kurman, R; Shah, K.V, *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group.* J Natl Cancer Inst, 1995. **87**: p. 796 - 802.
10. Clifford, G.M.S., J; Plummer, M; Muñoz, N; Franceschi, S, *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis.* British Journal of Cancer, 2003. **88**: p. 63 - 73.
11. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
12. Caldieri, G., et al., *Cell and molecular biology of invadopodia.* Int Rev Cell Mol Biol, 2009. **275**: p. 1-34.
13. LeRoitha, D.R., C, *The insulin-like growth factor system and cancer.* Cancer Letters, 2003. **195**: p. 127 - 137.
14. Mathur, S.M., M; Underwood, P; Kohler, R; Creasman, W, *Circulating levels of insulin-like growth factor-II and IGF-binding protein 3 in cervical cancer.* Gynecologic Oncology, 2003. **91**: p. 486 - 493.
15. Boerner, J.B., J; Parsons S, *Overview of Oncogenesis*, in *The Cancer Handbook*, M.R. Alison, Editor. 2003. p. 27 - 34.
16. Saez, M.N., D; Lara, P, *Invasión y Metástasis.* Biocáncer, 2004. **1**: p. 1 - 8.

17. Krauss, G., *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 3 ed. 2003, Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
18. Knowles, M.S., P, *Introduction to the Cellular Biology and Molecular Biology of Cancer*. 4 ed. 2005: Oxford university Press. 455.
19. Jones, J.I.C.D.R., *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions.* Endocr Rev, 1995. **16**: p. 3 – 34.
20. Kenyon, C., *A conserved regulatory system for aging.* Cell 2001. **105**: p. 165 – 168.
21. Furstenberger, G.S., H. J, *Insulin-like growth factors and cancer.* Lancet Oncol 2002. **3**(298–302).
22. Samani, A.Y., S; LeRoith, D; Brodt, P, *The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights.* Endocrine Reviews, 2008. **28**(1): p. 20 - 47.
23. Ullrich, A.G., A; Tam, A. W; Yang-Feng, T; Tsubokawa, M; Collins, C; Henzel, W; Le Bon, T; Kathuria, S; Chen, E; Jacobs, S; Francke, U; Ramachandrau, J; Fujita-Yamaguchi, Y, *nsulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity.* EMBO J, 1986. **5**: p. 2503–2512.
24. Butler, A.A.Y., S; Gewolb, I. H; Karas, M; Okubo, Y; LeRoith, D, *Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1998. **121**: p. 19-26.
25. Giorgetti, S.B., R; Kowalski-Chauvel, A; Tartare, S; Van Obberghen, E, *The insulin and insulin-like growth factor-I receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro.* J Biol Chem, 1993. **268**: p. 7358–7364.
26. Petley, T.G., K; Jiang, W; Yang, H; Florini, J *Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses.* Horm Metab Res, 1999. **31**: p. 70–76.
27. Peruzzi, F.P., M; Dews, M; et al, *Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7203-7215.
28. Baron, V.C., V; Ferrari, P; Alengrin, F; Van Obberghen, E, *p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-I tyrosine kinase receptors.* J Biol Chem, 1998. **273**: p. 7162–7168.
29. Koval, A.P.K., M; Zick, Y; LeRoith, D *Interplay of the proto-oncogene proteins CrkL and CrkII in insulin-like growth factor-I receptor-mediated signal transduction.* J Biol Chem, 1998. **273**: p. 14780–14787.
30. Casamassima, A.R., E *Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130(Cas), focal adhesion kinase, and paxillin. Role of phosphatidylinositol 3 -kinase and formation of a p130(Cas).Crk complex.* J Biol Chem, 1998. **273**: p. 26149–26156.
31. Cavallaro, U.C., G., *Cell adhesion and signalling by cadherins and IG-CAMs in cancer.* Nat. Rev. Cancer, 2004. **4**: p. 118 - 132.
32. Mao, Q.L., Y; Zheng, X; Yang, K; Shen, H; Qin, J; Bai, Y; Kong, D; Jia, X; Xie, L, *Up-regulation of E-cadherin by small activating RNA inhibits cell invasion and migration in 5637 human bladder cancer cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **375**: p. 466–470.
33. Wanga, G.H., X; Lua, C; Sua, C; Luoa, S; Luo; Z, *Promoter-hypermethylation associated defective expression of E-cadherin in primary non-small cell lung cancer.* Lung Cancer, 2008.
34. Stegg, P.S., *Tumor metastasis: Mechanistic Insights and Clinical Challenges.* Nature Medicine, 2006. **12**(8): p. 895 - 904.

35. Guo, W.G., F.G, *Integrin signalling during tumour progression.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2004. **5**: p. 816 - 826.
36. Ruddon, R., *Cancer Biology*. 4 ed. 2007: Oford University Press. 505.
37. Hicklin, D.J.E., L.M. , *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis.* J. Clin. Oncol., 2005. **23**: p. 1011–1027.
38. Raghunand, N.G., R.A; Gillies, R.J and (2003), *Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours.* Br. J. Radiol., 2003. **76**(Spec No 1): p. S11–S22.
39. Ray, J.M.S.-S., W.G, *The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis.* European Respiratory Journal, 1994. **7**: p. 67 - 82.
40. M. L. Saez Bravo, D. Navarro Bosch, and P. C. Lara Jiménez, *INVASIÓN Y METÁSTASIS* Biocancer, 2oo4. **1**: p. 1-8.
41. Weber, R., *Molecular Mechanisms of Cancer*. 2007: Springer. 592.
42. Murphy, G.N., H, *Progress in matrix metalloproteinase research.* Molecular Aspects of Medicine, 2008. **29**: p. 290 - 308.
43. Pandey, R.P., N; Rao; M, *Proteases and Protease Inhibitors: Implications in Antitumorigenesis and Drug Development.* Int J Hum Genet, 2007. **7**(1): p. 67 - 82.
44. H. Birkedal-Hansen, W.G.I.M., M. K. Bodden, L J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, J. A. Engler, *Matrix Metalloproteinases: A Review.* Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 1993. **4**(1045-4411): p. 197-250.
45. J.M. Ray and W.G. Stetler-Stevenson, *The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis.* European Respiratory Journal, 1994. **7**: p. 2062–2072.
46. Noel, A.J., M; Maquoi, E, *Matrix metalloproteinases at cancer tumor–host interface.* Seminars in Cell & Developmental Biology, 2008. **19**: p. 52 - 60.
47. Bergers, G.B., R; McMahon, G; Vu, T.H; Itoh, T; Tamaki, K; Tanzawa, K; Thorpe, P; Itohara, S; Werb, Z; Hanahan, D, *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.* Nature Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-744.
48. Hamano, Y.Z., M; Sugimoto, H; Lively, J.C; Maeshima, Y; Yang, C; Hynes, R.O; Werb, Z; Sudhakar, A; Kalluri, R, *Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin.* Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 589–601.
49. Liotta, L.P., C, *Invasion y Metastasis*, in *The Cancer Handbook*, M.R. Alison, Editor. 2003. p. 225-234.
50. Monteagudo, C.e.a., *Inmunohistologic distribution of type IV collagenases in normal, benign, and malignant breast tissue.* American Journal of Pathology, 1990. **136**: p. 585 - 592.
51. Levy, A.e.a., *Increased expression of the 72 kDa type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma.* Cancer Research, 1991. **51**: p. 439-444.
52. Mignatti, P.e.a., *In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases.* Journal of Cell Biology 1986. **108**: p. 671-682.
53. Zhan, M.Z., H; Han, Z.C. , *Signalling mechanisms of anoikis.* Histol. Histopathol., 2004. **19**: p. 973–983.
54. Luzzi, K.J.e.a., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.* Am. J. Pathol., 1998. **153**: p. 865–873
55. Tan, S., H.T. Tan, and M.C. Chung, *Membrane proteins and membrane proteomics.* Proteomics, 2008. **8**(19): p. 3924-32.
56. Kabbani, N., *Proteomics of membrane receptors and signaling.* Proteomics, 2008. **8**(19): p. 4146-55.

57. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry* 5ed. 2001: W.H. Freeman and Company.
58. Braun, R.J., et al., *Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins.* Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(4): p. 1033-45.
59. Wallin, E. and G. von Heijne, *Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms.* Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 1029-38.
60. Josic, D. and J.G. Clifton, *Mammalian plasma membrane proteomics.* Proteomics, 2007. **7**(16): p. 3010-29.
61. Peirce, M. and R. Wait, eds. *Membrane Proteomics: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, ed. S. Protocols. Vol. 528. 2009.
62. Penque, D., *Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery.* Proteomics Clinical Applications, 2009. **3**(2): p. 155-172.
63. Grimsrud, P.A., et al., *Phosphoproteomics for the masses.* ACS Chem Biol, 2010. **5**(1): p. 105-19.
64. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling.* Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
65. Thingholm, T.E., O.N. Jensen, and M.R. Larsen, *Analytical strategies for phosphoproteomics.* Proteomics, 2009. **9**(6): p. 1451-68.
66. Sellors, J.W., Sankaranarayanan, R, *La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes* O.P.d.l. Salud, Editor. 2003, Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer: Washington, D.C. p. 140.
67. Erazo, J.V., *Manual de Patología Cervical*, U.d.P. Cervical, Editor. 2007, Universidad del Cauca: Colombia. p. 78.
68. Masters, J.R., *HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 315-9.
69. ATCC. *www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch*. 2009 Abril 21].
70. Scheffner, M.M., K; Byrne, J; Howley, P, *The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines.* Proc. Nati. Acad. Sci., 1991. **88**: p. 5523-5527.
71. Ramer, R. and B. Hinz, *Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1.* Journal of the National Cancer Institute, 2008. **100**(1): p. 59-69.
72. Fountoulakis, M., et al., *Protein profile of the HeLa cell line.* J Chromatogr A, 2004. **1038**(1-2): p. 247-65.
73. Dinamycis, N. *www.fixingproteomics.org*. 2007 [cited 2009.
74. Whitley, B.R., et al., *Expression of active plasminogen activator inhibitor-1 reduces cell migration and invasion in breast and gynecological cancer cells.* Experimental Cell Research, 2004. **296**(2): p. 151-162.
75. ATCC. *www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch*. 2008 [cited 2008 Octubre 15].
76. Vella, V.P., G; Sciacca, L; Mineo, R; Vigneri, R; Pezzino, V; Belfiore, A, *A Novel Autocrine Loop Involving IGF-II and the Insulin Receptor Isoform-A Stimulates Growth of Thyroid Cancer.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2002. **87**(1): p. 245-254.
77. Serrano, M.-L., *Expresión de factores de crecimiento IGF en células cervicales de mujeres con citología cervico-uterina negativa para neoplasia, diferentes grados de displasia y cáncer*, in *Departamento de Química*. 2006, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá, Colombia. p. 170.
78. Castellsagué, X., *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.* Gynecologic Oncology 2008. **110**: p. S4-S7.

79. Thomison, J.T., L; Shroyer; K, *Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma.* Human Pathology, 2008. **39**: p. 154 - 166.
80. Choi, Y.P., et al., *Proteomic analysis of progressive factors in uterine cervical cancer.* Proteomics, 2005. **5**(6): p. 1481-93.
81. Dehn, D.T., K. C; Shroyer, K. R *Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma.* Cancer 2007. **111**: p. 1-14.
82. Stoler, M.H., *Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis.* Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**: p. 16-28.
83. Peh, W.L.M., K; Christensen, N; et al, *Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease.* J Virol, 2002. **76**: p. 10401-10416.
84. Hwang, E.S.N., T; Dimaio, D, *The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells.* Virology, 1995. **211**: p. 227-233.
85. Ashrafi, G.H.H., M. R; Marchetti, B; O'Brien, P. M; Campo, M. S, *E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I.* Int J Cancer, 2005. **113**: p. 276-283.
86. Scheffner, M.H., J. M; Vierstra, R. D; Howley, P. M, *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53.* Cell, 1993. **75**: p. 495-505.
87. HumpherySmith, I. and W. Blackstock, *Proteome analysis: Genomics via the output rather than the input code.* Journal of Protein Chemistry, 1997. **16**(5): p. 537-544.
88. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.* J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
89. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.* Humangenetik, 1975. **26**(3): p. 231-43.
90. Southern, E.M., *Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel-Electrophoresis.* Journal of Molecular Biology, 1975. **98**(3): p. 503-&.
91. Rougeon, F., P. Kourilsky, and B. Mach, *Insertion of a Rabbit Beta-Globin Gene Sequence into an Escherichia-Coli Plasmid.* Nucleic Acids Research, 1975. **2**(12): p. 2365-2378.
92. Westermeier, R., T. Naven, and H.-R. Höpker, *Proteomics in Practice. A Guide to Successful Experimental Design*. 2 ed, ed. W.-V.V.G.C. KGaA. 2008, Weinheim.
93. Vesterberg, O.A.Y., *Method of Isoelectric Fractionation*. 1969: Estados Unidos.
94. Company, G.E., *Handbook: Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography. Principles and Methods*. 2006: Suecia.
95. Han, X., A. Aslanian, and J.R. Yates, 3rd, *Mass spectrometry for proteomics.* Curr Opin Chem Biol, 2008. **12**(5): p. 483-90.
96. Jain, K.K., *Innovations, challenges and future prospects of oncoproteomics.* Mol Oncol, 2008. **2**(2): p. 153-60.
97. Reymond, M.A. and W. Schlegel, *Proteomics in cancer.* Adv Clin Chem, 2007. **44**: p. 103-42.
98. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
99. Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.* Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1327-33.
100. Shevchenko, A., et al., *In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes.* Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2856-60.

101. Bhatia, V., et al., *Software Tool for Researching Annotations of Proteins: Open-Source Protein Annotation Software with Data Visualization.* Analytical chemistry, 2009. **81**(20): p. 8387-8395.
102. Surmacz, E., *Function of the IGF-I receptor in breast cancer.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(1): p. 95-105.
103. Mathur, S.P.M., R. S; Young, R. , *Human papilloma virus (HPV) protein E6/E7 and epidermal growth factor receptor (EGF-R) levels in women with cervical cancer and CIN.* C Am J Reprod Immunol, 2001. **46**(4): p. 280-287.
104. Mathur, R.S.M., S. P; Young, R. C. , *Up regulation of epidermal growth factor receptors (EGF-R) by nicotine in cervical cancer cell lines: this effect may be mediated by EGF.* Am J Reprod Immunol, 2000. **44**: p. 114-120.
105. Steller, M.A.D., C.H; Zou, Z, *Insulin-like growth factor II mediates epidermal growth factor-induced mitogenesis in cervical cancer cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1995. **92**: p. 11970–11974.
106. Nakamura, K.H., A; Kodama, J; Miyagi, Y; Yoshinouchi, M; Kudo, T *Down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor by antisense RNA can reverse the transformed phenotype of human cervical cancer cell lines.* Cancer Research, 2000. **60**: p. 760–765.
107. Serrano, M.-L.S.-G., M; Bravo M, *Insulin-like growth factor system gene expression in cervical scrapes from women with squamous intraepithelial lesions and cervical cancer.* Growth Hormone & IGF Research 2007. **17**: p. 492-499.
108. Serrano, M.L., et al., *Serum levels of insulin-like growth factor-I and -II and insulin-like growth factor binding protein 3 in women with squamous intraepithelial lesions and cervical cancer.* Biomedica, 2006. **26**(2): p. 258-68.
109. Serrano, M.L., et al., *Differential expression of IGF-I and insulin receptor isoforms in HPV positive and negative human cervical cancer cell lines.* Horm Metab Res, 2008. **40**(10): p. 661-7.
110. Sciacca, L.C., A; Pandini, G; Mineo, R; Frasca, F; Scalia, P; Sbraccia, P; Goldfine, I. D; Vigneri, R; Belfiore, A, *Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism.* Oncogene, 1999. **18**: p. 2471-2479.
111. Diaz, L.E., et al., *IGF-II regulates metastatic properties of choriocarcinoma cells through the activation of the insulin receptor.* Mol Hum Reprod, 2007. **13**(8): p. 567-76.
112. Myung, J.K., et al., *Expressional patterns of chaperones in ten human tumor cell lines.* Proteome Sci, 2004. **2**(1): p. 8.
113. Gien, L.T., M.C. Beauchemin, and G. Thomas, *Adenocarcinoma: a unique cervical cancer.* Gynecol Oncol, 2010. **116**(1): p. 140-6.
114. Na, S. and E. Paek, *Quality assessment of tandem mass spectra based on cumulative intensity normalization.* J Proteome Res, 2006. **5**(12): p. 3241-8.
115. Kaiser, B.K., et al., *Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands.* Nature, 2007. **447**(7143): p. 482-6.
116. Feng, Y. and C.A. Walsh, *The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling.* Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1034-8.
117. Gressens, P., *Pathogenesis of migration disorders.* Curr Opin Neurol, 2006. **19**(2): p. 135-40.
118. Ravid, D., et al., *Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration.* Exp Cell Res, 2008. **314**(15): p. 2762-73.
119. Bernatchez, P.N., et al., *Myoferlin regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 stability and function.* J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30745-53.
120. Martin, T.A., et al., *The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis.* Crit Rev Oncol Hematol, 2003. **46**(2): p. 165-86.

121. Dall, P., et al., *Increasing incidence of CD44v7/8 epitope expression during uterine cervical carcinogenesis.* Int J Cancer, 1996. **69**(2): p. 79-85.
122. Takahashi, E., et al., *Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction.* J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 4060-73.
123. He, M., et al., *Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 170.