

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia



“Efectos de los factores liberados por células tumorales derivadas de cáncer cervical, sobre la plasticidad de células endoteliales vasculares”

Tesis de grado Lic. en Ciencias Biológicas

Tesista: Luana Micaela Homann

Director: Dra. Natalia Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Química Biológica

INBIOSUR

2022

“Efectos de los factores liberados por células tumorales derivadas de cáncer cervical, sobre la plasticidad de células endoteliales vasculares”

Tesis de grado Lic. en Ciencias Biológicas

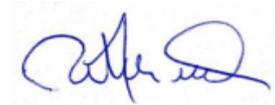
Lugar de trabajo: Laboratorio de Química Biológica

INBIOSUR

2022



Tesista: Luana Micaela Homann



Director: Dra. Natalia Calvo

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi mayor agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Natalia Calvo, por su dedicación, su paciencia, su compromiso y su apoyo en este trayecto tan importante desde el primer día.

A la Universidad Nacional del Sur, al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, al Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR) por la formación y los recursos proporcionados.

A la Dra. Claudia Gentili y el Dr. Pedro Carriere por su buena predisposición desde que comencé a ir al laboratorio.

A mis padres, mi pilar fundamental en la vida, por todo lo que me apoyaron y la confianza que depositaron en mí siempre. No podría haber llegado hasta acá sin ellos y estoy eternamente agradecida.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación académica, en especial a mi profesora consejera, Alicia Carrera.

A mis hijos, Iker y Amelia, que son mi motor todos los días para superarme y ser mejor persona, tanto en lo personal como en lo académico.

A mis compañeros y amigos, por apoyarme en cada paso, por ser tan incondicionales, por escucharme y aconsejarme, por confiar en mí y no permitir que me rinda nunca, por estar siempre.

Eternamente agradecida

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 2 |
| RESUMEN | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1. Cáncer cervical | 6 |
| 2. Células endoteliales tumorales | 7 |
| 3. Transición endotelial a mesenquimal (EndoMT) | 8 |
| 4. Mecanismos moleculares involucrados en la EndoMT | 9 |
| HIPÓTESIS | 11 |
| OBJETIVOS | 12 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 1. Cultivo de células de CC y obtención de medio condicionado tumoral (MCT). | 13 |
| 2. Cultivo de células endoteliales y tratamiento | 13 |
| 3. Tinción de las células endoteliales con el colorante Violeta Cristal y observación comparativa de la morfología celular | 14 |
| 4. Técnica de <i>Western blot</i> | 14 |
| -Obtención de lisado celular | 14 |
| -Cuantificación proteica | 14 |
| -Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) | 15 |
| -Electrotransferencia e <i>Immunoblotting</i> | 15 |
| -Remoción de anticuerpos de las membranas | 16 |
| -Tinción con <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i> | 16 |
| -Análisis estadístico de los resultados obtenidos por la técnica de <i>Western Blot</i> | 16 |
| 5. Preparación de las muestras para espectrometría de masas LFQ (<i>label free quantitation</i> : cuantificación libre de marca) | 16 |
| 6. Tinción <i>Coomassie Blue Coloidal</i> | 16 |
| 7. Espectrometría de masas LFQ | 17 |
| 8. Herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de proteómica | 18 |
| - <i>Perseus</i> | 18 |
| - <i>Enrichr</i> | 20 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 21 |
| 1. Estudio de cambios en la morfología de las células endoteliales debidos a los factores liberados por células tumorales derivadas de CC. | 21 |
| 2. Estudio de cambios en la expresión de marcadores asociados a la EndoMT de las células endoteliales debidos a los factores liberados por células tumorales derivadas de CC. | 23 |
| 3. Análisis de los datos del proteoma: identificación y cuantificación de proteínas. Identificación de proteínas expresadas diferencialmente (PED). | 24 |
| 4. Análisis funcional de las PEDs. | 29 |
| DISCUSIÓN | 32 |
| CONCLUSIÓN | 36 |
| BIBLIOGRAFÍA | 37 |

RESUMEN

El cáncer cervical o de cuello uterino continúa siendo un problema de salud pública en la Argentina. Dentro de los procesos que contribuyen a su progresión y metástasis se encuentra la angiogénesis tumoral que consiste en la formación de vasos anormales a partir de los pre-existentes. El estudio de este proceso se ve afectado por la anormalidad y plasticidad de las células endoteliales que forman estos vasos debida fundamentalmente a los factores liberados por las células tumorales. La amplia plasticidad de estas células endoteliales tumorales les permite adquirir características de células mesenquimales mediante la transición endotelial a mesenquimal (EndoMT), que puede ser parcial o total. El objetivo de esta tesis fue identificar cambios tempranos a nivel morfológico y proteico en las células endoteliales HMEC-1 debidos a los factores liberados en medios condicionados (MCTs) por células tumorales HeLa derivadas de CC con el fin de descubrir potenciales proteínas y vías de señalización relevantes para el proceso de EndoMT parcial. Inicialmente, se observó que el tratamiento con estos MCTs por 3 horas aumentó el número de células endoteliales HMEC-1 con proyecciones citoplasmáticas y forma más elongada. El análisis de las fotomicrografías obtenidas con el programa *Image J* reveló que en estas condiciones experimentales las células endoteliales adquieren una morfología asociada al estado mesenquimal. Además, mediante la técnica de *Western blot* se observó que los cambios en la morfología se acompañan de una disminución en los niveles proteicos del marcador endotelial VE-cadherina y un aumento en los niveles proteicos de la α -actina de músculo liso (α -SMA), un marcador de fibroblastos asociados al cáncer. Estos cambios se asocian al proceso de EndoMT. A continuación, utilizando espectrometría de masas cuantitativa libre de marca LFQ y el programa *Perseus*, se estudiaron los cambios en el proteoma de las células HMEC-1 en estas condiciones experimentales. Se obtuvieron 9 proteínas reguladas negativamente y 24 proteínas reguladas positivamente en las células HMEC-1 tratadas con el MCT por 3 horas. Clusterina fue la proteína que presentó la mayor magnitud de cambio, seguida por el homólogo de peroxidasa (PXDN). Por último, se realizó un análisis de enriquecimiento de las proteínas reguladas positivamente utilizando la plataforma *Enrichr*. Se obtuvo una estadística significativa para la vía de regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa y la señalización mTOR y una tendencia al tipo celular de los fibroblastos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los factores liberados al medio por células tumorales derivadas de CC provocarían, en tiempos cortos, cambios en la morfología y en la expresión de marcadores en las células endoteliales asociados a la EndoMT, siendo clusterina y PXDN dos proteínas potencialmente involucradas en este proceso. Además, se destacó la vía de regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa y la señalización mTOR. Debido a que la EndoMT está involucrada en la génesis y progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a la terapia, este tipo de hallazgos permiten entender mejor el ambiente tumoral para encontrar posibles blancos terapéuticos y disminuir la tasa de mortalidad, no solo en el CC sino también en otros tipos de cáncer.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer cervical

El cáncer cervical o de cuello uterino (CC) es la cuarta patología maligna más frecuente y que más muertes causa en mujeres a nivel mundial (Sung et al., 2021). Según los datos estimados por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) para Argentina en 2020, el CC ocupó el tercer lugar de los cánceres con mayor incidencia en las mujeres. Se registraron 4.583 casos anuales, lo que representó el 6,7% de todos los tumores malignos en este grupo, con una tasa ajustada por edad de 16,7 casos por cada 100.000 mujeres (<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>). Además, según la información elaborada por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica y reporte del Cáncer (SIVER-Ca) en base a los datos de mortalidad de la Dirección de Estadísticas e Información de la Salud (DEIS), en el 2019 se registraron en nuestro país 7,87 muertes debidas a CC por cada 100.000 mujeres, ocupando el cuarto lugar en las causas de muerte por cáncer en mujeres (<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>). También, si bien hasta el 2012 la tasa de mortalidad en la Argentina disminuyó, luego del 2019 se evidenció un ascenso estadísticamente significativo (<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad-ccu>). Estas estadísticas reflejan que, a pesar de las mejoras en la prevención y detección de este tipo de cáncer, logradas por el Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cervicouterino (PNPCC), el CC continúa siendo uno de los principales problemas de salud pública en nuestro país (<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/institucional/pnpcc>).

Con respecto a las características de este tipo de cáncer, el CC se desarrolla en las células que recubren el cuello uterino, la parte inferior del útero que se conecta a la vagina. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérvix y está cubierta por células glandulares, mientras que la parte al lado de la vagina es el exocérvix (o ectocérvix) y está cubierta por células escamosas. La zona comprendida entre ambos tipos de células se denomina zona de transición. La mayoría de los CC son carcinomas de células escamosas que suelen comenzar en la zona de transición o adenocarcinomas que se desarrollan a partir de las células glandulares (Gupta y Gupta, 2017; Kurnia et al., 2022). La principal causa del CC es la infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH) (**Figura 1**), siendo los VPH16 y VPH18 los tipos de alto riesgo más comunes (Yang et al., 2017; Bhattacharjee et al., 2022). Las microabrasiones en la superficie del epitelio del cuello uterino, permiten la entrada del VPH y la consiguiente infección del epitelio de la membrana basal. La mayoría de las infecciones por VPH se autolimitan espontáneamente y solamente una pequeña proporción de las infecciones son persistentes. El VPH involucra la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 que interactúan con diversas proteínas encargadas de regular la expresión genética. Por lo tanto, estas oncoproteínas pueden inhibir proteínas celulares y afectar procesos biológicos importantes tales como el ciclo celular, la proliferación celular y la apoptosis (Vallejo-Ruiz et al., 2015). La sobreexpresión

inicial de dichas oncoproteínas en las capas superiores del epitelio conduce a la producción de partículas virales y al establecimiento de una infección productiva, asociada con la formación de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado. La posterior integración del virus en las células huésped da como resultado la progresión a lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado produciendo una gran acumulación de alteraciones del ADN en dichas células, lo que eventualmente conduce al CC (Pappa et al., 2017). El tiempo estimado, desde que se produce una lesión hasta que se desarrolla el CC, es entre 10 y 20 años. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos biológicos que subyacen a la patogénesis del CC es de gran importancia para mejorar las estrategias de detección temprana.

De acuerdo con la etapa de la enfermedad en el momento del diagnóstico, las estrategias de tratamiento del CC comprenden en particular cirugía, quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia y terapia dirigida localmente (Sai et al., 2021). Sin embargo, las opciones de tratamiento son limitadas y el pronóstico pobre en el caso de enfermedad recurrente o metastásica. Además, en nuestro país, las fallas en la terapia y la falta de acceso a los servicios que permiten una detección temprana en mujeres de bajos recursos socioeconómicos lleva al desarrollo de CC avanzado, metastásico o recurrente (Chaparro et al., 2020). Por esta razón, las investigaciones sobre la invasión, metástasis y resistencia a la terapia del CC es un tema relevante en los últimos años.

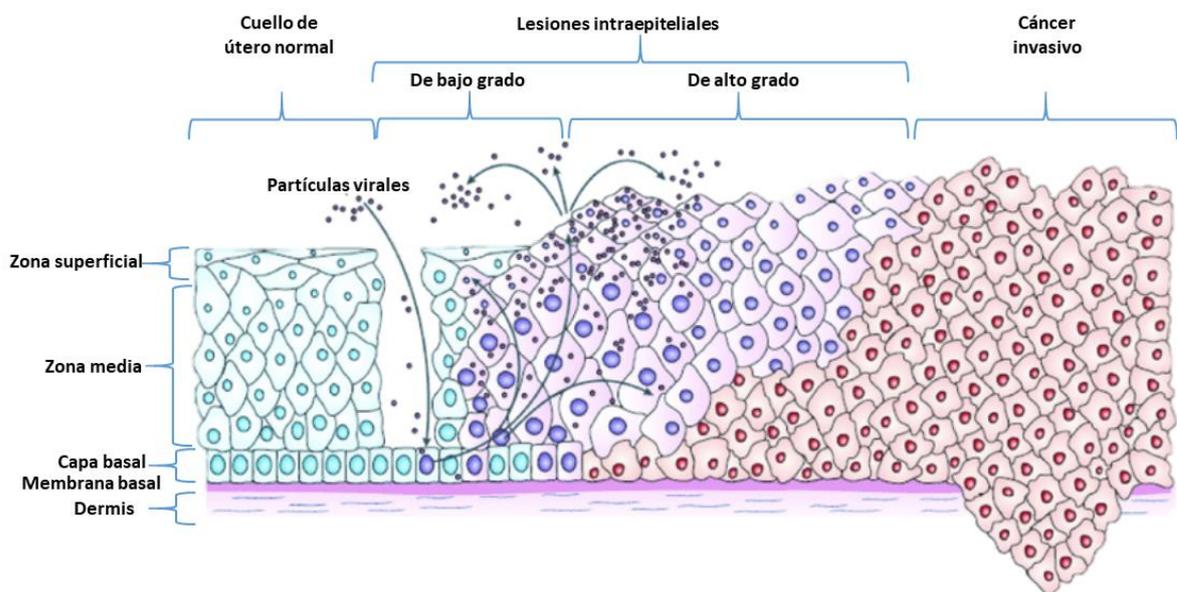


Figura 1. Modelo de progresión del CC (adaptado de Woodman CB, et al. 2007).

2. Células endoteliales tumorales

Es importante destacar que, en el CC, al igual que en otros tipos de cánceres, el microambiente en el cual se desarrollan las células tumorales es muy complejo y contribuye a la invasión, metástasis y resistencia a la terapia (Li y Hua, 2022). Este microambiente está compuesto por varios tipos de células, entre las cuales se encuentran las células endoteliales que recubren los vasos tumorales (CETs), y

componentes químicos (quimiocinas y citocinas) y físicos (matriz extracelular) (Pfaffenzeller et al., 2020). La comunicación intercelular en este microambiente es fundamental y contribuye a la progresión del cáncer (You et al., 2021).

El rol funcional de las CETs es multifacético, ya que son relevantes para promover la angiogénesis tumoral, que es la formación anormal de vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, y también son componentes claves en la génesis, progresión y metástasis del tumor (Nagl et al., 2020; Platel et al., 2019). Estas CETs presentan diferencias moleculares con respecto a las células endoteliales normales, debidas fundamentalmente a la comunicación con las células tumorales mediada por contacto célula-célula y la liberación de factores solubles y vesículas extracelulares (Hida et al., 2018). De esta manera las CETs adquieren capacidades para migrar, invadir y proliferar llevando a la formación tortuosa y anormal de vasos sanguíneos. Además, las CETs demuestran tener una amplia plasticidad y tienen potencial para diferenciarse en células mesenquimales mediante la transición endotelial a mesenquimal (EndoMT) (Platel et al., 2019).

Por lo tanto, la comprensión de las características del microambiente tumoral, como las CETs, puede proporcionar información relevante en los distintos tipos de cánceres como el CC y potenciar el desarrollo de nuevos tratamientos.

3. Transición endotelial a mesenquimal (EndoMT)

La EndoMT es un proceso mediante el cual las células endoteliales pierden sus características y adquieren un fenotipo mesenquimal. Principalmente, este cambio fenotípico se puede evidenciar claramente mediante cambios en la morfología. Este proceso se asocia a la disminución de marcadores endoteliales como CD31, Tie-2, VE-cadherina (cadherina endotelial vascular) y la ganancia de marcadores mesenquimales como α -actina de músculo liso o α -SMA (del inglés, *α -smooth muscle actin*), vimentina y de propiedades invasivas y migratorias (**Figura 2**) (Platel et al., 2019).

EndoMT es un ejemplo de plasticidad celular observada en la formación embrionaria del corazón (Armstrong et al., 2004) pero también se asocia a patologías como el cáncer (Platel et al., 2019). EndoMT puede ser la fuente del 30-40% de los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) (Zeisberg et al., 2007). Por otro lado, desempeña un papel importante en la angiogénesis tumoral permitiendo que las CETs migren e invadan el tejido adyacente (Potenta et al., 2008; Welch-Reardon et al., 2015); mediante una EndoMT parcial (Welch-Reardon et al., 2015; Wang et al., 2017; Fang et al., 2021). Además, las CETs pueden adquirir un fenotipo mesenquimatoso parcial y desprenderse de la capa de revestimiento endotelial de la vasculatura neoplásica hacia la sangre periférica y convertirse en CETs circulantes (Lin, 2020). En particular, se descubrió que la EndoMT promueve significativamente la extravasación transendotelial de células neoplásicas durante la metástasis (Gasparics et al., 2016). Además, varios trabajos relacionan este proceso con la respuesta a los métodos terapéuticos empleados en el cáncer (Platel et al., 2019). Por lo tanto, la EndoMT está involucrada en la génesis y progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a la terapia (Platel et al., 2019; Lin 2020).

Por consiguiente, los estudios que contribuyen a la caracterización y comprensión de plasticidad de las CETs (elucidar la variedad de fenotipos CETs e identificar sus características moleculares), contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la iniciación, la progresión tumoral y la metástasis, así como al desarrollo de biomarcadores y de nuevos enfoques terapéuticos (Man et al., 2019).

4. Mecanismos moleculares involucrados en la EndoMT

La EndoMT a menudo se clasifica como una forma especializada de transición epitelio-mesénquima (TEM), por lo que varios de los reguladores de la TEM también están involucrados en este proceso (Welch-Reardon et al., 2015). Sin embargo, el mecanismo biológico molecular específico de la EndoMT y la relación entre las vías involucradas no se han dilucidado por completo. Además, se piensa que un punto de control regulatorio clave determina si las células endoteliales experimentan una EndoMT total o parcial; pero se sabe muy poco sobre cómo se controla este interruptor.

Con respecto a los mecanismos involucrados en este proceso, se destacan el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Piera-Velazquez y Jimenez, 2012), las vías Wnt/ β -catenina (Zhong et al., 2018) y Notch (Liu et al., 2014), la hipoxia (Zhang et al., 2018) y el estrés oxidativo (Guo et al., 2015) (**Figura 2**).

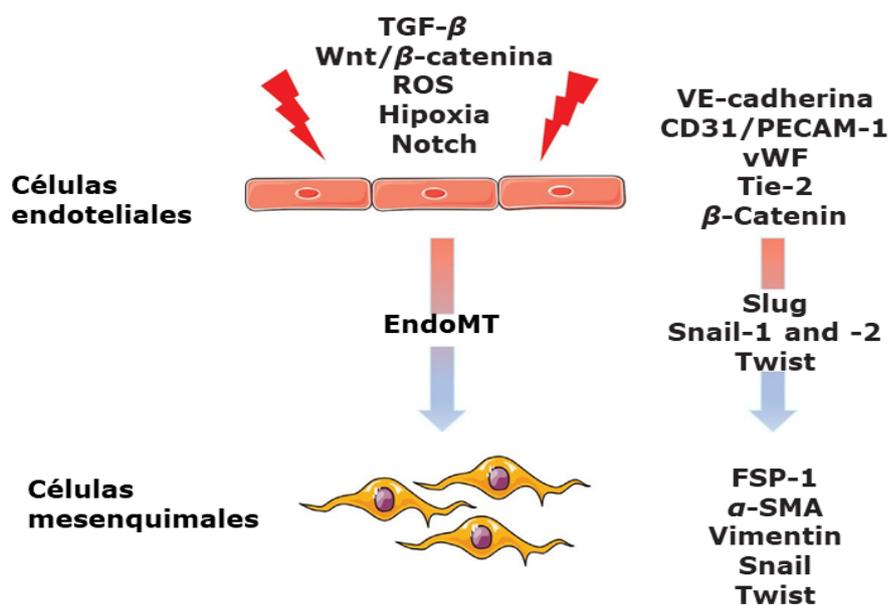


Figura 2. Modificaciones fenotípicas durante EndoMT. TGF- β (factor de crecimiento transformante- β); ROS (especies reactivas de oxígeno); VE-cadherina (cadherina endotelial vascular); vWF (factor de *von Willebrand*); FSP-1 (proteína 1 específica de fibroblastos); α -SMA (α -actina del músculo liso).

Adaptada de Platel et al., 2019.

En el cáncer, se sabe que las características morfológicas, funcionales, epigenéticas y moleculares de las CETs son debidas fundamentalmente a su comunicación con las células tumorales mediada por la liberación de factores (Hida et al., 2018; Ciesielski et al., 2020). En consecuencia, la EndoMT es inducida principalmente por factores secretados por el propio tumor o por su microambiente, como TGF- β (Platel et al., 2019).

Los integrantes del grupo en el cual se llevó a cabo esta tesis de grado llevaron a cabo previamente experimentos para profundizar el estudio del efecto de los factores liberados por células de CC sobre las células endoteliales. Demostraron que el tratamiento con medios condicionados de células HeLa de CC (MCTs) incrementa el número y la formación de estructuras similares a tubos de las células HMEC-1, una línea celular inmortalizada de células endoteliales microvasculares humanas. Además, encontraron a las 24 horas de exposición con estos MCTs cambios en el proteoma de las células HMEC-1. Se observó incremento de una proteína relacionada a la biogénesis de los ribosomas y de la endoglina, que se sobreexpresa en las CETs (Sakamoto et al., 2020). Además, se encontró un potencial rol de las vías de las proteínas morfogenéticas óseas. Por lo tanto, los factores liberados por células tumorales derivadas de CC modificarían el perfil proteico de las células endoteliales favoreciendo la angiogénesis. Estos resultados fueron presentados en la Reunión Anual SAB 2020 (Valero V, Homann L, Carriere P, Novoa MB, Gentili C, Calvo N.) *Identification of potential proteins involved in angiogenesis associated with cervical cancer using proteomics and bioinformatics approaches*. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. 9/9 al 15/9/2020. Modalidad virtual. Publicado en Biocell, Vol. 45 (Suppl. 3):17 (2021)) y permitieron generar el trabajo de Tesis de Grado: “Identificación de potenciales proteínas involucradas en la angiogénesis asociada al cáncer cervical utilizando enfoques de bioinformática y proteómica. Importancia de la comunicación celular.” Dirección: Dra. Calvo (defendida en 2021 y disponible en la Biblioteca de la UNS). También resultados preliminares mostraron cambios morfológicos en las células endoteliales a tiempos cortos de tratamiento con el MCT, que no se observaron a las 24 horas y podrían asociarse a una EndoMT parcial. Pero se requieren de más estudios para su comprobación y para identificar las proteínas involucradas que podrían indicar cambios iniciales en las células endoteliales.

HIPÓTESIS

Se espera que los factores liberados por las células tumorales derivadas de CC provoquen, en una respuesta temprana, cambios en la morfología y el perfil proteico de las células endoteliales relacionados a un proceso de EndoMT parcial.

OBJETIVOS

Identificar cambios tempranos a nivel morfológico y proteico en las células endoteliales debidos a los factores liberados por células tumorales derivadas de CC con el fin de descubrir proteínas relevantes para el proceso de EndoMT parcial.

Específicamente, se propone:

- Evaluar si el tratamiento a tiempos cortos con medios condicionados de células tumorales HeLa derivadas de CC (MCTs), provoca cambios en la morfología de las células endoteliales HMEC-1 relacionados al proceso de EndoMT.
- Investigar si el tratamiento a tiempos cortos con MCTs de células HeLa, provoca cambios en la expresión de marcadores de las células endoteliales HMEC-1 relacionados al proceso de EndoMT.
- En caso de observar cambios relacionados al proceso de EndoMT en las células endoteliales HMEC-1 luego del tratamiento a tiempos cortos con MCTs de células HeLa:
 - . Se estudiará el perfil proteico mediante espectrometría de masas de las células endoteliales.
 - . Se identificarán proteínas reguladas o expresadas diferencialmente (PEDs) en las células endoteliales luego de su exposición o no a los MCTs de células HeLa.
 - . Se analizará la relación de las PEDs con el proceso de EndoMT y vías de transducción de señales utilizando enfoques de bioinformática.

1. Cultivo de células de CC y obtención de medio condicionado tumoral (MCT).

Como modelo experimental para el estudio del CC se utilizó la línea celular HeLa, que corresponde a células epiteliales humanas de adenocarcinoma cervical transformadas por el virus del papiloma humano 18 (VPH18+). Estas células crecen en cultivo *in vitro* de manera muy rápida, agresiva y en monocapa. Presentan una morfología poligonal característica, son de gran tamaño y adherentes. Puede considerarse como la primera línea de células humanas inmortales y ha servido por varios años como fuente de investigación en varios campos de la medicina (Carrera Páez, 2015).

Las células HeLa se cultivaron en medio de cultivo *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM), conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, bajo atmósfera de 5,5% de CO₂ en aire y a 37°C. Una vez alcanzado el nivel de confluencia apropiado (80%), las células fueron lavadas con una solución salina amortiguada por fosfatos (buffer PBS) estéril (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 2 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; pH: 7,2-7,4) y deprivadas de SFB por dos horas. Luego fueron incubadas en DMEM sin SFB, utilizando una baja cantidad de medio de cultivo y siguiendo siempre la misma relación células/volumen, durante 24 horas. A continuación, se recolectó el medio de cultivo para obtener los medios condicionados tumorales (MCTs), los cuales fueron filtrados y centrifugados durante 10 minutos a 10000 rpm para eliminar restos celulares. Se utilizaron inmediatamente o fueron almacenados en freezer a -80°C. Para normalizar los resultados, se midió el contenido proteico de las células HeLa por el método colorimétrico de *Bradford* (Bradford, 1976) como se describe posteriormente.

2. Cultivo de células endoteliales y tratamiento

Como modelo experimental de células endoteliales se emplearon las células HMEC-1. Esta línea celular inmortalizada conserva la morfología, el fenotipo y la función de las células endoteliales microvasculares humanas normales, como la expresión de marcadores característicos (CD31 y CD36), y la formación de estructuras capilares (Ades et al., 1992).

Las células HMEC-1 se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de SFB inactivado por calor en una atmósfera húmeda de 5,5% de CO₂ en aire y a 37 °C. Una vez alcanzado el nivel de confluencia apropiado (80%), las células endoteliales fueron lavadas con buffer PBS estéril, deprivadas de SFB por dos horas y tratadas con los MCTs durante 3, 6 y 24 horas según el experimento. Como controles se utilizaron células HMEC-1 incubadas con medio de cultivo sin SFB por 3, 6 y 24 horas. Cabe destacar que este medio de cultivo fue expuesto a las mismas condiciones que el utilizado para obtener los MCTs pero sin las células tumorales.

3. Tinción de las células endoteliales con el colorante Violeta Cristal y observación comparativa de la morfología celular

Luego del tratamiento correspondiente, el medio de incubación fue removido, se realizaron lavados con PBS y las células endoteliales fueron fijadas con metanol durante 10 minutos a -20°C . Después de varios lavados con PBS, las células se tiñeron con el colorante Violeta Cristal 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se observaron y fotografiaron con un microscopio de luz invertida (NIKON Eclipse Ti-S). El Violeta Cristal es un colorante básico que se une a componentes celulares de carga negativa. Tiñe el núcleo de las células de azul-violeta oscuro y el citoplasma de azul-violeta claro, ya que se une a las proteínas y al ADN. Se utilizó el programa *Image J*-NIH para analizar los cambios morfológicos. Los parámetros morfológicos cuantificados fueron forma redonda (redondez), eje mayor, eje menor y relación de aspecto (AR por sus siglas en inglés) que representa la relación entre el eje mayor y el eje menor que denota el grado de elongación celular de acuerdo a estudios previos (Goto et al., 2017; Zhou et al., 2020). La significancia estadística de los datos obtenidos se evaluó mediante un análisis estadístico del tipo “t de *student*”, considerándose significativos valores de $p < 0,05$ de tres experimentos independientes.

4. Técnica de Western blot

-Obtención de lisado celular

Luego del tratamiento correspondiente de las células HMEC-1, las cajas de cultivo se colocaron en hielo y se lavaron con PBS frío conteniendo inhibidores de fosfatasas (NaF 25 mM y Na_3VO_4 1 mM). A continuación, las células fueron lisadas en un buffer compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH: 7,4), NaCl 150 mM, KCl 3 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 1%, Nonidet P-40 1%, aprotinina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, NaF 25 mM y Na_3VO_4 1 mM. Los lisados fueron colectados en tubos *Eppendorfs*, mantenidos en hielo por 10 minutos, agitados por 45 segundos y colocados nuevamente en hielo por 10 minutos. Seguidamente, los lisados fueron centrifugados a $14.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C para descartar restos celulares. Se colectaron los sobrenadantes (lisados proteicos) y se tomaron alícuotas para cuantificar las proteínas por el método colorimétrico de *Bradford*, que se detalla a continuación (Bradford, 1976).

También se obtuvo el lisado proteico de las células HeLa para normalizar los MCTs.

-Cuantificación proteica

Las proteínas de los lisados celulares fueron cuantificadas por el método de *Bradford* (Bradford, 1976). Para ello, se tomaron alícuotas de las muestras por duplicado; se agregó 2,5 ml de reactivo de *Bradford* (*Coomassie Brilliant Blue G-250* 100 mg/L; etanol 4,75% y ácido fosfórico 8,5%),

se incubó durante 5 minutos y las absorbancias se midieron a 595 nm empleando un espectrofotómetro *Beckman DU530*. Como estándar de concentración conocida se empleó 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA).

La cuantificación de proteínas de las células endoteliales permitió utilizar la misma cantidad de proteínas de cada una de las muestras y la de las células HeLa para la normalización de los MCTs obtenidos.

-Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (*SDS-PAGE*)

Se tomó la misma cantidad de proteína de cada condición experimental de los lisados de las células endoteliales. Seguidamente, las proteínas se desnaturalizaron utilizando buffer muestra de electroforesis 5X (Tris 0,4 M pH: 6,8; dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%; glicerol 50%; dithiothreitol (DTT) 7,7% y azul de bromofenol como indicador del frente de corrida) y realizando un baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras fueron sembradas (30 µg de proteína/calle de cada una de las muestras de cada condición) en un gel de poliacrilamida-SDS (*SDS-PAGE*) discontinuo (gel de "*stacking*": 4% acrilamida, gel de separación: 10% acrilamida). La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 voltios) utilizando como buffer de corrida Tris 25 mM pH: 8,8; glicina 195 mM; SDS 0,1%.

-Electrotransferencia e *Immunoblotting*

A continuación, las proteínas separadas por *SDS-PAGE* según su peso molecular fueron electrotransferidas a membranas de polivinilideno bifluoruro (PVDF) (*immobilon-P*; 0,45 µm). Las membranas se hidrataron en metanol puro durante 50 segundos y se equilibraron en buffer de transferencia *Towbin* (Tris 0,25 M pH: 8,3; glicina 0,192 M; 20% metanol) durante 5 minutos al igual que los geles. La transferencia se realizó en una cámara semi seca aplicando 125 mA por gel durante 1 ó 2 horas y embebiendo la membrana y el gel en buffer de transferencia (*Towbin et al., 1979*). Posteriormente los geles se tiñeron con el colorante *Coomassie Brilliant Blue R-250* para constatar la eficiencia de la transferencia, según se detalla más adelante. Los sitios de ligado inespecíficos de las membranas fueron bloqueados usando el buffer TBS-T 0,1% (Tris 50 mM pH: 7,4; NaCl 200 mM; Tween-20 0,1%) conteniendo 5% de leche descremada y deshidratada durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, las membranas se incubaron con la dilución apropiada de anticuerpo primario (específico para la detección de la proteína de interés y preparado en TBS-T 0,1% conteniendo 1-5% de leche o BSA) durante toda la noche a 4°C. Luego las membranas fueron lavadas con TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo primario y fueron incubadas con la dilución apropiada de anticuerpo secundario (anti globulina de la especie animal correspondiente al anticuerpo primario usado) conjugado a peroxidasa (preparado en TBS-T 0,1% conteniendo 1-5% de leche descremada) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas con TBS-T 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y finalmente fueron incubadas con un kit comercial de

electroquimioluminiscencia (ECL) y expuestas a placas radiográficas *GE Healthcare Amersham Hyperfilm* para visualizar las proteínas de interés. Las bandas obtenidas fueron escaneadas y se cuantificaron usando el programa *Image J*. Los datos fueron volcados a planillas de Excel para la construcción de los gráficos correspondientes.

-Remoción de anticuerpos de las membranas

Para remover el anticuerpo primario y secundario de las membranas y poder exponerlas a anticuerpos diferentes (“*stripping*”), las membranas se sumergieron en buffer *stripping* (Tris-HCl 62,5 mM pH: 6,8; SDS 2% y β -mercaptoetanol 50 mM) a 55°C durante 30 minutos con agitación y luego se lavaron con TBS-T 1% por 10 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo continuando con el protocolo explicado anteriormente.

-Tinción con *Coomassie Brilliant Blue R-250*

Para poner en evidencia las bandas proteicas resueltas en los geles de poliacrilamida-SDS, los geles se tiñeron (2-5 minutos) con una solución de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,125%, metanol 50% y ácido acético 10% y luego el exceso de colorante se eliminó por lavados sucesivos en solución de desteñido I (metanol 50%, ácido acético 10%), desteñido II (metanol 5%, ácido acético 7%) y PBS.

-Análisis estadístico de los resultados obtenidos por la técnica de *Western Blot*

La significancia estadística de los datos obtenidos se evaluó mediante un análisis estadístico del tipo “t de *student*”, considerándose significativos valores de $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como promedio \pm desvío estándar (\pm DS) de tres experimentos independientes.

5. Preparación de las muestras para espectrometría de masas LFQ (label free quantitation: cuantificación libre de marca)

Inicialmente se procedió de la misma manera que para la técnica de *Western blot*. Se obtuvieron los lisados celulares, las proteínas se cuantificaron por el método de *Bradford* (Bradford, 1976) y se sembraron en un gel de poliacrilamida con SDS al 10%, pero las mismas se dejaron correr sólo 1 cm dentro del gel de separación. El pasaje de los lisados proteicos por el gel permite limpiar las muestras de posibles contaminantes (ADN, lípidos, sales). Luego, los geles se tiñeron utilizando la técnica *Coomassie Blue* coloidal, como se detalla a continuación. Cada condición experimental (tratada y control) se realizó por triplicado para una mayor fiabilidad estadística.

6. Tinción *Coomassie Blue* Coloidal

Inicialmente, las proteínas fueron fijadas colocando el gel en una solución fijadora (30% (v/v) etanol, 2% (v/v) ácido fosfórico) por 3 horas. Luego de 3 lavados con H₂O destilada durante 30 minutos,

se agregó la solución de tinción (18% (v/v) metanol, 17% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2% (v/v) ácido fosfórico) en agitación durante una hora y se añadió 0,5 g/L de *Coomassie Blue* G-250 en polvo. A continuación, el gel se agitó suavemente por un día en un recipiente tapado para evitar evaporación y contaminación. Luego, se lavó con H_2O destilada. Las bandas de las proteínas teñidas se cortaron y se colocaron en tubos *Eppendorfs* separados para su envío y análisis en el Servicio de Proteómica mediante la técnica analítica de espectrometría de masas.

7. Espectrometría de masas LFO (label free quantitation: cuantificación libre de marca)

Se utilizó un enfoque proteómico de espectrometría de masas sin marcaje y un flujo de trabajo denominado proteómica “*bottom-up*” o proteómica ascendente. La digestión de proteínas y el análisis de espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de las proteínas se realizó en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, en la Universidad de Buenos Aires / CONICET según protocolo descrito por Alejandro La Greca y colaboradores (La Greca et al., 2018).

Luego de extraer las proteínas de la muestra, se utilizó una enzima, la tripsina, que digiere las proteínas para obtener una mezcla de péptidos. Los péptidos de la mezcla se separaron en una cromatografía líquida de fase inversa acoplada a la ionización por *electrospray*. A medida que los péptidos eluyeron de la columna, se fueron ionizando y pasando al espectrómetro de masas con tecnología *Orbitrap*. Allí, los iones de los péptidos se fueron separando y detectando en función de su relación masa-carga (m/z). Los péptidos más abundantes se aislaron del resto, y se fragmentaron, dando lugar a espectros de fragmentación. Los resultados generados se registraron en forma de espectro de masas. Los datos obtenidos de estos espectros mediante herramientas informáticas específicas permiten identificar y cuantificar los péptidos.

El servicio de Proteómica CEQUIBIEM realizó la identificación y cuantificación de las proteínas utilizando el programa *Proteome Discoverer* (Marca: *Thermo Scientific*. Versión: 2.2) y la base de datos *UniProt* (Homo sapiens UP00000564; 11/01/2021)-que es un repositorio central de datos gratuito sobre proteínas.

La identificación de proteínas se realizó utilizando la estrategia del mapeo de masas peptídicas mediante espectrometría de masas y el empleo de bases de datos de secuencias de proteínas. Es decir, se compararon los espectros experimentales con los espectros virtuales teóricos obtenidos al realizar la digestión *in silico* de las proteínas de la base de datos correspondiente. Se obtienen una serie de péptidos con una puntuación a partir de los cuales se pueden inferir las proteínas. El programa *Proteome Discoverer* asigna un nivel de confianza a los péptidos que se utilizaron para la identificación de proteínas (“*High/Medium/Low*”) y en este estudio se utilizaron solo los péptidos de nivel “*High*”, y una cantidad mínima de dos péptidos únicos identificados por proteína.

La cuantificación se realizó con el cálculo de áreas para cada proteína según los algoritmos usados por el programa *Proteome Discoverer*.

De esta manera, es posible saber qué proteínas hay en las muestras analizadas y en qué cantidad, permitiendo llevar a cabo un estudio a gran escala de las proteínas.

8. Herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de proteómica

-Perseus

El Servicio de Proteómica CEQUIBIEM envía los datos de las proteínas identificadas y su intensidad normalizada de cada condición experimental. Esta información en formato Excel es transformada a formato .txt para que pueda ser ingresada al programa *Perseus*. *Perseus* permite la anotación y el análisis estadístico de datos proteómicos obtenidos mediante espectrometría de masas. Para determinar las variaciones entre el proteoma de dos o más condiciones, es necesario no solo identificar las proteínas presentes en una muestra, sino también realizar pruebas estadísticas para determinar si los cambios observados experimentalmente en los valores de expresión de las proteínas son estadísticamente significativos (Tyanova y Cox, 2018). Luego, de cargar los datos en *Perseus*, se seleccionó la información que se quiere colocar en los campos correspondientes. En este caso se seleccionaron las áreas (intensidad normalizada de las proteínas identificadas) y se agregaron en el campo “*Main*”. En este campo se colocan los datos que serán analizados. La información correspondiente a “*Accession*” (número de identificación en la base de datos *UniProt*) y “*Description*” (nombre de las proteínas) se agregó en el campo “*Text*”. De esta manera se generó una matriz con los datos seleccionados (matriz 1). Es una matriz formada por filas con las distintas proteínas y por columnas con las réplicas de las distintas condiciones de estudio, la “*Accession*” y la descripción. Cabe destacar, que no fue necesario realizar filtros de los datos ya que el servicio envía los datos filtrados.

Seguidamente, los datos se transformaron a escala logarítmica en base 2 (\log_2), para que se ajusten a una distribución normal y se pueda realizar un análisis estadístico del tipo “t de *student*”. Para esto, se calculó el \log_2 de las intensidades normalizadas de las proteínas identificadas seleccionando la opción “*Basic*” y “*Transform*”, generándose una nueva matriz (matriz 2). Se realizaron los histogramas correspondientes para comprobar que los datos de la nueva matriz tengan una distribución normal.

A continuación, se editaron los nombres de cada triplicado para agruparlos en Control o Tratado según corresponda, seleccionando “*Annotation rows*” y “*Categorical annotation rows*”. De esta manera se generó la matriz 3 con las condiciones Control y Tratado definidas.

Para determinar si las medias de los valores de intensidad de las proteínas de las dos condiciones de estudio (Control y Tratado) son significativamente diferentes entre sí se realizó la prueba de dos muestras (“*Two-sample test*”). Para esto, se seleccionó la opción “*Test –Two sample test*” para realizar el análisis estadístico “t de *student*”. Se generaron dos nuevas matrices (matrices 4 y 5). Para cada proteína, teniendo en cuenta las réplicas se calculó la media de la condición tratada y del control. En la matriz 4 se agregaron nuevas columnas con datos estadísticos. Una columna que contiene el menos logaritmo en base 10 ($-\log_{10}$) del valor p (“*–Log10 Student’s T-test p-value Tratado-Control*”) de cada proteína brinda información sobre el nivel de significación estadística. Otra columna que contiene la

diferencia entre las medias (“*Student's T-test Difference Tratado-Control*”) que corresponde al \log_2 de la magnitud de cambio brinda información sobre el impacto biológico del cambio de cada proteína identificada. Si el valor p es menor que el nivel de significancia elegido sugiere que hay una diferencia entre los valores medios de los datos de tratamiento y de control. La magnitud de cambio o factor de proporcionalidad se calcularía dividiendo el nivel de expresión en el tratamiento (media de la condición tratada) por el nivel de expresión en el control (media de la condición control). Sin embargo, como los datos se encuentran transformados en \log_2 , los logaritmos transforman los cocientes en restas. Por lo tanto, no se realiza un cociente sino una resta, es decir, al nivel de expresión en el tratamiento se le resta el nivel de expresión en el control y eso nos calcula el \log_2 de la magnitud de cambio de una proteína. Se repite lo mismo para cada proteína. La figura 3 muestra el diagrama de trabajo realizado en *Perseus*.

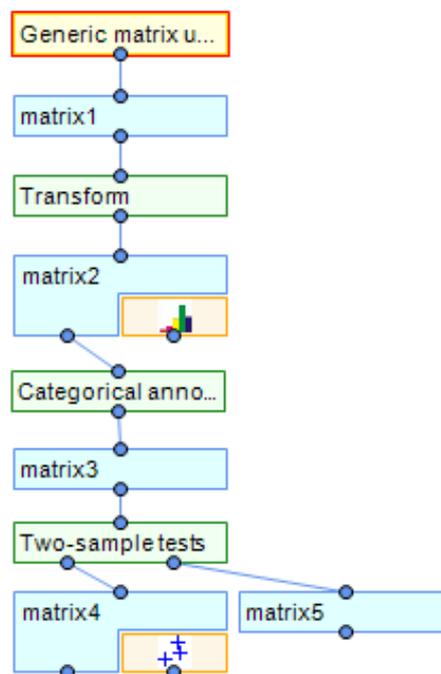


Figura 3. Diagrama de trabajo realizado en Perseus.

Para poder identificar aquellas proteínas con una magnitud de cambio grande (mayor a 1,5) y con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) se realizó un gráfico de tipo volcán. Para hacer este gráfico se colocó en el eje X el \log_2 de la magnitud de cambio (“*Student's T-test Difference Tratado-Control*”) y en el eje Y el $-\log_{10}$ del valor p (“*-log student's t-test p value tratado-control*”). Los valores de p están dados como $-\log_{10}$ del valor p, por lo que todo valor mayor a 1,3 se consideró significativo ya que el $-\log_{10}$ de 0,05 es 1,3. Por lo tanto, los valores de p más bajos, correspondientes a las diferencias estadísticamente más significativas, se encuentran en la parte superior de este diagrama de dispersión. Por otro lado, las proteínas que están reguladas de manera positiva y negativa aparecen en forma simétrica respecto del valor cero del \log_2 de la magnitud de cambio. Y un valor de \log_2 de 0,6 corresponde a una magnitud de cambio de 1,5. Por lo tanto, las proteínas con diferencia estadísticamente significativa y magnitud de cambio mayor tenderán a encontrarse en los extremos derecho e izquierdo superiores del gráfico. De esta manera, teniendo en cuenta ambos criterios, las proteínas con un cambio

relativo mayor a 1,5 ó menor a 0,65 (en el gráfico mayor a 0,6 ó menor a -0,6, respectivamente) y un valor de p menor a 0,05 (en el gráfico mayor a 1,3) fueron consideradas expresadas diferencialmente.

-*Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)

El análisis de enriquecimiento es un método para analizar conjuntos de genes o proteínas. *Enrichr* es una de las herramientas que contiene una gran colección de diversas bibliotecas de conjuntos de genes disponibles para su análisis y descarga. *Enrichr* contiene actualmente 383.335 términos anotados de 194 bibliotecas de conjuntos de genes. En general, *Enrichr* es un recurso integral para conjuntos de genes seleccionados y un motor de búsqueda que acumula conocimientos biológicos para futuros descubrimientos biológicos. *Enrichr* está disponible gratuitamente en: <https://maayanlab.cloud/Enrichr/> (Kuleshov et al., 2016; Xie et al., 2021).

1. Estudio de cambios en la morfología de las células endoteliales debidos a los factores liberados por células tumorales derivadas de CC.

En base a los resultados previos obtenidos por el grupo donde se llevó a cabo esta tesis, se iniciaron ensayos para evaluar si los factores liberados por células tumorales derivadas de CC provocan cambios sobre la morfología de las células endoteliales. Para esto, se emplearon células HMEC-1 y medios condicionados de células HeLa de CC (MCTs). Observamos que el tratamiento con estos MCTs por 3 horas aumentó el número de células endoteliales HMEC-1 con prolongaciones o proyecciones citoplasmáticas y forma más elongada o ahusada (**Figura 4**). Estas características morfológicas se asocian al proceso de EndoMT (Fang et al., 2021; Platel et al., 2019). Sin embargo, a las 6 y 24 horas de exposición a los MCTs no se encontraron estas diferencias en la morfología de las células endoteliales (**Figura 4**). Cabe aclarar que acorde a los resultados obtenidos en el laboratorio donde se llevó a cabo esta tesis, se puede apreciar un aumento en el número de células endoteliales a las 24 horas de tratamiento con el MCT. Seguidamente se analizaron las fotomicrografías utilizando el programa *Image J* para evaluar los parámetros morfológicos asociados a la ganancia de características mesenquimales como se describe en Materiales y Métodos. La **Tabla 1** revela que bajo la acción del MCT, las células endoteliales adquieren una morfología asociada al estado mesenquimal. El aumento de la relación entre el eje mayor y menor indica que la exposición al MCT durante 3 horas aumentó significativamente el grado de elongación de las células endoteliales.

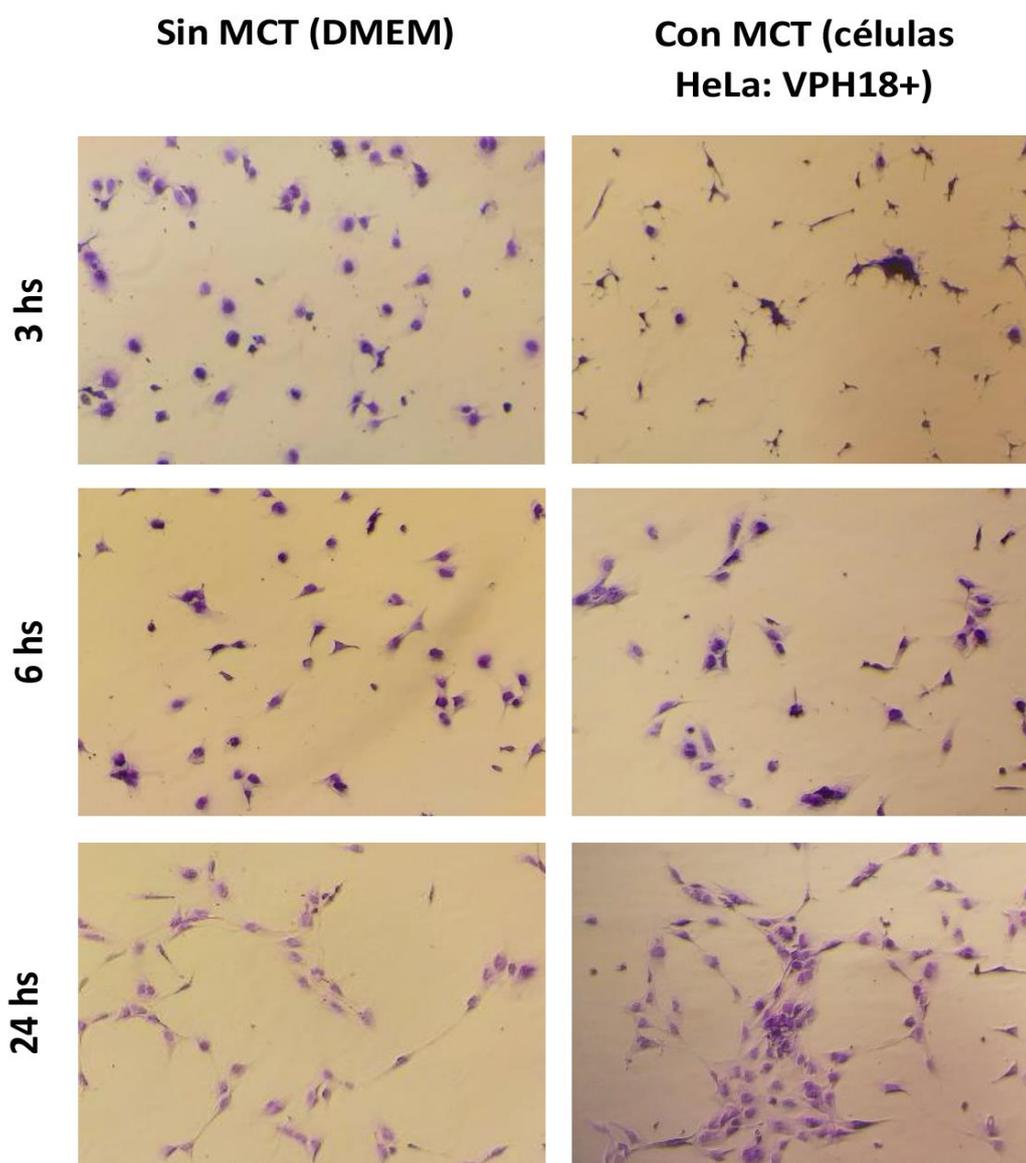


Figura 4. El tratamiento con MCT de células HeLa durante 3 horas aumenta el número de células endoteliales HMEC-1 con prolongaciones o proyecciones citoplasmáticas y forma más elongada o **ahusada**. Se muestran micrografías representativas de células endoteliales de tres experimentos independientes, teñidas con el colorante Violeta Cristal (para una mejor visualización), tratadas en ausencia y presencia de MCTs por 3, 6 y 24 horas.

| Condiciones | Redondez | Eje Mayor | Eje Menor | AR |
|--------------|----------|-----------|-----------|--------|
| Control 3 hs | 0,83 | 78,23 | 64,73 | 1,23 |
| MCT 3 hs | 0,38 * | 88,03 | 26,1 * | 4,81 * |

Tabla 1. Análisis de la relación del eje mayor/eje menor obtenido empleando el programa *Image J*. La tabla muestra el valor de los parámetros celulares: forma redonda, eje mayor, eje menor, relación de eje mayor/eje menor (AR) para cada condición. 10 células fueron medidas por condición de cada tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control.

2. Estudio de cambios en la expresión de marcadores asociados a la EndoMT de las células endoteliales debidos a los factores liberados por células tumorales derivadas de CC.

A continuación, se evaluó si el cambio en la morfología de las células endoteliales observado se acompaña con modificaciones en la expresión de marcadores asociados a la EndoMT. Mediante *Western blot* se observó en las células HMEC-1 expuestas al MCT por 3 horas una disminución de los niveles proteicos del marcador endotelial VE-cadherina y un aumento de los niveles proteicos de α -SMA, un marcador de fibroblastos asociados al cáncer (Figura 5).

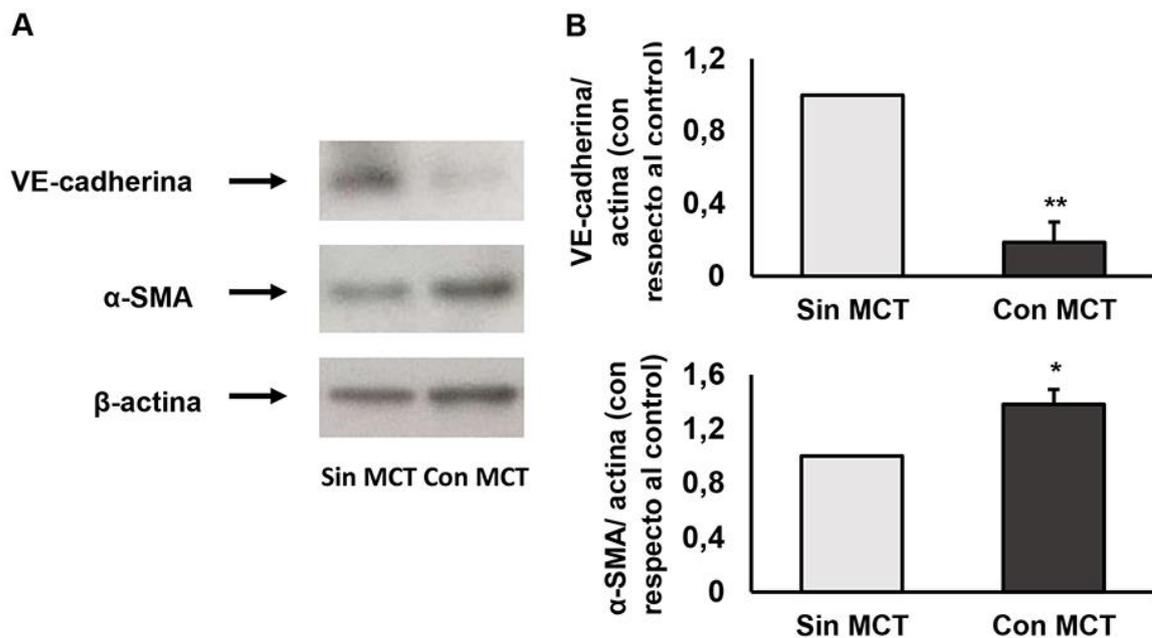


Figura 5. El MCT disminuye los niveles proteicos de VE-cadherina y aumenta los de α -SMA en las células HMEC-1. Las células endoteliales se trataron con o sin MCT durante 3 horas y los niveles proteicos se analizaron mediante *Western blot* usando anticuerpos específicos (anti-VE-cadherina y anti-SMA) como se describe en Materiales y Métodos. Además, se empleó el anticuerpo anti- β -actina como control de la cantidad de proteínas presentes en la membrana. Se muestran inmunotransferencias representativas (A) y los gráficos de barras de tres experimentos independientes (B) * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$ con respecto al control.

En conjunto estos hallazgos sugieren que los factores liberados por las células tumorales, a tiempos cortos, provocan en las células endoteliales cambios morfológicos y en la expresión de marcadores asociados a una EndoMT. A partir de los resultados obtenidos, se continuaron los estudios en estas condiciones experimentales.

3. Análisis de los datos del proteoma: identificación y cuantificación de proteínas. Identificación de proteínas expresadas diferencialmente (PED).

Un punto de control regulatorio clave determina si las células experimentan una transición EndoMT total o parcial; sin embargo, se sabe muy poco sobre cómo se controla este interruptor. Por esta razón, seguidamente, se estudiaron los cambios en el proteoma de las células HMEC-1 en las condiciones experimentales que previamente observamos características asociadas a una EndoMT, con el fin de identificar potenciales proteínas y/o vías asociadas a este proceso. Para esto, se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masas cuantitativa libre de marca LFQ en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM. Este servicio realizó la identificación y cuantificación de las proteínas con el programa *Proteome Discoverer* y la base de datos *Uniprot*. Luego continuamos con el análisis de los datos enviados por el CEQUIBIEM. La **Figura 6** muestra el gráfico de tipo volcán que ilustra la significancia estadística en función de la magnitud de cambio realizado con el programa *Perseus*. Se obtuvieron 9 proteínas reguladas negativamente y 24 proteínas reguladas positivamente en las células HMEC-1 tratadas con el MCT en comparación con el control ($p \leq 0,05$; magnitud de cambio $\geq 1,5$ y $\leq 0,65$).

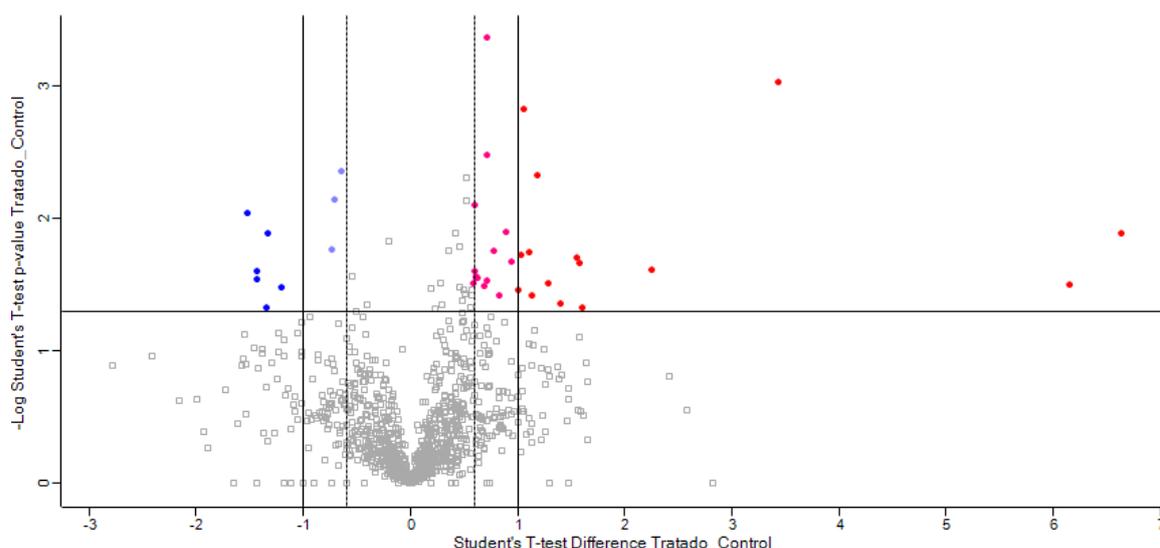


Figura 6. Gráfico de tipo volcán “*Volcano plots*” que ilustra la distribución de los valores p y la magnitud de cambio de todas las proteínas que se encontraron consistentemente entre las dos condiciones experimentales. El $-\text{Log}_{10}$ (Valor p) ($-\text{Log Student's T test p value}$ Tratado-Control) se traza frente al Log_2 (magnitud de cambio) ($\text{Student's T-test Difference}$ Tratado-Control). Los puntos marcados en color representan proteínas que superan el umbral estadístico establecido en un valor de $p \leq 0,05$. Los puntos rojos corresponden a las proteínas con una magnitud de cambio ≥ 2 ; los puntos rosados a las de una magnitud de cambio entre 1,5 y 2; los puntos azules a las proteínas con una magnitud de cambio $\leq 0,5$ y los puntos celestes a las de una magnitud de cambio entre 0,5 y 0,65.

En las **Tablas 2 y 3** se muestran las proteínas reguladas o expresadas diferencialmente (PEDs), con su correspondiente gen, el valor p y la magnitud de cambio.

| <i>Protein accession</i> | Descripción | GEN | -Log <i>Student's T-test p-value</i> Tratado_Control | Valor de p | <i>Student's T-test Difference</i> Tratado_Control | Magnitud del cambio | Cobertura % |
|--------------------------|---|---------|--|------------|--|---------------------|-------------|
| P10909 | Clusterina | CLU | 1,50 | 0,0319 | 6,1555 | 71,28 | 21 |
| Q92626 | Homólogo de peroxidasa | PXDN | 3,03 | 0,0009 | 3,4390 | 10,85 | 8 |
| P00966 | Argininosuccinato sintasa | ASS1 | 1,61 | 0,0244 | 2,2546 | 4,77 | 4 |
| A0A5F9ZHU7 | Subunidad grande de ADN primasa | PRIM2 | 1,33 | 0,0470 | 1,6080 | 3,05 | 4 |
| P19525 | Proteína quinasa activada por ARN bicatenario inducida por interferón | EIF2AK2 | 1,67 | 0,0215 | 1,5839 | 3,00 | 5 |
| P68032 | Actina, músculo cardíaco alfa 1 | ACTC1 | 1,70 | 0,0199 | 1,5527 | 2,93 | 40 |
| Q14694 | Unbiquina carboxilo terminal hidrolasa 10 | USP10 | 1,36 | 0,0437 | 1,3969 | 2,63 | 3 |
| P38159 | Proteína con motivo de unión al ARN, cromosoma X | RBMX | 1,51 | 0,0311 | 1,2810 | 2,43 | 12 |
| H0YHGO | Proteína no caracterizada (fragmento) | | 2,32 | 0,0048 | 1,1854 | 2,27 | 4 |
| A0A3B3ISG5 | Enzima degradadora de insulina | IDE | 1,42 | 0,0377 | 1,1358 | 2,20 | 2 |

| | | | | | | | |
|--------|---|---------|------|--------|--------|------|----|
| P78527 | Subunidad catalítica de proteína quinasa dependiente de ADN | PRKD C | 1,74 | 0,0180 | 1,1030 | 2,15 | 5 |
| O60488 | Ácido graso de cadena larga - CoA ligasa 4 | ACSL 4 | 2,82 | 0,0015 | 1,0534 | 2,08 | 6 |
| Q9Y295 | Proteína 1 de unión a GTP regulada por el desarrollo | DRG1 | 1,72 | 0,0189 | 1,0304 | 2,04 | 11 |
| O14737 | Proteína de muerte celular programada 5 | PDCD 5 | 1,46 | 0,0344 | 1,0048 | 2,01 | 19 |
| A8MXP9 | Matrina-3 | MAT R3 | 1,67 | 0,0214 | 0,9474 | 1,93 | 10 |
| J3KPF3 | Cadena pesada de antígeno de superficie celular 4F2 | SLC3 A2 | 1,90 | 0,0127 | 0,8976 | 1,86 | 21 |
| Q01650 | Transportador de aminoácidos neutros grande subunidad pequeña 1 | SLC7 A5 | 1,42 | 0,0378 | 0,8290 | 1,78 | 7 |
| Q3ZCM7 | Cadena beta-8 de tubulina | TUBB 8 | 1,75 | 0,0177 | 0,7788 | 1,72 | 19 |
| Q16630 | Subunidad 6 del factor de especificidad de escisión y poliadenilación | CPSF6 | 2,48 | 0,0033 | 0,7192 | 1,65 | 10 |
| P22314 | Enzima activadora del modificador similar a la ubiquitina 1 | UBA1 | 3,37 | 0,0004 | 0,7155 | 1,64 | 22 |

| | | | | | | | |
|--------|---|-------|------|--------|--------|------|----|
| P49736 | Factor de licencia de replicación de ADN MCM2 | MCM2 | 1,53 | 0,0292 | 0,7128 | 1,64 | 6 |
| P07814 | Glutamato/prolina bifuncional - ARNt ligasa | EPRS1 | 1,49 | 0,0321 | 0,6852 | 1,61 | 2 |
| P00558 | Fosfoglicerato quinasa 1 | PGK1 | 1,55 | 0,0279 | 0,6265 | 1,54 | 43 |
| P62191 | Subunidad reguladora 4 del proteasoma 26S | PSMC1 | 1,56 | 0,0275 | 0,6123 | 1,53 | 12 |
| O15371 | Subunidad D del factor 3 de iniciación de la traducción eucariota | EIF3D | 1,55 | 0,0281 | 0,6136 | 1,53 | 5 |

Tabla 2. Proteínas reguladas positivamente en las células endoteliales HMEC-1 tratadas durante 3 horas con el MCT en comparación con las células control. Se muestra el número de identificación en la base de datos *UniProt* (“*Uniprot Accession*”), el nombre de las proteínas, su correspondiente gen, el “*-Log Student's T-test p-value* Tratado-Control”, el valor p, el “*Student's T-test Difference* Tratado-Control”, la magnitud de cambio y el porcentaje de cobertura.

| <i>Protein accession</i> | Descripción | Gen | <i>-Log Student's T-test p-value</i> Tratado_Control | Valor de p | <i>Student's T-test Difference</i> Tratado_Control | Magnitud del cambio | Cobertura % |
|--------------------------|-------------------------------------|-------|--|------------|--|---------------------|-------------|
| A0A0A0MTJ9 | Colesterol éster hidrolasa 1 neutra | NCEH1 | 2,35 | 0,0073 | -0,6427 | 0,6405 | 23 |

| | | | | | | | |
|------------|--|--------|------|--------|---------|--------|----|
| Q14344 | Proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad alfa-13 | GNA13 | 2,14 | 0,0073 | -0,7144 | 0,6094 | 12 |
| P62805 | Histona H4 | H4C1 | 1,76 | 0,0173 | -0,7366 | 0,6001 | 57 |
| A0A0U1RRH7 | Histona H2A | | 1,48 | 0,0331 | -1,2076 | 0,4330 | 27 |
| Q14257 | Reticulocalbina-2 | RCN2 | 1,88 | 0,0131 | -1,3370 | 0,3958 | 14 |
| Q9UHG3 | Prenilcisteína oxidasa 1 | PCYOX1 | 1,33 | 0,0472 | -1,3408 | 0,3948 | 7 |
| Q92979 | Metiltransferasa NEP1 de subunidad pequeña de ARN ribosómico | EMG1 | 1,54 | 0,0288 | -1,4324 | 0,3705 | 14 |
| P62241 | Proteína ribosómica 40S S8 | RPS8 | 1,60 | 0,0253 | -1,4359 | 0,3696 | 25 |
| P68366 | Cadena alfa 4A de tubulina | TUBA4A | 2,04 | 0,0091 | -1,5250 | 0,3475 | 34 |

Tabla 3. Proteínas reguladas negativamente en las células endoteliales HMEC-1 tratadas durante 3 horas con el MCT en comparación con las células control. Se muestra el número de identificación en la base de datos *UniProt* (“*Uniprot Accession*”), el nombre de las proteínas, su correspondiente gen, el “-Log *Student's T-test p-value* Tratado-Control”, el valor p, el “*Student's T-test Difference* Tratado-Control”, la magnitud de cambio y el porcentaje de cobertura (muestra el porcentaje de la secuencia de la proteína cubierto por los péptidos identificados).

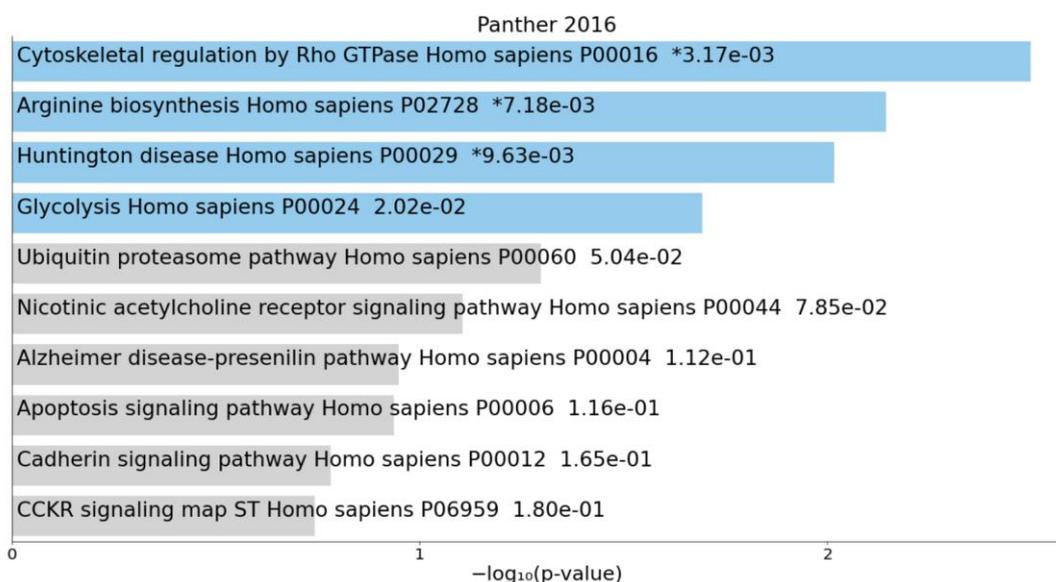
Se pudo observar que clusterina (CLU) es la proteína que presenta la mayor magnitud de cambio, seguida por el homólogo de peroxidasa (PXDN). Clusterina es una glicoproteína con un rol clave en la respuesta al estrés celular y en el cáncer regulando procesos como la migración celular (Tian et al., 2019). PXDN es una proteína de la matriz extracelular con actividad peroxidasa y se ha informado

que participa en la TEM (Zheng y Liang, 2018). Según los resultados obtenidos CLU y PXDN podrían estar involucradas en la EndoMT.

4. Análisis funcional de las PEDs.

Luego para realizar un análisis funcional en un contexto biológico de estas proteínas reguladas diferencialmente, las clasificamos utilizando herramientas de análisis informático. Por lo tanto, para profundizar en la función de las PEDs, se evaluaron las vías de señalización en las que están involucradas y el tipo celular. Para esto, se incorporaron las PED a la plataforma *Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) (Xie et al., 2021), que reúne distintas bases de datos para el enriquecimiento funcional. Como se observa en la **Figura 7** las proteínas reguladas positivamente se asocian significativamente a la vía de regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa ($p= 0,003171$; p ajustado= $0,03805$) involucrando a dos proteínas del citoesqueleto: la actina alfa del músculo cardíaco 1 (ACTC1) y la tubulina beta-8 (TUBB8). También se vinculan a efectos metabólicos de oncogenes y supresores de tumores en células cancerosas ($p= 0,00007229$; p ajustado= $0,004779$), a proteínas con expresión alterada en la reprogramación metabólica del cáncer ($p= 0,0001406$; p ajustado= $0,004779$), la Glutamina en el metabolismo del cáncer ($p= 0,0005118$; p ajustado= $0,008701$) y la activación de señalización mTOR por aminoácidos ($p= 0,001505$; p ajustado= $0,02047$). Con respecto al tipo celular, si bien el valor p ajustado no dio significativo, se asociaron a células de soporte perivascular – Útero ($p=0,006607$; p ajustado= $0,126142$) y a fibroblastos ($p=0,1134$; p ajustado= $0,1290$).

Se muestran sólo los resultados obtenidos con las proteínas reguladas positivamente ya que fueron más relevantes que los de las reguladas negativamente.



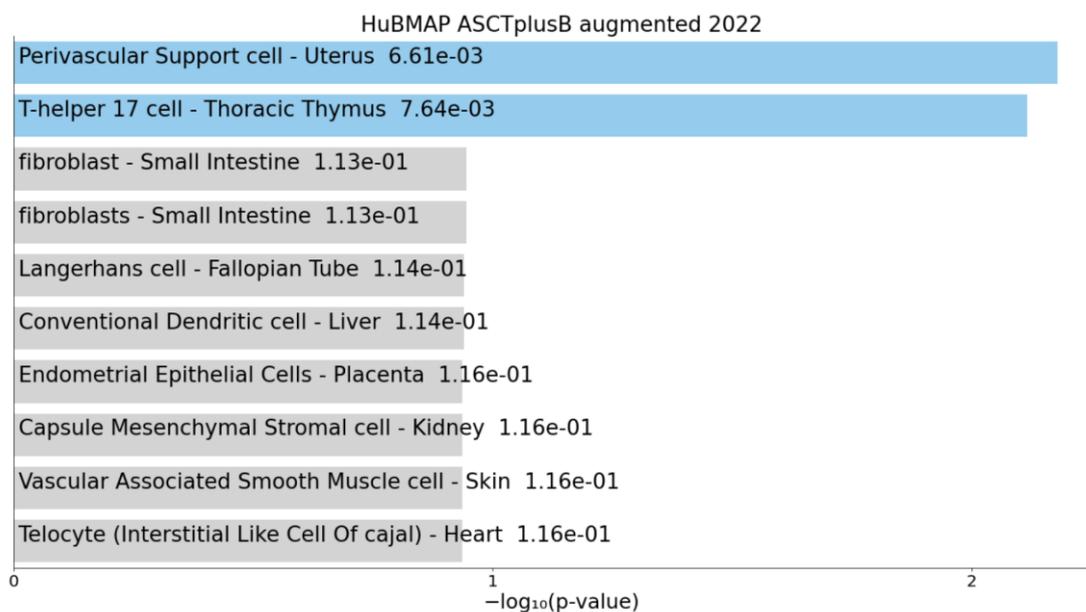
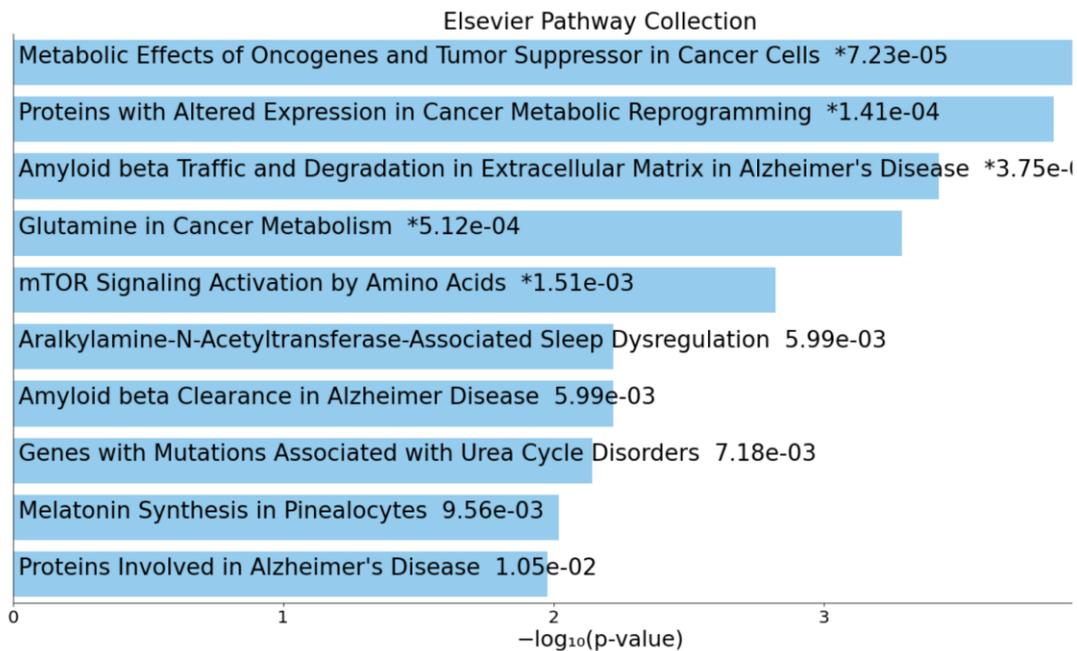


Figura 7. Vías y tipos celulares asociados a las proteínas reguladas positivamente. Empleando la plataforma *Enrichr* se realizó la consulta de enriquecimiento funcional por vías de señalización “*Panther 2016*” (panel superior), “*Elsevier Pathway Collection*” (panel medio) y tipos celulares “*HuBMAP ASCTplusB augmented 2022*” (panel inferior), de las 24 proteínas reguladas positivamente. El gráfico de barras muestra la probabilidad asociada en cada caso expresada como $-\log_{10}(\text{valor } p)$.

En conjunto el análisis realizado, sugiere que los factores liberados por las células tumorales a tiempos cortos modifican la expresión de proteínas involucradas en la vía de regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa y la señalización mTOR. Estas vías de señalización podrían estar

involucradas en la regulación de la EndoMT. Además, este análisis bioinformático sugirió que en las condiciones experimentales estudiadas las células endoteliales tienen características de fibroblastos.

DISCUSIÓN

Aunque se ha logrado un gran progreso con la vacunación profiláctica contra el VPH, la detección citológica y el tratamiento del CC, la reducción de la tasa de supervivencia debido al diagnóstico tardío y al tratamiento inadecuado siguen siendo los mayores desafíos (Xu et al., 2022). Por lo tanto, se necesita una mayor comprensión de la patogenia del CC para encontrar blancos terapéuticos moleculares alternativos que sean más eficaces que los tradicionales.

El VPH puede promover varios procesos asociados a la progresión del tumor como la angiogénesis tumoral (Clere et al., 2007; Gupta et al., 2018). Este proceso es importante para la iniciación, progresión y metástasis del CC (Mazibrada et al., 2008; Gupta et al., 2018). Varias investigaciones se focalizaron en la relación de la angiogénesis con el CC con el objetivo de identificar potenciales biomarcadores y diseñar herramientas terapéuticas (Hu et al., 2018; Pfaendler et al., 2018). Diferentes estudios observaron un incremento de marcadores asociados con la angiogénesis desde el epitelio normal, a través de las lesiones pre-malignas de leves a graves hasta el CC (No et al., 2009; Balasubramaniam et al., 2019). Sin embargo, aún no se ha llegado a resultados concluyentes, posiblemente por no tener en cuenta la heterogeneidad y plasticidad de las CETs.

La EndoMT se define como una transición celular de un fenotipo endotelial a mesenquimático, debido al potencial de plasticidad de las células endoteliales. Este proceso se ha caracterizado y confirmado a través de varios estudios realizados en diferentes modelos de células endoteliales tales como CETs aisladas de cáncer de próstata (Dudley et al., 2008), células endoteliales microvasculares dérmicas normales (HDMEC), células HMEC-1 endoteliales microvasculares dérmicas inmortalizadas (Ciszewski et al., 2017), células endoteliales venosas umbilicales humanas (HUVEC) (Paranya et al., 2001; Nagai et al., 2018) o células endoteliales microvasculares del esófago humano (HEMEC) (Nie et al., 2014). Además, algunos estudios *in vivo* confirmaron este proceso no sólo en diversas situaciones fisiológicas como desarrollo (Lu et al., 2015) y cicatrización de heridas (Lee y Kay, 2006), sino también en procesos patológicos como enfermedades fibróticas (Piera-Velazquez et al., 2016; Cho et al., 2018) y en el cáncer (Potenta et al., 2008; Herrera et al., 2018). Si bien la EndoMT, al ser un proceso de transición progresivo y complejo, es difícil de explorar *in vivo*, se ha descrito en muestras humanas de varias patologías. La detección de EndoMT en pacientes con cáncer humano se ha informado en secciones de tejido colorrectal (Fan et al., 2017).

Los estudios *in vitro* han proporcionado una mejor comprensión de las alteraciones fenotípicas de las células endoteliales durante la EndoMT. En este trabajo de tesis inicialmente se evaluó si los factores liberados por células derivadas de CC inducen en células endoteliales características relacionadas a este proceso. Observamos que el tratamiento con MCTs obtenidos de células HeLa de CC por 3 horas provoca en las células endoteliales HMEC-1 cambios morfológicos y en la expresión de marcadores asociados a este proceso. Si bien se incluyeron en este estudio sólo MCTs de una línea celular tumoral, cabe aclarar que el grupo donde se llevó a cabo esta tesis también encontró cambios similares utilizando la línea Caski derivada de CC positiva para VPH16. Por otro lado, además al

emplear el MC de una línea normal de queratinocitos humanos, una línea no tumoral, observaron una morfología similar a la de las células control sin MCT. Por último, también hallaron cambios similares utilizando un sistema de co-cultivo indirecto, empleando filtros *transwells*.

Se eligió como primer análisis la observación del cambio morfológico debido a que permite evidenciar un potencial proceso de EndoMT al observar células endoteliales con un fenotipo mesenquimatoso, determinado principalmente por el desarrollo de proyecciones y una forma elongada (Ciszewski et al., 2021). Si bien es posible evaluar la morfología celular mediante un microscopio de contraste de fases, sin la necesidad de teñir las células, empleamos la tinción de las células con Violeta Cristal para facilitar su observación en el microscopio. Además de las modificaciones en la morfología, se analizaron los cambios en la expresión de VE-cadherina, un importante marcador endotelial, y α -SMA como marcador mesenquimal, los cuales respaldaron lo observado morfológicamente en la primera instancia. Varios trabajos emplean el uso de estos marcadores para evaluar la presencia de una EndoMT (Platel et al., 2019). Cabe aclarar que el grupo donde se llevó a cabo esta tesis también observó cambios en los niveles de ARNm de estos marcadores y de otros relacionados al proceso de EndoMT.

A continuación, mediante análisis de expresión diferencial de proteínas y herramientas de bioinformática se identificaron potenciales vías de señalización y de modificación metabólica y fenotípica inducidas en células endoteliales en las condiciones experimentales mostradas en este trabajo y en las cuales se observaron cambios relacionados al proceso de EndoMT. Para esto, inicialmente en este trabajo se estudió la respuesta del proteoma de las células endoteliales HMEC-1 luego de 3 horas de exposición a los factores liberados por las células HeLa derivadas de CC. Se identificaron 9 proteínas reguladas negativamente y 24 proteínas reguladas positivamente. Dentro de las proteínas reguladas positivamente, se pudo observar que clusterina es la proteína que presenta la mayor magnitud de cambio, seguida PXDN.

Clusterina es una glicoproteína ampliamente distribuida en varios tejidos y en casi todos los fluidos fisiológicos del organismo con múltiples funciones específicas del tipo de isoforma (Zhang et al., 2022). Según diversos estudios, los niveles de clusterina están directamente relacionados con el grado de severidad de varios tipos de cánceres y sugieren que esta proteína tiene un rol importante en la activación de vías de supervivencia en células tumorales, metástasis y quimiorresistencia (Praharaj et al., 2021). Además, si bien no hay trabajos que relacionen a esta proteína con la EndoMT, varias investigaciones sostienen que es un regulador esencial del proceso de TEM en el cáncer (Praharaj et al., 2021). En el adenocarcinoma de pulmón, clusterina promueve la TEM. Además, observaron que las células enriquecidas con clusterina tienen un fenotipo más fusiforme que cuboidal, lo que sugiere que esta proteína también modula la plasticidad celular (Chou et al., 2009). Por otro lado, PXDN es una proteína de la matriz extracelular con actividad peroxidasa que tiene varios roles en procesos fisiológicos y patológicos como el cáncer (Cheng y Shi, 2022). Se han evidenciado aumentos en su expresión en diferentes tipos de tejidos tumorales como cáncer de ovario, melanoma, entre otros (Zheng y Liang, 2018). Si bien no se ha estudiado el rol de PXDN en la EndoMT se demostró que está involucrada en procesos en los que tiene lugar la TEM como desarrollo, fibrosis y cáncer (Wang et al., 2019; Paumann-

Page et al., 2021). Durante el desarrollo en los organismos modelo *X. tropicalis* y *C. elegans*, se descubrió que los ortólogos de PXDN son parte integral del desarrollo embrionario y, en humanos, las mutaciones en PXDN se han asociado con anomalías congénitas del ojo (Yan et al., 2014; Micheal et al., 2016; Tindall et al., 2005; Gotenstein et al., 2010). En la fibrosis, la expresión de PXDN está elevada en los fibroblastos dérmicos y pulmonares humanos, y en la fibrosis renal, los miofibroblastos tratados con TGF- β 1 depositan excesivamente PXDN en la matriz extracelular (Péterfi et al., 2009). Desde la perspectiva del cáncer, Barnett y colaboradores encontraron que la sobreexpresión de *Snail*, un marcador de TEM, causaba una regulación positiva de PXDN en células de cáncer de próstata humano (Barnett et al., 2011). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, Sitole y Mavri-Damelin observaron que durante la TEM inducida por TGF- β 1, disminuyó la expresión de PXDN en dos líneas celulares de CC, con aumentos concomitantes en *Snail* y vimentina, y una disminución en E-cadherina (Sitole y Mavri-Damelin, 2018). Por lo tanto, si bien en la TEM en células de CC PXDN parece estar inhibida, en la fibrosis renal, PXDN está aumentada en la matriz extracelular, por lo que podría ser un marcador de EndoMT, pero no de TEM en el CC. Además, al igual que con muchas otras proteínas, la expresión de PXDN parece depender del tipo, subtipo y de la etapa del cáncer pudiendo ejercer roles opuestos en su progresión (Young et al., 2015).

Teniendo en cuenta la información disponible previamente en otros estudios y los resultados presentados en esta tesis, CLU y PXDN podrían ser reguladores del proceso de EndoMT. Sin embargo, se requiere de más investigaciones para confirmar estas hipótesis. Los enfoques de espectrometría libres de marca representan una fase inicial de descubrimiento de potenciales biomarcadores o blancos terapéuticos que luego deben ser validados y verificados con otras técnicas.

Si bien no se pudo confirmar el cambio en los niveles de estas proteínas por la técnica de *Western blot* por no disponer de los anticuerpos correspondientes, el grupo donde se llevó a cabo esta tesis observó cambios en los niveles de ARNm de clusterina y PXDN. Por otro lado, también se pretende realizar ensayos para inhibir o sobre-expresar estas proteínas en las células endoteliales para profundizar el estudio de su potencial rol en la EndoMT.

Por último, se realizó un análisis funcional de las 24 proteínas reguladas positivamente. El enriquecimiento funcional mediante *Enrichr* arrojó asociaciones con vías y tipos celulares en las cuales estas proteínas están enriquecidas. Este análisis permitió inferir la asociación significativa con la vía de regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa y la señalización mTOR. En concordancia con estos resultados, otros investigadores demostraron la participación de estas vías en la EndoMT. Han observado que los cambios en la forma y el alargamiento de las células y la modulación de las propiedades de adhesión y migración observadas durante EndoMT están controlados por las pequeñas proteínas G que pertenecen a la familia Rho GTPasa (Mihira et al., 2012; Sobierajska et al., 2022). Ke y colaboradores demostraron que *Vaspin*, un inhibidor de la serina proteasa derivado del tejido adiposo visceral, aumenta la EndoMT al activar la autofagia a través de la vía de señalización PI3K/AKT-mTOR (Ke et al., 2022). Las vías de señalización TGF- β /Smad y Akt/mTOR/p70S6K están asociadas con la

patogénesis de EndoMT inducida por TGF- β 1 en la fibrosis intersticial del riñón trasplantado (Wang et al., 2017). Sin embargo, no se ha estudiado el rol de estas vías en la EndoMT en el CC.

Por otro lado, este análisis bioinformático con respecto al tipo celular encontró asociación de las proteínas reguladas positivamente con los fibroblastos, afianzando de esta manera el modelo experimental estudiado.

Si bien, los efectos observados *in vitro* son entre dos líneas celulares con modificaciones genéticas únicas y no necesariamente reflejan lo que podría ocurrir *in vivo* entre células tumorales con modificaciones genéticas distintas a HeLa y células endoteliales normales, esto no resta valor al diseño ya que siempre es posible hallar mediadores y vías de tipo general, por lo que estos resultados podrían considerarse un buen punto de partida

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, los factores liberados al medio por células tumorales derivadas de CC provocarían en tiempos cortos cambios en la morfología y en la expresión de marcadores en las células endoteliales asociados a la EndoMT, siendo clusterina y PXDN dos proteínas potencialmente involucradas en este proceso. Además, se destacó la vía de regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa y la señalización mTOR. Estos resultados sientan las bases para profundizar el estudio de estas proteínas y vías en el rol de la EndoMT.

Debido a que la EndoMT es un proceso clave en el cáncer, este tipo de hallazgos permiten entender mejor el ambiente tumoral para encontrar posibles blancos terapéuticos y disminuir la tasa de mortalidad, no solo en el CC sino también en otros tipos de cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., & Lawley, T. J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of investigative dermatology*, 99(6), 683–690.
- Armstrong, E. J., & Bischoff, J. (2004). Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circulation research*, 95(5), 459–470.
- Balasubramaniam, S. D., Balakrishnan, V., Oon, C. E., & Kaur, G. (2019). Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(7), 384.
- Barnett, P., Arnold, R. S., Mezencev, R., Chung, L. W., Zayzafoon, M., & Odero-Marah, V. (2011). Snail-mediated regulation of reactive oxygen species in ARCaP human prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 404(1), 34–39.
- Bhattacharjee, R., Das, S. S., Biswal, S. S., Nath, A., Das, D., Basu, A., Malik, S., Kumar, L., Kar, S., Singh, S. K., Upadhye, V. J., Iqbal, D., Almojam, S., Roychoudhury, S., Ojha, S., Ruokolainen, J., Jha, N. K., & Kesari, K. K. (2022). Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Critical reviews in oncology/hematology*, 174, 103675.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Carrera Páez "Compilador", L. C. (2015). Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con Chlamydia trachomatis. *Nova*, 13(23), 19–31.
- Chaparro, R. M., Rodríguez, B., Maza, Y., Moyano, D., & Hernández-Vásquez, A. (2020). Factors associated with hindering the acceptance of HPV vaccination among caregivers - A cross-sectional study in Argentina. *PloS one*, 15(3), e0229793.
- Cheng, G., & Shi, R. (2022). Mammalian peroxidase (PXDN): From physiology to pathology. *Free radical biology & medicine*, 182, 100–107.
- Cho, J. G., Lee, A., Chang, W., Lee, M. S., & Kim, J. (2018). Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Frontiers in immunology*, 9, 294.

- Chou, T. Y., Chen, W. C., Lee, A. C., Hung, S. M., Shih, N. Y., & Chen, M. Y. (2009). Clusterin silencing in human lung adenocarcinoma cells induces a mesenchymal-to-epithelial transition through modulating the ERK/Slug pathway. *Cellular signalling*, *21*(5), 704–711.
- Ciesielski, O., Biesiekierska, M., Panthu, B., Vialichka, V., Pirola, L., & Balcerczyk, A. (2020). The Epigenetic Profile of Tumor Endothelial Cells. Effects of Combined Therapy with Antiangiogenic and Epigenetic Drugs on Cancer Progression. *International journal of molecular sciences*, *21*(7), 2606.
- Ciszewski, W. M., Sobierajska, K., Wawro, M. E., Klopocka, W., Chęczyńska, N., Muzyczuk, A., Siekacz, K., Wujkowska, A., & Niewiarowska, J. (2017). The ILK-MMP9-MRTF axis is crucial for EndMT differentiation of endothelial cells in a tumor microenvironment. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, *1864*(12), 2283–2296.
- Ciszewski, W. M., Wawro, M. E., Sacewicz-Hofman, I., & Sobierajska, K. (2021). Cytoskeleton Reorganization in EndMT-The Role in Cancer and Fibrotic Diseases. *International journal of molecular sciences*, *22*(21), 11607.
- Clere, N., Bermont, L., Fauconnet, S., Lascombe, I., Saunier, M., Vettoretti, L., Plissonnier, M. L., & Mougín, C. (2007). The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Experimental cell research*, *313*(15), 3239–3250.
- Dudley, A. C., Khan, Z. A., Shih, S. C., Kang, S. Y., Zwaans, B. M., Bischoff, J., & Klagsbrun, M. (2008). Calcification of multipotent prostate tumor endothelium. *Cancer cell*, *14*(3), 201–211.
- Fan, C. S., Chen, W. S., Chen, L. L., Chen, C. C., Hsu, Y. T., Chua, K. V., Wang, H. D., & Huang, T. S. (2017). Osteopontin-integrin engagement induces HIF-1 α -TCF12-mediated endothelial-mesenchymal transition to exacerbate colorectal cancer. *Oncotarget*, *9*(4), 4998–5015.
- Fang, J. S., Hultgren, N. W., & Hughes, C. (2021). Regulation of Partial and Reversible Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Angiogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 702021.
- Gasparics, Á., Rosivall, L., Krizbai, I. A., & Sebe, A. (2016). When the endothelium scores an own goal: endothelial cells actively augment metastatic extravasation through endothelial-mesenchymal transition. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *310*(9), H1055–H1063.

- Gotenstein, J. R., Swale, R. E., Fukuda, T., Wu, Z., Giurumescu, C. A., Goncharov, A., Jin, Y., & Chisholm, A. D. (2010). The *C. elegans* peroxidase PNX-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration. *Development (Cambridge, England)*, *137*(21), 3603–3613.
- Goto, M., Osada, S., Imagawa, M., & Nishizuka, M. (2017). FAD104, a regulator of adipogenesis, is a novel suppressor of TGF- β -mediated EMT in cervical cancer cells. *Scientific reports*, *7*(1), 16365.
- Guo, Y., Li, P., Bledsoe, G., Yang, Z. R., Chao, L., & Chao, J. (2015). Kallistatin inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by differential regulation of microRNA-21 and eNOS expression. *Experimental cell research*, *337*(1), 103–110.
- Gupta, S., & Gupta, M. K. (2017). Possible role of nanocarriers in drug delivery against cervical cancer. *Nano reviews & experiments*, *8*(1), 1335567.
- Gupta, S., Kumar, P., & Das, B. C. (2018). HPV: Molecular pathways and targets. *Current problems in cancer*, *42*(2), 161–174.
- Herrera, A., Herrera, M., Guerra-Perez, N., Galindo-Pumariño, C., Larriba, M. J., García-Barberán, V., Gil, B., Giménez-Moyano, S., Ferreiro-Monteagudo, R., Veguillas, P., Candia, A., Peña, R., Pinto, J., García-Bermejo, M. L., Muñoz, A., García de Herreros, A., Bonilla, F., Carrato, A., & Peña, C. (2018). Endothelial cell activation on 3D-matrices derived from PDGF-BB-stimulated fibroblasts is mediated by Snail1. *Oncogenesis*, *7*(9), 76.
- Hida, K., Maishi, N., Annan, D. A., & Hida, Y. (2018). Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression. *International journal of molecular sciences*, *19*(5), 1272.
- Hu, X., Liu, H., Ye, M., & Zhu, X. (2018). Prognostic value of microvessel density in cervical cancer. *Cancer cell international*, *18*, 152.
- Ke, X., Chen, X., Yan, L., & Zhang, Y. (2022). Vaspin contributes to autophagy and endothelial-to-mesenchymal transition via PI3K-/AKT-mTOR pathway. *Acta histochemica*, *124*(4), 151881.
- Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W., & Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research*, *44*(W1), W90–W97.

- Kurnia, I., Rauf, S., Hatta, M., Arifuddin, S., Hidayat, Y. M., Natzir, R., Kaelan, C., Bukhari, A., Pelupessy, N. U., & Patelonggi, I. J. (2022). Molecular Patho-mechanisms of cervical cancer (MMP1). *Annals of medicine and surgery (2012)*, *77*, 103415.
- La Greca, A., Solari, C., Furmento, V., Lombardi, A., Biani, M. C., Aban, C., Moro, L., García, M., Guberman, A. S., Sevlever, G. E., Miriuka, S. G., & Luzzani, C. (2018). Extracellular vesicles from pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire a stromal modulatory proteomic pattern during differentiation. *Experimental & molecular medicine*, *50*(9), 1–12.
- Lee, J. G., & Kay, E. P. (2006). FGF-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells. *Experimental eye research*, *83*(6), 1309–1316.
- Li, C., & Hua, K. (2022). Dissecting the Single-Cell Transcriptome Network of Immune Environment Underlying Cervical Premalignant Lesion, Cervical Cancer and Metastatic Lymph Nodes. *Frontiers in immunology*, *13*, 897366.
- Lin P. P. (2020). Aneuploid Circulating Tumor-Derived Endothelial Cell (CTEC): A Novel Versatile Player in Tumor Neovascularization and Cancer Metastasis. *Cells*, *9*(6), 1539.
- Liu, J., Dong, F., Jeong, J., Masuda, T., & Lobe, C. G. (2014). Constitutively active Notch1 signaling promotes endothelial-mesenchymal transition in a conditional transgenic mouse model. *International journal of molecular medicine*, *34*(3), 669–676.
- Lu, C. C., Liu, M. M., Clinton, M., Culshaw, G., Argyle, D. J., & Corcoran, B. M. (2015). Developmental pathways and endothelial to mesenchymal transition in canine myxomatous mitral valve disease. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, *206*(3), 377–384.
- Man, S., Sanchez Duffhues, G., Ten Dijke, P., & Baker, D. (2019). The therapeutic potential of targeting the endothelial-to-mesenchymal transition. *Angiogenesis*, *22*(1), 3–13.
- Mazibrada, J., Rittà, M., Mondini, M., De Andrea, M., Azzimonti, B., Borgogna, C., Ciotti, M., Orlando, A., Surico, N., Chiusa, L., Landolfo, S., & Gariglio, M. (2008). Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecologic oncology*, *108*(1), 112–120.
- Micheal, S., Siddiqui, S. N., Zafar, S. N., Iqbal, A., Khan, M. I., & den Hollander, A. I. (2016). Identification of Novel Variants in LTBP2 and PXDN Using Whole-Exome Sequencing in Developmental and Congenital Glaucoma. *PloS one*, *11*(7), e0159259.

- Mihira, H., Suzuki, H. I., Akatsu, Y., Yoshimatsu, Y., Igarashi, T., Miyazono, K., & Watabe, T. (2012). TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *Journal of biochemistry*, *151*(2), 145–156.
- Nagai, N., Ohguchi, H., Nakaki, R., Matsumura, Y., Kanki, Y., Sakai, J., Aburatani, H., & Minami, T. (2018). Downregulation of ERG and FLI1 expression in endothelial cells triggers endothelial-to-mesenchymal transition. *PLoS genetics*, *14*(11), e1007826.
- Nagl, L., Horvath, L., Pircher, A., & Wolf, D. (2020). Tumor Endothelial Cells (TECs) as Potential Immune Directors of the Tumor Microenvironment - New Findings and Future Perspectives. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 766.
- Nie, L., Lyros, O., Medda, R., Jovanovic, N., Schmidt, J. L., Otterson, M. F., Johnson, C. P., Behmaram, B., Shaker, R., & Rafiee, P. (2014). Endothelial-mesenchymal transition in normal human esophageal endothelial cells cocultured with esophageal adenocarcinoma cells: role of IL-1 β and TGF- β 2. *American journal of physiology. Cell physiology*, *307*(9), C859–C877.
- No, J. H., Jo, H., Kim, S. H., Park, I. A., Kang, D., Han, S. S., Kim, J. W., Park, N. H., Kang, S. B., & Song, Y. S. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1 α in cervical neoplasia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1171*, 105–110.
- Pappa, K. I., Kontostathi, G., Makridakis, M., Lygirou, V., Zoidakis, J., Daskalakis, G., & Anagnostou, N. P. (2017). High Resolution Proteomic Analysis of the Cervical Cancer Cell Lines Secretome Documents Deregulation of Multiple Proteases. *Cancer genomics & proteomics*, *14*(6), 507–521.
- Paranya, G., Vineberg, S., Dvorin, E., Kaushal, S., Roth, S. J., Rabkin, E., Schoen, F. J., & Bischoff, J. (2001). Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro. *The American journal of pathology*, *159*(4), 1335–1343.
- Paumann-Page, M., Kienzl, N. F., Motwani, J., Bathish, B., Paton, L. N., Magon, N. J., Sevcnikar, B., Furtmüller, P. G., Traxlmayr, M. W., Obinger, C., Eccles, M. R., & Winterbourn, C. C. (2021). Peroxidase protein expression and enzymatic activity in metastatic melanoma cell lines are associated with invasive potential. *Redox biology*, *46*, 102090.
- Péterfi, Z., Donkó, A., Orient, A., Sum, A., Prókai, A., Molnár, B., Veréb, Z., Rajnavölgyi, E., Kovács, K. J., Müller, V., Szabó, A. J., & Geiszt, M. (2009). Peroxidase is secreted and incorporated

- into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. *The American journal of pathology*, 175(2), 725–735.
- Pfaendler, K. S., Liu, M. C., & Tewari, K. S. (2018). Bevacizumab in Cervical Cancer: 5 Years After. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 24(4), 187–192.
- Pfaffenzeller, M. S., Franciosi, M., & Cardoso, A. M. (2020). Purinergic signaling and tumor microenvironment in cervical Cancer. *Purinergic signalling*, 16(1), 123–135.
- Piera-Velazquez, S., & Jimenez, S. A. (2012). Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5(Suppl 1), S7.
- Piera-Velazquez, S., Mendoza, F. A., & Jimenez, S. A. (2016). Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *Journal of clinical medicine*, 5(4), 45.
- Platel, V., Faure, S., Corre, I., & Clere, N. (2019). Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance. *Journal of oncology*, 2019, 8361945.
- Potentia, S., Zeisberg, E., & Kalluri, R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *British journal of cancer*, 99(9), 1375–1379.
- Praharaj, P. P., Patra, S., Panigrahi, D. P., Patra, S. K., & Bhutia, S. K. (2021). Clusterin as modulator of carcinogenesis: A potential avenue for targeted cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1875(2), 188500.
- Sai, C., Qin, W., Meng, J., Gao, L. N., Huang, L., Zhang, Z., Wang, H., Chen, H., & Yan, C. (2021). Macleayins A From *Macleaya* Promotes Cell Apoptosis Through Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer HeLa Cells. *Frontiers in pharmacology*, 12, 668348.
- Sakamoto, R., Kajihara, I., Miyauchi, H., Maeda-Otsuka, S., Yamada-Kanazawa, S., Sawamura, S., Kanemaru, H., Makino, K., Aoi, J., Makino, T., Fukushima, S., Masuzawa, M., Masuzawa, M., Amoh, Y., Hoshina, D., Abe, R., & Ihn, H. (2020). Inhibition of Endoglin Exerts Antitumor Effects through the Regulation of Non-Smad TGF- β Signaling in Angiosarcoma. *The Journal of investigative dermatology*, 140(10), 2060–2072.e6.
- Sitole, B. N., & Mavri-Damelin, D. (2018). Peroxidasin is regulated by the epithelial-mesenchymal transition master transcription factor Snai1. *Gene*, 646, 195–202.

- Sobierajska, K., Wawro, M. E., & Niewiarowska, J. (2022). Oxidative Stress Enhances the TGF- β 2-RhoA-MRTF-A/B Axis in Cells Entering Endothelial-Mesenchymal Transition. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2062.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- Tian, Y., Wang, C., Chen, S., Liu, J., Fu, Y., & Luo, Y. (2019). Extracellular Hsp90 α and clusterin synergistically promote breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis via LRP1. *Journal of cell science*, 132(15), jcs228213.
- Tindall, A. J., Pownall, M. E., Morris, I. D., & Isaacs, H. V. (2005). *Xenopus tropicalis* peroxidase gene is expressed within the developing neural tube and pronephric kidney. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 232(2), 377–384.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- Tyanova, S., & Cox, J. (2018). Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1711, 133–148.
- Vallejo-Ruiz, V., Velázquez-Márquez, N., Sánchez-Alonso, P., Santos-López, G., & Reyes-Leyva, J. (2015). La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular [Human papillomavirus E7 oncoprotein and its role in the cell transformation]. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53 Suppl 2, S172–S177.
- Wang, S. H., Chang, J. S., Hsiao, J. R., Yen, Y. C., Jiang, S. S., Liu, S. H., Chen, Y. L., Shen, Y. Y., Chang, J. Y., & Chen, Y. W. (2017). Tumour cell-derived WNT5B modulates in vitro lymphangiogenesis via induction of partial endothelial-mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells. *Oncogene*, 36(11), 1503–1515.
- Wang, Z., Han, Z., Tao, J., Wang, J., Liu, X., Zhou, W., Xu, Z., Zhao, C., Wang, Z., Tan, R., & Gu, M. (2017). Role of endothelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in transplant kidney interstitial fibrosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(10), 2359–2369.

- Welch-Reardon, K. M., Wu, N., & Hughes, C. C. (2015). A role for partial endothelial-mesenchymal transitions in angiogenesis?. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(2), 303–308.
- Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*, 7(1), 11–22.
- Xie, Z., Bailey, A., Kuleshov, M. V., Clarke, D., Evangelista, J. E., Jenkins, S. L., Lachmann, A., Wojciechowicz, M. L., Kropiwnicki, E., Jagodnik, K. M., Jeon, M., & Ma'ayan, A. (2021). Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Current protocols*, 1(3), e90.
- Xu, D., Zhu, X., Ren, J., Huang, S., Xiao, Z., Jiang, H., & Tan, Y. (2022). Quantitative proteomic analysis of cervical cancer based on TMT-labeled quantitative proteomics. *Journal of proteomics*, 252, 104453.
- Yan, X., Sabrautzki, S., Horsch, M., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Beckers, J., Hrabě de Angelis, M., & Graw, J. (2014). Peroxidase is essential for eye development in the mouse. *Human molecular genetics*, 23(21), 5597–5614.
- Yang, A., Farmer, E., Lin, J., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2017). The current state of therapeutic and T cell-based vaccines against human papillomaviruses. *Virus research*, 231, 148–165.
- You, X., Sun, W., Wang, Y., Liu, X., Wang, A., Liu, L., Han, S., Sun, Y., Zhang, J., Guo, L., & Zhang, Y. (2021). Cervical cancer-derived exosomal miR-663b promotes angiogenesis by inhibiting vinculin expression in vascular endothelial cells. *Cancer cell international*, 21(1), 684.
- Young, C. D., Zimmerman, L. J., Hoshino, D., Formisano, L., Hanker, A. B., Gatzka, M. L., Morrison, M. M., Moore, P. D., Whitwell, C. A., Dave, B., Stricker, T., Bhola, N. E., Silva, G. O., Patel, P., Brantley-Sieders, D. M., Levin, M., Horiates, M., Palma, N. A., Wang, K., Stephens, P. J., ... Arteaga, C. L. (2015). Activating PIK3CA Mutations Induce an Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Paracrine Signaling Axis in Basal-like Breast Cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 14(7), 1959–1976.
- Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer research*, 67(21), 10123–10128.
- Zhang, H., Liu, Y., Yan, L., Du, W., Zhang, X., Zhang, M., Chen, H., Zhang, Y., Zhou, J., Sun, H., & Zhu, D. (2018). Bone morphogenetic protein-7 inhibits endothelial-mesenchymal transition in

pulmonary artery endothelial cell under hypoxia. *Journal of cellular physiology*, 233(5), 4077–4090.

Zhang, Y., Lv, X., Chen, L., & Liu, Y. (2022). The role and function of CLU in cancer biology and therapy. *Clinical and experimental medicine*, 10.1007/s10238-022-00885-2. Advance online publication.

Zheng, Y. Z., & Liang, L. (2018). High expression of PXDN is associated with poor prognosis and promotes proliferation, invasion as well as migration in ovarian cancer. *Annals of diagnostic pathology*, 34, 161–165.

Zhong, A., Mirzaei, Z., & Simmons, C. A. (2018). The Roles of Matrix Stiffness and β -Catenin Signaling in Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Aortic Valve Endothelial Cells. *Cardiovascular engineering and technology*, 9(2), 158–167.

Zhou, S., Yang, J., Wang, M., Zheng, D., & Liu, Y. (2020). Endoplasmic reticulum stress regulates epithelial-mesenchymal transition in human lens epithelial cells. *Molecular medicine reports*, 21(1), 173–180.