



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Análisis del proteoma de la mitocondria en líneas celulares
de Cáncer Cervicouterino**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

ROBERTO JIMÉNEZ ÁNGEL

DIRECTOR

Dr. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2020

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para titulación de Licenciatura otorgada a través del donativo para investigación 220790.

El presente trabajo de Investigación se realizó en el laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas (CCG), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), a la Facultad de Ciencias Biológicas y al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM (CCG-UNAM), por haber contribuido en mi formación como biólogo.

A mi director de tesis, Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, por haberme dado la grata oportunidad de llevar a cabo mi tesis bajo su dirección, por su paciencia y por todas las atenciones que me brindó durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Leopoldo Gómez Caudillo, por el apoyo brindado durante el análisis estadístico de este proyecto, la asesoría durante la construcción de los *tree map*, la construcción de las redes de interacción proteína-proteína, la revisión constante de este escrito, las recomendaciones y palabras de motivación.

A la M. en C. Ariadna Ortega, por la orientación durante el cultivo celular y el enriquecimiento de mitocondrias, así como la revisión de la redacción de la misma metodología.

A la M. en C. Diana L. Fernandez Coto, por la orientación de la implementación del enriquecimiento mitocondrial.

Al equipo del laboratorio de proteómica del CCG-UNAM, quienes forman parte y quienes formaron parte del mismo; Dr. Juan Luna, Dr. Alberto Checa, Dr. Jeovannis Gil, por su apoyo y todo el conocimiento que me otorgaron en diferentes etapas de este proyecto.

Al Dr. Edgar Dantan por su confianza y apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, por la confianza que me brindó durante este proyecto.

A mi madre, gracias por amarme y procurar mi bienestar durante todo este viaje de aprendizaje llamado vida.

A mis hermanos por su apoyo incondicional.

Al Biol. Ismael H. Vera Navarro, por todo el apoyo, las opiniones otorgadas y su amistad.

ÍNDICE

I.	Introducción	1
I.I.	Definición de cáncer	1
I.I.I.	Características particulares del cáncer	2
I.I.I.I.	Señalización proliferativa	3
I.I.I.II.	Evasión de los supresores de crecimiento	4
I.I.I.III.	Resistencia a la muerte celular	5
I.I.I.IV.	La inmortalidad replicativa	5
I.I.I.V.	Inducción de angiogénesis	6
I.I.I.VI.	Activación de la invasión y metástasis	6
I.I.I.VII.	Mutación e inestabilidad genómica	7
I.I.I.VIII.	Inflamación promovida a tumor	7
I.I.I.IX.	Reprogramación del metabolismo energético	8
I.I.I.X.	Evasión de la destrucción inmune	8
I.I.II.	Estadísticas del cáncer	8
I.II.	Cáncer cérvicouterino	10
I.III.	Generalidades de Papilomavirus humano	12
I.IV.	Entrada del Papilomavirus humano a la célula y su relación con el cáncer cervicouterino	12
I.IV.I.	El genoma del virus del Papiloma humano	16
I.IV.II.	Replicación de VPH y oncoproteínas en CaCu	16
I.V.	Las líneas celulares como modelo de estudio del cáncer cervicouterino	18
I.VI.	La función de la mitocondria en el cáncer	19
I.VII.	Relevancia de las proteínas mitocondriales	22
I.VIII.	Proteómica	23
I.VIII.I.	Proteómica en cáncer	24
I.VIII.II.	Proteómica en cáncer cervicouterino	25
I.VIII.III.	La oncoproteómica enfocada a la mitocondria	28
II.	Justificación	30
III.	Hipótesis	31
IV.	Objetivos	31
IV.I.	Objetivos específicos	31
V.	Material y métodos	32

V.I. Cultivo de líneas celulares	32
V.I.II. Rehabiliación celular	33
V.II. La cosecha de las líneas celulares	33
V.III. El enriquecimiento de mitocondrias	33
V.IV. La extracción de proteínas	35
V.V. Normalización de la carga del enriquecimiento mitocondrial	35
V.VI. Reducción y alquilación.....	36
V.VII. La digestión de proteínas	36
V.VIII. Análisis de las muestras mediante LC MS/MS	37
V.IX. El análisis estadístico de las proteínas.....	38
V.X. La construcción de los <i>tree map</i>	39
V.XI. El desarrollo de las redes de interacción proteína-proteína (PPI)	39
VI. Resultados.....	40
VI.I. La validación del enriquecimiento mitocondrial.....	40
VI.II. El análisis cualitativo.....	40
VI.III. El análisis estadístico.....	40
VI.IV. Enriquecimiento de proteínas.....	43
VI.IV.I. El enriquecimiento mitocondrial de la línea celular HaCaT.....	44
VI.IV.I.I. Organización del citoesqueleto.....	45
VI.IV.I.II. Iniciación de la traducción	45
VI.IV.I.III. Mantenimiento de la polaridad celular	46
VI.IV.II. El enriquecimiento de proteínas para CaLo	47
VI.IV.II.I. Liberación del citocromo c de la mitocondria.....	47
VI.IV.II.II. Ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial ..	48
VI.IV.II.III. Proceso óxido-reducción	48
VI.IV.II.IV. Respiración aeróbica	49
VI.IV.II.V. Fusión mitocondrial.....	49
VI.IV.II.VI. Transporte de proteínas	50
VI.IV.II.VII. Traducción	50
VI.IV.III. El enriquecimiento para SiHa	51
VI.IV.III.I. Proceso glicolítico.....	51
VI.IV.III.II. Regulación de la respuesta inmune	52
VI.IV.III.III. Homeostasis redox	52
VI.IV.III.IV. Entrada viral hacia la célula hospedera	52
VI.IV.III.V. Gluconeogénesis	53

VI.IV.III.VI. Empaquetamiento de proteínas	53
VI.IV.III.VII. Regulación negativa del proceso apoptótico.....	53
VI.IV.III.VIII. Regulación de la respuesta de defensa a virus	54
VI.V. Obtención de los genes clave.....	54
VI.V.I. Los genes clave de la línea celular HaCaT	55
VI.V.II. Los genes clave de la línea celular CaLo	57
VI.V.III. Los genes clave de la línea celular SiHa	58
VII. Discusión	60
VII.I. Los procesos biológicos presentados en HaCaT muestran un entorno regular asociados a la mitocondria en comparación con las líneas celulares cancerosas	61
VII.II. CaLo delimita un perfil mayormente oxidativo	61
VII.II.I. Procesos de óxido-reducción	62
VII.II.II. Unión del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial	63
VII.II.III. Traducción	64
VII.III. SiHa es una línea celular mayormente glucolítica en comparación con la línea celular CaLo.....	65
VII.III.I. El proceso glucolítico.....	66
VII.IV. La influencia del VPH en la expresión de proteínas.....	68
VII.V. Los hubs encontrados en la mitocondria de la línea celular CaLo	69
VII.VI. Los hubs encontrados en SiHa.....	70
VIII. Conclusiones.....	73
IX. Bibliografía.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: El microentorno del tumor (modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).....	2
Figura 2: Esquema de las características particularidades del cáncer (modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).	3
Figura 3: Gráfica de los tipos de cáncer presentes en hombres y mujeres con más número de muertes en el mundo, mostrado en números de casos (modificado de IARC, GLOBOCAN 2018).	9
Figura 4: Gráfica de los tipos de cáncer con mas incidencia en el mundo, mostrado en números (modificado de IARC, GLOBOCAN 2018).	9
Figura 5: Gráfica de los países con mayor números de casos de defunciones por cáncer cervicouterino. (modificado de IARC, 2018).	10
Figura 6: Gráfica de los tipos de cáncer con más casos de muertes en mujeres de México (modificado de IARC, 2018).	10
Figura 7: El ciclo viral.....	15
Figura 8: Diagrama de flujo general.	32
Figura 9: Diagrama de flujo del enriquecimiento mitocondrial por centrifugación diferencial y gradiente de sacarosa.....	34
Figura 10: Heatmap de los diferentes valores de cantidad de proteína expresada en las mitocondrias de las tres líneas celulares con su respectivo triplicado biológico.	42
Figura 11: Representación de la expresión de proteínas en la línea celular HaCaT mediante un treemap.	44
Figura 12: Representación de la expresión de proteínas en la línea celular CaLo mediante un treemap.	47
Figura 13: Representación de la expresión de proteínas de la línea celular SiHa utilizando un treemap.	51
Figura 14: Red de interacción de proteínas expresadas en las mitocondrias de la línea celular HaCaT (control).	55
Figura 15: Red de interacción de proteínas expresadas en las mitocondrias para la línea celular CaLo (VPH 18).	57
Figura 16: Red de interacción de proteínas expresadas para la línea celular SiHa (VPH 16)	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación del sistema FIGO para cáncer cervicouterino (Sobin y Wittekind, 2002).	11
Tabla 2: Biomarcadores identificados por Proteómica para distintos tipos de cáncer.....	25
Tabla 3: Biomarcadores específicos para CaCu (modificado de Dasari et al., 2015).	27
Tabla 4: Representación de las distribuciones de proteínas utilizadas para la ontología génica.....	43

Resumen

El cáncer cervicouterino es una de las neoplasias más frecuentes y mortales en mujeres mexicanas, ya que presentó una incidencia de 7,896 casos y una mortalidad de 4,121 casos en 2018. Además, México se encuentra entre los países con mayor incidencia de cáncer cervicouterino en Centroamérica (GLOBOCAN, 2018). Estos datos ubican a esta enfermedad como un gran reto para la salud pública a nivel nacional.

Actualmente esta perfectamente establecida la relación que existe entre el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer cervicouterino, López-Saavedra y Lizano-Soberón (2006) lo identificaron en 99,8% de mujeres con cáncer cervicouterino. Cerca de 40 tipos del VPH pueden infectar la región anogenital, de los cuales los tipos virales de alto riesgo oncogénico mas frecuentes son los 16 y 18, estos se caracterizan por inducir al desarrollo del tumor maligno mediante dos importantes proteínas E6 y E7, las cuales están involucradas en el control del ciclo celular, apoptosis, proliferación celular, procesos de reparación del DNA, respuesta inmune e inactivan a los genes supresores de tumores p53 y pRB respectivamente, favoreciendo la transformación maligna (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

La mitocondria es un elemento primordial en el desarrollo del cáncer. Las células cancerosas presentan una sobreproducción de ATP como requerimiento para su crecimiento, una dependencia mayor al metabolismo mitocondrial (Tian et al., 2018), mutaciones en el ADN mitocondrial y enzimas tales como; succinato deshidrogenasa, fumarato hidratasa e isocitrato deshidrogenasa (Wallace, 2012), cambios en el nivel intracelular de calcio (Hsu et al., 2016), el estrés oxidativo debido a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Vyas et al., 2016) y la liberación de proteínas proapoptóticas debido la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Norberg, et al., 2010). Estas características sugieren que la función incorrecta de la mitocondria juega un papel crítico en la progresión del cáncer, ya que las proteínas asociadas a estos procesos pueden ser blancos para el desarrollo de las terapias anticáncer.

En el presente proyecto se utilizó la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con el propósito de identificar las proteínas de extractos mitocondriales enriquecidos de dos líneas celulares de cáncer cervicouterino con presencia de VPH, CaLo (VPH18) y SiHa (VPH16), utilizando una línea celular control de queratinocitos de neonato (HaCaT).

Se obtuvo un total de 1704 proteínas totales, de las cuales 62 proteínas fueron específicas para HaCaT, 110 para CaLo y 24 para SiHa. El análisis de la expresión de proteínas entre las líneas celulares se llevó a cabo por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Se obtuvieron 99 proteínas sobreexpresadas en HaCaT, 103 proteínas en CaLo y 177 proteínas en SiHa.

Con las proteínas sobreexpresadas en cada línea celular se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento para mostrar los procesos más significativos de cada línea celular. Así mismo, estos datos señalan la presencia de procesos biológicos asociados a tumorigénesis en las líneas celulares de cáncer cervicouterino, estos resultados muestran un perfil oxidativo en CaLo y un perfil asociado a glicólisis aeróbica en SiHa.

Finalmente se construyó una red de interacciones proteína-proteína de cada línea celular para determinar los "genes clave" de los principales procesos biológicos. Los "genes clave" de HaCaT (HNRNPA3 y HNRNPM) fueron previstos por tener funciones principalmente en el procesamiento de ARN, la biogénesis ribosomal (RPS7 y NPM1) y la asociación al citoesqueleto (VCL). Por otro lado, los "genes clave" presentes en las líneas celulares de cáncer cervicouterino exhiben funciones asociadas al desarrollo del tumor; en el caso de CaLo (EGFR) la asociación a metástasis y la síntesis de ATP (ATP5D, ATP5L, ATP5O, ATP5F1). Por otro lado, en SiHa; invasión (MYH10), la inducción de angiogénesis (ISG15), la evasión de apoptosis (HSPA5), la homeostasis redox (P4HB), así como la asociación con el virus (ITGB1).

I. Introducción

I.I. Definición de cáncer

Actualmente el cáncer es considerado como un desorden de células que se reproducen de manera anormal, dirigiendo a la formación de tumores malignos que crecen dañando y alterando la fisiología de tejidos vecinos (Sánchez, 2015). Los tumores, en general tienden a ser heterogéneos, se ha demostrado en distintos estudios que las muestras tumorales incluyen células normales, células estromales, vasos sanguíneos e incluso células inmunes, entre otras (Yates y Campbell, 2012) (figura 1). Es decir, la evolución del cáncer es el resultado de las interacciones celulares y moleculares de las células tumorales con el microentorno del tumor (Bindea et al.,2010).

El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina carcinogénesis. Este suceso ha sido revisado mediante el desarrollo de técnicas genéticas, las cuales establecen, que la transformación progresiva de células normales a células altamente malignas es llevada a cabo por alteraciones del genoma. Las mutaciones del material genético le confieren a la célula una capacidad de reproducirse a una tasa mayor que su sucesora, generando una descendencia que conserva esta mutación. Posteriormente, las células hijas acumulan subsecuentes, y diversas mutaciones que permiten generar clones, así, estos presentarán capacidades superiores de proliferación, con respecto a las células normales (Catherine Sánchez, 2015). Por otro lado, las células del sistema inmune son capaces de eliminar algunas de estas células tumorales. Sin embargo, algunos de estos clones pueden adquirir nuevas capacidades que les permite evadir los mecanismos de control celular, desarrollando neoplasia (Garraway, 2013).

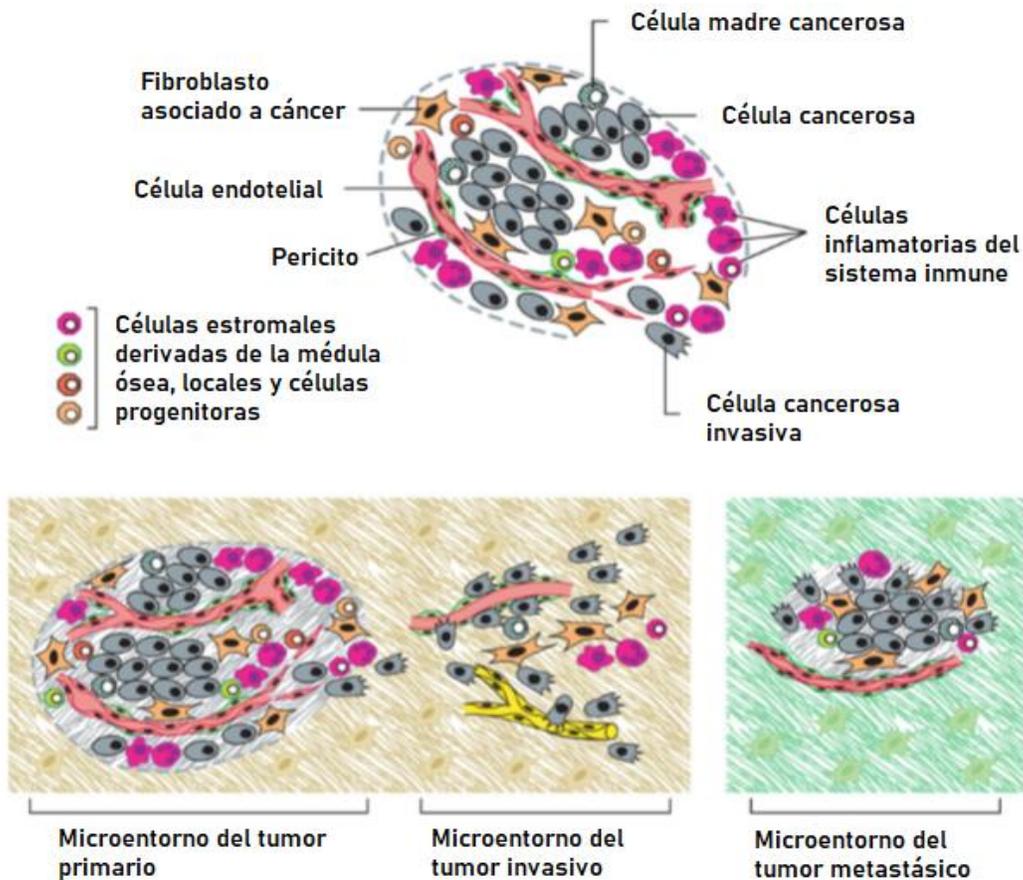


Figura 1: El microentorno del tumor (modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

I.I.I. Características particulares del cáncer

Las principales características del cáncer fueron descritas por Hanahan y Weinberg en 2011 (figura 2), estas características constituyen un perfil organizado para el daño neoplásico, las cuales son adquiridas por las células durante la carcinogénesis (Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 2: Esquema de las características particulares del cáncer (modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

I.I.I.I. Señalización proliferativa

La señalización proliferativa asegura la homeostasis celular, permitiendo el número de células suficientes para mantener una función correcta y una estructura tisular adecuada. En los tejidos normales se encuentra controlada por; la producción y la liberación de señales inductoras de crecimiento, la progresión a través del ciclo celular y el crecimiento de la célula. En el caso de las células cancerosas estas señales inductoras de crecimiento se encuentran desreguladas, la existencia de estas señales son permitidas en gran parte por los factores de crecimiento que se unen a receptores de superficie celular que usualmente contienen dominios intracelulares de tirosina cinasa, de esta manera se emiten señales mediante rutas de señalización intracelular las cuales regularán la progresión a través del ciclo celular y también el incremento del tamaño celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

Así mismo, las células cancerosas pueden adquirir la capacidad para sostener la señalización proliferativa mediante rutas alternativas como; la producción de ligandos

de factores de crecimientos propios, resultando en estimulación proliferativa autocrina (Hanahan y Weinberg, 2011). Las señales inductoras de crecimiento también se han descrito asociadas a otras propiedades celulares como: el metabolismo energético y la sobrevivencia celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

I.I.I.II. Evasión de los supresores de crecimiento

Las células cancerosas pueden evitar procesos que regulan negativamente la proliferación celular, muchos de estos procesos dependen de las acciones de genes supresores de tumores. Los genes supresores de tumores operan de diferente manera para reducir el crecimiento y la proliferación celular, dichos genes han sido descritos por su inactivación en diferentes tipos de cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

Experimentos con ratones han demostrado que algunos genes funcionan como supresores de tumores ya sea por la pérdida o aumento de estos, los dos genes supresores de tumores más conocidos son RB (asociado a retinoblastoma) y las proteínas TP53 (proteína 53 asociada a tumor, TP53: por sus siglas en inglés). Estos genes operan controlando el crecimiento celular por medio de dos circuitos que dirigen a la adecuada proliferación celular, o alternativamente a la senescencia celular o apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011). La proteína RB integra señales extracelulares e intracelulares para regular el ciclo y el crecimiento celular por medio de señales inhibitorias de crecimiento (Burkhart y Sage, 2008; Deshpande et al., 2005; Sherr y McCormick, 2002; Hanahan y Weinberg, 2011). Pero en las células cancerosas con defectos en la función de RB se produce una inestabilidad que permite la proliferación celular. Por otra parte, si TP53 recibe entradas de sensores de estrés y anormalidades, si el daño al genoma es excesivo, si existe una escasez en la oxigenación, concentración de glucosa, niveles de nucleótidos o señales inductoras de crecimiento, TP53 puede detener la progresión celular hasta que las condiciones sean normalizadas, incluso en caso de que exista un daño grave o irreparable TP53 dirigirá a apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011).

I.I.I.III. Resistencia a la muerte celular

Este proceso es llevado a cabo cuando las células cancerosas evitan la muerte celular programada, como es conocido la apoptosis es inducida por el estrés fisiológico que las células cancerosas presentan durante la tumorigénesis, resultado del desequilibrio de la señalización oncogénica alta y el daño a ADN (Adams y Cory, 2007; Lowe et al., 2004).

La maquinaria apoptótica compuesta por la señalización extracelular asociada a Fas (receptor de muerte celular) conocida como apoptosis extrínseca, y la señalización intracelular también conocida como intrínseca (asociada a la mitocondria), presentan la activación de caspasas 8 y 9 respectivamente que dirigen a una cascada proteolítica. La regulación de la apoptosis es controlada por la familia de proteínas regulatorias Bcl-2 (Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 y A1), las cuales son unidas a dos proteínas proapoptóticas (Bax y Bak), estas proteínas proapoptóticas se encuentran presentes en la membrana externa mitocondrial las cuales liberan citocromo c entre otras proteínas de señalización proapoptóticas (Adams y Cory, 2007; Willis y Adams, 2005). Por otro parte, las células tumorales presentan variedad de estrategias para evadir la apoptosis, los más comunes serían: la pérdida de TP53, lo cual provoca que no exista ningún sensor de daño durante la apoptosis; el incremento de la expresión de reguladores antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xl, o bien, el sobrevivimiento de factores proapoptóticos como Bax, Bim y Puma (Hanahan y Weinberg, 2011). Además, se ha descrito que la apoptosis puede ser anulada en tumores malignos (Adams y Cory, 2007; Lowe et al., 2004).

I.I.I.IV. La inmortalidad replicativa

Las células cancerosas surgen de la población celular en crisis presentando un potencial replicativo conocido como inmortalización (Hanahan y Weinberg, 2011). La proliferación ilimitada se encuentra ampliamente asociada a la telomerasa encontrada en los cromosomas (Blasco, 2005; Shay y Wright, 2000), la telomerasa protege los extremos de los cromosomas agregando segmentos repetidos de telómero al final del ADN telomérico. Sin embargo, en las células no inmortalizadas la telomerasa pierde funcionalidad, pero en la mayoría de células inmortalizadas espontáneamente, incluyendo las células cancerosas, la telomerasa se encuentra expresada funcionalmente (Hanahan y Weinberg, 2011).

I.I.I.V. Inducción de angiogénesis

Durante la embriogénesis se desarrolla la vascularización y todos los procesos adyacentes a ella, procesos que en el adulto ya han finalizado; en contraste, con el tumor cancerígeno ocurre una vasculatura quiescente conocida como angiogénesis, que continúa ampliándose a nuevos vasos sanguíneos. Esta vasculatura es inducida durante el desarrollo de los diferentes tipos de cáncer invasivos (Hanahan y Weinberg, 2011), la cual tiene el propósito de expandir el crecimiento neoplásico (Hanahan y Folkman, 1996).

Existen reguladores angiogénicos que inhiben, o estimulan a las células vasculares endoteliales, estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización con unión a receptores celulares, algunos de ellos son: el factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A), y la trombospondina 1 (TSP-1) (Hanahan y Weinberg, 2011). El gen VEGF-A codifica ligandos involucrados en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo posnatal y embrionario, pero también en la homeostasis de las células endoteliales durante situaciones patológicas y fisiológicas en el adulto (Hanahan y Weinberg, 2011). No obstante, la expresión del gen VEGF puede ser sobrerregulada por la señalización oncogénica (Ferrara, 2009; Mac Gahann y Popel, 2008; Carmeliet, 2005).

I.I.I.VI. Activación de la invasión y metástasis

El multiproceso de invasión y metástasis abarca muchos cambios celulares entre los que destacan: la invasión local, la intravasación de las células cancerosas hacia vasos linfáticos y sanguíneos, el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfáticos y sanguíneos, posteriormente el escape de las células cancerosas de los vasos al parénquima de tejidos distantes (extravasación), seguido de la formación de nódulos pequeños de células cancerosas, y finalmente, el crecimiento de las lesiones micrometastásicas hacia tumores macroscópicos o usualmente llamado colonización (Hanahan y Weinberg, 2011). La proteína E-caderina es de suma importancia para la adhesión celular, la cual forma uniones adherentes con las células adyacentes. Sin embargo, en las células cancerosas se describe una inactivación y subregulación de esta proteína, la cual podría dirigir a invasión (Hanahan y Weinberg, 2011).

I.I.I.VII. Mutación e inestabilidad genómica

La habilidad de la polimerasa en el genoma para resolver y detectar defectos en el ADN es altamente exitosa. Sin embargo, pueden llegar a existir mutaciones en cada generación celular, y en el caso de las células cancerosas no es la excepción. Las células cancerosas tienden a incrementar los rangos en mutaciones (Negrini et al., 2010; Salk et al., 2010), y estas mutaciones también suelen ser producidas por agentes mutagénicos, la acumulación de mutaciones puede ser acelerada comprometiendo la integridad genómica causando daño celular, senescencia o apoptosis (Jackson y Bartek, 2009; Kastan, 2008; Sigal y Rotter, 2000). Es importante mencionar que TP53 tiene una función importante en este proceso, detectando el daño a ADN, activando la maquinaria de reparación para restaurar el ADN dañado, así como inactivando o interceptando moléculas mutagénicas antes de que causen daño en el ADN (Negrini et al., 2010; Ciccia y Elledge, 2010; Jackson y Bartek, 2009; Kastan, 2008; Harper y Elledge, 2007; Friedberg et al., 2006).

I.I.I.VIII. Inflamación promovida a tumor

Cada lesión neoplásica contiene células inmunes, estas células han sido detectadas por técnicas de tinción histoquímicas (Pages et al., 2010), con las que se han demostrado que la presencia de estas células son un intento del sistema inmune para erradicar los tumores por medio de la respuesta inmune. Sin embargo, el tumor evade la destrucción inmune (Hanahan y Weinberg, 2011). En otros experimentos se ha demostrado que los efectos inductores de tumores de las células inmunes y la asociación al sistema inmune innato presentan un papel en la progresión neoplásica (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian y Pollard, 2010; Colotta et al., 2009), describiendo así mismo, que la inflamación puede contribuir a múltiples características facultativas del cáncer por medio de moléculas bioactivas ante el microentorno tumoral, que incluyen: factores de crecimiento para la proliferación, factores proangiogénicos, enzimas modificantes de la matriz celular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian y Pollard, 2010; Karnoub y Weinberg, 2007)

I.I.I.IX. Reprogramación del metabolismo energético.

Las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de glucosa y su producción energética, esta reprogramación sucede cuando existe una limitación de su metabolismo energético en gran parte de la glicólisis que dirige a un proceso conocido como "glicólisis aeróbica". Durante esta reprogramación metabólica aparentemente establece, las células cancerosas compensan la baja eficiencia de la producción de ATP, que era proporcionada por la glicólisis para la fosforilación oxidativa mitocondrial (Hanahan y Weinberg, 2011). Así mismo, se ha demostrado que gran parte del proceso de reprogramación metabólica es por la sobrerregulación de transportadores de glucosa, como GLUT1, el cual incrementa el importe de glucosa hacia el citoplasma (Jones y Thompson, 2009; DeBerardinis et al., 2008; Hsu y Sabatini, 2008). Por lo tanto, el incremento y la utilización de glucosa ha sido documentado en muchos tipos de tumores, este estimulante glicolítico ha sido descrito asociado a la activación de oncogenes como Ras, Myc, y TP53 (DeBerardinis et al., 2008; Jones y Thompson, 2009), dichas alteraciones en las células tumorales han sido asociadas a beneficiar la tumorigénesis, confiriendo características de la proliferación celular y la evasión a la apoptosis.

I.I.I.X. Evasión de la destrucción inmune

El sistema inmune juega un papel importante en la erradicación de la formación y progresión de neoplasias y micrometástasis en algunas formas cánceres no inducidos por virus. Las pruebas hechas con ratones deficientes de varios componentes del sistema inmune han demostrado que los tumores son más frecuentes y crecen más rápido en ratones inmunodeficientes, particularmente deficientes del desarrollo o función de CD8+, linfocitos T citotóxicos (CTLs), CD4+Th1 células T y las células asesinas naturales (NK), las cuales conducen a un incremento en la incidencia del tumor (Teng et al., 2008; Kim et al., 2007).

I.I.II. Estadísticas del cáncer

El cáncer es considerado una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo según datos de la OMS (OMS, 2012). En el año 2018 existieron 9.6 millones de muertes relacionadas a cáncer, los tipos de cáncer con mayor número de

defunciones fueron los siguientes: cáncer de pulmón, hígado, estómago, mama, colorrectal, esófago y cervicouterino, entre otros (GLOBOCAN, 2018) (figura 3).

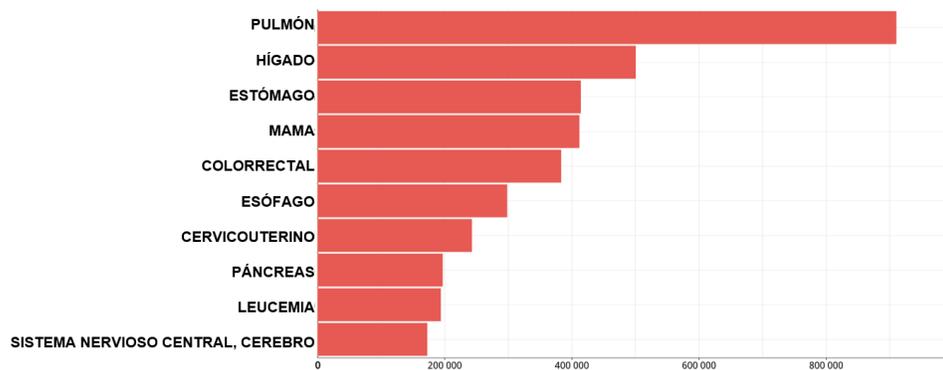


Figura 3: Gráfica de los tipos de cáncer con más número de muertes en el mundo, mostrado en números de casos (modificado de IARC, GLOBOCAN 2018). En el eje X se muestra el número de muertes, y en el eje Y el nombre del tipo de cáncer.

GLOBOCAN reportó 1,310,000 de casos de incidencia de cáncer durante el 2018. Definimos incidencia como el número de casos nuevos en un periodo específico y área geográfica, donde los tipos de cáncer con mayor número de casos a nivel mundial fueron; pulmón, mama, colorrectal, próstata, entre otros (figura 4) (GLOBOCAN, 2018).

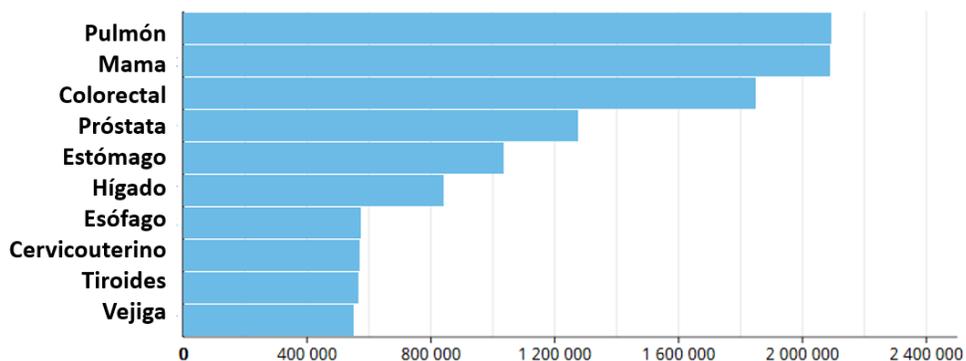


Figura 4: Gráfica de los tipos de cáncer con más incidencia en el mundo, mostrado en números (modificado de IARC, GLOBOCAN 2018). En el eje X se encuentra el número de incidencia, y en el eje Y el nombre del tipo de cáncer.

El cáncer cervicouterino es la segunda neoplasia más frecuente a nivel mundial, presentando más de 690,000 defunciones, de las cuales el 85% ocurren en países en vías de desarrollo, incluyendo América Latina (figura 5).

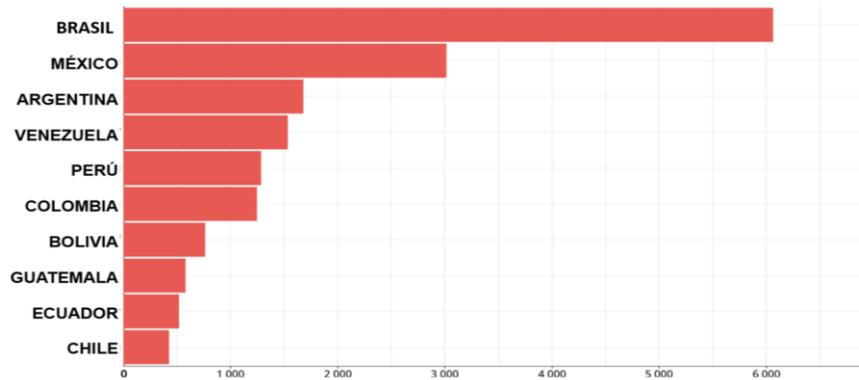


Figura 5: Gráfica de los países con mayor números de casos de defunciones por cáncer cervicouterino. (modificado de IARC, 2018). En el eje X se encuentra el numero de defunciones, y en el eje Y el país.

En México se reportaron 569,847 (6.6%) casos de incidencia y 311,365 (7.5%) muertes por cáncer cervicouterino en el 2018, colocando a esta neoplasia en el tercer lugar. Es importante mencionar que las presentes cifras fueron únicamente en las mujeres de México, lo cual lleva a considerar a CaCu como uno de los tipos de cáncer ginecológicos más comunes en México (figura 6).

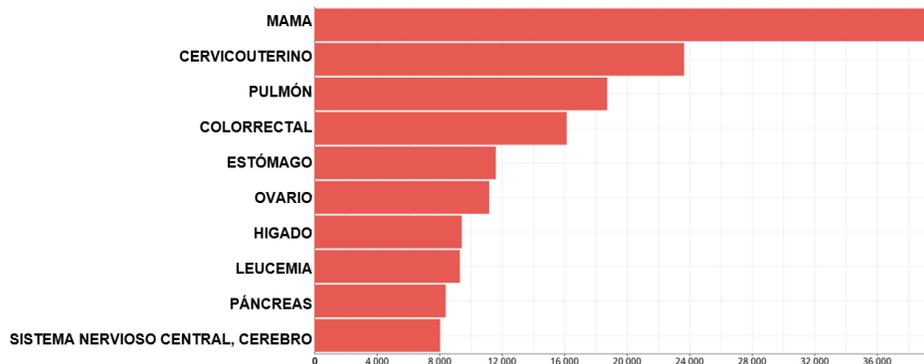


Figura 6: Gráfica de los tipos de cáncer con más casos de muertes en mujeres de México (modificado de IARC, 2018). En el eje X se encuentra los numeros de muertes, y en el eje Y el nombre del tipo de cáncer.

I.II. Cáncer cérvicouterino

El cáncer cérvicouterino (CaCu), es un cáncer de lenta y progresiva evolución, el cual se desarrolla en el epitelio cervical y el cuello uterino. Este tipo de cáncer presenta etapas previas de lesiones neoplásicas intraepiteliales (NIC) de grados 1 a 3 (tabla 1), que por lo regular son inducidas por agentes oncogénicos, como el virus del papiloma

humano (VPH) (Jadon, 2012), considerado el principal factor de riesgo para el CaCu (OMS, 2018) presentes en un 99.7% de los casos.

Cabe señalar que también existen otros factores como; el embarazo en mujeres jóvenes <17 años de edad, lo cual aumenta al doble la posibilidad de desarrollar posteriormente cáncer cervicouterino, los múltiples embarazos también incrementan el riesgo, debido a cambios hormonales, o un sistema inmune débil durante el embarazo, así mismo, el tabaquismo incrementa riesgos de cáncer de células escamosas por exposición del cuerpo a químicos, el uso de contraceptivos orales por periodos prolongados también predispone fuertemente a padecer cáncer cervicouterino. No obstante, también existe una predisposición genética, ya que una mujer con antecedentes familiares tiene 2 a 3 veces más riesgo de desarrollar CaCu que la mujer sin historial familiar relacionado a CaCu. Por otro lado, una dieta sana que incluya frutas y vegetales pueden reducir el riesgo a desarrollar cáncer cervicouterino (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Sin embargo, el CaCu puede ser detectado y tratado completamente en los diferentes estados precancerosos, los cuales han sido descritos por la FIGO (tabla 1).

Tabla 1: Clasificación del sistema FIGO para cáncer cervicouterino (Sobin y Wittekind, 2002).

ESTADO	DESCRIPCIÓN
IA	Cáncer invasivo identificado solo microscópicamente. La invasión es medida con máximo de profundidad 5 mm y no mas grande que 7 mm.
IA1	Mide la invasión del estroma, no mas grande que 3 mm de profundidad y no mas amplia de 7 mm de diámetro.
IA2	Mide la invasión del estroma mas grande que 3 mm pero no mas de 5 mm de profundidad y no mas amplia que 7 mm en diámetro.
IB	Las lesiones clínicas confinadas a cérvix, o lesiones preclínicas mas grandes que el estado IA. Todas las lesiones gruesas aun con invasión superficial son cáncer de estado IB
IB1	Las lesiones clínicas no mas grandes que 4 cm de diámetro.
IB2	Lesiones clínicas mas grandes de 4 cm en tamaño.
IIA	Sin involucramiento del parametrio, involucramiento de dos tercios superiores de la vagina.
IAB	Involucramiento evidente del parametrio, pero no hacia la pared pélvica.
IIIA	Sin extensión hacia la pared pélvica, pero involucrando un tercio inferior de la vagina.
IIIB	Extensión hacia la pared pélvica, o hidronefrosis (atrofia del riñón).
IVA	Propagación del tumor hacia órganos adyacentes a la pelvis.
IVB	Propagación a órganos distantes.

El estado I, es el carcinoma estrictamente confinado a cérvix, la extensión al cuerpo uterino debe ser ignorado. El diagnostico de ambos estados IA1 y IA2 está basado en examinación microscópica de tejido removido.

El estado II es el carcinoma que se extiende más allá del cérvix, pero no se extiende hacia la pared pélvica. El carcinoma involucra la vagina, pero no más allá de un tercio inferior de esta.

El estado III, es carcinoma que ha sido extendido a la pared pélvica. En la examinación rectal, no hay espacio libre de cáncer entre el tumor y la pared pélvica. El tumor involucra el tercio inferior de la vagina. Todos los casos con hidronefrosis son cáncer en estado III.

El estado IV es el carcinoma que se extiende más allá de la pelvis, o ha sido clínicamente envuelto en la mucosa de la vejiga y/o el recto.

I.III. Generalidades de Papilomavirus humano

Los *Papillomaviridae* (PVs) son una familia de virus de ADN bicatenario, los cuales infectan el epitelio de los vertebrados. Poseen un genoma de ~8Kb y, a diferencia de otras familias virales las técnicas convencionales de cultivo no logran ser eficientes para ser empleadas en la familia de los PVs; ya que estos virus no presentan respuestas adecuadas a anticuerpos, por ende su clasificación por serotipos es imposible. Sin embargo, la proteína mayoritaria de la cápside L1 se encuentra relativamente muy conservada en la familia, en consecuencia una clasificación basada en las diferencias a nivel de secuencia es permisible (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Es importante mencionar que los genotipos presentan un porcentaje de identidad de <90%, en comparación al de un subtipo que presenta un porcentaje de identidad el cual se encuentra entre el 90%-98%. Por otra parte, las variantes presentan un porcentaje de identidad de ≥98% (Prendiville y Davies, 2004; Garcea, 2007). Sin embargo, Ethel-Michele de Villiers propuso ampliar la clasificación de los *Papillomaviridae* con base en una filogenia realizada con la proteína L1 de 189 tipos de PVs. Hasta ahora existen 29 géneros, con 189 tipos de los cuales 120 son aislados de humano, 64 aislados de mamíferos no humanos, 3 de aves y 2 de reptiles (Hans- Ulrich, 2010).

I.IV. Entrada del Papilomavirus humano a la célula y su relación con el cáncer cervicouterino

La asociación entre el VPH y el CaCu fue demostrado por Harald zur Hausen a principios de los años 80s, quien describió que la infección viral es un punto clave para el desarrollo de esta enfermedad, siendo el resultado de la infección del VPH una verruga o papiloma. Las verrugas de la piel pueden ser planas (superficiales) o verrugas plantares (más profundas), estas verrugas son transmitidas por contacto sexual (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). La mayoría de estas verrugas son causadas por los tipos virales

no oncogénicos (6 y 11) en el 90% de los casos, por lo tanto estas verrugas causadas por estos tipos de virus no trascienden a CaCu, y pueden ser transmitidas por contacto piel a piel, no necesariamente contacto sexual. Por otra parte, se encuentran los papilomavirus humanos de alto riesgo, o también llamados oncogénicos, de los cuales el tipo 16 y 18 son responsables del 70% de todos los cánceres cervicouterinos (Zheng y Baker, 2006). Es importante resaltar que los virus genitales oncogénicos y no oncogénicos pueden causar neoplasia intra epitelial cervical grado 1 (NIC1) (o LSIL; por sus siglas en inglés) en la zona de transformación del cuello uterino. Esta neoplasia es caracterizada por presentar una mayor actividad mitótica y contenido de las células inmaduras en el tercio inferior del epitelio, se diferencia, y madura mostrando anomalías menores de la célula.

La zona de transformación del cuello uterino es la unión entre el epitelio columnar del endocérvix y el epitelio escamoso del ectocérvix. Esta zona es un sitio de continuos cambios metaplásicos, los cuales son más activos en la pubertad y durante el primer embarazo, estos mismos reducen su actividad después de la menopausia (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Por otra parte, una metaplasia escamosa atípica inducida por algún virus y que se desarrolle en esta región puede dirigir a una HSIL, también conocida como NIC2 o NIC3, las cuales son consideradas verdaderas lesiones precursoras del CaCu. Se ha descrito que HSIL es comúnmente positivo a los tipos virales oncogénicos que evitan la maduración y diferenciación celular, produciendo una replicación continua de células inmaduras y eventualmente la acumulación de anomalías genéticas que favorecen la malignidad. Así mismo, LSIL puede establecerse al inicio, al mismo tiempo o en ausencia de HSIL (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

Existen tipos histopatológicos de carcinoma cervical entre los cuales se encuentran: carcinoma de células escamosas que corresponde a un 66%; el cual tiene origen en células escamosas epiteliales de cérvix, y el adenocarcinoma; el cual se presenta en un 28% de los casos y tiene origen en células glandulares productoras de mucus del endocérvix, adicionalmente existen algunos tipos no tan comunes correspondientes a un 6% que comprenden los carcinomas adenoescamosos y carcinomas neuroendocrinos.

El ciclo del VPH incluye las diversas etapas:

1) La infección y desensamble del virión, etapa en la cual las partículas infecciosas

entran a las células basales o germinales por medio de una abertura en el epitelio estratificado, la cual puede ocurrir en condiciones donde la piel tenga alguna lesión o microtrauma. Los virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) como el tipo 16, inducen la formación de lesiones cervicales por la infección de células columnares, que después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. Por otra parte, también se ha descrito que la entrada del virus depende de los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, el cual podría ser el lugar de unión inicial previo a la unión con el receptor (Evander et al., 1997; Giroglou, 2001; Yoon, 2001; López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Posteriormente, se da paso a la internalización del virus, que ocurre por medio de endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina (Day, Lowy y Schiller, 2003), y el desensamble del virión por rompimiento de enlaces disulfuro internos de la cápside. El ambiente reductor de la célula permite el transporte del DNA viral al núcleo de dicha célula (Li, 1998).

2) El mantenimiento del genoma. Se produce después de la infección y desensamble del virus en las células basales, para mantener su genoma episomal en bajo número de copias (10 a 200 por célula), donde se expresan las proteínas E1 y E2 (Wilson, 2002), que facilitan la segregación correcta de los genomas durante la división celular. En el caso del VPH tipo 31 en las líneas celulares epiteliales se ha descrito que existe una falla para expresar E1, por lo tanto se pierde el estado episomal y el genoma viral se integra al de la célula (Frattini et al., 1996).

3) La infección viral es seguida por una **fase proliferativa** que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que requiere la expresión de las proteínas E6 y E7, las cuales estimulan el progreso de la fase del ciclo celular G1 a S. (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Así mismo, la expresión de E6 y E7 de un ARNm bicistronico bajo el control del promotor temprano en la LCR, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que esta migra al estrato suprabasal del epitelio. Por lo tanto, las proteínas E6 y E7 retardan la diferenciación celular (Sherman et al., 1997) induciendo la proliferación mediante las interacciones con proteínas celulares asociadas al control del ciclo celular.

4) La amplificación del genoma y la síntesis de los viriones ocurre mediante el empaquetamiento del genoma viral en una partícula proteica, el empaquetamiento se lleva a cabo en las capas superiores del epitelio en el estrato espinoso, en esta región aumenta la actividad transcripcional del promotor tardío dependiente de la diferenciación.

Este promotor se halla en el marco de lectura del gen E7, el cual promueve la transcripción de proteínas involucradas en la replicación del ADN viral, tales como; E1, E2, E4 y E5. Así como, las constituyentes de la cápside, L1 y L2. Por otra parte, para la replicación viral se necesita que E2 se una a la LCR y promueva la unión de E1 en el sitio de origen de la replicación viral.

El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y posteriormente las células infectadas se descaman de la capa superior de este estrato. El virus es estable extracelularmente ya que es resistente a la desecación y puede ser transmitido directamente a otros individuos. Sin embargo, las células infectadas permanecen en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a una nueva superficie epitelial. De este modo, funciona el ciclo lisogénico del VPH, y se ha sugerido que la proteína tardía E4 contribuye a la salida del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina (Doorbar y Sterling, 1991), dicho ciclo viral se haya descrito en la figura 7.

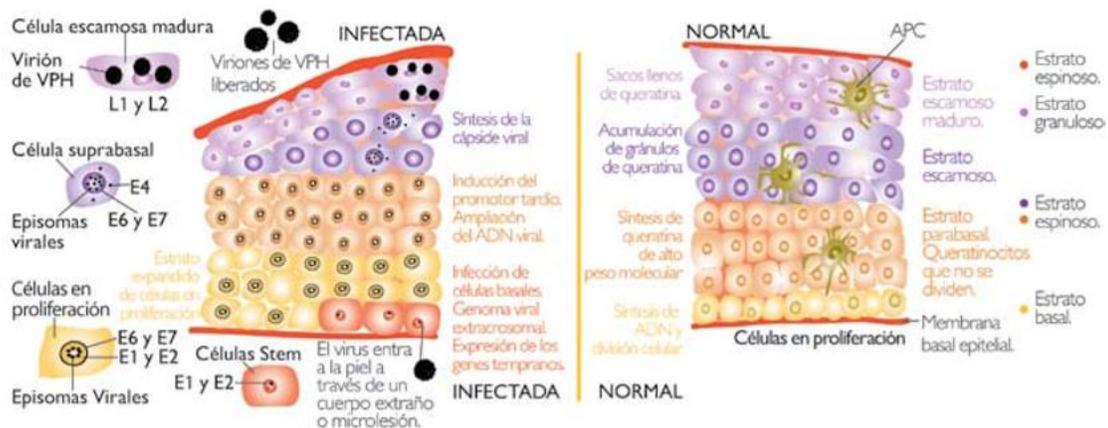


Figura 7: El ciclo viral. Las células germinales sin infección del virus se dividen a lo largo de la membrana basal, madurando verticalmente a través del epitelio sin división posterior. Una vez que el VPH infecta dichas células en la membrana basal, se expresarán las proteínas tempranas. La presencia de estas proteínas provocan en las células que están en división, su expansión verticalmente produciendo el retraso y dejando inconclusa la diferenciación celular, las proteínas virales son expresadas a la par de la diferenciación celular y los viriones son producidos en las capas superiores del epitelio. APC: células presentadoras de antígenos intraepiteliales, las cuales son abatidas en la célula infectada por VPH. (modificado de Nature Reviews Immunology, 2004 y López-Saavedra y Lizano-Soberon, 2006).

I.IV.I. El genoma del virus del Papiloma humano

Como se menciona anteriormente, todos los papilomavirus contienen un genoma de DNA circular de doble cadena aproximadamente 8 kb de tamaño que puede ser dividido en general a tres regiones; "*Early*" o región temprana, "*Late*" o región tardía y una región larga de control (LCR, por sus siglas en ingles). LCR es una región codificante, y las tres regiones en todos los papilomavirus están separadas por dos sitios de poliadenilación; "*early*" pA (A_E) y "*late*" pA (A_L). La región "*temprana*" del genoma del papilomavirus ocupa alrededor de un 50% de su genoma y codifica ocho fragmentos de lectura abierta (ORF); E1 a E8, los cuales traducen proteínas propias, de los cuales E1 Y E2 están implicados en la replicación de ADN viral (Zheng y Baker, 2006). Por otra parte, la región "*tardía*" de todos los genomas de papilomavirus abarcan más del 40% del genoma total, y codifica los fragmentos de lectura abierta; L1 y L2, para la traducción de dos proteínas de la cápside; una mayor (L1), y una menor (L2). Los niveles taxonómicos de los tipos, subtipos y variantes de papilomavirus están basados en la secuencia de sus genes L1 (Zheng y Baker, 2006). Por último, la región "LCR" es un segmento de alrededor de 850 pb, el cual ocupa un 10% del genoma de VPH y no presenta proteínas con funciones codificantes, el origen de replicación funciona como un factor de transcripción múltiple, uniendo sitios importantes en la regulación de la transcripción iniciada por la RNA polimerasa II de la región viral *temprana* con promotores de la región *tardía*. Durante el ciclo de vida del VPH las oncoproteínas E6 y E7 son expresadas y estas desregulan las funciones de p53 y E2F, alterando el ciclo celular. Sin embargo, la infección por VPH no es suficiente para el desarrollo de CaCu, ya que otros factores tanto exógenos como endógenos contribuyen al desarrollo y progresión del CaCu (Zheng y Baker, 2006).

I.IV.II. Replicación de VPH y oncoproteínas en CaCu

Para entender el desarrollo del CaCu es importante comprender el proceso de infección y replicación que lleva a cabo el virus dentro de la célula hospedera. El VPH comienza la producción de viriones una vez que la célula infectada ha llevado a cabo una mitosis, y las células hijas se han diferenciado, a comparación de muchos otros virus que producen los viriones en la misma célula que originalmente fue infectada (Moody y Laimins, 2010). En resumen, el ciclo de replicación del virus llega a ser muy distinto al de otros virus.

Los VPHs infectan la capa basal de los epitelios estratificados, debido a que las células que conforman esta capa son las únicas que llevan a cabo el proceso de división. La capa basal se ve expuesta gracias a microlesiones en el epitelio y una vez infectada la célula, el genoma del virus puede permanecer como un elemento extra cromosomal (episoma), o integrarse al genoma. Kadaja y colaboradores (2009) describen que un paso importante para la carcinogénesis es la coexistencia de ambas formas del genoma (Kadaja *et al.*, 2009). Así como también, se ha reportado que existe una cierta preferencia entre VPHs por presentar un estado genómico, por ejemplo: VPH 16 se ha encontrado en estudios realizados en biopsias, principalmente en estado episomal, mientras que VPH 18 se encuentra principalmente integrado en el genoma (Nambaru, 2009). Otra diferencia importante entre los VPHs de alto riesgo VPH16 y VPH18, es la prognosis que los pacientes reciben, los pacientes que presentan lesiones cervicales cancerosas inducidas por VPH 18 tienen un pronóstico mayormente maligno, en comparación con pacientes infectados por VPH 16 (Schwartz, 2001). De igual manera, se ha observado que existe una variación regional en la incidencia de infección por los distintos VPHs de alto riesgo (Clifford *et al.*, 2003).

Se sabe que las capacidades transformantes que poseen los VPH-AR son resultado principalmente de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Estas proteínas actúan de manera cooperativa en el desarrollo de cáncer, y ambas han sido encontradas en el núcleo sin embargo algunos estudios proponen la presencia citoplásmica de E7 y de E6 (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2009). Además, algunos trabajos indican que E7 por sí misma puede immortalizar queratinocitos con una baja frecuencia, mientras que E6 no puede hacerlo. Sin embargo, la combinación de la expresión de ambas proteínas es altamente importante en la immortalización (Hawley-Nelson *et al.*, 1989). No obstante, aunque las oncoproteínas E6 y E7 son eficientes en la immortalización celular, las células immortalizadas no poseen capacidades tumorigénicas en ratones (Kaur y McDougall, 1988), lo que indica que las oncoproteínas E6 y E7 son necesarias, pero no suficientes para la progresión maligna.

E7 no posee ninguna actividad enzimática, sin embargo, sí se conoce que es capaz de unirse a la proteína supresora de tumores RB, así como a las proteínas relacionadas p107 y p130. RB y las proteínas antes mencionadas están involucradas en la transición de la fase G1 a S en del ciclo celular, mediante la regulación de los factores de transcripción de la familia de E2F (Moody y Laimins, 2010). En condiciones normales RB

reprime la actividad de los promotores dependientes de E2F mediante su unión con E2F en conjunto con el reclutamiento de varios modificadores de la cromatina como desacetilasas de histonas (HDACs). Sin embargo, la unión de E7 y RB disocia estos complejos permitiendo que se transcriban genes específicos de fase S, como la ciclina A y la ciclina E. También, se ha descrito que E7 interacciona de manera directa con HDACs, así como con E2F6, la cual es un represor transcripcional de los promotores dependientes de E2F, mediante el reclutamiento de complejo del grupo de Polycomb (PcG) (Brehm *et al.*, 1999). No obstante, se ha observado que la interacción entre E7-RB-HDACs es esencial para el mantenimiento episomal y de la fase S para la diferenciación en la producción viral por las células de las capas basales (Moody y Laimins, 2010).

I.V. Las líneas celulares como modelo de estudio del cáncer cervicouterino

El cultivo celular ha permitido conocer el comportamiento *in vitro* de las células cancerosas haciendo más fácil su estudio. Los primeros cultivos datan desde 1907, cuando Ross Harrison cultivó un coágulo linfático de medula espinal de anfibio, el cual realmente era un explante, un fragmento de tejido. A finales del siglo XIX, Sydney Ringer desarrolló una solución que contenía cloruro de sodio, potasio, calcio y magnesio, esta solución permitía mantener las condiciones fisiológicas del cuerpo y por lo tanto era capaz de mantener latiendo el corazón de un animal *in vitro*, esta solución fue nombrada después con el mismo nombre (Martinez-Capio y Navarro-Moreno, 2003). Existen diferentes tipos de cultivos celulares los cuales van dependiendo de acuerdo a las necesidades del investigador, y la investigación. En el presente estudio se utilizaron las líneas celulares CaLo, SiHa y el control HaCaT, que se describen a continuación.

CaLo es una línea celular aislada de una mujer de 55 años de edad, presenta secuencias de papilomavirus tipo 18. Es un carcinoma epidermoide no queratinizado de estadio IIB. Por otro lado, SiHa es un carcinoma escamoso aislado de una mujer asiática de 55 años de edad, de grado II que presenta secuencias de papilomavirus humano tipo 16. Es de gran importancia hacer notar que las dos líneas celulares ya descritas anteriormente son de cérvix y han sufrido un cambio en el genoma que las hace inmortales, por lo tanto, se usan cotidianamente en la investigación de cáncer cervicouterino. Así mismo, también se ha descrito que el VPH es un agente importante en el proceso de immortalización celular (Martinez-Capio y Navarro-Moreno, 2003).

Finalmente, la línea celular utilizada como control (HaCaT), son células inmortalizadas de queratinocitos de prepucio de neonato, cabe recalcar que HaCaT ha sido utilizada anteriormente en otros experimentos con mismo enfoque de investigación. Así mismo, las células de las tres líneas celulares presentan inmortalización celular, lo cual incluye alteraciones citomorfológicas características como; menor tamaño, menor adherencia, más redondas y una mayor relación entre el núcleo y citoplasma (Martinez-Capio y Navarro- Moreno, 2003).

I.VI. La función de la mitocondria en el cáncer

La mitocondria presenta diversas funciones biosintéticas y bioenergéticas, los cuales son de suma importancia durante el estrés celular. No obstante, se han descrito como mediadores de la tumorigénesis, ya que este proceso requiere flexibilidad de adaptación celular y alteraciones del entorno enfocados a tratamientos contra el cáncer (Vyas, Zaganjor, y Haigis, 2016). La función de la biogénesis mitocondrial en el cáncer es regulada por muchos factores; incluyendo el estado metabólico, la heterogeneidad del tumor, el tipo de tejido, el microentorno, el estado del tumor e incluso la mitofagia para mantener una población mitocondrial sana. Es necesario resaltar que la regulación de la biogénesis mitocondrial y la mitofagia son rutas importantes para la señalización oncogénica (Vyas et al., 2016).

La biogénesis mitocondrial es regulada por factores transcripcionales que coordinan la inducción de genes que codifican proteínas, localizados en el núcleo y mitocondria, tales como; el coactivador-1 alfa (PGC-1a), el cual es un regulador de la biogénesis mitocondrial que actúa a través de las interacciones con diversos factores de transcripción (Tan et al., 2016). Por lo tanto, los niveles de PGC-1a revelan la dependencia al tumor de acuerdo a la masa mitocondrial, una expresión alta de PGC-1a da como resultado una dependencia en la respiración mitocondrial (Tan et al., 2016). De este modo, la sobreexpresión de PGC-1a induce la apoptosis. Sin embargo, puede funcionar como un supresor de tumor en algunos tipos de cáncer (Tan et al., 2016).

Por otro lado, un activador clave para la biogénesis mitocondrial en el cáncer es c-Myc, el cual es un factor de transcripción que generalmente regula el ciclo, crecimiento, metabolismo y apoptosis celular. Alrededor de 400 genes mitocondriales han sido

identificados como blancos para c-Myc, determinando así la pérdida o incremento de Myc, lo cual incrementa o reduce respectivamente la masa mitocondrial (Li et al., 2005).

Otro efector de la biogénesis mitocondrial es mTOR, el cual es considerado un blanco a rapamicina. mTOR es un elemento primordial para el crecimiento celular y la homeostasis energética, y se ha descrito desregulado en el cáncer. mTOR regula la biogénesis mitocondrial mediante dos vías, en primer lugar, la vía transcripcional; dando como resultado la expresión génica mitocondrial y, en segundo lugar, la vía traduccional, por represión de la inhibición de las proteínas de unión a 4E (4E-BPs), las cuales subregulan la traducción de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo (Morita et al., 2015). Por otra parte, en melanomas mutados de B-Raf o N-Ras la resistencia a inhibidores MEK ha sido demostrada parcialmente debido al metabolismo oxidativo el cual es mediado por la sobreexpresión de PGC-1^a, y superado por la inhibición de mTORc1/2, la cual reprime la expresión de PGC-1^a (Gopal et al., 2014; Haq et al., 2013). Así mismo, las células cancerosas pueden adaptarse a su función mitocondrial de acuerdo al estrés específico, un ejemplo sería la sobreexpresión de c-Myc y la expresión de genes glicolíticos que permiten la resistencia a metformina, el cual es un inhibidor del complejo I mitocondrial en células cancerosas pancreáticas, elemento de suma importancia en la respiración mitocondrial debido a la expresión de PGC-1^a (Sancho, Barneda, y Heeschen, 2016).

De igual importancia, el daño mitocondrial por mitofagia es crítico, la vía cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1), se activa hasta la despolarización de la membrana mitocondrial, generando una señal de la disfunción mitocondrial resultante de múltiples causas como la hipoxia y un transporte de electrones disfuncional. Además, una ruta alternativa para la inducción de mitofagia es a través de genes blancos a HIF1a, como es el caso de Bcl-2, la proteína 3 adenovírica (BNIP3) y BNIP3/NIX, quienes inhiben la respiración mitocondrial durante condiciones hipóxicas que podrían dirigir a un exceso de EROs. No obstante, BNIP3 Y NIX han sido identificadas como supresores de tumor en muchos modelos de cáncer (Chourasia et al., 2015). Por otra parte, en algunos estados de tumorigénesis, la reducción de mitofagia puede permitir la existencia de algunas mitocondrias disfuncionales, que generan un incremento en EROs induciendo el desarrollo del tumor, u otras señales mitocondriales tumorigénicas (Vyas, Zaganjor, y Haigis, 2016).

En cuanto a la fisión mitocondrial se ha descrito que un paso crítico es la proteína 1 relacionada a dinamina (Drp1), reclutada en la mitocondria con la asociación de receptores

de membrana externa mitocondrial, causando encogimiento de la membrana producida por la actividad GTPasa. La translocación y la actividad mitocondrial de Drp1 es regulada por la fosforilación, la cual es regulada por múltiples cinasas que responden a distintas condiciones de estrés y ciclo celular (Mishra y Chan, 2016). De igual importancia, dos mitofusinas (Mfn1 y Mfn2) median la fusión mitocondrial junto con Opa1, de esta manera la morfología mitocondrial afecta susceptiblemente a la mitofagia y la apoptosis (Kasahara y Scorrano, 2014). No obstante, muchos estudios han demostrado que existe un desbalance en la actividad de fusión y fisión mitocondrial en el cáncer, y por lo tanto pueden resultar en una red mitocondrial fragmentada (Senlt y Ronai, 2016). De esta manera la dinámica mitocondrial alterada es clave en la transformación celular dependiente de K-Ras estimulando la fragmentación mitocondrial por la vía de fosforilación de Drp1 mediada por ERK1/2 (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015), Así, la inhibición de Drp1 confiere resistencia celular a la transformación oncogénica mediada por K-Ras, afectando el crecimiento del tumor (Kashatus et al., 2015).

Como fue descrita anteriormente una de las características facultativas del cáncer es la habilidad de evadir la muerte celular, la cual se haya fuertemente ligado a la mitocondria. Los tumores evaden la apoptosis por la subregulación de los genes proapoptóticos Bcl2, y/o por la sobrerregulación de genes Bcl2 anti apoptóticos (López y Tait, 2015), el balance de las proteínas pro y antiapoptóticas afectan la integridad de las células cancerosas por el estímulo apoptótico, y por lo tanto pueden predecir cómo el tumor puede responder a la quimioterapia (Sarosiek et al., 2013). Sin embargo, la forma mitocondrial también influye en la susceptibilidad apoptótica, la pérdida de Drp1 retrasa la liberación de citocromo c y obviamente la inducción de apoptosis (Martinou y Youle, 2011).

Así mismo, el estrés oxidativo se ha descrito también asociado a la mitocondria, la mitocondria contribuye en gran parte a la producción de EROs. Sin embargo, presenta también múltiples rutas antioxidantes para neutralizar a estas mismas, incluyendo: la superóxido dismutasa (SOD2), el glutatión, las peroxirredoxinas y tiorredoxinas. Adicionalmente se ha descrito que las concentraciones de EROs, producidas por NADP oxidasas, se encuentran exacerbadas durante la tumorigénesis, debido a la señalización oncogénica, mutaciones de la cadena transportadora de electrones y microentornos de hipoxia. Por lo tanto, los altos niveles de EROs contribuyen a la oxidación de macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN, contribuyendo a la inestabilidad genómica (Vyas et al., 2016).

En cuanto a la reprogramación metabólica, se ha descrito que el grupo amida del nitrógeno de la glutamina es usado para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, y los carbonos derivados de la glutamina son usados en la síntesis de glutatión, lípidos y aminoácidos. Por lo tanto, la glutaminólisis (catabolismo de la glutamina), se haya elevada en muchos tumores asociados a glutamina, lo cual se cree que es dirigido por la sobrerregulación de c-Myc de la glutaminasa (GLS), ya que esta enzima convierte la glutamina a glutamato y amoniaco (Stine et al., 2015). Además, existen también alteraciones en el metabolismo de lípidos asociados a algunos tipos de cáncer por sobrerregulación de la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, algunos tipos de cáncer pueden ser más dependientes a la síntesis de lípidos, por lo tanto la sobrerregulación de lipogénesis es propuesta como proceso común en muchos tumores (Currie et al., 2013; Vyas et al., 2016).

I.VII. Relevancia de las proteínas mitocondriales

Se sabe que la mitocondria codifica 13 proteínas de las cuales siete de estas corresponden al complejo I: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6; citocromo b correspondiente al complejo III; la citocromo oxidasa I (COI), citocromo oxidasa II (COII) y citocromo oxidasa III (COIII) corresponden al complejo IV; y dos proteínas del complejo V: ATP6 y ATP8, estas proteínas son cargadoras de protones con función principal en la fosforilación oxidativa (OXPHOS). El resto de proteínas encontradas en la mitocondria, incluyendo aproximadamente 80 subunidades de la fosforilación oxidativa y las cuatro subunidades del complejo II son codificadas por el ADN nuclear (Wallace, 2012).

Un meta-análisis de ADN mitocondrial con mutaciones asociadas a cáncer revelan que muchas mutaciones al ADN mitocondrial en la célula cancerosa inhiben la fosforilación oxidativa. Así mismo, los cambios de nucleótidos han sido previamente reportados como variantes del ADN mitocondrial vestigial adaptativo en poblaciones humanas (Wallace, 2012). Por otra parte, los defectos en la célula cancerosa son establecidos en los genes de la succinato deshidrogenasa (SDH), fumarato hidratasa (FH), isocitrato deshidrogenasa I (IDH1) e isocitrato deshidrogenasa II (IDH2) (Wallace, 2012). De esta manera el propósito del estudio en las mutaciones de genes mitocondriales es proveer nuevos conocimientos amplios hacia la importancia y complejidad de las alteraciones mitocondriales en el cáncer.

I.VIII. Proteómica

Para entender el término "Proteómica" es esencial definir el término "Genoma", introducido por Hans Winkler en 1920 a partir de las palabras "GENes" y "cromosOMAS", descrito como el juego completo de cromosomas y sus genes en una especie biológica determinada. La "Genómica" es considerada el estudio de los genomas completos de los diferentes organismos, y consiste en la determinación de la secuencia completa de su propio ADN y la ubicación de los genes secuenciados en los diferentes cromosomas. Sin embargo, el estudio amplio de los genes y sus productos no son incluidos en el término "Genómica". Es importante saber que la información genética existente hasta ahora publicada, está basada en los marcos de lectura abierta (ORFs, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, los ORFs encontrados por similitud con genes ya conocidos se han identificado tentativamente, por lo que muchos genes secuenciados presentan "proteínas hipotéticas" (Liebler, 2002).

Por otra parte, el término "Proteoma" unión de los términos "PROTEína" y "genOMA" fue acuñado por Marc Wilkins en 1994, y fue utilizado para nombrar el conjunto completo de las proteínas que una célula u organismo puede expresar. Para los organismos pluricelulares el genoma de todas sus células es idéntico. Sin embargo, el proteoma es característico de cada tipo celular, y por lo tanto existen proteínas que se expresan en todas, o en la mayoría de las células de un organismo. Así como también, existen otras proteínas características que se expresan en un solo tipo celular. De igual forma, el humano tiene más de 200 tipos celulares diferentes, todas con diferente expresión de proteínas. Es por ello que para conocer las características bioquímicas y biológicas de un proteína codificada se requiere de la secuencia, estructura dimensional, la presencia de modificaciones postraduccionales y el procesamiento proteolítico (la capacidad de unir ligandos), incluso de las interacciones con otras proteínas (Liebler, 2002). Por lo tanto, conocer el proteoma de un organismo es un reto difícil de dilucidar.

A causa de estas dificultades, se han desarrollado diversas metodologías. En 1964 se inició la "Proteómica" con la introducción de la *electroforesis* en geles de poliacrilamida por L. Ornstein y B. J. Davis. Posteriormente, se introdujo el gel de poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), para separar las proteínas de acuerdo al peso molecular, y la unión de esta técnica anterior con el isoelectroenfoco (IEF), llamada como electroforesis bidimensional (2D-PAGE), introducida por J. Klose y P.H. O Farrell.

Por consiguiente, la Electroforesis bidimensional tiene como propósito separar las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico mediante el IEF, y peso molecular mediante SDS-PAGE (Liebler, 2002).

La introducción de la espectrometría de masas fue de gran avance para la detección de proteínas separadas en geles 2D. Los espectrómetros de masas tienen como objetivo; medir la relación masa/carga (m/z) de compuestos ionizados, siendo "m" la masa molecular del compuesto y "z" un múltiplo entero de la carga elemental "e" del electrón. En el presente proyecto se utilizó la Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC MS/MS) o tándem MS/MS, esta técnica consiste en una (1) fuente de ionización por presión atmosférica, la cual, usualmente es una fuente de ionización electrospray (ESI) o una ionización química por presión atmosférica (APCI), acoplada por un (2) componente de entrada de iones (Q0), que provee ambas; transición de la presión atmosférica a vacío y la entrada de iones hacia (3) un dispositivo filtrante de la primera masa (Q1), que dirige a una (4) cámara de colisión (Q2), el cual puede ser llenado con gas de baja presión para la disociación inducida por colisión (CID), seguida por un segundo (5) dispositivo filtrante de masa (Q3), y finalmente un (vi) detector de impacto de iones (Liebler, 2002).

I.VIII.I. Proteómica en cáncer

La Oncoproteómica, o la aplicación de la Proteómica en el estudio del cáncer, ha permitido la identificación de los cambios de la expresión proteica en diferentes tipos de cáncer. Así como también, se ha centrado en la búsqueda de proteínas específicas que correlacionen directamente con la presencia de cáncer, mediante el descubrimiento de biomarcadores, y proteínas que puedan ser blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer. Ambos aspectos podrían funcionar para la detección molecular de los diferentes tipos de cáncer, o para su tratamiento específico (Maarten-Altelaar, Munoz y Heck, 2013). Así mismo, el término biomarcador, es definido por el Programa Internacional de Seguridad Química dirigido por la OMS como: cualquier sustancia, estructura, o proceso que puede ser medido en el cuerpo, el cual predice la incidencia de daño. Por ello, la respuesta medida del biomarcador puede ser funcional y fisiológica, bioquímica a nivel celular o una interacción molecular. Por consiguiente, los tipos de biomarcadores incluyen algunos de presión sanguínea a través de químicos básicos, hasta pruebas de laboratorio más complejas de sangre u otros tejidos (Strimbu y Tavel, 2010).

La mayoría de los estudios oncoproteómicos llevan a cabo la comparación entre los perfiles proteómicos del control contra el cáncer de interés. Por lo que, mediante este enfoque se han identificado las proteínas diferencialmente expresadas en distintos tipos de cáncer (tabla 2). Sin embargo, el tumor representa un estadio avanzado del cáncer, por lo tanto, los cambios detectados son cambios tardíos del desarrollo del cáncer. Debido a esto, más del 60% de los pacientes diagnosticados con cáncer ya presentan metástasis, y por lo tanto las terapias suelen ser poco efectivas. Para concluir, lo ideal sería establecer el proteoma del tejido sano, lesiones precancerosas, tumor no invasivo, displasia y cáncer metastásico, para poder identificar biomarcadores y blancos terapéuticos en etapas tempranas del desarrollo tumoral, y no aquellos de etapas tardías que ya muestran consecuencias clínicas graves (Petricoin, et al., 2002).

Tabla 2: Biomarcadores identificados por Proteómica para distintos tipos de cáncer.

Tipo de cancer	Marcadores
Colorectal	1. Apolipoproteína C1, Complemento C3a des-arg, a1-antitripsina y transferina (Ward <i>et al.</i> , 2006).
Mama	2. Calciclina y Calgranulina A (Sanders <i>et al.</i> , 2008).
Próstata	3. PC-1, PC-2, PC-3 (Li <i>et al.</i> , 2004).
Ovario	4. FK506, inhibidor de disecación Rho, proteína-G y glioxilasa (Jones <i>et al.</i> , 2002).

I.VIII.II. Proteómica en cáncer cervicouterino

Los primeros estudios proteómicos sobre el CaCu datan del 2004, donde el objetivo fue distinguir las diferencias entre el proteoma de tejidos no afectados, líneas celulares no cancerígenas, tejido adyacente al cancerígeno no afectado y biopsias de cáncer cervicouterino (Pyo *et al.*, 2005; Bae, 2005; Zhu *et al.*, 2009; Arnouk *et al.*, 2009). Hilal Arnouk observó que la expresión proteica del CaCu es variable entre diferentes estadios de progresión, ya que comparó los perfiles proteómicos de tejido cervical no afectado por cáncer, lesión intraepitelial de alto grado y carcinoma invasivo (Arnouk *et al.*, 2009). Por otro lado, Lomnytska abordó el estudio de la expresión proteica de la ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2 y TPM4 durante la neoplasia intraepitelial (NIC), cáncer micro invasivo y

cáncer cérvico escamoso (CCE) invasivo, donde evaluó la aplicación clínica como biomarcadores de las proteínas mencionadas así como su implicación en la prognosis. En conclusión, este estudio fue el primero en describir la expresión dinámica de las proteínas durante el DT del CaCu (Lomnytska y Becker, 2011). Sin embargo, la mayoría de las proteínas identificadas como diferencialmente expresadas entre los diferentes estudios proteómicos del CaCu no son similares, y esto se debe principalmente a que cada estudio presenta la diversidad de los pacientes (edad, estado hormonal, genética, medio ambiente), a las biopsias (contenido estromal, estadios distintos, tipo de cáncer) y al tipo de control utilizado (líneas celulares, tejido normal y tejido adyacente al canceroso). Además, las biopsias solo representan un punto tardío del CaCu. Esta diversidad de controles y análisis estático al comparar solo un punto del DT del CaCu, no permiten establecer la dinámica proteómica del DT a distintos tiempos (Pyo *et al.*, 2005; SM *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009). En la tabla 3 se muestran algunos biomarcadores para el cáncer cervicouterino basados en enfoques moleculares y celulares, tales como; Antígeno para carcinoma de células escamosas (SCC-Ag), Fragmentos séricos de citoqueratina (CYFRA) y Antígeno carcinoembrionario (CEA).

Kato y Tarigoe (1997), describieron el antígeno para carcinoma de células escamosas (**SCC-Ag**) en subfracciones de antígeno 4 en tumores neutrales y ácidos (Di Saia y Creasman, 2002). Así mismo, los niveles elevados de carcinoma cervical de células escamosas (SCC) fueron detectados en un 28% a 88% de los carcinomas de células escamosas en suero (Ohara *et al.*, 2002), durante el tratamiento temprano del cáncer cervicouterino. Por lo tanto, los niveles de SCC han sido relacionados al estado de daño, tamaño del tumor y profundidad de la invasión estromal (Takeda *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha demostrado en estudios que los niveles elevados de SCC pueden predecir el valor de prognosis (Gaarenstroom *et al.*, 2000), y de esta manera implementar SCC-Ag para la examinación de pacientes con cáncer cervicouterino.

El antígeno carcinoembrionario (**CEA**), ha sido fuertemente sugerido como potencial biomarcador para el desarrollo temprano del cáncer y como indicador de prognosis (Sugarbaker, 1985). Así mismo, **CEA** ha sido descrito en niveles altos bajo condiciones no cancerosas, aunque en pacientes con CaCu y cáncer de ovario la aplicación de CEA es de suma importancia. Di Saia y colaboradores (1997), reportaron que existe un incremento progresivo del valor de CEA en los estados, I al estado II (26%-88%), en pacientes con carcinoma invasivo de células escamosas, lo cual indica el valor de CEA

como marcador en CaCu (Disaia et al., 1977).

Por último, los fragmentos séricos de citoqueratina (**CYFRA**) son los constituyentes con mayor abundancia en el citoesqueleto de las células epiteliales y también pertenecen al grupo de proteínas de filamentos intermedios. CYFRA es referencia de las concentraciones séricas de fragmentos de citoqueratina 19, una subunidad ácida de citoqueratina que es expresa en el epitelio normal y en carcinomas cervicouterinos. Sin embargo, los niveles elevados de fragmentos de citoqueratinas han sido detectados en un 42 a 52% de los pacientes con carcinoma de células escamosas de cervicouterino (Suzuki et al., 2000). Por lo tanto, los niveles de CYFRA también pueden ser usados para evaluar el estado de daño, tamaño del tumor y profundidad de la invasión estromal (Molina, 2005). Es importante mencionar que, el antígeno polipeptídico tisular (**TPA**) y el antígeno específico polipeptídico tisular (**TPS**), son los tipos de citoqueratinas mayormente usados para la predicción de prognosis durante el tratamiento, y en el monitoreo de daño después del tratamiento primario (Gaarenstroom et al., 2000).

Tabla 3: Biomarcadores específicos para CaCu (modificado de Dasari et al., 2015).

Marcador	Uso propuesto	Nivel de evidencia
SSC-Ag	Identificación de grupos de alto riesgo con metástasis de nodo linfoide metastásico en células escamosas de cérvix	III-IV
	Pretratamiento para la predicción de prognosis en células escamosas de cáncer cérvico uterino	III-IV
	Predicción de la respuesta a tratamiento en cáncer cérvico uterino de células escamosas.	III-IV
CA-125	Pretratamiento para la predicción de prognosis, en particular en adenocarcinoma de cérvix	III-IV
	Predicción preoperativa de la presencia de nodo linfoide metastásico, en particular adenocarcinoma de cérvix	III-IV
CEA	Monitoreo del daño, en particular adenocarcinoma de cérvix	III-IV
	Pretratamiento de predicción de prognosis	III-IV
	Predicción preoperativa de la presencia de nodo linfoide metastásico, en particular adenocarcinoma de cérvix	III-IV
	Pretratamiento para la predicción de respuesta clínica a quimioterapia neoadyuvante.	IV
Citoqueratinas (TPA, TPS, Cyfra21-1)	Pretratamiento para la predicción de prognosis	III-IV
	Monitoreo de daño después del tratamiento primario.	III-IV

I.VIII.III. La oncoproteómica enfocada a la mitocondria

La estrategia experimental más eficiente y sofisticada para definir el proteoma mitocondrial mediante la identificación de proteínas altamente enriquecidas de extractos mitocondriales ha sido la espectrometría de masas (MS). Incluso los avances en la separación y las técnicas de tándem de espectrometría de masas permiten una detección más acertada, incluyendo la identificación de hasta 2533 proteínas de extractos mitocondriales. Algunos estudios realizados mediante la espectrometría de masas enfocada a la mitocondria son descritos a continuación.

Los agentes alquilantes llamados Cloroetiloureas (CEU) se unen covalentemente a β -tubulina (BTAC) afectando a la polimerización del microtúbulo. Patenaude y colaboradores en 2007, reportaron la identificación de un grupo de CEU que corresponde a las oxazolinas, las cuales inhiben el crecimiento celular, apoptosis y la interrupción de los microtúbulos sin la alquilación de la β tubulina. De esta manera BTAC Y N-BTAC desencadenan el colapso del potencial mitocondrial y modulan los niveles de EROs seguidos de la activación de las caspasas 8 y caspasa 9. Sus resultados sugieren que BTAC Y N-BTAC a pesar de su habilidad común para afectar la red de microtúbulos, también desencadenan diferentes mecanismos citotóxicos en las líneas celulares, proponiendo la función de la mitocondria en estos mecanismos y el potencial de N- BTAC como blanco terapéutico para las células resistentes a hipoxia (Patenaude et al., 2007).

Por otro lado, Shen y colaboradores (2009), reportaron que el Dicitrato de lantánido (YbCit_2)³⁻ inhibe el crecimiento celular en la línea celular HeLa e induce apoptosis, similares a los efectos de (LaCit_2)³⁻. Los resultados proteómicos de células tratadas con (YbCit_2)³⁻ revelan cambios profundos en proteínas relacionadas a la mitocondria y estrés oxidativo, sugiriendo de este modo que la disfunción mitocondrial juega un papel principal en la apoptosis inducida por (YbCit_2)³⁻, lo cual fue confirmado por un descenso en el potencial mitocondrial transmembranal y el incremento de la generación de EROs en células tratadas con (YbCit_2)³⁻. No obstante, también fue descrito que la apoptosis inducida por (YbCit_2)³⁻ estaba acompañada de la activación de caspasa 9 y la escisión proteolítica específica de PARP, lo cual induce un incremento en la proteína proapoptótica Bax y el descenso de la proteína anti apoptótica Bcl-2, lo cual sugiere que una ruta mitocondrial de la apoptosis celular en las células con (YbCit_2)³⁻ ayuda a entender los mecanismos moleculares de la apoptosis inducida por lantánidos en las células tumorales (Shen et al.,

2009).

De la misma forma, la actividad antiapoptótica de Bcl-2 ha sido extensamente estudiada. Villeneuve y colaboradores (2010) combinaron la inmunocaptura de Bcl-2 con un análisis mediante espectrometría de masas, usando fracciones mitocondriales altamente puras aisladas de células cancerosas humanas, donde lograron identificar 127 proteínas que interactúan con Bcl-2. La ontología génica utilizada reveló principalmente un enriquecimiento de proteínas mitocondriales, inclusive proteínas asociadas a retículo endoplásmico y proteínas asociadas a citoesqueleto. El estudio se centró en la identificación de galectina 7 (Gal7), un miembro de la familia de las lectinas con unión a betagalactosidasa que se le conoce función proapoptótica, así como su asociación a Bcl2. En conclusión, los datos presentados demuestran que los coinmunoprecipitados de Bcl2 con Gal7 se haya localizado en la mitocondria en una manera dependiente de Bcl2 y por lo tanto sensibiliza a la mitocondria para la señal apoptótica. También se demostró que la interacción Bcl2/Gal7 es anulada posteriormente al estrés genotóxico. De esta manera se sugiere que la unión de Gal7 a Bcl2 puede constituir un nuevo blanco en el estudio de la apoptosis intrínseca (Villeneuve, 2010).

Herman (2003), analizó las subunidades de Citocromo C oxidasa, codificadas en la mitocondria y la correlación con la progresión maligna de tejidos de próstata humana. Las subunidades I-III de la Citocromo C oxidasa comprende el "núcleo catalítico" de la enzima, y son sintetizados a partir del ADN mitocondrial, las subunidades restantes (IV-VIII) son sintetizadas del ADN nuclear. De este modo, se observó un cambio significativo en las concentraciones relativas de las subunidades IV, Vb y VIc de la Citocromo C oxidasa codificada en el núcleo, comparadas a las subunidades I y II mitocondriales fueron visibles durante la progresión de cáncer de próstata del epitelio normal, a través de lesiones premalignas a carcinoma invasivo. Es importante destacar que este cambio fue descubierto al inicio aun en el estado premaligno, por lo que este análisis enfoca una función para las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo en la carcinogénesis (Herman et al., 2003).

II. Justificación

La mitocondria ha sido ampliamente descrita como la "fuente de poder" de la célula. Sin embargo, este mismo organelo también ha sido asociada a diversos procesos que inducen, promueven y mantienen el desarrollo del cáncer, tales como; la sobreproducción de ATP, mutaciones en el ADN y enzimas mitocondriales, cambios en los niveles intracelulares de calcio, sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, y un desajuste en la liberación de proteínas proapoptóticas, induciendo parcialmente el desarrollo y soporte al cáncer. No obstante, existen algunos tipos de cáncer que además se encuentran asociados a algunos virus, como es el caso del virus del papiloma humano con el cáncer cervicouterino, el cual se encuentra entre los tipos de cáncer con más números de defunciones en México, convirtiendo a esta patología en un reto para la salud pública nacional.

Por otra parte, el desarrollo de técnicas sofisticadas que analizan específicamente a las proteínas, ha tenido gran desarrollo en los últimos años para la investigación más sensible y precisa para la detección de proteínas implicadas en el desarrollo de la carcinogénesis, también llamadas oncogénicas, las cuales pueden funcionar como blancos terapéuticos o biomarcadores para la detección temprana del cáncer. Metodologías proteómicas que en este proyecto servirán para dilucidar el perfil proteómico de la mitocondria en el cáncer cervicouterino.

III. Hipótesis

La expresión proteica en mitocondrias de ambas líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaLo y SiHa), con secuencias génicas de los virus del papiloma humano tipo 18 y 16 respectivamente, presentarán un perfil proteómico, el cual también diferirá entre ambas. Por otra parte, el proteoma de las mitocondrias de la línea celular no cancerosa (HaCaT), presentará un perfil proteómico distinto a CaLo y SiHa, pero característico de las células sin daño por cáncer.

IV. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es comparar y estudiar el desarrollo del cáncer, a partir del proteoma mitocondrial expresado en las líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaCu); CaLo (VPH 18) y SiHa (VPH 16), contra el proteoma mitocondrial expresado en la línea celular control HaCaT.

IV.I. Objetivos específicos

Identificar el proteoma mitocondrial de las tres líneas celulares mediante cromatografía líquida acoplada a tándem de espectrómetro de masas (LC MS/MS).

Evaluar el enriquecimiento mitocondrial mediante la base de datos para proteínas mitocondriales *Mitominer*.

Establecer un análisis cualitativo de las proteínas expresadas en cada línea celular para obtener las proteínas específicas de cada línea celular.

Establecer un análisis cuantitativo mediante ANOVA para determinar la sobreexpresión y subexpresión de las proteínas mitocondriales en las tres líneas celulares.

Obtener un enriquecimiento de proteínas mediante la base de datos bioinformática *DAVID*.

Construir redes de interacción proteína-proteína, para la obtención de "genes clave" del proteoma mitocondrial en cáncer cervicouterino.

V. Material y métodos

El siguiente diagrama de flujo (figura 8), se representan todos los pasos metodológicos, llevados a cabo durante el presente proyecto, partiendo del cultivo de las distintas líneas celulares, hasta la obtención de los "genes clave". Cada proceso ha sido descrito a continuación.

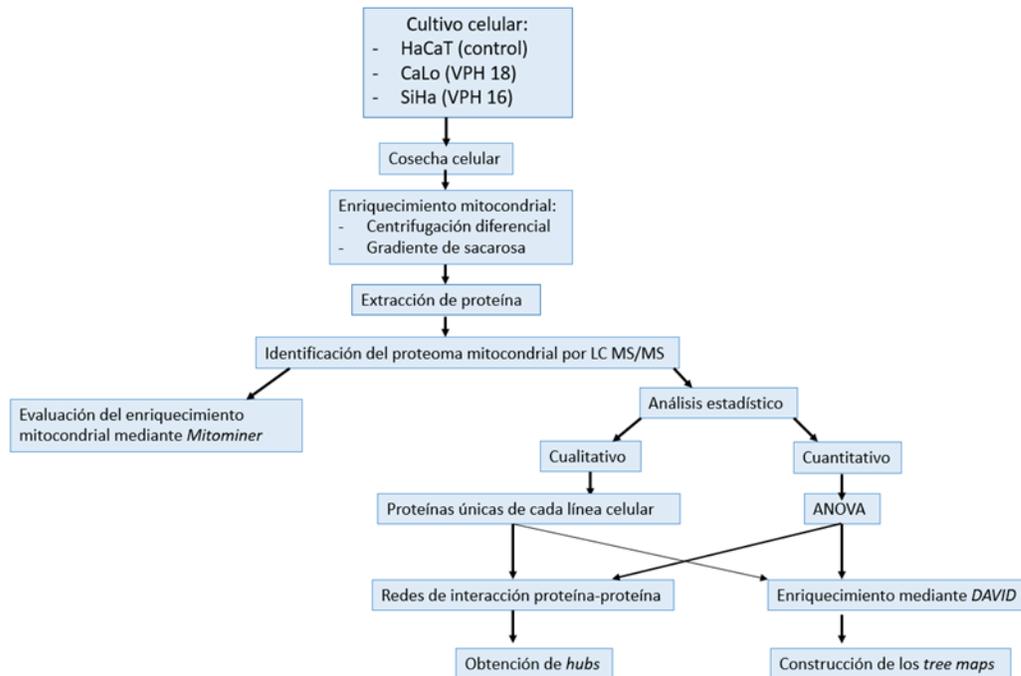


Figura 8: Diagrama de flujo general.

V.I. Cultivo de líneas celulares

Se realizó el cultivo de dos líneas celulares de cáncer cervicouterino, CaLo (adenocarcinoma con VPH 18) y SiHa (adenocarcinoma con VPH 16), y de una línea control: HaCaT (queratinocitos). Las tres líneas celulares se crecieron en medio RPMI Advanced (Invitrogen, CA), suplementado con suero fetal bovino 10%, L-Glutamina 1% y Antibiótico-Antimicótico 1% (10,000 unidades de penicilina, 10mg de estreptomina y 25 mg de anfotericina por mL). Así mismo, los cultivos se mantuvieron en condiciones estables de temperatura de 37°C, humedad relativa (90%), CO₂ (5%) y O₂ (95%).

V.I.II. Rehabiliación celular

La descongelación de las células se realizó lo más rápido posible para lograr una mayor viabilidad. Primero se realizó una descongelación parcial de los viales incubándolos a 37°C, donde, el contenido se transfirió a un tubo con 9 ml de medio de cultivo suplementado, para proseguir con la centrifugación a 200 g durante 5 minutos. Posteriormente, el pellet celular fue re-suspendido en 5 ml de medio suplementado y, transferido a una caja de cultivo de 75 cm². Por último, la caja se llevó a 10 ml de volumen final con medio de cultivo suplementado.

V.II. La cosecha de las líneas celulares

Cuando los cultivos celulares alcanzaron una confluencia del 90%, el medio fue removido con una pipeta, y se adicionó a cada caja 5 ml de verseno 1X (Tris base 28 mM, NaCl 136 mM, KCl 5.3 mM y EDTA 1.3 mM, pH 7.4), para proceder a desprender las células, así mismo, el volumen celular se centrifugó a 200 g por 5 minutos, y por lo tanto, se desechó el sobrenadante, para obtener el paquete celular, el cual se lavó con PBS 1X.

V.III. El enriquecimiento de mitocondrias

Para obtener un mejor enriquecimiento mitocondrial se llevó a cabo un protocolo de extracción de mitocondrias basado en centrifugación diferencial, seguido por un protocolo de gradiente de sacarosa (figura 9).

La centrifugación diferencial

A partir de los paquetes celulares obtenidos, inmediatamente se procedió a la extracción de mitocondrias. Así mismo, el paquete celular fue re-suspendido en 10 ml de solución amortiguadora Hepes a pH 7.4 (sacarosa 250 mM, EDTA 1mM, HEPES 10mM), para proceder a ser homogenizado 25 veces con un *Potter*.

Posterior a esto, el homogenizado se centrifugó a 1,500 g durante 20 minutos, 4°C, el sobrenadante se colectó en un tubo y se mantuvo a 4°C. Por otra parte, el paquete celular se re-suspendió en 5 ml de solución amortiguadora Hepes a pH 7.4, para proceder a homogenizar nuevamente. Estos ciclos de homogenización-centrifugación se llevaron a cabo hasta juntar 4 sobrenadantes. Finalmente, los sobrenadantes fueron centrifugados a 15,600 g durante 50 minutos a 4°C, donde el sobrenadante fue desechado, y el pellet obtenido corresponde a la fracción mitocondrial.

El gradiente de sacarosa

Con el propósito de obtener una fracción mitocondrial con un mejor enriquecimiento, se procedió a tratar el paquete mitocondrial obtenido de la centrifugación diferencial, mediante un gradiente discontinuo de sacarosa de dos concentraciones; 1.7 M (1.7 M de sacarosa, tris base 10 mM, EDTA 0.1 mM, PH 7.6) y 1 M (1M de sacarosa, tris base 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.6). Por lo tanto, el gradiente de sacarosa fue colocado en el siguiente orden: 3.2 ml de buffer sacarosa al 1 M, seguido de 2 ml de buffer sacarosa al 1.7 M (figura 9).

De este modo, el paquete mitocondrial obtenido de la centrifugación diferencial y el posterior gradiente de sacarosa. Fue re-suspendido en 3ml de buffer amortiguador MS 1x (manitol 84 mM, sacarosa 28 mM, EDTA 2 mM, tris-HCl 2 mM), para proceder a ser colocado en la parte superior del gradiente. Eventualmente, la colecta fue llevada a cabo por una centrifugación a 40,000 g durante 60 minutos a 4°C, para lograr obtener la fracción mitocondrial mediante una jeringa. Así mismo, esta misma fracción fue re-suspendida en 4 ml de amortiguador MS 1X, centrifugada una vez más a 18,000 g durante 40 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue desechado y el pellet mitocondrial fue almacenado a -80°C hasta su uso.

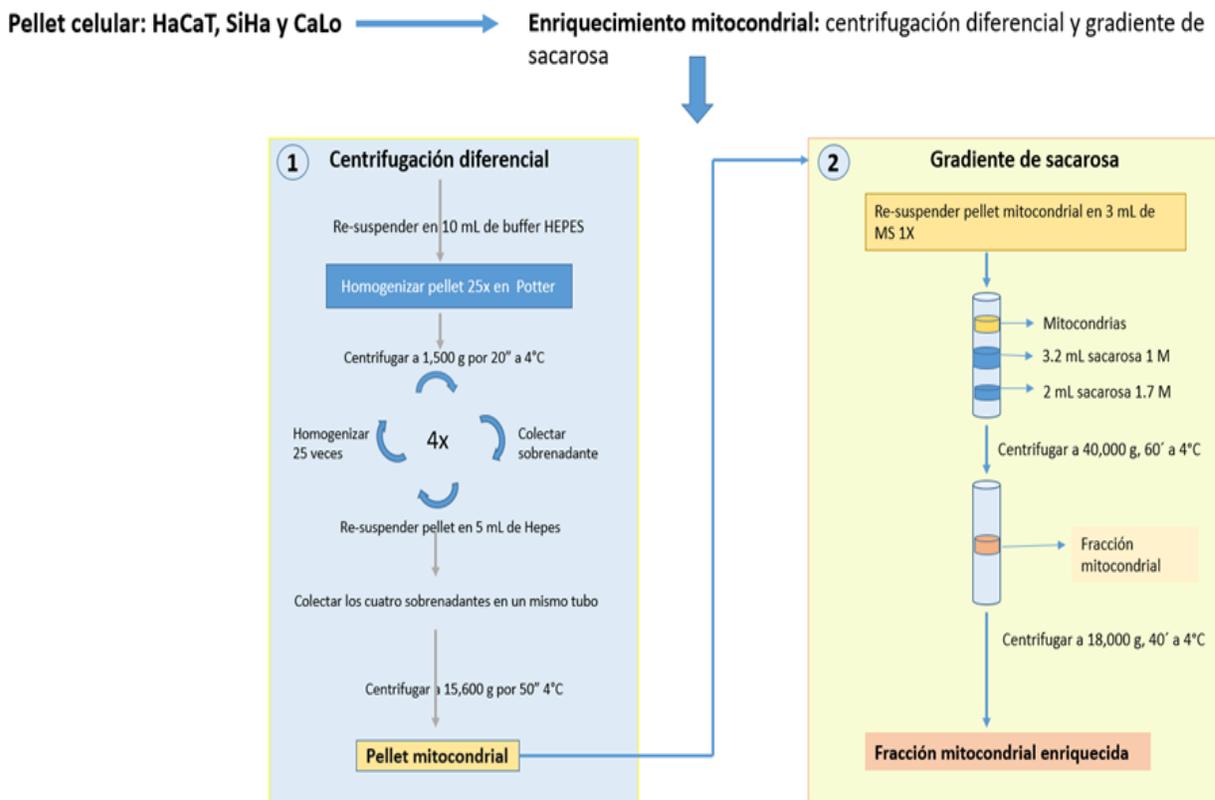


Figura 9: Diagrama de flujo del enriquecimiento mitocondrial por centrifugación diferencial y gradiente de sacarosa.

V.IV. La extracción de proteínas

Los botones de los enriquecimientos mitocondriales de las líneas celulares CaLo, SiHa y HaCaT, se resuspendieron en 200 µl de buffer SDS (Tris-HCl 100 mM pH 8.6, Dodecilsulfato sódico (SDS) 4%, Dithiotreitol (DTT) 10 mM, Inhibidores de proteasas 1X, Glicerol 10%), y fueron colocados en *Vortex* por 5 minutos, tratando de disgregar lo mejor posible el botón. Posteriormente, se colocaron en un baño sónico durante 10 a 5 minutos preferentemente en hielo, y se prosiguió a centrifugar a 13,000 rpm por 10 min para quitar restos insolubles. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a menos -70°C, y se alicuotaron 30 µl de cada una respectivamente, para ser usadas en la determinación de proteína por SDS-PAGE 1D (Gel electroforesis Dodecilsulfato sódico-poliacrilamida).

V.V. Normalización de la carga del enriquecimiento mitocondrial

Con el propósito de obtener una cuantificación correcta de la concentración de proteína en relación microgramo por microlitro (µg/µl), se llevó a cabo una normalización de la carga del enriquecimiento mitocondrial, mediante SDS-PAGE 1D, donde se utilizaron 3 µl de cada extracto del enriquecimiento mitocondrial (CaLo, SiHa y HaCaT), contra un extracto de proteína de *Rhizobium etli*, el cual había sido extraído con Fenol, resuspendido en buffer TBP (Urea 7 M, Thiurea 2 M, CHAPS 4%, TBP 2 mM, Anfolinas (3-10) 2%, DTT 60 mM), y previamente determinada y cuantificada la proteína por el método de Bradford ácido. Es importante señalar que se llevó a cabo de esta manera ya que el buffer de SDS no es compatible con el método de Bradford ácido.

Posteriormente, se llevó a cabo un gel de Acrilamida al 12%, donde se cargaron en cada pozo: 5, 10 y 15 µg de proteína utilizada como control de carga de *R. etli*, seguidos de 3µl de los extractos mitocondriales de las líneas celulares con sus respectivas replicas experimentales. Los parámetros para la electroforesis fueron: una hora a 30 mili amperes por gel. Por lo tanto, una vez que finalizó la corrida electroforética se retiró el gel, para proceder a ser fijado con 50 ml de solución de fijado (Etanol 30%, Ácido fosfórico 2%, Agua MQ 68%) durante 30 minutos en agitación lenta. Después de esto, se dieron tres lavados de 10 minutos al gel con agua MQ, y se añadió el Azul de coomassie coloidal. El gel se mantiene a temperatura ambiente toda la noche.

Finalmente, el gel se lavó con 50 ml de solución destiñidora (Etanol 10%, Ácido fosfórico 2%, H₂O MQ 88%), y eventualmente fue colocado en agua MQ, para proceder a ser escaneado en un densitómetro de la marca *Biorad (GS-800 Calibrated Densitometer)*. Los geles fueron visualizados en el programa *Quantity One versión 4.6.9 de Biorad*, donde se realizó la densitometría de los carriles de interés, así como también se calculó el ajuste de proteína. Por último, se llevó a cabo otro gel utilizando 10 µg de proteína de los enriquecimientos de mitocondria de las diferentes líneas celulares, con los controles de carga de *R. etli* para verificar que la carga fuera correcta.

V.VI. Reducción y alquilación

Se utilizaron 50 µg de proteína de acuerdo a la normalización previa, se procedió a calentar la muestra a 40°C durante 30 min, y se añadieron Tris 2 M a pH 8.6, para obtener una concentración final de 200 mM. Posteriormente, se agregó Iodoacetamida (IAM) al 200 mM, y se mantuvo en incubación durante 30 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz.

V.VII. La digestión de proteínas

Una vez reducida y alquilada la proteína, se precipito con 9 volúmenes de etanol absoluto, previamente almacenado a -70°C durante toda la noche o 2 horas. Y se prosiguió a centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se recuperó la pastilla. Posteriormente, se llevaron a cabo dos lavados con 500 µl de etanol al 90%, utilizando una centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos, así mismo, se dejó secar por inversión. Una vez seca la pastilla, se re suspendió en 100 µl de Bicarbonato de amonio (BCA) al 50 mM, con Deoxicolato (DOC) al 0.5%, posteriormente se agregó 1 µg de Tripsina y se dejó incubar a 37°C durante 16 horas. Se lavó con acetato de etilo y TFA, para eliminar todo el detergente.

El lavado con Acetato de etilo y TFA, se llevó a cabo aumentando el volumen final de la digestión a 100 µl de agua, se añadieron 100 µl de acetato de etilo, y posteriormente se agregaron entre 0.5 y 1 µl de TFA (este paso se debe llevar a cabo muy rápido, ya que el TFA se puede evaporar antes de llegar a la mezcla de la digestión), se procedió a dar Vortex vigorosamente durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se eliminó la fase orgánica, la cual se

encuentra en la parte superior y se forma en pequeño velo interfase. Posteriormente, se añadió otro volumen 100 µl de acetato de etilo, y se procedió a dar vortex vigorosamente durante 5 minutos, e inmediatamente se centrifugó a 13,000 rpm, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se descartó la fase orgánica sin tocar la interfase, ni la fase acuosa, y se procedió a dejar evaporar, para finalmente resuspender la pastilla en 100 µl de Ácido fórmico al 0.1%.

V.VIII. Análisis de las muestras mediante LC MS/MS

Los datos fueron analizados en un *Q Exactive Plus OrbitrapMassSpectrometer (Thermo Fisher Scientific)*. Donde se inyectaron 4 µL (2 µg de péptidos) en un *Ultimate 3000 RSLCnano HPLC system* acoplado en línea a un espectrómetro de masas híbrido de alta resolución *Q Exactive Plus*. Las muestras fueron atrapadas en una pre columna y posteriormente fueron colocadas en un gradiente de 250 minutos a 250 nl/min., usando una columna capilar (*Easy-spray column* 15 cm x 75 µm de diámetro interno, *PepMap* 100 C18, 3 µm). La fase móvil se describe de la siguiente manera: (A) 1% de Acetonitrilo, 0.1% de Ácido fórmico en agua y (B) 90:10 (v/v) Acetonitrilo: agua, Ácido fórmico. El espectrómetro de masas se operó en modo positivo, empleando data *dependentadquisition*, el rango de adquisición de masas en *Full MS* fue de 300-2,000 m/z. En el cuádruplo se aislaron 10 iones más intensos, y fueron fragmentados. Los iones precursores fueron medidos a una resolución de 70,000 a 200 m/z, y los fragmentos a una resolución de 17,500. Únicamente fueron fragmentados los iones con estados de carga a partir de dos.

La identificación de proteínas y cuantificación libre de marcaje (FLQ) se realizó en el programa *MaxQuant* versión 1.6.1.0, empleando como criterios de búsqueda: Tripsina como enzima de digestión, carbamidometil cisteína como modificación fija, y oxidación de la metionina como modificación variable. La base de datos utilizada para la identificación fue "*Proteoma Humano UP000005640*".

V.IX. El análisis estadístico de las proteínas

El análisis de los valores de proteínas se llevó a cabo mediante un método cualitativo y, posteriormente un análisis cuantitativo. Para el análisis cualitativo se compararon las proteínas expresadas en cada línea celular, para obtener el número de proteínas específicas de las mitocondrias para cada línea celular, así como aquellas compartidas en las tres líneas celulares. Para el análisis estadístico se utilizaron, solo aquellas proteínas que estaban presentes en las tres líneas celulares, posteriormente se imputaron los datos mediante el método *random forest (software R)*, una vez imputados los datos, se normalizaron. Finalmente se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar que tanto diferían en cantidad las proteínas expresadas.

El análisis de la varianza es una herramienta en la cual la variación total presente en un conjunto de datos se distribuye en varios componentes, asociada a cada uno de estos componentes hay una fuente específica de variación, así en el análisis se puede saber la magnitud de las contribuciones de cada una de estas fuentes de variación total. De esta manera el ANOVA, se utiliza ya sea para; estimar y probar las hipótesis acerca de las varianzas de las muestras y, estimar y probar la hipótesis acerca de las medias de las muestras.

Se parte desde los datos seleccionados aleatorios, para cada grupo se debe tomar el total de los valores y su respectiva media, posteriormente la suma total de cuadrados; la cual se define como la suma de los cuadrados de las desviaciones de cada observación de la media de todas las observaciones tomadas en conjunto, seguida de la suma de los cuadrados dentro de los grupos, el cual se obtiene mediante la suma de las desviaciones al cuadrado de las observaciones individuales respecto de su media. La suma de los cuadrados entre los grupos, se obtiene mediante la desviación al cuadrado de la media de cada grupo a partir de la gran media y multiplicar el resultado por el tamaño del grupo, para finalmente sumar todos los resultados.

V.X. La construcción de los *tree map*

Para la representación de la sobreexpresión y subexpresión de las proteínas se utilizó el software *REVIGO*, el cual funciona visualizando los procesos biológicos determinados por ontologías génicas. Se obtuvieron las GO (ontología génica) desde la base de datos DAVID (base de datos para la descripción, visualización y el descubrimiento integrado). Posteriormente los datos fueron cargados a *REVIGO*.

V.XI. El desarrollo de las redes de interacción proteína-proteína (PPI)

Las redes de interacción proteína-proteína fueron llevadas a cabo mediante el software *Cytoscape*, se ingresaron la lista de genes por medio de *genemania*, se ajustaron los parámetros "interacción física y genética", para obtener los "hub genes" se utilizó el plugin *Cytohubba* para clasificar los 5 principales.

VI. Resultados

Se obtuvo un total de 2885 proteínas, de las cuales 2401 presentaban más de dos péptidos, de estas mismas 1704 tenían al menos dos o más valores de intensidad.

VI.I. La validación del enriquecimiento mitocondrial

Con el propósito de tener la certeza de haber obtenido la cantidad considerablemente alta de proteínas mediante la extracción y purificación de las mitocondrias de cada una de las líneas celulares, se prosiguió a comparar el total de proteínas identificadas mediante LC MS/MS, de las cuales se obtuvieron 849 proteínas mitocondriales las cuales equivaldrían al 36.54% de las proteínas totales (2323) identificadas en este experimento, contra la base de datos de proteína total (anteriormente obtenida) se obtuvieron 668 proteínas mitocondriales correspondientes al 13.82% de un total de 4823 proteínas de la base de datos de proteínas totales. De esta manera se logró un enriquecimiento de proteína mitocondrial del 22.72% mediante esta metodología (centrifugación diferencial y purificación).

VI.II. El análisis cualitativo

Posteriormente, después de filtrar solo las proteínas con dos o más péptidos, que también presentaran dos o más valores se procedió a separar las proteínas por línea celular, obteniendo así las proteínas específicas de las mitocondrias de cada línea celular, se observó un total de 110 proteínas para CaLo (VPH 18), 24 para la línea celular SiHa (VPH 16), 62 proteínas para la línea celular control HaCaT y 67 proteínas se hallaron en ambas líneas celulares de adenocarcinoma. Finalmente se obtuvieron 1258 proteínas presentes en las tres líneas celulares. Con este material se realizó el análisis cualitativo.

VI.III. El análisis estadístico

El análisis cuantitativo se llevó a cabo con 1248 proteínas, eliminando 10 proteínas las cuales presentaban valores muy altos de intensidad, estas proteínas fueron compartidas en las tres líneas celulares. El análisis estadístico se llevó a cabo en 1248 proteínas mediante ANOVA (análisis de la varianza), ya que este análisis nos permite comparar más de dos variables en dos o más datos experimentales a la misma vez. Entonces se compararon las

medias de las diferentes abundancias para cada proteína mediante la varianza.

Se procedió a normalizar los valores de intensidad mediante cada una línea celular, para posteriormente imputar los datos faltantes mediante el método *Random forest* (software R) en las muestras biológicas.

De las 1248 proteínas 668 fueron estadísticamente significativas, de las cuales se hallan las diferenciadas, la prueba post hoc realizada comparando dos líneas celulares, de la manera siguiente; HaCaT contra CaLo, HaCaT contra SiHa y SiHa contra CaLo. Determinando así la sobre expresión por medio de un *p-value* menor a 0.1, y descritas no diferenciadas fueron determinadas por un valor de *p-value* de 0 o mayor a 0.1 (figura 10).

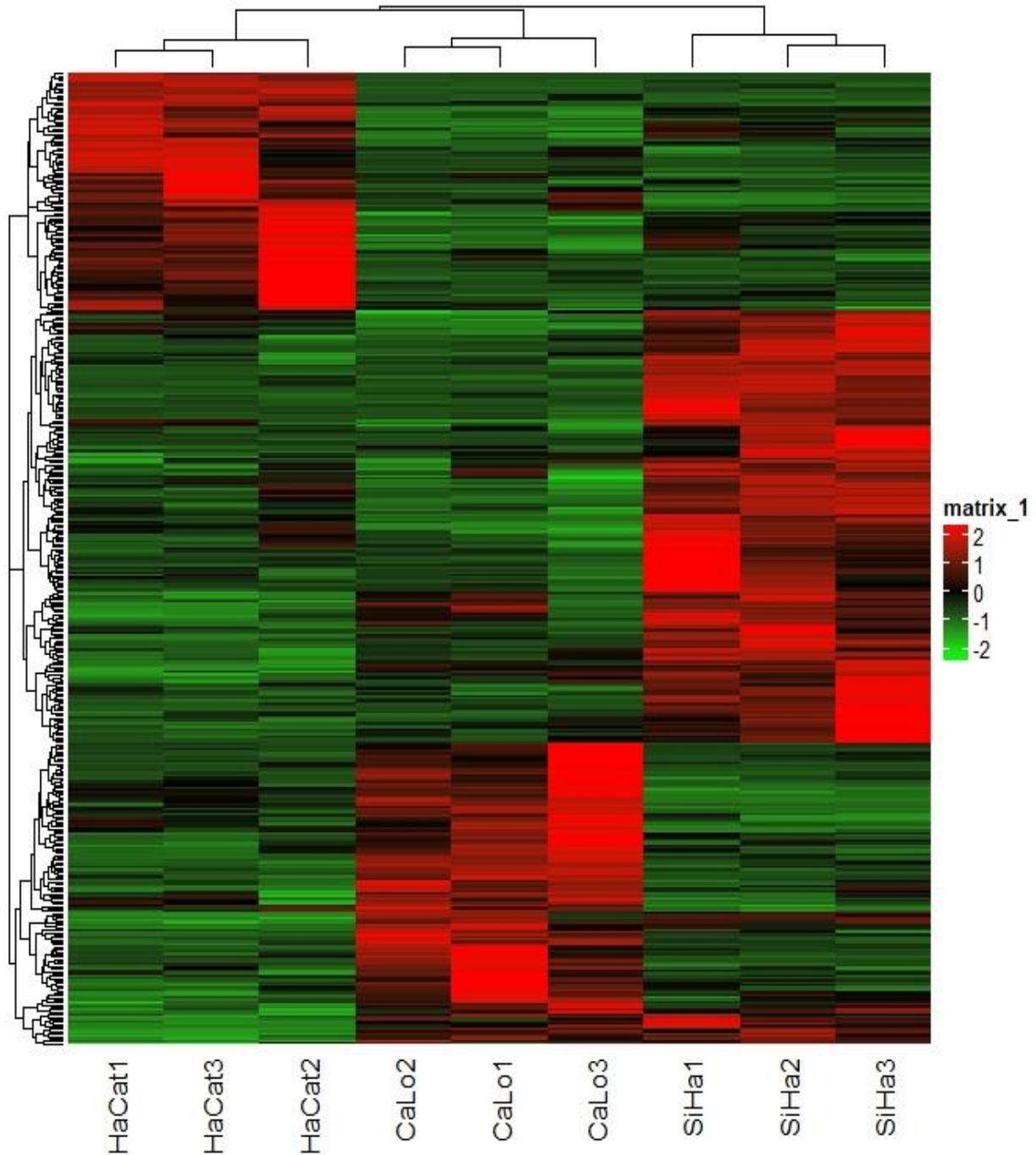


Figura 10: Heatmap de los diferentes valores de cantidad de proteína expresada en las mitocondrias de las tres líneas celulares con su respectivo triplicado biológico. Donde el color rojo muestra aquellas proteínas sobreexpresadas de cada línea celular en comparación con las otras dos, el verde significa aquellas proteínas compartidas entre las tres líneas celulares que no presentan sobreexpresión ante las demás, correspondientes a un p-value de 0 o mayor a 0.1. De este modo, aquellas con un p-value menor a 0.1, son descritas como sobreexpresadas correspondientes a 99 proteínas en HaCaT, 103 proteínas sobreexpresadas en CaLo (VPH 18) y 177 proteínas sobreexpresadas en SiHa (VPH 16).

En el *heatmap* anterior se muestra como difiere la expresión de proteínas específicas entre cada línea celular utilizada en el experimento, lo cual señala que existen proteínas que presentan funciones particulares entre dichas líneas celulares, en la línea control, así como en las cancerosas con diferentes tipos de virus presentes. También se puede resaltar el hecho de que, en cada línea celular las repeticiones biológicas presentan un patrón de expresión similar entre ellas, señalando que la misma metodología realizada en todas las líneas celulares fue implementada de manera eficiente. Así como también se presentarán diferentes procesos biológicos entre las tres líneas celulares.

VI.IV. Enriquecimiento de proteínas

A partir de los datos obtenidos, el total de proteínas sobre expresadas para cada línea celular obtenidas del análisis cuantitativo, adicional, las proteínas específicas para cada línea celular. Se obtuvieron los siguientes valores (tabla 4).

Tabla 4: Representación de las distribuciones de proteínas utilizadas para la ontología génica.

LINEA CELULAR	HaCaT	CaLo	SiHa
Proteínas sobreexpresadas	99	103	177
Proteínas específicas	62	110	24
Total	161	213	201

Del total de proteínas, se consultó la ontología génica por proceso biológico para cada línea celular mediante el software *DAVID* (base datos para la descripción, visualización y el descubrimiento integrado). De esta manera se utilizaron los siguientes parámetros. *Oficial gene symbol > gene list > Homo sapiens*.

Una vez obtenidos los datos, estos fueron ingresados en la herramienta bioinformática *REVIGO*, ingresando el valor de GO (ontología génica), y el respectivo *p-value* de cada proteína. *REVIGO* funciona comparando la similitud del GO "term" basado en el *p-value*, reduciendo la redundancia de los límites, formando "clusters" mediante la frecuencia de la proteína, la cual está dada en el porcentaje de las proteínas encontrado en el GO "term", de *UniProt*. De esta manera la frecuencia más alta representa los "clusters" (Supek et al., 2011). Finalmente, se llevó a cabo un *tree map* para cada línea celular, los cuales son descritos a continuación.

VI.IV.I. El enriquecimiento mitocondrial de la línea celular HaCaT

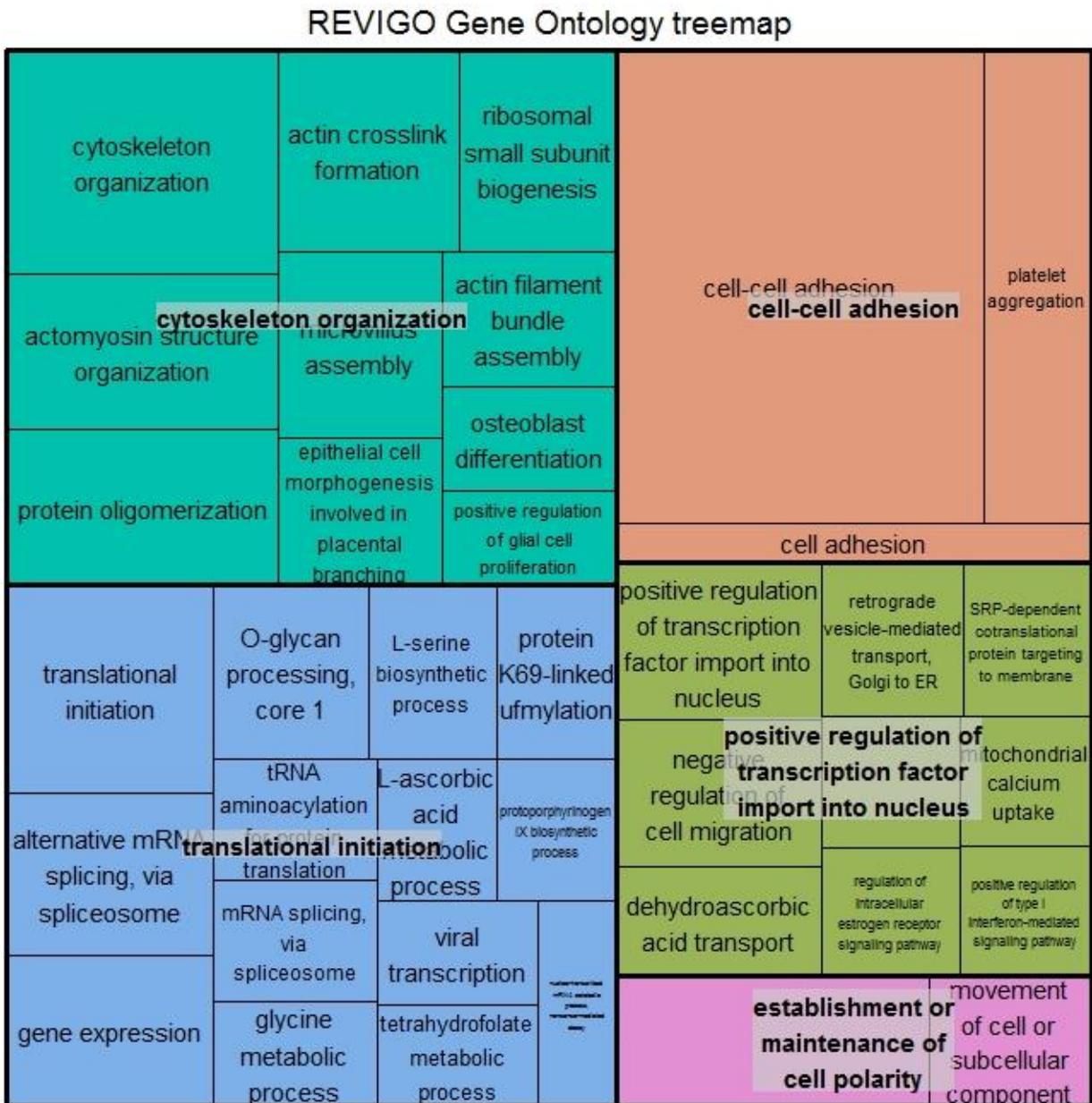


Figura 11: Representación de la expresión de proteínas en la línea celular HaCaT mediante un treemap. Cada rectángulo representa un cluster de la integración de un proceso biológico, la sobreexpresión de las proteínas está representada en el tamaño del rectángulo.

En el *tree map* anterior (figura 11) encontramos 38 GO "terms", agrupados en 5 "clusters" de los cuales algunos de los más representados se encuentran la organización del citoesqueleto, adhesión celular y la traducción, de los cuales algunos se hallan descritos abajo.

VI.IV.I.I. Organización del citoesqueleto

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de HaCaT: TNIK, MACF1, PRKCI, CNN2, CD2AP, CAPZB, TUBB3, SPTAN1, SPTB.

Dentro de las funciones principales del citoesqueleto se encuentran permitir el cambio de forma durante el movimiento, el transporte a la mitocondria, la conversión del estímulo mecánico a señalización (Fletcher y Mullins, 2010). También, ambas fuerzas físicas tanto externa como interna pueden ser transmitidas a través del citoesqueleto a otros organelos incluyendo el núcleo y la mitocondria. La red del citoesqueleto puede responder a fuerzas externas por histéresis o memoria, las estructuras citoesqueléticas de vida larga pueden ser epigenéticamente heredadas por sus cohortes (Fletcher y Mullins, 2010). La actina participa en la redistribución de la red mitocondrial durante la mitosis, el transporte de mitocondria a través de las células hijas al fin de la mitosis es promovido por una proteína asociada al citoesqueleto (Cenp-F) por medio de la proteína mitocondrial Miro (Kanfer et al., 2015). También se ha descrito que la mitocondria incluye en muchas funciones celulares relacionadas a actina, como la rigidez celular es dependiente de la producción de ATP mitocondrial (Bartolák-Suki et al., 2017).

VI.IV.I.II. Iniciación de la traducción

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de HaCaT: EIF3C, RPS17, RPS15, EIF2S2, RPL5, EIF3I, RPS7.

La expresión del genoma mitocondrial requiere de replicación intraorganelo, transcripción como traducción, los ribosomas asociados a la membrana traducen proteínas codificadas en la mitocondria y facilitan la inserción de co-traduccionales de nuevos polipéptidos sintetizados hacia la membrana interna. La mayoría de proteínas de la mitocondria son producidas en los ribosomas citosólicos, Priesnitz y Becker describen que las rutas asociadas a la síntesis de proteína mitocondrial y el importe de subunidades codificadas en el núcleo ensambladas a los complejos de la cadena respiratoria (Priesnitz y Becker, 2018). Por otro lado, resaltan que la traducción mitocondrial está influenciada por el entorno

celular.

VI.IV.I.III. Mantenimiento de la polaridad celular

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de HaCaT: ACTR2, SPINT2, FAT1, CAP1.

La polarización celular requiere de un incremento de energía otorgada por la mitocondria. Las células usan la fosforilación oxidativa para incrementar los niveles de ATP, ya que esta energía es requerida para la polarización, también se ha descrito un alargamiento y un potencial de membrana incrementado en la mitocondria (Fu et al., 2012).

VI.IV.II. El enriquecimiento de proteínas para CaLo

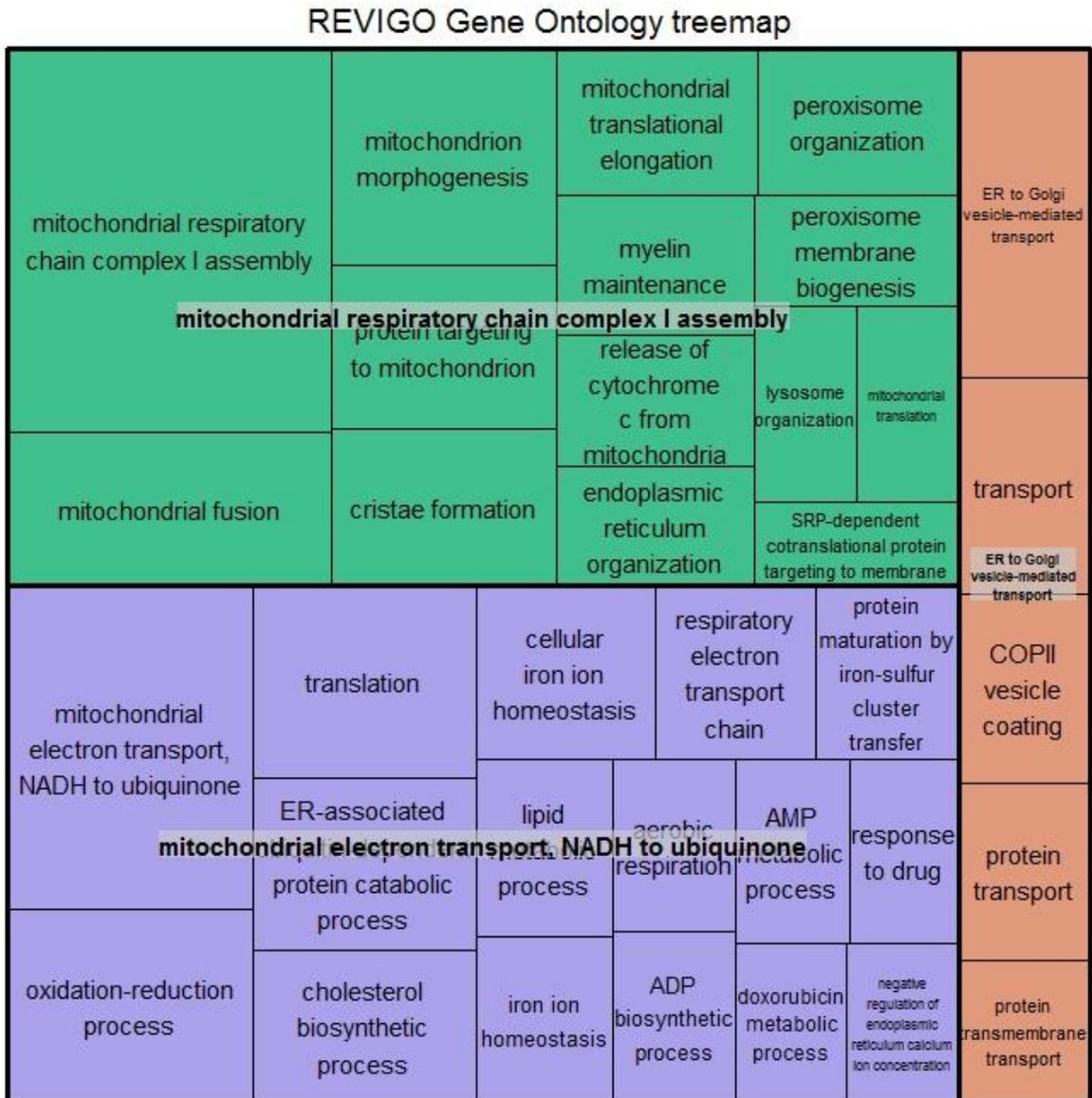


Figura 12: Representación de la expresión de proteínas en la línea celular CaLo mediante un treemap. Cada rectángulo representa un cluster de la integración de un proceso biológico, la sobreexpresión de las proteínas está representada en el tamaño del rectángulo.

VI.IV.II.I. Liberación del citocromo c de la mitocondria

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo: FIS1, MFF, BAK1

El citocromo c en las células sanas se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria donde actúa en la cadena transportadora de electrones para transferir

electrones del complejo III al complejo IV. En el citoplasma de células que experimentan apoptosis citocromo c se une a Apaf-1, el cual une a la caspasa 9, para posteriormente formar el apoptosoma (Zou et al., 1999; Acehan et al., 2002). Cada polipéptido de citocromo c une a un grupo hemo, ya que este es necesario para cargar electrones, y es también requerido para que el citocromo c active Apaf-1. (Yang et al., 1997; Purring-Koch, 2000). Por unión a Apaf-1. Y la formación del apoptosoma, la presencia de citocromo c en el citosol es suficiente para causar muerte celular dependiente de caspasas (Vaux, 2011).

VI.IV.II.II. Ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo: TIMMDC1, NDUFA5, NDUFB4, NDUFB11, NDUFA2, NDUFB9, TAZ, NDUFA7, NDUFC2, ACAD9.

El complejo I mitocondrial es el más grande contiene 45 subunidades codificadas por ADN mitocondria y nuclear. Es el complejo con mayor entrada de electrones hacia la fosforilación oxidativa mediante conversión enzimática de NADH a NAD⁺, CI bombea protones fuera de la matriz mitocondrial, lo cual contribuye a la generación del potencial de membrana mitocondrial, usado por el complejo V para la síntesis de ATP o para la generación de calor. Se han diagnosticado mutaciones en el gen NDUFS4, codificando una subunidad del complejo I codificada en el núcleo, asociada a daños neurodegenerativos (Leong et al., 2012).

VI.IV.II.III. Proceso óxido-reducción

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo: CYB5R1, HTATIP2, VKORC1L1, CBR4, TECR, POR, SDHA, PYCR1, DHRS3, G6PD, MARC2, SDHC, AKR7A2, HSD17B7, SCO2, UQCRB, NSDHL.

El transporte de electrones ineficiente a través de los complejos de la cadena transportadora de electrones dirige a la formación de radicales libres o ROS, los cuales exceden la capacidad de las enzimas antioxidantes, dirigen entonces, al daño de la cadena transportadora de electrones y al estrés respiratorio. La producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) en la mitocondria es mejorada por otras variables tales como; hipoxia, quimioterapia, radiación y otras lesiones patológicas (Choudry et al., 2017). La excesiva producción de ROS está implicada en la iniciación del tumor y progresión del mismo. Activa también HIF1a y HIF2a, los cuales en los melanomas dirigen la expresión del oncogén Src y promueve metástasis (Lim et al., 2010; Choudhury y Singh, 2017).

VI.IV.II.IV. Respiración aeróbica

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo: SDHC, CAT, UQCRB.

Las células cancerosas producen altos niveles de lactato, en el microentorno del cáncer es secretado y promueve la progresión del cáncer. El lactato ha sido identificado como un metabolito que "juega" un papel directo en el crecimiento celular (Pavrides et al., 2009). Así mismo, los niveles de lactato son producto de algunos factores, como la expresión diferencial de las isoformas de lactato deshidrogenasa (LDH), esta última convierte el piruvato en lactato mediante NADH y NAD⁺, LDH se ha descrito involucrada en el metabolismo de glucosa y la carbonación de la glutamina determinando el pH del tumor maligno ya la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Green et al., 2015).

VI.IV.II.V. Fusión mitocondrial

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo: FIS1, MFF, BAK1, CHCHD3.

La mitocondria se haya en una red dentro de las células, las cuales presentan procesos de fusión y fisión. Esto dependerá de la acción de tres grandes GTPasas: mitofusinas (Mfn1, Mfn2) mediando la fusión de la membrana en la membrana externa y Opa1 la cual es esencial para la fusión de las membranas internas del organelo (Debray, Lambert, y Mitchell, 2008).

Las mitofusinas son requeridas en la mitocondria adyacente para efectuar el proceso de fusión. La fosfolipasa D ha sido descrita como proteína implicada en la fusión de la membrana externa mitocondrial, la subregulación de fosfolipasa D mitocondrial por RNAi induce fragmentación de la red mitocondrial. Por otro lado, Opa1 proteína esencial para la fusión mitocondrial de la membrana interna mitocondrial, es codificada por un set de al menos ocho formas de mRNA que son producidas por *splicing* diferencial. La pérdida de la función de Opa1 por RNAi causa fragmentación del retículo tubular mitocondrial como ha sido descritos en experimentos con líneas celulares (Olichon et al., 2003; Griparic, 2004; Landes y Martinou, 2011).

VI.IV.II.VI. Transporte de proteínas

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo: RAB2A, SCAMP3, NACA, RAB29, BET1, SEC22B, RAB6B, LMAN2, SEC61A1, LIN7A.

La mayoría de las proteínas son sintetizadas en los ribosomas citosólicos y son importadas a través de TOM (translocasa de la membrana externa), los precursores de proteínas pueden usar diferentes maquinarias de "clasificación". Las proteínas precursoras destinadas para la matriz son importadas por la presecuencia de translocasa de la membrana interna (TIM23) y la presecuencia motora asociada a translocasa (PAM). La peptidasa procesadora mitocondrial (MPP) remueve las presecuencias. Entonces algunas proteínas son liberadas de TIM 23 a la fase de lípidos de la membrana interna. El espacio de ensamble intermembrana de la mitocondria (MIA) dirige al importe y empaquetamiento de muchas proteínas del espacio intermembrana. Algunas proteínas serán también sintetizadas en la matriz de ribosomas y serán exportadas hacia la membrana interna por la maquinaria de ensamblaje oxidasa (OXA) (Schmidt, Pfanner, y Meisinger, 2010).

VI.IV.II.VII. Traducción

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo: EGFR, NACA, RPL13, SLC25A35, FARSB, SLC25A19, MRPS21, IGF2BP3, MRPS7, RMND1.

La mayoría de los componentes de la traducción (mRNA, tRNA y ribosomas) son diferentes, la mitocondria usa un código distinto al universal (Barrell et al., 1979), la mitocondria humana usa los codones de la arginina AGG y AGA, con UAA y UAG, para la terminación. La mitocondria humana también tiene un mecanismo decodificador con solo 22 tRNAs (Anderson et al., 1981; Ott, Amunts, y Brown, 2016).

VI.IV.III. El enriquecimiento para SiHa

REVIGO Gene Ontology treemap

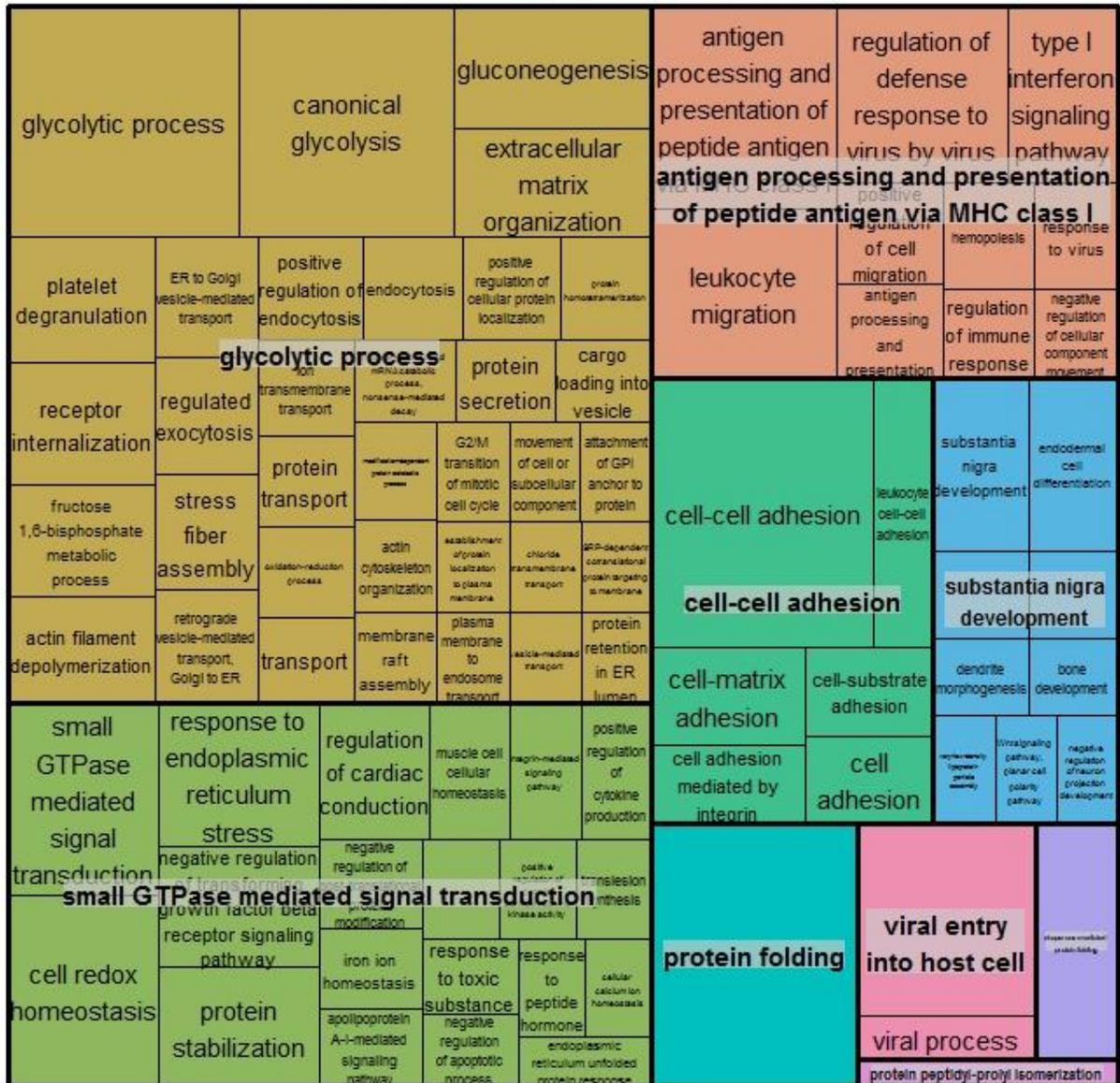


Figura 13: Representación de la expresión de proteínas de la línea celular SiHa utilizando un treemap. Cada rectángulo representa un cluster de la integración de un proceso biológico, la sobreexpresión de las proteínas está representada en el tamaño del rectángulo.

VI.IV.III.I. Proceso glicolítico

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: ALDOA, TP11, PFKL, ADPGK, HKDC1, ALDOC, PGK1, GAPDH, ENO1.

La regulación de la glicólisis está dada por las hexoquinasas, la hexoquinasa 2 (HK2) se considera como el mayor contribuyente a la producción alta de glicólisis y producción de

lactato aun en presencia de oxígeno. Un mecanismo por el cual HK2 se une a la mitocondria es mediante la proteína de la membrana externa (VDAC). Esta interacción facilitará entonces, la inmortalización de las células cancerosas (Green et al., 2015).

VI.IV.III.II. Regulación de la respuesta inmune

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: IFITM1, HLA-A, HLA-C, HLA-B, ITGB1, B2M.

La respuesta inmune innata funciona como la primera línea de defensa ante patógenos o cualquier lesión de tejido, activada por un rango de receptores de reconocimiento de patrones expresados en la superficie o de manera intracelular (PRR), se podrían citar los siguientes; patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o bien, patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). El metabolismo mitocondrial le ha permitido establecer respuestas inmunes tanto adaptativas como innata (Weinberg y Chandel, 2015).

VI.IV.III.III. Homeostasis redox

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: ERP44, P4HB, TXNDC12, TMX1, PDIA3, PRDX4, PDIA6, PDIA4.

Los factores que contribuyen a un entorno mayormente redox en las células cancerosas incluyen metabolismo mitocondrial alterado, señalización oncogénica incrementada. La señalización a través de las rutas mediadas al receptor del factor de crecimiento, dirigen de este modo a la generación de ROS por NADPH oxidasas reduciendo a RAS, la señalización aberrante debido a mutaciones en RAS u otro oncogén puede elevar los niveles de ROS (Briehl et al., 2014).

VI.IV.III.IV. Entrada viral hacia la célula hospedera

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: F11R, CD55, TFRC, ITGA5, ITGAV, ITGB5, HSPA1A, SCARB2, ITGB1.

Para poder establecerse el virus dentro la célula hospedera, este debe introducir el ADN hacia el núcleo de la célula, esto ocurre mediante interacciones complejas de la cápside viral con las proteínas celulares. Los papilomavirus infectan las células basales del epitelio y depende en la diferenciación celular epitelial para la replicación y la producción de viriones (Aksoy, Gottschalk, y Meneses, 2017).

VI.IV.III.V. Gluconeogénesis

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: ALDOA, TPI1, ALDOC, PGK1, GAPDH, ENO1.

La gluconeogénesis es uno de las razones para un metabolismo más rápido de GLN (Glucagón) en pacientes de cáncer, especialmente en estados severos del padecimiento. Es conocido que el cáncer usa la glucosa como la principal fuente de producción de ATP, sin embargo, cuando existe un consumo excesivo de glucosa por el cáncer. La glucosa es restaurada en el hígado por los aminoácidos, y GLN es la principal fuente para este proceso. Así mismo, existe un potencial peligro con la suplementación de GLN en pacientes de cáncer utilizada para apoyar el sistema inmunológico, tracto intestinal, y la síntesis de glutatión e inhibir la caquexia cancerígena (Michalak et al., 2015).

VI.IV.III.VI. Empaquetamiento de proteínas

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: FKBP9, TMX1, PPIAL4A, GANAB, PDIA3, RP2, ERP29, PDIA6, PDIA4, PRKCSH, P3H1, ERP44, CCT4, GNB2, GNB3, FKBP11.

Cuando las proteínas son sintetizadas, la mayoría no se empaquetan espontáneamente hacia la conformación apropiada. Se requiere entonces de chaperonas lo cual es crucial para el mantenimiento de la homeostasis proteica (Morimoto, 2008). La unión de chaperonas a los polipéptidos sintetizados previene el empaquetamiento hacia formas inapropiadas, y facilita el ensamblaje de la estructura correcta. (Buckau et al., 2006), en caso de las proteínas que han sido formadas innecesariamente con agregados tóxicos, algunas chaperonas, como HSP104, son capaces de quitar estos agregados hacia formas intermediarias que pueden ser tomadas en el reempaquetamiento al estado nativo. A altas concentraciones de proteínas "agregadas", HSP104, TRiC entre otras chaperonas pueden activar estas especies toxicas agregadas hacia tipos menos tóxicos (Behrends et al., 2006; Shorter y Lindquist 2004).

VI.IV.III.VII. Regulación negativa del proceso apoptótico

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: CD44, CFL1, HSPA5, FAM129B, EIF2AK2, NQO1, RPS27A, TIMP1, SOD2, PLAUR.

Las condiciones celulares donde existen niveles elevados de HK-I y HK-II permiten a las células tumorales evadir la apoptosis, permitiendo así la proliferación, HK-I y HK-II dirigen hacia la superficie citosólica de la membrana mitocondrial externa a través de la unión de VDAC (canal anión dependiente de voltaje), la unión de hexoquinasa (HK) a la mitocondria permite un flujo de ATP continuo, el cual proveerá energía para la fosforilación de la glucosa, y entonces un incremento del metabolismo glicolítico (Abu-Hamad et al., 2008).

VI.IV.III.VIII. Regulación de la respuesta de defensa a virus

Proteínas encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de SiHa: AP1B1, ARF1, AP2A1, RAC1, HLA-A, B2M.

Las células producen mediadores de la inflamación tales como factor a necrótico tumoral (TNFa), el cual es un importante inhibidor de la proliferación de queratinocitos. Las citosinas inflamatorias pueden activarla ruta apoptótica extrínseca a través receptores de muerte de superficie celular de la familia de receptores TNF, tales receptor TNF 1 (TNFR1), FAS y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL). Las proteínas E6 de alto riesgo bloquean la apoptosis inducida por TNFa por la unión directa a TNFR1 que inhibe la formación del complejo de señalización inductor de muerte celular, y posteriormente una transducción de señales apoptóticas (Moody y Laimins, 2010).

VI.V. Obtención de los genes clave

Las redes de interacción proteína-proteína fueron obtenidas mediante el software *Cytoscape*, utilizado para construir las redes y analizar el número de proteínas adyacentes mediante *genemania*, cada circulo representa una proteína, y las líneas las interacciones entre ellas mismas, se utilizó el *plug in Cytohubba* para calcular el grado de nodo (*node degree*), el cual nos representa los números de interconexiones, se seleccionaron solo 5 principales. Estas proteínas son aquellas que presentan los *core*, las cuales se considera, presentan funciones moleculares importantes en los diferentes estados del cáncer. Las redes PPI son descritas a continuación.

VI.V.I. Los genes clave de la línea celular HaCaT

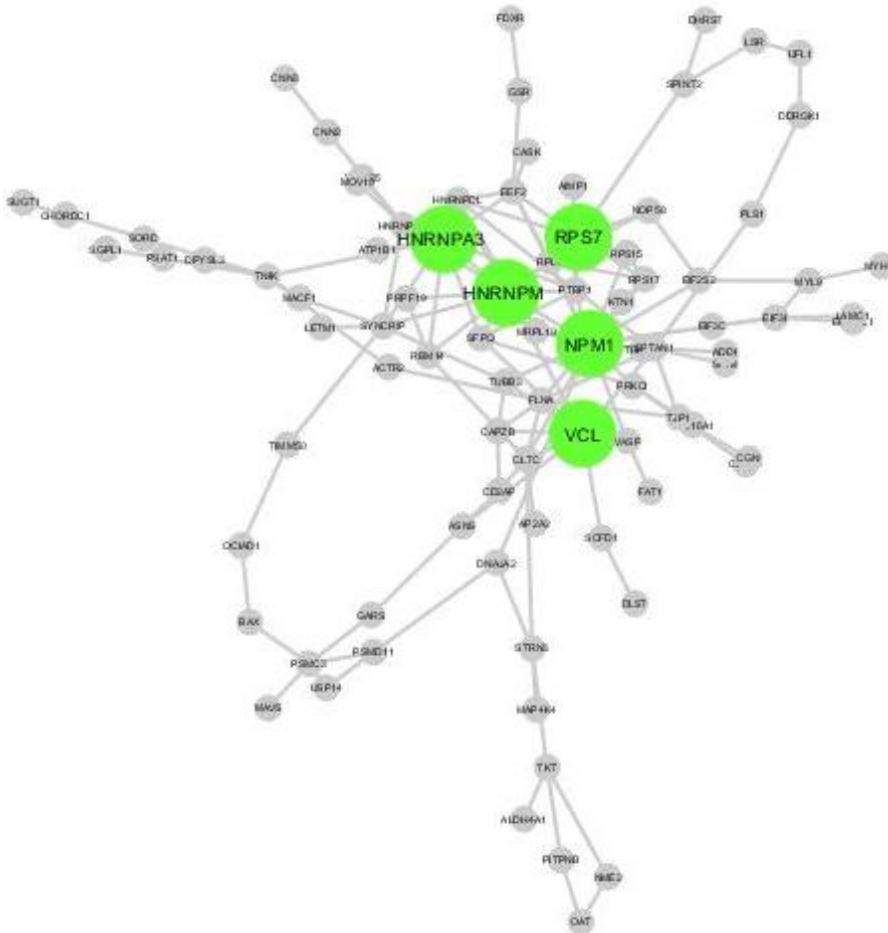


Figura 14: Red de interacción de proteínas expresadas en las mitocondrias de la línea celular HaCaT (control). Donde los nodos verdes presentan mayor número de interacciones ante las demás, llamados así los "hub genes", para la respectiva línea celular. Los nodos representan las proteínas y las líneas las interacciones entre ellas.

HNRNPA3: Se ha descrito esta proteína es un miembro de la familia hnRNP A/B de proteínas de unión a RNA que en común con otras proteínas contienen dos sitios de reconocimiento RNA N-terminal seguidos por una región rica en glicina en C-terminal. Esta familia de proteínas encontradas entre el núcleo y citoplasma, presentan múltiples funciones en términos de splicing pre-mRNA, importe nuclear, estabilidad y traducción de mRNA .

Por otro lado, **HNRNPM** otra proteína de la misma familia se ha reportado que la hipoxia incrementa a unión de esta proteína hacia blancos mRNAs y promueve por lo tanto la iniciación de la traducción. En cáncer de colon y carcinogénesis en ratón se ha demostrado que HNRNPM se haya elevado durante el desarrollo del cáncer colorectal y asociado

también a prognosis (Chen et al., 2019).

La proteína RPS, Subunidad 7 ribosomal, es componente importante estructural del ribosoma involucrado en la síntesis de proteínas, también asociado con enfermedades malignas. Wen y colaboradores adjudican la sobreexpresión de esta proteína al término de terapias para erradicar el cáncer de próstata en pacientes, así, de este modo la inhibición de esta misma podría con siRNA podría atenuar el crecimiento del tumor y la migración (Wen et al., 2018).

La vinculina (VCL), une muchas proteínas incluyendo talina, IpaA, b-catenina, a-catenina y a-actina, la vinculina existe en dos conformaciones en la célula: una forma activa abierta y una cerrada. Las células carentes de vinculina presentan propiedades migratorias alteradas. La migración celular puede ser explicada de la siguiente forma; la adhesión al sustrato, la generación de fuerzas de atracción para impulsar la célula y, posteriormente la lisis de adhesiones viejas en la célula (Bays y DeMali, 2017).

VI.V.II. Los genes clave de la línea celular CaLo

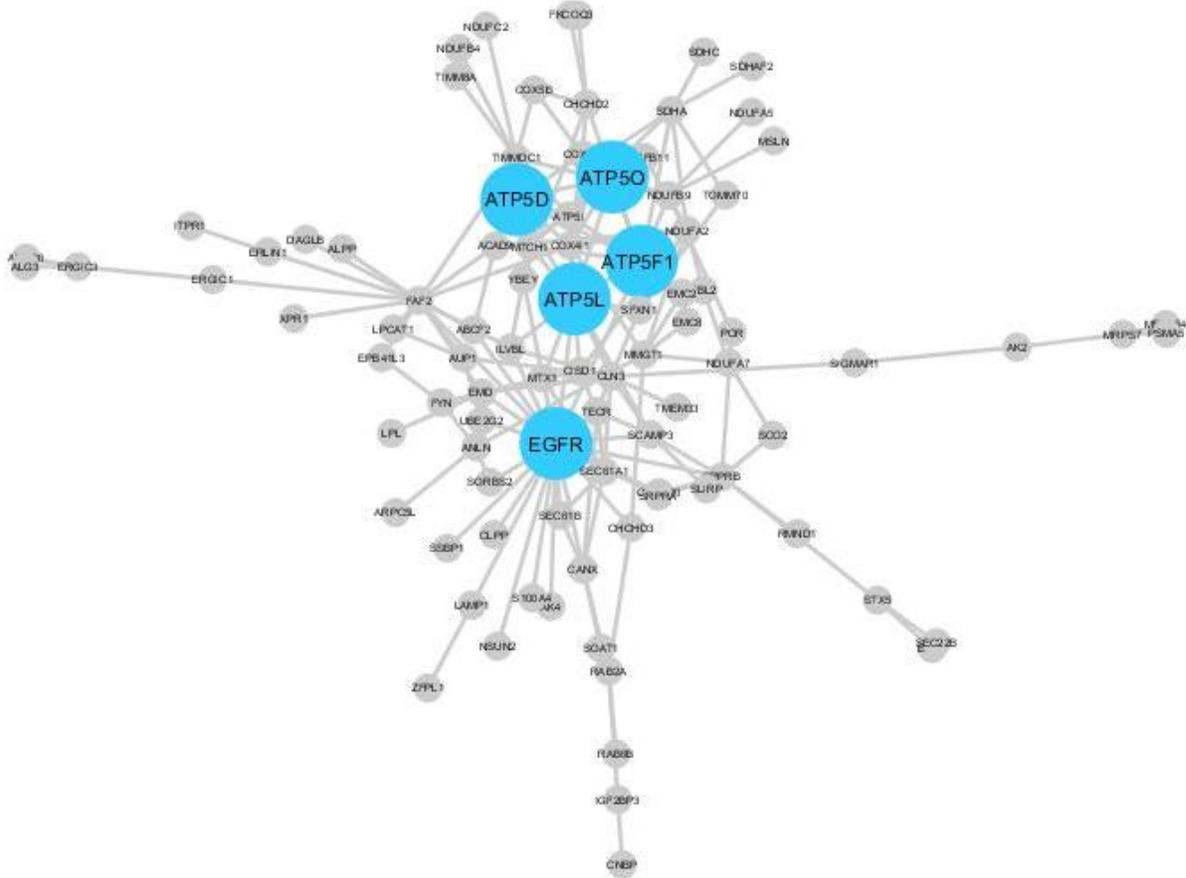


Figura 15: Red de interacción de proteínas expresadas en las mitocondrias para la línea celular CaLo (VPH 18). Donde los nodos azules presentan mayor número de interacciones ante las demás, llamados así los "hub genes" para la respectiva línea celular, los nodos representan las proteínas y las líneas las interacciones entre ellas.

Las subunidades de la ATP sintasa (ATP5D, ATP5L, ATP5O, ATP5F1), la ATP sintasa es la enzima primordial para la reacción de fosforilación oxidativa, la regulación baja de la ATP sintasa mitocondrial es una de las características del cáncer en un descenso de la fosforilación oxidativa y el incremento de la glucólisis. Se ha demostrado que la ATP sintasa y la resistencia a multifarmacos y la prognosis adversa del tumor están estrechamente relacionadas. Dichos mecanismos están relacionados a la regulación postraduccional de la ATP sintasa, la hipermetilación del gen ATP sintasa y el péptido inhibidor de la ATP sintasa llamado factor 1 inhibitorio de ATP sintasa (IF1) (Wang et al., 2014).

El receptor del factor de crecimiento epidermal (**EGFR**) es un receptor cinasa-tirosina, que es expresado en la superficie de la célula para desencadenar la ruta de señalización cinasa

vía fosforilación mediada de unión a ligando, y su autoactivación está relacionada a la progresión del tumor, EGFR también se haya involucrado en la regulación de la dinámica mitocondrial, induce la fisión y correlacionado a la producción de energía y redistribución mitocondrial al área del lamelipodio, altera también la distribución subcelular y la producción de energía produciendo así metástasis (Che at al., 2015).

VI.V.III. Los genes clave de la línea celular SiHa

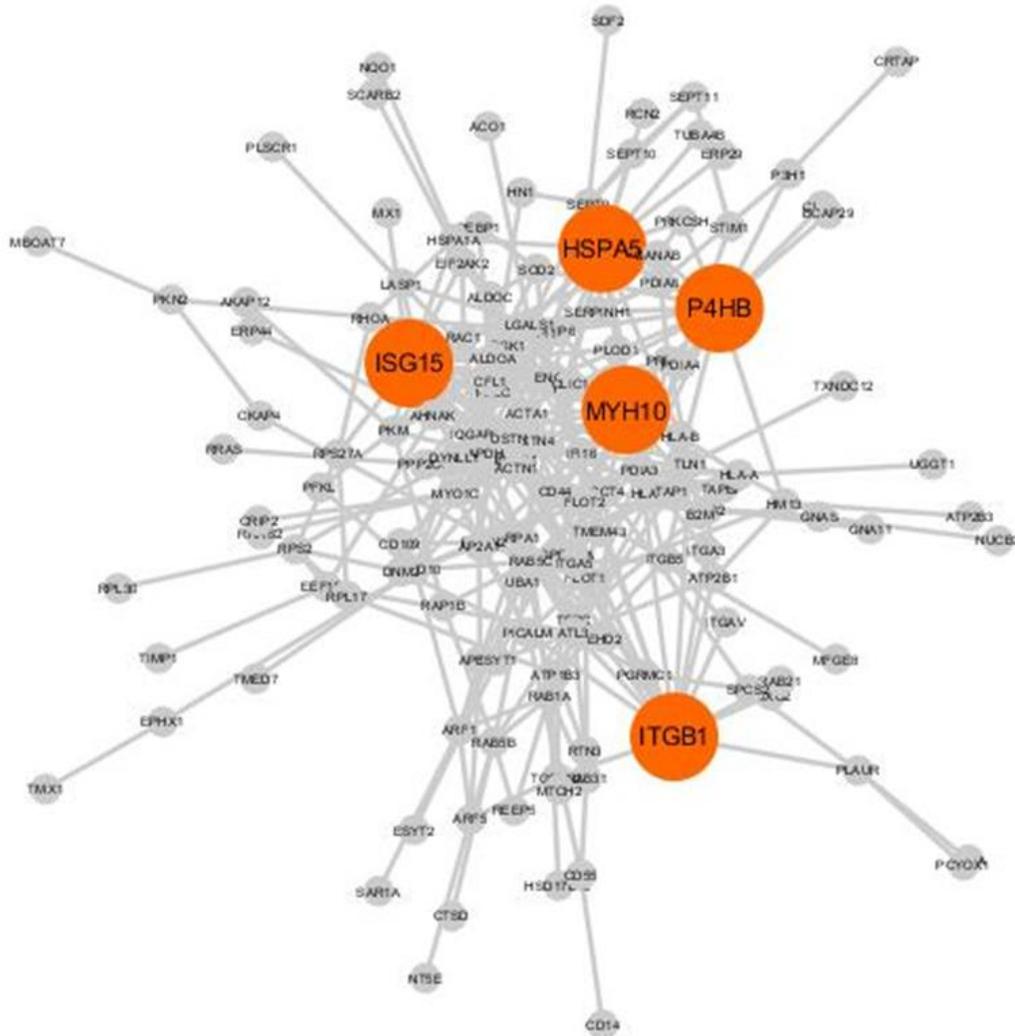


Figura 16: Red de interacción de proteínas expresadas para la línea celular SiHa (VPH 16). Donde los nodos anaranjados presentan mayor número de interacciones ante las demás, llamados así los "hub genes" para la respectiva línea celular, los nodos representan las proteínas y las líneas las interacciones entre ellas.

La Miosina 10 (MYH10), involucrada en la migración de la célula tumoral, la invasión, producción de la matriz extracelular (ECM), y la transición mesenquimal-epitelial. El gen se

encuentra localizado en el cromosoma 17, y dicha proteína esta principalmente localizada en los nervios celulares, megacariocitos y otras células no musculares (Conti et al., 2008; Wang et al., 2003), el gen MYH10 se ha descrito sobre expresado en cáncer de mama y asociado a la vez con la invasión de la célula tumoral en cáncer de mama (Betapudi et al., 2006; Wang et al., 2018).

HSPA5: Proteína chaperona, es un miembro de la familia HSP70, y es una proteína asociada a estrés del retículo endoplásmico, la cual tiene efecto en la protección celular. Cuando la síntesis de proteínas en el RE es alterada bajo condiciones de inanición las proteínas no empaquetadas acumuladas da como resultado estrés en el retículo endoplásmico, que finalmente terminará en la autofagia. (Eizirik, Cardozo, y Cnop, 2008).

P4HB: es la subunidad B de prolil 4 hidroxilasa, que tiene función de chaperona en el retículo endoplásmico para suprimir la agregación de proteínas mal plegadas. Se ha descrito la expresión de P4HB en cáncer de pulmón y la inducción a crecimiento del carcinoma de pulmón (Wang et al., 2015). La subexpresión de esta proteína disminuye la resistencia a temolozomida en glioma mediante rutas de respuestas a estrés del retículo endoplásmico (Sun et al., 2013).

ISG15: la ISG15 monomérica es encontrada ya sea libre o unida covalentemente a proteínas a través de *ISGilación*, un proceso de conjugación que usa activación de la enzima E1, un conjugado de la enzima E2, y uno de las tres ligasas E3. Estas enzimas e ISG15 son fuertemente transcripcionalmente sobrerreguladas por IFN-I. Cuando dichas proteínas son modificadas contribuyen a la respuesta innata a infección e interacciones virus-hospedero (Vuillier et al., 2019).

VII. Discusión

En el presente estudio el enriquecimiento de la fracción mitocondrial se llevó a cabo mediante una centrifugación diferencial, seguida de un gradiente de sacarosa. Cabe señalar que se decidió tomar en cuenta la unión de ambas metodologías para lograr mayor enriquecimiento mitocondrial. Gracias a esta metodología implementada, se obtuvo un porcentaje alto de proteínas mitocondriales, las cuales corresponden a más de la mitad de las proteínas ya reconocidas como mitocondriales, o bien, asociadas en gran parte a la mitocondria, las cuales se hayan descritas en la base de datos *Mitominer*. Hasta ahora, la base de datos para la evidencia y fenotipos de localización mitocondrial en mamíferos *Mitominer*, alberga 1626 proteínas descritas como mitocondriales en Humano de las cuales 849 proteínas fueron detectadas mediante LC MS/MS obtenidas por el enriquecimiento mitocondrial ejecutado en este proyecto.

Por lo tanto, es de suma importancia mencionar que la actividad relevante de la mitocondria y la interacción con otros compartimientos como el núcleo, el retículo endoplásmico y los peroxisomas, hacen casi imposible la obtención de extracciones mitocondriales ampliamente puras (Palmfeldt y Bross, 2017). Además, muchas proteínas presentan una doble localización (se encuentran presentes dentro y fuera de la mitocondria) (Kisslov et al., 2014; Yogev y Pines, 2011). Es por eso, que existen diversas proteínas mitocondriales que están localizadas tanto en mitocondria como en núcleo en condiciones fisiológicas normales (Monaghan y Whitmarsh, 2015), por ejemplo, la piruvato deshidrogenasa que sintetiza acetil-CoA, la cual es utilizada entre otros procesos, para la acetilación de histonas y la regulación genética en el núcleo, y en la mitocondria dando inicio al ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la matriz mitocondrial (Sutendra et al., 2014). No obstante, algunas proteínas solo son expresadas en ciertos tipos de células y/o tejidos, por ejemplo dos isoenzimas mitocondriales P450 y la proteína reguladora esteroidegenica (StAR) (involucrada en la síntesis de esteroides), únicamente son expresadas en la mitocondria de tejidos endocrinos, gonadales y adrenal-esteroidegenicos (Miller, 2011). Por último, la termogenina (UCP1; por sus siglas en inglés, Uncoupling Protein-1), es una proteína específica en la mitocondria del tejido adiposo marrón (Nedergaard y Cannon, 2010). En suma, el perfil proteómico expresado en las líneas celulares de CaCu muestra particularidades respecto a otro tipo de célula, y claramente ante la línea control utilizada.

VII.I. Los procesos biológicos presentados en HaCaT muestran un entorno regular asociados a la mitocondria en comparación con las líneas celulares cancerosas

La mitocondria se encuentra extensamente conectada a otros compartimentos celulares, debido a diversos procesos biológicos, de los cuales se pueden citar los siguientes: el transporte de metabolitos e iones entre el citosol y la mitocondria, el importe de precursores de proteínas desde el citosol, la formación de sitios de contacto con el RE (Retículo endoplásmico), y organelos adyacentes (Höß et al., 2017). De igual forma, como se encuentra expresado en el *tree map* para la línea celular HaCaT (figura 11), en el cual se ocuparon las proteínas específicas como las sobreexpresadas, este funciona como herramienta para demostrar que la mitocondria se encuentra asociada mayormente a procesos comunes en una célula sin daño por cáncer; como la organización del citoesqueleto, la adhesión celular, la iniciación de la traducción, entre otros.

La línea control HaCaT presentó procesos biológicos que se encuentran comúnmente regulados en las células sin daño por cáncer y/o por la presencia de VPH, esto sugiere que en las mitocondrias de células sanas se expresan proteínas principalmente relacionadas en procesos como: la organización del esqueleto, la adhesión célula-célula, la traducción, el importe de proteínas al núcleo, así como proteínas implicadas en mantener la polaridad celular. Así mismo, la línea celular HaCaT nos permite conocer el entorno de una célula sana debido a que no presenta procesos asociados a tumorigénesis, y por lo tanto podemos predecir que los procesos mayormente expresados en las mitocondrias de la línea celular control, son aquellos que tienden a ser desregulados en la célula cancerosa.

VII.II. CaLo delimita un perfil mayormente oxidativo

CaLo es un carcinoma con presencia de VPH tipo 18, el cual presentó un fenotipo mayormente oxidativo de acuerdo al análisis estadístico cuantitativo realizado. Como es representado en la figura 12, la mitocondria en la línea celular CaLo se encuentra asociada a procesos de apoptosis, la homeostasis óxido-reducción, la génesis del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, y el transporte de las proteínas. Cabe destacar que además de los procesos de óxido-reducción también se describen procesos importantes en la inducción y desarrollo del tumor, como el ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria, así como la traducción de proteínas.

VII.II.I. Procesos de óxido-reducción

En el presente estudio se identificaron las siguientes proteínas asociadas a procesos de óxido-reducción: CYB5R1, HTATIP2, VKORC1L1, CBR4, TECR, POR, SDHA, PYCR1, DHRS3, G6PD, MARC2, SDHC, AKR7A2, HSD17B7, SCO2, UQCRB, NSDHL. Las reacciones de óxido-reducción (redox) representan un principio constituyente de toda la vida, y la formación de antioxidantes ha sido descrita para mediar la toxicidad del oxígeno. Sin embargo, las EROs han sido asociadas al estrés oxidativo en algunas enfermedades. Estos agentes de daño pueden comprometer de manera estructural y/o funcionalmente macromoléculas como: ácidos nucleicos, proteínas y lípidos promoviendo la inestabilidad genómica (Cross et al., 1987).

El estrés oxidativo ocurre cuando existe un incremento en EROs, este proceso ha sido ampliamente descrito en el desarrollo del cáncer, así como otras enfermedades. La transcripción de p53 ha sido reportada por presentar el papel de supresor de la acumulación de EROs, y lo logra mediante la expresión de una variedad de genes antioxidantes tales como: SOD2, GPX1 y CAT (Budanov et al., 2004; Kruiswijk et al., 2015), e indirectamente a través de la inducción del gen metabólico TIGAR (Bensaad et al., 2006; Cheung et al., 2012). La expresión de TIGAR reduce los niveles de fructosa 2-6-bisfosfato, redirigiendo los carbonos de glucosa a la ruta de las pentosas fosfato e incrementado la producción de NADPH citosólico para reducir la acumulación de EROs en la célula (Yin et al., 2012).

Chiang y Massague (2008), describen que la pérdida de adhesión célula-célula, la habilidad de migrar y el despegue de las células de la matriz de la membrana basal celular son procesos de suma importancia para dar paso a la tumorigénesis, ya que estos procesos son asociados al desbalance de EROs (Chiang y Massague, 2008). Por otra parte, los niveles elevados de EROs también pueden inducir arresto al ciclo celular, senescencia y muerte de la célula cancerosa por medio de la activación de rutas de señalización de ASK1/JNK y ASK1/p38 en fibroblastos y células cancerosas (Ichijo et al., 1997; Moon et al., 2010) que dirigen a la supresión de factores anti-apoptóticos (Ichijo et al., 1997; Saitoh et al., 1998; Thornton y Rincon, 2009; Tobiume et al., 2001; Wagner y Nebreda, 2009). No obstante, la desregulación de antioxidantes también permiten la inducción de tumorigénesis, NRF2 regula la homeostasis redox (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014), la sobreexpresión de este factor de transcripción ha sido reportado en varios tipos de cáncer (piel, mama, próstata,

pulmón y páncreas) (No et al., 2014). Además de que también ha sido demostrado de manera experimental que NRF2 está asociado a la inducción de la reprogramación metabólica (Mitsuishi et al., 2012), proliferación de la célula cancerosa (DeNicola, 2011; Chio, 2016), la biosíntesis de serina (DeNicola et al., 2015), así como la traducción de mRNA (Chio et al., 2016; Chio y Tuveson, 2017; In et al., 2018)

VII.II.II. Unión del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial

De manera recíproca la inestabilidad genómica producto del exceso de EROs repercute en la actividad y ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria (Chio y Tuveson, 2017; In et al., 2018). En el presente proyecto se identificaron las siguientes proteínas correspondientes al ensamblaje del complejo I: TIMMDC1, NDUFA5, NDUFB4, NDUFB11, NDUFA2, NDUFB9, TAZ, NDUFA7, NDUFC2, ACAD9.

El complejo I es uno de varios sucesos clave que determinan el rango de NAD⁺/NADH celular. No obstante, la inhibición de NADH deshidrogenasa resulta en un descenso en la respiración mitocondrial (Bridges et al., 2014; El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000; Wheaton et al., 2014). Gui y colaboradores, demostraron que la metformina puede perjudicar la respiración por la inhibición del *shuttle* fosfato-glicerol (Madiraju et al., 2014), de la misma manera estudios experimentales han demostrado que la metformina causa un incremento en el consumo de glucosa, producción de lactato, y un descenso en la oxidación de glucosa mitocondrial (Andrzejewski et al., 2014; Fendt et al., 2013).

Así mismo, el complejo I permite la proliferación celular a través de la regeneración de NAD⁺, para mantener el balance celular de NAD⁺/NADH y permitir la síntesis de aspartato. Recíprocamente la dependencia del complejo I es directamente dirigida por la actividad de rutas alternativas para producir y consumir NAD⁺, el cual cambia en base a factores del entorno. Por lo tanto, las rutas alternativas de utilización de NAD⁺ modulan la dependencia del complejo I y la sensibilidad a metformina. Gui y colaboradores demostraron que la perturbación del balance NAD⁺/NADH por la modulación de la actividad del complejo I regula los niveles de aspartato (Gui et al., 2016). Finalmente, la resistencia de metformina por el análogo del complejo I (NDI1) permite insensibilidad celular a metformina y una resistencia a los efectos anti-tumor de la metformina (Birsoy et al., 2014; Wheaton et al., 2014).

VII.II.III. Traducción

Las proteínas asociadas a la traducción encontradas en el presente proyecto, únicamente en CaLo, fueron las siguientes: EGFR, NACA, RPL13, SLC25A35, FARSB, SLC25A19, MRPS21, IGF2BP3, MRPS7, RMND1. La expresión de los genes codificados por el mtDNA, dependen de una maquinaria específica llamados mitoribosomas para la obtención de las 13 proteínas mitocondriales (De Silva et al., 2015). Estudios previos han descubierto funciones regulatorias de apoptosis de diversas proteínas del mitoribosoma, que podrían estar involucradas en la señalización apoptótica (Sharma et al., 2003; Greber y Ban, 2016; Cavdar Koc et al., 2001). Como fue descrito anteriormente existen proteínas que dirigen a apoptosis por la vía intrínseca. Sin embargo, también existen proteínas que son traducidas en el ribosoma mitocondrial (mS29, mL41 y mL65).

En primer lugar, mS29 (proteína 3 asociada a muerte celular, DAP3; por sus siglas en inglés) es una proteína de unión a GTP del mt-SSU (Denslow et al., 1991). En el contexto mitoribosomal los estados de fosforilación de mS29 regulan la asociación de la subunidad mitoribosomal.

Ms29/DAP3 fue descrita como uno de los mayores mediadores de la apoptosis (Kissil et al., 1995). Las mutaciones en un P-loop altamente conservada reduce significativamente la muerte celular por DAP3, pero la sobreexpresión de DAP3 permite la apoptosis (Morgan et al., 2001). Ms29/DAP3 inicia apoptosis por la ruta extrínseca a través de las interacciones con factores apoptóticos como el ligando Fas, TNF- α (Factor alfa de necrosis tumoral), y el interferón gama (IFN γ) (Kissil et al., 1995; Wazir et al., 2015; Kissil, 1999). Adicionalmente, DAP3 interactúa con el factor IPS-1 (estimulador 1 promotor de interferón B) para activar las caspasas 3, 8, y 9, resultando en apoptosis extracelular o conocida también como anoikis (Cohen et al., 1999; Miyazaki et al., 2004). También, se han revelado nuevas funciones de la maquinaria de la traducción mitocondrial, las proteínas mitocondriales respectivamente asociadas a señalización apoptótica y la regulación de la proliferación celular (Cavdar Koc et al., 2001; Sun et al., 1998). En suma, los estudios de expresión genética han descrito alteraciones en los niveles de proteínas mitoribosomales o factores asociados al desarrollo del cáncer (Koc et al., 2015, Loo et al., 2012).

En segundo lugar, mL41 (proteína mitoribosomal asociada a BCL-2, o BMRP; por sus siglas en inglés). Interactúa con la subunidad 16s del rRNA y rodea proteínas mitoribosomales, incluyendo otra proteína pro-apoptótica, mL65 (Greber et al., 2014). De igual importancia,

mL41 ha sido descrita por suprimir el crecimiento de las células cancerosas en ratones, y se cree que es por la inducción de la apoptosis inducida por p53 (Choi et al., 2005). De este modo, cuando p53 transloca a la mitocondria en respuesta a señales de muerte celular, mL41 puede estabilizar a p53, contribuyendo a la apoptosis inducida por p53 en respuesta por la inhibición de la proliferación celular, además la ausencia de p53 permite a mL41 estabilizar p27 y p21, dos proteínas que participan en el arresto al ciclo celular y a la fase G1 (Yoo et al., 2005; Kim, 2005). Sugiriendo así, que mL41 funciona como un regulador negativo del ciclo celular y juega un rol importante en la supresión de tumor junto con p53, p27 y p21 (Yoo et al., 2005). Por otro lado, la sobreexpresión de mL41 en las células induce muerte celular contrarrestada por BCL-2, la apoptosis inducida por mL41 también puede ser suprimida por p35, el cual se encuentra involucrado en la regulación de apoptosis asociado a la familia BCL-2 (Kim et al., 2018).

Por último, mL65 (proteína 9 asociada a muerte celular programada, PDCD9; por sus siglas en ingles), presenta una homología a la proteína pro apoptótica p52 del pollo, se ha descrito en estudios con ratones que en condiciones de sobreexpresión induce apoptosis, sobrerregulación del factor c-Jun y la activación de JNK1, a través de una ruta distinta de la apoptosis extrínseca (Sun et al., 1998). Sin embargo, aún no se conocen las funciones explícitas y concretas de esta proteína.

VII.III. SiHa es una línea celular mayormente glucolítica en comparación con la línea celular CaLo

Los defectos de la fosforilación oxidativa en la mitocondria dirigen a un proceso glucolítico incrementado como la única alternativa para la producción de ATP propuesta por Warburg. Actualmente, se sabe que las células tumorales producen y secretan grandes cantidades de lactato (Frezza y Gottlieb, 2009), derivada en parte de la glucosa como Otto Warburg sugirió, o parcialmente de la glutamina como ha sido sugerido posteriormente (DeBerardinis et al., 2007). De acuerdo al *treemap* de CaLo (figura 12), podemos inferir, y proponer que algunas células cancerosas no presentan daño en los complejos de la fosforilación oxidativa, y que dichos complejos presentan una actividad parcialmente regular a las células sanas. Como es sabido, los tumores crecen rápidamente y tienen un alto consumo de carbono para su anabolismo y respectivo crecimiento. Por lo tanto, la producción alta de lactato puede ser debida a causas bioenergéticas, para esto el piruvato puede ser reducido a lactato y transportado fuera de la célula o bien, a la mitocondria para ser oxidado a CO₂

o a otros precursores (Frezza y Gottlieb, 2009). Por otra parte, en SiHa se observa un metabolismo excesivamente glucolítico referido en la figura 13, como se ha descrito esta podría ser la única alternativa a la fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP. La glicólisis excesiva, entonces es inducida cuando el oxígeno es limitado (condición de hipoxia).

De la misma forma, el descenso de la actividad mitocondrial en las células cancerosas puede tener múltiples razones relacionadas, ya sea por la alteración directa de los complejos de la fosforilación oxidativa, o por la mutación de algunas enzimas, en algunos casos, la depresión de la actividad respiratoria es claramente la consecuencia de mutaciones en el DNA mitocondrial, que dirige como consecuencia a la generación de EROs. Las EROs pueden contribuir directamente a la progresión de cáncer, las condiciones de estrés oxidativo pueden estar dadas por la desestabilización del complejo I para posteriormente generar EROs, dirigiendo a la disfunción mitocondrial. De este modo, el entorno mayormente glucolítico difiere en los tipos de cáncer como ha sido descrito por algunos autores. Sin embargo, en las dos líneas celulares cancerosas analizadas, se presenta un patrón de expresión proteica mitocondrial diferente entre ambas, lo cual nos permite proponer que el tipo de metabolismo ya sea generado por una deficiencia de la fosforilación oxidativa como es propuesta en el efecto Warburg, o por otro lado la producción oxidativa diferirá y posiblemente es determinada por el tipo de virus presentado en cada línea celular cancerosa.

VII.III.I. El proceso glucolítico

La glicólisis aeróbica es un proceso ampliamente desarrollado y descrito en las células cancerosas. La glicólisis aeróbica ocurre por la involucración de hexoquinasa 2 (HK2) en lugar de HK1, y la piruvato cinasa M2 (PKM2) en lugar de PKM1 (Leveillard y Sahel, 2016). Las proteínas asociadas al proceso glucolítico identificadas en el enriquecimiento de mitocondria de SiHa en el presente proyecto fueron las siguientes: **ALDOA, TPI1, PFKL, ADPGK, HKDC1, ALDOC, PGK1, GAPDH, ENO1**. Los transportadores de glucosa (Glut) facilitan la entrada de glucosa hacia el citosol, y su expresión es sobrerregulada por HIF-1 alfa en respuesta al factor de crecimiento (TNF-alfa, EGFR) (Semenza, 2010). Glut-1 es el principal transportador de glucosa (Gospe et al., 2010). Sin embargo, existen proteínas con funciones primordiales durante el proceso glucolítico, las cuales se describen a continuación. HK2 es responsable de convertir glucosa a glucosa 6 fosfato (G6P). El paso final de la glicólisis es la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) y ATP a piruvato, la cual es catalizada

por PK, PK tiene 4 isoformas (PKM1, PKM2, PKL, y PKR), de las cuales, la isoforma PKM2 es acetilada en condiciones altas de glucosa, lo que reduce la actividad de PKM2 por la degradación de lisosomas (Schubert, 2005). Por otra parte, bajo las mismas condiciones PKM2 es translocada al núcleo a través de la acción de la isomerasa peptidil prolil (Pin1) (Harris et al., 2014). Por otra parte, PDK1 fosforila el complejo PDH e inhibe la conversión de piruvato a acetil Coa en la mitocondria (Roche et al., 2001). Por lo que, la activación de PDK proviene del piruvato lejos de la mitocondria y dirige a un metabolismo en el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos, y esto permite la liberación de NADH a la cadena transportadora de electrones (Jha y Suk, 2013). En cambio, HIF-1 alfa bloquea la conversión de piruvato a acetil Coa (Jha y Suk, 2013), esto ocasiona la atenuación de la fosforilación oxidativa y reduce la producción de EROs (Chi et al., 2006).

Así mismo, la activación de LDH-A permite la conversión de piruvato a lactato. LDH es una enzima tetramérica, perteneciente a la familia oxidoreductasa, quienes incrementan el rango de la conversión simultánea de piruvato a lactato y NADH a NAD⁺ (Burgner y Ray, 1984). Existen cuatro genes de LDH de los cuales LDH-A es el isómero que produce l-lactato. HIF-1 alfa y c-Myc son los principales factores de LDH-A (Firth et al., 1995; Semenza et al., 1996; Shim et al., 1997; Lewis et al., 1997), así mismo LDH-A está asociado a la activación de la ruta VEGF (Koukourakis et al., 2003; Giatromanolaki et al., 2006; Kolev et al., 2008; Koukourakis et al., 2011), también las concentraciones altas de LDH-A en el citoplasma se encuentran descritas asociadas a la expresión de VEGF (Koukourakis et al., 2003). Además, el lactato juega un papel importante en la angiogénesis por la estimulación de VEGF (Dhup et al., 2012; Polet y Feron, 2013; San Millan y Brooks 2016; Vallée et al., 2017). De igual forma, es ampliamente conocido que las mutaciones en el ADN mitocondrial pueden afectar las enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa y hasta ahora se han descrito mutaciones en al menos tres enzimas, relacionadas al ciclo TCA como: SDH, FDH e IDH como fue descrito anteriormente.

Sin embargo, la producción excesiva de los procesos glicolíticos tienen el propósito de poder aumentar las concentraciones de ATP en la célula cancerosa para poder subsistir, ya sea desde la síntesis de intermediarios o precursores para la biosíntesis de macromoléculas, aumentar la masa del tumor durante el crecimiento y la proliferación (Deberardinis et al., 2008). De forma similar, la acumulación de intermediarios glicolíticos es conocida por la inducción de la ruta de pentosa fosfato en la generación de NADPH y ribosa 5 fosfato, NADPH y ribosa 5 fosfato son cruciales para para la biosíntesis de lípidos

y ácidos nucleicos. Por último, la producción de NADPH permite a las células cancerosas mantener los niveles adecuados de formas reducidas de glutatión (GSH), un antioxidante no enzimático. GSH juega un papel principal en la protección de las células cancerosas sobre agentes antineoplásicos por la regulación del estado redox contrarrestando algunos de los efectos de los agentes quimioterapéuticos (Backos y Reigan, 2012; Traverso et al., 2013; Ganapathy-kanniappan y Geschwind, 2013).

Sin embargo, las proteínas glicolíticas pueden presentar funciones no glicolíticas que permiten las células cancerosas otras funciones para su existencia. Hexoquinasa II (HKII), deshidrogenasa fosfato 3 gliceraldehido (GAPDH), la isoforma piruvato cinasa (PK)-M2 y la lactato deshidrogenasa (LDH) han sido descritos por actuar como agentes involucrados en diversas funciones subcelulares incluyendo la regulación de la transcripción y la fosforilación de histonas (Kim y Dang, 2005). Por ejemplo, HKII antagoniza la maquinaria apoptótica proveyendo ventaja a las células cancerosas (Pastorino et al., 2002; Majewski et al., 2004), pero también está involucrada en la regulación transcripcional, lo cual es propio de proteínas nucleares (Kim y Dang, 2005). Así mismo, GAPDH mantiene el balance redox produciendo NADH (Seidler, 2013), también se ha descrito el papel de GAPDH de proteger a las células de radicales libres o lesiones por EROs. Sin embargo, también se cree que podría estar involucrada en procesos oncogénicos y proapoptóticos (Seidler, 2013). Estudios han reportado que PK-M2 actúa como una cinasa y fosforila la histona H3 favoreciendo la tumorigénesis (Yang et al., 2012), provocando una transactivación de B catenina (Yang et al., 2011). Por otra parte, también se ha demostrado que LDH coopera con Oct-4, un factor transcripcional durante la tumorigénesis, así el silenciamiento de LDH suspende la tumorigenicidad causada por la subregulación de Oct-4 (Zhan y Yang, 2013; Ganapathy-kanniappan y Geschwind, 2013).

VII.IV. La influencia del VPH en la expresión de proteínas

La integración del genoma viral del VPH a la célula amplifica la existencia de oncogenes y desorganiza los genes supresores de tumor mediante "reajustes" inter e intra cromosomales. Como fue descrito anteriormente, los mecanismos de E6/E7 inducen transformación y degradación de las proteínas derivadas de los genes pRb y p53. Por otra parte, E7 está asociada a otras proteínas involucradas en proliferación incluyendo las desacetilasas de histonas, componentes del complejo de transcripción AP1 y los inhibidores de cinasas dependientes de cilina p21 y p27. Por otro lado, E6 interactúa con p53 para la

degradación vía proteosomal, inhibiendo la apoptosis y la reparación del ADN la cual es un componente principal el ciclo viral. La degradación de p53 es relevante ya que es el factor de transcripción que regula la expresión de genes codificando reguladores del ciclo celular, la maquinaria de reparación del DNA, el metabolismo y la apoptosis, lo que permite la acumulación de mutaciones secundarias. Diversos estudios han demostrado la existencia de una interacción por VPH, que funciona como una red de interacciones intermoleculares de E6 y E7 con las proteínas de la célula huésped. Así mismo, E6 y E7 pueden modular el perfil de expresión génica, el proteoma de la célula hospedera, y las rutas de señalización intracelulares (como MAPK-, Wnt-, Akt-, Notch-, Mtorc-, y las cascadas dependientes de STAT), dirigiendo a la "remodelación de las células epiteliales". No obstante, E6 también degrada a la proteína de dominio de muerte asociada a FAS (FADD), evitando la transmisión de señales apoptóticas mediante la vía Fas. Todas estas alteraciones moleculares facilitan la resistencia a la muerte celular programada, ya que la muerte celular por apoptosis también requiere de la asociación de las caspasas, quienes son primordiales en el proceso.

En contraste con el perfil mayormente glucolítico en SiHa, en comparación con el perfil de CaLo, diversos estudios han demostrado que algunas oncoproteínas de los distintos VPH 16 y 18 pueden presentar una ligera diferencia en el "comportamiento" de dichas oncoproteínas. Shim y colaboradores (2005), demostraron que la oncoproteína E7 del VPH 16, induce la expresión de catalasa y un descenso en los niveles de EROs (Shim, Cho y Lee, 2005). Posteriormente, Cruz-Gregorio y colaboradores (2018), demostraron los efectos de E7 del VPH 16 y 18, demostrando que E7 del VPH 16 reducía los niveles de EROs en un 60% en comparación con la oncoproteína E7 del VPH 18 la cual reducía los niveles de EROs en un 42%, y de manera recíproca, E7-VPH 16 incrementaba los niveles de GSH (Glutación) en un *fold change* de 3, a comparación de E7-VPH 18 que fue un 2.4 en células C33A transfectadas con las oncoproteínas correspondientes (Cruz-Gregorio et al., 2018). Sin embargo, el papel de E7-VPH16 en el desarrollo de CaCu no ha sido ampliamente estudiado en este contexto, y por lo tanto requiere de una investigación más robusta.

VII.V. Los hubs encontrados en la mitocondria de la línea celular CaLo

La elaboración de las redes de interacción enfocados a la búsqueda de *hub genes*, fue de gran ayuda para resaltar que existen genes que se encuentran ampliamente asociados en

la producción de energía, tal es el caso de las subunidades de la ATP sintasa encontradas en el enriquecimiento mitocondrial de CaLo (**ATP5D, ATP5O, ATPL y ATPF1**) (figura 15). La ATP sintasa se halla ampliamente relacionada al cáncer, en estudios con *S. cerevisiae* se ha demostrado que dos mutaciones de la subunidad ATP6, reducen la fosforilación oxidativa en un 50% a temperatura elevada llevado a cabo en dicho experimento, estas dos mutaciones son ATP6-K90E y ATP6-P163S, las cuales corresponden a mutaciones de m.8716^a y m.8932C del ADN mitocondrial humano, descritas en cáncer de tiroides y próstata. Ambas mutaciones afectan la señalización de especies reactivas, la homeostasis de calcio y la inducción del poro de transición por calcio cuando el funcionamiento del complejo porina en la mitocondria es alterado por la unión de GFP con Om45p. Sin embargo, la mutación de OM45-GFP, dirige a la reducción de la respiración y a la síntesis de ATP y un nivel elevado de EROs bajo condiciones de supresión de glucosa o de respiración (Niedzwiecka et al., 2018).

Otro *hub gene* encontrado en el enriquecimiento mitocondrial de la línea celular CaLo, fue EGFR (figura 15). El factor de crecimiento epidermal (EGFR) es un receptor tirosina cinasa, ampliamente relacionado a la progresión del tumor, EGFR fue encontrado como un *hub gene* en la línea celular CaLo. Usualmente, la translocación nuclear de EGFR es desencadenada por estimulación del factor de crecimiento epidermal (EGF), induciendo a EGFR de la membrana plasmática al tráfico nuclear (Bitler et al., 2010; Lo et al., 2006; Du et al., 2014). EGFR y una variación de este gen de origen mitocondrial han sido reportados presentes en la mitocondria de células de glioblastoma (Boerner, 2004). Che y colaboradores (2009), demostraron que EGFR regula la dinámica mitocondrial a través de una proteína mitocondria asociada a la fusión mitocondrial, por medio de endocitosis en la membrana externa mitocondrial, concluyendo que la fisión inducida por EGFR se encuentra relacionada ampliamente a la producción de energía, EGFR interactúa con Mfn1 interfiriendo en su polimerización. Otro punto importante a considerar es la expresión de EGFR citosólico en el nodo linfático, el cual llega a ser mayormente alto, en comparación a la expresión de este en las secciones del tumor primario (Che et al., 2015).

VII.VI. Los hubs encontrados en SiHa

En el enriquecimiento mitocondrial de la línea celular SiHa los *hub genes* encontrados fueron: **ISG15, MYH10, ITGB1, P4HB, HSPA5**, los cuales se encuentran altamente relacionados a la evasión de la apoptosis y la invasión (figura 16). Es de suma importancia

hacer notar que dichos procesos son característicos en cáncer, sin embargo, en este apartado se hace mayor énfasis en estos procesos, ya que fueron los resultados más notables en la búsqueda de los "genes clave" en SiHa, tales proteínas son descritas a continuación. La proteína ISG15 se ha descrito transcripcionalmente por la sobreexpresión de interferones tipo I inducidos por virus (IFN-I), consecuentemente numerosas proteínas celulares y virales pueden ser modificadas por la ruta de la ISGilación y contribuir a interacciones virus-hospedero a la respuesta innata de la infección, si bien, la ISGilación no es requisito para la función de ISG15, ya que se ha encontrado que modifica proteínas tanto celulares como virales de unión covalente. La ISGilación e ISG15 pueden ser inducidas no solo en la infección y las proteínas blanco involucradas en proliferación, remodelación de la cromatina, autofagia, regulación del ciclo celular y la activación de células inmunes innatas. Así mismo, la ISGilación también contribuye o participa en respuestas celulares a estrés genotóxico, ayudando a las células a adaptarse rápidamente a las perturbaciones patológicas (Vuillier et al., 2019).

En estudios previos se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-181b-5p puede inhibir la autofagia y promover apoptosis mediante HSPA5 (Chang et al., 2019), normalmente HSPA5 regula la autofagia y apoptosis en cardiomiocitos, los blancos potenciales de miR-181b-5p fue la región 3'-UTR de la HSPA5. Chang y colaboradores (2018), también describen que HSPA5 inhibe la expresión de Bcl2, dando como resultado el incremento de los niveles de Bax y el anclaje de la caspasa 3 (Chang et al., 2019). Por otro lado, ITGB1 ha sido descrita como activador de varios procesos biológicos como quimiotaxis, proliferación celular y angiogénesis. Además, su asociación a la familia integrina provee una fuerte activación mediante el factor de transcripción NF- κ B, de los mediadores de inflamación como: IL-1, IL8, el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) y genes característicos de la activación monocítica (Terrinoni, Holmgren, Lebens, y Larena, 2019). P4HB se ha encontrado asociado a tumorigénesis en cáncer de colon. Zhou y colaboradores en 2018, investigaron la proliferación y apoptosis mediante *western blot* e inmunohistoquímica obteniendo como resultado que la expresión de P4HB fue sumamente alta en las pruebas de cáncer de colon comparado a tejidos normales adyacentes. Así mismo, P4HB promueve la acumulación de EROs, por lo tanto la inhibición de EROs evita el incremento de la apoptosis celular inducida por el desbalance de P4HB (Zou et al., 2018). Por otro lado, MYH10 ha sido descrita por participar en migración celular, invasión y producción de la matriz extracelular y en la transición mesenquimal epitelial, el gen MYH10

codifica la proteína NMIIB que se encuentra en células nerviosas y otras células no musculares. Adicionalmente, se ha demostrado en estudios previos que MYH10 se encuentra sobre expresada en cáncer de mama y, asociado específicamente a la invasión tumoral en cáncer de mama (Betapudi, 2006). Incluso, se ha demostrado que la mutación de este gen induce migración celular, y se encuentra asociado a metástasis (Ma et al., 2009).

VIII. Conclusiones.

1.- Existe un perfil de expresión proteica particular en las mitocondrias de las distintas líneas celulares de CaCu con diferente tipo de virus CaLo (VPH 18) y SiHa (VPH 16), así como en la línea celular no cancerosa HaCaT. Este patrón de expresión proteico mitocondrial involucra proteínas asociadas al origen, mantenimiento y desarrollo de la célula cancerosa, las cuales están relacionadas a las características facultativas del cáncer.

2.- HaCaT presenta un perfil proteómico sumamente diferente, a las líneas celulares de CaCu. El patrón observado en HaCaT en comparación con el presente en CaLo y SiHa propone una desregulación de ciertos procesos presentes en las células cancerosas, es decir; los procesos mayormente expresados en HaCaT, se hallan disminuidos en las células cancerosas, y viceversa.

3.- El patrón proteico de la línea celular CaLo está ampliamente relacionado a procesos de oxidación-reducción, y obviamente asociados a la participación de la cadena respiratoria mitocondrial.

4.- La línea celular SiHa presenta un perfil proteómico asociado a glicólisis en comparación a la línea celular CaLo.

5.- El virus del papiloma humano presente en ambas líneas celulares de CaCu (CaLo y SiHa), juega un papel importante en la expresión proteica de ambas líneas celulares, y además varía de acuerdo al tipo de virus existente.

6.- 4 "genes clave" presentes en CaLo se encuentran asociados a la cadena respiratoria, destacando un evidente ambiente sumamente oxidativo, aunado a esto, también se observa un "gen clave" asociado a la angiogénesis. Por otra parte, los "genes clave" en SiHa corresponden a diversos procesos como ligados a apoptosis e invasión.

IX. Bibliografía

- Abu-Mahad, S., Zaid, Hilal., Israelson, Adrian., Nahon, E., Shoshan-Barmatz, V. (2008). Hexokinase-I Protein against Apoptotic Cell Death is Mediated via Interaction with the Voltage-dependent Anion Channel-1. *Journal of Biological Chemistry*. 19, 283. 13482-13483.
- Adams, J.M., y Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Aksoy, P., Gottschalk, E. Y., & Meneses, P. I. (2017). HPV entry into cells. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 772, 13–22.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–65
- Andrzejewski, S., Gravel, S.P., Pollak, M., St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & metabolism*. 2:12.
- Antonio, P., Ángel, M., & Moreno, N. (2016). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama, 5(4), 184–191.
- Arnouk, H., Merkley, M. A., Podolsky, R. H., Stöppler, H., Santos, C., Álvarez, M., Mariategui, J., Ferris, D., Lee, J. R., y Dynan, W. S. (2009). Characterization of molecular markers indicative of cervical cancer progression. *Proteomics Clin. Appl*, 3, 516–527.
- Avall-Lundqvist, E.H., Sjøvall, K., Nilsson, B.R., Eneroth, P.H. (1992). Prognostic significance of pretreatment serum levels of squamous cell carcinoma antigen and CA 125 in cervical carcinoma. *Eur J Cancer*. 28A: 1695– 702
- Backos, D.S., Franklin, C.C., Reigan, P. (2012). The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem Pharmacol*, 83(8):1005–1012.
- Bae, S.M., Lee, C.H., Cho, Y.L., Nam, K.H., Kim, Y.W., Kim, CK., et al. (2005). Two dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 99, 26– 35.
- Baeriswyl, V., y Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol*. 19, 329-337.
- Barnes, D.E., y Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet*. 38, 445-476.
- Barrell, B.G., Bankier, A.T., Drouin, J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. *Nature* 282:189–94
- Bartolák-Suki, E., Imsirovic, J., Nishibori, Y., Krishnan, R., & Suki, B. (2017). Regulation of mitochondrial structure and dynamics by the cytoskeleton and mechanical factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 7–11.
- Bays, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2999–3009.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 126:107–120.

- Besson, D., et al., (2011). A Quantitative Proteomic Approach of the Different Stages of Colorectal Cancer Establishes OLFM4 as a New Nonmetastatic Tumor Marker. *Molecular & Cellular Proteomics* 10: 1–14.
- Betapudi, V., Licate, L.S., Egelhoff, T.T. (2006). Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res*, 66(9). 33-4725.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, W. H., Pagès, F., & Galon, J. (2010). Natural immunity to cancer in humans. *Current Opinion in Immunology*, 22(2), 215–222.
- Birsoy, K., Possemato, R., Lorbeer, F.K., Bayraktar, E.C., Thiru, P., Yucel, B., Wang, T., Chen, W.W., Clish, C.B., Sabatini, D.M. (2014). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature*. 508:108–112.
- Bitler, B.G., Goverdhan, A., Schroeder, J.A. (2010). MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *Journal of cell science*. 123:1716–1723.16.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611-622.
- Boerner, J.L., Demory, M.L., Silva, C., Parsons, S.J. (2004). Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Molecular and cellular biology*. 24:7059–7071.
- Bolli, J.A., Doering, D.L., Bosscher, J.R. et al. (1994). Squamous cell carcinoma antigen: clinical utility in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 55-169.
- Brehm, A. et al. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 18, 2449–2458
- Bridges, H.R., Jones, A.J., Pollak, M.N., Hirst, J. (2014). Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *The Biochemical journal*. 462:475–487.
- Briehl, M.M., Tome, M.E., Wilkinson, S.T., Jaramillo, M.C., Lee, K. (2014). Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets. *Biochemical Society Transactions*, 42 (4), 939-944.
- Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M., (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*. 304:596– 600.
- Burgner, J.W., Ray, W.J. (1984). On the origin of the lactate dehydrogenase induced rate effect. *Biochemistry (Mosc)* 23:3636–3648
- Burkhardt, D.L., y Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8, 671-682.
- Calvo S.E., Mootha V.K. (2010). The mitochondrial proteome and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 25-44.
- Cantor J.R., Sabatini D.M., (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *American association for cancer research*, 881-898.

Carmeliet, P., y Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Catherine Sánchez, N. (2015). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562.

Cavdar Koc, E., Ranasinghe, A., Burkhart, W., Blackburn, K., Koc, H., Moseley, A., Spremulli, L.L. (2001). A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Lett.* 492(1–2):166–70.

Centro Internacional de investigaciones sobre el cancer. GLOBOCAN (OMS). 2009. <http://gco.iarc.fr/today/home> (consulta en Mayo de 2019).

Chang, L., Chai, X., Chen, P., Cao, J., Xie, H., & Zhu, J. (2019). MiR-181b-5p suppresses starvation-induced cardiomyocyte autophagy by targeting Hspa5. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(1), 143–154.

Che, T.-F., Lin, C.-W., Wu, Y.-Y., Chen, Y.-J., Han, C.-L., Chang, Y., Yang, P.-C. (2015). Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC. *Oncotarget*, 6(35).

Chen, T. M., Lai, M. C., Li, Y. H., Chan, Y. L., Wu, C. H., Wang, Y. M., Tsai, S. J. (2019). hnRNPM induces translation switch under hypoxia to promote colon cancer development. *EBioMedicine*.

Cheung, E.C., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. (2012). Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:20491– 20496.

Chi, J-T., Wang, Z., Nuyten, D.S.A. et al. (2006). Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med* 3:e47.

Chiang, A.C., Massague, J. (2008). Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 359:2814–2823.

Chio, I.I.C., y Tuveson, D.A. (2018). ROS in cancer: The burning question. *Trends Mol Med*. 23. 3-9.

Choi, Y. P., Kang, S., Hong, S., Xie, X., & Cho, N. H. (2005). Proteomic analysis of progressive factors in uterine cervical cancer. *Proteomics*, 5(6), 1481–1493.

Choudhury, A. R., & Singh, K. K. (2017). Mitochondrial determinants of cancer health disparities. *Seminars in Cancer Biology*, 47(April), 125–146.

Chourasia, A.H., Boland, M.L., y Macleod, K.F. (2015). Mitophagy and cancer. *Cancer Metab.* 3,4.

Ciccia, A., y Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179-204.

Clifford, G.M., Franceschi, S. et al. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis, *British Journal of Cancer*, 88:63-67.

Cohen, O., Inbal, B., Kissil, J.L., Raveh, T., Berissi, H., Spivak-Kroizaman, T., Feinstein, E., Kimchi, A. (1999). DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J Cell Biol.* 146(1):141–8.

- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., y Mantovani, A., (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.
- Conti, M.A., Adelstein, R.S. (2008). Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci*, 121(Pt 1): 11–18.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*. 107:526–545.
- Cruz-Gregorio, A., Martínez-Ramírez, I., Pedraza-Chaverri, J., & Lizano, M. (2019). Reprogramming of Energy Metabolism in Response to Radiotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 11(2), 182.
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T.C., y Farese, R.V., Jr. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*. 18, 153-161.
- D.Y. (2005). Protein and identification of modulators regulated by human papillomavirus 16 E6 oncogene in HaCaT keratinocytes by proteomics. Elsevier, 142-152.
- Daniel C. Liebler, et al., Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. Liebler © Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- Day, P.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T. (2003). Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 307: 1- 1.
- De Silva, D., Tu ,Y.T., Amunts, A., Fontanesi, F., Barrientos, A. (2015). Mitochondrial ribosome assembly in health and disease. *Cell Cycle*. 14(14):2226–50.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., et al. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (49): 19345-50.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassilou, G., y Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 7, 11-20.
- Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., Thompson, C.B. (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev*, 18(1):54–61.
- Debray, F. G., Lambert, M., & Mitchell, G. A. (2008). Disorders of mitochondrial function. *Current Opinion in Pediatrics*, 20(4), 471–482. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328306ebb6>
- DeNardo, D.G., Andreu, P., y Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev*. 29, 309-316.
- DeNicola, G.M., Chen, P.H., Mullarky, E., Sudderth, J.A., Hu, Z., Wu, D., Tang, H., Xie, Y., Asara, J.M., Huffman, K.E., et al. (2015). NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nature genetics*. 47:1475–1481.
- DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., et al. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*. 475:106–109.

- Denslow, N.D., Anders, J.C., O'Brien, T.W. (1991). Bovine mitochondrial ribosomes possess a high affinity binding site for guanine nucleotides. *J Biol Chem.* 266(15):9586–90.
- Deshpande, A., Sicinski, P., y Hinds, P.W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909-2915.
- DG Ward, et al., (2006). Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *British Journal of Cancer* 94, 1898 – 1905.
- Dhup, S., Dadhich, R.K., Porporato, P.E., Sonveaux, P. (2012). Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des* 18:1319–1330.
- Di Saia, P.J., Creasman W.T. (2002). *Clinical Gynecologic Oncology*. 6th ed. St. Louis, MO, USA: Mosby, 53-112.
- Disaia, P., Morrow, C., Haverback, B., Dyce, B. (1977). Carcino-embryonic antigen in cancer of the female reproductive system. *Cancer*, 70. 39-2365.
- Dominy, J.E., Puigserver, P., (2013). Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold spring harb perspect biol* 2013;5:a015008.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J. (1991). Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 352: 824–7
- Du, Y., Shen, J., Hsu, J.L., Han, Z., Hsu, M.C., Yang, C.C., Kuo, H.P., Wang, Y.N., Yamaguchi, H., Miller, S.A., Hung, M.C. (2014). Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking. *Oncogene*. 33:756–770.
- Duk, J.M., Aalders, J.G., Fleuren, G.J., Krans, M., De Bruijn, H.W. (1989). Tumor markers CA 125, squamous cell carcinoma antigen, and carcinoembryonic antigen in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1989; 73: 661– 8
- Eisenberg-Bord, M., Shai, N., Schuldiner, M., and Bohnert, M. (2016). Atether is a tether is a tether: tethering at membrane contact sites. *Dev. Cell* 39, 395–409.
- Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., and Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29: 42-61.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M., Leverve, X. (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry*. 275:223–228
- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., (1997). Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol*, 71, 2449-2456.
- Fendt, SM., Bell, EL., Keibler, M.A., Davidson, S.M., Wirth, G.J., Fiske, B., Mayers, J.R., Schwab, M., Bellinger, G., Csibi, A., et al. (2013). Metformin decreases glucose oxidation and increases the dependency of prostate cancer cells on reductive glutamine metabolism. *Cancer research*. 73:4429–4438.
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 789-791.

- Firth, J.D., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J. (1995). Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 270:21021–21027.
- Fletcher, D.A. y Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 463, 485–492.
- Frattini, M.G., Lim, H.B., Laimins, L.A., (1996). In vitro synthesis of oncogenic HPVs requires episomal genomes for differentiation-dependent late gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 3062–7
- Frezza, C., y Gottlieb, E. (2009). Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biology*, 19(1), 4–11.
- Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., y Wood, R.D. (2006). DNA repair: from molecular mechanism to human disease to human disease. *DNA repair (Amst)* 5, 986-996.
- Friedman, R. J., Nunnari J., (2014). Mitochondrial form and function, 335-343. Garraway L. A. & Lander E. S. (2013). Lessons from cancer genome. *Cell* 153: 17-37.
- Fu, D., Mitra, K., Sengupta, P., Jarnik, M., Lippincott-Schwartz, J., y Arias, I.M. (2012). Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization. *PNAS*, 18, 110. 7288.
- Gaarenstroom, K.N., Kenter, G.G., Bonfrer, J.M.G., et al. (2000). Can initial serum CYFRA 21-1, SCC antigen and TPA levels in squamous cell cervical cancer predict lymph node metastases or prognosis? *Gynecol Oncol*, 70. 77-164.
- Ganapathy-kanniappan, S., & Geschwind, J.-F. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy : *Molecular Cancer*, 12(1), 1–11.
- Garcea R. L., Di Maio D., (2007), *The Papilloma Viruses*, Springer.
- Garraway, L. A. y Lander, E. S. (2013) Lessons from the cancer genome. *Cell* 153: 17-37
- Gasparre, G., Porcelli A.M., Lenaz G., Romeo G. (2013). Relevance of mitochondrial genetics and metabolism in cancer development. *Cold spring harb perspect biol* 2013;5:a011411. 1-18.
- Giampazolias, E., Tait W.G.S., (2015). Mitochondria and the hallmarks of cancer, 1-12.
- Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K.C. et al (2006) Lactatedehydrogenase 5 (LDH-5) expression in endometrial cancer relates to the activated VEGF/VEGFR2(KDR) pathway and prognosis. *Gynecol Oncol* 103:912–918.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E., Sapp, M., (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75, 1565-1570.
- Gopal, Y.N., Rizos, H., Chen, G., Deng, W., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Scolyer, R.A., Pupo, G., Komurov, K., Sehgal, V., et al., (2014). Inhibition of Mtorc1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1a and oxidative phosphorylation in melanoma. *Cancer Res.* 74, 7037-7047.
- Gospe, S.M., Baker, S.A., Arshavsky, V.Y. (2010). Facilitative glucose transporter Glut1 is actively excluded from rodouter segments. *JCellSci* 123:3639–3644.

- Graves, P. R., Haystead Timothy A. J. (2002). *Molecular biologist's guide to proteomics*.
- Gray, M W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends genet.* 5, 294-299.
- Gray, M.W. (2012). Mitochondrial evolution. *Cold spring harb perspect biol*, 2012;4:a011403, 1- 17.
- Greber, B.J., Ban, N. (2016). Structure and function of the mitochondrial ribosome. *Annu Rev Biochem.* 85:103–32.
- Green, M. F., Diehl, A. M. E., Michelotti, G., Poore, B., Raffaghello, L., Mehrmohamadi, M., Locasale, J. W. (2015). Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S129–S150.
- Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J., van der Blik, A.M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria, *J. Biol. Chem.* 279. 18792–18798.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., y Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
- Gui, D.Y., Sullivan, L.B., Luengo, A., Hosios, A.M., Bush, L.N. et al. (2016). Environment dictates dependence on mitochondrial complex I for NAD⁺ and aspartate production and determines cancer cell sensitivity to metformin. *Cell Metab.* 24. 1-8.
- Hanahan, D., y Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hannahan, D., y Weinberg, R. A., (2011), Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646- 674.
- Hans-Ulrich, B. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. of Clinical Virology* 32S. S1-S6
- Hans-Ulrich, B., Villiers E., et al. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments, *Virology*, 401.
- Haq, R., Shoang, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., et al., (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1a and MITF. *Cancer Cell* 23, 302-315.
- Harper, J.W., y Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: Ten years after. *Mol. Cell* 28, 739-745.
- Harris, R.A., Tindale, L., Cumming, R.C. (2014). Age-dependent metabolic dysregulation in cancer and Alzheimer's disease. *Biogerontology* 15:559–577
- Hawley-Nelson, P., Schiller, J. T. et al., (1989). HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*, 8.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1989). HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8, 3905–3910
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences.* 39:199–218.

- Höb, P., Gebert, M., Stiller, S. B., Bohnert, M., Feuerstein, R., Schuldiner, M., ... Pfanner, N. (2017). Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports*, 19(13), 2836–2852.
- Hsu, P.P., y Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703.707.
- Huynen, M.A., Hollander, M., Szklarczyk R. (2009). Mitochondrial proteome evolution and genetic disease. *Elsevier*, 1122-1129.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 275:90–94.
- In, I., Chio, C., Tuveson, D. A., Harbor, C. S., Pancreatic, F., & Harbor, C. S. (2018). *HHS Public Access*, 23(5), 411–429.
- Jackson, S.P., y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.
- Jha, M.K., Suk, K. (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a potential therapeutic target for malignant gliomas. *Brain Tumor Res Treat* 1: 57–63.
- Jinong, li., et al., (2004). Detection of prostate cancer using serum proteomics pattern in a histologically confirmed population. *The journal of urology, the journal of urology*.
- Jones, M. B., Krutzsch, H., Shu, H., Zhao, Y., Liotta, L. A., Kohn, E. C., et al. (2002). Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2: 76-84.
- Jones, R.G., y Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23, 537-548.
- Kadaja, M., Ustav, M., et al., (2009). Mechanism of genomic instability in cells infected with the high- risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog.*, 5.
- Kanfer, G., Courtheoux, T., Peterka, M., Meier, S., Soste, M., Melnik, A., Reis, K., Aspenstrom, P., Peter, M., Picotti, P. et al. (2015). Mitotic redistribution of the mitochondrial network by MiroandCenp-F. *Nat. Commun.* 2015, 6, 8015.
- Karnoub, A.E., y Weinberg, R.A. (2006-2007). Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 26, 75-85.
- Kawahara, A., y Scorrano, L., (2014). Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends cell Biol.* 24, 761-770.
- Kashatus, J.A., Nascimento, A., Myers, L., Sher, A., Byrne, F.L., Hoehn, K.L., Counter, C.M., y Kashatus, D.F. (2015). Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol. Cell* 57, 537-551.
- Kastan, M.B. (2008). DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Mol. Cancer Res.* 6, 517-524.
- Kato, H., Torigoe, T. (1977). Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer*, 40. 1621-8.

- Kaur, P., McDougall, J. K. (1988). Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J. Virol.*, 62, 1917-1924.
- Kazerounian, S., Yee, K.O., y Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 700-712.
- Kim, J.W., Dang, C.V. (2005). Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci.* 30(3):142–150.
- Kim, M.J., Yoo, Y.A., Kim, H.J., Kang, S., Kim, Y.G., Kim, J.S., Yoo, Y.D. (2005). Mitochondrial ribosomal protein L41 mediates serum starvation-induced cell-cycle arrest through an increase of p21(WAF1/ CIP1). *Biochem Biophys Res Commun.* 338(2):1179–84.
- Kim, R., Emi, M., y Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.
- Kissil, J.L., Cohen, O., Raveh, T., Kimchi, A. (1999). Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *EMBO J.* 18(2): 353–62.
- Kissil, J.L., Deiss, L.P., Bayewitch, M., Raveh, T., Khaspekov, G., Kimchi, A. (1995). Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J Biol Chem.* 270(46):27932–6.
- Kisslov, I., Naamati, A., Shakarchy, N., Pines, O. (2014). Dual-targeted proteins tend to be more evolutionarily conserved. *Mol. Biol. Evol.* 31, 2770–2779.
- Kleckler, T., Bo" ckler, S., and Westermann, B. (2014). Making connections: interorganelle contacts orchestrate mitochondrial behavior. *Trends Cell Biol.* 24, 537–545. Kornmann,
- Koc, E.C., Haciosmanoglu, E., Claudio, P.P., Wolf, A., Califano, L., Friscia, M., Cortese, A., Koc, H. (2015). Impaired mitochondrial protein synthesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Mitochondrion*; 24:113–21
- Kolev, Y., Uetake, H., Takagi, Y., Sugihara, K. (2008). Lactate dehydrogenase5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 15:2336–2344.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E. et al. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 89:877–885.
- Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E. et al. (2011). Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17:4892–4900.
- Kroemer, G., y Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* 13, 472-482.
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F., Vousden, K.H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16:393–405.
- Kumar, N. (2016). Cervical cancer, a nightmare for womanhood: review of recent advances.

Labbe´, K., Murley, A., and Nunnari, J. (2014). Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 357–391. Lackner,

Landes, T., & Martinou, J. C. (2011). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The role of mitochondrial fission. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(4), 540–545.

Lee, K.A., Kang, J.W., Shim, J.H., Kho, C.W., Park, S.G., Lee, H.G., Paik, S.G., Lim, J.S., Yoon Li, J. et al., (2004). Detection of prostate cancer using serum proteomics pattern in a histologically confirmed population. *The journal of urology*, the journal of urology.

Leong, D. W., Komen, J. C., Hewitt, C. A., Arnaud, E., McKenzie, M., Phipson, B., ... Scott, H. S. (2012). Proteomic and metabolomic analyses of mitochondrial complex I-deficient mouse model generated by spontaneous B2 short interspersed nuclear element (SINE) insertion into NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4 (Ndufs4) gene. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 20652–20663.

Léveillard, T., Sahel, J-A. (2016) Metabolic and redox signaling in the retina. *Cell Mol Life Sci CMLS*

Lewis, B.C., Shim, H., Li, Q. et al. (1997). Identification of putative c-Mycresponsive genes: characterization of rcl, a novel growth-related gene. *Mol Cell Biol* 17:4967–4978.

Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O’Donell, K.A., Kim, J.W., Yustein, J.T., Lee, L.A., y Dang, C.V. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6225-6234.

Liebler, D. C. et al., (2002). *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology*. Liebler © Humana Press, Inc., Totowa, NJ.

Liu, J.S., Kuo, S.R., Makhov, A.M., (1998). Human Hsp 70 and Hsp 40 proteins facilitate human papillomavirus type 11 E1 protein to binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J. Biol. Chem.* 273, 30704–30712

Lo, H.W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S.C., Hung, M.C. (2006). Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J Cell Biochem.* 98:1570–1583.

Lomnytska, M. I., Becker, S., et al. (2011). Differential expression of ANXA6, HSP27, PRDX2, NCF2, and TPM4 during uterine cervix carcinogenesis: diagnostic and prognostic value. *British Journal of Cancer*, 104, 110 – 119.

Loo, L.W., Cheng, I., Tiirikainen, M., Lum-Jones, A., Seifried, A., Dunklee, L.M., Church, J.M., Gryfe, R., Weisenberger, D.J., Haile, R.W., Gallinger, S., Duggan, D.J., Thibodeau, S.N., Casey, G., Le Marchand, L. (2012). cis-Expression QTL analysis of established colorectal cancer risk variants in colon tumors and adjacent normal tissue. *PLoS One.* 7(2):e30477.

López-Saavedra, A., Lizano-Soberón, M. (2010). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, 1, 1–25.

Lopez, J., y Tait, S.W. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* 112, 957-962.

Lowe, S.W., Cepero, E., y Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.

- Maarten Altelaar, A. F., Munoz, J. y Heck, A. J. R. (2013). Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *NATURE REVIEWS | GENETICS*, 14. doi:10.1038/nrg335.
- Mac Gabhan, F., y Popel, A.S. (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* 15, 715-738.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., et al. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 510:542–546.
- Mah, L.Y., Ryan, K.M. (2012). Autophagy and cancer. *Cold spring harb perspect biol* 2012;4:a008821, 1-14.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P.E., Skeen, J.E., Gottlob, K., Chandel, N.S., Thompson, C.B., Robey, R.B., Hay, N. (2004). Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell*. 16(5):819–830.
- Martin, D.B., y Nelson, P.S. (2001). From genomics to proteomics: Techniques and applications in cancer research. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S60-56. Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003; 422:226-32.
- Martinez-Carpio, P. A. y Navarro-Moreno, M. A. (2003). El cultivo celular en la investigacion basica del cancer de mama. *Rev Oncol*, 5(4), 184-191.
- Martinou, J.C., y Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell*. 21, 92-101.
- McLaughlin-Drubin, M. E. y Munger, K., (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein, *Virology*, 2009, 384, Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A. & Galloway, D. A. Papillomavirus E6 proteins, *Virology*, 384.
- Michalak, K., Machowska-Kedziora, A., y Sobolewski et al., (2015). Key Roles of Glutamine Pathways in Reprogramming the Cancer Metabolism. *Hindawi Publishing Corporation*. 2-4.
- Miller, W.L., (2011). Role of mitochondria in steroidogenesis. *Endocr. Dev.* 20, 1–19.
- Mishra, P., y Chan, D.C., (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* 212, 379-387.
- Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., Motohashi, H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 22:66–79.
- Miyazaki, T., Shen, M., Fujikura, D., Tosa, N., Kim, H.R., Kon, S., Uede, T., Reed, J.C. (2004). Functional role of death-associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem*. 279(43):44667–72
- Molina, R., Filella, X., Auge, J.M. et al. (2005). CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA, *Anticancer Res*. 25. 1765-71.
- Monaghan, R.M., Whitmarsh, A.J., (2015). Mitochondrial proteins moonlighting in the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* 40, 728–735.

- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550–560.
- Moon, D.O., Kim, M.O., Choi, Y.H., Hyun, J.W., Chang, W.Y., Kim, G.Y. (2010). Butein induces G(2)/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. *Cancer letters*. 288:204–213.
- Morgan, C.J., Jacques, C., Savagner, F., Tourmen, Y., Mirebeau, D.P., Malthiery, Y., Reynier, P. (2001). A conserved N-terminal sequence targets human DAP3 to mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 280(1):177–81.
- Morgenstern, M., Stiller, S.B., Lubbert, P., et al. (2017), Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports*. 19. 2836-2840.
- Morita, M., Gravel, S.P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., y Topisirovic, I. (2015). mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14, 473-480.
- Nambaru, L., Rajkumar, T., et al. (2009). Prognostic significance of HPV Physical Status and Integration Sites in Cervical Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 10.
- Nedergaard, J., Cannon, B., (2010). The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab*. 11, 268–272.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., y Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 11, 220-228.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem*. 76, 723–749.
- Neuzil, J., Pervaiz, S., Fulda, S., (2014). Mitochondria: the anti-cancer target for the third millennium. Springer. 183-211.
- Niedzwiecka, K., Tisi, R., Penna, S., Lichočka, M., Plochočka, D., & Kucharczyk, R. (2018). Two mutations in mitochondrial ATP6 gene of ATP synthase, related to human cancer, affect ROS, calcium homeostasis and mitochondrial permeability transition in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(1), 117–131.
- No, J.H., Kim, Y.B., Song, Y.S. (2014). Targeting nrf2 signaling to combat chemoresistance. *Journal of cancer prevention*. 19:111–117.
- Ohara, K., Tanaka, Y., Tsunoda, H., Nishida, M., Sugahara, S., Itai, Y. (2002). Assessment of cervical cancer radioresponse by serum squamous cell carcinoma antigen and magnetic resonance imaging. *Obstet Gynecol*, 100. 781-7.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis, *J. Biol. Chem*. 278, 7743–7746.
- Ono A., Kumai T., Koizumi H., Nishikawa H., Kobayashi S., Tadokoro M. (2009). Overexpression of heat shock protein 27 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a proteomic analysis using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Elsevier*, 42-49.

- Ott, M., Amunts, A., y Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 77–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014334>
- Owen, M.R., Doran, E., Halestrap, A.P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*. (348 Pt 3):607–614.
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., y Fridman, W.H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093-1102.
- Palmfeldt, J., & Bross, P. (2017). Proteomics of human mitochondria. *Mitochondrion*, 33, 2–14.
- Pastorino, J.G., Shulga, N., Hoek, J.B. (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*. 277(9):7610–7618.
- Patenaude, A., Parker, J., y Karsan, A. (2010). Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. *Microvasc. Res*. 79, 217-223
- Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., ... Lisanti, M. P. (2009). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8(23), 3984–4001.
- Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C., y Liotta, L. A. (2002). Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nature reviews | drug discovery* 1. doi:10.1038/nrd891.
- Polet, F., Feron, O. (2013). Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force. *J Intern Med* 273:156–165.
- Prendiville, W., Davies. P. (2004). HPV HANDBOOK 1: Human papilloma virus and cervical cancer. London and New York: Taylor & Francis Group.
- Pyo, Y. et al., (2005). Proteomics analysis of progressive factors in uterine cervical cancer. *Proteomics* 2005, 5, 1481–1493.
- Qian, B.Z., y Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
- Roche, T.E., Baker, J.C., Yan, X. et al. (2001). Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70:33 – 75
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO journal*. 17:2596–2606.
- Salk, J.J., Fox, E.J., y Loeb, L.A. (2010). Mutational heterogeneity in human cancer: origin and consequences. *Ann. Rev. Pathol.* 5, 51-75.
- Sanchez, C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *REV. MED. CLIN*.
- Sancho, P., Barneda, D., & Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British Journal of Cancer*, 114(12), 1305–1312.

Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, t., Jagust, P., Schoenhals, M., Barneda, D., Sellers, K., Campos-Olivas, R., Graña, O., et al., (2015). MYC/PGC-1a Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab.* 22, 590-605.

Sanders, M. E. et al. (2008). Differentiating Proteomic Biomarkers in Breast Cancer by Laser Capture Microdissection and MALDI MS. *Journal of Proteome Research* 2008, 7, 1500–1507.

San-Millán, I., Brooks, G.A. (2016). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*. doi:10.1093/carcin/bgw127

Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., y Letai, A. (2013). BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Mol. Cell.* 51, 751-765.

Schmidt, O., Pfanner, N., Meisinger, C., (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews*, 11, 655-667.

Schubert, D. (2005). Glucose metabolism and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 4:240–257

Schwartz, S.M., McDougall, J.K. et al., (2001). Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. *J Clin Oncol*, 19: 1906–1915.

Seidler, N.W. (2013). GAPDH and intermediary metabolism. *Adv Exp Med Biol* 2013, 985:37–59.

Seidler, N.W. Basic biology of GAPDH. *Adv Exp Med Biol.* 985:1–36.

Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625-634.

Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W. et al. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:32529–32537.

Senft, D., y Ronai, Z.A., (2016). Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 39, 43-52.

Serasinghe, M.N., Wieder, S.Y., Renault, T.T., Elkholi, R., Ascio, J.J., Yao, J.L., Jabado, O., Hoehn, K., Kageyama, Y., Sesaki, H., y Chipuk, J.E. (2015). Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol. Cell* 57, 521-536.

Shanmugasundaram, S.G. y Jean-Francois, G. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy. *Molecular Cancer.* 12. 3-6.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13:2498-04

Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spremulli, L.L., Agrawal, R.K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell.* 115(1):97–108.

- Shay, J.W., y Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72-76.
- Sherman, L., Jackman, A., Itzhaki, H. (1997). Inhibition of serum - and calcium – induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein: role of P53 inactivation. *Virology.* 237: 296–306.
- Sherr, C.J., y McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C. et al. (1997). c-Myc transactivation of LDHA: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6658–6663.
- Shim, J.H., Cho, K.J., Lee, K.A. et al. (2005). E7-expressing HaCaT keratinocyte cells are resistant to oxidative stress-induced cell death via the induction of catalase. *Proteomics*, 5 (8):2112-22.
- Sigal, A., y Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer res.* 60, 6788-6793.
- Stine, Z.E., Walton, Z.E., Altman, B.J., Hsieh, A.L., y Dang, C.V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov.* 5, 1024-1039.
- Strimbu, K., y Tavel, J. A. (2010). Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation. *Environmental Health*, 5(6), 144.
- Strimbu, K., y Travel, J. A. (2010). What are biomarkers?, *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463-466.
- Sugarbaker, P.H. (1985). Role of carcinoembryonic antigen assay in the management of cancer. *Adv Immun Cancer Ther*, 93. 1-167.
- Sun, S., Lee, D., Ho, A. S. W., Pu, J. K. S., Zhang, X. Q., Lee, N. P., Leung, G. K. K. (2013). Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. *Neuro-Oncology*, 15(5), 562–577.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7).
- Sutendra, G., Kinnaird, A., Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T.H., Haromy, A., Hashimoto, K., Zhang, N., Flaim, E., Michelakis, E.D., (2014). A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell* 158, 84–97.
- Suzuki, Y., Nakano, T., Ohno, T., Abe, A., Morita, S., Tsujii, H. (2000). Serum CYFRA 21-1 in cervical cancer patients treated with radiation therapy. *J Cancer Res Clin Oncol*, 6. 126-332.
- Tait ,S.W.G., Green, D.R. (2013). Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013;5:a008706, 1-16.
- Takeda, M., Sakuragi, N., Okamoto, K., et al. (2002). Preoperative serum SCC, CA125 and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 7. 81-451.

- Tan, Z., Luo, X., L. Tang, M., Bode, A.M., Dong, Z., y Cao, Y. (2016). The role of PGC1a in cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* 15, 774-782.
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., y Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* 84, 988-993.
- Terrinoni, M., Holmgren, J., Lebens, M., & Larena, M. (2019). Proteomic analysis of cholera toxin adjuvant-stimulated human monocytes identifies Thrombospondin-1 and Integrin- β 1 as strongly upregulated molecules involved in adjuvant activity. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Thornton, T.M., Rincon, M. (2009). Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *International journal of biological sciences.* 5:44–51.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports.* 2:222–228.
- Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A.L., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., Domenicotti, C. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 2013:972913.
- Vallée, A., Lecarpentier, Y., Guillevin, R., & Vallée, J. N. (2017). Aerobic Glycolysis Hypothesis Through WNT/Beta-Catenin Pathway in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(3–4), 368–379.
- Vaux, D. L. (2011). Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(4), 546–550.
- Villeneuve, N.F., Lau, A., Zhang, D.D. (2010). Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal*, 13. 1699-1712.
- Vouillier, et al. (2018). USP18 and ISG15 coordinately impact on SKP2 and cell cycle progression. *NATURE.* (9). 11 pags.
- Vuillier, F., Li, Z., Commere, P. H., Dynesen, L. T., & Pellegrini, S. (2019). USP18 and ISG15 coordinately impact on SKP2 and cell cycle progression. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
- Vyas, S., Zaganjor, E., Haigis, M.C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3), 555-566.
- Wagner, E.F., Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 9:537–549.
- Wallace, D. C. (2012).  Mitochondrial function and cancer. *Nature Reviews: Cancer*, 1.
- Wang, et al., (2018). Myosin Heavy Chain 10 (MYH10) Gene Silencing Reduces Cell Migration and Invasion in the Glioma Cell Lines U251, T98G, and SHG44 by inhibiting the Wnt/B-catenin Pathway. *Med Sci Monit*, 24. 10.
- Wang, F., Kovacs, M., Hu A et al. (2003). Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: Functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem*, 278(30): 27439–48.
- Wang, J., Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther.* 7:1875–1884.

- Wang, L., Wu, H., Wang, L. et al. (2017). Asporin promotes pancreatic cancer cell invasion and migration by regulating the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) through both autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Lett*, 398: 24–36.
- Wang, S.M., Lin, L.Z., Zhou, D.H., Zhou, J.X., Xiong, S.Q. (2015). Expression of prolyl 4-hydroxylase beta-polypeptide in non-small cell lung cancer treated with Chinese medicines. *Chin J Integr Med* 21: 689-696.
- Wang, X.J., Hayes, J.D., Wolf, C.R. (2006). Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of nrf2 by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 66:10983–10994
- Wang, Y., Yang, Q., Cheng, Y., Gao, M., Kuang, L., & Wang, C. (2018). Myosin Heavy Chain 10 (MYH10) Gene Silencing Reduces Cell Migration and Invasion in the Glioma Cell Lines U251, T98G, and SHG44 by Inhibiting the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Medical Science Monitor*, 24, 9110–9119.
- Ward, D. G. et al., (2006). Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *British Journal of Cancer* 94, 1898 – 1905.
- Wazir, U., Orakzai, M.M., Khanzada, Z.S., Jiang, W.G., Sharma, A.K., Kasem, A., Mokbel, K. (2015). The role of death-associated protein 3 in apoptosis, anoikis and human cancer. *Cancer Cell Int.* 2015; 15:39.
- Weinberg, R. A. (2014). *The biology of cancer*. Garland science, 31-131, 331-511, 641-723.
- Weinberg, S. E., & Chandel, N. S. (2015). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*, 11(1), 9–15.
- Weinberg, S.E., y Chandel, N.S. (2014). Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*, 11, 9-11.
- Wheaton, W.W., Weinberg, S.E., Hamanaka, R.B., Soberanes, S., Sullivan, L.B., Anso, E., Glasauer A, Dufour, E., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., et al. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife*. 3.
- Willis, S.N., y Adams, J.M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 617-625.
- Wilson, V.G., West, M., Woytek, K., (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes.* 24: 275-90.
- Wisnovsky, S., Lei, E.K., Jean, S.R., Kelley, S.O. (2016). Mitochondrial chemical biology: new probes elucidate the secrets of the powerhouse of the cell. *Cell chemical biology*, 23, 917-927.
- Xueqiong, Zhu. et al., (2009). Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 112 248–256.
- Yang, W., Xia, Y., Hawke, D., Li, X., Liang, J., Xing, D., Aldape, K., Hunter, T., Alfred Yung WK, Lu Z. (2012). PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell.* 150(4):685–696.
- Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K., Lu, Z. (2011). Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature.* 480(7375):118–122.

- Yates, L. R. y Campbell, P. J. (2012) Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13: 795-806
- Yin, L., Kosugi, M., Kufe, D. (2012). Inhibition of the MUC1-C oncoprotein induces multiple myeloma cell death by down-regulating TIGAR expression and depleting NADPH. *Blood*. 119:810–816.
- Yogev, O., Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1012–1020.
- Yoo, Y.A., Kim, M.J., Park, J.K., Chung, Y.M., Lee, J.H., Chi, S.G., Kim, J.S., Yoo, Y.D. (2005) Mitochondrial ribosomal protein L41 suppresses cell growth in association with p53 and p27Kip1. *Mol Cell Biol*. 25(15):6603–16
- Zhang, W., Chait, B.T. (2000). Profound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information, *Anal chem* 72,11, 2482-2489.
- Zhang, Y., Yang, J.M. (2013). Altered energy metabolism in cancer: a unique opportunity for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther*. 14(2):81–89.
- Zhao, Q., He, Y., Wang, X.-L., Zhang, Y.-X., Wu, Y. (2015). Differentially expressed proteins among normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *Clin Transl Oncol* 17, 620-631.
- Zheng, Z.M., Baker C.C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front biosci*, 11, 1-25.
- Zhu, X., Lv, J., Yu, L., Zhu, X., Wu, J., Zou, S., Jiang, S. (2008). Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 112, 248- 256.
- Zhu, Xueqiong., et al. (2009). Proteomic identification of differentially-expressed proteins in squamous cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 112, 248–256.
- Zou, H., Wen, C., Peng, Z., Shao, Y. Y., Hu, L., Li, S., Zhou, H. H. (2018). P4HB and PDIA3 are associated with tumor progression and therapeutic outcome of diffuse gliomas. *Oncology Reports*, 39(2), 501–510.



Cuernavaca, Mor., _____

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE,
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **C. ROBERTO JIMÉNEZ ÁNGEL**, con el título del trabajo: **ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA MITOCONDRIA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO.**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

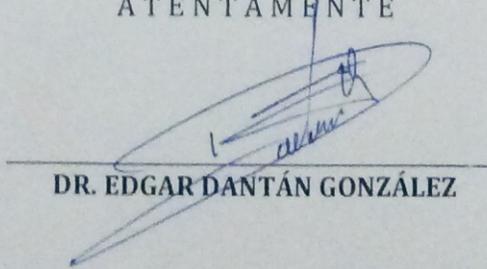
VOTO A FAVOR: _____ ✓

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

ATENTAMENTE


 DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



Cuernavaca, Mor., _____

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE,
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **C. ROBERTO JIMÉNEZ ÁNGEL**, con el título del trabajo: **ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA MITOCONDRIA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO.**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: _____

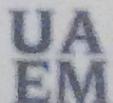
VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ DE JESÚS ARELLANO GARCÍA





Cuernavaca, Mor., _____

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE,
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **C. ROBERTO JIMÉNEZ ÁNGEL**, con el título del trabajo: **ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA MITOCONDRIA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO.**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: _____

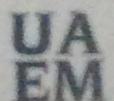
VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

ATENTAMENTE

DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA



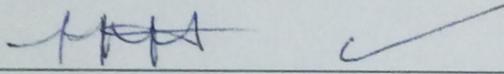


Cuernavaca, Mor., _____

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE,
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **C. ROBERTO JIMÉNEZ ÁNGEL**, con el título del trabajo: **ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA MITOCONDRIA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO.**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: _____ 

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: Necesita mejorar el formato de tesis.

COMENTARIOS: _____

ATENTAMENTE

DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE



Cuernavaca, Mor., _____

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE,
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES, UAEM.
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **C. ROBERTO JIMÉNEZ ÁNGEL**, con el título del trabajo: **ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE LA MITOCONDRIA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO.**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

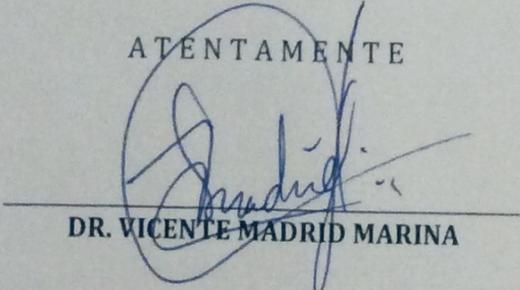
VOTO A FAVOR: _____ ✓

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA AGREGAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

ATENTAMENTE



DR. VICENTE MADRID MARINA