



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel de CD43 en la secreción de factores que modulan el microambiente tumoral en cáncer de pulmón

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

DANIELA VEGA MENDOZA

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay
(Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México)

MIEMBROS DEL COMITE TUTOR:

Dr. Sergio Encarnación Guevara
(Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México)

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
(Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México)

Ciudad de México, Octubre de 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DE EXAMEN

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

(Presidente)

Dr. Gustavo Pedraza Alva

(Secretario)

Dra. Marcela Lizano Soberón

(Vocal)

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá

(Vocal)

Dr. Enrique Salas Vidal

(Vocal)

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Morelos.

Para su realización, el proyecto contó con fondos provenientes de los proyectos:

DGAPA-UNAM (PAPIIT): IN212716 y IN212519.

CONACYT: 220990 y A1-S-15601.

Asimismo, conté con una beca CONACYT (Núm. Becario: 366442), así también, gocé de un apoyo de “Ayudante de Investigador Nacional SNI III” y recibí el apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)” para la asistencia a cursos y congresos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yvonne Rosenstein por recibirme en su laboratorio, por sus enseñanzas y apoyo.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Sergio Encarnación y Dr. Alejandro Zentella por sus sugerencias y consejos durante el doctorado.

A los integrantes del jurado de examen: Dr. Mario Enrique Zurita Ortega, Dr. Gustavo Pedraza Alva, Dra. Marcela Lizano Soberón, Dr. Alejandro Manuel García Carrancá y Dr. Enrique Salas Vidal, por sus revisiones, recomendaciones y sugerencias hechas al trabajo.

A la M. en C. Erika Melchy y al Dr. Ángel Flores por su apoyo técnico para la realización de los experimentos que permitieron la culminación del trabajo, y por su amistad.

A la M. en C. Alicia Cañas por su apoyo en la realización de experimentos que permitieron validar los resultados del ensayo proteómico, y por su amistad.

A la Dra. Rosario Vera por su apoyo en las técnicas de proteómica y el análisis de los datos, también por sus amenas pláticas y consejos.

A todos los miembros del laboratorio YR: Monse, Álvaro, Roberto, Mali, Brenda, Pablo, Steph, Nacho, Víctor, Ismael, Constance, Sara, Den, Vero, Alan, Ivan, Eli y Erick por sus sugerencias, consejos y críticas en cada seminario, y por su amistad.

A la unidad de docencia del IBT por todo su apoyo durante mis estudios de posgrado, y en especial al Lic. Antonio Bolaños por su excelente disposición siempre.

A mi mamá por estar y apoyarme siempre, y a mi papá que aun cuando no está físicamente, siempre será mi inspiración para ser mejor.

A Edson por apoyarme e impulsarme a seguir adelante y a Emilia por darme la fuerza de seguir adelante.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
I.- INTRODUCCIÓN	
1.1 Cáncer	12
1.2 Cáncer de pulmón.....	13
1.3 Microambiente tumoral.....	16
1.3.1 Secretoma	19
1.3.2 Matriz extracelular.....	20
1.4 Angiogénesis.....	23
1.5 Mucinas y cáncer	25
1.5.1 CD43 en el cáncer	28
II. HIPÓTESIS	34
III. OBJETIVOS.....	36
IV. RESULTADOS.....	37
4.1 Resumen general de los resultados obtenidos en este trabajo.....	38
4.2 Resultados publicados	44
4.3 Resultados no publicados	65
V. DISCUSIÓN.....	71
VI. CONCLUSIONES	81
VII. PERSPECTIVAS	83
VIII.REFERENCIAS.....	85
IX. ANEXOS.....	100
<i>Anexo 1. Materiales y Métodos</i>	101

<i>Anexo 2. Proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma de células A549 pSuper y CD43 RNAi</i>	<i>113</i>
<i>Anexo 3. Proteínas expresadas exclusivamente en el secretoma de células A549 pSuper o CD43 RNAi</i>	<i>117</i>
<i>Anexo 4. Proteínas identificadas en el secretoma de células A549 pSuper y CD43 RNAi.....</i>	<i>119</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales mutaciones conductoras del proceso tumoral en el NSCLC	15
Figura 2. Componentes del microambiente tumoral.....	17
Figura 3. El secretoma del cáncer y su contribución a las alteraciones fisiológicas encontradas en el cáncer	20
Figura 4. Composición de la ECM	21
Figura 5. Cambios patológicos ocurridos en la ECM en el cáncer de pulmón.....	23
Figura 6. Etapas de la angiogénesis tumoral	24
Figura 7. Vías de señalización de mucinas en el cáncer de pulmón	27
Figura 8. Estructura de la molécula CD43.....	29
Figura 9. CD43 y su participación en vías de señalización en el cáncer.....	32
Figura 10. CD43 participa en la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis en el cáncer de pulmón a través del secretoma.....	43
Figura 11. Vías de activación del sistema del complemento.....	66
Figura 12. Papel pro-tumoral del sistema del complemento en el microambiente tumoral	67
Figura 13. La expresión de CD43 modula la activación del complemento en células A549.....	70

ABREVIATURAS

NSCLC	Non-small cell lung cancer
TME	Tumor microenvironment
ECM	Extracellular matrix
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
NF- κ B	Nuclear factor κ B
PDGF-D	Platelet derived growth factor-D
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9
VEGF	Vascular endothelial growth factor
MAC	Membrane attack complex

RESUMEN

CD43 es una glicoproteína expresada en células del sistema inmunológico y en tumores malignos no hematopoyéticos de pulmón, cervix, colon y mama, donde su expresión correlaciona con un pobre pronóstico. Se sabe que las señales de CD43 incrementan la motilidad, el crecimiento independiente de anclaje, el crecimiento de tumores *in vivo* y protegen a las células tumorales de la apoptosis y la lisis mediada por células NK. En este trabajo nos enfocamos en evaluar la participación de CD43 en la secreción de moléculas que promueven la capacidad tumorigénica de células A549 mediante técnicas de proteómica. Para esto, se analizó el secretoma de células A549 con niveles endógenos y disminuidos de expresión de CD43, obtenidas mediante la técnica del RNAi de interferencia. El análisis proteómico reveló que las células que expresan los niveles endógenos de CD43 liberan significativamente mayor cantidad de moléculas involucradas en la organización de la matriz extracelular, la angiogénesis, la degranulación de plaquetas, la degradación de colágena, la inflamación y la inhibición del sistema del complemento, que las células con los niveles reducidos de la molécula. Además, demostramos que la expresión de CD43 modula la capacidad angiogénica y la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en células A549. Nuestros datos revelaron un nuevo papel de CD43 en el desarrollo del cáncer de pulmón, principalmente en la remodelación del microambiente tumoral.

ABSTRACT

CD43 is a glycoprotein expressed in cells of the immune system and in non-hematopoietic malignant tumors of the lung, cervix, colon and breast, where its expression correlates with a poor prognosis. CD43 signals are known to increase motility, anchor independent growth, tumor growth *in vivo*, and protect tumor cells from apoptosis and NK cell-mediated lysis. In this work we focus on evaluating the participation of CD43 in the secretion of molecules that promote the tumorigenic capacity of A549 cells through proteomic techniques. For this, the secretome of A549 cells with endogenous and decreased levels of CD43 expression, obtained by the interference RNAi technique, was analyzed. Proteomic analysis revealed that cells expressing endogenous levels of CD43 release significantly more molecules involved in the organization of the extracellular matrix, angiogenesis, platelet degranulation, collagen degradation, inflammation, and inhibition of the complement system, than cells with reduced levels of the molecule. We further demonstrate that the expression of CD43 modulates the angiogenic capacity and activity of the metalloproteases MMP-2 and MMP-9 cells in A549. Our data revealed a new role for CD43 in the development of lung cancer, mainly in the remodeling of the tumor microenvironment.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, con un estimado de 9.9 millones de muertes (es decir, una de cada seis muertes es causada por cáncer), y un estimado de 19.3 millones de nuevos casos por año (OMS, 2020). Se estima que la carga global por cáncer será de 28.4 millones de casos para el 2040, es decir, un incremento del 47% respecto a los casos del 2020 (Sung et al., 2021). Para el 2040 se proyecta un incremento del 71% en las muertes por cáncer respecto a las cifras del 2018, de 9.6 millones a 16.4 millones (NIH, 2020).

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado con un estimado de 2.3 millones de nuevos casos (11.7%), seguido del cáncer de pulmón (11.4%), colorrectal (10%), próstata (7.3%) y de estómago (5.6%) por año. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer, con un estimado de 1.8 millones de decesos (18%), seguido del colorrectal (9.4%), hígado (8.3%), estómago (7.7%) y de mama (6.9%) (Padilla-Raygoza et al., 2020). En México, se diagnostican cerca de 191,000 casos de cáncer al año de los cuales 84,000 fallecen. De acuerdo a estas cifras, el cáncer es considerado la tercera causa de muerte a nivel nacional. Las estadísticas indican que las defunciones relacionadas a cáncer han aumentado en los últimos años en nuestro país, por lo cual se debe poner énfasis en la prevención y la detección temprana (INCAN, 2018), ya que tristemente la mayor parte de los casos son detectados en etapas tardías cuando las posibilidades de sobrevivir disminuyen drásticamente.

El cáncer se define como un grupo de enfermedades en las cuales las células se dividen sin control, destruyendo los tejidos adyacentes y son capaces de invadir otros tejidos del cuerpo a través de la sangre y la linfa. Las causas del cáncer son múltiples, entre ellas se encuentran factores genéticos (adquiridos y hereditarios) y causas ambientales. Dentro de los factores ambientales se encuentran el tabaco, la exposición excesiva a la luz ultravioleta, la dieta, el consumo de alcohol, condiciones inflamatorias crónicas, entre otras (Ames et al., 1995). Se estima que aproximadamente entre el 30 y 50% de los cánceres pueden ser prevenibles modificando factores de riesgo, tales como reducir el consumo de tabaco, alcohol, mantener un peso saludable, incrementar la actividad física y evitar factores de riesgo relacionados a infecciones como hepatitis, papiloma virus, entre otros (Padilla-Raygoza et al., 2020). Las mutaciones en genes que alteran la función celular, especialmente en genes claves del ciclo celular, se asocian frecuentemente a la adquisición de un fenotipo canceroso. Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar mayormente tres tipos principales de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del DNA (National Cancer Institute, 2007). Los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores son los responsables de controlar la división y el crecimiento celular. Al sufrir

alteraciones, permiten que las células se dividan sin control. Las mutaciones en los genes reparadores del DNA provocan que las células pierdan la capacidad de reparar el DNA dañado. En conjunto, estas mutaciones contribuyen a la carcinogénesis (Hassanpour & Dehghani, 2017).

Se ha propuesto que el amplio número de genotipos en el cáncer es una manifestación de alteraciones esenciales en la fisiología celular, las cuales colectivamente conllevan al crecimiento maligno y son: evasión de los mecanismos de supresión del crecimiento, señales de proliferación sostenidas, resistencia a la muerte celular, inducción de angiogénesis, capacidad de inmortalización, reprogramación del metabolismo energético, evasión de las células tumorales a la destrucción por parte del sistema inmunológico, inestabilidad genética, promoción de un ambiente inflamatorio, activación de la invasión y la metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Cáncer de pulmón

A pesar de los avances significativos logrados en las últimas décadas, el cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer debido a su alta incidencia y recurrencia, ya que solo el 5-16% de los pacientes logra sobrevivir 5 años (*Cancer of the Lung and Bronchus - Cancer Stat Facts*, 2020). En México, por su frecuencia, el cáncer de pulmón se ubica en el séptimo lugar, sin embargo, por ser el tumor más letal, se ubica como la primera causa de muerte por cáncer. Cada año fallecen cerca de ocho mil mexicanos por esta neoplasia y se registran nueve mil casos nuevos anualmente (INCAN, 2018). De una manera general, el diagnóstico temprano sigue siendo un gran reto, ya que solo el 10% de los casos son detectados en etapas iniciales, con un buen pronóstico, a diferencia del 90% de los casos detectados en etapas avanzadas, y para los cuales las opciones de tratamiento son casi nulas (Barrón-Barrón & Guzmán-De Alba, 2019).

El cáncer de pulmón se forma en los tejidos pulmonares, por lo general en las células que recubren el epitelio respiratorio (National Cancer Institute, 2020). Con base en sus características histológicas el cáncer de pulmón se clasifica en carcinoma de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés). Este último incluye a los adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. Aproximadamente el 85-90% de todos los casos de cáncer de pulmón se clasifican como NSCLC (Keith & Miller, 2013).

Los tumores de pulmón se caracterizan por su alto grado de heterogeneidad, causado en parte por las diferentes condiciones de acidez, oxígeno y concentraciones de factores de crecimiento que, en conjunto, ejercen una presión selectiva que favorece la

selección y supervivencia de clones tumorales más agresivos (Graves et al., 2010; Zito Marino et al., 2019). A la heterogeneidad de las células epiteliales tumorales se suman la de la vasculatura, de los fibroblastos asociados a tumor (CAFs, por sus siglas en inglés), de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), y las células inmunes infiltrantes (Altorki et al., 2019). A pesar de los avances en el tratamiento, el cáncer de pulmón tiene la notable capacidad de reaparecer, lo que sugiere que la enfermedad residual mínima contiene una población celular que resiste a los distintos regímenes de tratamientos y que preserva su capacidad de crecer. Esta capacidad de autorrenovación y regeneración es una función biológica propia de células progenitoras somáticas normales, por lo que esta población celular particular dentro de los tumores se denomina "células madre tumorales" (CSC, del inglés *Cancer Stem Cells*) (Alamgeer et al., 2013). Así, el cáncer de pulmón es también una enfermedad heterogénea formada por subpoblaciones de células o clones con características morfológicas, mutaciones, y perfiles transcriptómicos distintos, lo cual agrega un nivel adicional a la complejidad a nivel de tratamiento y pronóstico de los pacientes (Herbst et al., 2018).

Estudios genéticos han revelado que, al igual que otros cánceres, los distintos subtipos de cáncer de pulmón presentan anomalías genéticas y/o moleculares llamadas "alteraciones genéticas conductoras del proceso tumoral", que incluyen amplificación de genes, mutaciones o translocaciones que causan la activación aberrante de vías de señalización involucradas en el crecimiento celular y diferenciación, llevando a una proliferación descontrolada, resistencia a la apoptosis y metástasis (Ruiz-Cordero & Devine, 2020). Entre las alteraciones genéticas conductoras del proceso tumoral más frecuentes en el cáncer de pulmón se encuentran: mutaciones/alteraciones en el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, por sus siglas en inglés), rearrreglos en el gen de la cinasa de linfoma anaplásico (ALK, por sus siglas en inglés), rearrreglos en el receptor tirosina cinasa de la familia de receptores de insulina (ROS1, por sus siglas en inglés), mutaciones en KRAS (del inglés *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*) y mutaciones en la proteína supresora de tumores p53 (Griffin & Ramirez, 2017). Otras mutaciones menos frecuentes son: amplificaciones, sobreexpresión aberrante y/o mutaciones activadoras en los genes MET, RET, HER2 y BRAF (Hirsch et al., 2017) (Figura 1).

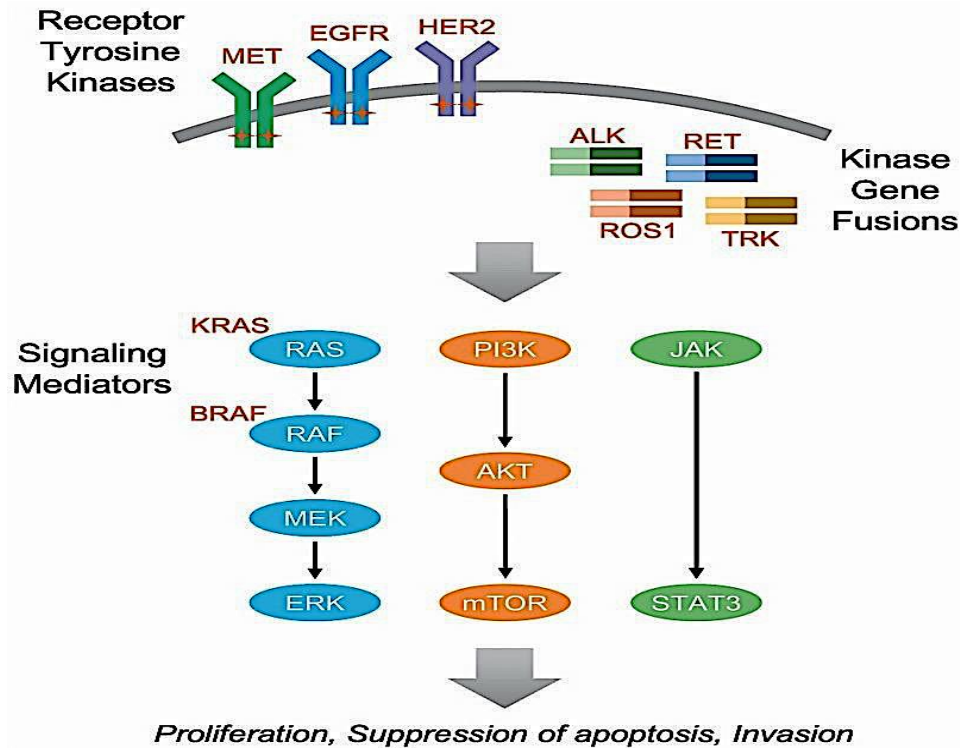


Figura 1. Principales mutaciones conductoras del proceso tumoral en el NSCLC. Las alteraciones genéticas en las vías de señalización de RAS, PI3K y STAT3 inducen genes que en células normales son altamente controladas, pero que en células tumorales conducen a la activación constitutiva de señales de crecimiento y supervivencia. Consecuentemente, los tumores se vuelven “adictos” a estas vías de señalización hiperactiva. Inhibir estas señales puede llevar a suprimir el crecimiento tumoral y la apoptosis, identificándose así potenciales blancos terapéuticos. Tomado de (Yoda et al., 2019).

El descubrimiento de mutaciones en genes conductores del cáncer de pulmón ha conducido al desarrollo de terapias dirigidas, las cuales se basan en el uso de fármacos que inhiben las señales de crecimiento y supervivencia inducidas por las mutaciones en moléculas que controlan vías de señalización involucradas en proliferación y resistencia a apoptosis. Actualmente, en la práctica clínica los tumores que poseen alteraciones en EGFR, ALK y ROS1 pueden ser tratados con inhibidores de tirosina cinasa como erlotinib y gefitinib (inhibidores del EGFR) y crizotinib (inhibidor del receptor tirosina cinasa MET), entre otros (Götte & Kovalszky, 2018). Así mismo, se ha aprobado el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a inhibir la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), con el fin de abatir el crecimiento de vasos sanguíneos y así la progresión del tumor. Desafortunadamente, no todos los cánceres de pulmón presentan estas alteraciones genéticas, y no pueden ser tratados con terapias dirigidas, o terapias mixtas, por lo se

requiere generar más información acerca de los mecanismos que utilizan las células tumorales para el éxito del proceso canceroso, con la finalidad de identificar nuevos blancos terapéuticos.

La intensa investigación que se realiza en esta área ha puesto en evidencia que el inicio y la progresión del cáncer de pulmón no dependen únicamente de los cambios genéticos y moleculares que ocurren en las células tumorales, sino también de la relación estrecha que se establece entre el tumor y el sistema inmunológico, relación en la que el sistema inmunológico, que normalmente debería de buscar eliminar a las células tumorales, acaba siendo domado por el tumor, trabajando a favor de este. Entender esta compleja relación ha llevado al desarrollo de inmunoterapias cuya meta es activar nuevamente a las células del sistema inmunológico para que ejerzan sus funciones efectoras, particularmente la muerte de las células tumorales. Las inmunoterapias que existen actualmente se enfocan en moléculas que buscan estimular la activación de las células linfoides. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas reguladoras negativas de la activación de linfocitos T como el receptor PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) y a su ligando PD-L1 (atezolizumab, durvalumab, avelumab), lo cual ha demostrado mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón (Hirsch et al., 2017). Como PD-L1, CTLA-4 es otra proteína de la superficie de los linfocitos que, al reconocer a sus ligandos CD80 y CD86 en la superficie de las células tumorales genera señales que regulan negativamente la activación de los linfocitos T, por lo que también se han desarrollado anticuerpos monoclonales que en la clínica se administran para evitar esa regulación negativa de los mecanismos de activación. Se ha reportado que la expresión de PD-L1 correlaciona con el grado de malignidad en el NSCLC (Pawelczyk et al., 2019), también se ha documentado la expresión de las moléculas CD80 y CD86 en líneas celulares de NSCLC (Wroblewski et al., 2001).

Además de las terapias dirigidas y de la inmunoterapia, el tratamiento del cáncer de pulmón incluye cirugía, ablación por radiofrecuencia, radioterapia, quimioterapia y procedimientos paliativos (American Cancer Society, 2020).

1.3 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) se ha identificado como un elemento importante en la progresión tumoral (F. Chen et al., 2015). Debido al impacto directo que tiene el TME sobre el pronóstico y el tratamiento del cáncer, su estudio ha cobrado gran importancia en los últimos años. El TME es una compleja y dinámica red compuesta por células tumorales, vasos sanguíneos circundantes, sistema linfático, fibroblastos, matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés), células no malignas

(células estromales, fibroblastos, miofibroblastos, células neuroendocrinas, adipocitos, pericitos), células de la respuesta inmune innata y adaptativa (linfocitos T, linfocitos B, células NK y células T NK, macrófagos asociados a tumor, entre otras) y el conjunto de moléculas que cada una de estas poblaciones celulares secretan en respuesta a las intrincadas interacciones celulares y moleculares que se establecen (F. Chen et al., 2015; Hui & Chen, 2015; Weber & Kuo, 2012) (Figura 2). Dentro del TME, las células tumorales reclutan a todas estas células y, mediante señales paracrin, se encargan de educarlas o reprogramarlas para que promuevan la carcinogénesis, contribuyendo a la inflamación, inmunosupresión, resistencia a las terapias y a la metástasis (Mittal et al., 2016).

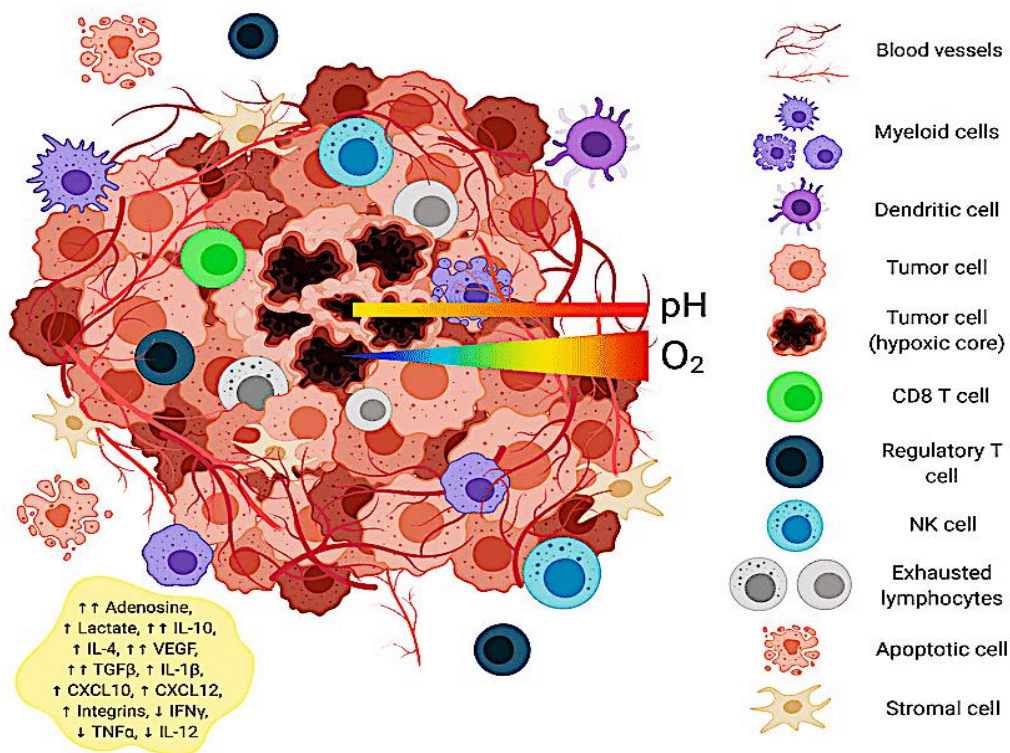


Figura 2. Componentes del microambiente tumoral. El TME está formado por las células tumorales, células estromales que incluyen fibroblastos y una variedad de células inmunes que residen dentro de una abundante ECM, y por una vasculatura desorganizada, todos estos elementos se comunican mediante un conjunto de factores solubles. El TME se caracteriza por ser pobremente irrigado y densamente poblado, lo que provoca zonas de hipoxia, de acidez y bajas de nutrientes, lo que a su vez favorece los procesos de angiogénesis y metástasis. Tomado de (Piñeiro Fernández et al., 2019).

Las células epiteliales tumorales se caracterizan por presentar una gran cantidad de aberraciones genómicas que incluyen aneuploidías, rearrreglos, ganancia en el número de copias y amplificaciones, la cuales confieren una gran plasticidad para que las células tumorales se adapten a un microambiente cambiante (Zito Marino et al., 2019).

Los fibroblastos son las células predominantes del estroma en el cáncer de pulmón. Son reprogramados o reeducados por las células tumorales para adquirir un fenotipo protumoral. Los llamados fibroblastos asociados a tumor secretan una gran cantidad de factores de crecimiento y citocinas protumorales, son los principales productores de ECM y también están implicados en su degradación favoreciendo procesos de invasión (Wang et al., 2017). Además, promueven proliferación celular, angiogénesis, invasión, metástasis y resistencia a fármacos, y modulan las respuestas inmunes dentro del TME (Altorki et al., 2019).

Por la gran cantidad de fibroblastos que contienen, los tumores de pulmón se rodean de grandes cantidades de ECM, rica en fibronectina, laminina, colágena tipo IV y tenascina-C. También se ha reportado un aumento en el grado de entrecruzamiento de las colágenas, suceso que favorece la rigidez del tejido e induce procesos de invasión y metástasis (Burgstaller et al., 2017). Las grandes cantidades de ECM, la rigidez que aporta y su composición molecular se han asociado a una resistencia a la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos y a una menor supervivencia de los pacientes (Henke et al., 2019).

Dentro del TME se secretan una gran variedad de factores solubles. Las quimiocinas y citocinas forman parte de este grupo de moléculas. Reclutan y activan diversas células de la respuesta inmunológica, las cuales son educadas para favorecer el proceso tumoral, evadiendo e inhibiendo los mecanismos de destrucción propios del sistema inmune y promoviendo el establecimiento de un estado de inflamación (Yuan et al., 2016). Los macrófagos representan las células predominantes inflamatorias del TME, donde se polarizan hacia un fenotipo asociado a tumor caracterizado por tener poca capacidad fagocítica, por facilitar el crecimiento tumoral mediante la secreción de proteasas como MMP-2, MMP-9, y de factores promotores del proceso tumoral como la ciclooxygenasa 2 (COX2), PDGF-B (del inglés, *Platelet Derived Growth Factor-B*), VEGF-A (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor-A*), HGF (del inglés, *Hepatocyte Growth Factor*), activador de plasminógeno tipo uroquinasa, entre otros (Mittal et al., 2016; Wood et al., 2014). Algunos de estos factores solubles se han utilizado como biomarcadores para el diagnóstico temprano y pronóstico, y como blancos terapéuticos (I & Cho, 2015; Skerenova et al., 2017).

1.3.1 Secretoma

Cada tipo celular tiene una firma de proteínas secretadas, la cual puede cambiar en respuesta a diversas condiciones patológicas como el cáncer. Las células cancerosas exhiben un secretoma alterado en comparación con sus contrapartes normales, por lo cual el secretoma representa una fuente de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y de posibles blancos terapéuticos (Capece et al., 2018). Así mismo, el estudio del secretoma tumoral ha permitido entender la comunicación bidireccional entre las células tumorales y el estroma, y descifrar mejor los procesos biológicos que participan en la iniciación y la progresión tumoral. En particular, el estudio del secretoma de tumores de pulmón ha llevado a la identificación de elementos clave en la comunicación entre las células tumorales y el microambiente tumoral, evidenciando la intrincada red de procesos biológicos que participan en el cáncer (Schaaij-Visser et al., 2013).

A través del secretoma, las células tumorales modifican su entorno para generar un microambiente favorable para su progresión: reclutan y educan a las células estromales para que adquieran un fenotipo protumoral, y con esto garantizar el éxito del proceso canceroso (da Cunha et al., 2019). Las proteínas de matriz extracelular, las peptidasas y las proteínas de adhesión secretadas por las células tumorales y las demás células del TME son esenciales para los procesos de metástasis del cáncer de pulmón. Diversas proteínas formadoras y remodeladoras de la ECM se han encontrado alteradas en los secretomas de líneas celulares de cáncer de pulmón, relacionándose directamente con procesos de angiogénesis y metástasis (Mossina et al., 2017).

El secretoma del tumor está formado por citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores inflamatorios, moléculas de adhesión, receptores escindidos, proteínas de la ECM y sus reguladores, y otras moléculas de señalización necesarias para que se lleven a cabo las interacciones entre las células malignas y no malignas dentro del TME (Lin et al., 2013). Además, existen componentes no proteicos en el secretoma, como son lípidos, microRNAs, RNAs mensajeros y DNA que son secretados de manera aislada o en cuerpos vesiculares (Karagiannis et al., 2010; Lin et al., 2013).

En conjunto, el secretoma contribuye a cada una de las características adquiridas por las células tumorales: proliferación sostenida, insensibilidad a las señales de anticrecimiento, desregulación del metabolismo energético, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, evasión de la respuesta inmune, angiogénesis y metástasis (Paltridge et al., 2013) (Figura 3). En particular el secretoma de los tumores de NSCLC se caracteriza por ser inmunosupresor y promotor de la cicatrización de heridas y la fibrosis, siendo particularmente abundantes las citocinas MIP1 β ,

CCL22/MDC, CX3CL1/fractalkine, IFN α 2, IFN γ , VEGF, IL-1 α y FGF2 (Donnenberg et al., 2019), así como proteínas de la matriz extracelular (Mossina et al., 2017)

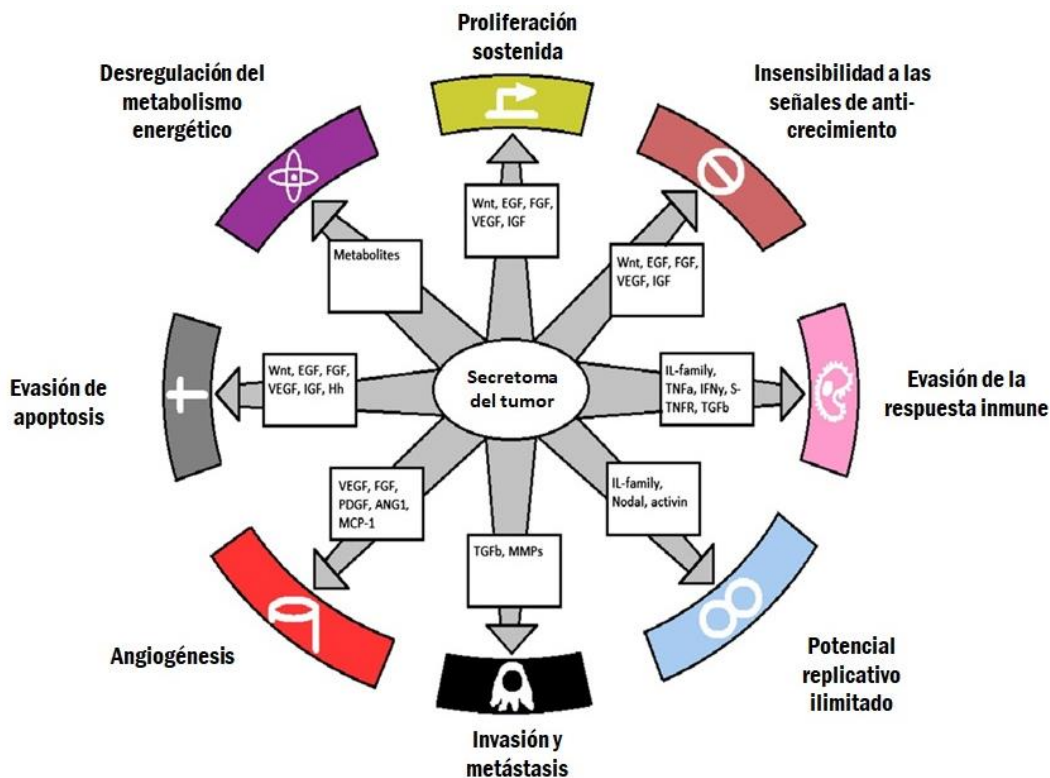


Figura 3. El secretoma del cáncer y su contribución a las alteraciones fisiológicas encontradas en el cáncer. El diagrama muestra algunos de los factores solubles encontrados en el secretoma del cáncer que contribuyen a cada una de las alteraciones fisiológicas adquiridas por las células tumorales. Tomado de (Paltridge et al., 2013).

1.3.2 Matriz extracelular

La matriz extracelular es el principal componente del TME. En los pulmones, la ECM define la arquitectura tisular, y promueve la estabilidad mecánica y elástica necesaria para las funciones fisiológicas del pulmón. Las señales biomecánicas y bioquímicas que se originan a partir de la ECM inciden directamente sobre las funciones de las diversas estirpes celulares del pulmón, por lo que el papel de la ECM en las funciones normales o patológicas del pulmón es preponderante (Burgstaller et al., 2017).

La ECM está compuesta por dos clases principales de macromoléculas: proteoglicanos y proteínas fibrosas. Las principales proteínas fibrosas son: colágenas, elastinas,

fibronectinas y lamininas. Las colágenas son las proteínas fibrosas más abundantes de la ECM, y contribuyen de manera importante al mantenimiento de la integridad estructural del organismo. La fibronectina contiene múltiples sitios de unión para otras proteínas de la ECM, incluyendo las colágenas y la fibrina, por lo que juega un papel importante en la organización de los componentes de la ECM (Miner, 2010). Las lamininas, junto con la fibronectina, funcionan como puentes entre las moléculas estructurales de la ECM, para reforzar y conectar con las células y con moléculas solubles del espacio extracelular (Mouw et al., 2014). Los proteoglicanos son un grupo heterogéneo de moléculas que por su gran hidrofiliidad forman un gel que rellena los espacios intersticiales de los tejidos y proveen hidratación y resistencia compresiva a la ECM (Bosman & Stamenkovic, 2003; Frantz et al., 2010; Theocharis et al., 2016) (Figura 4).

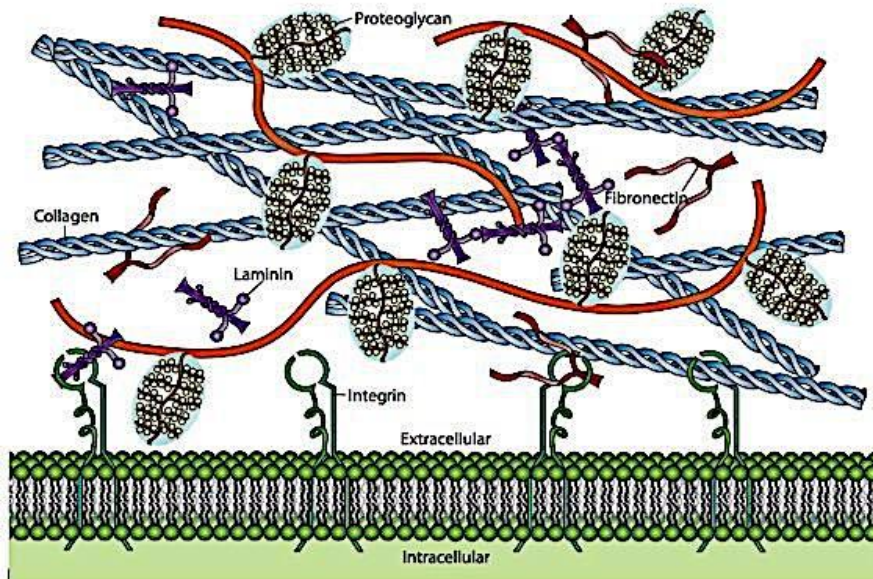


Figura 4. Composición de la ECM. Una ECM típica está compuesta por colágenas, proteoglicanos, fibronectina y laminina. Las integrinas presentes en las membranas de las células permiten la interacción con las diferentes proteínas de la ECM. Tomado de <https://bio.libretexts.org/@go/page/16170>

La ECM funciona como un reservorio que distribuye factores de crecimiento y citocinas necesarias para la proliferación y diferenciación celular, o, al contrario, que restringe la disponibilidad de los mismos. Como resultado de la proteólisis de la ECM, esos factores se liberan al medio circundante. Unidos a un sustrato, estos factores pueden tener una actividad diferente de la que tienen en su forma soluble. Así mismo, la disponibilidad de estos factores permite formar gradientes que promueven y dirigen la

migración celular, o que, como una huella de la actividad celular anterior, moldean el comportamiento de las células circundantes. Una proporción importante de estos factores de crecimiento y citocinas promueven la adhesión y el crecimiento celular generando señales locales que contribuyen a modificar la arquitectura tisular (Bonnans et al., 2014; Yue, 2014). La degradación de la ECM es un evento fundamental en la remodelación tisular, un proceso en el que las proteasas dependientes de zinc juegan un papel decisivo (Nagase et al., 2006).

Para cumplir con sus funciones, la ECM experimenta constantes cambios en respuesta a las múltiples señales proporcionadas durante procesos como el desarrollo, la inflamación, la cicatrización de heridas, y procesos patológicos como el cáncer (Stamenkovic, 2003). La remodelación de la ECM involucra cambios cuantitativos y cualitativos, producto de la actividad de enzimas específicas responsables de la degradación de la ECM, entre las que se encuentran: metaloproteinasas de matriz (MMPs), adamalisin (ADAMs), meprin, entre otras (Bonnans et al., 2014). Las MMPs son una familia de más de 20 miembros de endopeptidasas dependientes de zinc, las cuales colectivamente degradan varios de los componentes de la ECM. Las MMPs son importantes tanto en procesos fisiológicos (embriogénesis, remodelación de tejidos, cicatrización de heridas y angiogénesis) como patológicos (artritis, cáncer, ulceración de tejidos, entre otros) (Yadav et al., 2014). Estas enzimas han recibido gran atención porque se encargan de regular los procesos de invasión tumoral y metástasis, así como la proliferación, diferenciación y muerte celular (Conlon & Murray, 2019). En diversos tipos de cánceres se ha reportado una alta expresión de algunas MMPs, lo cual está asociado a las distintas etapas del proceso tumoral, tales como la invasión, la transición epitelio-mesénquima, la metástasis y la angiogénesis (Merdad et al., 2014).

La alteración en la composición, estructura, rigidez y abundancia de la ECM contribuye a diversas condiciones patológicas, entre ellas el cáncer (Bonnans et al., 2014). Las células tumorales son capaces de secretar componentes y enzimas remodeladoras de la ECM hacia el espacio extracelular, construyendo un microambiente tumoral permisivo para el crecimiento (Eble & Niland, 2019). Los tumores se encuentran rodeados de cantidades importantes de diferentes tipos de colágenas en distintas proporciones. Esto aumenta la rigidez de los tejidos, y favorece procesos de angiogénesis, transición epitelio-mesénquima, metástasis, e impide la penetración de fármacos al sitio tumoral y el ataque por parte del sistema inmunológico, entre otros (Najafi et al., 2019; S. Xu et al., 2019). El aumento en la degradación y recambio de los componentes de la ECM es otra de las características encontradas en los tumores de pulmón. En este tipo de tumores las MMPs presentan una alta actividad, degradando colágenas y lamininas de las membranas basales impactando en procesos de invasión y angiogénesis. Se ha asociado la expresión de la proteasa ADAM8 y de la MMP-2, MMP-9 y MMP-1 como marcadores de estadio avanzado en cáncer de pulmón (Götte &

Kovalszky, 2018). Los proteoglicanos de heparán sulfato también se encuentran sobre-expresados en los tumores, potenciando los efectos oncogénicos de diversas vías de señalización de factores de crecimiento (Lu et al., 2012) (Figura 5).

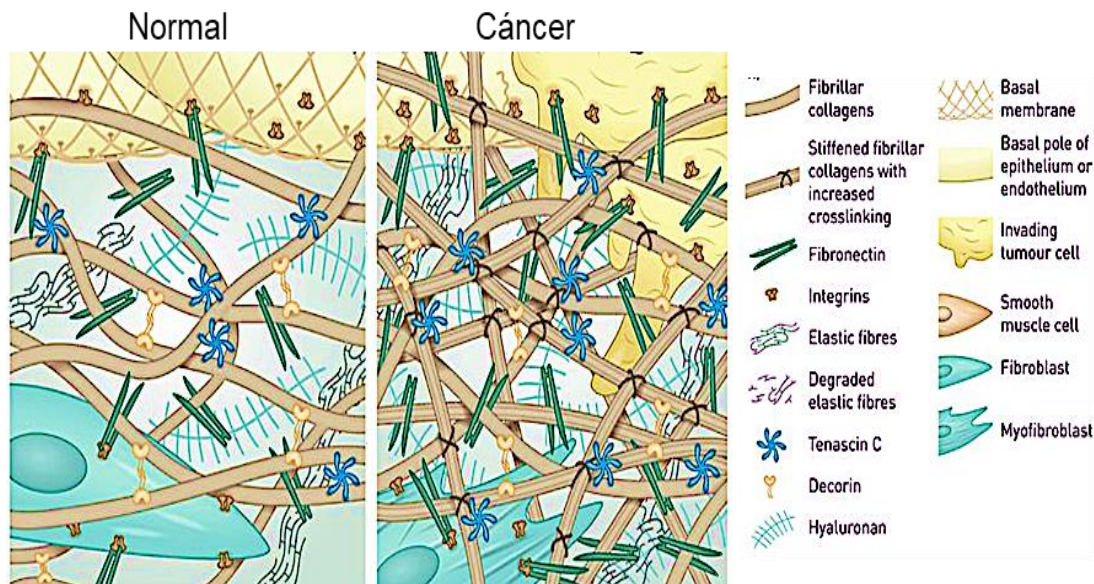


Figura 5. Cambios patológicos ocurridos en la ECM en el cáncer de pulmón. La ECM se mantiene sana gracias a la acción de los fibroblastos residentes, la colágena, la elastina y la fibronectina anclada a la membrana basal. Los tumores de cáncer de pulmón experimentan cambios cualitativos y cuantitativos a nivel de la ECM, rodeándose de áreas extensas y rígidas de estroma que se compone de colágena altamente entrecruzada, altos niveles de fibronectina, tenascina C y hialuronano. Modificado de (Burgstaller et al., 2017).

1.4 Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso que lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis tiene un papel central en procesos fisiológicos (desarrollo fetal, procesos de reparación de heridas, ciclo menstrual), y en procesos patológicos (enfermedades isquémicas e inflamatorias, cáncer) (Yoo & Kwon, 2013) dentro del cuerpo humano.

Con el fin de establecer un flujo sanguíneo que les permita suplir sus necesidades de oxígeno, nutrientes y otras funciones metabólicas, y así alcanzar una masa crítica para invadir órganos distantes, los tumores son capaces de inducir la angiogénesis (Carmeliet & Jain, 2000; De Palma et al., 2017). La angiogénesis tumoral comienza cuando las células tumorales secretan mayor cantidad de factores estimulantes que inhibitorios de la angiogénesis, lo cual da lugar a una vasculatura que se caracteriza

por ser desorganizada, inmadura y permeable, resultando en tumores poco irrigados con regiones hipóxicas que favorecen la resistencia a diversos fármacos (Yadav, 2015).

Las distintas etapas de la angiogénesis involucran interacciones entre las células, los factores solubles y los componentes de la ECM. Las etapas son: 1) activación de las células endoteliales por un estímulo angiogénico; 2) degradación de la membrana basal por medio de proteasas; 3) migración de células endoteliales dentro del espacio intersticial; 4) proliferación de células endoteliales y su migración hacia el ápice del nuevo capilar; 5) formación del lumen, generación de nueva membrana basal mediante el reclutamiento de pericitos, anastomosis (unión de vasos sanguíneos de pequeño calibre a uno de mayor grosor o diámetro), y 6) el establecimiento del flujo sanguíneo (Gupta, 2003) (Figura 6).

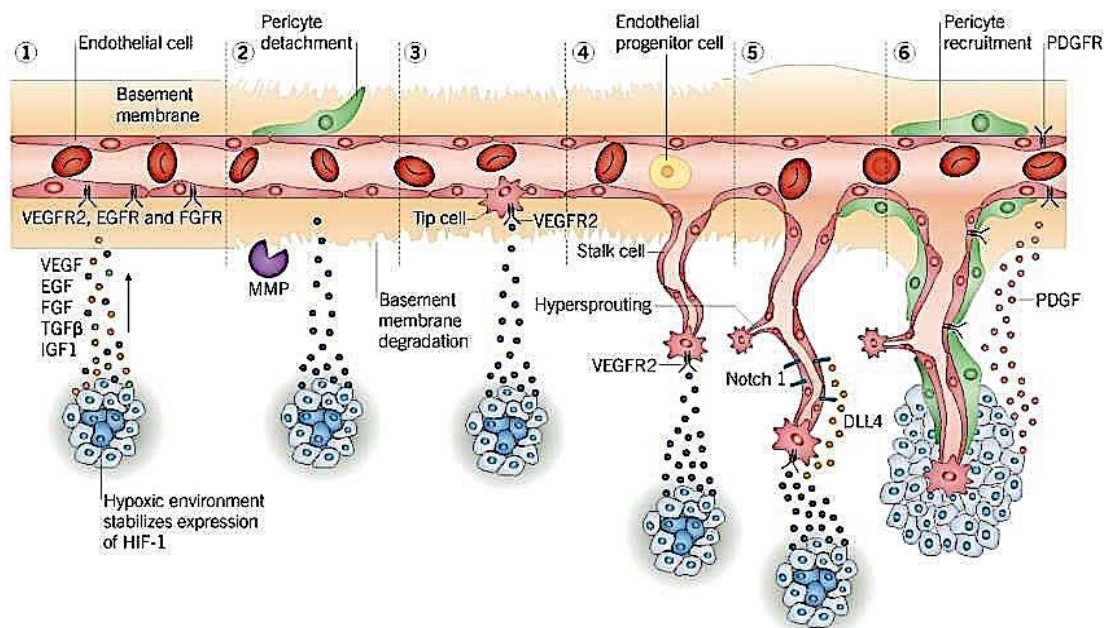


Figura 6. Etapas de la angiogénesis tumoral. 1) La falta de oxígeno o hipoxia activa al factor inducible por hipoxia (HIF-1) que induce la expresión y liberación de factores proangiogénicos, tanto de las células tumorales como de las estromales, 2) Las MMPs, encargadas de degradar la membrana basal, se activan y permiten que 3) las células endoteliales especializadas llamadas “células en punta” migren a favor del gradiente de factores proangiogénicos y hacia el nuevo capilar, 4) las células endoteliales se diferencian en células altamente proliferativas que comenzarán a formar el nuevo capilar, 5) Una vez formados los vasos sanguíneos, se regula su tamaño suprimiendo la proliferación de células endoteliales al disminuir la expresión de VEGFR, 6) finalmente se establece el flujo sanguíneo que le permite al tumor seguir creciendo. Tomado de <https://www.tocris.com/cell-biology/angiogenesis>

Los tumores presentan un proceso llamado “cambio angiogénico”, el cual implica que algunas células tumorales adquieren un fenotipo angiogénico, es decir, incrementan la producción de factores angiogénicos o bien, disminuyen o pierden la capacidad de producción de factores inhibitorios de la angiogénesis. La transición hacia un fenotipo angiogénico está regulada por cambios en las proporciones entre reguladores positivos y negativos de la angiogénesis (Yadav, 2015).

Entre de los factores que afectan positivamente la angiogénesis tumoral se encuentran: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) y sus receptores, el factor de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), angiopoyetinas y sus receptores, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), MMPs, factor de necrosis tumoral (TNF), algunas quimiocinas como la IL-8, entre otros (Gupta, 2003; Sakurai & Kudo, 2011; Yadav, 2015). Entre los factores inhibitorios de la angiogénesis se encuentran: las trombospondinas (TSP, por sus siglas en inglés), angiostatina, endostatina, los interferones α/β , algunas interleucinas como la IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, IL-23, IL-25 y la IL-27, los inhibidores tisulares de MMPs (TIMP), entre otros (Huang & Bao, 2004; Ribatti, 2019; Yadav, 2015).

En el cáncer de pulmón, un mayor grado de vascularización de los tumores se ha correlacionado con un peor pronóstico de los pacientes, por lo cual resulta importante identificar los factores moleculares que inciden sobre esta función biológica, para así dirigir adecuadamente las terapias. Dentro de los factores angiogénicos mejor estudiados en el cáncer de pulmón se encuentra la familia del VEGF, PDGF y FGF, para los cuales existen diversos fármacos inhibitorios que se usan en la clínica (Bačić et al., 2017). Actualmente el anticuerpo monoclonal bevacizumab (anti-VEGF) se ha aprobado para su uso en el tratamiento de NSCLC y se ha relacionado con una mejora en la sobrevida de los pacientes (Crinò & Metro, 2014).

1.5 Mucinas y cáncer

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular sintetizadas principalmente por células epiteliales. En condiciones fisiológicas, confieren lubricación y protección a las superficies epiteliales (Senapati et al., 2010). Además, poseen un importante papel como moduladoras de la señalización (Singh et al., 2007). Existen dos tipos de mucinas: las secretadas, llamadas mucinas formadoras de gel, que son completamente extracelulares; y las mucinas de superficie celular que funcionan como receptoras de señales. Las mucinas participan en procesos fisiológicos como adhesión, migración, proliferación, diferenciación, apoptosis y secreción de productos celulares específicos

(Hollingsworth & Swanson, 2004; Thornton et al., 2008). En salud, las mucinas suprimen la inflamación protegiendo al epitelio de patógenos y heridas, contribuyendo al establecimiento de un ambiente inmunosupresor, el cual es explotado por las células cancerosas para evadir la respuesta inmunológica (Bhatia et al., 2019).

Los tumores expresan una variedad de mucinas que crean una barrera que impide la detección de antígenos tumorales por el sistema inmunológico, evitando así su destrucción. La expresión aberrante de mucinas durante el proceso tumoral permite además que las células tumorales interactúen con múltiples receptores, favoreciendo procesos proliferación, invasión y metástasis (Hollingsworth & Swanson, 2004). Además, las mucinas participan en vías de señalización que regulan procesos de diferenciación y proliferación en el cáncer. Así, por ejemplo, el dominio citoplásmico de la mucina transmembranal MUC1 interactúa con β -catenina citoplásmica, dicha asociación incrementa la localización nuclear de β -catenina donde promueve la activación de genes de proliferación y diferenciación celular (Wen et al., 2003). La mucina MUC4 contiene un motivo tipo EGF, el cual interactúa con el receptor ERBB2 (del inglés, *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*) induciendo señales de diferenciación. Tanto MUC1 como MUC4 se han encontrado aberrantemente expresadas en distintos tipos de cánceres, incluido el cáncer de pulmón (Hollingsworth & Swanson, 2004).

Debido a su sobreexpresión en cánceres humanos y a sus patrones de glicosilación aberrante, las mucinas se han convertido en potenciales biomarcadores de diagnóstico y de monitoreo de la progresión de la enfermedad, así como en atractivos blancos terapéuticos para el desarrollo de vacunas, anticuerpos y drogas inhibitoras (Kufe, 2009; Raina et al., 2009). La mucina MUC16 conocida como antígeno de cáncer 125 (CA 125, por siglas en inglés), es utilizada como biomarcador en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de ovario, ya que incrementa su expresión en suero en el 80-90% de los casos en estadios avanzados. La mucina MUC1 conocida como antígeno de cáncer 15-3 (CA 15-3, por sus siglas en inglés) se sobre expresa en el suero de pacientes con cáncer de mama y se utiliza en el diagnóstico de la enfermedad (Rachagani et al., 2009).

En el cáncer de pulmón, específicamente en el NSCLC, se ha observado que la sobreexpresión de las mucinas MUC1 y MUC5AC correlaciona con la progresión de la enfermedad (Lakshmanan et al., 2015). El silenciamiento de MUC1 en la línea celular de NSCLC NCI-H1650 disminuye su proliferación, promueve la apoptosis, disminuye la angiogénesis a través de la inhibición en la producción de VEGF, e inhibe la activación de las vías de señalización de Akt y ERK (T. Xu et al., 2017). El silenciamiento de MUC5AC en NSCLC disminuye el crecimiento celular, la fosforilación de Akt y ERK, la capacidad de migrar, y aumenta la sensibilidad a los efectos citotóxicos del cisplatino (Lakshmanan et al., 2015) (Figura 7). La sobreexpresión de MUC4 es un indicador de pobre pronóstico en el adenocarcinoma de pulmón, los pacientes con altos niveles de

MUC4 en sus tumores presentan una menor supervivencia libre de enfermedad en comparación con los pacientes con niveles bajos de la mucina (Rachagani et al., 2009).

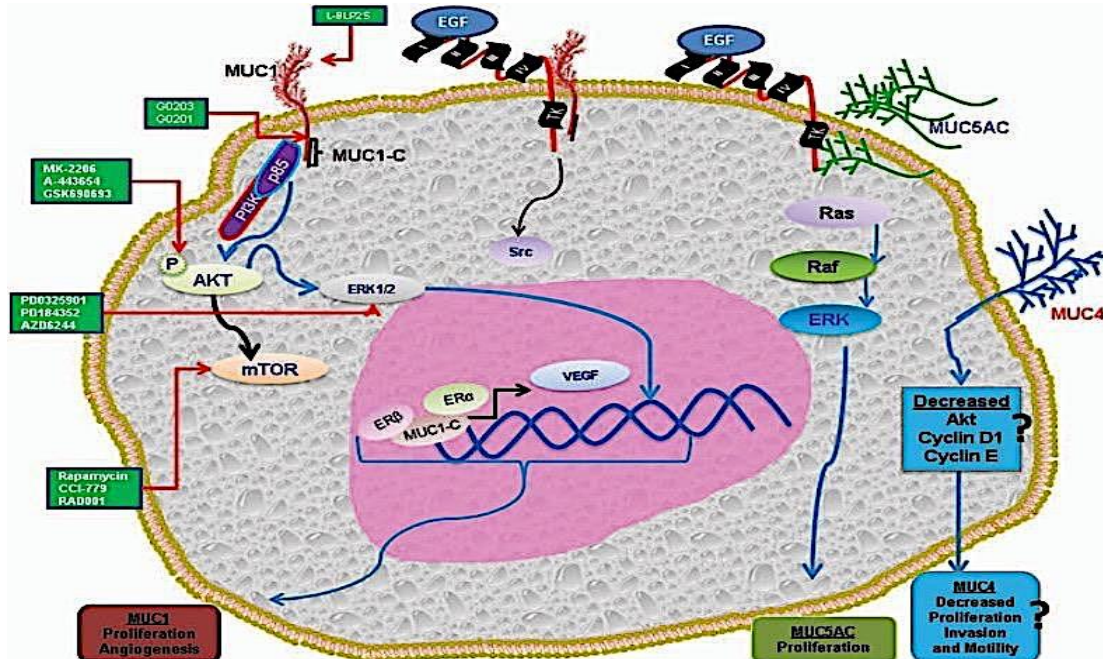


Figura 7. Vías de señalización de mucinas en el cáncer de pulmón. La sobreexpresión de MUC1 activa la vía de señalización de PI3K-Akt involucrada en la proliferación celular y el metabolismo en el cáncer de pulmón. MUC1 regula la expresión de VEGF promoviendo la angiogénesis e interactúa con la vía de señalización del EGFR, promoviendo la proliferación de las células cancerosas de pulmón a través de Src. La MUC5AC promueve la proliferación alterando la vía de señalización de Ras. La sobreexpresión de MUC4 activa la vía de Akt en el cáncer de ovario y mama, pero en pulmón se desconoce si esto ocurre. Existen algunos inhibidores disponibles que bloquean la proliferación de las células de cáncer de pulmón, ya sea inhibiendo directamente a MUC1 (L-BLP25, G0203) o bien proteínas río abajo como mTOR y ERK1/2 y Akt. Tomado de (Lakshmanan et al., 2015).

Dentro de la familia de mucinas de superficie celular se encuentra la molécula CD43, la cual es una proteína altamente O-glicosilada que se encuentra implicada en el desarrollo del NSCLC y en tumores de distintos orígenes (Q. Fu et al., 2014; Qiangwei Fu et al., 2013; Santamaría et al., 1996; Sikut et al., 1999).

1.5.1 CD43 en el cáncer

CD43 es una glicoproteína abundantemente expresada en todas las células hematopoyéticas, excepto eritrocitos y linfocitos B no activados. CD43 era considerada exclusiva de células hematopoyéticas hasta el año de 1995 cuando se reportó su expresión en la línea celular humana de adenocarcinoma de colon COLO 205 (Baeckström et al., 1995), así como en tumores de mama, pulmón, páncreas y ovario, y además en secciones de tejido de próstata, testículos, vejiga, pulmón y laringe, donde su expresión se encuentra asociada con malignidad (Baeckström et al., 1995; Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Kadaja-Saarepuu et al., 2008; Santamaría et al., 1996). En tumores y líneas celulares de cáncer de mama, colon y pulmón, la expresión de CD43 es predominantemente intracelular, a diferencia de los leucocitos donde su expresión es predominantemente a nivel de membrana (Q. Fu et al., 2014; Qiangwei Fu et al., 2013; Sikut et al., 1999).

El gen que codifica para la proteína CD43 se encuentra en el cromosoma 16 en humanos y se compone de dos exones y un intrón de 378 pb dentro de la región 5' UTR, aunque la proteína completa es codificada solo por el segundo exón. El gen contiene dos sitios de inicio de la transcripción localizados en los nucleótidos 70 y 125 río arriba del dinucleótido GT que define la terminación 5' del intrón. Existen dos RNA mensajeros de CD43 de 1.9 y 4.3kb generados por las señales de poliadenilación alternativas en su región 3' no traducida (Shelley et al., 1990). Ambos mensajeros se encuentran en líneas de células linfoides, pero en células tumorales no linfoides no existen reportes acerca del procesamiento del mensajero.

CD43 posee una región extracelular que sobresale 45nm de la superficie celular y contiene cinco repeticiones en tándem de 18 aminoácidos cada una (¹¹⁶Ile-²⁰⁵Ser) ricos en serinas y treoninas modificados por glicosilaciones O-GalNAc. Presenta dos isoformas, una de 115 kDa en timocitos, linfocitos T CD4 en reposo y monocitos; y una de 130 kDa presente en linfocitos T CD8 en reposo, linfocitos T CD4 activados, neutrófilos, plaquetas, linfocitos B y macrófagos, así como células tumorales. En su región intracelular contiene dos sitios de unión a proteínas ERM (ezrina, radixina, moesina); dos señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) embebidas en los dominios de unión a ERM y una región rica en prolinas (PRR) que le permite unirse a proteínas con dominios SH3 y participar en diversas vías de señalización (Torres-Huerta et al., 2018) (Figura 8).

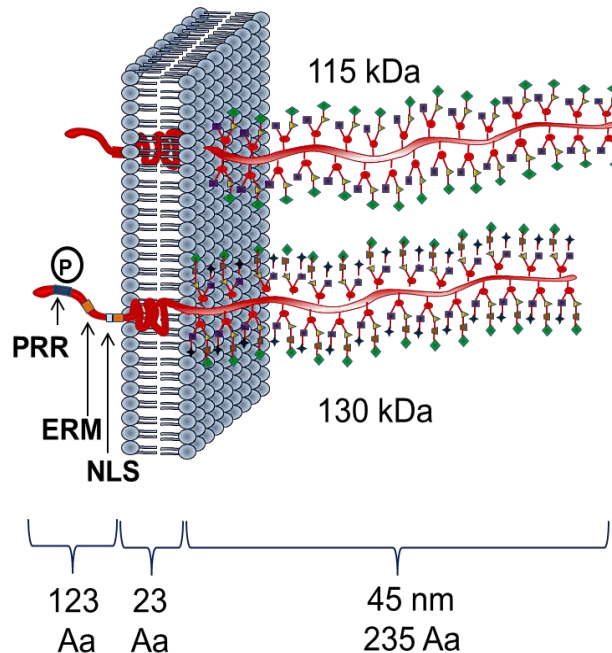


Figura 8. Estructura de la molécula CD43. CD43 es una mucina de superficie celular que sobresale 45nm hacia el espacio extracelular. Su región extracelular contiene cinco repeticiones en tándem de 18 aminoácidos cada una (¹¹⁶Ile-²⁰⁵Ser) ricos en serinas y treoninas modificados por glicosilaciones O-GalNAc. Presenta dos isoformas, una de 115 kDa en timocitos, linfocitos T CD4 en reposo y monocitos; y una de 130 kDa presente en linfocitos T CD8 en reposo, linfocitos T CD4 activados, neutrófilos, plaquetas, linfocitos B y macrófagos, así como células tumorales. En su región intracelular contiene dos sitios de unión a proteínas ERM (Ezrina, radixina, moesina); dos señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) embebidas en los dominios de unión a ERM; y una región rica en prolina (PRR) que le permite unirse a proteínas con dominios SH3 y participar en diversas vías de señalización. Tomado de Torres-Huerta, 2012 (imagen); (Torres-Huerta et al., 2018).

En células hematopoyéticas se ha descrito que CD43 es una proteína multifuncional que participa en la regulación de la activación celular, diferenciación, crecimiento celular, supervivencia, apoptosis, adhesión y migración. Algunas de sus funciones las ejerce gracias a su interacción con alguno de sus múltiples ligandos descritos entre los que se encuentran: ICAM-1, galectina-1, el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I), albúmina sérica humana (HSA), E-selectina, sialoadesina (siglec-1) y nucleolina (Bravo-Adame et al., 2012).

Las señales de CD43 inducen la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. En linfocitos T las señales de CD43 inducen la secreción de las citocinas: RANTES, MIP-1, TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6 e IL-12 (Fierro et al., 2006). En fibroblastos NIH-3T3, CD43 favorece la secreción de las citocinas IFN- γ , MCP-1, MCP-5, RANTES, IL-4, IL-5,

VEGF y trombopoyetina (Olivos-Ortiz, Tesis de maestría, 2008). Estos datos sugieren que CD43 podría participar en la modulación del secretoma en células linfoides y no linfoides a través de la secreción de citocinas inflamatorias contribuyendo a procesos patológicos como el cáncer.

Numerosos reportes indican que existe una asociación entre CD43 y cáncer, sin embargo, el papel que juega en el proceso de transformación no ha sido completamente esclarecido, aunque los datos de la literatura sugieren que participa en más de una vía de señalización, modificando el comportamiento de las células a múltiples niveles (Figura 9). En los linfomas de células B, la expresión de CD43 es considerada de mal pronóstico ya que incrementa la capacidad de sobrevivida y la proliferación de las células tumorales, y esto se traduce en una menor sobrevivida de los pacientes (Ma et al., 2015). En leucemias, se ha demostrado que CD43 actúa como una barrera que protege a las células tumorales de la lisis por linfocitos T citotóxicos (Hasegawa et al., 2016). En tumores de origen epitelial, como en cáncer de colon (línea celular COLO 205), se ha observado que CD43 sufre una ruptura proteolítica en su dominio citoplásmico, lo cual provoca que su señal de localización nuclear sea expuesta y su dominio intracelular sea translocado al núcleo donde interactúa con β -catenina, resultando en la expresión de c-Myc y Ciclina D1 (Andersson et al., 2004). Esto sugiere que CD43 podría promover la proliferación y la sobrevivida de las células tumorales.

CD43 participa también en el proceso tumoral a través de su interferencia con el proceso apoptótico. Se ha reportado que la expresión de CD43 en cáncer de colon reduce la expresión de FAS en la superficie celular, esto ayuda a las células a escapar del mecanismo de apoptosis, promoviendo el crecimiento celular mediante el incremento en la sobrevivida celular y la formación de colonias por un mecanismo dependiente de la vía ARF/p53 (Kadaja-Saarepuu et al., 2008). De acuerdo con esto, se reportó que en células A549 (NSCLC) y MCF7 (cáncer de mama), la expresión de CD43 disminuye la susceptibilidad a la apoptosis y la vulnerabilidad a la lisis mediada por células NK (Q. Fu et al., 2014; Qiangwei Fu et al., 2013).

Así mismo CD43 posee un papel antiadhesivo en células de carcinoma de colon (HT-29), donde causa la disminución en la expresión de la integrina β 1, lo cual inhibe la adhesión celular a laminina y colágeno IV, y potencialmente proporciona a las células la capacidad de migrar (Park et al., 2012). En células tumorales SW1222, la inhibición de la interacción de CD43 con uno de sus ligandos, la molécula ICAM-1 (Rosenstein et al., 1991), reduce la adhesión de las células tumorales al mesotelio, lo que sugiere un rol proadhesivo de CD43 en el cáncer de colon (Ziprin et al., 2004). Además, se ha observado que la interacción ICAM-1-CD43 provoca un incremento en la producción de metaloproteasas (MMP-9 y MMP-2) (Alkhamesi et al., 2007; Ziprin et al., 2004), importantes para el proceso de invasión tumoral. La inhibición de la expresión de CD43

en células A549 y MCF7 limita el crecimiento de tumores *in vivo* (Q. Fu et al., 2014; Qiangwei Fu et al., 2013), evidenciando la participación de CD43 en el crecimiento tumoral.

Resultados previos de nuestro laboratorio obtenidos con células A549 y Caski (carcinoma epidermoide de cérvix humano derivado de metástasis de intestino delgado) mostraron que las señales de CD43 combinadas con señales oncogénicas adicionales promueven la proliferación independiente de anclaje, favoreciendo el proceso de migración celular, y que, para esto, se requiere del dominio intracelular de CD43. Se demostró que CD43 inhibe el mecanismo de inhibición por contacto en células A549 confluentes mediante la fosforilación de Akt, lo cual lleva a la fosforilación de la proteína supresora de tumores Merlina y su eventual degradación, lo que induce la translocación al núcleo del regulador de la transcripción YAP, favoreciendo una proliferación descontrolada. Con estudios *in vivo*, se demostró que la inhibición de la expresión de CD43 en células A549 y Caski resulta en la formación de tumores de menor tamaño en ratones desnudos (Camacho-Concha et al., 2013).

La evidencia sugiere que CD43 confiere ventajas a las células tumorales de diversos orígenes para el éxito del proceso canceroso (Andersson et al., 2004; Camacho-Concha et al., 2013; Q. Fu et al., 2014; Qiangwei Fu et al., 2013). Entender como lo hace y qué mecanismos utiliza resulta importante para generar conocimiento que lleve finalmente a identificar nuevos biomarcadores de pronóstico y de diagnóstico, así como para definir potenciales blancos terapéuticos. En el presente trabajo nos propusimos investigar el papel que juega CD43 en la secreción de factores que influyen y modifican el potencial transformador de células A549 derivadas de un NSCLC.

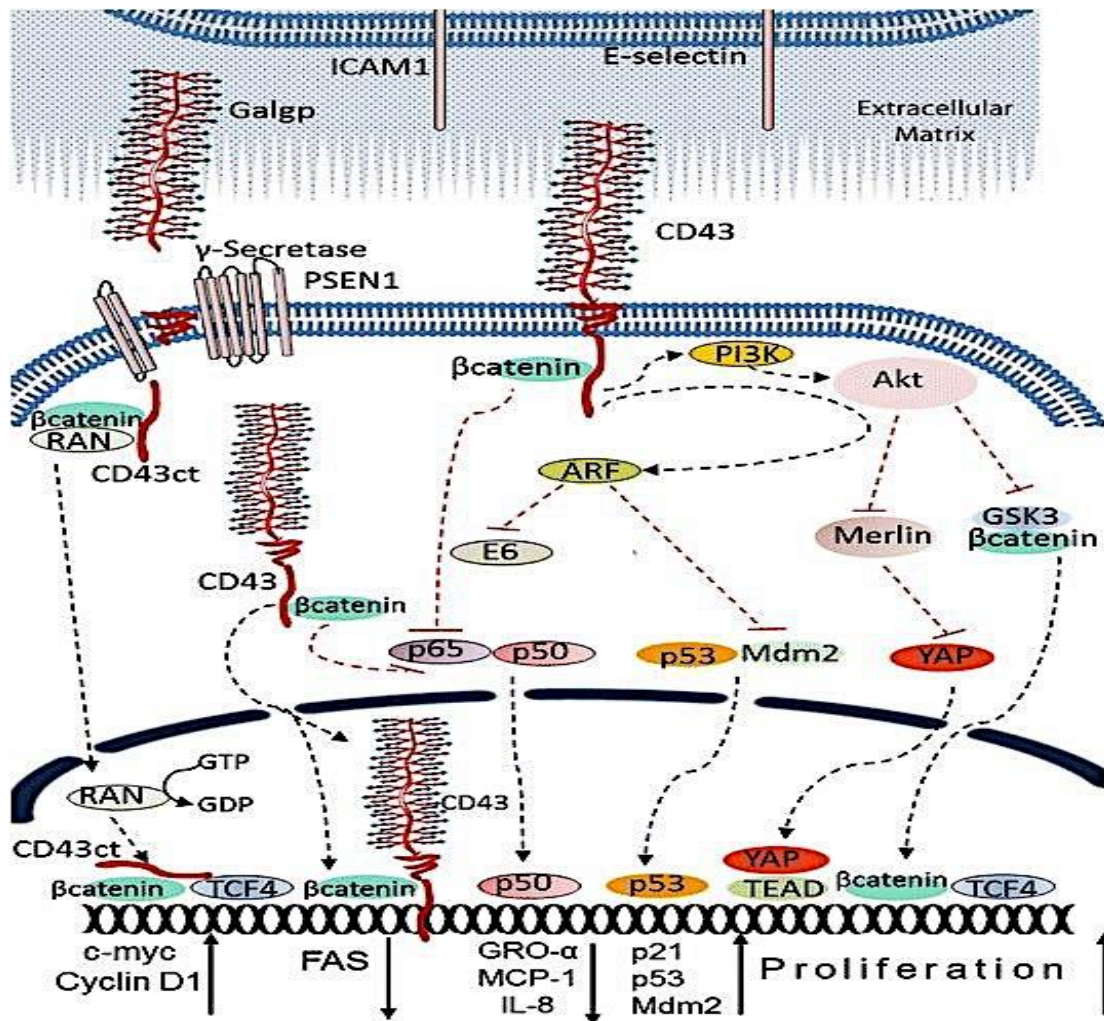


Figura 9. CD43 y su participación en vías de señalización en el cáncer. En el cáncer de colon, CD43 sufre un corte proteolítico por una gama secretasa que libera su dominio citoplásmico para que interactúe con β -catenina en el núcleo gracias a su señal de localización nuclear. La interacción con β -catenina induce la expresión de genes que favorecen la entrada al ciclo celular, la proliferación y la supervivencia. La sobreexpresión de CD43 en cáncer de colon baja la expresión de genes de quimiocinas como MCP-1, IL-8 y GRO-alfa, a través de un mecanismo dependiente de NF- κ B. La expresión de CD43 en cáncer de pulmón apaga el proceso de inhibición por contacto a través de la degradación de Merlina, lo que permite que el regulador transcripcional YAP se transloque a núcleo y active genes involucrados en proliferación y supervivencia. Se ha demostrado que las señales de CD43 favorecen la transformación celular en conjunto con señales oncogénicas tales como la proteína E6 del HPV16 y la proteína p53. Tomado y modificado de (Torres-Huerta et al., 2018).

II. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La expresión de CD43 favorece la secreción de factores que modifican el potencial transformador de células tumorales de origen no linfoide.

III. OBJETIVO

Objetivo general

Evaluar la participación de CD43 en la transformación de células tumorales no-linfoideas, con especial énfasis en la secreción de moléculas bioactivas con funciones proinflamatorias, angiogénicas, quimiotácticas y remodeladoras de la matriz extracelular.

Objetivos particulares

1. Caracterizar el secretoma de células A549 con niveles endógenos o disminuidos de CD43 mediante técnicas de proteómica.
2. Validar los resultados del estudio proteómico mediante ensayos biológicos enfocados a determinar la participación de las proteínas más sobresalientes y los procesos biológicos resultantes.

IV. RESULTADOS

4.1 Resumen general de los resultados obtenidos en este trabajo

CD43 es capaz de generar señales que favorecen la proliferación independiente de sustrato, bloqueando la inhibición por contacto mediante y favoreciendo el proceso de migración celular en células A549 (NSCLC) y Caski (cáncer de cérvix). Se sabe que CD43 inhibe el mecanismo de inhibición por contacto en células A549 confluentes, al promover la fosforilación de Akt, lo cual lleva a la fosforilación de la proteína supresora de tumores Merlina y su eventual degradación, CD43 promueve la translocación al núcleo del regulador de la transcripción YAP, favoreciendo una proliferación descontrolada (Camacho-Concha et al., 2013). En el presente trabajo, con clonas que expresan niveles endógenos o disminuidos de CD43, nos propusimos evaluar si expresar CD43 les confiere a las células A549 la capacidad de modificar la composición del secretoma, identificar las funciones biológicas más representadas por el conjunto de moléculas secretadas y, mediante ensayos biológicos, validar estos resultados.

Se generaron clonas de células A549 con niveles reducidos de la molécula CD43 (RNAi) y clonas que expresan los niveles endógenos de la molécula (pSuper). Para simular las características de privación de nutrientes y oxígeno resultantes del acelerado crecimiento tumoral (Wek & Staschke, 2010), las células fueron cultivadas a confluencia y posteriormente se ayunaron en medio libre de suero por 48 horas. En dichas condiciones, la viabilidad de las clonas pSuper y RNAi fue mayor del 85%.

Considerando que los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B participan en la síntesis y secreción de diversas citocinas y proteínas que modifican el TME, y sus vías de señalización se encuentran activas en muestras de pacientes y líneas celulares de NSCLC, correlacionando con la progresión del cáncer (Chen et al., 2011; Mohrher et al., 2020). Comparamos el estado de activación de STAT3 y NF- κ B en lisados de clonas de células A549 pSuper o RNAi confluentes y cultivadas en condiciones de privación de nutrientes. Encontramos que las células A549 pSuper tienen niveles de pSTAT3 Y⁷⁰⁵ significativamente mayores, y aunque no se alcanzó significancia estadística, mayores niveles de p-I κ B- α que las células RNAi. Lo anterior sugiere la participación de CD43 en la activación de estas dos vías de señalización en células A549, y correlaciona con lo reportado en linfocitos T, donde las señales de CD43 activan la vía de NF- κ B (Santana et al., 2000) y STAT3 (Bravo-Adame et al., 2017).

Como una primera aproximación para comparar la composición del secretoma de células A549 pSuper y RNAi, se analizó el perfil de citocinas y factores de crecimiento en sobrenadantes de clonas independientes de células cultivadas en ausencia de nutrientes con un arreglo de anticuerpos. Encontramos que las células pSuper secretan significativamente mayores cantidades de: IL-8 (CXCL-8), MCP-1 (CCL2) y ENA-78 (CXCL5) ($p < 0.05$), y aunque no se alcanzó la significancia estadística, estas células

secretan también mayores cantidades de: GRO, GRO- α (CXCL1) y angiogenina, comparado con células CD43-RNAi. En consistencia con reportes previos acerca de la capacidad secretoria de células A549 (Cai et al., 2009; Chauhan et al., 2012; Holownia et al., 2016), independientemente del nivel de expresión de CD43, las células A549 secretan cantidades equivalentes de moléculas como: MIP1beta (CCL4), TGF-beta 2, TIMP1 y TIMP2, osteopontina, RANTES (CCL5), MIF, LIF y oncostatin M.

Para tener una visión más amplia del repertorio de moléculas secretadas por las clonas de células A549 pSuper y RNAi, se realizó un análisis proteómico libre de marcaje por LC-MS/MS de los sobrenadantes de las clonas pSuper y RNAi cultivadas en las mismas condiciones limitantes de nutrientes. El análisis de enriquecimiento basado en “compartimento celular” de las proteínas identificadas reveló que el 85.76% de estas pertenecen a la región extracelular, lo cual concuerda con lo esperado con un secretoma. Se identificaron 645 proteínas; 107 estaban diferencialmente expresadas entre ambas condiciones experimentales (con un índice de cambio ≥ 2.5), de las cuales, 57 se encontraban sobreexpresadas y 50 subexpresadas en la condición pSuper comparada con la condición RNAi. Además, 12 proteínas se encontraban expresadas únicamente en la condición pSuper y 16 en la condición RNAi. Inesperadamente, a pesar de que la espectrometría de masas es una técnica muy sensible, entre las proteínas identificadas en los sobrenadantes concentrados de las distintas clonas celulares no logramos identificar todas las citocinas que se detectaron con el arreglo de proteínas. No obstante, en las proteínas que se identificaron por las dos metodologías, las tendencias en los índices de cambios entre condiciones de estudio fueron las mismas, validando así los resultados de ambas técnicas.

El análisis de enriquecimiento basado en “funciones biológicas” del conjunto de proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma reveló que la organización de la matriz extracelular fue el proceso biológico mayormente enriquecido con un puntaje de 5.73, seguido de angiogénesis (puntaje-4.39), proceso de catabolismo del colágeno (3.93), proceso de catabolismo del condroitin sulfato (3.16), degranulación de plaquetas (2.54), regulación del crecimiento celular (2.32), procesos de biosíntesis de gangliósidos (1.82), respuesta celular a IL-1 (1.65), proteólisis (1.63) y adhesión célula-célula (1.3).

Para validar los resultados arrojados por espectrometría de masas, se evaluó la concentración de tres proteínas que participan en migración, proliferación y angiogénesis en cáncer de pulmón, particularmente en NSCLC: fibrinógeno, neuroserpina y PDGF-D (del inglés, *Platelet Derived Growth Factor-D*). Los resultados de ELISA obtenidos con clonas independientes y distintas de las clonas utilizadas en los ensayos anteriores mostraron que la expresión de fibrinógeno, PDGF-D y neuroserpina exhibe la misma tendencia que el ensayo de LC-MS/MS, es decir, las

clonas pSuper secretan cantidades significativamente mayores de las tres moléculas en comparación con las clonas RNAi.

Considerando que la angiogénesis fue la segunda función más representada entre las proteínas del secretoma, comparamos la capacidad angiogénica de los secretomas de células A549 pSuper y RNAi. Se realizaron ensayos de angiogénesis con explantes de aorta de ratón, los cuales tienen la capacidad de formar nuevos vasos cuando son embebidos en Matrigel [una mezcla gelatinosa rica en proteínas estructurales como colágeno y factores de crecimiento (como EGFR, FGF, PDGF)]. El análisis de los resultados reveló que los sobrenadantes de células A549 pSuper inducen un crecimiento de vasos sanguíneos a partir de los explantes de aorta significativamente mayor al observado con los sobrenadantes provenientes de células A549 RNAi. Estos resultados sugieren que, a diferencia de las células que expresan niveles reducidos de CD43, expresar niveles normales de CD43 modifica la composición del secretoma de células A549 confluentes y cultivadas en ausencia de nutrientes, favoreciendo el proceso de angiogénesis.

La formación de vasos sanguíneos requiere de la participación de varias estirpes celulares, siendo central la capacidad de las células endoteliales de formar tubos que a su vez se conectaran unos con otros, para formar redes de vasos por las que circulara la sangre. Al comparar la capacidad de los sobrenadantes de células A549 pSuper o de RNAi de inducir la formación de tubos de una línea de células endoteliales humanas inmortalizadas (células TeloHAEC), observamos que los sobrenadantes provenientes de las células pSuper formaron significativamente más tubos, más mallas, más nodos y menos extremos sueltos comparado con los sobrenadantes de células RNAi. En conjunto estos resultados indican que la concentración de los factores angiogénicos contenidos en los sobrenadantes de las células A549 pSuper, además de favorecer el crecimiento de vasos sanguíneos, inducen la formación de redes de tubos de células endoteliales que darán origen a los vasos sanguíneos propiamente dichos.

Los procesos de angiogénesis requieren de remodelación de la matriz extracelular. Numerosos reportes indican que la expresión de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) es muy elevada en tumores de pulmón en comparación con el tejido no-maligno, y que su expresión se asocia a distintas etapas del proceso tumoral, como la metástasis y la angiogénesis (Merchant et al., 2017). Específicamente la MMP-2 y la MMP-9 han sido relacionadas a procesos de invasión y metástasis en el NSCLC, por su papel como degradadoras de colágena tipo IV, uno de los principales componentes de la membrana basal (Rollin et al., 2007). Si bien no identificamos a MMP-2 y MMP-9 por LC-MS/MS, detectamos que las células A549 pSuper y RNAi secretan niveles equivalentes de dos reguladores de MMPs, TIMP-1 y TIMP-2. Además, encontramos varios miembros del sistema de activadores de plasminógeno en el secretoma, los cuales han sido relacionados con la regulación de las MMPs y la

angiogénesis (Pepper, 2001). Entre estos últimos se encuentran uPA (del inglés, *urokinase plasminogen activator*), PAI-1 (del inglés, *plasminogen activator inhibitor-1*), PLAUR (de inglés, *plasminogen activator, urokinase receptor*). Por lo anterior, evaluamos la capacidad de los sobrenadantes de células pSuper y RNAi de degradar gelatina (colágeno desnaturalizado) mediante un ensayo de zimografía. Detectamos dos gelatinasas de 62 y 82 KDa que corresponden a la MMP-2 y MMP-9, y encontramos una correlación positiva entre los niveles de expresión de CD43 y la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9.

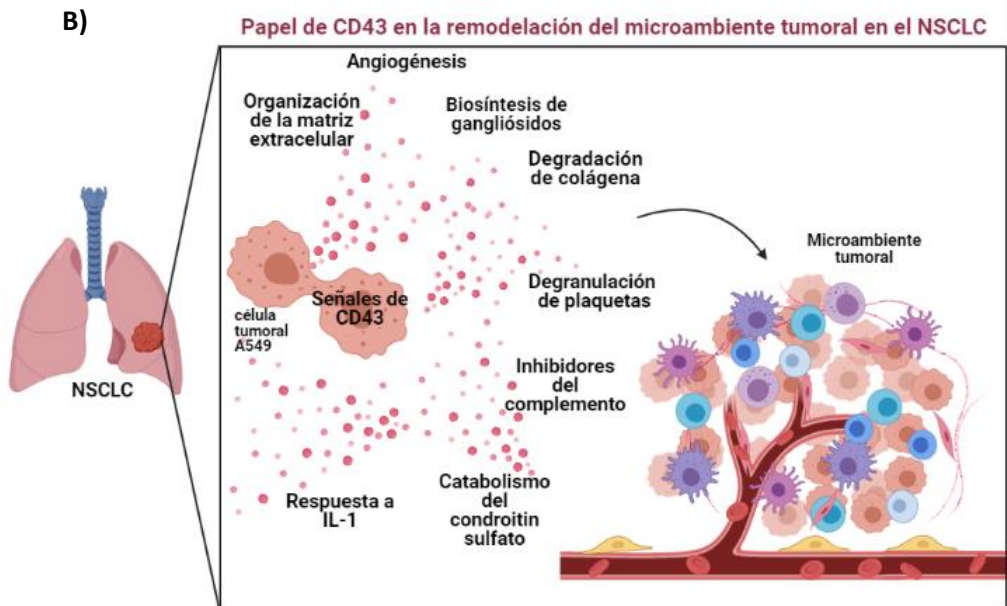
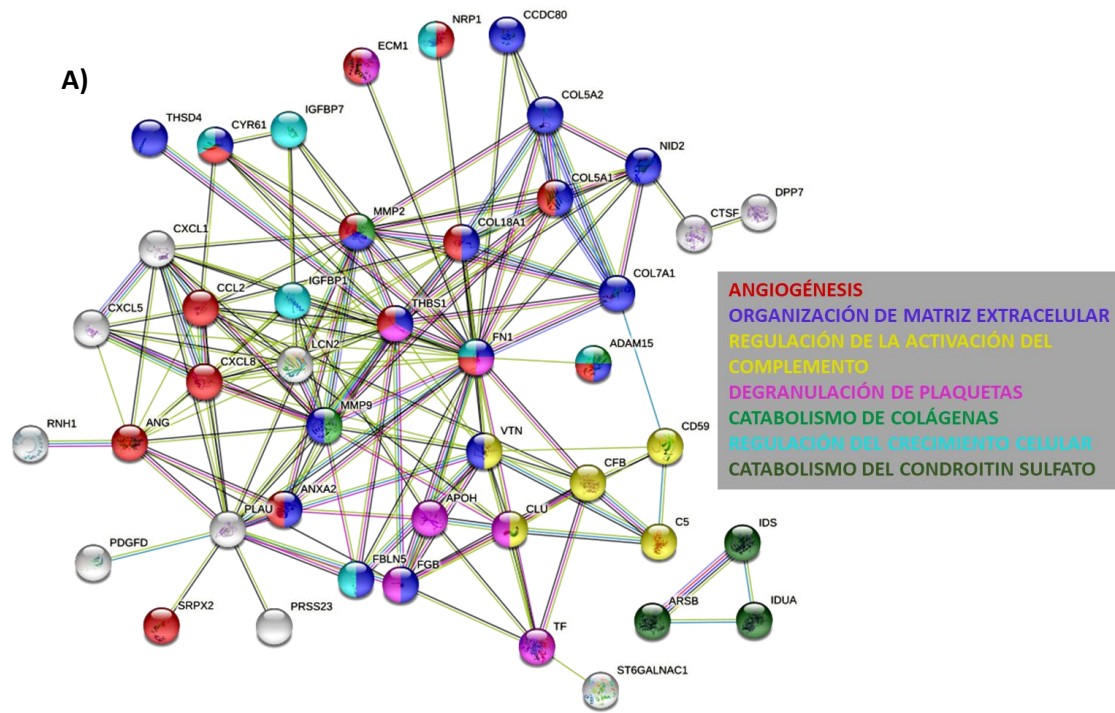
Finalmente, entre las proteínas diferencialmente expresadas entre las dos condiciones experimentales (secretomas de células A549 pSuper y RNAi), se detectaron proteínas que participan en la activación y/o regulación del sistema del complemento. El sistema del complemento es un componente de la inmunidad innata además de participar en la inmunidad adaptativa, la inflamación, la homeostasis y la embriogénesis (Afshar-Kharghan, 2017). Dentro del TME, el sistema del complemento juega un papel dual, contribuyendo al crecimiento tumoral y la metástasis, y actuando como un efector de la citotoxicidad antitumoral.

El sistema del complemento está constituido por una veintena de moléculas con funciones reguladoras positivas o negativas, siendo que entre las proteínas diferencialmente expresadas entre las dos condiciones experimentales (secretomas de células A549 pSuper y RNAi), se detectaron proteínas pertenecientes a ambas categorías. Encontramos que las células pSuper secretan significativamente más proteínas inhibitorias del complemento (CD59, vitronectina y clusterina) y más del componente C5 que las células RNAi, y aunque no hubo diferencias significativas, también encontramos las proteínas pro-C3, el factor H, el factor D, C1r, C1r-LP y C1s. Estos resultados y la importancia del complemento en la regulación del TME y la angiogénesis, nos incito a evaluar si las clonas pSuper y RNAi tienen capacidades distintas para activar el complemento. Por citometría de flujo se determinó la deposición sobre la superficie celular de las proteínas C3b y la del complejo C5b-9 mediante un “*in-cell* ELISA”. Se encontró que las células RNAi tienden a tener una mayor deposición de las dos proteínas en comparación con células pSuper. Un análisis de correlación de Pearson muestra que la expresión de CD43 correlaciona negativamente con la deposición de C3b y C5b-9. En conjunto, estos resultados sugieren que CD43 podría estar implicado en la regulación de la activación del sistema del complemento, y proteger a las células del ataque del complemento.

Como se resume en la figura 10, los resultados obtenidos sugieren que las vías de señalización de STAT3 y NF- κ B se encuentran más activas en células A549 con niveles endógenos de CD43, regulando la activación de genes de numerosas moléculas que las células tumorales secretan para modelar su TME, facilitando el crecimiento y la expansión tumoral. El análisis proteómico de los sobrenadantes de cultivo de clonas de

células A549 CD43 pSuper y RNAi nos llevó a identificar que la expresión de CD43 favorece la secreción de moléculas que participan en procesos de remodelación de la ECM (catabolismo del colágeno, catabolismo del condroitin sulfato, biosíntesis de gangliósidos), angiogénesis, degranulación de plaquetas y de proteínas inhibitorias del sistema del complemento. En particular, mostramos que la secreción de factores proangiogénicos, de proteasas involucradas en la degradación de colágena, y la activación del sistema del complemento, es dependiente de los niveles de expresión de CD43. De una manera general los resultados obtenidos descubren una nueva función de la sialomucina CD43 en los procesos de invasión y metástasis de cáncer de pulmón, a través de su participación en la angiogénesis y la remodelación de la ECM.

Figura 10. CD43 participa en la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis en el cáncer de pulmón a través del secretoma. A) Los resultados sugieren que en células A549, CD43 promueve la activación de los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B, los cuales se encuentran constitutivamente activos en el NSCLC e involucrados en la secreción de factores promotores del crecimiento tumoral. El análisis proteómico del secretoma de células A549 que expresan niveles diferenciales de CD43 reveló que las señales de CD43 estimulan la secreción de proteínas involucradas en funciones biológicas que en conjunto contribuyen a la remodelación del microambiente tumoral: la organización de la matriz extracelular (biosíntesis de gangliósidos, degradación de colágenas, catabolismo del condroitin sulfato), la angiogénesis, la degranulación de plaquetas, la inflamación y la inhibición del sistema del complemento. **B)** Análisis de redes de interacción entre proteínas afectadas por el silenciamiento de CD43 en el secretoma de células A549, el análisis se llevó a cabo mediante el software STRING. Los diferentes colores de las líneas representan los tipos de evidencia que existen para validar las asociaciones; y los colores de cada proteína corresponden a los procesos biológicos en los que cada una participa.



Created in **BioRender.com** bio

4.2 Resultados publicados


Received: 14 September 2020 | Revised: 17 January 2021 | Accepted: 21 January 2021

DOI: 10.1002/jcp.30308

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Journal of Cellular Physiology WILEY

CD43 (sialophorin) is involved in the induction of extracellular matrix remodeling and angiogenesis by lung cancer cells

Daniela Vega-Mendoza^{1,2} | Alicia Cañas-Linares^{1,2} | Angel Flores-Alcantar¹ | Roberto Espinosa-Neira^{1,4} | Erika Melchy-Perez¹ | Rosario Vera-Estrella³ | Constance Auvynet¹ | Yvonne Rosenstein¹ 

¹Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

²Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

³Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

⁴División de Investigación Básica, Laboratorio de Epigenética del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, Mexico

Correspondence

Yvonne Rosenstein, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, MOR, Mexico.

Email: yvonne@ibt.unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Grant/Award Numbers: 220990, A1-S-15601; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant/Award Number: UNAM-PAPIIT IN212419

Abstract

Aberrant expression of CD43 in malignant tumors of nonhematopoietic origin such as those from lung, cervix, colon, and breast has been shown to correlate with poor prognosis, providing tumor cells with enhanced motility, anchorage-independent growth, and in vivo tumor size, while protecting the cells of NK lysis and apoptosis. To further characterize the role of CD43 in cell transformation, we tested whether interfering its expression modified the capacity of the A549 non-small cell lung cancer cells to secrete molecules contributing to malignancy. The proteomic analysis of the secretome of serum-starved A549 cells revealed that cells expressing normal levels of CD43 released significantly high levels of molecules involved in extracellular matrix organization, angiogenesis, platelet degranulation, collagen degradation, and inflammation, as compared to CD43 RNAi cells. This data reveals a novel and unexpected role for CD43 in lung cancer development, mainly in remodeling the tumor microenvironment.

KEYWORDS

angiogenesis, CD43, extracellular matrix, lung cancer, secretome

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; ECM1, extracellular matrix protein 1; ENA-78, epithelial neutrophil-activating peptide; GRO, growth-regulated protein; LC-MS/MS, liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LIF, leukemia inhibitory factor protein; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIF, macrophage migration inhibitory factor; MIP-1 β , macrophage inflammatory protein 1 beta; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; NF- κ B, nuclear factor κ B; NSCLC, non-small cell lung cancer; PDGF-D, platelet derived growth factor-D; p-I κ B- α , phospho NF- κ B inhibitor alpha; SCLC, small cell lung cancer; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TGF- β 2, transforming growth factor-beta 2; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinases 2; TME, tumor microenvironment; TNFR, tumor necrosis factor receptor; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase-type plasminogen activator; VEGF, vascular endothelial growth factor.

1 | INTRODUCTION

The intricate interactions between malignant and nontransformed cells create a complex tumor microenvironment (TME), where tumor cells thrive. The TME comprises cancer tumor cells, extracellular matrix (ECM), stromal tissue, immune cells, neuroendocrine cells, adipose cells, vascular and lymphatic networks, and their associated secretomes (Weber & Kuo, 2012). Particularly, the secretome of the tumor cells orchestrates the complexity and the changes of the TME to the tumor benefit (Patel et al., 2014), uncovering the TME for the discovery of new therapeutic targets.

The ECM is a remarkably dynamic meshwork that maintains tissue homeostasis. Dysregulation in its composition and structure results in an altered organization, changes in the biochemical and biomechanical properties, and the supply of growth factors, paving the road for tissue malignancy (Lu et al., 2012). ECM remodeling results from the combined action of matrix-degrading enzymes, the synthesis and deposition of collagen, elastin, fibronectin, laminins, and proteoglycans, among other molecules, secreted by ECM-dedicated cells like fibroblasts and myofibroblasts, and the tumor cells (Bonnans et al., 2014). In addition, tumor cells secrete chemokines, cytokines, and components of the complement system, molding the immune microenvironment to protect the tumor from complement attacks while building a pro-inflammatory milieu and counterbalancing the metastasis suppressive effects of the fibrinolytic system (Rutkowski et al., 2010; Setrerrahmane & Xu, 2017). Likewise, ECM remodeling fosters stromal cells and tumor cells to release growth factors that contribute to the development of new blood vessels, favoring tumor cell proliferation, survival, migration, and the colonization of new niches (Yadav et al., 2015).

CD43 (sialophorin, SPN), a Type I protein that participates in cell–cell adhesion, intracellular signaling, migration, proliferation, and apoptosis (Torres-Huerta et al., 2018) has long been considered to be a leukocyte-specific molecule. However, a growing number of publications report the aberrant expression of CD43 in non-hematopoietic tumors. Notably, the expression of CD43 in lung, cervix, colon, breast, and salivary gland tumors has been associated with malignancy (Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Santamaría et al., 1996). Overexpression of CD43 in mouse and human colon cancer cells lacking expression of the p53 or ARF tumor-suppressor proteins was reported to favor cell growth and colony formation while protecting the cells of TNF receptor family-mediated apoptosis and NK lysis (Fu et al., 2013; Kadaja-Saarepuu et al., 2008). We reported that in human lung-, cervix- and colon-derived tumor cells, CD43 cooperates with oncogenic signals, promoting cell transformation by abrogating contact inhibition of growth through Merlin phosphorylation and degradation (Camacho-Concha et al., 2013). Furthermore, CD43 was found to inhibit the homotypic adhesion of cancer cells, as well as cell adhesion to Type IV collagen and laminin, two components of the ECM (Park et al., 2012), and to favor adhesion to endothelial cells, promoting transendothelial migration (Fu et al., 2013).

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer, accounting for more than 80% of all lung cancers.

To date, there is no effective treatment for this form of cancer, and the overall 5-year survival is around 20% (NIH, 2020). Herein, we evaluated the potential role of CD43 to tailor the secretome of the human NSCLC A549 cells. Using a loss of function approach, we show that expression of CD43 in A549 cells favors the secretion of a number of molecules with overlapping functions in several biological processes related to TME remodeling: organization of the ECM, angiogenesis, collagen degradation, platelet degranulation, cell–cell adhesion, and the establishment of a pro-inflammatory milieu, that together contribute to defining a tumor's fitness.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Reagents, antibodies, and materials

Advanced Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, and glutamine were obtained from Gibco/Life Technologies. DMEM-low glucose was from Sigma. G418 was from Cayman Chemical Company. Nitrocellulose membranes were from GE Healthcare. The Fixable Viability Dye eFluor 780 and the HRP substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine were from eBiosciences. Western Lighting Plus-ECL substrate was from Perkin Elmer. The Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices were from Millipore. The anti-CD43 (H300), anti-MMP-2, anti-MMP-9 antibodies, and the MMP-2/MMP-9 Inhibitor II (2R)-N-hydroxy-3-phenyl-2-[(4-phenylphenyl)sulfonylamino]propanamide, were from Santa Cruz Biotechnology. The anti-actin antibody was from Biologend. The Human Cytokine Antibody Array C5 kit was from RayBiotech. Matrigel was from Corning Life Sciences. The human VEGF and IL-8 were from Peprotech. The ELISA Kit for fibrinogen, PGDF-D, and neuroserpin was obtained from Abcam, R&D Systems, and Peprotech, respectively.

2.2 | Cells

The human alveolar epithelial carcinoma cell line A549 (ATCC® CCL-185™) was obtained from the ATCC. Mycoplasma-free cells were grown in Advanced DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. For the collection of conditioned media, cells were grown in DMEM-low glucose without serum in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. Mycoplasma-free TeloHAEC cells (ATCC CRL-4052™) were obtained from the ATCC and grown following the ATCC protocol.

2.3 | RNA interference

A synthetic oligonucleotide encoding for an interfering RNA specific for the human CD43 mRNA (AA ATG GCC ACG CTT CTC CT) cloned into pSuper/EGFP plasmid was described previously

(Camacho-Concha et al., 2013). DraIII linearized DNA (5 μ g) was transfected and clones were obtained by G418 (800 μ g/ml) selection. GFP positive single clones were isolated and CD43 expression levels were evaluated by immunoblot or flow cytometry.

2.4 | SDS-PAGE and immunoblotting

Cells were lysed in 50 μ l of lysis buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 10 mM β -glycerophosphate, 200 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, and 50 μ g/ml antipain) for 15 min at 4°C. Lysates were spun at 17,000g for 10 min at 4°C; the supernatants were kept at -70°C until use. Lysates (30 μ g/lane) were resolved by SDS-PAGE and proteins were transferred onto 0.2 μ m nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% low-fat milk in TBS-T buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20). Primary antibodies and HRP-coupled secondary antibodies were diluted in 5% low-fat milk in TBS-T buffer. Proteins were visualized with Western Lighting Plus-ECL substrate according to the manufacturer's instructions, with a Molecular Imager Gel DocTMXR⁺ Imaging System (Bio-Rad); the densitometric analysis was performed with the ImageLab software (Bio-Rad, Version 5.2.1).

2.5 | Conditioned media sample preparation

A549 pSuper and CD43 RNAi cells grown to confluence in 10 cm tissue culture dishes were washed four times with pre-warmed PBS, and once with pre-warmed phenol red- and serum-free DMEM-low glucose medium before incubation in serum-free DMEM-low glucose medium for 48 h at 37°C and 5% CO₂. The conditioned medium was recovered, centrifuged at 400g at 4°C for 15 min and at 1500g for 15 min at 4°C to remove floating cells and cellular debris, and finally filtered through a 0.22 μ m filter. The conditioned medium (30 mL) was concentrated with Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices with a 3000-nominal-weight limit to a final volume of 1 ml. The protein concentration of samples was determined by Bradford protein assay (Kruger, 1994), before the addition of protease inhibitors (PMSF [1 mM], BGP [10 mM], NaF [10 mM], Na₃VO₄ [0.2 mM], DTT [2 mM]), and storage at -70°C until use.

2.6 | Cell viability assay

Cells were labeled with the Fixable Viability Dye eFluor 780 (50 μ l of a 1:10,000 dilution in PBS) at 4°C for 30 min in the dark, before flow cytometry analysis. Dimethyl sulfoxide (DMSO 30%) was used as a positive control for cell death. Samples were acquired with a BD FACSCanto II (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed with the FlowJo v10 software.

2.7 | Mass spectrometry (LC-MS/MS) and bioinformatics analysis

Proteins (30 μ g) from the concentrated supernatant in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, and 0.1% sodium deoxycholate) were precipitated with 72% trichloroacetic acid, followed by 90% acetone, vacuum-dried, and sent to the Proteomics Facility of the *Institut de Recherches Cliniques*. Proteins were reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and digested with trypsin. The resulting peptides were analyzed by nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS), as previously reported (Barkla et al., 2012).

The Scaffold software (version 3.6, Proteome Software, Inc.) was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. Mascot (Matrix Science Inc.) identifications required that ion scores be at least greater than the associated identity scores and 20, 15, and 15 for double, triple, and quadruple charged peptides. X! Tandem identifications required at least -log (expect) scores of greater than 2.0. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm (Keller et al., 2002). Proteins identifications were accepted if established at greater than 99% probability and contained at least two unique peptides (Nesvizhskii et al., 2003) and if present in at least $n-1$ replicates. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principle of parsimony. The exponentially modified protein abundance index (emPAI) value and Student's *t*-test were used to estimate fold-changes between experimental groups. A protein was considered differentially expressed if the difference was statistically significant ($p \leq 0.05$) and reached a fold change value of at least ± 2.5 . The enrichment analysis of functional annotation clustering based on biological process and cellular compartment was performed by Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.7, with an enrichment score ≥ 1.3 .

2.8 | Enzyme-linked immunosorbent assay

Fibrinogen, platelet-derived growth factor-D (PDGF-D), and neuroserpin concentrations were determined using commercially developed sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturers' instructions. We used serum-free DMEM-low glucose as negative control. The concentration of each target protein was determined according to a standard curve.

2.9 | Cytokine antibody array

Membranes of the Human Cytokine Antibody Array were incubated overnight at 4°C with the conditioned media from A549 pSuper or CD43 RNAi cells and the assay was performed according to the manufacturers' instructions. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence with a Molecular Imager Gel DocTMXR⁺ Imaging System.

Spots were quantified using the ImageJ software. For each spot, the net density gray level was determined by subtracting the background gray level from the negative control. After background subtraction, data were normalized according to positive control densities.

2.10 | Aortic ring assay

Aortic ring assay was performed as previously reported in Rodero et al. (2013) with some modifications. Briefly, BALB/c mice aorta rings (1 mm) embedded in Matrigel drops (50 μ l approximately) in 24-well plates containing Advanced DMEM supplemented with 5% FBS were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 3–4 days, after which the medium was replaced with pSuper or CD43 RNAi A549 cells conditioned media for 4 days. Explants were monitored daily for sprouting vessels for the next 4 days. Phase-contrast images of microvessel outgrowth were analyzed with the Image J software (Fiji, 2012; <https://fiji.sc/>). Outgrowth was calculated as follows: (outgrowth area at Day 4 of stimulus) – (outgrowth area at Day 0 of stimulus)/outgrowth area at Day 0 of stimulus.

2.11 | Tube formation assay

TeloHAEC cells were incubated with the pSuper or CD43 RNAi A549 cells conditioned media. The Image J software with the Angiogenesis Analyzer plugin (Carpentier, 2012) was used to quantify the tube network, measuring the following parameters: number of tubes; number of loops/meshes; number of nodes; number of loose extremities. The angiogenesis index was calculated as follows: [(number of tubes + number of meshes + number of nodes) – number of loose extremities]/100.

2.12 | Gelatin zymography

Enzymatic activity of the conditioned medium was checked by gelatin zymography as previously described (Kupai, 2011) with brief modifications. To confirm the presence of MMP-2/MMP-9, gels were incubated with 1 μ M MMP-2/MMP-9 Inhibitor II before the development process.

2.13 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6 software. The student's *t*-test was used for comparisons between two conditions. Differences with a $p \leq 0.05$ were determined as statistically significant. The LC-MS/MS and cytokine heat maps were generated with MultiExperiment Viewer Software (MeV), considering the number of peptides generated with emPAI index and with the normalized density gray levels, respectively. The unsupervised hierarchical clustering was done using a Manhattan distance metric and hierarchical clustering based on average linkage.

3 | RESULTS

3.1 | CD43 expression shapes the TME composition of A549 cells

The ability of tumors to change their environment is a fundamental property by which tumor cells acquire some of the functions necessary for tumor growth and metastatic dissemination (Weber & Kuo, 2012). To test whether CD43 expression could tailor the TME by subverting the composition of the secretome, we generated clones of A549 cells with reduced levels of expression of CD43 (CD43 RNAi) and control A549 cells transfected with the empty pSuper plasmid expressing endogenous levels of the CD43 molecule (pSuper; Figures 1a and S1). To mimic the reduced nutrients conditions of a rapidly growing tumor, once confluency was attained, the tissue culture medium was switched to serum-free, low glucose medium, and cells were cultured for 48 h more, a time-point at which cell viability remained >85% (Figure 1b). Since the transcription of numerous cytokines, growth factors, chemokines is under the control of STAT3 and NF- κ B, two transcription factors highly expressed by tumor cells, and particularly NSCLC cells (Gu et al., 2018; Mohrher et al., 2020), we evaluated their activation status in the pSuper and CD43 RNAi A549 cells. Interestingly, pSuper A549 cells had significantly more pSTAT3 Y⁷⁰⁵ and more p-I κ B- α than the CD43 RNAi A549 cells (Figure 1c).

As a first approach to comparing the secretome composition between nutrient-deprived A549 pSuper and CD43 RNAi cells, the secretomes were screened with a human cytokine antibody array. A549 pSuper cells secreted significantly higher amounts of IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2), and ENA-78 (CXCL5; $p < 0.05$), as compared to A549 CD43 RNAi cells (Figure 2a). Although statistical significance was not reached, A549 pSuper secreted more GRO, GRO-alpha (CXCL1), and angiogenin than the CD43 RNAi cells. Independent of the expression level of CD43, cells released equivalent amounts of MIP-1 β (CCL4), TGF β 2, TIMP1 and TIMP2, osteopontin, RANTES (CCL5), MIF, LIF, oncostatin M (Figures S2 and S3), consistent with previous reports on the secretory capacity of A549 cells (Cai et al., 2009; Holownia et al., 2016).

To further evaluate the capacity of CD43 to shape the composition of the secretome of A549 cells, the supernatants of A549 pSuper and CD43 RNAi cells cultured under the same nutrient deprivation conditions as above were concentrated as described in Section 2.5 and subjected to a label-free LC-MS/MS analysis. A total of 645 proteins were identified across three pSuper, and five CD43 RNAi independent clones (Table S1), a yield consonant with similar studies with mammalian cells (Brown et al., 2012), and reports on the secretome of A549 (S. Li et al., 2014; Luo et al., 2011; Mossina et al., 2017; Shin et al., 2017). Although we detected only 7 cytokines by LC-MS/MS (ENA-78, GRO, TIMP-1, TIMP-2, angiogenin, osteopontin, and TGF- β 2) out of the 15 identified with the cytokine array, the trend was the same, independent of the technique, except for GRO (Figure S4). The low recovery of cytokines-derived peptides in the LC-MS/MS analysis may reflect the loss of low molecular components resulting of the sample preparation protocol as well as of the

scarcity of peptides for identification by LC-MS/MS (lack of sufficient peptide coverage) due to the low molecular weight and low abundance of these molecules.

One hundred and seven proteins were differentially expressed ($p < 0.05$) among conditions, with a fold change ≥ 2.5 in either direction (Table S2), segregating into two independent clusters when submitted to an unsupervised hierarchical clustering analysis (Figure 2b). Specifically, 57 proteins were upregulated, and 50 were downregulated in A549 pSuper cells as compared to A549 CD43 RNAi cells. In addition, 12 proteins were uniquely expressed in

pSuper cells, and 16 proteins were exclusively found in CD43 RNAi cells (Table S3). The functional enrichment analysis revealed that *extracellular region* was the most overrepresented cellular compartment, with more than 85.76% of the proteins identified belonging to the extracellular region and an enrichment score of 240.91.

pSuper A549 cells secreted more Type V collagen, providing a reservoir for fibrogenic molecules, preparing the tumor invasion and metastasis path. Interfering the expression of CD43 in A549 cells resulted in the diminished secretion of three enzymes (arylsulfatase-B, alpha-L-iduronidase precursor, and iduronate 2-sulfatase) of the catabolic pathway of chondroitin sulfate, a glycosaminoglycan present in the ECM that participates in cell adhesion and growth, receptor binding, and in cell migration. The ganglioside synthetic pathway was also more enriched in the pSuper A549 cells supernatants, highlighting a role for CD43 in regulating the synthesis of molecules associated with cell-cell recognition, adhesion, and signal transduction. pSuper A549 cells secreted more molecules associated with platelet degranulation such as ECM1 (extracellular matrix protein 1), fibrinogen, thrombospondin-1, apolipoprotein H, transferrin, and SVEP1 (Sushi, von Willebrand factor type A, EGF, and pentraxin domain-containing protein 1) than the CD43 RNAi A549 cells, favoring a pro-thrombotic environment and platelet activation and degranulation, promoting angiogenesis, extravasation and survival in the bloodstream, and proliferation of the tumor cells. pSuper A549 cells secreted also more C5, and more of the complement regulators CD59, vitronectin, and clusterin than the CD43 RNAi A549 cells. Overall, this data points out that expressing CD43 enables A549 cells to secrete molecules that will modify the extracellular milieu of the tumor.

To gain a deeper understanding of the biological differences between groups, we combined the list of the proteins differentially expressed by LC-MS/MS with the cytokines data to perform an enrichment analysis based on biological functions. ECM organization was the most over-represented biological process with an enrichment score of 5.73, followed by angiogenesis (4.39), collagen catabolic process (3.93), chondroitin sulfate catabolic process (3.16), platelet degranulation (2.54), regulation of cell growth (2.32), ganglioside biosynthetic process (1.82), cellular response to interleukin-1 (1.65), proteolysis (1.63), and cell-cell adhesion (1.30; Figure 2c and Table 1).

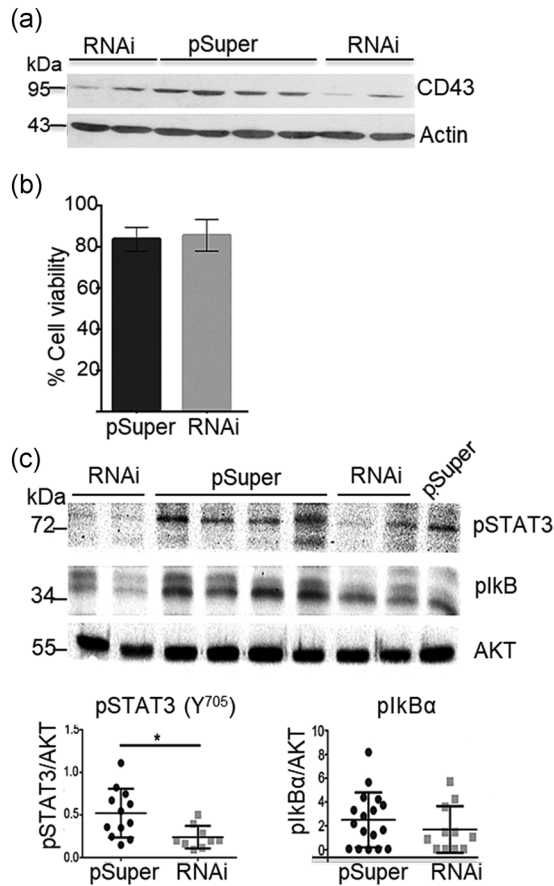


FIGURE 1 CD43 promotes STAT3 and NF- κ B activation in nutrient-deprived A549 cells. (a) The expression of CD43 in A549 lung tumor cells transfected with the pSuper vector (pSuper) or the CD43 RNAi pSuper vector (CD43 RNAi) was evaluated by immunoblot with the H300 anti-CD43 antibody. Actin levels are used as loading control. (b) Viability of pSuper and CD43 RNAi A549 cells grown to confluence in Advanced DMEM and further cultured in serum-free, low glucose (1 mg/ml) DMEM for 48 h. A positive staining with the Fixable Viability Dye eFluor 780 was considered as cell death marker. (c) pSTAT3 Y⁷⁰⁵ and NF- κ B activation, as measured by the phosphorylation status of I κ B- α , were evaluated by immunoblot in total cell lysates from pSuper and CD43 RNAi A549 cells grown to confluence in Advanced DMEM and cultured for 48 h in serum-free, low glucose (1 mg/ml) DMEM. AKT was used as loading control. Data from two independent experiments with four pSuper and four independent CD43 RNAi A549 clones are shown as mean \pm SD, * $p \leq 0.05$. DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

3.2 | Endogenous levels of CD43 favor the secretion of angiogenic factors

To validate the LC-MS/MS results, we measured the concentration of fibrinogen, PDGF-D, and neuroserpin, three molecules that participate in migration, proliferation, invasion, and angiogenesis in lung cancer, specifically in NSCLC and A549 cells (LaRochelle et al., 2002; Sahni et al., 2008; Valiente et al., 2014). The ELISA results obtained with the supernatants of 48-h postconfluence, starved, A549 pSuper, and CD43 RNAi clones (different from the clones used for the proteomic analysis) demonstrated that the expression level of fibrinogen, PDGF-D, and neuroserpin followed the same trend as detected

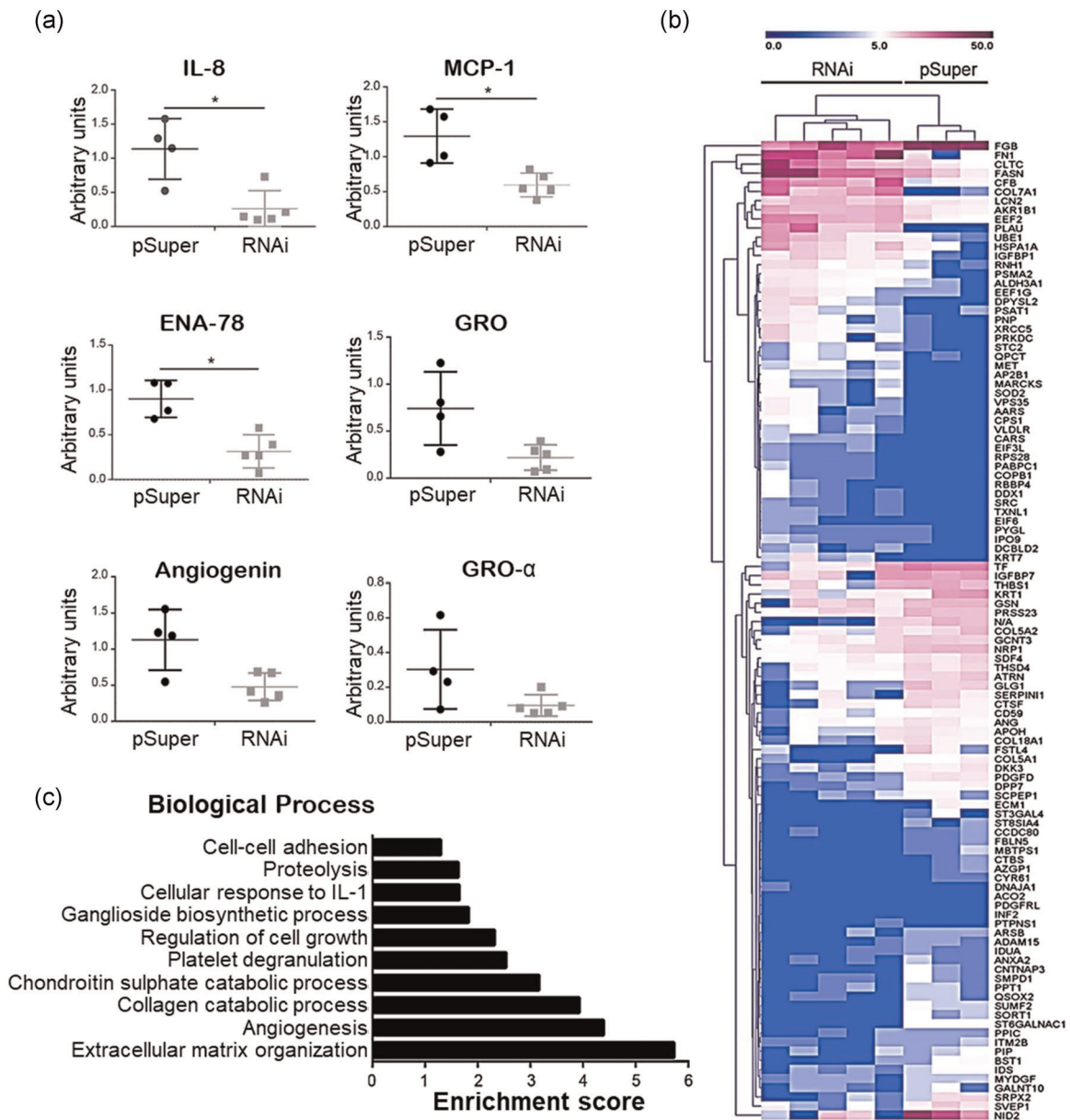


FIGURE 2 CD43 expression levels modulate protein secretion in A549 cells. (a) Cytokines and chemokines secretion. The supernatants of pSuper and CD43 RNAi A549 cells grown to confluence in Advanced DMEM and cultured for 48 h in serum-free and low glucose (1 mg/ml) DMEM were collected and analyzed with a human cytokine antibody array. Data from four pSuper and five independent CD43 RNAi clones are shown as mean \pm SD, $*p \leq 0.05$. (b) Heat map of unsupervised hierarchical clustering (Manhattan distance metric and hierarchical clustering based on average linkage) of differentially expressed proteins identified by LC-MS/MS (fold change ≥ 2.5 , $p \leq 0.05$) in the conditioned media of five CD43 RNAi and three pSuper independent clones of A549 cells. The color scale indicates the relative abundance of peptides in samples, blue indicates low expression, and purple high expression. (c) Enrichment score of GO biological processes regulated by the differentially expressed proteins from the cytokine antibody array and LC-MS/MS (fold change ≥ 2.5 , $p \leq 0.05$). p values for all experiments were calculated with the Student's t -test

with the LC-MS/MS data. The secretomes of the pSuper clones contained significantly higher amounts of these three proteins as compared to those of the CD43 RNAi clones (Figure 3a), supporting a role for CD43 in the secretion of molecules that promote tumor cell growth, angiogenesis, migration, invasion, and metastasis.

Because angiogenesis was the second most over-represented biological process, we assessed the angiogenic capacity of conditioned media from A549 pSuper and CD43 RNAi cells. First, we

evaluated microvessel sprouting around mouse aortic rings embedded in Matrigel. In agreement with the differences in the abundance of angiogenic factors and their relative proportions, pSuper A549 cells conditioned media supported microvessel sprouting significantly better ($p < 0.05$) than that of A549 CD43 RNAi cells (Figure 3b), and that IL-8 or VEGF controls (Figure S5).

To further assess the angiogenic potential of the pSuper versus CD43 RNAi A549 cells conditioned media, we compared their capacity

TABLE 1 Differentially expressed proteins between A549 pSuper and CD43 RNAi cells grouped by enriched biological processes

Biological process	Gene	Protein (human)
Angiogenesis	<i>RNH1</i>	Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1
Angiogenesis	<i>MYDGF</i>	Chromosome 19 open reading frame 10
Angiogenesis	<i>PDGFD</i>	Spinal cord-derived growth factor-B
Angiogenesis	<i>ANG</i>	Angiogenin
Angiogenesis	<i>NRP1</i>	Neuropilin 1
Angiogenesis	<i>SRPX2</i>	Sushi-repeat-containing protein, X-linked 2
Angiogenesis	<i>CXCL1</i>	Growth-regulated alpha protein
Angiogenesis	<i>CXCL5</i>	C-X-C motif chemokine 5
Angiogenesis/ECM organization/collagen catabolic process	<i>COL5A1</i>	Collagen, Type V, alpha 1
Angiogenesis/ECM organization/collagen catabolic process	<i>COL18A1</i>	Type XVIII collagen long variant
Angiogenesis/ECM organization/platelet degranulation	<i>FN1</i>	Fibronectin 1
Angiogenesis/ECM organization/platelet degranulation	<i>ECM1</i>	Extracellular matrix protein 1
Angiogenesis/ECM organization/platelet degranulation	<i>APOH</i>	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)
Angiogenesis/ECM organization/regulation of cell growth	<i>CYR61</i>	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
Angiogenesis/ECM organization/regulation of cell growth	<i>FBLN5</i>	Fibulin 5
Angiogenesis/ECM organization/proteolysis	<i>PLAU</i>	Urokinase-type plasminogen activator, partial
Angiogenesis/ECM organization/cell-cell adhesion	<i>ANXA2</i>	Annexin A2
Angiogenesis/ECM organization/complement system	<i>KRT1</i>	Keratin 1
Angiogenesis/collagen catabolic process/proteolysis	<i>ADAM15</i>	Metalloproteinase-like, disintegrin-like, and cysteine-rich protein 15
Angiogenesis/platelet degranulation/response to IL-1	<i>FGB</i>	Fibrinogen beta chain
Angiogenesis/response to IL-1	<i>CCL2</i>	C-C motif chemokine 2
Angiogenesis/response to IL-1	<i>CXCL8</i>	Interleukin-8
ECM organization	<i>PRKDC</i>	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
ECM organization	<i>CLTC</i>	Clathrin, heavy polypeptide (Hc)
ECM organization	<i>CCDC80</i>	Coiled-coil domain containing 80
ECM organization	<i>NID2</i>	Nidogen 2 (osteonidogen)
ECM organization/collagen catabolic process	<i>COL7A1</i>	Collagen, Type VII, and alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant, and recessive)
ECM organization/collagen catabolic process	<i>COL5A2</i>	Collagen alpha-2(V) chain
ECM organization/platelet degranulation	<i>THBS1</i>	Thrombospondin-1
ECM organization/regulation of cell growth	<i>IGFBP1</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 1
ECM organization/proteolysis	<i>THSD4</i>	Thrombospondin Type-1 domain-containing protein 4

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Biological process	Gene	Protein (human)
ECM organization/cell–cell adhesion	<i>EEF2</i>	EEF2 protein
Chondroitin sulfate catabolic process	<i>ARSB</i>	Arylsulfatase B
Chondroitin sulfate catabolic process	<i>IDUA</i>	alpha-L-iduronidase precursor
Chondroitin sulfate catabolic process	<i>IDS</i>	Iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)
Platelet degranulation	<i>TF</i>	Chain A, Apo-Human Serum Transferrin (Glycosylated)
Platelet degranulation	<i>SVEP1</i>	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF, and pentraxin domain-containing protein 1
Regulation of cell growth	<i>IGFBP7</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 7
Ganglioside biosynthetic process	<i>ST8SIA4</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4
Ganglioside biosynthetic process	<i>ST6GALNAC1</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1
Ganglioside biosynthetic process	<i>ST3GAL4</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4
Response to IL-1	<i>LCN2</i>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
Proteolysis	<i>CPS1</i>	Carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial
Proteolysis	<i>CTSF</i>	Cathepsin F
Proteolysis	<i>DPP7</i>	Dipeptidyl-peptidase 7
Proteolysis	<i>MBTPS1</i>	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1
Proteolysis	<i>PIP</i>	Prolactin-induced protein, partial
Proteolysis	<i>PRSS23</i>	Protease, serine, 23
Cell–cell adhesion	<i>EEF1G</i>	Elongation factor 1-gamma
Cell–cell adhesion	<i>FASN</i>	Fatty acid synthase
Cell–cell adhesion	<i>HSPA1A</i>	Heat shock 70 kDa protein 1A
Complement system	<i>CD59</i>	Cd59
Complement system	N/A	cDNA FLJ51597, highly similar to C4b-binding protein alpha chain
Complement system/proteolysis	<i>CFB</i>	Complement factor B

Note: GO terms in the biological process category with an enrichment score ≥ 1.3 are shown. Differentially expressed proteins were considered if they have a fold change ≥ 2.5 and $p \leq 0.05$ (Student's *t*-test).

to induce the formation of capillary-like tubes. TeloHAEC cells cultured with pSuper-derived conditioned media formed significantly more tubes, more loops, more branching points, and less loose extremities than cells cultured in CD43 RNAi-derived conditioned media, with an angiogenesis index of 6.38 versus 4.59 (Figures 3c and S6). Altogether, this data indicates that when expressing endogenous levels of CD43, A549 cells secrete several molecules that promote angiogenesis, suggesting that CD43 participates in the signaling pathways affecting the synthesis and/or secretion of angiogenic molecules.

3.3 | Silencing CD43 compromises the ability of A549 cells to secrete MMP-2 and MMP-9

The expression levels of the gelatinases MMP-2, MMP-9, and urokinase-type plasminogen activator (uPA) are associated with pathological staging, invasion, angiogenesis, and metastasis in NSCLC

(Merchant et al., 2017; Offersen et al., 2007). Although we did not detect MMPs in the secretomes, yet considering that all clones secreted comparable amounts of TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases 2; Figure S2) and that ECM remodeling was the most enriched biological function in the secretomes of pSuper A549 cells, we evaluated whether down-modulating the expression level of CD43 in A549 cells modified the amounts of MMP-2 and MMP-9 secreted to the conditioned media.

The gelatinase zymograms revealed that the conditioned media of the pSuper A549 clones contained two gelatinolytic proteins, one that migrated at 62 and the other at 82 kDa, that correspond to MMP-2 and MMP-9, as shown by inhibition with a specific MMP-2/MMP9 inhibitor (Figure 4a) and immunoblot (Figure S7). In contrast, the conditioned media of the CD43 RNAi A549 clones contained only traces of MMP-2, while MMP-9 was undetectable in most samples analyzed. Accordingly, there was a positive correlation between the expression level of CD43 of all A549 clones tested and

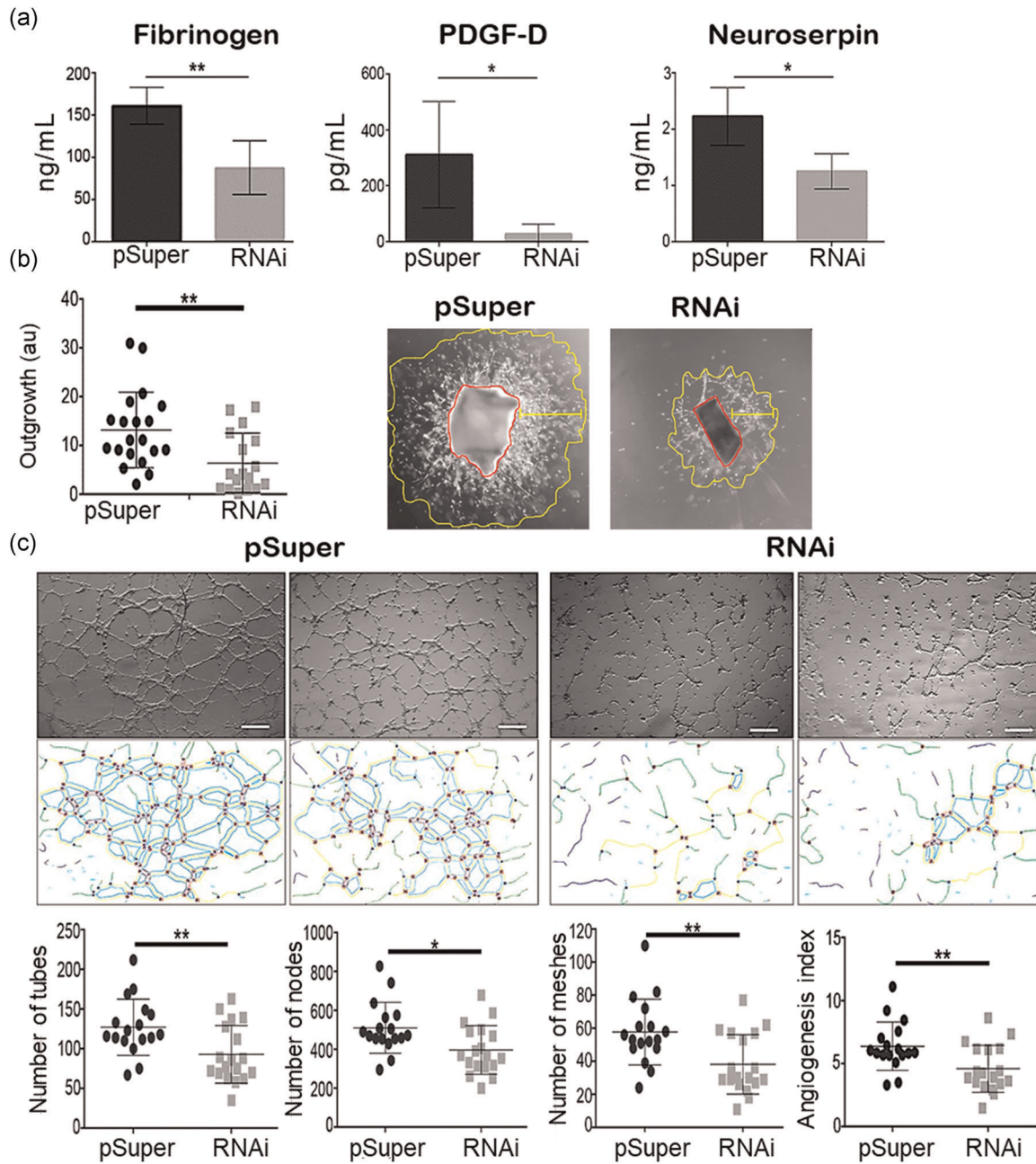


FIGURE 3 CD43 expression favors the secretion of angiogenic proteins to the tumor microenvironment in A549 cells. (a) Levels of fibrinogen, PDGF-D, and neuroserpin in the conditioned media of pSuper and CD43 RNAi A549 cells. Supernatants were collected, concentrated (25 times), and analyzed by ELISA. Data from three independent experiments with at least three independent clones are shown as mean \pm SD, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$. (b) *Left panel*: Quantification of the sprouting area from aortic rings incubated with the conditioned media of pSuper or CD43 RNAi A549 cells for 4 days. Vessel formation was quantified by measuring the area of vessel-like extensions sprouting from the explants with the ImageJ software. The supernatants of 20 pSuper and 17 CD43 RNAi independent clones were tested by at least duplicates. *Right panel*: Representative photomicrographs of aortic rings incubated with pSuper or CD43 RNAi A549 conditioned media showing vessel sprouting out of the aortic ring (magnification 5 \times). The outgrowth area between the vessel growth front (yellow ring) and the base of the aortic ring (red ring) was measured as indicated. (c) *Upper panel*: Representative images of tube formation by TeloHAEC cells. Cells (20,000 cells/well), were seeded on Matrigel-coated 96-well plates and incubated with pSuper or CD43 RNAi A549 conditioned media for 6 h at 37°C and 5% CO₂. Scale bar = 500 μ m. *Lower panel*: Number of tubes, nodes, meshes, and angiogenesis index in equivalent area of cells incubated with pSuper or CD43 RNAi A549 cells conditioned media. Data shown in (b) and (c) represent the mean \pm SD of three independent experiments with at least three independent clones of pSuper or CD43 RNAi A549 cells. * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$. p values for all experiments were calculated with the Student's t -test

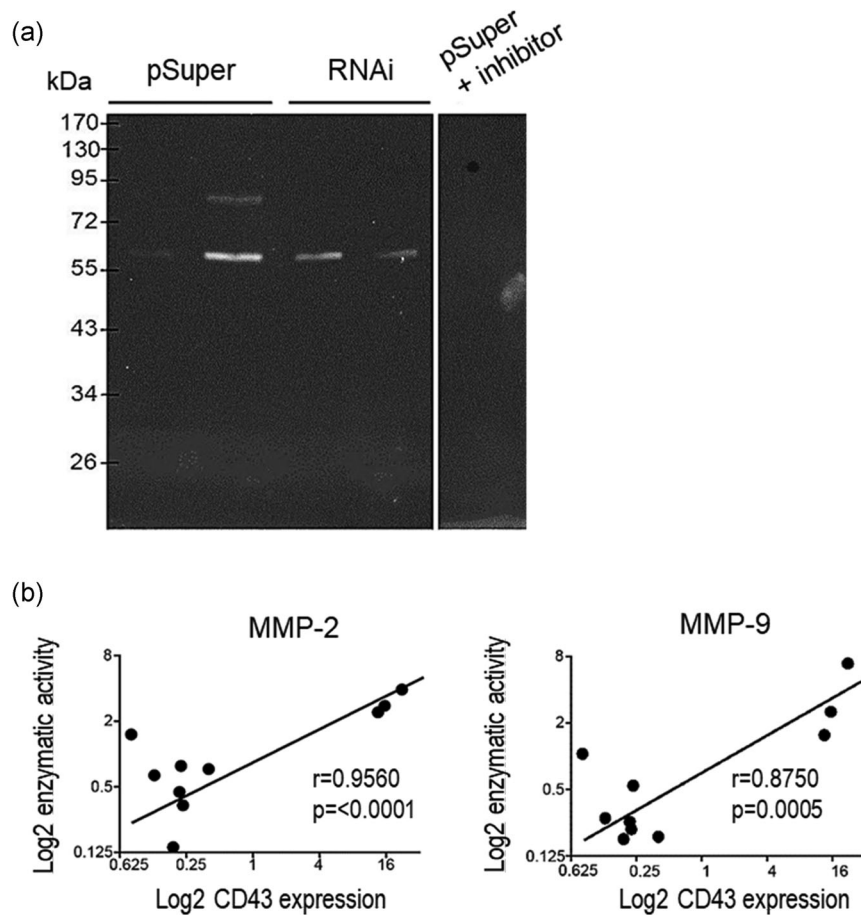


FIGURE 4 CD43 expression level correlates with the gelatinase activity of MMP-2 and MMP-9. (a) Conditioned media (50 μ g) from pSuper or CD43 RNAi A549 cells were mixed with nonreducing sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 4% SDS, and 0.1% bromophenol blue) and electrophoresed on ice for 2.5 h at 90 V on 8% SDS-PAGE gels containing gelatin (1 mg/ml), as an MMP substrate. Gels were washed three times in 2.5% v/v Triton X-100 and incubated in development buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) for 20 h at 37°C, stained with Coomassie Blue, and destained until white bands were visualized under the blue background. To confirm the presence of gelatinases, pSuper supernatant zymograms were treated with the MMP-2/MMP-9 Inhibitor II (1 μ M). (b) Correlation between CD43 expression and gelatinase activity in pSuper and RNAi supernatants. CD43 expression was evaluated by flow cytometry, and data are shown as the log₂ of MFI

that of MMP-2 and MMP-9 (Figure 4b). These results are consistent with previous reports indicating that A549 cells express more MMP-2 than MMP-9 (Roomi et al., 2009), and point at a role for CD43 in promoting the secretion to the extracellular milieu of two of the key MMPs for ECM degradation and remodeling in NSCLC.

4 | DISCUSSION

CD43 has been reported to enhance the tumorigenic capacity of nonhematopoietic tumors, underscoring a role for this molecule in cancer development (Camacho-Concha et al., 2013; Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Fu et al., 2013). Considering that the secretome of tumor cells plays an essential role in tumor development (Patel et al., 2014) and that the majority of SCLC (small cell lung cancer) and NSCLC tumors express CD43 (Fu et al., 2013), we hypothesized that CD43 expression grants a transforming advantage to tumor cells by shaping the secretome of A549 cells. To test this

hypothesis, we generated clones of A549 cells with normal (pSuper) or reduced (CD43 RNAi) expression of CD43. Notably, in addition to the considerable interclonal heterogeneity resulting from the capacity of A549 cells to reversibly acquire mesenchymal or epithelial traits, affecting the morphology and the tumorigenicity (Bechyne et al., 2012; Croce et al., 1999), we could not achieve more than 60%–70% reduction in CD43 expression in the A549 CD43 RNAi cells, underlining a role for CD43 in granting advantages to cancer cells.

We compared the secretome composition of post-confluent A549 cells expressing normal (pSuper) or reduced expression of CD43 (CD43 RNAi) starved for 48 h. Consistent with a secretome, the majority (85.76%) of the proteins belonged to the “extracellular region.” While most proteins identified are released to the extracellular space by classical (via Golgi apparatus) or nonclassical pathways (via Golgi-independent) mechanisms, we found proteins considered to be cytoplasmic, possibly secreted by unconventional mechanism (Brown et al., 2012). Among those, we detected HSP90 α ,

annexin A2, calreticulin, triosephosphate isomerase, glucose-6-phosphate isomerase, lactate dehydrogenase, and PKM2 (pyruvate kinase M2), all of which have been reported in the extracellular milieu of different tumors, where they acquire novel functions, participating in the activation of pro-enzymes and the selective degradation of ECM, tumor angiogenesis, cell adhesion, migration and invasion (Butler & Overall, 2009; Johnson et al., 2001; L. Li et al., 2014; Li et al., 2012; Lokman et al., 2011).

A549 pSuper clones released increased levels of a number of proteins associated with TME and ECM remodeling, compared to CD43 RNAi clones. The two most overrepresented biological processes affected were *ECM organization* and *angiogenesis*, followed by *collagen catabolic process*, *chondroitin sulfate catabolic process*, *platelet degranulation*, *regulation of cell growth*, *ganglioside biosynthetic process*, *cellular response to interleukin-1*, *proteolysis*, and *cell-cell adhesion*, supporting a role for CD43 to bolster architectural changes of the TME.

A549 pSuper cells secreted more type V collagen, a fibrillar collagen that contributes to tissue scaffold. Consistent with the fact that type V collagen binds to heparan sulfate, thrombospondin, and insulin, serving as a reservoir for fibrogenic molecules (Fichard et al., 1995). A549 pSuper cells secreted more insulin-like growth factor binding protein 7, a protein that regulates the availability of insulin-like growth factor, and more thrombospondin, a protein involved in tumor progression, than CD43 RNAi A549 cells. Silencing CD43 also negatively affected the secretion of proteins that directly participate in ECM remodeling, such as nidogen-2 and ECM1, among others. Interestingly, nidogen-2 gene methylation (Feng et al., 2018) and the presence of ECM1 in the serum have been proposed as biomarkers of NSCLC patients (Niu et al., 2019).

Biopsies of NSCLC contain significantly more heparan sulfate and chondroitin sulfate than normal lung samples (Rangel et al., 2018), which, together with shed gangliosides, contribute to modulate cell growth and angiogenesis. Interfering the expression of CD43 in A549 cells resulted in the diminished secretion of three enzymes of the catabolic pathway of chondroitin sulfate, potentially affecting the availability of this sulfated glycosaminoglycan that binds to proangiogenic growth factors and cytokines such as VEGF-A, TGF- β , and PDGF-B (Jan et al., 2012). Furthermore, in line with metastatic NSCLC tumors expressing high levels of ST8SIA4 (Pearce & Läubli, 2016), pSuper A549 cells expressed higher levels of three sialyltransferases (ST3Gal, ST6GalNAc, and ST8SIA4) that participate in the ganglioside synthetic pathway than CD43 RNAi A549 cells.

Activated platelets stimulate tumor growth, prepare metastatic niches and help tumor cells survive in the circulation by secreting proteins that strengthen their adhesive interaction with ECM components, actively participating in ECM remodeling, and angiogenesis (Menter et al., 2014). pSuper A549 cells secreted more molecules associated with platelet degranulation such as ECM1, fibrinogen, thrombospondin-1, apolipoprotein H, transferrin, and SVEP1 than the CD43 RNAi A549 cells, implicating CD43 in regulating the expression level of those molecules in NSCLC. Consistent with previous

studies in NSCLC cancer cells and A549 cells (Ajona et al., 2004), pSuper A549 cells secreted more C5 and more MAC insertion inhibitors (CD59, vitronectin, and clusterin) than the CD43 RNAi A549 cells. Whether a sublytic density of the MAC complex protects the A549 cells of complement-mediated cell lysis and instead promotes proliferation and differentiation remains to be investigated. Overall, this data points out that expressing CD43 enables A549 cells to secrete molecules that will modify the tumor extracellular milieu.

Chemokines and cytokines play a crucial role in tumor development, promoting tumor growth, angiogenesis, and metastasis, as well as the infiltration of immune cells to the tumor microenvironment, contributing to a chronic inflammation milieu (Smyth et al., 2004). Consistent with this, and with a previous report indicating that the conditioned media of A549 cells contained a number of pro-inflammatory cytokines (Cai et al., 2009; Holownia et al., 2016), A549 pSuper cells secreted significantly more CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), and ENA 78 (CXCL5) than CD43 RNAi cells. These cytokines contribute to angiogenesis, and their expression has been associated with a poor prognosis in lung cancer (Rivas-Fuentes et al., 2015). Accordingly, the A549 pSuper cells supernatants promoted tube formation from the human aortic endothelial cell line and the sprouting of vessels in the aortic ring model more vigorously than the CD43 RNAi A549 cells supernatants, supporting a role for CD43 in modulating the inflammatory milieu and the angiogenic capacity of NSCLC cells, feeding the IL-1 β signaling pathway, which correlates with poor prognosis (Li et al., 2020).

In agreement with reports indicating that breast and lung adenocarcinomas metastatic tumor cells produced the plasminogen activator inhibitors neuroserpin and serpin B2 (Valiente et al., 2014), pSuper A549 cells secreted more neuroserpin than the CD43 RNAi cells. Neuroserpin has been shown to protect brain cancer cells from FasL-mediated cell death, promoting cancer cell survival (Valiente et al., 2014), in agreement with A549 cells being more resistant to TNFR-mediated cell death (Fu et al., 2013). Moreover, by inhibiting uPA (urokinase-type plasminogen activator), tPA, and plasmin, members of the serpin family participate in the ECM breakdown and remodeling, facilitating invasion, and metastasis (Fortenberry, 2015). In line with a more robust capacity to remodel the ECM and the TME, A549 pSuper cells secreted more MMP2 and MMP9 than the CD43 RNAi A549 cells. In addition to ECM disassembly and remodeling, the MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases release growth factors, cytokines, and matrix fragments that modulate the viability, angiogenesis, the metastatic potential of the tumor cells, and the tumor immune environment. Elevated expression of MMP-2 and MMP-9 has been shown to correlate with a likelihood of cancer metastasis and resistance to chemotherapy of NSCLC (Merchant et al., 2017).

The majority of NSCLC patient samples and cell lines harbor persistent STAT3 activation, and high intra-tumoral pSTAT3 levels correlate with the advanced disease stage (Mohrher et al., 2020). The constitutive activation of STAT3 is associated with evasion of apoptosis, enhanced cell proliferation, metastasis, angiogenesis, and the establishment of a tumor-promoting inflammatory milieu,

regulating the transcription of a plethora of genes involved in each of these processes (Dutta et al., 2014). Consistent with a role for CD43 in shaping the TME through STAT3 signaling, pSuper A549 cells had significantly more pSTAT3 Y⁷⁰⁵ than the CD43-RNAi A549 cells.

Overall, in addition to abrogate merlin-mediated contact inhibition of growth, Fas-dependent apoptosis, favoring resistance to NK lysis and tumor growth (Camacho-Concha et al., 2013; Fu et al., 2013), our data suggests that expressing CD43 enables NSCLC cells to secrete a number of molecules with overlapping functions in biological processes associated to malignancy such as ECM remodeling, migration, invasion, angiogenesis and inflammation. All these biological processes are interconnected and are fundamental to establish a microenvironment favorable to tumor survival and progression. How CD43 achieves this remains to be established as, different to lymphoid cells, in NSCLC and SCLC cells, CD43 is exclusively an intracellular protein, present in the cytoplasm and the nucleus (Fu et al., 2013), probably performing different functions with different partners in either compartment. Interestingly, the Hippo pathway has been shown to participate in regulating genes associated with ECM organization and angiogenesis in NSCLC (Shreberk-Shaked et al., 2020). Whether this pathway is one of the mechanisms by which CD43 participates in remodeling the tumor microenvironment remains to be investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

This study is submitted in partial fulfillment of the requirements for the doctoral degree of the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM of Daniela Vega-Mendoza. The authors thank Dr. Roberto González Amaro, Dr. Simon Shelley, Dr. José Ignacio Veytia and members of the Rosenstein Lab for valuable comments and critical reading of the manuscript. The authors thank Drs. Elizabeth Mata and Graciela Cabeza for animal husbandry, and Dr. Denis Faubert and his team at Institut de Recherches Cliniques de Montréal-Proteomics Discovery Platform for MS analysis. Daniela Vega-Mendoza and Alicia Cañas-Linares were supported by scholarships from CONACYT (366442 to Daniela Vega-Mendoza; 482307 to Alicia Cañas-Linares) and DGAPA/UNAM (Alicia Cañas-Linares). This study was funded by Grants 220990 and A1-S-15601 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Grant UNAM-PAPIIT IN212419 from the Dirección General de Apoyo al Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA/UNAM) to Yvonne Rosenstein.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Daniela Vega-Mendoza designed and performed the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. Alicia Cañas-Linares performed experiments and reviewed the manuscript. Erika Melchy-Perez oversaw and participated in all the cytometric analysis. Ángel Flores-Alcantar and Roberto Espinosa-Neira contributed to the experimental design and to the initial review of the literature. Rosario

Vera-Estrella contributed to the proteomic data analysis and Constance Auvynet to data analysis and review of the manuscript. Yvonne Rosenstein contributed to experimental design, data analysis, manuscript writing, and led the study.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated and analyzed during this study are included in this manuscript, as supplementary information files.

ORCID

Yvonne Rosenstein  <http://orcid.org/0000-0003-4040-4256>

REFERENCES

- Ajona, D., Castaño, Z., Garayoa, M., Zudaire, E., Pajares, M. J., Martinez, A., Cuttitta, F., Montuenga, L. M., & Pio, R. (2004). Expression of complement factor H by lung cancer cells: Effects on the activation of the alternative pathway of complement. *Cancer Research*, 64(17), 6310–6318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2328>
- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., & Pantoja, O. (2012). Protein profiling of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Proteomics*, 12(18), 2862–2865. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200152>
- Bechyne, I., Szpak, K., Madeja, Z., & Czyż, J. (2012). Functional heterogeneity of non-small lung adenocarcinoma cell subpopulations. *Cell Biology International*, 36(1), 99–103. <https://doi.org/10.1042/cbi20110151>
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Brown, K. J., Formolo, C. A., Seol, H., Marathi, R. L., Duguez, S., An, E., Pillai, D., Nazarian, J., Rood, B. R., & Hathout, Y. (2012). Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. *Expert Review of Proteomics*, 9(3), 337–345. <https://doi.org/10.1586/epr.12.21>
- Butler, G. S., & Overall, C. M. (2009). Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(12), 935–948. <https://doi.org/10.1038/nrd2945>
- Cai, Z., Chen, Q., Chen, J., Lu, Y., Xiao, G., Wu, Z., Zhou, Q., & Zhang, J. (2009). Monocyte chemotactic protein 1 promotes lung cancer-induced bone resorptive lesions in vivo. *Neoplasia*, 11(3), 228–236. <https://doi.org/10.1593/neo.81282>
- Camacho-Concha, N., Olivos-Ortiz, A., Nuñez-Rivera, A., Pedroza-Saavedra, A., Gutierrez-Xicotencatl, L., Rosenstein, Y., & Pedraza-Alva, G. (2013). CD43 promotes cells transformation by preventing merlin-mediated contact inhibition of growth. *PLOS One*, 8(11): e80806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080806>
- Carpentier, G. (2012). Angiogenesis analyzer for imageJ. *ImageJ News*. <http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&lang=en>
- Croce, M. V., Colussi, A. G., Price, M. R., & Segal-Eiras, A. (1999). Identification and characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell line (A549). *Pathology Oncology Research*, 5(3), 197–204. <https://doi.org/10.1053/paor.1999.0212>
- Dutta, P., Sabri, N., Li, J., & Li, W. X. (2014). Role of STAT3 in lung cancer. *JAK-STAT*, 3(4):e999503. <https://doi.org/10.1080/21623996.2014.999503>
- Feng, X., Xie, X., Zheng, B., Peng, C., Zhou, H., & Qin, J. (2018). The more potential performance of nidogen 2 methylation by tissue or plasma DNA over bronchoalveolar lavage DNA in diagnosis of nonsmall cell lung cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(9), 341–346. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.235352>
- Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C. X., Laos, S., Baekström, D., Sikut, A., Sikut, R., & Hansson, G. C. (2002). The leukocyte antigen

- CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumor Biology*, 23(4), 193–201. <https://doi.org/10.1159/000067252>
- Fichard, A., Kleman, J.-P., & Ruggiero, F. (1995). Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biology*, 14(7), 515–531. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(05\)80001-0](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(05)80001-0)
- Fortenberry, Y. (2015). The role of serpins in tumor cell migration. *Biological Chemistry*, 396(3), 205–213. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0254>
- Fu, Q., Cash, S. E., Andersen, J. J., Kennedy, C. R., Oldenburg, D. G., Zander, V. B., Foley, G. R., & Simon Shelley, C. (2013). CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target. *International Journal of Cancer*, 132(8), 1761–1770. <https://doi.org/10.1002/ijc.27873>
- Gu, L., Wang, Z., Zuo, J., Li, H., & Zha, L. (2018). Prognostic significance of NF- κ B expression in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *PLOS One*, 13(5):e0198223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198223>
- Holownia, A., Wielgat, P., Rysiak, E., & Braszko, J. J. (2016). Intracellular and extracellular cytokines in A549 cells and THP1 cells exposed to cigarette smoke. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 910, 39–45. https://doi.org/10.1007/5584_2016_214
- Jan, S. L., Hayashi, M., Kasza, Z., Eriksson, I., Bishop, J. R., Weibrecht, I., Heldin, J., Holmborn, K., Jakobsson, L., Söderberg, O., Spillmann, D., Esko, J. D., Claesson-Welsh, L., Kjellén, L., & Kreuger, J. (2012). Functional overlap between chondroitin and heparan sulfate proteoglycans during VEGF-induced sprouting angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(5), 1255–1263. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.240622>
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., & Eggleton, P. (2001). The ins and outs of calreticulin: From the ER lumen to the extracellular space. *Trends in Cell Biology*, 11(3), 122–129. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)01926-2](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)01926-2)
- Kadaja-Saarepuu, L., Laos, S., Jääger, K., Viil, J., Balikova, A., Lööke, M., Hansson, G. C., & Maimets, T. (2008). CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in non-hematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF. *Oncogene*, 27(12), 1705–1715. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210802>
- Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., & Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical Chemistry*, 74(20), 5383–5392. <https://doi.org/10.1021/ac025747h>
- Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 32, 9–15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:9>
- Kupai, K. (2011). *Gelatin zymography for detection of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2, MMP-9) from myocardium samples*. Practical manual: http://www3.szote.u-szeged.hu/hurodocs/downloads/biochemistry/HU_RO_zymo_practical_Kupai_final.pdf
- LaRochelle, W. J., Jeffers, M., Corvalan, J. R. F., Jia, X.-C., Feng, X., Vanegas, S., & Lichenstein, H. S. (2002). Platelet-derived growth factor D. *Cancer Research*, 62(9), 2468.
- Li, L., Zhang, Y., Qiao, J., Yang, J. J., & Liu, Z. R. (2014). Pyruvate kinase M2 in blood circulation facilitates tumor growth by promoting angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), 25812–25821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576934>
- Li, R., Ong, S. L., Tran, L. M., Jing, Z., Liu, B., Park, S. J., Huang, Z. L., Walsler, T. C., Heinrich, E. L., Lee, G., Salehi-Rad, R., Crosson, W. P., Pagano, P. C., Paul, M. K., Xu, S., Herschman, H., Krysan, K., & Dubinett, S. (2020). Chronic IL-1 β -induced inflammation regulates epithelial-to-mesenchymal transition memory phenotypes via epigenetic modifications in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 377. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57285-y>
- Li, S., Li, X., Wang, Y., Yang, J., Chen, Z., & Shan, S. (2014). Global secretome characterization of A549 human alveolar epithelial carcinoma cells during *Mycoplasma pneumoniae* infection. *BioMed Central Microbiology*, 14, 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-27>
- Li, W., Sahu, D., & Tsen, F. (2012). Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(3), 730–741. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.009>
- Lokman, N. A., Ween, M. P., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2011). The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenvironment*, 4(2), 199–208. <https://doi.org/10.1007/s12307-011-0064-9>
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196(4), 395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>
- Luo, X., Liu, Y., Wang, R., Hu, H., Zeng, R., & Chen, H. (2011). A high-quality secretome of A549 cells aided the discovery of C4b-binding protein as a novel serum biomarker for non-small cell lung cancer. *Journal of Proteomics*, 74(4), 528–538. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.011>
- Menter, D. G., Tucker, S. C., Kopetz, S., Sood, A. K., Crissman, J. D., & Honn, K. V. (2014). Platelets and cancer: A casual or causal relationship: Revisited. *Cancer Metastasis Reviews*, 33(1), 231–269. <https://doi.org/10.1007/s10555-014-9498-0>
- Merchant, N., Nagaraju, G. P., Rajitha, B., Lammata, S., Jella, K. K., Buchwald, Z. S., Lakka, S. S., & Ali, A. N. (2017). Matrix metalloproteinases: Their functional role in lung cancer. *Carcinogenesis*, 38(8), 766–780. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx063>
- Mohrherr, J., Uras, I. Z., Moll, H. P., & Casanova, E. (2020). STAT3: Versatile functions in non-small cell lung cancer. *Cancers*, 12(5), 1107. <https://doi.org/10.3390/cancers12051107>
- Mossina, A., Lukas, C., Merl-Pham, J., Uhl, F. E., Mutze, K., Schamberger, A., Staab-Weijnitz, C., Jia, J., Yildirim, A. Ö., Königshoff, M., Hauck, S. M., Eickelberg, O., & Meiners, S. (2017). Cigarette smoke alters the secretome of lung epithelial cells. *Proteomics*, 17(1–2), 1600243. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600243>
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., & Aebersold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(17), 4646–4658. <https://doi.org/10.1021/ac0341261>
- NIH. (Revised May 2020). Cancer stat facts: Lung and bronchus cancer. *Surveillance Epidemiology and End Results (SEER)*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
- Niu, L., Song, X., Wang, N., Xue, L., Song, X., & Xie, L. (2019). Tumor-derived exosomal proteins as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Cancer Science*, 110(1), 433–442. <https://doi.org/10.1111/cas.13862>
- Offersen, B. V., Pfeiffer, P., Andreasen, P., & Overgaard, J. (2007). Urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in nonsmall-cell lung cancer: Relation to prognosis and angiogenesis. *Lung Cancer*, 56(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.11.018>
- Park, W. S., Kim, H. J., Lee, G. K., Son, H. S., & Bae, Y. (2012). Anti-adhesive functions of CD43 expressed on colon carcinoma cells through the modulation of integrins. *Experimental and Molecular Pathology*, 92(1), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.10.009>
- Patel, S., Wetie, A. G. N., Darie, C. C., Clarkson, B. D., Woods, A. G., & Darie, C. C. (2014). Cancer secretomes and their place in supplementing other hallmarks of cancer. In A. G. Woods, & C. C. Darie (Eds.), *Advancements of mass spectrometry in biomedical research* (pp. 409–442). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06068-2_20
- Pearce, O. M. T., & Läubli, H. (2016). Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology*, 26(2), 111–128. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv097>
- Rangel, M. P., de Sá, V. K., Prieto, T., Martins, J. R. M., Olivieri, E. R., Carraro, D., Takagaki, T., & Capelozzi, V. L. (2018). Biomolecular analysis of matrix proteoglycans as biomarkers in non small cell lung cancer. *Glycoconjugate Journal*, 35(2), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s10719-018-9815-x>

- Rivas-Fuentes, S., Salgado-Aguayo, A., Pertuz Beloso, S., Gorocica Rosete, P., Alvarado-Vásquez, N., & Aquino-Jarquín, G. (2015). Role of chemokines in non-small cell lung cancer: Angiogenesis and inflammation. *Journal of Cancer*, 6(10), 938–952. <https://doi.org/10.7150/jca.12286>
- Rodero, M. P., Auvynet, C., Poupel, L., Combadière, B., & Combadière, C. (2013). Control of both myeloid cell infiltration and angiogenesis by CCR1 promotes liver cancer metastasis development in mice. *Neoplasia*, 15(6), 641–648. <https://doi.org/10.1593/neo.121866>
- Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M., & Niedzwiecki, A. (2009). Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncology Reports*, 21(5), 1323–1333. https://doi.org/10.3892/or_00000358
- Rutkowski, M. J., Sughrue, M. E., Kane, A. J., Mills, S. A., & Parsa, A. T. (2010). Cancer and the complement cascade. *Molecular Cancer Research*, 8(11), 1453–1465. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0225>
- Sahni, A., Simpson-Haidaris, P. J., Sahni, S. K., Vaday, G. G., & Francis, C. W. (2008). Fibrinogen synthesized by cancer cells augments the proliferative effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(1), 176–183. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02808.x>
- Santamaría, M., López-Beltrán, A., Toro, M., Peña, J., & Molina, I. J. (1996). Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells. *Cancer Research*, 56(15), 3526.
- Setrerrahmane, S., & Xu, H. (2017). Tumor-related interleukins: Old validated targets for new anti-cancer drug development. *Molecular Cancer*, 16(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0721-9>
- Shin, J., Song, S.-Y., Ahn, H.-S., An, B. C., Choi, Y.-D., Yang, E. G., Na, K. J., Lee, S. T., Park, J. I., Kim, S. Y., Lee, C., & Lee, S. (2017). Integrative analysis for the discovery of lung cancer serological markers and validation by MRM-MS. *PLOS One*, 12(8):e0183896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183896>
- Shreberk-Shaked, M., Dassa, B., Sinha, S., Di Agostino, S., Azuri, I., Mukherjee, S., Aylon, Y., Blandino, G., Ruppín, E., & Oren, M. (2020). A division of labor between YAP and TAZ in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 80(19), 4145–4157. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0125>
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., & Hayakawa, Y. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*, 202(1), 275–293. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00199.x>
- Torres-Huerta, A., Aleman-Navarro, E., Bravo-Adame, M. E., Sandoval-Hernandez, M. A., Migueles-Lozano, O. A., & Rosenstein, Y. (2018). CD43. In S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of signaling molecules* (pp. 893–905). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9_523-1
- Valiente, M., Obenauf, A. C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X. H. F., Lee, D. J., Chaft, J. E., Kris, M. G., Huse, J. T., Brogi, E., & Massagué, J. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*, 156(5), 1002–1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.040>
- Weber, C. E., & Kuo, P. C. (2012). The tumor microenvironment. *Surgical Oncology*, 21(3), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2011.09.001>
- Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., & Sharma, V. (2015). Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(6), XE01–XE05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12016.6135>

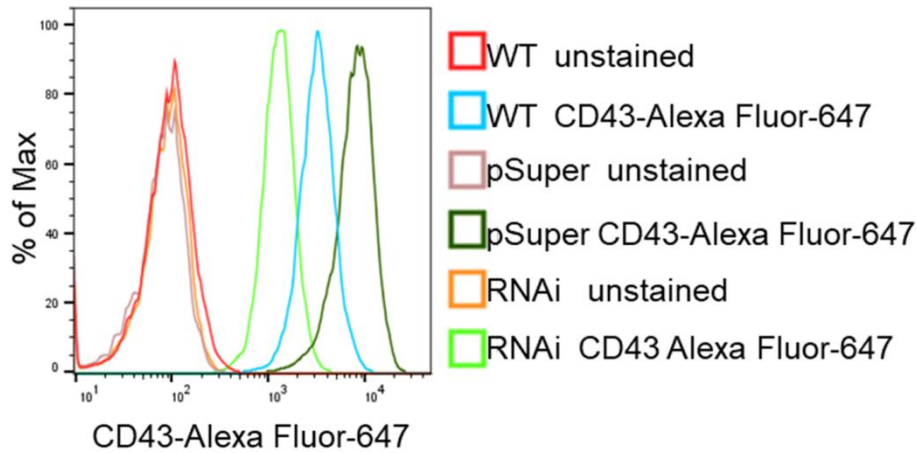
SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

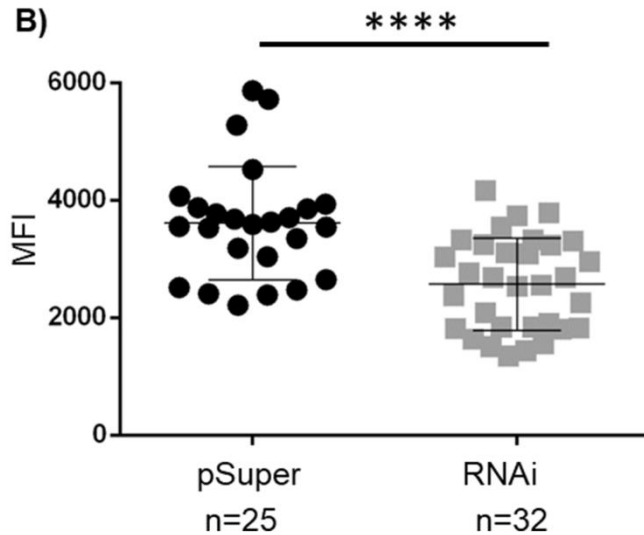
How to cite this article: Vega-Mendoza D, Cañas-Linares A, Flores-Alcantar Á, et al. CD43 (sialophorin) is involved in the induction of extracellular matrix remodeling and angiogenesis by lung cancer cells. *J Cell Physiol*. 2021;1–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.30308>

Supplementary Figures

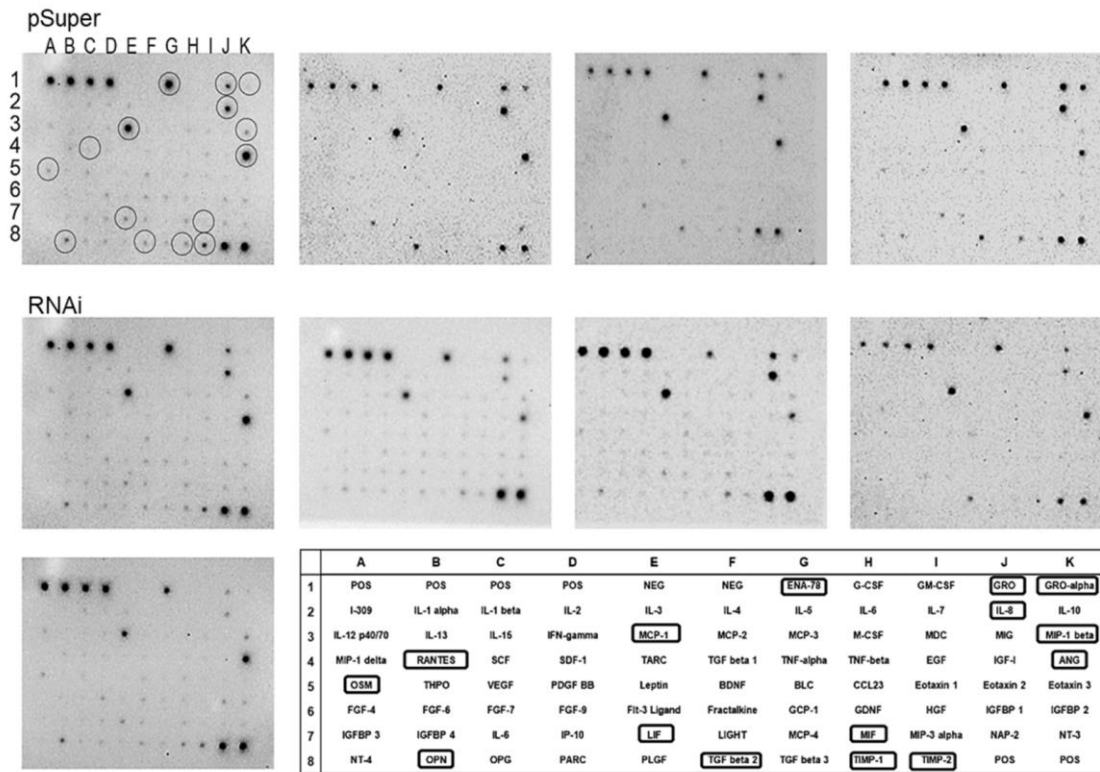
A)



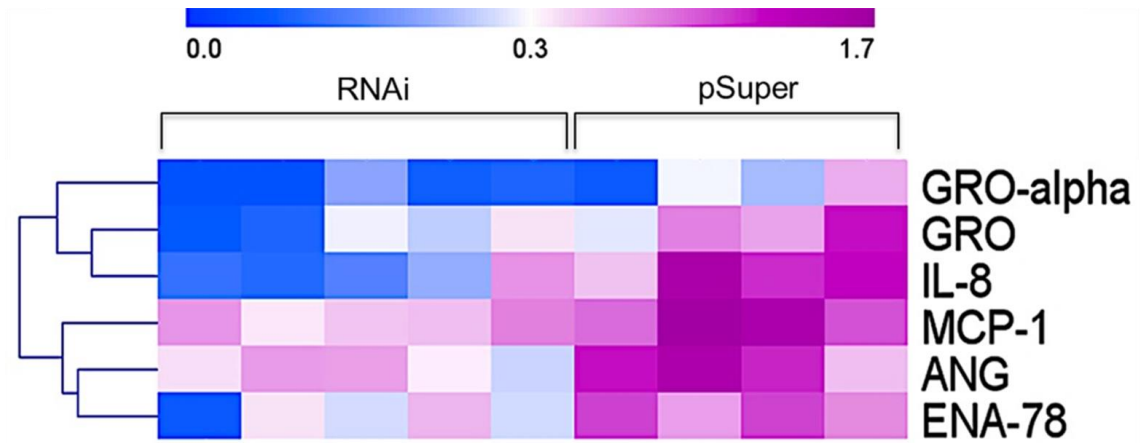
B)



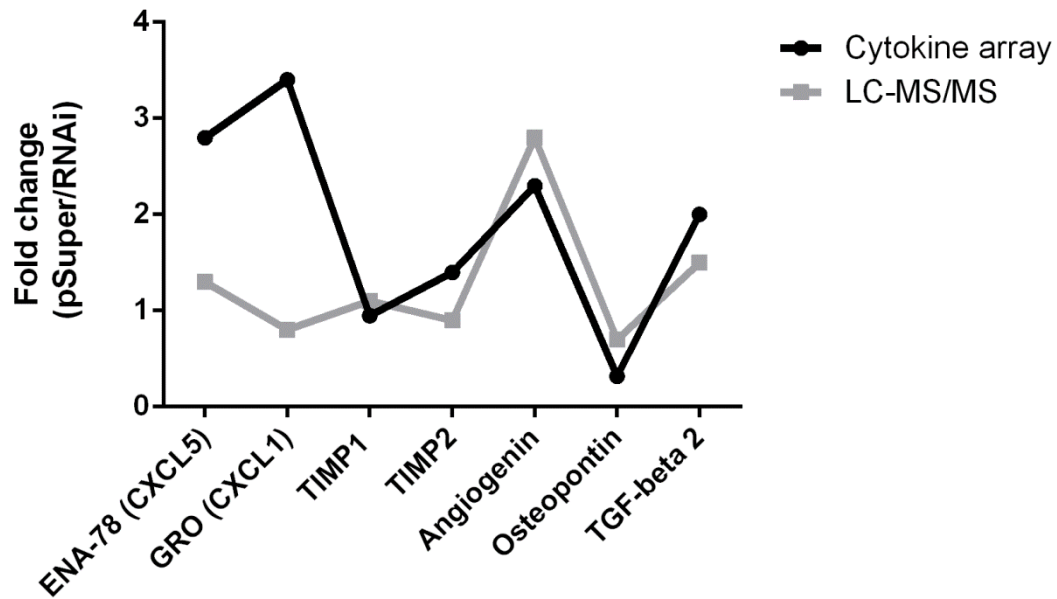
Supplementary Figure 1. CD43 expression in A549 pSuper and CD43-RNAi clones. **A)** Representative histograms of CD43 expression of WT cells, pSuper and CD43-RNAi clones. Unstained cells were used as control. CD43 expression was determined by flow cytometry with the DFT1-Alexa 647 anti-CD43 antibody. **B)** Mean fluorescence intensity (MFI) of CD43 expression in pSuper and CD43-RNAi clones. Mean \pm SD of pSuper (n= 25) or CD43 RNAi A549 (n=32) independent clones. **** $p \leq 0.0001$, calculated with the Student's t test.



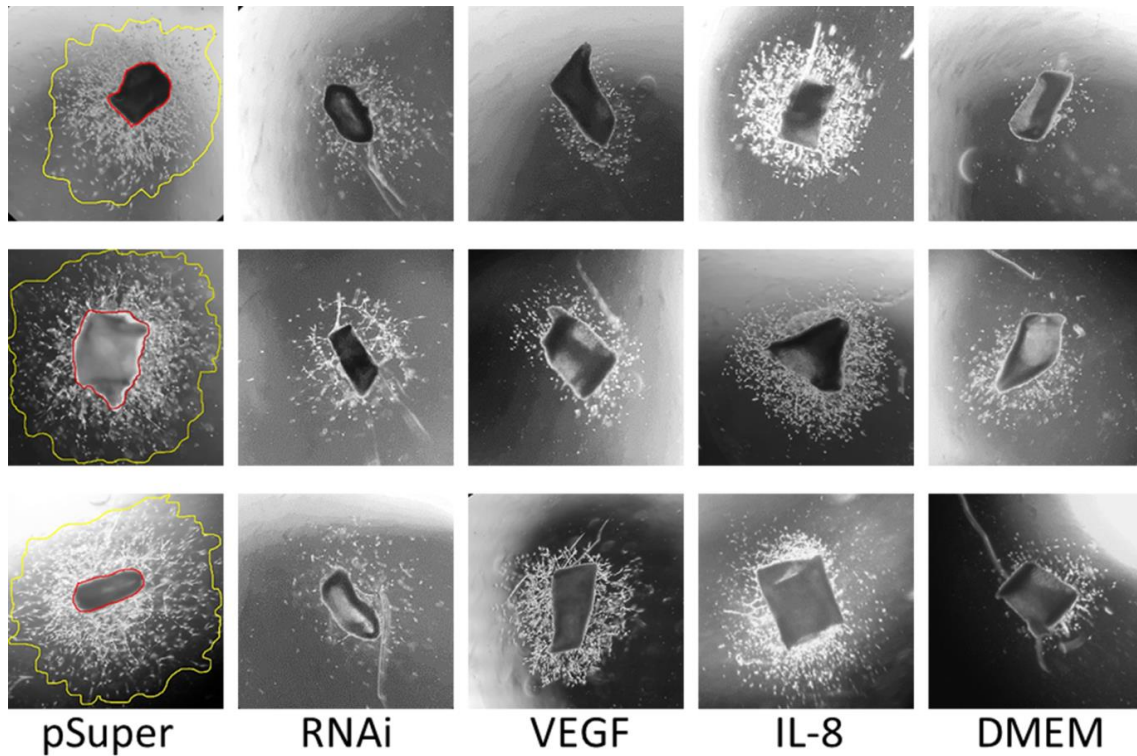
Supplementary Figure 2. Cytokines production in conditioned media from pSuper and CD43 RNAi A549 cells. Images of the cytokine array membranes incubated with conditioned media from different clones of pSuper and CD43 RNAi A549. Cells were grown to confluence in Advanced DMEM and cultured for 48h in serum-free, low glucose (1mg/mL) DMEM. The signals of ENA-78, GRO, GRO α , IL-8 MCP-1, MIP-1 β , RANTES, ANG, OSM, LIF, MIF, OPN, TGF β 2, TIMP-1 y TIMP-2 were labeled with rectangles. The map of the array is shown.



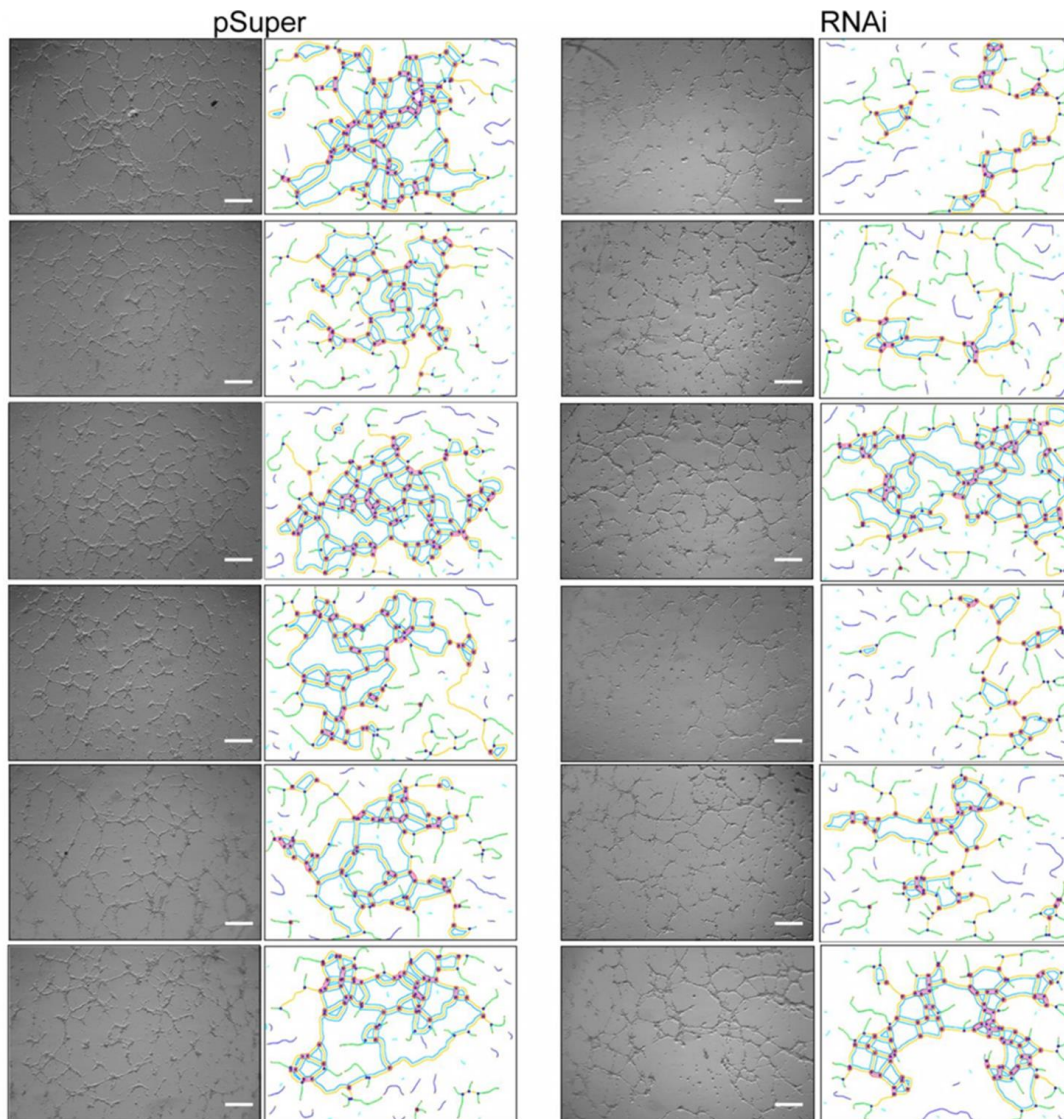
Supplementary Figure 3. Heat map of cytokine released by pSuper and CD43 RNAi A549 cells. The unsupervised clustering of the cytokines released by A549 pSuper and CD43 RNAi was visualized using Manhattan distance metric and hierarchical clustering based on average linkage. The heat map was generated with the MeV software.



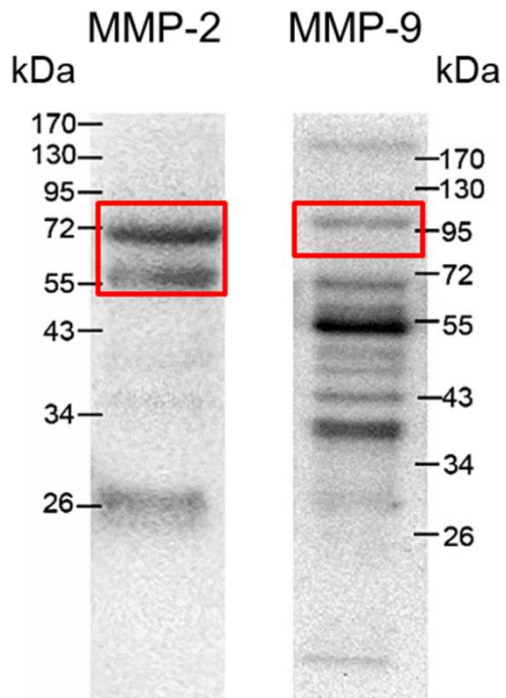
Supplementary Figure 4. Correlation of protein identification between cytokine antibody array and LC-MS/MS. The fold-changes (pSuper/CD43 RNAi) of the cytokines found in the protein array (four pSuper and five independent CD43 RNAi) and the LC-MS/MS analysis (three pSuper five CD43 RNAi independent clones) were plotted. The changes in the cytokines found in the cytokine protein array and the LC-MS/MS analysis follow the same trend.



Supplementary Figure 5. Aortic ring assay of pSuper or CD43 RNAi A549 cells conditioned media. Representative photomicrographs of aortic rings incubated with DMEM, VEGF (30ng/ml), IL-8 (50ng/ml), pSuper or CD43 RNAi A549 cells conditioned media showing the vessel sprouting (magnification 5X). The outgrowth was measured between the vessel growth front (yellow ring) and the base of the aortic ring (red ring).



Supplementary Figure 6. Tube formation assay of TeloHAEC cells incubated with pSuper or CD43 RNAi A549 cells conditioned media. Images of tube formation by TeloHAEC cells incubated with conditioned media of different clones of pSuper or CD43 RNAi A549 cells. Scale bar= 500 μ m.



Supplementary Figure 7. MMP-2 and MMP-9 expression in A549 pSuper cells secretome. The identity of gelatinases in the pSuper conditioned media was confirmed by immunoblot with the anti-MMP-2 and anti-MMP-9 antibodies.

4.3 Resultados no publicados

- **La expresión de CD43 en células A549 correlaciona con la resistencia a la activación del sistema del complemento**

El sistema del complemento es un componente de la inmunidad innata que contribuye a la defensa contra patógenos, y que participa en la inmunidad adaptativa, la inflamación, la homeostasis y la embriogénesis (Afshar-Kharghan, 2017). El complemento está formado por una red de más de 30 proteínas, tanto solubles como asociadas a membrana que, al activarse conducen una cascada de reacciones enzimáticas secuenciales que convergen en la activación de una proteasa llamada convertasa de C3, y finalmente, a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC, por sus siglas en inglés), el cual forma un poro en la membrana celular de algunos patógenos o células blanco, conduciendo a la muerte (Sarma & Ward, 2011). A lo largo de las etapas de activación de la cascada enzimática se forman péptidos que actúan como opsoninas y mediadoras de la inflamación, C5a y C3a (Janeway et al., 2001).

Con el fin de proteger el tejido del hospedero del ataque del complemento, el cuerpo humano está equipado con una gran cantidad de inhibidores solubles y unidos a membrana. Algunos elementos inhibitorios del complemento influyen directamente en el decaimiento de la convertasa de C3 o bien, actúan inhibiendo la formación del MAC. Además, algunos de estos reguladores ejercen funciones alternas como son mediar la adhesión celular y las interacciones con la ECM, o unir la cascada del complemento con otros procesos fisiológicos tales como la cascada de la coagulación (Trouw & Daha, 2011; Zipfel & Skerka, 2009). Entre de los factores inhibitorios solubles se encuentran el factor H, la proteína 1 tipo factor H (FHL1), la properdina, la carboxipeptidasa N, el inhibidor C1, la proteína de unión a C4b (C4BP), la proteína 1 relacionada con el factor H (CFHR1), la clusterina y la vitronectina. Los inhibidores del complemento unidos a membrana son: el receptor de complemento 1 (CR1, CD35). Los receptores de complemento tipo 2, 3 y 4, la proteína cofactora de membrana (MCP, CD46), el factor acelerador del decaimiento anclado a GPI (DAF, CD55) y CD59 (Cho, 2015; Gialeli et al., 2018) (Figura 11).

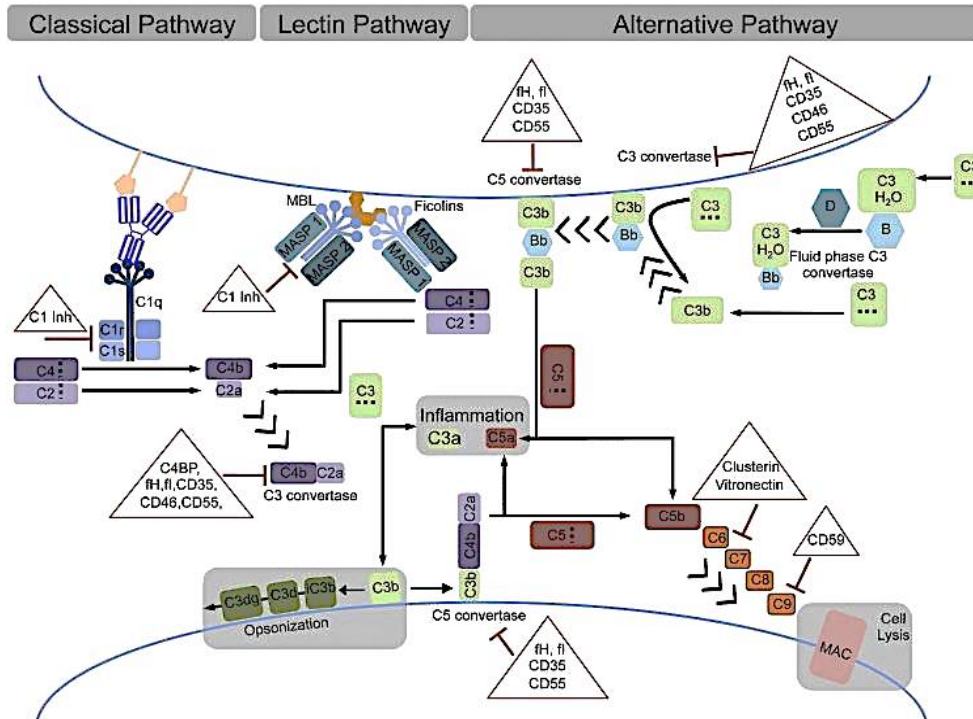


Figura 11. Vías de activación del sistema del complemento. La activación de la cascada del complemento se lleva a cabo por tres vías: clásica, alternativa y de la lectina. La vía clásica se induce por la unión de C1q a las células opsonizadas por anticuerpos. La vía alternativa se induce por agentes infecciosos como bacterias, hongos y virus. La vía de la lectina es activada por la lectina de unión a manosa (MBL, por sus siglas en inglés) o por ficolinas. Las tres vías convergen en la activación de C3 y en la formación del complejo de ataque a la membrana, C5b-9. Durante la cascada se forman las anafilotoxinas C3a y C5b las cuales reclutan células inmunes a los sitios de inflamación. El sistema del complemento es regulado a distintos niveles por medio de proteínas reguladoras solubles y unidas a membrana. Tomado de (Mamidi et al., 2017).

El papel que juega el sistema del complemento dentro del TME parece ser dual, es decir, contribuye al crecimiento tumoral y la metástasis, pero también es un efector de la citotoxicidad antitumoral (Zhang et al., 2019). Se han encontrado cantidades importantes de proteínas del complemento en el TME de diversos tipos de cáncer, donde se ha visto que promueven el crecimiento tumoral a través de la estimulación de la angiogénesis, la inflamación y la creación de un ambiente inmunosupresor (Macor et al., 2018) (Figura 12). La activación del complemento favorece la invasión y la metástasis a través de su participación en la degradación de la ECM. Se ha documentado que la proteína C1s puede degradar directamente colágeno y gelatina del cartílago y que la activación del sistema del complemento estimula la liberación y activación de MMP-2 y MMP-9 (Corrales et al., 2012). Por otra parte, el sistema del complemento contribuye al control del crecimiento tumoral mediante su activación

sobre la superficie de células tumorales para provocar su lisis. Sin embargo, los tumores han evolucionado para evitar esta activación y destrucción mediante la expresión de proteínas inhibitorias de la activación del complemento (Okroj et al., 2008). Existen reportes sobre la secreción de las proteínas del complemento C1r y C1s por células de cáncer de pulmón A549 y LLC1, y su asociación con la activación del sistema en riñones provocando daño glomerular en modelos de ratón (Hung et al., 2020).

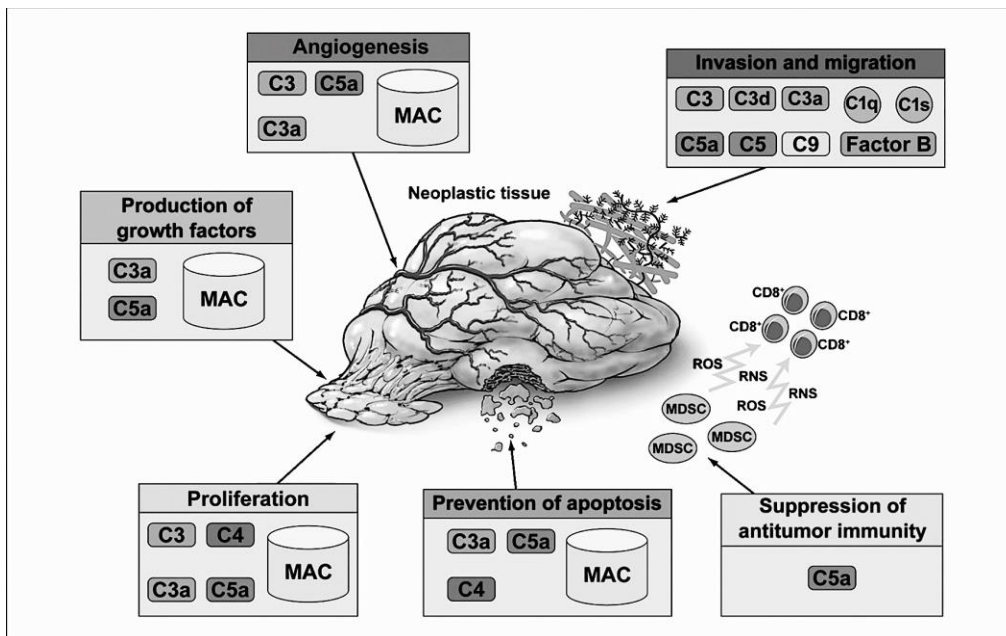


Figura 12. Papel protumoral del sistema del complemento en el microambiente tumoral. Las proteínas del complemento contribuyen a cada una de las características adquiridas por las células tumorales, entre las que se encuentran las cascadas de señalización mitogénicas y la producción de factores de crecimiento, la angiogénesis, la protección contra las señales de anti crecimiento y apoptosis, la invasión celular y la migración a través de la ECM, y la supresión a la inmunidad antitumoral. Tomado de (Rutkowski et al., 2010).

Las células de cáncer de pulmón NSCLC son altamente resistentes a la lisis mediada por complemento, esto debido en parte a la expresión y secreción de diversos inhibidores de la formación del MAC (Ajona et al., 2007). Líneas celulares de NSCLC como las células A549 secretan factor H, factor I, CD46, CD55, CD59 que las protege de la activación del complemento y la lisis, y el silenciamiento de estos genes ha mostrado disminuir el crecimiento tumoral (Ajona et al., 2007; Mamidi et al., 2017; Okroj et al., 2008). Además, en el suero de pacientes con cáncer de pulmón se han reportado cantidades elevadas de otros componentes del sistema del complemento, entre los que

se encuentra la proteína C5a. El componente C5 parece crear un ambiente favorable para el crecimiento tumoral ya que promueve el proceso de angiogénesis y el reclutamiento de células supresoras derivadas mieloides (Corrales et al., 2012).

Entre las proteínas diferencialmente expresadas entre las dos condiciones experimentales (secretomas de células A549 pSuper y RNAi), se detectaron proteínas que participan en la activación y/o regulación del sistema del complemento (Anexo 4). Encontramos que las células pSuper secretan más proteínas inhibitorias del complemento (CD59, vitronectina y clusterina) y más del componente C5 que las células RNAi. Además, aunque no hubo diferencias significativas entre las células A549 pSuper y RNAi, también encontramos en el secretoma las proteínas pro-C3, el factor H, el factor D, C1r, C1r-LP y C1s (Tabla 1). Estos resultados y la importancia del complemento en la regulación del TME y la angiogénesis, nos incito a evaluar si las clonas pSuper y RNAi tienen capacidades distintas para activar el complemento.

Gen	Proteína	Prueba de t (valor de p)	Índice de cambio pSuper/RNAi
C5	Componente 5 del complemento	0.03	1.8
CD59	CD59	0.01	2.7
CFB	Factor B del complemento	0.018	0.2
VTN	Vitronectina	0.022	1.9
CLU	Clusterina	0.017	1.8
C3	Precursor del componente C3 del complemento	0.31	0.8
CFH	Factor H del complemento	0.21	1.5
CFD	Preproteína del factor D del complemento	0.75	0.9
C1RL	Componente 1 del complemento, subcomponente r	0.18	1.6
CFI	Cadena A, factor I del complemento	0.95	1
C1S	Subcomponente C1s del complemento	0.54	1.1

Tabla 1. Proteínas del sistema del complemento encontradas en el secretoma de células A549 pSuper y RNAi. Se muestra el índice de cambio y el valor de significancia estadística para cada proteína.

La deposición de la proteína C3b y su unión covalente sobre la superficie de las células es un evento temprano durante la activación del complemento. La deposición del complejo de ataque a la membrana o C5b-9 (compuesto por las proteínas C5b, C6, C7, C8 y C9) sobre la superficie celular representa la fase final de la activación del complemento. Para comparar la activación del complemento en células A549 con distintos niveles de CD43 medimos la deposición de C3b y C5b-9 sobre la superficie celular, con el fin de validar los datos del análisis proteómico. Por citometría de flujo se evaluó la deposición de las proteínas C3b sobre la superficie celular y la del complejo C5b-9 se midió mediante un “*in-cell* ELISA”, incubando las células con un pool de sueros humanos.

Nuestros resultados mostraron que las células A549 RNAi tienden a tener una mayor deposición de C3b y de C5-9 en comparación con células A549 pSuper (Figura 13A). Un análisis de correlación de Pearson muestra que la expresión de CD43 correlaciona

negativamente con la deposición de C3b y C5b-9 (Figura 13B), y que la deposición de C3b y C5b-9 disminuye conforme se disminuye la concentración de suero (Figura 13C). En conjunto, estos resultados sugieren que CD43 participa también en la regulación de la activación del sistema del complemento, protegiendo a las células de la lisis mediada por complemento, siendo que las células que presentan niveles mayores de expresión de CD43 presentan menor activación del sistema del complemento. Resultaría interesante llevar a cabo ensayos de citotoxicidad después de la incubación con el suero y con esto demostrar si la expresión de CD43 estaría protegiendo a las células de la lisis por MAC.

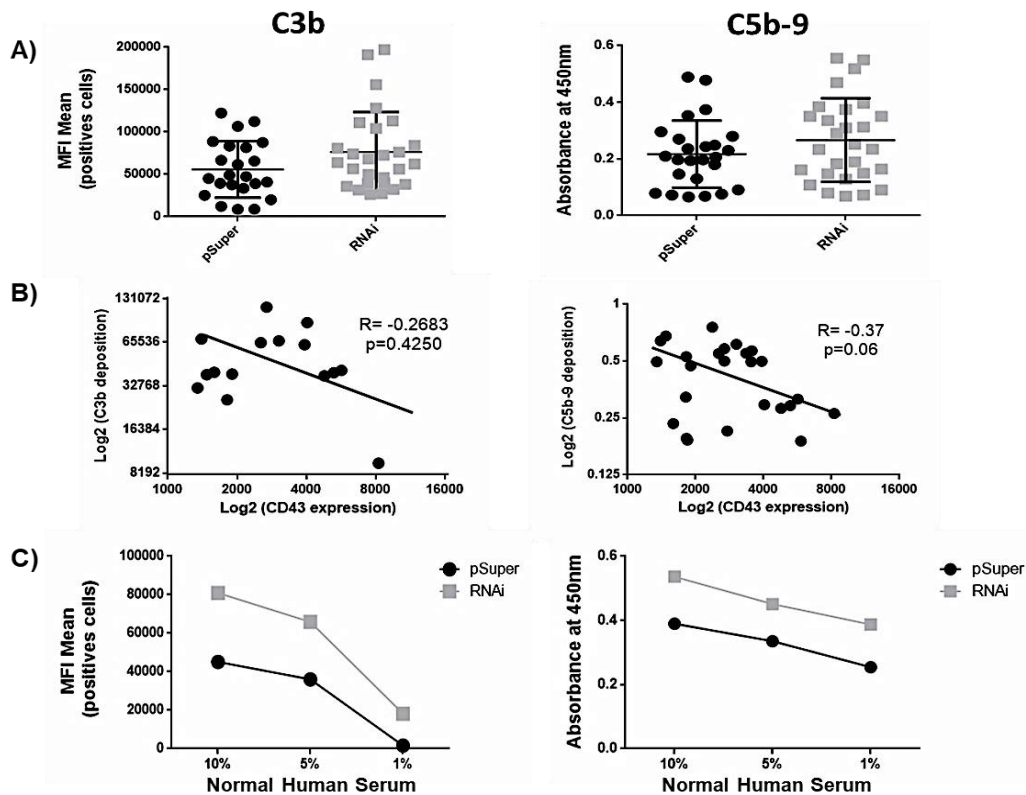


Figura 13. La expresión de CD43 modula la activación del complemento en células A549. **A)** Deposición de C3b medida por citometría de flujo y C5b-9 determinada con *in-cell* ELISA sobre células A549 pSuper y RNAi seguido de la incubación con suero humano normal. Los datos representan la intensidad media de fluorescencia integrada (iMFI = % de células positivas x MFI de las células positivas). Los datos mostrados representan la media de 3 experimentos independientes con al menos 4 clones pSuper y 5 clones RNAi independientes (media \pm desviación estándar). **B)** Correlación entre la expresión de CD43 y la deposición de C3b y C5b-9 en células pSuper y RNAi incubadas con suero humano normal, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. La expresión de CD43 se midió por citometría con el anticuerpo anti-CD43 DFT-1-AF647. **C)** Deposición de C3b y C5b-9 sobre células pSuper y RNAi seguido de la incubación con diferentes concentraciones de suero humano normal.

V. DISCUSIÓN

En un tumor se establece un microambiente complejo donde, además de las diversas interacciones entre las distintas estirpes celulares, las células tumorales se comunican con su entorno y en particular con las células estromales a través de factores secretados para que trabajen en su beneficio. La expresión de CD43 en células tumorales linfoides y no linfoides se ha asociado a una mayor proliferación, supervivencia, y capacidad invasiva (Andersson et al., 2004; Balikova, 2012; Camacho-Concha et al., 2013; Q. Fu et al., 2014; Qiangwei Fu et al., 2013). Considerando el papel esencial del secretoma en el desarrollo del cáncer (Patel et al., 2014), y que la mayoría de los tumores de cáncer de pulmón NSCLC expresan la sialomucina CD43 (Qiangwei Fu et al., 2013), nos propusimos investigar si la expresión de CD43 tiene un impacto en la composición del secretoma de las células A549, una línea celular modelo de NSCLC.

Para abordar este objetivo, generamos clones de células A549 con niveles normales de CD43 (pSuper) y clones con los niveles reducidos de CD43 (RNAi). La reducción en la expresión de CD43 fue de alrededor del 50%, no lográndose obtener clones estables con niveles menores de CD43. El bajo nivel de reducción en la expresión de CD43 puede deberse al papel que juega CD43 en la supervivencia de las células A549 (Cañas-Linares; Tesis de maestría, 2020).

En aproximadamente el 70% de los tumores primarios, STAT3 está constitutivamente activo, y en la mayoría de los programas transcripcionales asociados al cáncer están implicados los factores de transcripción NF- κ B y STAT3 correlacionando con la progresión del cáncer (W. Chen et al., 2011; Mohrherr et al., 2020). Además de promover la proliferación y supervivencia de las células cancerosas, los dos participan en cambios genéticos y epigenéticos, cambios metabólicos, adquisición de propiedades de células madre cancerosas, transición epitelio-mesénquima, invasión, angiogénesis, metástasis, establecimiento de un ambiente inflamatorio, supresión de la inmunidad antitumoral y resistencia a la terapia (Dutta et al., 2014; Taniguchi & Karin, 2018).

STAT3 y NF- κ B participan en la regulación de la transcripción de genes de numerosas moléculas que las células tumorales secretan para modelar su TME, haciéndolo más favorable para el crecimiento y la expansión tumoral. Nuestros resultados sugieren la participación de CD43 en la activación de las vías de señalización que llevan a la activación de STAT3 y NF- κ B en células A549, lo cual correlaciona con lo reportado en linfocitos T, donde las señales de CD43 activan la vía de NF- κ B (Santana et al., 2000) y STAT3 (Bravo-Adame et al., 2017). Estas vías de señalización podrían ser parte de los mecanismos moleculares por medio de los cuales CD43 modula el secretoma en el cáncer de pulmón, quedando por evaluar el efecto de la inhibición de estas vías en la composición del secretoma de células A549 y en los procesos biológicos que

encontramos alterados en nuestras condiciones experimentales de confluencia, y ayuno.

La comunicación dentro del TME ocurre en gran parte gracias a las moléculas secretadas por las distintas poblaciones celulares que conforman la masa tumoral. Además de llevar a la identificación de nuevos biomarcadores, el estudio del secretoma tumoral contribuye a entender las complejas redes de interacciones moleculares y celulares que propician el cáncer. Al comparar la composición del secretoma de células A549 pSuper y RNAi confluentes y ayunadas por 48 horas, encontramos que la mayoría de las proteínas (85.76%) pertenecían a la región extracelular, lo cual es consistente con un secretoma. Dentro del grupo de proteínas identificadas como no pertenecientes a la región extracelular identificamos algunas previamente reportadas en otros secretomas de líneas celulares tumorales, y que adquieren funciones alternas en el espacio extracelular (Butler & Overall, 2009). Aunque hasta hace unos años, encontrar este tipo de proteínas “intracelulares” en el secretoma del cáncer era considerado como una contaminación posiblemente resultante de la lisis celular, se ha demostrado que varias de estas proteínas son secretadas por mecanismos no convencionales y, además, que ejercen funciones alternas en el espacio extracelular. Al ser encontradas en diversos fluidos biológicos, algunas de ellas incluso pueden servir como biomarcadores de la enfermedad, ya que normalmente no son secretadas, salvo a causa de un proceso patológico en curso.

Entre las proteínas del secretoma no pertenecientes a la región extracelular: encontramos HSP90 α , anexina A2, calreticulina y PKM2. La proteína HSP90 α , una chaperona intracelular, participa en la activación de MMP-2 y en la cicatrización de heridas cuando se encuentra en el espacio extracelular (W. Li et al., 2012). La anexina A2 extracelular se une la colágena tipo I, al activador de plasminógeno tisular (tPA, por sus siglas en inglés) y a catépsina B, entre otras, y participa en la activación de proenzimas y la degradación selectiva de componentes de la ECM (Lokman et al., 2011). La calreticulina participa en procesos de migración y adhesión celular en el espacio extracelular (Johnson et al., 2001). La secreción de PKM2 ha sido reportada en numerosos tumores, incluyendo el cáncer de pulmón, donde participa directamente estimulando la angiogénesis mediante el incremento de la proliferación endotelial, de la expresión de MMP-9 y de la migración e invasión tumoral (L. Li et al., 2014).

El análisis proteómico de los sobrenadantes de cultivo de las clonas de células A549 reveló que las células pSuper secretan más proteínas involucradas en la organización de la ECM que las células RNAi. Destacan colágena tipo V, colágena tipo XVIII, proteína de matriz extracelular 1 (ECM 1), fibulina 5, nidogen 2, trombospondina 1, entre otras. Además, las células pSuper secretan mayor cantidad de enzimas del catabolismo del condroitin sulfato (arilsulfatasa B, alfa-L-iduronidasa, iduronato 2 sulfatasa), un glicosaminoglicano componente de la ECM involucrado en procesos de

metástasis (Asimakopoulou et al., 2008). La vía sintética de gangliósidos se encontró mayormente enriquecida en las células pSuper, siendo que estas células secretan mayor cantidad de las sialiltransferasas ST3Gal, ST6GalNAc y ST8SIA4 que las células RNAi, en consistencia con reportes que indican que niveles elevados de expresión de ST8SIA4 en NSCLC se asocian con metástasis (Pearce & Läubli, 2016). También encontramos que las células pSuper secretan mayores cantidades de proteínas asociadas a la degranulación de plaquetas: ECM1, fibrinógeno, trombospondina-1, apolipoproteína H, transferrina y SVEP1 (del inglés, *Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1*), acorde con el hecho que las células de NSCLC, así como de otros tumores, secretan proteínas que favorecen un ambiente protrombótico que conlleva a la activación de plaquetas. Las plaquetas facilitan la progresión y la metástasis del cáncer, promoviendo la angiogénesis, protegiendo a las células tumorales del sistema inmunológico y favoreciendo el crecimiento tumoral (Meikle et al., 2016).

El conjunto de proteínas que identificamos y las funciones biológicas asociadas son acordes a otros estudios en los que se analizó el secretoma de las células A549, y en los que se reporta una mezcla de citocinas, proteínas del complemento, factores de crecimiento, proteínas asociadas a matriz extracelular, entre otras, y que promueven un ambiente inmunosupresor, angiogénico y promotor del crecimiento tumoral (Donnenberg et al., 2019; Hung et al., 2020). De la misma manera, el análisis del transcriptoma de células A549 cultivadas en ausencia de glucosa por 48 h (Vincent et al., 2015), muestra que entre los procesos alterados, además de procesos metabólicos como la glicolisis y el metabolismo de ácidos grasos, se encuentran la transición epitelio-mesénquima y la angiogénesis (E. Castañeda y E. Pérez, datos no publicados). Considerando que estos estudios, como el nuestro, fueron realizados en células A549, las cuales son CD43+, .sería interesante evaluar si, en las condiciones experimentales de estos trabajos (ausencia de glucosa y otros nutrientes), el silenciamiento de CD43 altera la secreción de proteínas involucradas en distintos procesos biológicos que conllevan a modelar el TME, para el beneficio del tumor.

Si bien la mayoría de los estudios de análisis de secretomas reportados se han realizado a partir de medios condicionados de líneas celulares de cáncer de pulmón, los resultados han sido validados en distintas muestras biológicas, tales como suero, tejidos tumorales o líquido pleural de pacientes con la enfermedad (Planque et al., 2009; Luo et al., 2011; Li et al., 2014). Aunque existen pocos estudios que analicen el secretoma completo de tejidos tumorales, se ha encontrado que las proteínas secretadas por los tumores participan en procesos biológicos tales como el crecimiento y mantenimiento celular, metabolismo, catálisis, transducción de señales por receptores de ECM, adhesión celular y remodelación de la matriz extracelular (Feng et al., 2018; Schaaij-Visser et al., 2013), procesos que encontramos también representados en nuestro secretoma. Así mismo, Birse y col. (2015) realizaron un estudio utilizando LC-

MS para la identificación de biomarcadores, combinando múltiples sistemas celulares: tejidos de cáncer de pulmón recién extirpados, líneas celulares de cáncer de pulmón y medios condicionados colectados de líneas celulares de cáncer de pulmón. Además de los marcadores específicos de cada plataforma, con este estudio se identificaron varios marcadores comunes entre las plataformas, así como similitudes en las vías de señalización aparentemente activadas entre los diferentes sistemas. Las vías comunes incluyen: coagulación, señalización de integrinas, inflamación, cascada de activación de plasminógeno, señalización del receptor EGF, señalización de caderinas, angiogénesis, entre otras, siendo que con los resultados que obtuvimos identificamos que varias de estas mismas vías se encuentran presentes y que además están más o menos activas en función de los niveles de expresión de CD43.

En el TME, las citocinas crean un ambiente inflamatorio, modulan la respuesta inmune intratumoral, influyen directamente en la actividad de las células endoteliales para estimular la angiogénesis y educan a las células estromales para que adquieran fenotipos protumorales (Matanić et al., 2003; Smyth et al., 2004). En líneas celulares y fluidos de pacientes con NSCLC (sangre, lavado bronco-alveolar, esputo, líquido pleural) se han detectado diversas citocinas que participan en el desarrollo del tumor, entre las cuales se encuentran: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-22, VEGF, TGF- β , TNF- α (Marrugal et al., 2016; Matanić et al., 2003). En linfocitos T, las señales de CD43 han sido implicadas en la producción de diversas citocinas proinflamatorias como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10 (Fierro et al., 2006); en fibroblastos transformados NIH-3T3 la expresión de CD43 favorece la producción de IFN- γ , MCP-1, MCP-5, RANTES, IL-4, IL-5, VEGF y trombotocina (Olivos-Ortiz; Tesis de maestría, 2008). En nuestro trabajo encontramos que en células A549, la expresión de CD43 favorece la secreción de citocinas proinflamatorias promotoras de la angiogénesis y asociadas a un pobre pronóstico en el cáncer de pulmón: CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), y ENA 78 (Cai et al., 2009; Holownia et al., 2016; Rivas-Fuentes et al., 2015) y que el silenciamiento de CD43 resulta en una disminución de los niveles de estas citocinas en el secretoma de las células. Lo anterior sugiere que en células tumorales A549, CD43 promueve la secreción de citocinas que benefician al tumor. El mecanismo por el cual CD43 ejerce esta función queda por explorar, así como la posibilidad de que esto mismo suceda en otros tumores CD43 positivos, hematopoyéticos y no-hematopoyéticos.

En el cáncer de pulmón la sobreexpresión de MMPs se ha asociado a una mayor capacidad angiogénica, invasiva y metastásica (Blanco-Prieto et al., 2017). En el secretoma de las células A549 pSuper encontramos concentraciones más elevadas de varios miembros del sistema de activadores de plasminógeno, los cuales se han relacionado con la regulación de las MMPs y la angiogénesis (Pepper, 2001). Entre estos últimos se encuentran uPA, PAI-1 y PLAUR. Mediante ensayos de zimografía

encontramos una correlación positiva entre la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 en los secretomas y el nivel de expresión de CD43 (Alicia Cañas Linares, Tesis de Maestría, 2020). Estos resultados sugieren que CD43 favorece la expresión y la secreción de MMP-2 y MMP-9 para degradar colágeno, uno de los componentes más abundantes de la ECM y favorecer la metástasis. Así mismo, son consistentes con reportes que sugieren que la interacción de CD43 con uno de sus ligandos (ICAM-1) induce la producción de estas dos MMPs en cáncer de colon (Alkhamesi et al., 2007). El mecanismo por el cual CD43 ejerce este papel y el nivel de regulación al que lo hace (síntesis, secreción o regulación postraduccional) aún queda por determinar.

La angiogénesis está regulada por una compleja red de interacciones entre factores de crecimiento, y otros elementos importantes como son la disponibilidad de enzimas proteolíticas como las MMPs, los activadores de plasminógeno, la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, cadherinas) en las células endoteliales que darán lugar a la neovasculatura y la remodelación de la ECM (Shijubo et al., 2003). Además de las citocinas pro-angiogénicas mencionadas anteriormente, encontramos que las células A549 pSuper secretan mayor cantidad de factores proangiogénicos comparado con los sobrenadantes de células RNAi. Entre estos factores se encuentran: angiogenina, fibulina 5, anexina A2, fibrinógeno, PDGF-D, SRPX2 (del inglés, *Sushi-repeat-containing protein, X-linked 2*), colágena tipo V, ECM1, apolipoproteína H y ADAM15. Estos resultados concuerdan con una mayor capacidad de los sobrenadantes de estas células para promover el crecimiento de vasos sanguíneos en el modelo *ex vivo* de anillos de aortas de ratón y formar tubos *in vitro*, en un modelo de angiogénesis de células aórticas endoteliales humanas

Estos datos revelan una nueva función de CD43 en el cáncer de pulmón, al favorecer la secreción de factores proangiogénicos. Así, además de prevenir la inhibición de la proliferación por contacto dependiente de merlina (Camacho-Concha et al., 2013; Qiangwei Fu et al., 2013) lo cual da lugar a una proliferación descontrolada de las células y al crecimiento tumoral, CD43 favorece también la secreción al microambiente tumoral de una combinación de moléculas que promueven la angiogénesis. Se sabe que para que un tumor alcance un tamaño crítico y sea capaz de metastatizar, debe inducir el proceso de angiogénesis. Además de resultar de la inhibición de la vía de Hippo, el mayor tamaño tumoral generado por células con los niveles endógenos de CD43 podría deberse a la mayor secreción de factores proangiogénicos secretados por dichas células. Datos de la literatura sugieren que existe una correlación positiva entre la densidad microvascular, como medida del grado de vascularización, y el tamaño tumoral (Sener, et al., 2016). En su momento no se analizó esta variable, pero sería interesante determinar el grado de vascularización de los tumores generados en ratones por células A549 con niveles endógenos y reducidos de CD43. Los

mecanismos moleculares por los cuales CD43 ejerce esta nueva función aún quedan por determinar.

Al promover una inflamación crónica, y un ambiente inmunosupresor, el sistema del complemento juega un papel activo en el crecimiento tumoral y la metástasis, llegando inclusive a considerarse como un potencial blanco terapéutico para el desarrollo de tratamientos antitumorales (Pio et al., 2014). Se ha reportado que las células de NSCLC producen proteínas inhibitorias del sistema del complemento como CD46, CD55, CD59, factor I y factor H, para protegerse del ataque del complemento y de la lisis (Ajona et al., 2004). Nuestros resultados de LC-MS/MS mostraron que las células A549 secretan varias proteínas que participan en el sistema del complemento (CD59, vitronectina, clusterina, C5, pro-C3, el factor H, el factor D, C1r, C1r-LP y C1s) lo cual concuerda con datos previamente reportado en el secretoma de esta línea celular (S. Li et al., 2014; Luo et al., 2011; Shin et al., 2017). Al disminuir la expresión de CD43, los niveles de algunas de estas proteínas también disminuyeron en los sobrenadantes de cultivo de células confluentes y ayunadas por 48 horas. Es el caso de inhibidores de la formación del MAC (complejo C5b-9) CD59, vitronectina y clusterina (Bayly-Jones et al., 2017), así como de la proteína C5 implicada en procesos de angiogénesis (Corrales et al., 2012). La menor secreción de inhibidores del MAC en células RNAi concuerda con que las células CD43 pSuper exhiben una menor deposición del MAC. Estos resultados sugieren que, en NSCLC, CD43 favorece la secreción de proteínas que inhiben la formación del complejo de ataque a la membrana, quedando por determinar si la secreción de estos factores está protegiendo a las células de cáncer de pulmón de la lisis por complemento. Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que CD43 favorece procesos de supervivencia en células A549 bajo condiciones limitantes de nutrientes (Cañas-Linares; Tesis de maestría, 2020). Secretar factores inhibitorios de la formación del MAC evitando la destrucción por parte del sistema del complemento podría ser otro de los mecanismos por el cual CD43 favorece procesos de supervivencia.

Las líneas celulares de origen tumoral experimentan rearrreglos cromosomales, multiplicaciones y mutaciones espontáneas de manera continua y rápida. Esto se refleja en subclonas o subpoblaciones con diferentes morfologías, así como diversas características fenotípicas como la sensibilidad a ciertos fármacos, la resistencia a la apoptosis, tasa de crecimiento, antigenicidad, entre otras (Watanabe et al., 2002). Sumado a estas características, el cáncer de pulmón se caracteriza por ser una enfermedad heterogénea formada por subpoblaciones de células o clonas con características morfológicas, mutaciones, y perfiles transcriptómicos distintos (Herbst et al., 2018). En el caso particular de las células A549, se han descrito subpoblaciones de celulares con diferente morfología, tasa de crecimiento, expresión de antígenos y tumorigenicidad (Bechyne et al., 2012; Croce et al., 1999), desconociéndose la gran mayoría de los mecanismos moleculares responsables de esta heterogeneidad. Por lo

cual no resulta sorprendente la considerable heterogeneidad interclonal en la expresión de CD43 en células A549 que tuvimos durante el transcurso del presente trabajo.

El conjunto de los resultados expuestos en esta tesis muestra que expresar CD43 confiere ventajas a las células tumorales de NSCLC. En particular, les permite modelar su TME a través de la secreción de diversas proteínas que participan en remodelación de la ECM, angiogénesis, y establecimiento de un microambiente inmunológico que privilegia el crecimiento tumoral sobre la respuesta antitumoral. Sin embargo, desconocemos los mecanismos por los cuales CD43 ejerce estas funciones. Es probable que en las células A549, CD43 participe en las vías de señalización que regulan la expresión y/o secreción de estas proteínas, ya que en linfocitos T humanos normales, en células tumorales [células Jurkat (Leucemia aguda de células T) y células THP-1 (leucemia aguda monocítica)] participa en vías de señalización involucradas en la secreción de varias de las proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma (Pedraza-Alva et al., 1998; Torres-Huerta et al., 2017). Se sabe también que CD43 participa en las vías de señalización de Hippo, PI3K-Akt y Wnt- β -catenina en células tumorales (Andersson et al., 2004; Camacho-Concha et al., 2013), vías que pueden conllevar a la activación de genes relacionados con remodelación de matriz extracelular y angiogénesis. Otro de los mecanismos podría ser a través de la interacción con la cinasa de serina/treonina STANK (del inglés, *Sialophorin tail-associated nuclear kinase*) nombrada también como HIPK1 (del inglés, *homeodomain-interacting protein kinase-1*) reportada por Wang y col (2000), la cual interactúa con el dominio citoplásmico de CD43. Esta cinasa regula la actividad de numerosos factores de transcripción y se expresa en el núcleo y en el citoplasma de células de diversos tejidos, incluido el de pulmón. La interacción entre CD43 y STANK podría desencadenar una vía de señalización que culminará en cambios en la transcripción de diversos genes que den lugar a las proteínas que encontramos diferencialmente expresadas en el secretoma de células A549.

Adicional a su papel en la unión de actina filamentosa, por su capacidad para unirse a receptores de membrana y vincularlos a vías señalización río abajo, las proteínas de la ERM (Ezrina-radixina-moesina) participan también en los procesos asociados a la secreción de moléculas/vesículas hacia el medio extracelular (Neisch & Fehon, 2011). Específicamente ezrina posee funciones secretoras en el epitelio pulmonar, donde se encuentra altamente expresada y es esencial en el proceso de secreción de la mucina 5AC (Q. Li et al., 2015). CD43 interactúa con proteínas de citoesqueleto gracias a su dominio de unión a la familia ERM localizado en su región intracelular, dicha interacción es importante para regular el tráfico de los linfocitos T (Cannon et al., 2011). La información anterior hace surgir la pregunta: ¿CD43 está involucrado en el proceso de secreción de algunas de las proteínas que encontramos diferencialmente expresadas

en el secretoma? Sería interesante abordar esta pregunta para explorar otros de los mecanismos moleculares por los que CD43 pudiera modelar el TME.

A todas estas preguntas se agrega el hecho que en cáncer de colon, mama y pulmón la localización de CD43 es predominantemente intracelular, a diferencia de lo observado en leucocitos, donde su localización principal es en la membrana celular (Andersson et al., 2004; Q. Fu et al., 2014; Qiangwei Fu et al., 2013; Remold-O'Donnell et al., 1987). Lo anterior vuelve más complejo el tratar de dilucidar los elementos moleculares con los que CD43 interactúa para ejercer estas nuevas funciones. En cáncer de colon se sabe que CD43 sufre un corte proteolítico por γ -secretasa, liberando su dominio citoplásmico, el cual contiene una señal de localización nuclear (NLS) que le permite dirigirse al núcleo e interactuar con β -catenina, activando genes de proliferación (c-MYC y ciclina D1) (Andersson et al., 2004, 2005). En las células A549 y de una manera general en los estudios histopatológicos de tumores de NSCLC y de mama, CD43 es una proteína únicamente intracelular, y en ocasiones intranuclear. No hemos encontrado reportes sugiriendo que, en estos tumores, CD43 sufra algún corte proteolítico. Sería interesante explorar si este proceso ocurre también en cáncer de pulmón, resultando en la activación de genes que codifican para algunas de las proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma, o si, alternativamente, la molécula completa pudiera ejercer estas mismas funciones.

Es posible que la participación de CD43 en la remodelación del TME a través del secretoma ocurra también en otros tipos de tumores, linfoides y no linfoides. Esto debido a varias razones, entre la cuales podemos mencionar: su expresión en tejidos de diferentes orígenes y capas embrionarias, el hecho de que su dominio intracitoplasmático sea muy conservado entre especies, y a que algunas de las vías de señalización ya descritas en diversos tumores se compartan, como su participación en la vía de STAT3, β -catenina, PI3K/Akt y NF- κ B (Andersson et al., 2004; Bravo-Adame et al., 2017; Camacho-Concha et al., 2013; Santana et al., 2000). Sería interesante explorar el secretoma de otras líneas celulares tumorales de distintos orígenes que expresan CD43 y ver que procesos biológicos se encuentran mayormente enriquecidos.

La transformación neoplásica se asocia frecuentemente con la expresión de antígenos oncofetales, los cuales se expresan en tejido fetal y canceroso, pero no en tejido adulto normal. Estos antígenos son frecuentemente glicoproteínas que presentan glicosilaciones alteradas que correlacionan con el crecimiento y la capacidad proliferativa incrementada de las células tumorales. CD43 ha sido considerado como un antígeno oncofetal ya que se expresa en etapas tempranas del desarrollo de tejidos fetales (timo, bazo, corteza adrenal, epitelio bronquial y piel), baja su expresión durante la ontogenia y reaparece en tejido canceroso, por lo cual se ha propuesto su utilización en el diagnóstico del cáncer y con fines terapéuticos (Tuccillo, de Laurentiis, et al.,

2014; Tuccillo, Palmieri, et al., 2014). Adicionalmente, CD43 es un marcador de pronóstico adverso asociado a menor sobrevida en pacientes con linfomas de células B (Ma et al., 2015), ya que su expresión correlaciona con un incremento en la capacidad de sobrevida y proliferación de las células B normales y transformadas. Los resultados del presente trabajo aportan más información para considerar a CD43 como un marcador de malignidad y pobre pronóstico en tumores de origen no linfoide, ya que su expresión dota a las células cancerosas de pulmón de la capacidad de modelar su microambiente haciéndolo más permisivo para el crecimiento tumoral.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La expresión de CD43 en células A549, un modelo de NSCLC, favorece la activación de las vías STAT3 y NF- κ B.
- La expresión de CD43 favorece la secreción al microambiente tumoral de moléculas que participan en procesos de remodelación de la ECM (catabolismo del colágeno, catabolismo del condroitin sulfato, biosíntesis de gangliósidos), angiogénesis, degranulación de plaquetas y de proteínas inhibitorias del sistema del complemento, procesos que contribuyen a modelar un TME benéfico para el crecimiento del tumor.
- La expresión de CD43 favorece la secreción de factores pro-angiogénicos, identificando un nuevo rol de la molécula, en el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos.
- La expresión de CD43 correlaciona positivamente con la actividad de MMP-2 y MMP-9 para degradar colágeno, uno de los componentes más abundantes de la ECM.
- La expresión de CD43 inhibe la activación del sistema del complemento en células A549.

VII. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- Evaluar el secretoma de otras líneas celulares tumorales de distintos orígenes que expresan CD43 y comparar los procesos biológicos mayormente enriquecidos con nuestros resultados.
- Explorar cómo CD43 participa en la regulación de las vías de señalización que rigen la expresión y/o secreción de las proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma.
- Evaluar el estado de vascularización de tumores de células A549 con niveles diferenciales de CD43 en ratones desnudos.
- Realizar experimentos adicionales para definir con mayor certeza si la expresión de CD43 protege a las células de la lisis por complemento.

VIII. REFERENCIAS

- Afshar-Kharghan, V. (2017). The role of the complement system in cancer. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 127, Issue 3, pp. 780–789). <https://doi.org/10.1172/jci90962>
- Ajona, D., Castaño, Z., Garayoa, M., Zudaire, E., Pajares, M. J., Martinez, A., Cuttitta, F., Montuenga, L. M., & Pio, R. (2004). Expression of Complement Factor H by Lung Cancer Cells. In *Cancer Research* (Vol.64, Issue 17, pp. 6310–6318). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2328>
- Ajona, D., Hsu, Y. F., Corrales, L., Montuenga, L. M., & Pio, R. (2007). Down-Regulation of Human Complement Factor H Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells to Complement Attack and Reduces In Vivo Tumor Growth. In *The Journal of Immunology* (Vol. 178, Issue 9, pp. 5991–5998). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5991>
- Alamgeer, M., Peacock, C. D., Matsui, W., Ganju, V., & Watkins, D. N. (2013). Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies. *Respirology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 757–764). doi: 10.1111/resp.12094
- Alkhamisi, N. A., Roberts, G., Ziprin, P., Peck, D. H., & Darzi, A. W. (2007). Induction of Proteases in Peritoneal Carcinomatosis, the Role of ICAM-1/CD43 Interaction. In *Biomarker Insights* (Vol. 2, p. 117727190700200). <https://doi.org/10.1177/117727190700200001>
- Altorki, N. K., Markowitz, G. J., Gao, D., Port, J. L., Saxena, A., Stiles, B., McGraw, T., & Mittal, V. (2019). The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature Reviews. Cancer* (Vol. 19, Issue 1, pp. 9-31). doi: 10.1038/s41568-018-0081-9
- Amara, U., Flierl, M. A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Brückner, U. B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J. D., & Huber-Lang, M. (2010). Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *Journal of Immunology* (Vol.185, Issue 9, pp.5628–5636). DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903678>
- American Cancer Society. (2020). *Opciones de tratamiento para el cáncer de pulmón no microcítico según la etapa*. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon/tratamiento-no-microcitico/por-etapa.html>
- Ames, B. N., Gold, L. S., & Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 92, Issue 12, pp. 5258–5265). doi: 10.1073/pnas.92.12.5258.
- Andersson, C. X., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Baeckström, D., Haass, C., & Hansson, G. C. (2005). Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochemical Journal* (Vol. 387, Issue (Pt 2), pp. 377–384). DOI: 10.1042/bj20041387
- Andersson, C. X., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Sikut, R., Sikut, A., Baeckström, D., & Hansson, G. C. (2004). CD43 has a functional NLS, interacts with β -catenin, and affects gene expression. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 316, Issue 1, pp. 12–17). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.011>
- Asimakopoulou, A. P., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N., & Karamanos, N. K. (2008). The biological role of chondroitin sulfate in cancer and chondroitin-based anticancer agents. *In Vivo* (Vol. 22, Issue 3, pp. 385–389).
- Bačić, I., Karlo, R., Zadro, A., Zadro, Z., Skitarelić, N., & Antabak, A. (2017). Tumor

- angiogenesis as an important prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer (Stage IIIA). In *Oncology Letters* (Vol. 15, Issue 2, pp. 2335-2339). <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7576>
- Baeckström, D., Zhang, K., Asker, N., Rüetschi, U., Ek, M., & Hansson, G. C. (1995). Expression of the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43 by a colon carcinoma cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13688–13692.
- Balikova, A. (2012). Leukocyte marker CD43 promotes cell growth in cooperation with β -catenin in non-hematopoietic cancer cells. In *International Journal of Oncology* (Vol. 41, Issue 1, pp. 299-309). <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1440>
- Barrón-Barrón, F., Guzmán-De Alba, E., Alatorre-Alexander, J., Aldaco-Sarvide, F., Bautista-Aragón, Y., Blake-Cerda, M. et al. (2019). Guía de Práctica Clínica Nacional para el manejo del cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios tempranos, localmente avanzados y metastásicos. In *Salud Pública de México* (Vol. 61, Issue 3, pp. 359-414). <https://doi.org/10.21149/9916>
- Bayly-Jones, C., Bubeck, D., & Dunstone, M. A. (2017). The mystery behind membrane insertion: a review of the complement membrane attack complex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* (Vol. 372, Issue 1726, p. 20160221). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0221>
- Bechyně, I., Szpak, K., Madeja, Z., & Czyż, J. (2012). Functional heterogeneity of non-small lung adenocarcinoma cell sub-populations. *Cell Biology International* (Vol. 36, Issue 1, pp. 99–103). doi: 10.1042/CBI20110151.
- Bhatia, R., Gautam, S. K., Cannon, A., Thompson, C., Hall, B. R., Aithal, A., Banerjee, K., Jain, M., Solheim, J. C., Kumar, S., & Batra, S. K. (2019). Cancer-associated mucins: role in immune modulation and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews* (Vol. 38, Issue 1-2, pp. 223–236). doi: 10.1007/s10555-018-09775-0
- Birse C.E., Lagier, R.J., FitzHugh, W., Pass, H.I., Rom, W.N., Edell, E.S., Bungum, A.O., Maldonado, F., Jett, J.R., Mesri, M., Sult, E., Joseloff, E., Li, A., Heidbrink, J., Dhariwal, G., Danis, C., Tomic, J.L., Bruce, R.J., Moore, P.A., He, T., Lewis, M.E., & Ruben, S.M. (2015) Blood-based lung cancer biomarkers identified through proteomic discovery in cancer tissues, cell lines and conditioned medium. In *Clinical Proteomics* (Vol. 16, Issue 12, p18. doi: 10.1186/s12014-015-9090-9.
- Blanco-Prieto, S., Barcia-Castro, L., Páez de la Cadena, M., Rodríguez-Berrocal, F. J., Vázquez-Iglesias, L., Botana-Rial, M. I., Fernández-Villar, A., & De Chiara, L. (2017). Relevance of matrix metalloproteases in non-small cell lung cancer diagnosis. *BMC Cancer* (Vol.17, Issue 1, p. 823). DOI: 10.1186/s12885-017-3842-z
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. In *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 786–801). DOI: 10.1038/nrm3904
- Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. In *The Journal of Pathology* (Vol. 200, Issue4, pp. 423–428). doi: 10.1002/path.1437.
- Bravo-Adame, M. E., Sandoval-Hernandez, M. A., Migueles-Lozano, O. A., & Rosenstein, Y. (2012). CD43. In S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules* (pp. 320–328). Springer New York.

- Bravo-Adame, M. E., Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Martínez-Campos, C., Flores-Alcantar, A., Ocelotl-Oviedo, J. P., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2017). An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes. In *Immunology* (Vol. 150, Issue 1, pp. 87–99). <https://doi.org/10.1111/imm.12670>
- Burgstaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M., White, E. S., Schiller, H. B., & Eickelberg, O. (2017). The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. In *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* (Vol. 50, Issue 1, p. 1601805). <https://doi.org/10.1183/13993003.01805-2016>
- Butler, G. S., & Overall, C. M. (2009). Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nature Reviews. Drug Discovery* (Vol. 8, Issue 12, pp. 935–948). doi: 10.1038/nrd2945
- Cai, Z., Chen, Q., Chen, J., Lu, Y., Xiao, G., Wu, Z., Zhou, Q., & Zhang, J. (2009). Monocyte Chemotactic Protein 1 Promotes Lung Cancer-Induced Bone Resorptive Lesions In Vivo. In *Neoplasia* (Vol. 11, Issue 3, pp. 228–236). <https://doi.org/10.1593/neo.81282>
- Camacho-Concha, N., Olivos-Ortiz, A., Nuñez-Rivera, A., Pedroza-Saavedra, A., Gutierrez-Xicotencatl, L., Rosenstein, Y., & Pedraza-Alva, G. (2013). CD43 Promotes Cells Transformation by Preventing Merlin-Mediated Contact Inhibition of Growth. In *PLoS ONE* (Vol. 8, Issue 11, p. e80806). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080806>
- Cancer of the lung and Bronchus - Cancer stat facts.* (2020). <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
- Cannon, J. L., Mody, P. D., Blaine, K. M., Chen, E. J., Nelson, A. D., Sayles, L. J., Moore, T. V., Clay, B. S., Dulin, N. O., Shilling, R. A., Burkhardt, J. K., & Sperling, A. I. (2011). CD43 interaction with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins regulates T-cell trafficking and CD43 phosphorylation. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 22, Issue 7, pp. 954–963). doi: 10.1091/mbc.E10-07-0586
- Cañas Linares, A. (2020). Participación de CD43 en la capacidad invasora de células A549. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Capece, D., Verzella, D., Tessitore, A., Alesse, E., Capalbo, C., & Zazzeroni, F. (2018). Cancer secretome and inflammation: the bright and the dark sides of NF-κB. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 78, pp. 51–61). <https://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.004>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. In *Nature*, (Vol. 407, Issue 6801, pp. 249–257). doi: 10.1038/35025220.
- Chauhan, V., Howland, M., & Wilkins, R. (2012). A Comparative Assessment of Cytokine Expression in Human-Derived Cell Lines Exposed to Alpha Particles and X-Rays. In *The Scientific World Journal*, (Vol. 2012) <https://doi.org/10.1100/2012/609295>
- Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., & Sun, Y. (2015). New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. In *BMC Medicine* (Vol. 13, p.45). doi: 10.1186/s12916-015-0278-7.
- Chen, W., Li, Z., Bai, L., & Lin, Y. (2011). NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 16, pp.1172–1185). doi: 10.2741/3782.
- Cho, H. (2015). Complement regulation: physiology and disease relevance. In *Korean Journal*

- of *Pediatrics* (Vol. 58, Issue 7, p. 239). <https://doi.org/10.3345/kjp.2015.58.7.239>
- Conlon, G. A., & Murray, G. I. (2019). Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. In *The Journal of Pathology* (Vol. 247, Issue 5, pp. 629–640). doi: 10.1002/path.5225.
- Corrales, L., Ajona, D., Rafail, S., Lasarte, J. J., Riezu-Boj, J. I., Lambris, J. D., Rouzaut, A., Pajares, M. J., Montuenga, L. M., & Pio, R. (2012). Anaphylatoxin C5a Creates a Favorable Microenvironment for Lung Cancer Progression. In *The Journal of Immunology* (Vol. 189, Issue 9, pp. 4674–4683). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201654>
- Crinò, L., & Metro, G. (2014). Therapeutic options targeting angiogenesis in non-small cell lung cancer. In *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* (Vol. 23, Issue 131, pp. 79–91). doi: 10.1183/09059180.00008913.
- Croce, M. V., Colussi, A. G., Price, M. R., & Segal-Eiras, A. (1999). Identification and characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell line (A549). In *Pathology Oncology Research* (Vol.5, Issue3, pp. 197-204). <https://doi.org/10.1053/paor.1999.0212>
- da Cunha, B. R., Domingos, C., Stefanini, A. C. B., Henrique, T., Polachini, G. M., Castelo-Branco, P., & Tajara, E. H. (2019). Cellular Interactions in the Tumor Microenvironment: The Role of Secretome. In *Journal of Cancer* (Vol. 10, Issue 19, pp. 4574–4587). doi: 10.7150/jca.21780.
- De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. In *Nature Reviews. Cancer* (Vol. 17, Issue 8, pp. 457–474). doi: 10.1038/nrc.2017.51.
- Donnenberg, A. D., Luketich, J. D., & Donnenberg, V. S. (2019). Secretome of pleural effusions associated with non-small cell lung cancer (NSCLC) and malignant mesothelioma: therapeutic implications. In *Oncotarget* (Vol. 10, Issue 60, pp. 6456–6465). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27290>
- Dutta, P., Sabri, N., Li, J., & Li, W. X. (2014). Role of STAT3 in lung cancer. In *JAK-STAT* (Vol. 3, Issue 4, p. 3e999503). doi: 10.1080/21623996.2014.999503
- Eble, J. A., & Niland, S. (2019). The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. In *Clinical & Experimental Metastasis* (Vol. 36, Issue 3, pp.171–198). doi: 10.1007/s10585-019-09966-1.
- Feng, L., Yang, Y., Li, M., Song, J., Gao, Y., Cheng, S., & Xiao, T. (2018). Systems biology analysis of the lung cancer-related secretome. In *Oncology Reports* (Vol. 40, Issue 2, pp. 1103-1118). doi: 10.3892/or.2018.6509.
- Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C. X., Laos, S., Baeckström, D., Sikut, A., Sikut, R., & Hansson, G. C. (2002). The Leukocyte Antigen CD43 Is Expressed in Different Cell Lines of Nonhematopoietic Origin. In *Tumor Biology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 193–201). <https://doi.org/10.1159/000067252>
- Fierro, N. A., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2006). TCR-Dependent Cell Response Is Modulated by the Timing of CD43 Engagement. In *The Journal of Immunology* (Vol. 176, Issue 12, pp. 7346–7353). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7346>
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. In *Journal of Cell Science* (Vol. 123, (Pt 24), pp. 4195–4200). doi: 10.1242/jcs.023820.
- Fu, Q., Cash, S. E., Andersen, J. J., Kennedy, C. R., Madadi, A. R., Raghavendra, M., Dietrich,

- L. L., Agger, W. A., & Shelley, C. S. (2014). Intracellular patterns of sialoporphin expression define a new molecular classification of breast cancer and represent new targets for therapy. In *British Journal of Cancer* (Vol. 110, Issue 1, pp. 146–155). <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.526>
- Fu, Q., Cash, S. E., Andersen, J. J., Kennedy, C. R., Oldenburg, D. G., Zander, V. B., Foley, G. R., & Shelley, C. S. (2013). CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target. In *International Journal of Cancer* (Vol. 132, Issue 8, pp. 1761–1770). <https://doi.org/10.1002/ijc.27873>
- Gialeli, C., Gungor, B., & Blom, A. M. (2018). Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond. In *Molecular Immunology* (Vol. 102, pp. 73–83). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.023>
- Götte, M., & Kovalszky, I. (2018). Extracellular matrix functions in lung cancer. In *Matrix Biology* (Vol. 73, pp. 105–121). <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.018>
- Graves, E. E., Maity, A., & Le, Q.-T. (2010). The tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer. *Seminars in Radiation Oncology* (Vol. 20, Issue 3, pp. 20156–163. doi: 10.1016/j.semradonc.2010.01.003.
- Griffin, R., & Ramirez, R. A. (2017). Molecular targets in non-small cell lung cancer. In *The Ochsner Journal* (Vol. 17, Issue 4, pp. 388–392.
- Gupta, M. K. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 9, Issue 6, p. 1144). <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i6.1144>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hasegawa, K., Tanaka, S., Fujiki, F., Morimoto, S., Nakano, K., Kinoshita, H., Okumura, A., Fujioka, Y., Urakawa, R., Nakajima, H., Tatsumi, N., Nakata, J., Takashima, S., Nishida, S., Tsuboi, A., Oka, Y., Oji, Y., Miyoshi, E., Hirata, T., ... Hosen, N. (2016). Glycosylation Status of CD43 Protein Is Associated with Resistance of Leukemia Cells to CTL-Mediated Cytolysis. In *PLOS ONE* (Vol. 11, Issue 3, p. e0152326). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152326>
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. In *Journal of Cancer Research and Practice* (Vol. 4, Issue 4, pp. 127–129). <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S. (2019). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 6, p. 160). doi: 10.3389/fmolb.2019.00160
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. In *Nature* (Vol. 553, Issue 7689, pp. 446–454). doi: 10.1038/nature25183
- Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V., Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J., Jr, Wu, Y.-L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. In *The Lancet* (Vol. 389, Issue 10066, pp. 299–311). doi: 10.1016/S0140-6736(16)30958-8.
- Hollingsworth, M. A., & Swanson, B. J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 4, Issue 1, pp. 45–60). <https://doi.org/10.1038/nrc1251>

- Holownia, A., Wielgat, P., Rysiak, E., & Braszko, J. J. (2016). Intracellular and Extracellular Cytokines in A549 Cells and THP1 Cells Exposed to Cigarette Smoke. In *Respiratory Medicine and Science* (Vol. 910, pp. 39–45). https://doi.org/10.1007/5584_2016_214
- I, H., & Cho, J.Y. (2015). Lung Cancer Biomarkers. In *Advances in Clinical Chemistry*. (Vol. 72, pp. 107-70). doi: 10.1016/bs.acc.2015.07.003.
- Huang, Z., & Bao, S.-D. (2004). Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. In *World Journal of Gastroenterology: WJG* (Vol. 10, Issue 4, pp. 463–470). doi: 10.3748/wjg.v10.i4.463
- Hui, L., & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. In *Cancer Letters* (Vol. 368, Issue 1, pp. 7–13. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.039
- Hung, C.-C., Zhen, Y.-Y., Niu, S.-W., Hsu, J.-F., Lee, T.-H., Chuang, H.-H., Wang, P.-H., Lee, S.-C., Lin, P.-C., Chiu, Y.-W., Wu, C.-H., Huang, M.-S., Hsiao, M., Chen, H.-C., & Yang, C.-J. (2020). Lung Cancer Cell-Derived Secretome Mediates Paraneoplastic Inflammation and Fibrosis in Kidney in Mice. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 12, p. 3561). <https://doi.org/10.3390/cancers12123561>
- I, H., Cho, J.Y. (2015) Lung Cancer Biomarkers. In *Advances In Clinical Chemistry* (Vol. 72 pp:107-70). doi: 10.1016/bs.acc.2015.07.003.
- INCAN. (2018). 145. Cada año mueren cerca de ocho mil mexicanos por cáncer de pulmón. <https://www.gob.mx/salud/prensa/145-cada-ano-mueren-cerca-de-ocho-mil-mexicanos-por-cancer-de-pulmon?idiom=es>
- Introduction to Extracellular Matrix and Cell Adhesion. (enero 3, 2021). Consultado el 22 de agosto de 2021. De: <https://bio.libretexts.org/@go/page/16170>.
- Janeway, C. A., Jr, Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *The Immune System in Health and Disease*. Garland Science.
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., & Eggleton, P. (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 11, Issue 3, pp: 122–129). doi: 10.1016/s0962-8924(01)01926-2
- Kadaja-Saarepuu, L., Laos, S., Jääger, K., Viil, J., Balikova, A., Lööke, M., Hansson, G. C., & Maimets, T. (2008). CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in non-hematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF. In *Oncogene* (Vol. 27, Issue 12, pp. 1705–1715). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210802>
- Karagiannis, G. S., Pavlou, M. P., & Diamandis, E. P. (2010). Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. In *Molecular Oncology* (Vol. 4, Issue 6, pp. 496–510). doi: 10.1016/j.molonc.2010.09.001
- Keith, R. L., & Miller, Y. E. (2013). Lung cancer chemoprevention: current status and future prospects. *Nature Reviews*. In *Clinical Oncology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 334–343). DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.64
- Kufe, D. W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 9, Issue 12, pp. 874–885). <https://doi.org/10.1038/nrc2761>
- Kupcova Skalnikova, H., Cizkova, J., Cervenka, J., & Vodicka, P. (2017). Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 12, p. 2697) <https://doi.org/10.3390/ijms18122697>
- Lakshmanan, I., Ponnusamy, M. P., Macha, M. A., Haridas, D., Majhi, P. D., Kaur, S., Jain, M.,

- Batra, S. K., & Ganti, A. K. (2015). Mucins in Lung Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications. In *Journal of Thoracic Oncology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 19–27). <https://doi.org/10.1097/jto.0000000000000404>
- Li, L., Zhang, Y., Qiao, J., Yang, J. J., & Liu, Z.-R. (2014). Pyruvate kinase M2 in blood circulation facilitates tumor growth by promoting angiogenesis. In *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 289, Issue 37, pp. 25812–25821). doi: 10.1074/jbc.M114.576934
- Lin, Q., Tan, H. T., Lim, H. S. R., & Chung, M. C. M. (2013). Sieving through the cancer secretome. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1834, Issue 11, pp. 2360–2371). doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.030
- Li, Q., Li, N., Liu, C.-Y., Xu, R., Kolosov, V. P., Perelman, J. M., & Zhou, X.-D. (2015). Ezrin/Exocyst Complex Regulates Mucin 5AC Secretion Induced by Neutrophil Elastase in Human Airway Epithelial Cells. In *Cellular Physiology and Biochemistry* (Vol. 35, Issue 1, pp. 326–338). <https://doi.org/10.1159/000369699>
- Li, S., Li, X., Wang, Y., Yang, J., Chen, Z., & Shan, S. (2014). Global secretome characterization of A549 human alveolar epithelial carcinoma cells during Mycoplasma pneumoniae infection. In *BMC Microbiology* (Vol. 14, Issue 27). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-27>
- Li, W., Sahu, D., & Tsen, F. (2012). Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1823, Issue 3, pp. 730–741). doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.009
- Lokman, N. A., Ween, M. P., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2011). The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society* (Vol. 4, Issue 2, pp. 199–208). doi: 10.1007/s12307-011-0064-9
- Luo, X., Liu, Y., Wang, R., Hu, H., Zeng, R., & Chen, H. (2011). A high-quality secretome of A549 cells aided the discovery of C4b-binding protein as a novel serum biomarker for non-small cell lung cancer. In *Journal of Proteomics* (Vol. 74, Issue 4, pp. 528–538). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.011>
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 196, Issue 4, pp. 395–406). doi: 10.1083/jcb.201102147
- Macor, P., Capolla, S., & Tedesco, F. (2018). Complement as a Biological Tool to Control Tumor Growth. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, p. 2203). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02203>
- Mamidi, S., Höne, S., & Kirschfink, M. (2017). The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. In *Immunobiology* (Vol. 222, Issue 1, pp. 45–54). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.008>
- Marrugal, Á., Ojeda, L., Paz-Ares, L., Molina-Pinelo, S., & Ferrer, I. (2016). Proteomic-Based Approaches for the Study of Cytokines in Lung Cancer. In *Disease Markers* (Vol. 2016, p. 2138627). <https://doi.org/10.1155/2016/2138627>
- Matanić, D., Beg-Zec, Z., Stojanović, D., Matakorić, N., Flego, V., & Milevoj-Ribić, F. (2003). Cytokines in patients with lung cancer. In *Scandinavian Journal of Immunology* (Vol. 57, Issue 2, pp. 173–178). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01205.x>
- Ma, X.-B., Zheng, Y., Yuan, H.-P., Jiang, J., & Wang, Y.-P. (2015). CD43 expression in diffuse

- large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis. In *Human Pathology* (Vol. 46, Issue 4, pp. 593–599). <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.01.002>
- Meikle, C. K. S., Kelly, C. A., Garg, P., Wuescher, L. M., Ali, R. A., & Worth, R. G. (2016). Cancer and Thrombosis: The Platelet Perspective. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 4, p.147). doi: 10.3389/fcell.2016.00147
- Merchant, N., Nagaraju, G. P., Rajitha, B., Lammata, S., Jella, K. K., Buchwald, Z. S., . . . Ali, A. N. (2017). Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. In *Carcinogenesis* (Vol. 38, Issue 8, pp: 766-780). doi: 10.1093/carcin/bgx063
- Merdad, A., Karim, S., Schulten, H.-J., Dallol, A., Buhmeida, A., Al-Thubaity, F., Gari, M. A., Chaudhary, A. G., Abuzenadah, A. M., & Al-Qahtani, M. H. (2014). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. In *Anticancer Research* (Vol. 34, Issue 3, pp. 1355–1366).
- Miner, J. H. (2010). The Extracellular Matrix: An Overview. In R. Zent & A. Pozzi (Eds.), *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer* (pp. 1–17). Springer New York.
- Mittal, V., El Rayes, T., Narula, N., McGraw, T. E., Altorki, N. K., & Barcellos-Hoff, M. H. (2016). The Microenvironment of Lung Cancer and Therapeutic Implications. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol 890, pp. 75–110). doi: 10.1007/978-3-319-24932-2_5.
- Mohrherr, J., Uras, I. Z., Moll, H. P., & Casanova, E. (2020). STAT3: Versatile Functions in Non-Small Cell Lung Cancer. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 5, p. 1107). <https://doi.org/10.3390/cancers12051107>
- Mossina, A., Lukas, C., Merl-Pham, J., Uhl, F. E., Mutze, K., Schamberger, A., Staab-Weijnitz, C., Jia, J., Yildirim, A. Ö., Königshoff, M., Hauck, S. M., Eickelberg, O., & Meiners, S. (2017). Cigarette smoke alters the secretome of lung epithelial cells. In *Proteomics*, (Vol. 17, pp. 1-2). <https://doi.org/10.1002/pmic.201600243>
- Mouw, J. K., Ou, G., & Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. In *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 12, pp. 771–785). doi: 10.1038/nrm3902.
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. In *Cardiovascular Research* (Vol. 69, Issue 3, pp. 562–573). doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
- Najafi, M., Farhood, B., & Mortezaee, K. (2019). Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. In *Journal of Cellular Biochemistry* (Vol. 120, Issue 3, pp. 2782–2790). doi: 10.1002/jcb.27681.
- National Cancer Institute. (2007). *What Is Cancer?* <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- National Cancer Institute. (2020). *Non-small cell lung cancer treatment (PDQ®)–health professional version*. <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq>
- Neisch, A. L., & Fehon, R. G. (2011). Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane–cortex interactions and signaling. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 377–382). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.011>

- NIH. (2020). *Worldwide cancer deaths: Image details - NCI visuals online*. <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=12610>
- Okroj, M., Hsu, Y.-F., Ajona, D., Pio, R., & Blom, A. M. (2008). Non-small cell lung cancer cells produce a functional set of complement factor I and its soluble cofactors. In *Molecular Immunology* (Vol. 45, Issue 1, pp. 169–179). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.04.025>
- Olivos Ortiz, A. (2008). Papel de CD43 en células tumorales. Universidad Nacional Autónoma de México.
- OMS. (2020). OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Padilla-Raygoza, N., Monroy-Torres, R., Sandoval-Salazar, C., Vera-Becerra, L. E., Patiño-López, M. E., de Lourdes García-Campos, M., Campos, V. B., Del Carmen Ortega Jiménez, M., Del Carmen Delgado-Sandoval, S., Ramírez-Gómez, X. S., Jimenez-García, S. N., & Lemus, H. L. L.-. (2020). Cancer prevention programmes in Mexico: are we doing enough? In *Ecancermedicalscience* (Vol 14, p. 997). doi: 10.3332/ecancer.2020.997
- Paltridge, J. L., Belle, L., & Khew-Goodall, Y. (2013). The secretome in cancer progression. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1834, Issue 11, pp. 2233–2241). doi: 10.1016/j.bbapap.2013.03.014.
- Park, W. S., Kim, H. J., Lee, G. K., Son, H. S., & Bae, Y. (2012). Anti-adhesive functions of CD43 expressed on colon carcinoma cells through the modulation of integrins. In *Experimental and Molecular Pathology* (Vol. 92, Issue 1, pp. 82–89). <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.10.009>
- Patel, S., Ngounou Wetie, A. G., Darie, C. C., & Clarkson, B. D. (2014). Cancer secretomes and their place in supplementing other hallmarks of cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 806, pp. 409–442). DOI: 10.1007/978-3-319-06068-2_20
- Pawelczyk, K., Piotrowska, A., Ciesielska, U., Jablonska, K., Gletzel-Plucinska, N., Grzegorzolka, J., Podhorska-Okolow, M., Dziegiel, P., & Nowinska, K. (2019). Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040824>
- Pearce, O. M. T., & Läubli, H. (2016). Sialic acids in cancer biology and immunity. In *Glycobiology* (Vol. 26, Issue 2, pp. 111–128). doi: 10.1093/glycob/cww097
- Pedraza-Alva, G., Mérida, L. B., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (1998). T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. In *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 273, Issue 23, pp. 14218–14224). DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14218>
- Pepper, M. S. (2001). Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 21, Issue 7, pp. 1104–1117). <https://doi.org/10.1161/hq0701.093685>
- Piñeiro Fernández, J., Luddy, K. A., Harmon, C., & O'Farrelly, C. (2019). Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174131>
- Pio, R., Corrales, L., & Lambris, J. D. (2014). The role of complement in tumor growth. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 772, pp. 229–262). DOI: 10.1007/978-1-4614-5915-6_11
- Planque, C., Kulasingam, V., Smith, C.R., Reckamp, K., Goodglick, L., Diamandis, E.P.(2009)

- Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines. *Molecular and Cellular Proteomics* (Vol.8, Issue 12, pp:2746-58. doi: 10.1074/mcp.M900134-MCP200
- Rachagani, S., Torres, M. P., Moniaux, N., & Batra, S. K. (2009). Current status of mucins in the diagnosis and therapy of cancer. In *BioFactors* (Vol. 35, Issue 6, pp. 509–527). doi: 10.1002/biof.64.
- Raina, D., Ahmad, R., Joshi, M. D., Yin, L., Wu, Z., Kawano, T., Vasir, B., Avigan, D., Kharbanda, S., & Kufe, D. (2009). Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. In *Cancer Research* (Vol. 69, Issue 12, pp. 5133–5141). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0854
- Remold-O'Donnell, E., Zimmerman, C., Kenney, D., & Rosen, F. S. (1987). Expression on blood cells of sialoporphin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. In *Blood* (Vol. 70, Issue 1, pp. 104–109). <https://doi.org/10.1182/blood.V70.1.104.104>
- Ribatti, D. (2019). Interleukins as modulators of angiogenesis and anti-angiogenesis in tumors. In *Cytokine* (Vol. 118, pp. 3–7). <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.10.022>
- Rivas-Fuentes, S., Salgado-Aguayo, A., Pertuz Belloso, S., Gorocica Rosete, P., Alvarado-Vásquez, N., & Aquino-Jarquín, G. (2015). Role of Chemokines in Non-Small Cell Lung Cancer: Angiogenesis and Inflammation. In *Journal of Cancer* (Vol. 6, Issue 10, pp. 938–952. doi: 10.7150/jca.12286
- Rollin, J., Régina, S., Vourc'h, P., Lochmann, S., Bléchet, C., Reverdiau, P., & Gruel, Y. (2007). Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. In *Lung Cancer* (Vol. 56, Issue 2, pp: 273-280)v. doi: 10.1016/j.lungcan.2006.11.021
- Rosenstein, Y., Park, J. K., Hahn, W. C., Rosen, F. S., Bierer, B. E., & Burakoff, S. J. (1991). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. In *Nature* (Vol. 354, Issue 6350, pp. 233–235). <https://doi.org/10.1038/354233a0>
- Ruiz-Cordero, R., & Devine, W. P. (2020). Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. In *Surgical Pathology Clinics* (Vol. 13, Issue 1, pp. 17–33). doi: 10.1016/j.path.2019.11.002.
- Rutkowski, M. J., Sughrue, M. E., Kane, A. J., Mills, S. A., & Parsa, A. T. (2010). Cancer and the Complement Cascade. In *Molecular Cancer Research* (Vol. 8, Issue 11, pp. 1453–1465). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-10-0225>
- Sakurai, T., & Kudo, M. (2011). Signaling pathways governing tumor angiogenesis. In *Oncology* (Vol. 81 Suppl 1, pp. 24–29). doi: 10.1159/000333256
- Santamaría, M., López-Beltrán, A., Toro, M., Peña, J., & Molina, I. J. (1996). Specific Monoclonal Antibodies against Leukocyte-restricted Cell Surface Molecule CD43 React with Nonhematopoietic Tumor Cells. In *Cancer Research* (Vol. 56, Issue 15, pp. 3526–3529.
- Santana, M. A., Angélica Santana, M., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S. J., & Rosenstein, Y. (2000). CD43-mediated Signals Induce DNA Binding Activity of AP-1, NF-AT, and NFκB Transcription Factors in Human T Lymphocytes. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 275, Issue 40, pp. 31460–31468). <https://doi.org/10.1074/jbc.m005231200>
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. In *Cell and Tissue Research* (Vol.

- 343, Issue 1, pp. 227–235). doi: 10.1007/s00441-010-1034-0
- Schaaij-Visser, T. B. M., de Wit, M., Lam, S. W., & Jiménez, C. R. (2013). The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1834, Issue 11, pp. 2242–2258). doi: 10.1016/j.bbapap.2013.01.029.
- Senapati, S., Das, S., & Batra, S. K. (2010). Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 35, Issue 4, pp. 236–245). doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.003.
- Şener, E., Şipal, S., & Gündoğdu, C. (2016). Comparison of Microvessel Density with Prognostic Factors in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. In *Turkish Journal of Pathology* (Vol. 32, Issue 3, pp. 164-70). doi: 10.5146/tjpath.2016.01366.
- Shelley, C. S., Remold-O'Donnell, E., Rosen, F. S., & Whitehead, A. S. (1990). Structure of the human sialoporphin (CD43) gene. Identification of features atypical of genes encoding integral membrane proteins. In *Biochemical Journal* (Vol. 270, Issue 3, pp. 569–576). <https://doi.org/10.1042/bj2700569>
- Shijubo, N., Kojima, H., Nagata, M., Ohchi, T., Suzuki, A., Abe, S., & Sato, N. (2003). Tumor angiogenesis of non-small cell lung cancer. In *Microscopy Research and Technique* (Vol. 60, Issue 2, pp. 186–198). doi: 10.1002/jemt.10257.
- Shin, J., Song, S.-Y., Ahn, H.-S., An, B. C., Choi, Y.-D., Yang, E. G., Na, K.-J., Lee, S.-T., Park, J.-I., Kim, S.-Y., Lee, C., & Lee, S.-W. (2017). Integrative analysis for the discovery of lung cancer serological markers and validation by MRM-MS. In *PLOS ONE* (Vol. 12, Issue 8, p. e0183896). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183896>
- Sikut, R., Andersson, C. X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N. G., & Hansson, G. C. (1999). Detection of cd43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. In *International Journal of Cancer* (Vol. 82, Issue 1, pp. 52–58). [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990702\)82:1<52::aid-ijc10>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990702)82:1<52::aid-ijc10>3.0.co;2-c)
- Singh, A. P., Chaturvedi, P., & Batra, S. K. (2007). Emerging Roles of MUC4 in Cancer: A Novel Target for Diagnosis and Therapy. In *Cancer Research* (Vol. 67, Issue 2, pp. 433–436). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3114.
- Skerenova, M., Mikulova, V., Capoun, O., Zima, T., & Tesarova, P. (2017). Circulating tumor cells and serum levels of MMP-2, MMP-9 and VEGF as markers of the metastatic process in patients with high risk of metastatic progression. In *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (Vol. 161, Issue 3, pp.272-280). doi: 10.5507/bp.2017.022
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., & Hayakawa, Y. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. In *Immunological Reviews* (Vol. 202, Issue 1, pp. 275–293). doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00199.x
- Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 448–464). doi: 10.1002/path.1400
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. Global cancer statistics (2021). 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In *CA Cancer Journal of Clinicians* (Vol. 71, pp: 209- 249). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. In

- Nature Reviews. Immunology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 309–324). doi: 10.1038/nri.2017.142
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 97, pp. 4–27). doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001
- Thornton, D. J., Rousseau, K., & McGuckin, M. A. (2008). Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 70, Issue 1, pp. 459–486). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702>
- Torres-Huerta, A., Aleman-Navarro, E., Bravo-Adame, M. E., Sandoval-Hernandez, M. A., Migueles-Lozano, O. A., & Rosenstein, Y. (2018) CD43. In: Choi S. (eds) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, Cham (pp. 893–905). https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_523
- Torres-Huerta, A., Villaseñor, T., Flores-Alcantar, A., Parada, C., Alemán-Navarro, E., Espitia, C., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein, Y. (2017). Interaction of the CD43 Sialomucin with the Mycobacterium tuberculosis Cpn60.2 Chaperonin Leads to Tumor Necrosis Factor Alpha Production. In *Infection and Immunity* (Vol. 85, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/IAI.00915-16>
- Trouw, L. A., & Daha, M. R. (2011). Role of complement in innate immunity and host defense. In *Immunology Letters* (Vol. 138, Issue 1, pp. 35–37). <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.02.014>
- Tuccillo, F. M., de Laurentiis, A., Palmieri, C., Fiume, G., Bonelli, P., Borrelli, A., Tassone, P., Scala, I., Buonaguro, F. M., Quinto, I., & Scala, G. (2014). Aberrant Glycosylation as Biomarker for Cancer: Focus on CD43. In *BioMed Research International* (Vol. 2014, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1155/2014/742831>
- Tuccillo, F. M., Palmieri, C., Fiume, G., de Laurentiis, A., Schiavone, M., Falcone, C., Iaccino, E., Galandrini, R., Capuano, C., Santoni, A., D'Armiento, F. P., Arra, C., Barbieri, A., Piaz, F. D., Venzon, D., Bonelli, P., Buonaguro, F. M., Scala, I., Mallardo, M., ... Scala, G. (2014). Cancer-Associated CD43 Glycoforms as Target of Immunotherapy. In *Molecular Cancer Therapeutics* (Vol. 13, Issue 3, pp. 752–762). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-13-0651>
- Vincent, E.E., Sergushichev, A., Griss, T., Gingras, M.C., Samborska, B., Ntimbane, T., Coelho, P.P., Blagih, J., Raissi, T.C., Choinière, L., Bridon, G., Loginicheva, E., Flynn, B.R., Thomas, E.C., Tavaré, J.M., Avizonis, D., Pause, A., Elder, D.J., Artyomov, M.N., Jones, R.G. (2015). Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Regulates Metabolic Adaptation and Enables Glucose-Independent Tumor Growth. In *Molecular Cell* (Vol.60, Issue 2, pp.195-207. doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.013.
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., Gong, Z., Zhang, S., Zhou, J., Cao, K., Li, X., Xiong, W., Li, G., Zeng, Z., & Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. In *Journal of Cancer* (Vol. 8, Issue 5, pp. 761–773). doi: 10.7150/jca.17648
- Wang, W., Link, V., & Green, J. M. (2000). Identification and cloning of a CD43-associated serine/threonine kinase. In *Cellular Immunology* (Vol. 205, Issue 1, pp. 34–39). doi: 10.1006/cimm.2000.1716.
- Watanabe, N., Dickinson, D. A., Krzywanski, D. M., Iles, K. E., Zhang, H., Venglarik, C. J., & Forman, H. J. (2002). A549 subclones demonstrate heterogeneity in toxicological sensitivity and antioxidant profile. In *American Journal of Physiology-Lung Cellular and*

- Molecular Physiology* (Vol. 283, Issue 4, pp. L726–L736). doi: 10.1152/ajplung.00025.2002
- Weber, C. E., & Kuo, P. C. (2012). The tumor microenvironment. In *Surgical Oncology* (Vol. 21, Issue 3, pp. 172–177). doi: 10.1016/j.suronc.2011.09.001
- Wek, R.C., Staschke, K.A. (2010). How do tumours adapt to nutrient stress? In *EMBO Journal* (Vol. 29, Issue 12, pp. 1946-7). doi: 10.1038/emboj.2010.110.
- Wen, Y., Caffrey, T. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., & Hollingsworth, M. A. (2003). Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. In *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 278, Issue 39, pp. 38029-39). doi: 10.1074/jbc.M304333200.
- Wong, E.V. Introduction to Extracellular Matrix and Cell Adhesion (2021, January 3). Retrieved August 18, 2021 from <https://bio.libretexts.org/@go/page/16170>
- Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A., & Whetton, A. D. (2014). The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 40, Issue 4, pp. 558–566). doi: 10.1016/j.ctrv.2013.10.001
- Wroblewski, J. M., Bixby, D. L., Borowski, C., & Yannelli, J. R. (2001). Characterization of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines for expression of MHC, co-stimulatory molecules and tumor-associated antigens. In *Lung Cancer* (Vol. 33, Issue 2-3, pp. 181–194). doi: 10.1016/s0169-5002(01)00210-0
- Xu, S., Xu, H., Wang, W., Li, S., Li, H., Li, T., Zhang, W., Yu, X., & Liu, L. (2019). The role of collagen in cancer: from bench to bedside. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 17, Issue 1, p. 309). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1>
- Xu, T., Li, D., Wang, H., Zheng, T., Wang, G., & Xin, Y. (2017). MUC1 downregulation inhibits non-small cell lung cancer progression in human cell lines. In *Experimental and Therapeutic Medicine* (Vol. 14, Issue 5, pp. 4443-4447 <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5062>
- Yadav, L. (2015). Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. In *Journal Of Clinical And Diagnostic Research* (Vol. 9, Issue 6, pp. XE01-XE05). <https://doi.org/10.7860/jcdr/2015/12016.6135>
- Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Ahmad, R., & Kaur, G. (2014). Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. In *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* (Vol. 15, Issue 3, pp.1085–1091). doi: 10.7314/apjcp.2014.15.3.1085
- Yoda, S., Dagogo-Jack, I., & Hata, A. N. (2019). Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities. In *Pharmacology & Therapeutics* (Vol. 193, pp. 20–30). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.007>
- Yoo, S. Y., & Kwon, S. M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2013, p.127170). DOI: 10.1155/2013/127170
- Yuan, Y., Jiang, Y.-C., Sun, C.-K., & Chen, Q.-M. (2016). Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). In *Oncology Reports* (Vol. 35, Issue 5, pp.2499–2515). doi: 10.3892/or.2016.4660
- Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: an overview. In *Journal of Glaucoma* (Vol. 23, Issue 8 Suppl 1, pp.S20–S23). doi: 10.1097/IJG.0000000000000108
- Zhang, R., Liu, Q., Li, T., Liao, Q., & Zhao, Y. (2019). Role of the complement system in the tumor microenvironment. In *Cancer Cell International* (Vol. 19, p. 300). <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1027-3>

- Zipfel, P. F., & Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 10, pp. 729–740). <https://doi.org/10.1038/nri2620>
- Ziprin, P., Alkhamesi, N. A., Ridgway, P. F., Peck, D. H., & Darzi, A. W. (2004). Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumour-mesothelial cell adhesion. In *Biological Chemistry* (Vol. 385, Issue 8). <https://doi.org/10.1515/bc.2004.092>
- Zito Marino, F., Bianco, R., Accardo, M., Ronchi, A., Cozzolino, I., Morgillo, F., Rossi, G., & Franco, R. (2019). Molecular heterogeneity in lung cancer: from mechanisms of origin to clinical implications. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 16, Issue 7, pp. 981–989). doi: 10.7150/ijms.34739

IX. ANEXOS

Anexo 1. Materiales y Métodos

■ Lista de anticuerpos

Anticuerpo	Hospedero	#Catálogo	Casa comercial	Fluoróforo	Dilución	Solución de bloqueo
Anti-CD43 (H-300)	Conejo	sc-20819	Santa Cruz Biotechnology	---	1:2500	5% de leche en TBS-T* buffer
Anti-CD43 (DFT1)	Ratón	sc-6256 AF647	Santa Cruz Biotechnology	Alexa Fluor-647	1:100	2%FBS/PBS
Anti- actin	Ratón	643802	BioLegend	---	1:1000	5% de leche en TBS-T buffer
Anti-pSTAT3 (Tyr705)	Conejo	9131	Cell Signaling Technology	---	1:500	3% BSA en TBS-T buffer
Anti-IKB α	Ratón	8404	Santa Cruz Biotechnology	---	1:500	3% BSA en TBS-T buffer
HRP-conjugado anti-ratón IgG	Conejo	sc-358914	Santa Cruz Biotechnology	----	1:5000	5% de leche en TBS-T buffer
Anti-complemento C3/C3b/iC3b	Ratón	846502	BioLegend,	----	1:100	2% FBS/PBS
Anti-complemento C5b-9	Conejo	55811	Abcam	----	1:4000	5% de leche en TBS
HRP-conjugado anti-conejo IgG	Cabra	4055-05	Southern Biotechnology		1:5000	5% leche o 3% BSA en TBS-T buffer
Anticuerpo secundario Anti-ratón	Ratón	A21052	Invitrogen	Alexa Fluor-633	1:1400	2%FBS/PBS
MMP-2 (8B4)	Ratón	sc-13595	Santa Cruz Biotechnology	---	1:1000	3% BSA en TBS-T buffer
MMP-9 (7-11C)	Ratón	sc-13520	Santa Cruz Biotechnology	---	1:1000	3% BSA en TBS-T buffer

■ Lista de reactivos

Reactivo	# Catálogo	Casa comercial
Advanced DMEM	12491	Gibco/Life Technologies
DMEM-low glucose	D2902	SigmaAldrich
Penicillin Streptomycin	15140-122	Gibco/Life Technologies
Fetal Bovine Serum	16000-044	Gibco/Life Technologies
Lipofectamine 2000	11668-019	Invitrogen
Trypsin-EDTA 10x	T4174	SigmaAldrich
G418 Sulfate	13200	Cayman Laboratories
Human Cytokine Antibody Array C5	AAH-CYT-5-8	Ray-Biotech
Matrigel	354234	Corning Life Sciences
Amicon Ultra-15, membrana PLBC Ultracel-PL, 3 kDa	UFC900308	Millipore
DuoSet PDGF ELISA	D41159	R&D Systems
Human Neuroserpin Mini ABTS ELISA Development kit	900-M412	Peprtech
ABTS Substrate	A3219	SigmaAldrich
Human Fibrinogen ELISA Kit SimpleStep	Ab208036	Abcam
Acrylamide	161-01-01	BioRad

Bis-acrylamide	1610201	BioRad
TEMED	161-0800	BioRad
Ammonium Persulphate	1610700	BioRad
VEGF	100-20	PeptoTech
MMP-2/MMP-9 Inhibitor II	sc-311430	Santa Cruz Biotechnology
Fixable Viability Dye eFluor 780	65-0865-14	eBioscience
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB	Del kit 88-7346-88	eBioscience
Hank's solution	H6648	Sigma

■ Cultivo de las células A549

La línea celular A549 (ATCC CCL-185TM) proviene de un carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano, establecido en 1972 mediante un explante de cultivo de tejido carcinomatoso de un paciente caucásico de 58 años. Las células se caracterizan por su fenotipo alveolar epitelial y son utilizadas como modelo *in vitro* de células adherentes de adenocarcinoma de pulmón. La línea celular presenta mutaciones activadoras en la proteína K-Ras y mutaciones inactivadoras en los genes reparadores de DNA del complejo SMARC4/BRG1. No presenta mutaciones comunes en el cáncer de pulmón como EGFR, PIK3CA, TP53, ALK y PTEN (Korrodi-Gregório et al., 2016).

La línea celular se adquirió directamente del ATCC al inicio del estudio. Las células se mantuvieron en medio DMEM Advanced 1X (Gibco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin (Gibco). Las células se mantuvieron en cajas de 6 cm a 37°C en una atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ y se subcultivaron cuando alcanzaron una confluencia del 70-80%. Para el subcultivo las células se lavaron con 3 mL de PBS-1X y se despegaron con 500 µL tripsina-EDTA 1X (Sigma) durante 2 min a 37°C. La tripsina se neutralizó con 1 mL de DMEM Advanced suplementado con 5% de SFB.

■ Obtención de clonas A549 con diferentes niveles de CD43

Las células A549 se transfectaron con el método reportado en (Camacho-Concha et al., 2013). El vector pSuper tiene un tamaño de 5344 pares de bases (pb), contiene el reportero fluorescente GFP y un sitio de resistencia a neomicina para seleccionar células eucariotas (Brummelkamp et al., 2002). Se linearizaron 7 µg del plásmido pSuper-RNAi así como el 7 µg del vector vacío, pSuper, utilizando la enzima de restricción DraIII durante 1 hora a 37°C con el buffer adecuado en un volumen final de 20 µL. El ADN digerido se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar que el plásmido estuviera totalmente linearizado. Comprobado esto, el ADN se precipitó con 1.5 mL de isopropanol a -20°C durante 12 horas. Posteriormente se centrifugó a 17,000 g durante 30 minutos a 4°C, el pellet se resuspendió en etanol al 70% y se incubó durante 30 minutos a -70°C, seguido se centrifugaron las muestras a 17,000 g durante 30 minutos a 4°C. El pellet se dejó secar con el fin de eliminar el etanol y se resuspendió en 6.5 µL de agua estéril. El ADN precipitado se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar su integridad.

Las células se cultivaron en cajas de cultivo de 6 cm de diámetro y se transfectaron cuando alcanzaron el 90% de confluencia, por el método de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para realizar la transfección, se mezclaron 500 µL de Opti-MEM (Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium) y 8 µL de lipofectamina, así como 7 µg de ADN linearizado de la construcción que expresa el RNAi de CD43 (pSuper-RNAi) o del vector vacío (pSuper) con 500 µL de Opti-MEM. Después de incubar durante 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 500 µL de la mezcla que contiene la lipofectamina a la mezcla ADN-Opti-MEM y los tubos se dejaron incubando por 20 min a temperatura ambiente. Seguido, la mezcla fue agregada por goteo a las células previamente lavadas con PBS, dejando incubar durante 6 horas a 37 C, 5% CO₂. Posterior a esto, se les agregó 3 mL de DMEM suplementado con 10% SFB (sin antibióticos) por 48 horas, después de lo cual, se añadió PSG (100 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina y 2 mM de glutamina) y las células se pusieron en selección con neomicina (G418, 800 µg/mL). Después de una semana se llevó a cabo la clonación por dilución limitante (a razón de una célula por pozo) en placas de 96 pozos y las clonas obtenidas se analizaron para determinar los niveles de expresión de CD43 por inmunoblot y/o citometría de flujo.

■ Caracterización de las clonas mediante inmunoblot y/o citometría de flujo

a) Inmunoblot

Las clonas fueron caracterizadas mediante la evaluación de la expresión de CD43 por el método de inmunoblot a partir de lisados celulares totales. Las células se cultivaron al 80-90% de confluencia en cajas de 6cm, se triptinizaron y el pellet fue lavado con

PBS. Posteriormente, el botón celular fue resuspendido en 50 μ L de buffer de lisis (HEPES 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, 0.5% Tritón X-100, suplementado al momento de usar con DTT 0.5 mM, 10 mM β -glicerofosfato, 200 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 μ g/mL leupeptina, 50 μ g/mL antipaina y 10 μ g/mL aprotinina). La mezcla se incubó 15 minutos a 4°C en agitación. Seguido se centrifugó a 17,000 g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, donde se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (Kruger, 1994).

Se corrieron 40 μ g de proteína en geles SDS-PAGE 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ m (Whatman) en buffer de transferencia (Glicina 200 mM, Tris 25 mM y MeOH 20%) a 100 V durante 90 min. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en TBS-T (NaCl 150 mM, Tris/HCl 20 mM pH 7.4 y Tween 0.1%) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (anti-CD43 H300: anti-GFP: anti-actina) durante toda la noche en agitación a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T (cada lavado de 10 min) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:5000 en leche al 5%, seguido de tres lavados con TBS-T. Las proteínas se visualizaron con el sustrato Western Lighting Plus-ECL (Perkin Elmer) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las imágenes se capturaron con el foto documentador *Molecular Imager Gel DocTMXR+ Imaging System* (BioRad) y analizadas mediante el software ImageLab (BioRad).

b) Citometría de flujo

Se cultivaron las células en cajas de 6 cm de diámetro y cuando tenían un 70-80% de confluencia se despegaron con tripsina-EDTA y se contaron con una cámara de Neubauer. Se colocaron 2.5×10^5 células en tubos de FACS, se lavaron con PBS, y se fijaron con 200 μ L de PFA 2% durante 10 min a 37°C. Después se lavaron con 3 mL de solución de FACS (PBS, 2% SFB) y se permeabilizaron con 1 mL de metanol frío durante 30 min en hielo, después de lo cual se agregó a cada tubo 2 mL de solución de FACS y se centrifugaron para eliminar el metanol. Las células se marcaron con 0.2 μ g (1 μ L por muestra) del anticuerpo monoclonal específico para CD43 DFT1 acoplado a Alexa Fluor-647 (Santa-Cruz Biotechnology) durante 30 min en hielo. Después, las muestras se lavaron por centrifugación con 3 mL de solución de FACS, se descartó el sobrenadante y las células resuspendidas en 100 μ L de solución de FACS se fijaron con 100 μ L de PFA 2% por 10 min y se guardaron a 4°C protegidas de la luz hasta su análisis con un citómetro FACSCanto II.

■ **Determinación de la viabilidad de las clonas pSuper y RNAi en condiciones limitantes de nutrientes**

Se cultivaron 2.5×10^5 células A549 pSuper y RNAi por pozo en placas de 24 pozos en medio DMEM Advanced suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100U de penicilina, 2 mM de glutamina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin a 37°C y 5% de CO_2 , hasta alcanzar confluencia. Posteriormente fueron lavadas cuatro veces con PBS y dos veces con DMEM (bajo en glucosa) libre de suero y rojo de fenol, seguido fueron incubadas en este mismo medio a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 horas. Transcurridas las 48 horas, el sobrenadante fue colocado en tubos de FACS junto con las células despegadas con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 400 g por 6 min, seguido de un lavado con PBS. Para evaluar la viabilidad, las células se marcaron con el colorante de viabilidad eFluor 780 (50 $\mu\text{L}/\text{tubo}$ de una dilución 1:10,000 en PBS de la solución comercial, eBioscience) durante 30 min en hielo, seguido se lavaron con 3 mL de PBS, se fijaron con 100 μL de PFA 2% 10 minutos y se guardaron a 4°C protegidas de la luz hasta su análisis. Como control negativo de muerte se utilizaron células A549 cultivadas bajo condiciones óptimas y como control positivo se utilizaron células A549 incubadas durante 15 min a 37°C en dimetilsulfóxido (DMSO) al 30%. Las muestras fueron analizadas mediante el citómetro FACSCanto II donde se obtuvieron los porcentajes de células vivas y muertas por condición.

■ **Obtención de sobrenadantes de clonas pSuper y RNAi**

Las células fueron cultivadas en cajas de Petri de 10 cm de diámetro en DMEM Advanced suplementado con 5% de suero fetal bovino, 100 U de penicilina, 2 mM de glutamina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin a 37°C y 5% de CO_2 . Cuando alcanzaron confluencia, fueron lavadas cuatro veces con PBS y dos veces con DMEM (bajo en glucosa) libre de suero y rojo de fenol, e incubadas en este mismo medio a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 horas. Al término del periodo de incubación se recolectaron los sobrenadantes (un total de 25 mL) y el debris celular fue eliminado mediante centrifugación a 400 g 15 minutos a 4°C , seguido de un paso de centrifugación a 1500 g y uno de filtración en acetato de celulosa con poro de 0.22 μm (Millipore). Posteriormente, los sobrenadantes se concentraron en dispositivos de filtración por centrifugación (Amicon-ultra 15, Millipore) con un punto de corte de 3 KDa a un volumen final de 1 mL, en presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF (1 mM), BGP (10 mM), NaF (10 mM), Na_3VO_4 (0.2 mM), DTT (2 mM). La cantidad de proteína de los concentrados se determinó mediante el método de Bradford (Kruger, 1994). Los sobrenadantes fueron almacenados a -70°C hasta su posterior análisis.

■ Caracterización del secretoma de clonas A549 pSuper y RNAi

a) Determinación de citocinas y factores de crecimiento

Se utilizó un arreglo de anticuerpos que reconocen 80 citocinas y factores de crecimiento de humano C-Series Human Cytokine Antibody Array C5 (RayBiotech), el procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer de bloqueo y después se incubaron durante toda la noche a 4°C con los sobrenadantes de cultivo de células A549 pSuper y RNAi, recolectados como se describió anteriormente. Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min con buffer de lavado e incubadas durante dos horas a temperatura ambiente con la mezcla de anticuerpos biotinilados. Después se lavaron tres veces durante 5 min con buffer de lavado y se incubaron durante 2 horas con estreptavidina peroxidasa diluida 1:1000 en buffer de bloqueo. Se realizaron 3 lavados de 5 min con buffer de lavado y se revelaron utilizando el sistema de detección por quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer). Las imágenes se capturaron en un sistema *Molecular Imager Gel DocTMXR+ Imaging System* (BioRad) y analizadas mediante el software ImageLab (BioRad). Posteriormente las imágenes fueron analizadas en el programa Image J para generar valores de densidad óptica para cada punto. Se sustrajo el valor de densidad óptica de los controles negativos a cada punto y se normalizó utilizando los valores de densidad óptica de los controles positivos.

Se analizaron los sobrenadantes de cinco clonas RNAi y cuatro clonas pSuper y una vez obtenidos los valores de densidad óptica ajustados a los controles tanto negativos como positivos, se llevó a cabo una prueba de t para determinar si había diferencias entre las condiciones. Para determinar si una citocina estaba presente en el sobrenadante, se sustrajo el valor de densidad óptica de los controles negativos. Si el valor resultante era negativo o cercano a cero, se consideró que esa citocina no estaba presente bajo estas condiciones.

b) Ensayo proteómico

Precipitación de proteínas

Para cada muestra, a partir de los sobrenadantes recolectados como se describió anteriormente, se colocaron 30 µg de proteína en un volumen final de 250 µL de buffer TE (10 mM Tris/HCl pH 7.6; 1 mM EDTA pH 8), y se agregaron 100 µL de una solución de deoxicolato de sodio al 0.3% y 100 µL de ácido tricloroacético al 72% para precipitar las proteínas. La mezcla se incubó durante 3 horas en hielo, posteriormente se centrifugó a 16,000 g durante 30 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 250 µL de acetona al 90% para deslipidar las muestras, incubándose por 16 horas a -20°C. Nuevamente se centrifugó a 16,000 g 30 minutos a 4°C y el pellet se dejó secar durante

20 minutos en un Speedvac (Eppendorf) sin aplicar calor. Los pellets obtenidos mediante el procedimiento anterior fueron almacenados a -70°C y enviados a las instalaciones de proteómica del *Institut de Recherches Cliniques* (Montreal, Canadá). Las proteínas se redujeron con DTT, se alquilaron con yodoacetamida y se digirieron con tripsina, y los péptidos resultantes se analizaron mediante un sistema de nano-cromatografía de líquidos de alta eficacia (nano-HPLC, por sus siglas en inglés) acoplado a espectrometría de masas en tándem (MS/MS, por sus siglas en inglés) como se reportó anteriormente (Barkla et al., 2012).

Identificación de proteínas

Los archivos de la lista de espectros fueron generados en el programa Proteome Discoverer (versión 1.4), utilizando los siguientes parámetros: un mínimo de masa de 500 Da y un máximo de masa de 6000 Da, espectros MS/MS sin agrupar, la carga del precursor se ajustó automáticamente, y el número mínimo de iones fragmentados se ajustó a 5. La búsqueda de proteínas en las bases de datos se llevó a cabo con el programa Mascot 2.5 (Matrix Science) y se comparó con la base de datos para humanos de NCBIInr (versión junio 17, 2015). Las tolerancias de masas para los iones precursores y fragmentados fueron ajustadas a 10 ppm y 0.6 Da respectivamente. La tripsina fue utilizada como enzima y se permitió un máximo de dos sitios de cortes perdidos. La carbamidometilación se tomó como modificación fija y la oxidación de metioninas como modificación variable. El análisis de los datos se hizo utilizando el programa Scaffold 3.6.

Análisis bioinformático

La validación de la identificación y el análisis cuantitativo se llevó a cabo con el programa Scaffold 3.6. Las identificaciones de proteínas se aceptaron si tenían un 99% de probabilidad, un mínimo de dos péptidos únicos (Nesvizhskii et al., 2003) y se encontraban en al menos 4 de las 5 réplicas RNAi o en 2 de las 3 réplicas pSuper. Para determinar la abundancia relativa de las proteínas en las muestras se utilizó el índice emPAI (del inglés, *exponentially modified protein abundance index*), el cual se define como el número de péptidos observados por proteína dividido entre el número de péptidos observables por proteína (Ishihama et al, 2005).

Validación de proteínas diferencialmente expresadas

La validación de las proteínas seleccionadas a partir del ensayo LC-MS/MS se llevó a cabo mediante técnicas de ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para la validación de la proteína neuroserpina se utilizó el kit Human Neuroserpin Mini ABTS ELISA Development kit (Peprotech), para fibrinógeno el kit Human Fibrinogen SimpleStep ELISA kit (Abcam) y para PDGF-D el kit DuoSet ELISA (R&D Systems), de acuerdo a las especificaciones del fabricante

■ Evaluación de la capacidad angiogénica de sobrenadantes provenientes de clonas A549 pSuper y RNAi mediante ensayos de anillos aórticos de ratón

Los ensayos de angiogénesis se llevaron a cabo mediante el ensayo del anillo aórtico previamente reportado en Rodero et al. (2013). Se aislaron las aortas de ratones BALB/c de 12 a 24 semanas de edad, removiendo cuidadosamente el tejido circundante. Las aortas se seccionaron en anillos de aproximadamente 1 mm, los cuales fueron lavados con PBS antes de ser embebidos en una gota ($\approx 50 \mu\text{L}$) de Matrigel (Corning), a razón de un anillo por cada pozo de una placa de 24 pozos. La placa fue incubada durante 1 hora a 37°C para permitir la polimerización de la matriz, después de lo cual se agregó 1 mL de DMEM Advanced (Gibco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina a cada pozo. Los anillos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda, con 5% de CO_2 por 3-4 días, observándose un crecimiento inicial de vasos. Posterior a eso se agregaron los correspondientes estímulos: los sobrenadantes de cultivo de las clonas pSuper o RNAi, recolectados como se describió anteriormente, a una concentración final del 50%. Como control positivo se utilizó VEGF (30 ng/mL, PeproTech) y como control negativo se agregó DMEM (Sigma) suplementado con 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina. Las placas se incubaron 37°C en una atmósfera húmeda, con 5% de CO_2 por 6 días adicionales durante los cuales la vascularización de los anillos se documentó por fotografías con el objetivo 4X. Al término del experimento, el área de crecimiento de los vasos sanguíneos se midió a partir de las microfotografías utilizando el software Image J (Schindelin 2012).

■ Evaluación del estado de activación del sistema del complemento en clonas A549 pSuper y RNAi

a) Obtención del pool de sueros

Se llevó a cabo la extracción de muestras de sangre total a partir de 11 donadores sanos mediante venopunción. Una vez obtenida la sangre se dejó coagular durante 2 horas a 4°C , posteriormente se centrifugó a 400 g durante 15 minutos a 4°C . Se separó el suero con ayuda de la micropipeta y se colocó en microtubos de 1.5 mL, después se centrifugó a alta velocidad 20,000 g a 4°C . Una vez obtenido el suero se mezclaron todos para tener un pool de 50 mL. A partir de este pool, se separó una alícuota de 10 mL la cual fue calentada durante 1 hora a 56°C para desactivar las proteínas del sistema del complemento, a esta fracción se le nombró HI-NHS (del inglés, *heat inactivated-normal human serum*), y se utilizó como control negativo para los ensayos. La fracción restante se utilizó como fuente de proteínas del complemento y se denominó NHS (del inglés *normal human serum*). Ambas fracciones se alicuotaron y se

guardaron a -70°C hasta su posterior uso, evitando varios ciclos de descongelación (Lashmann 2010).

b) Determinación de la deposición de C3b mediante citometría de flujo

La deposición de C3b se determinó sobre la superficie de células A549 pSuper y RNAi en cultivos subconfluentes cultivadas en cajas de 6 cm como se reportó anteriormente (Jeon et al., 2018). Se lavó la monocapa de células con 2 mL de PBS y se incubó con 500 μL de Tripsina-EDTA durante 2 min a 37°C . Posteriormente se inactivó la tripsina con 1 mL de DMEM Advanced suplementado con 10% SFB. Una vez despegadas, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron 4×10^5 células con 500 μL de solución de Hanks (Sigma) suplementada con 10% NHS o HI-NHS durante 1 hora a 37°C . Posteriormente se realizó un lavado con 3 mL de solución de FACS y se procedió a la tinción. Para la tinción se utilizó 1 μg del anticuerpo anti-C3/C3b/iC3b (Biolegend) por muestra durante 1 hora en hielo. Después se realizó un lavado con 3 mL de solución de FACS y se marcaron las muestras con el anticuerpo anti-ratón IgG Alexa Fluor-633 (Invitrogen) en una dilución 1:1400 durante 1 hora en hielo. Las muestras se lavaron nuevamente con 3 mL de solución de FACS, se fijaron con 100 μL de PFA 2% y se guardaron a 4°C protegidas de la luz hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas con mediante el citómetro FACSCanto II.

c) Determinación de la deposición de C5b-9 mediante *in-cell* ELISA

Un *in-cell* ELISA es un método para cuantificar una proteína blanco directamente en células en cultivo, el procedimiento se llevó a cabo según lo reportado en Jeon et al., 2014. Se sembraron 25,000 células A549 pSuper y RNAi por pozo en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C y 5% CO_2 hasta alcanzar la confluencia. Una vez confluentes se procedió a realizar el ELISA. Se lavó la monocapa de células con 200 μL de PBS y se incubó con solución de Hanks suplementada con 10% de NHS o HI-NHS durante 1 hora a 37°C . Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se fijaron con 200 μL de PFA al 4% durante 15 min a 37°C . Después se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno y se procedió al bloqueo con 200 μL de buffer de bloqueo (TBS 5% leche) durante 1 hora a 37°C . Se llevaron a cabo tres lavados de 5 min con buffer de lavado TBS-T (TBS con Tween 0.01%) y se incubaron las células con el anticuerpo policlonal anti-C5b-9 (Abcam) a una dilución 1:5000 en el buffer de bloqueo (TBS 5% leche) durante 2 horas a 37°C . Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS-T de 5 min y se agregó el anticuerpo anti-conejo IgG-HRP (1:5000; Southern Biotechnology) 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavó nuevamente la placa con TBS-T durante 10 min. Se reveló utilizando 100 μL del sustrato de HRP 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB (eBiosciences), la reacción se detuvo con 50 μL de solución de ácido sulfúrico 2N. Se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Biorad).

■ Evaluación del estado de activación de NF-κB y STAT3

Las células se cultivaron bajo las condiciones descritas en la sección *Obtención de sobrenadantes de clonas pSuper y RNAi*. Posteriormente las células se despegaron con tripsina y se centrifugaron para obtener un pellet. El pellet fue resuspendido en 50 µL de buffer de lisis (HEPES 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, 0.5% Tritón X-100, suplementado al momento de usar con DTT 0.5 mM, 10 mM β-glicerofosfato, 200 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 µg/mL leupeptina, 50 µg/mL antipaina y 10 µg/mL aprotinina), la mezcla se incubó 15 minutos a 4°C en agitación. Seguido se centrifugó a 17,000 g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, donde se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

Se corrieron 40 µg de proteína en geles SDS-PAGE 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm (Whatman) en buffer de transferencia (Glicina 200 mM, Tris 25 mM y MeOH 20%) a 100 V durante 90 min. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% disuelta en TBS-T (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.4 y Tween 0.1%) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-p-STAT3 Tyr705 (Cell signaling) a una dilución 1:500 en BSA al 3%, con el anticuerpo anti-p-IKBα (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500 en BSA al 3%, y con el anticuerpo anti-Akt1,2,3 (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:3000 en TBS-T con 5% de leche. Se incubaron durante toda la noche en agitación a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T (cada lavado de 10 min) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:5000 en leche al 5%. Las membranas se lavaron nuevamente tres veces con TBS-T y se revelaron por el método de quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer). Las imágenes se capturaron con el foto documentador *Molecular Imager Gel DocTMXR+ Imaging System* (BioRad) y analizadas mediante el software ImageLab (BioRad).

REFERENCIAS

- Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., & Pantoja, O. (2012). Protein profiling of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Proteomics* (Vol. 12, Issue 18, pp. 2862-2865). doi: 10.1002/pmic.201200152
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., & Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* (Vol. 296, Issue 5567, pp. 550-553). doi: 10.1126/science.1068999.
- Camacho-Concha, N., Olivos-Ortiz, A., Nuñez-Rivera, A., Pedroza-Saavedra, A., Gutierrez-Xicotencatl, L., Rosenstein, Y., & Pedraza-Alva, G. (2013). CD43 Promotes Cells

- Transformation by Preventing Merlin-Mediated Contact Inhibition of Growth. In PLoS ONE (Vol. 8, Issue 11, p. e80806). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080806>
- Jeon, H., Lee, J.-S., Yoo, S., & Lee, M.-S. (2014). Quantification of complement system activation by measuring C5b-9 cell surface deposition using a cell-ELISA technique. *Journal of Immunological Methods* (Vol. 415, pp. 57-62). doi: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.09.002>
- Jeon H., Han S.R., Lee S., Park S.J., Kim J.H., Yoo S.M., & Lee M.S. (2018). Activation of the complement system in an osteosarcoma cell line promotes angiogenesis through enhanced production of growth factors. *Scientific Reports*. (Vol. 3, Issue 85415). doi: [10.1038/s41598-018-23851-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-23851-z).
- Korrodi-Gregório, L., Soto-Cerrato, V., Vitorino, R., Fardilha, M., & Pérez-Tomás, R. (2016). From Proteomic Analysis to Potential Therapeutic Targets: Functional Profile of Two Lung Cancer Cell Lines, A549 and SW900, Widely Studied in Pre-Clinical Research. *PloS One* (Vol. 11, Issue 11, e0165973). doi: [10.1371/journal.pone.0165973](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165973).
- Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in molecular biology* (Vol. 32, pp. 9-15). doi: [10.1385/0-89603-268-x:9](https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:9)
- Lachmann P.J. Preparing serum for functional complement assays. (2010). *Journal of Immunology Methods* (Vol. 352, Issue 1-2, pp.195-7). doi: [10.1016/j.jim.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.11.003).
- Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., & Aebersold, R. (2003). A Statistical Model for Identifying Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* (Vol. 75, Issue 17, pp. 4646-4658). doi: [10.1021/ac0341261](https://doi.org/10.1021/ac0341261)
- Rodero, M. P., Auvynet, C., Poupel, L., Combadière, B., & Combadière, C. (2013). Control of both myeloid cell infiltration and angiogenesis by CCR1 promotes liver cancer metastasis development in mice. *Neoplasia* (New York, N.Y.) (Vol. 15, Issue 6, pp. 641-648). doi: [10.1593/neo.121866](https://doi.org/10.1593/neo.121866).
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., & Cardona A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. (Vol. 9, Issue 7, pp. 676-82). doi: [10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019).

Anexo 2. Proteínas diferencialmente expresadas en el secretoma de células A549 pSuper y CD43 RNAi

UniProt KB	Gene	Protein (Human)	Student's t-test (p-Value)	Fold Change (pSuper/ RNAi)	Concordance with other proteomics studies
Q16555	DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	0.038	0.05	1,2,4
Q02388	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1	0.0049	0.06	1,2,3,4
A0A024 R728	MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	0.0073	0.1	1
P13010	XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5	0.034	0.1	4
P49588	AARS	alanyl-tRNA synthetase	0.036	0.1	1,4
Q96QK1	VPS35	vacuolar protein sorting 35	0.039	0.1	1,4
P78527	PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	0.046	0.1	-
P02751	FN1	fibronectin 1	0.014	0.2	1,2,4
P08833	IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	0.018	0.2	1,2,4
P00751	CFB	complement factor B	0.018	0.2	1,3
P00491	PNP	Purine nucleoside phosphorylase	0.041	0.2	1,2,4
P04179	SOD2	Chain B, Human Manganese Superoxide Dismutase	0.054	0.2	-
P49589	CARS	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic isoform b	0.019	0.2	-
Q6FHC9	STC2	stanniocalcin 2	0.019	0.2	3
A0A024 R9C1	PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	0.024	0.2	2
B0QY90	EIF3L	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein	0.032	0.2	-
P53618	COPB1	Coatomer subunit beta	0.045	0.2	1,3
P63010	AP2B1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	0.0014	0.3	-
P13489	RNH1	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	0.013	0.3	1,2,4
P25787	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type	0.014	0.3	1,4
A0A024 R1A3	UBE1	ubiquitin-activating enzyme E1	0.042	0.3	-
P26641	EEF1G	Elongation factor 1-gamma	0.045	0.3	1
Q9Y617	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	0.049	0.3	1,4
Q16769	QPCT	glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase)	0.052	0.3	1,2,4
Q96P70	IPO9	importin 9	0.039	0.3	-
P06737	PYGL	Chain A, Human Liver Glycogen Phosphorylase A Complexed With Amp	0.041	0.3	-
P13639	EEF2	EEF2 protein	0.00084	0.4	1,2,4

P15121	AKR1B1	Chain A, Aldose Reductase Tertiary Complex With Nadph And Deg	0.0034	0.4	1,2,4
P30838	ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1	0.0071	0.4	1,2
P49327	FASN	Fatty acid synthase	0.016	0.4	1,4
P80188	LCN2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	0.019	0.4	1,3,4
P0DMV8	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	0.034	0.4	-
Q96PD2	DCBLD2	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	0.051	0.4	-
Q00610	CLTC	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	0.052	0.4	1,4
Q969H8	MYDGF	chromosome 19 open reading frame 10	0.0028	2.5	-
P06396	GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	0.017	2.5	1,2
P02749	APOH	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	0.04	2.5	1
A0A024R5T9	GCNT3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	0.0038	2.6	1
P07355	ANXA2	Annexin A2	0.018	2.6	1,2,4
P39060	COL18A1	type XVIII collagen long variant	0.033	2.6	1,4
P05997	COL5A2	Collagen alpha-2(V) chain	0.049	2.6	1,4
O95084	PRSS23	protease, serine, 23	0.0029	2.7	1,2,4
Q6ZMP0	THSD4	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4	0.004	2.7	-
P13987	CD59	CD59	0.01	2.7	4
Q86SR1	GALNT10	Chain A, Crystal Structure Of Pp-Galnac-T10 With Udp, Galnac And Mn2+	0.032	2.7	1
Q9Y287	ITM2B	integral membrane protein 2B	0.013	2.8	1
A0A024R084	SDF4	stromal cell derived factor 4	0.014	2.8	-
P03950	ANG	Angiogenin	0.015	2.8	1
O14786	NRP1	neuropilin 1	0.002	2.9	4
P22304	IDS	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	0.0027	3	1
P07996	THBS1	Thrombospondin-1	0.0068	3	1,3,4
Q16270	IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7	0.026	3	1,2,4
Q01459	CTBS	Di-N-acetylchitobiase	0.049	3	-
Q9UBX1	CTSF	Cathepsin F	0.016	3.1	1
P50897	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase	0.024	3.1	1,4
P02675	FGB	fibrinogen beta chain	0.0024	3.3	1
Q9HB40	SCPEP1	serine carboxypeptidase 1 precursor protein	0.011	3.6	-
O75882	ATRN	attractin	0.0016	3.8	1,3,4
Q9UBP4	DKK3	Dickkopf-related protein 3	0.0075	3.8	1
P12273	PIP	prolactin-induced protein, partial	0.045	3.8	1
Q14703	MBTPS1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	0.023	3.9	1

Q4LDE5	SVEP1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1 precursor	0.0034	4	1,4
P02787	TF	Chain A, Apo-Human Serum Transferrin (Glycosylated)	0.0012	4.2	-
Q6FI18	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	0.014	4.4	-
A0A024 R8E5	COL5A1	collagen, type V, alpha 1	0.033	4.6	1,3
Q9UHL4	DPP7	Dipeptidyl-peptidase 7	0.0026	4.6	1
Q6ZRP7	QSOX2	sulfhydryl oxidase 2 precursor	0.0041	4.7	1,4
P04264	KRT1	keratin 1	0.031	4.7	1,4
Q92187	ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	0.021	5.5	1
Q92896	GLG1	golgi apparatus protein 1	0.0001	6.5	1,4
Q9GZP0	PDGFD	spinal cord-derived growth factor-B	0.0001	6.9	1,2,4
Q14112	NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	0.0019	6.9	4
B4E1D8	N/A	cDNA FLJ51597, highly similar to C4b-binding protein alpha chain	0.0048	7.2	-
Q10588	BST1	ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2	0.01	7.2	-
Q8NBJ7	SUMF2	Sulfatase modifying factor 2	0.0001	7.5	1
Q6MZW 2	FSTL4	follistatin-like 4	0.025	8	1,3
O60687	SRPX2	sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	0.022	8.7	1
Q99574	SERPINI 1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	0.00033	9.3	1
Q9NSC7	ST6GAL NAC1	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1	0.0001	11.2	-
P15848	ARSB	Arylsulfatase B	0.015	pSuper only	-
P35475	IDUA	alpha-L-iduronidase precursor	0.029	pSuper only	1
P45877	PPIC	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	0.017	pSuper only	-
P17405	SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase)	0.013	pSuper only	-
Q76M96	CCDC80	Coiled-coil domain containing 80	0.0088	pSuper only	1,3,4
Q13444	ADAM15	Metalloproteinase-like, disintegrin-like, and cysteine-rich protein 15	0.0026	pSuper only	1,4
Q9UBX5	FBLN5	fibulin 5	0.0029	pSuper only	-
P25311	AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc	0.018	pSuper only	-
Q11206	ST3GAL 4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	0.043	pSuper only	-
A2RU34	CNTNAP 3	CNTNAP3 protein	0.0012	pSuper only	-

Q16610	ECM1	extracellular matrix protein 1	0.04	pSuper only	1
Q99523	SORT1	sortilin 1	0.00014	pSuper only	-
O43396	TXNL1	thioredoxin-like 1	0.00093	RNAi only	1,4
P31327	CPS1	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	0.0041	RNAi only	-
Q5VVF5	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	0.0046	RNAi only	-
B2R4R9	RPS28	ribosomal protein S28	0.0048	RNAi only	-
D3DVW9	PTPNS1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	0.013	RNAi only	-
P56537	EIF6	integrin beta 4 binding protein	0.017	RNAi only	1,4
P29966	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	0.018	RNAi only	4
P12931	SRC	Chain A, Src Kinase In Complex With A Quinazoline Inhibitor	0.028	RNAi only	-
Q99798	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0.028	RNAi only	4
Q15198	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	0.028	RNAi only	-
Q27J81	INF2	hCG2029577	0.028	RNAi only	-
Q09028	RBBP4	Histone-binding protein RBBP4	0.032	RNAi only	-
P00749	PLAU	urokinase-type plasminogen activator, partial	0.039	RNAi only	1,2,4
P31689	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	0.04	RNAi only	-
A3RJH1	DDX1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1	0.049	RNAi only	-
P08729	KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	0.049	RNAi only	1,2

1= Luo et al., 2011; 2= Li et al., 2014; 3=Mossina et al., 2017; 4=Shin et al., 2017

Anexo 3. Proteínas expresadas exclusivamente en el secretoma de células A549 pSuper o CD43 RNAi

UniProtKB	Gene	Protein (Human)	Student's t-test (p-Value)	Fold Change
P45877	PPIC	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	0.017	pSuper only
P17405	SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal	0.013	pSuper only
Q76M96	CCDC80	Coiled-coil domain containing 80	0.0088	pSuper only
Q13444	ADAM15	MDC15	0.0026	pSuper only
Q9UBX5	FBLN5	fibulin 5	0.0029	pSuper only
P25311	AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc	0.018	pSuper only
Q11206	ST3GAL4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	0.043	pSuper only
A2RU34	CNTNAP3	CNTNAP3 protein	0.0012	pSuper only
Q16610	ECM1	extracellular matrix protein 1	0.04	pSuper only
Q99523	SORT1	sortilin 1	0.00014	pSuper only
O43396	TXNL1	thioredoxin-like 1	0.00093	RNAi only
P31327	CPS1	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	0.0041	RNAi only
Q5VVF5	VLDLR	very low density lipoprotein receptor	0.0046	RNAi only
B2R4R9	RPS28	ribosomal protein S28	0.0048	RNAi only
D3DVW9	PTPNS1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	0.013	RNAi only
P56537	EIF6	integrin beta 4 binding protein	0.017	RNAi only
P29966	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	0.018	RNAi only
P12931	SRC	Chain A, Src Kinase In Complex With A Quinazoline Inhibitor	0.028	RNAi only
Q99798	ACO2	aconitase 2, mitochondrial	0.028	RNAi only
Q15198	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	0.028	RNAi only
Q27J81	INF2	hCG2029577	0.028	RNAi only

Q09028	RBBP4	Histone-binding protein RBBP4	0.032	RNAi only
P00749	PLAU	urokinase-type plasminogen activator, partial	0.039	RNAi only
P31689	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	0.04	RNAi only
A3RJH1	DDX1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1	0.049	RNAi only
P08729	KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	0.049	RNAi only

Anexo 4. Proteínas identificadas en el secretoma de células A549 pSuper y CD43 RNAi

UniProtKB	Gene	Protein (Human)	Molecular Weight	Exclusive Unique Peptides									Student's t-test (p-Value)	Fold Change pSuper/RNAi
				RNAi					pSuper					
				replicate 1	replicate 2	replicate 3	replicate 4	replicate 5	replicate 1	replicate 2	replicate 3			
P98088	MUC5AC	mucin-5AC precursor	586 kDa	91	89	102	103	123	104	106	109	0.12	1.4	
A7Y9J9	MUC5AC	mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	649 kDa	73	56	75	74	78	76	72	70	0.077	1.5	
P01024	C3	complement C3 precursor	187 kDa	99	91	96	98	98	84	89	86	0.31	0.8	
P00352	ALDH1A1	RecName: Full=Retinal dehydrogenase 1; Short=RALDH 1; Short=RalDH1; AltName: Full=ALDH-E1; AltName: Full=ALHD1	55 kDa	31	32	29	25	27	26	26	28	0.2	0.8	
Q9Y6R7	FCGBP	IgG Fc binding protein	572 kDa	58	20	77	65	78	72	76	77	0.12	1.6	
P98160	HSPG2	heparan sulfate proteoglycan perlecan, partial	467 kDa	84	15	43	102	83	49	34	71	0.62	0.8	
O15230	LAMA5	laminin alpha5 chain precursor	400 kDa	60	25	50	92	63	60	61	82	0.33	1.5	
P02671	FGA	fibrinogen alpha chain, isoform CRA_b	95 kDa	25	24	26	29	30	30	31	26	0.11	1.6	
P08603	CFH	RecName: Full=Complement factor H; AltName: Full=H factor 1; Flags: Precursor	139 kDa	54	27	58	46	50	53	51	47	0.21	1.5	
P21333	FLNA	filamin-A isoform 1	280 kDa	65	100	36	39	45	23	30	40	0.31	0.5	
P07602	PSAP	prosaposin isoform b preproprotein	58 kDa	26	20	24	25	25	21	22	26	0.47	1.1	
P01031	C5	Complement component 5	188 kDa	50	16	48	47	48	51	55	48	0.03	1.8	
V9HWD9	HEL107	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome), isoform CRA_a	68 kDa	29	32	30	21	27	18	22	24	0.099	0.6	
A0A0S2Z3G9	ACTN4	actinin, alpha 4, isoform CRA_b	105 kDa	46	53	45	34	34	24	33	36	0.1	0.5	
P07339	CTSD	RecName: Full=Cathepsin D; Contains: RecName: Full=Cathepsin D light chain; Contains: RecName: Full=Cathepsin D heavy chain	45 kDa	18	19	19	18	19	20	19	20	0.021	1.7	
P02675	FGB	fibrinogen beta chain, isoform CRA_c	56 kDa	21	18	23	23	25	28	28	28	0.0024	3.3	
O00468	AGRN	agrin precursor, partial	213 kDa	40	33	33	51	40	44	42	51	0.075	1.7	
A0A0S2Z3Y1	LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein, isoform CRA_a	65 kDa	23	18	24	19	22	20	19	20	0.55	1.1	
P02679	FGG	fibrinogen gamma chain, isoform CRA_l	52 kDa	19	20	23	19	21	22	25	24	0.003	2	
O75369	FLNB	filamin-B isoform 2	278 kDa	67	61	34	32	33	14	20	25	0.079	0.4	
P00450	CP	RecName: Full=Ceruloplasmin; AltName: Full=Ferroxidase; Flags: Precursor	122 kDa	26	14	21	20	25	25	32	31	0.0053	2.2	
A0A0S2Z4Q2	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa, isoform CRA_b	75 kDa	27	26	21	26	23	20	20	19	0.032	0.7	
P60709	ACTB	actin, beta, partial	41 kDa	20	21	15	13	16	9	12	12	0.18	0.3	
P14618	PKM	pyruvate kinase, muscle, isoform CRA_c	60 kDa	26	29	26	23	28	20	21	26	0.088	0.7	
A0A024R4F1	ENO1	alpha-enolase	47 kDa	20	24	18	15	20	11	13	16	0.046	0.5	
P28799	GRN	granulin, isoform CRA_a	64 kDa	22	19	20	22	17	19	21	18	0.64	1.1	
P49327	FASN	RecName: Full=Fatty acid synthase; Includes: RecName: Full=[Acyl-carrier-protein] S-acetyltransferase; Includes: RecName: Full=Acyl-CoA synthetase	273 kDa	43	49	25	28	29	6	12	19	0.016	0.4	
A0A024R972	LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2), isoform CRA_a	174 kDa	29	15	24	38	27	32	28	38	0.14	1.7	
Q92626	PXDN	peroxidasin homolog precursor	165 kDa	42	9	36	44	36	35	39	26	0.88	1.1	
P02751	FN1	fibronectin 1, isoform CRA_h	256 kDa	35	36	44	32	28	4	1	13	0.014	0.2	
P10909	CLU	RecName: Full=Clusterin; AltName: Full=Agiling-associated gene 4 protein; AltName: Full=Apolipoprotein J; Short=Apo-J; AltName: Full=C1q-inhibitor	52 kDa	15	13	15	17	17	18	16	16	0.017	1.8	
P09871	C1S	RecName: Full=Complement C1s subcomponent; AltName: Full=C1 esterase; AltName: Full=Complement component 1 subcomponent	77 kDa	20	23	23	19	19	18	24	18	0.54	1.1	
Q8NBP7	PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	74 kDa	21	15	18	20	21	18	15	19	0.28	1.3	
A0A024R374	CTSB	cathepsin B, isoform CRA_a	38 kDa	18	16	15	17	17	12	9	13	0.063	0.4	
P07711	CTSL	RecName: Full=Cathepsin L1; AltName: Full=Cathepsin L; AltName: Full=Major excreted protein; Short=MEP; Contains: RecName: Full=Cathepsin L	38 kDa	14	10	12	10	12	10	11	11	0.65	1.1	
O00391	QSOX1	quiescin Q6, isoform CRA_a	83 kDa	23	15	23	23	20	22	23	24	0.085	1.5	
O94985	CLSTN1	calsyntenin 1, isoform CRA_b	110 kDa	22	14	22	19	19	25	24	20	0.023	1.7	
V9HWF4	HEL-S-68p	Phosphoglycerate kinase 1	45 kDa	21	24	18	12	18	11	16	16	0.28	0.6	
P53634	CTSC	cathepsin C	52 kDa	15	12	14	13	14	14	16	17	0.034	1.5	
Q6YHK3	CD109	CD109 antigen isoform 1 preproprotein	162 kDa	20	13	28	21	21	23	24	25	0.065	1.7	
P60174	TPI1 TPI	triosephosphate isomerase 1, isoform CRA_b	31 kDa	15	15	15	14	15	13	15	14	0.2	0.8	
P11413	G6PD	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase isoform b	59 kDa	26	25	22	20	23	9	18	17	0.019	0.6	
Q13219	PAPPA	pregnancy-associated plasma protein-A preproform	181 kDa	26	21	29	14	16	24	23	23	0.14	1.5	
P07942	LAMB1	laminin B1	198 kDa	30	12	16	35	22	24	22	29	0.43	1.4	
V9HW22	HEL-S-72p	heat shock 70kDa protein 8, isoform CRA_a	71 kDa	26	27	20	20	20	9	14	20	0.09	0.5	
O60218	AKR1B10	Chain X, Crystal Structure Of Akrlb10 Complexed With Nadp+ And Tolrestat	36 kDa	11	16	15	13	14	15	14	16	0.048	1.5	
V9HWB9	HEL-S-133P	lactate dehydrogenase A, isoform CRA_a	37 kDa	20	18	13	16	14	8	11	13	0.054	0.5	
Q16270	IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7	29 kDa	8	11	15	1	11	15	15	16	0.026	3	
P04075	ALDOA	RecName: Full=Fructose-bisphosphate aldolase A; AltName: Full=Lung cancer antigen NY-LU-1; AltName: Full=Muscle-type fructose-bisphosphate aldolase	39 kDa	21	24	16	12	19	14	17	15	0.62	0.9	
O14773	TPP1	Chain A, Crystal Structure Of The Precursor Form Of Human Tripeptidyl-Peptidase 1	59 kDa	14	10	13	15	15	17	16	16	0.25	1.5	
P00736	C1R	human complement C1r	80 kDa	19	19	23	12	16	19	19	16	0.25	1.4	
A0A024R104	CNTN1	contactin 1, isoform CRA_a	113 kDa	27	15	26	18	21	20	19	24	0.61	1.2	
A0A024RAL1	CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican), isoform CRA_c	265 kDa	14	18	35	22	23	17	21	21	0.89	1	
P04406	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36 kDa	14	15	9	9	11	6	7	9	0.28	0.6	
V9HW80	HEL-S-70	valosin-containing protein, isoform CRA_b	89 kDa	20	26	5	17	18	4	7	12	0.11	0.5	
P00751	CFB	complement factor B	86 kDa	21	27	28	16	20	7	8	4	0.018	0.2	
A0A024R6E0	SMOC1	secreted modular calcium-binding protein	48 kDa	13	13	15	13	14	15	16	16	0.019	1.7	
P52209	PGD	phosphogluconate dehydrogenase, isoform CRA_b	53 kDa	16	18	12	11	12	10	13	13	0.77	1	
P06744	GPI	glucose phosphate isomerase, GPI [EC 5.3.1.9] [Homo sapiens=human, leukocyte, Peptide, 558 aa]	63 kDa	10	17	13	10	9	10	13	11	0.17	1.3	

Q5U077	LDHB	lactate dehydrogenase B, isoform CRA_a	37 kDa	11	12	12	10	11	11	11	12	0.12	1.2
B3KNK9	GOLPH2	golgi phosphoprotein 2, isoform CRA_a	45 kDa	12	8	16	12	15	17	17	15	0.013	2.3
A0A024RBK9	TXNRD1	thioredoxin reductase 1	68 kDa	23	20	17	11	15	11	12	13	0.23	0.6
P06865	HEXA	Chain A, X-Ray Crystal Structure Of Ngt-Bound Hexa	58 kDa	17	11	15	16	16	15	12	15	0.27	1.3
P54802	NAGLU	alpha-N-acetylglucosaminidase	82 kDa	10	10	19	15	14	22	20	20	0.02	2.3
Q00610	CLTC	clathrin, heavy polypeptide (Hc), isoform CRA_a	192 kDa	29	37	15	17	23	5	9	14	0.052	0.4
P15121	AKR1B1	Chain A, Aldose Reductase Tertiary Complex With Nadph And Deg	36 kDa	12	16	15	13	14	7	7	8	0.0034	0.4
P01033	TIMP1	Chain A, Complex Of Matrix Metalloproteinase-10 Catalytic Domain (Mmp-10cd) With Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase	21 kDa	9	9	9	8	8	7	8	8	0.61	1.1
P13639	EEF2	EEF2 protein	95 kDa	22	24	19	15	16	5	7	13	0.00084	0.4
V9HWC0	HEL70	moesin, isoform CRA_a	68 kDa	16	23	14	13	13	10	11	11	0.26	0.7
P00746	CFD	complement factor D preproprotein	28 kDa	8	8	10	12	12	11	9	9	0.75	0.9
A0A024RDE2	SPP1	osteopontin	35 kDa	11	11	8	11	11	8	7	10	0.18	0.7
P21980	TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase), isoform CRA_a	77 kDa	18	23	10	14	14	8	14	15	0.67	0.9
Q53XC6	LGMN	legumain, isoform CRA_a	49 kDa	12	6	12	13	13	9	10	11	0.59	0.8
P80188	LCN2	RecName: Full=Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; Short=NGAL; AltName: Full=25 kDa alpha-2-microglobulin-related	23 kDa	11	10	11	8	12	7	7	7	0.019	0.4
Q14112	NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	151 kDa	1	4	1	12	16	19	29	36	0.0019	6.9
P53396	ACLY	RecName: Full=ATP-citrate synthase; AltName: Full=ATP-citrate (pro-S-)-lyase; Short=ACL; AltName: Full=Citrate cleavag	121 kDa	22	28	10	7	10	1	3	8	0.098	0.3
A0A024R4H0	PLOD1	procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1, isoform CRA_a	84 kDa	17	9	16	20	19	15	16	18	0.53	1.2
D3DSQ1	ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1, isoform CRA_a	45 kDa	12	10	9	13	12	12	8	11	1	1
Q6IPS9	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	50 kDa	11	13	9	8	7	8	7	10	0.82	1
		unnamed protein product	18 kDa	11	11	9	5	10	7	9	10	0.47	0.8
P42830	CXCL5 ENA78	neutrophil-activating peptide ENA-78	12 kDa	6	6	5	6	6	6	6	6	0.46	1.3
Q92820	GGH	gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase)	36 kDa	11	9	11	11	10	11	11	9	0.13	1.4
P05067	APP A4	Amyloid beta A4 protein	87 kDa	6	12	4	15	13	11	7	12	0.93	1
A0A024R1U8	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4, isoform CRA_a	28 kDa	8	8	8	8	7	8	8	8	0.51	1.1
P80723	BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1, isoform CRA_a	23 kDa	12	12	10	10	8	10	10	10	0.035	1.6
Q02818	NUCB1	nucleobindin 1, isoform CRA_a	54 kDa	9	4	18	13	11	17	16	13	0.13	2.1
Q6IAT1	GDI2	GDP dissociation inhibitor 2, isoform CRA_a	48 kDa	11	13	13	11	13	4	9	11	0.0083	0.6
K9JA46	EL52	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	85 kDa	3	24	0	20	15	2	0	10	0.22	0.2
P07686	HEXB	Chain B, Crystallographic Structure Of Human Beta-Hexosaminidase A	58 kDa	10	11	11	14	12	13	12	15	0.025	1.7
P11021	HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa), isoform CRA_a	72 kDa	10	16	2	15	19	12	10	22	0.4	1.4
Q16719	KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase), isoform CRA_b	52 kDa	13	17	9	9	9	2	4	6	0.083	0.4
P42330	AKR1C3	Chain A, Crystal Structure Of Prostaglandin F Synthase Containing Bimatoprost	37 kDa	10	13	13	9	11	10	10	11	0.85	1
Q02388	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive), isoform CRA_a	295 kDa	14	31	27	21	16	3	0	0	0.0049	0.06
Q9HC84	MUC5B	mucin-5B precursor	596 kDa	4	2	4	4	4	4	4	3	0.11	1.4
P02753	RBP4	retinol binding protein 4, plasma, isoform CRA_a	23 kDa	5	8	9	7	8	8	9	9	0.093	1.6
P02787	TF	Chain A, Apo-Human Serum Transferrin (Glycosylated)	75 kDa	9	3	19	11	8	26	27	27	0.0012	4.2
P68363	TUBA1B	alpha tubulin, isoform CRA_a	50 kDa	15	15	8	7	9	8	8	12	0.91	1
Q06830	PRDX1	peroxiredoxin 1, isoform CRA_a	22 kDa	12	13	11	9	11	8	9	13	1	1
P06396	GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type), isoform CRA_c	86 kDa	12	0	6	14	9	15	16	13	0.017	2.5
V9HWJ2	HEL-S26	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble, isoform CRA_a	47 kDa	12	14	8	7	12	5	5	10	0.12	0.6
Q9HAT2	SIAE	sialic acid-specific acetyltransferase II	58 kDa	5	6	6	7	5	8	7	6	0.016	2
P01034	CST3	Chain A, Human Cystatin C; Dimeric Form With 3d Domain Swapping	13 kDa	6	3	6	7	7	4	5	6	0.42	1.3
P10619	CTSA	Chain A, Physiological Dimer Hpp Precursor	51 kDa	13	10	11	12	13	10	12	11	0.85	1
O00469	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2, isoform CRA_a	87 kDa	14	11	7	16	14	11	9	14	0.56	1.2
P34932	HSPA4	Heat shock 70kDa protein 4	94 kDa	19	21	6	6	9	3	3	9	0.2	0.5
Q15149	PLEC	Plectin	532 kDa	17	33	5	10	10	0	2	3	0.062	0.1
P00749	PLAU	urokinase-type plasminogen activator, partial	46 kDa	20	16	15	12	12	0	0	0	0.039	0
P13797	PLS3	plastin 3 (T isoform)	71 kDa	16	17	15	8	9	4	10	12	0.2	0.7
A0A024R6C0	NPC2	Niemann-Pick disease, type C2, isoform CRA_a	17 kDa	6	7	8	8	4	7	7	8	0.7	1.1
Q99715	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1, isoform CRA_c	333 kDa	34	4	14	20	12	13	6	4	0.38	0.6
Q5SU16	TUBB	beta-tubulin protein	50 kDa	12	19	9	9	10	4	9	11	0.42	0.7
Q95084	PRSS23	protease, serine, 23, isoform CRA_a	43 kDa	8	5	7	9	11	11	12	13	0.0029	2.7
P22626	HNRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_a	32 kDa	10	14	7	6	9	4	5	9	0.37	0.7
P16035	TIMP2	Chain A, Human Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase-2	22 kDa	8	9	9	8	7	7	7	7	0.62	0.9
P05121	SERPINE1	Chain A, Latent Form Of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Pai-1)	43 kDa	11	9	11	9	10	10	9	9	0.46	1.1
P16278	GLB1	beta-galactosidase isoform a preproprotein	76 kDa	12	7	9	13	13	13	14	13	0.045	1.7
Q92823	NRCAM	RecName: Full=Neuronal cell adhesion molecule; Short=Nr-CAM; AltName: Full=Neuronal surface protein Bravo; Short=hB	144 kDa	2	13	17	0	6	16	14	11	0.12	2.4
P03973	SLPI	RecName: Full=Antileukoproteinase; Short=ALP; AltName: Full=BLPI; AltName: Full=HUSI-1; AltName: Full=Mucus protei	14 kDa	8	5	7	7	8	9	6	6	0.39	1.3
Q92859	NEO1	Neogenin homolog 1 (chicken)	160 kDa	15	4	14	12	13	7	7	5	0.26	0.7
Q9UBR2	CTSZ	cathepsin Z, isoform CRA_a	34 kDa	11	5	8	8	9	10	11	11	0.0047	2.2
P0DMV8	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	70 kDa		15	14	8	10	1	5	8	0.034	0.4
P07996	THBS1	RecName: Full=Thrombospondin-1; Flags: Precursor	129 kDa	13	8	16	3	5	15	19	19	0.0068	3

A0A024R1A3	UBE1	ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing), isoform CRA_a	118 kDa	15	21	9	8	12	2	3	7	0.042	0.3
Q32Q12	NME1-NME2	hCG2001850, isoform CRA_a	33 kDa	7	10	6	5	6	3	6	6	0.33	0.5
P07737	PFN1	profilin 1, isoform CRA_a	15 kDa	7	8	9	6	6	4	5	6	0.07	0.4
A6XND0	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	30 kDa	7	9	3	9	11	5	8	10	0.88	1.1
A0A024RB53	HNRPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, isoform CRA_a	34 kDa	10	10	6	7	8	6	6	7	0.22	0.5
O14786	NRP1	neuropilin 1, isoform CRA_c	103 kDa	5	6	10	8	7	14	14	14	0.002	2.9
P06280	GLA	RecName: Full=Alpha-galactosidase A; AltName: Full=Alpha-D-galactosidase A; AltName: Full=Alpha-D-galactoside galact	49 kDa	9	6	7	7	8	6	9	9	0.16	1.3
P25774	CTSS	Cathepsin S	38 kDa	11	6	9	8	10	7	10	7	0.7	1.1
P15291	B4GALT1	RecName: Full=Beta-1,4-galactosyltransferase 1; Short=Beta-1,4-GalTase 1; Short=Beta4Gal-T1; Short=b4Gal-T1; AltNam	44 kDa	8	7	8	7	7	7	8	7	0.26	1.2
P49788	RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1, isoform CRA_a	38 kDa	8	9	9	9	7	7	7	9	0.82	1.1
O60568	PLOD3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	85 kDa	11	5	15	10	9	12	13	12	0.11	1.6
O60701	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase, isoform CRA_a	55 kDa	9	14	7	9	14	4	6	11	0.43	0.8
H9ZYJ2	TXN	thioredoxin	12 kDa	7	7	7	6	7	5	7	7	0.36	0.8
P13497	BMP1	hCG95918, isoform CRA_d	111 kDa	17	4	17	13	13	18	13	10	0.3	1.5
P07093	SERPINE2	Chain A, Crystal Structure Of Native Protease Nexin-1 With Heparin	42 kDa	9	9	6	7	8	9	5	11	0.38	1.3
P04004	VTN	vitronectin	54 kDa	6	6	10	4	6	8	9	10	0.022	1.9
Q9NZV1	CRIM1	cysteine-rich motor neuron 1 protein precursor	114 kDa	12	5	9	8	8	10	10	9	0.055	1.5
A0A024R5T9	GCNT3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type, isoform CRA_a	51 kDa	5	4	11	5	8	11	12	11	0.0038	2.6
P08833	IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1, isoform CRA_a	28 kDa	11	7	8	6	9	0	2	6	0.018	0.2
J3KPF3	SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2, isoform CRA_a	68 kDa	9	9	9	5	11	6	12	10	0.16	1.4
Q53XB4	RAB1	hCG2044782, isoform CRA_a	17 kDa	5	2	8	5	6	6	6	7	0.078	1.9
P04264	KRT1	keratin 1	66 kDa	11	4	9	7	4	20	20	8	0.031	4.7
P02545	LMNA	lamin A/C, isoform CRA_c	87 kDa	12	13	1	6	3	1	1	7	0.32	0.5
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	23 kDa	10	10	8	6	9	5	8	10	0.97	1
Q08211	DHX9	ATP-dependent RNA helicase A	141 kDa	9	18	8	2	7	0	2	4	0.1	0.3
P27695	APEX1	RecName: Full=DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase; AltName: Full=APEX nuclease; Short=APEN; AltName: Full=Apu	36 kDa	11	10	8	6	7	2	5	6	0.013	0.5
P05787	KRT8	keratin 8, isoform CRA_a	58 kDa	11	11	11	9	12	8	6	6	0.12	0.7
D9IAI1	HEL-S-34	phosphatidylethanolamine binding protein 1, isoform CRA_a	21 kDa	7	8	8	7	7	6	6	8	0.33	0.8
P10253	GAA	alpha-glucosidase	105 kDa	10	10	12	10	12	12	12	9	0.12	1.4
P19883	FST	follistatin, isoform CRA_a	35 kDa	13	3	4	14	11	9	9	8	0.95	1
P15559	NQO1	Chain A, Crystal Structure Of Nqo1 With Dicoumarol	31 kDa	10	11	5	5	6	1	4	7	0.26	0.5
P02749	APOH	apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I), isoform CRA_a	38 kDa	5	1	8	4	3	6	8	11	0.04	2.5
P0C0S5	H2AFZ	Chain A, Crystal Structure Of Human Lnhk2b-h2a.z-anp32e	22 kDa	6	6	4	5	4	6	5	4	0.82	0.9
P23528	CFL1	RecName: Full=Cofilin-1; AltName: Full=18 kDa phosphoprotein; Short=p18; AltName: Full=Cofilin, non-muscle isoform	19 kDa	8	7	9	6	5	5	6	9	0.42	0.8
A0A0S2Z4F1	EFEMP1	hCG16977, isoform CRA_a	55 kDa	11	5	11	11	7	12	10	8	0.11	1.8
Q14641	INSL4	insulin-like 4 (placenta)	15 kDa	6	5	5	4	5	5	5	5	0.44	1.2
A0A024R7D5	LDLR	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia), isoform CRA_b	95 kDa	12	10	7	8	5	4	5	5	0.045	0.6
P05997	COL5A2	RecName: Full=Collagen alpha-2(V) chain; Flags: Precursor	145 kDa	7	2	9	3	5	11	9	7	0.049	2.6
A0A024R4K3	MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial), isoform CRA_a	36 kDa	8	10	9	5	7	4	6	5	0.088	0.6
A0A024R2W4	DAG1	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1), isoform CRA_a	98 kDa	7	4	7	6	8	3	8	6	0.42	1.2
P20061	TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	48 kDa	7	0	10	4	6	7	7	8	0.12	1.9
P10646	TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor), isoform CRA_a	35 kDa	7	5	6	6	7	6	6	9	0.047	1.5
Q9Y490	TLN1	talin 1, isoform CRA_a	270 kDa	6	21	3	3	5	1	3	3	0.25	0.4
P30101	PDIA3	Chain A, TapasinERP57 HETERODIMER	54 kDa	8	9	8	8	10	9	5	10	0.32	1.3
Q14766	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1, isoform CRA_e	187 kDa	13	4	12	8	4	14	14	12	0.033	2.2
T1R7Q9	MUC5AC	MUC5AC, partial	414 kDa	4	4	3	4	5	4	4	4	0.072	1.4
P23142	FBLN1	fibulin 1, isoform CRA_e	77 kDa	7	8	8	7	8	5	10	11	0.038	1.6
P34059	GALNS	galactosamine (N-acetyl)-6-sulfate sulfatase (Morquio syndrome, mucopolysaccharidosis type IVA), isoform CRA_a	78 kDa	8	3	10	8	7	9	8	8	0.12	1.6
A0A024RBC5	GNS	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID), isoform CRA_a	62 kDa	6	5	3	10	9	8	3	10	0.5	1.4
P61769	B2M	Chain B, Crystal Structure Of The Human Mhc-Related Fc Receptor (Beta-2-microglobulin)	12 kDa	3	3	3	3	3	3	3	3	0.2	1.3
O75882	ATRNL	attractin, isoform CRA_a	141 kDa	6	2	5	6	6	14	12	11	0.0016	3.8
Q14974	KPNB1	nuclear factor p97	97 kDa	5	8	4	4	4	2	4	4	0.13	0.8
Q14126	DSG2	desmoglein-2 preproprotein	122 kDa	8	4	6	6	5	6	7	7	0.019	1.6
P23284	PIIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	24 kDa	5	5	6	7	7	8	7	9	0.027	1.9
A0A140VK72		stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kDa, isoform CRA_b	52 kDa	9	7	6	6	8	7	8	10	0.021	1.6
Q9UNN8	PROCR	Chain A, Crystal Structure Of The Endothelial Protein C Receptor And Bound Phospholipid Molecule	22 kDa	6	5	5	6	5	6	6	5	0.18	1.5
P27348	YWHAQ	RecName: Full=14-3-3 protein theta; AltName: Full=14-3-3 protein T-cell; AltName: Full=14-3-3 protein tau; AltName: Full=	28 kDa	8	8	8	7	9	4	3	6	0.0044	0.5
A0A024RAY2	KRT18	keratin 18, isoform CRA_a	48 kDa	8	7	6	6	8	3	3	3	0.026	0.6
P02760	AMBP	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	39 kDa	4	2	11	4	6	10	9	10	0.11	2.4
P27797	CALR	RecName: Full=Calreticulin; AltName: Full=CRP55; AltName: Full=Calregulin; AltName: Full=Endoplasmic reticulum reside	48 kDa	1	11	0	10	6	3	1	4	0.38	0.5
Q92743	HTRA1	HtrA serine peptidase 1, isoform CRA_a	51 kDa	8	4	7	9	8	8	8	11	0.039	1.7
A0A024R084	SDF4	stromal cell derived factor 4, isoform CRA_c	42 kDa	6	4	6	9	5	10	8	10	0.014	2.8
O43405	COCH	coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus), isoform CRA_a	59 kDa	8	6	7	7	7	8	7	9	0.0094	1.6

Q9BWS9	CHID1	CHID1 protein	45 kDa	8	4	4	4	5	3	3	6	0.88	1
O75629	CREG1	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1, isoform CRA_b	24 kDa	2	2	1	5	2	3	2	5	0.33	1.9
P05060	CHGB	chromogranin B (secretogranin 1)	78 kDa	9	6	0	16	7	4	1	6	0.48	0.5
P01011	SERPINA3	RecName: Full=Alpha-1-antichymotrypsin; Short=ACT; AltName: Full=Cell growth-inhibiting gene 24/25 protein; AltName: F	48 kDa	15	6	7	9	10	2	0	1	0.078	0.09
V9HWB7	HEL60	aconitase 1, soluble, isoform CRA_a	98 kDa	5	15	6	1	8	1	3	1	0.18	0.2
Q5SRT3	CLIC1	chloride intracellular channel 1, isoform CRA_a	27 kDa	8	8	8	5	5	2	7	7	0.54	0.8
P20810	CAST	calpastatin isoform f	80 kDa	7	7	6	5	5	2	4	4	0.03	0.7
A0A140VK56		Transaldolase 1	38 kDa	9	8	9	6	8	0	4	7	0.079	0.5
V9HWF2	HEL-S-32	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble), isoform CRA_a	36 kDa	8	10	6	4	9	5	6	7	0.87	1
Q12907	LMAN2	lectin, mannose-binding 2, isoform CRA_a	40 kDa	5	4	6	7	9	7	8	6	0.14	1.6
P63241	EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A, isoform CRA_a	17 kDa	9	9	4	5	5	3	1	3	0.074	0.2
Q9BTY2	FUCA2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma	54 kDa	8	6	6	7	6	9	8	8	0.025	1.6
P15311	EZR	hypothetical protein DKFZp762H157.1 - human (fragment)	74 kDa	5	7	7	3	6	2	3	4	0.14	0.7
P61978	HNRNPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform CRA_a	51 kDa	9	11	7	7	9	2	3	8	0.092	0.6
A0A024R694	ACTN1	actinin, alpha 1, isoform CRA_a	103 kDa	13	10	10	7	7	3	2	2	0.015	0.5
Q92896	GLG1	golgi apparatus protein 1, isoform CRA_a	135 kDa	3	1	3	3	6	12	12	16	0.0001	6.5
Q99985	SEMA3C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	85 kDa	10	0	4	13	7	9	6	8	0.64	1.3
O43570	CA12	carbonic anhydrase XII, isoform CRA_a	39 kDa	6	7	7	5	6	3	5	5	0.033	0.6
E9KL35		guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1, isoform CRA_a	35 kDa	10	12	5	6	7	0	1	6	0.097	0.3
Q16658	FSCN1	Chain A, Crystal Structure Of Human Fascin, An Actin-Crosslinking Protein	55 kDa	6	16	4	4	6	1	1	5	0.27	0.3
Q13740	ALCAM	RecName: Full=CD166 antigen; AltName: Full=Activated leukocyte cell adhesion molecule; AltName: CD_antigen=CD166;	65 kDa	11	3	7	4	5	6	6	5	0.8	1.1
		unnamed protein product	68 kDa	8	7	5	6	5	4	3	2	0.014	0.6
P09341	CXCL1	Chain A, The Solution Structure Of Melanoma Growth Stimulating Activity	8 kDa	5	5	6	5	5	4	5	2	0.56	0.8
P09382	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	15 kDa	7	7	5	5	5	4	6	7	0.68	1.1
P03950	ANG	RecName: Full=Angiogenin; AltName: Full=Ribonuclease 5; Short=RNase 5; Flags: Precursor	17 kDa	4	2	4	3	4	4	6	6	0.015	2.8
O00754	MAN2B1	lysosomal acid alpha-mannosidase	111 kDa	10	2	8	9	8	9	5	6	0.73	1.1
P23526	AHCY	S-adenosylhomocysteine hydrolase, isoform CRA_a	48 kDa	6	11	4	6	4	0	3	4	0.11	0.4
A0A024R4A0	NCL	nucleolin, isoform CRA_b	77 kDa	3	14	0	12	5	0	0	2	0.17	0.09
P09936	UCHL1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase), isoform CRA_c	25 kDa	5	6	7	5	6	2	5	6	0.36	0.8
A0A024R8S5	P4HB	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide, isoform CRA_a	57 kDa	3	8	2	11	13	4	3	6	0.5	0.6
A0A0S2Z4K3	PROS1	protein S (alpha), isoform CRA_a	75 kDa	9	3	9	6	7	6	6	7	0.72	1.1
Q6ZMP0	THSD4	RecName: Full=Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4; AltName: Full=A disintegrin and metalloproteinase wi	112 kDa	8	2	7	7	6	11	9	12	0.004	2.7
A0A024RD80	HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1, isoform CRA_a	83 kDa	3	16	0	11	9	1	0	7	0.25	0.3
P13489	RNH1	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1, isoform CRA_a	49 kDa	11	10	7	8	5	2	1	4	0.013	0.3
Q5JQI0	NEU1	sialidase 1 (lysosomal sialidase), isoform CRA_a	45 kDa	4	3	7	7	5	5	7	8	0.17	1.6
Q15262	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K, isoform CRA_a	158 kDa	7	4	11	6	8	8	9	10	0.055	1.7
A0A140VK69	N/A	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1), isoform CRA_b	46 kDa	7	8	5	2	3	7	10	5	0.051	2.4
B4E1D8	N/A	cDNA FLJ51597, highly similar to C4b-binding protein alpha chain	60 kDa	0	1	11	0	2	13	14	11	0.0048	7.2
A0A024R1Y8	FSTL3	follistatin-like 3 (secreted glycoprotein), isoform CRA_a	28 kDa	3	3	6	4	4	6	4	5	0.099	1.7
P62826	RAN	RAN, member RAS oncogene family, isoform CRA_a	26 kDa	6	7	5	5	5	1	3	6	0.15	0.6
A0A1L7NY50	GALNT2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2), isoform CRA_c	65 kDa	6	5	6	6	6	7	6	5	0.33	1.3
Q9UBX1	CTSF	RecName: Full=Cathepsin F; Short=CATSF; Flags: Precursor	53 kDa	2	0	5	7	7	7	11	12	0.016	3.1
Q53GN4	WDR1	WD repeat domain 1, isoform CRA_a	66 kDa	12	11	4	2	2	0	3	2	0.21	0.3
Q04828	AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase	37 kDa	3	6	7	4	4	3	3	5	0.86	0.9
I1W660	DKK1	dickkopf homolog 1	29 kDa	8	7	5	6	4	5	5	4	0.61	0.9
P06748	NPM1	nucleophosmin isoform 1	33 kDa	2	5	2	7	4	1	2	5	0.28	0.4
P26641	EEF1G	RecName: Full=Elongation factor 1-gamma; Short=EF-1-gamma; AltName: Full=eEF-1B gamma	50 kDa	8	11	3	6	7	1	3	3	0.045	0.3
D0PNI1	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide, isoform CRA_a	28 kDa	5	5	5	5	5	3	3	5	0.00079	0.5
P37802	TAGLN2	transgelin 2, isoform CRA_b	22 kDa	3	6	4	4	4	2	2	4	0.25	0.6
V9HWH1	SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1, isoform CRA_a	43 kDa	6	8	8	3	4	1	3	5	0.17	0.5
P30838	ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1, isoform CRA_b	50 kDa	7	9	6	5	6	1	3	4	0.0071	0.4
P04066	FUCA1	tissue alpha-L-fucosidase precursor	54 kDa	4	2	4	4	4	5	4	5	0.013	2.1
Q14103	HNRNPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa), isoform CRA_a	41 kDa	5	8	4	4	4	2	4	4	0.4	0.7
P48307	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2, isoform CRA_b	26 kDa	5	4	3	3	2	4	5	4	0.027	1.7
Q16531	DDB1	DDBa p127	127 kDa	8	11	2	2	3	1	1	2	0.11	0.4
P16152	CBR1	carbonyl reductase 1	30 kDa	10	10	6	2	4	1	0	5	0.15	0.3
Q86VP6	CAND1	cullin-associated and neddylation-dissociated 1, isoform CRA_b	136 kDa	3	11	3	6	4	1	1	3	0.13	0.4
A0A024R0A1	CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage), isoform CRA_a	60 kDa	5	3	4	5	5	4	5	4	0.47	1.2
A0A140VK27	N/A	leukotriene A4 hydrolase, isoform CRA_c	69 kDa	9	14	6	2	3	2	2	1	0.14	0.3
P25787	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2, isoform CRA_b	26 kDa	6	6	4	5	6	1	1	3	0.014	0.3
Q9Y617	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1, isoform CRA_d	40 kDa	7	10	4	6	4	3	1	1	0.049	0.3
Q4LDE5	SVEP1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1 precursor	390 kDa	3	9	2	5	2	10	15	9	0.0034	4
B2R4R0	HIST1H4L	HIST4H4 protein	11 kDa	3	5	3	4	5	4	4	4	0.3	1.4

P13645	<i>KRT10</i>	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris), isoform CRA_a	59 kDa	7	1	5	2	1	20	14	3	0.077	9.5
A3R0T8	<i>HIST1H1E</i>	histone 1, H1e	22 kDa	2	5	2	4	2	3	2	3	0.83	0.9
B2RDE8	<i>N/A</i>	unnamed protein product	27 kDa	4	8	1	4	4	0	0	4	0.2	0.3
P46940	<i>IQGAP1</i>	RecName: Full=Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1; AltName: Full=p195	189 kDa	6	10	3	5	8	1	3	8	0.82	0.9
P18065	<i>IGFBP2</i>	Insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	35 kDa	9	1	6	8	9	3	3	2	0.12	0.3
P17900	<i>GM2A</i>	GM2 ganglioside activator, isoform CRA_a	21 kDa	4	2	5	5	3	3	4	4	0.15	1.7
Q9UBP4	<i>DKK3</i>	RecName: Full=Dickkopf-related protein 3; Short=Dickkopf-3; Short=Dkk-3; Short=hDkk-3; Flags: Precursor	38 kDa	3	2	5	3	2	8	7	7	0.0075	3.8
P02768	<i>ALB</i>	RecName: Full=Serum albumin; Flags: Precursor	69 kDa	3	4	7	5	4	6	3	4	0.4	1.4
Q8NC51	<i>SERBP1</i>	SERPINE1 mRNA binding protein 1	44 kDa	7	6	3	3	5	1	1	3	0.076	0.4
Q99574	<i>SERPINI1</i>	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1, isoform CRA_a	46 kDa	4	0	1	3	2	8	12	12	0.00033	9.3
A0A024R5U5	<i>ADAM10</i>	ADAM metallopeptidase domain 10, isoform CRA_b	84 kDa	5	3	6	4	6	4	6	7	0.16	1.4
Q4JM46	<i>AGR2</i>	anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis), isoform CRA_a	20 kDa	2	1	4	3	5	3	5	6	0.059	2.6
Q9GZP0	<i>PDGFD</i>	spinal cord-derived growth factor-B	43 kDa	2	2	3	2	3	9	10	9	0.0001	6.9
P39060	<i>COL18A1</i>	type XVIII collagen long variant	178 kDa	5	2	10	2	3	6	6	11	0.033	2.6
P55786	<i>NPEPPS</i>	Aminopeptidase puromycin sensitive	99 kDa	9	17	8	0	4	0	0	1	0.11	0.05
P43490	<i>NAMPT</i>	Chain A, Crystal Structure Of Human Nmptase And Its Complex With Nmn	56 kDa	3	14	3	1	3	0	0	3	0.37	0.2
P11216	<i>PYGB</i>	glycogen phosphorylase B	97 kDa	10	6	3	6	7	2	3	4	0.049	0.5
Q16555	<i>DPYSL2</i>	dihydropyrimidinase-like 2, isoform CRA_a	62 kDa	11	10	3	4	5	0	0	1	0.038	0.05
Q14914	<i>PTGR1</i>	NADP dependent leukotriene b4 12-hydroxydehydrogenase, partial	34 kDa	2	8	4	0	2	0	1	4	0.67	0.7
P13987	<i>CD59</i>	Chain A, Structure Of A Soluble, Glycosylated Form Of The Human Complement Regulatory Protein Cd59	9 kDa	4	2	4	3	4	5	5	4	0.01	2.7
P21291	<i>CSRP1</i>	RecName: Full=Cysteine and glycine-rich protein 1; AltName: Full=Cysteine-rich protein 1; Short=CRP; Short=CRP1; AltName	21 kDa	6	8	0	3	1	1	1	2	0.33	0.3
P0CG48	<i>UBC</i>	polyubiquitin	68 kDa	5	6	5	6	4	5	4	4	0.67	1.1
A0AVL1	<i>ADAM9</i>	ADAM9 protein	79 kDa	3	3	4	4	3	3	3	5	0.11	1.5
C0LQF2	<i>N/A</i>	deoxyribonuclease II, partial	38 kDa	5	2	3	4	5	5	5	4	0.17	1.6
P26639	<i>TARS</i>	threonyl-tRNA synthetase, isoform CRA_b	83 kDa	4	8	4	1	2	2	1	1	0.18	0.6
V9HWC9	<i>HEL-S-44</i>	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult)), isoform CRA_a	16 kDa	3	5	3	2	3	2	2	2	0.3	0.7
P19022	<i>CDH2</i>	RecName: Full=Cadherin-2; AltName: Full=CDw325; AltName: Full=Neural cadherin; Short=N-cadherin; AltName: CD_antig	100 kDa	4	6	7	1	2	4	3	6	0.42	1.4
Q9H4A4	<i>RNPEP</i>	aminopeptidase B, partial	73 kDa	7	13	3	1	3	1	1	3	0.29	0.4
P78527	<i>PRKDC</i>	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide, isoform CRA_b	469 kDa	6	13	6	1	6	0	0	2	0.046	0.1
P13010	<i>XRCC5</i>	X-ray repair cross-complementing protein 5	83 kDa	6	12	4	4	6	0	0	2	0.034	0.1
Q8NHP8	<i>PLBD2</i>	Phospholipase B domain containing 2	65 kDa	5	5	2	4	4	6	5	6	0.011	1.9
Q6FHU2	<i>PGAM1</i>	phosphoglycerate mutase 1 (brain), isoform CRA_b	29 kDa	4	4	6	2	4	1	4	4	0.88	0.9
P28074	<i>PSMB5</i>	Chain L, Human Constitutive 20s Proteasome	22 kDa	5	6	2	3	3	2	0	3	0.24	0.5
P0C0L5	<i>C4B</i>	hCG2001591	193 kDa	5	4	4	11	8	8	9	3	0.54	1.3
P35052	<i>GPC1</i>	glypican 1, isoform CRA_b	62 kDa	1	3	0	7	3	5	2	7	0.2	2.3
P35527	<i>KRT9</i>	RecName: Full=Keratin, type I cytoskeletal 9; AltName: Full=Cytokeratin-9; Short=CK-9; AltName: Full=Keratin-9; Short=K9	62 kDa	7	1	6	4	2	5	14	6	0.065	3.3
Q6IAW5	<i>CALU</i>	calumenin, isoform CRA_b	37 kDa	2	3	2	5	3	4	4	6	0.034	2.1
P38571	<i>LIPA</i>	lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Wolman disease), isoform CRA_a	45 kDa	3	4	3	5	5	3	2	5	0.99	1
P00491	<i>PNP</i>	RecName: Full=Purine nucleoside phosphorylase; Short=PNP; AltName: Full=Inosine phosphorylase; AltName: Full=Inosin	32 kDa	7	8	3	2	6	0	1	2	0.041	0.2
A0A024R1N1	<i>MYH9</i>	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle, isoform CRA_a	227 kDa	3	15	0	4	3	0	0	2	0.24	0.2
P43251	<i>BTB</i>	biotinidase, isoform CRA_a	61 kDa	3	2	5	2	2	4	6	3	0.1	1.8
Q12841	<i>FSTL1</i>	follicle-stimulating-like 1, isoform CRA_a	35 kDa	5	7	3	1	3	4	2	1	0.83	0.9
V9HWK2	<i>HEL114</i>	vinculin, isoform CRA_b	124 kDa	1	5	2	4	2	1	1	5	0.59	1.2
P05156	<i>CFI</i>	Chain A, Human Complement Factor I	63 kDa	3	6	9	2	6	4	3	6	0.95	1
P67809	<i>YBX1</i>	Y box binding protein 1, isoform CRA_b	36 kDa	5	9	2	3	4	2	1	3	0.27	0.5
V9HW11	<i>HEL-S-10</i>	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)), isoform CRA_a	22 kDa	4	7	4	3	5	1	2	5	0.29	0.6
P52823	<i>STC1</i>	stanniocalcin 1	28 kDa	6	3	5	5	7	1	3	1	0.078	0.3
P36871	<i>PGM1</i>	phosphoglucomutase 1, isoform CRA_a	61 kDa	5	10	2	2	4	0	2	2	0.28	0.5
P80303	<i>NUCB2</i>	nucleobindin 2, isoform CRA_a	50 kDa	4	0	6	7	6	6	6	7	0.071	2
A0A024RAI1	<i>ACTR3</i>	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast), isoform CRA_a	47 kDa	5	6	4	5	2	2	1	3	0.12	0.5
A0A024RDL1	<i>CCT6A</i>	chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1), isoform CRA_a	58 kDa	3	5	2	3	3	0	1	3	0.19	0.5
P61981	<i>YWHAG</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	28 kDa	4	5	4	4	4	0	2	4	0.055	0.6
Q9NS15	<i>LTBP3</i>	FLJ00070 protein, partial	147 kDa	12	4	7	5	1	4	7	3	0.78	1.1
Q13838	<i>DDX39B</i>	BAT1 protein	51 kDa	6	9	2	4	5	0	0	4	0.09	0.3
P0DP23	<i>CALM1</i>	Chain A, 1.7-A Structure Of Calmodulin Bound To A Peptide From Dap Kinase	17 kDa	4	5	4	4	3	1	2	4	0.38	0.8
P00390	<i>GSR</i>	Chain A, Crystal Structure Of Human Glutathione Reductase Complexed With A Fluoro-analogue Of The Menadione Deriva	52 kDa	5	7	3	2	3	1	1	2	0.059	0.4
Q6MZW2	<i>FSTL4</i>	follicle-stimulating-like 4, isoform CRA_b	93 kDa	1	4	1	1	1	3	7	14	0.025	8
P31939	<i>ATIC</i>	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase, isoform CRA_c	65 kDa	7	10	2	3	6	0	0	3	0.1	0.3
V9HWC2	<i>HEL-S-67p</i>	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	20 kDa	6	7	6	1	4	1	1	4	0.17	0.4
P41250	<i>GARS</i>	glycine--tRNA ligase precursor	83 kDa	7	8	2	2	2	2	1	2	0.16	0.4
Q43291	<i>SPINT2</i>	kunitz-type protease inhibitor 2 isoform a precursor	28 kDa	3	2	4	2	4	2	3	4	0.23	1.4
P30153	<i>PPP2R1A</i>	Chain A, Structure Of The Protein Phosphatase 2a Core Enzyme Bound To Tumor- Inducing Toxins	65 kDa	5	5	2	3	4	1	3	3	0.052	0.5
G3V1D3	<i>DPP3</i>	hCG2016942, isoform CRA_c	84 kDa	7	8	4	0	3	1	2	2	0.18	0.4

Q05CK9	<i>SYNCRIP</i>	SYNCRIP protein, partial	51 kDa	4	9	3	4	3	2	2	3	0.29	0.6
Q14019	<i>COTL1</i>	coactosin-like 1 (Dictyostelium), isoform CRA_b	16 kDa	3	3	2	2	2	2	1	2	0.88	1
P12955	<i>PEPD</i>	Chain A, Crystal Structure Of Human Prolidase	55 kDa	4	9	5	1	2	0	3	2	0.34	0.5
O60687	<i>SRPX2</i>	sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	53 kDa	1	0	2	4	2	11	10	4	0.022	8.7
Q9UM22	<i>EPDR1</i>	ependymin related protein 1 (zebrafish), isoform CRA_a	25 kDa	5	3	4	5	5	5	5	5	0.041	1.6
A0A140VK49	<i>SND1</i>	Staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1	102 kDa	4	11	2	1	2	0	0	1	0.082	0.08
Q15904	<i>ATP6AP1</i>	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1, isoform CRA_b	48 kDa	1	2	4	4	4	3	4	4	0.26	1.5
A0A140VJY7		thioredoxin-like 5	14 kDa	5	5	4	2	4	3	4	4	0.84	0.9
Q99729	<i>HNRNPAB</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B, isoform CRA_b	31 kDa	6	7	2	4	4	1	2	3	0.11	0.5
A0A024R5F9	<i>B3GNT6</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6, isoform CRA_a	47 kDa	4	0	6	5	4	5	6	5	0.055	1.9
P05455	<i>SSB</i>	lupus La protein	47 kDa	5	7	0	4	2	0	0	3	0.21	0.3
P16070	<i>CD44</i>	cell surface glycoprotein CD44	39 kDa	2	2	3	2	3	2	2	2	0.86	1
Q14980	<i>XPO1</i>	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast), isoform CRA_a	123 kDa	4	7	4	3	3	3	3	3	0.98	1
Q16769	<i>QPCT</i>	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase), isoform CRA_a	41 kDa	4	2	4	3	2	1	2	1	0.052	0.3
P48163	<i>ME1</i>	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	64 kDa	3	4	3	3	3	1	1	3	0.032	0.5
Q2TNB3		proteasome activator hPA28 suunit beta	27 kDa	4	3	2	3	3	0	2	3	0.27	0.6
Q15181	<i>PPA1</i>	inorganic pyrophosphatase	33 kDa	4	7	5	4	3	1	3	4	0.1	0.6
A0A024QZL1	<i>PRG1</i>	proteoglycan 1, secretory granule, isoform CRA_a	18 kDa	3	3	3	2	3	3	3	2	0.062	1.9
Q75787	<i>ATP6AP2</i>	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	39 kDa	1	1	5	5	8	5	6	5	0.36	1.6
A0A140VK44	<i>N/A</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6, isoform CRA_b	27 kDa	4	8	0	3	4	1	0	1	0.16	0.2
P19021	<i>PAM</i>	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase, isoform CRA_a	101 kDa	6	0	3	6	2	4	6	6	0.061	2.2
A0A024R6E8	<i>GALC</i>	galactosylceramidase, isoform CRA_c	77 kDa	4	1	4	6	7	4	4	5	0.67	1.2
A0A024R889	<i>SPTAN1</i>	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin), isoform CRA_d	285 kDa	2	11	2	5	4	2	2	3	0.37	0.6
A0A024R3N3	<i>APLP2</i>	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2, isoform CRA_a	82 kDa	1	4	1	3	3	2	1	3	0.71	0.8
P49588	<i>AARS</i>	alanyl-tRNA synthetase	107 kDa	6	7	3	3	1	0	0	1	0.036	0.1
P63010	<i>AP2B1</i>	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit, isoform CRA_a	105 kDa	4	4	4	3	4	1	1	1	0.0014	0.3
O00764	<i>PDXK</i>	Chain A, Crystal Structure Of Human Pyridoxal Kinase	37 kDa	4	6	5	1	1	0	1	1	0.12	0.2
P07910	<i>HNRNPC</i>	RecName: Full=Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2; Short=hnRNP C1/C2	34 kDa	0	6	2	4	3	0	0	3	0.28	0.3
P02765	<i>AHSG</i>	RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein; AltName: Full=Alpha-2-Z-globulin; AltName: Full=Ba-alpha-2-glycoprotein; AltName: Full=Ba-alpha-2-glycoprotein	39 kDa	2	3	3	2	2	3	2	2	0.16	1.4
P20933	<i>AGA</i>	aspartylglucosaminidase, isoform CRA_c	37 kDa	4	2	3	3	4	4	3	4	0.071	1.8
V9HW04	<i>HEL-S-80p</i>	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform, isoform CRA_a	37 kDa	3	6	1	2	2	1	2	2	0.32	0.6
O60462	<i>NRP2</i>	Neuropilin 2	104 kDa	5	4	5	3	6	1	1	3	0.043	0.5
Q9UNW1	<i>MINPP1</i>	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1, isoform CRA_a	55 kDa	2	1	4	4	3	4	4	6	0.032	2.2
A6XND5	<i>N/A</i>	ribonuclease T2 precursor	36 kDa	4	1	3	5	2	7	2	3	0.27	2.3
Q9UHL4	<i>DPP7</i>	Dipeptidyl-peptidase 7	54 kDa	2	1	3	2	2	7	6	5	0.0026	4.6
P08236	<i>GUSB</i>	glucuronidase, beta, isoform CRA_c	75 kDa	3	1	4	4	1	4	4	4	0.053	2
A0A024R3W5	<i>SLC39A10</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10, isoform CRA_a	94 kDa	4	3	2	5	3	2	2	3	0.56	0.8
Q9HC38	<i>GLOD4</i>	unknown	33 kDa	2	5	4	1	2	1	0	2	0.22	0.4
Q5M8T4	<i>CTGF</i>	connective tissue growth factor	38 kDa	6	1	6	1	7	2	0	5	0.56	0.7
A0A024RB85	<i>PA2G4</i>	proliferation-associated 2G4, 38kDa, isoform CRA_a	44 kDa	5	8	1	2	1	0	1	2	0.2	0.3
P16870	<i>CPE</i>	RecName: Full=Carboxypeptidase E; Short=CPE; AltName: Full=Carboxypeptidase H; Short=CPH; AltName: Full=Enkephalinase	53 kDa	9	0	6	13	3	3	3	2	0.4	0.4
P61812	<i>TGFB2</i>	transforming growth factor, beta 2, isoform CRA_a	51 kDa	3	3	3	3	2	4	3	5	0.1	1.5
P04179	<i>SOD2</i>	Chain B, Human Manganese Superoxide Dismutase	22 kDa	4	4	4	1	2	1	1	0	0.054	0.2
A0A024QZX3	<i>SERPINB6</i>	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6, isoform CRA_a	43 kDa	5	6	7	0	0	2	2	2	0.63	0.7
P22304	<i>IDS</i>	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome), isoform CRA_b	62 kDa	3	1	2	3	2	5	5	4	0.0027	3
P02786	<i>TFRC</i>	transferrin receptor	85 kDa	1	1	4	1	3	1	4	3	0.31	1.7
E7DVW5	<i>FABP5</i>	hCG1984476, isoform CRA_a	15 kDa	7	7	2	4	1	0	0	1	0.1	0.05
Q8WUM4	<i>PDCD6IP</i>	HP95	96 kDa	4	4	4	3	2	1	0	3	0.1	0.5
Q14204	<i>DYNC1H1</i>	DYNC1H1 variant protein	532 kDa	5	6	1	2	1	0	1	2	0.25	0.5
P07814	<i>EPRS</i>	EPRS protein	171 kDa	5	15	1	1	1	0	1	1	0.33	0.2
Q546I6	<i>HLA-C</i>	HLA-C protein	41 kDa	5	4	4	3	5	3	4	2	0.84	1
Q96QK1	<i>VPS35</i>	vacuolar protein sorting 35	92 kDa	6	8	3	1	3	0	0	1	0.039	0.1
P25789	<i>PSMA4</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 4, isoform CRA_a	29 kDa	5	6	2	3	1	0	0	2	0.083	0.2
A0A024R8E5	<i>COL5A1</i>	collagen, type V, alpha 1, isoform CRA_a	184 kDa	1	3	6	0	0	9	5	5	0.033	4.6
		PREDICTED: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 isoform X1	36 kDa	3	0	3	2	2	5	4	2	0.047	2.3
Q9UJJ9	<i>GNPTG</i>	CAB56184	34 kDa	3	1	3	3	3	3	3	3	0.11	1.6
P24592	<i>IGFBP6</i>	insulin-like growth factor-binding protein 6 precursor	25 kDa	4	1	4	1	3	2	2	1	0.99	1
D3DV87	<i>GBA</i>	glucosidase, beta; acid (includes glucosylceramidase), isoform CRA_a	60 kDa	2	3	2	4	4	2	4	2	0.65	1.2
Q96KP4	<i>CNDP2</i>	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family), isoform CRA_c	53 kDa	1	7	1	2	1	0	0	1	0.23	0.2
P31431	<i>SDC4</i>	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan), isoform CRA_b	22 kDa	5	3	0	4	4	4	0	0	0.41	0.5
F4ZW62	<i>N/A</i>	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa, isoform CRA_b	43 kDa	5	7	0	2	2	0	0	3	0.32	0.4
P20618	<i>PSMB1</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1, isoform CRA_a	24 kDa	4	6	2	2	1	0	0	2	0.12	0.2
Q13275	<i>SEMA3F</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F, isoform CRA_b	88 kDa	1	0	0	15	1	7	11	2	0.52	1.9

V9HW98	HEL2	14-3-3 protein epsilon isoform	29 kDa	2	2	3	2	2	2	3	2	0.45	0.9
P55060	CSE1L	hCG2019736, isoform CRA_a	110 kDa	4	7	3	1	2	0	1	2	0.2	0.3
Q99832	CCT7	chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta), isoform CRA_b	59 kDa	4	4	2	3	3	0	0	3	0.088	0.4
Q6FHC9	STC2	stanniocalcin 2, isoform CRA_a	33 kDa	4	3	2	4	3	0	0	1	0.019	0.2
Q9NRX4	PHPT1	Chain A, Crystal Structure Of Human Phosphohistidine Phosphatase	16 kDa	2	3	4	0	2	0	0	3	0.58	0.6
P23396	RPS3 OK/SW	ribosomal protein S3	27 kDa	5	10	0	2	3	0	0	2	0.24	0.2
Q8WUA8	TSKU	RecName: Full=Tsukushin; Short=Tsukushi; AltName: Full=E2-induced gene 4 protein; AltName: Full=Leucine-rich repeat-	38 kDa	2	4	4	2	3	2	3	4	0.43	1.2
Q9HB40	SCPEP1	serine carboxypeptidase 1 precursor protein	51 kDa	1	1	4	2	3	3	6	6	0.011	3.6
Q02790	FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa, isoform CRA_a	52 kDa	6	10	2	2	2	0	0	1	0.096	0.08
P61604	HSPE1	chaperonin 10	11 kDa	3	3	4	1	2	2	2	2	0.64	0.8
P60842	EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1, isoform CRA_b	46 kDa	5	7	1	2	4	0	0	1	0.057	0.09
Q12906	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa, isoform CRA_a	76 kDa	3	8	0	3	2	0	0	0	0.097	0
A0A024R127	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2, isoform CRA_a	58 kDa	7	1	1	3	1	1	1	1	0.42	0.5
Q8WVQ1	CANT1	Chain A, Crystal Structure Of Human Soluble Calcium-activated Nucleotidase (scan) With Calcium Ion	38 kDa	3	0	5	2	1	3	4	4	0.21	1.9
Q9NZU0	FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3, isoform CRA_a	73 kDa	5	1	4	4	5	2	4	4	0.73	1.1
Q14703	MBTPS1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1, isoform CRA_a	118 kDa	1	1	1	1	1	4	1	2	0.023	3.9
P08729	KRT7	RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 7; AltName: Full=Cytokeratin-7; Short=CK-7; AltName: Full=Keratin-7; Short=K	51 kDa	10	4	0	4	3	0	0	0	0.049	0
Q08830	FGL1	Fibrinogen-like 1	36 kDa	1	0	7	6	4	6	3	2	0.83	1.2
Q6FH49	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	30 kDa	2	3	3	2	2	1	1	1	0.079	0.4
Q53FA7	TP53I3	Chain A, Crystal Structure Of Human P53 Inducible Oxidoreductase (Tp53i3,Pig3)	38 kDa	3	3	3	1	2	0	1	3	0.41	0.7
P22234	PAICS	multifunctional protein ADE2 isoform 2	47 kDa	2	4	1	1	1	1	1	1	0.41	0.8
Q13753	LAMC2	laminin, gamma 2, isoform CRA_b	131 kDa	19	0	1	10	1	0	1	0	0.27	0.06
Q5VYK3	ECPAS	hCG28762	192 kDa	2	6	2	2	3	1	1	3	0.38	0.6
Q92616	GNC1	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast), isoform CRA_a	271 kDa	5	4	1	2	1	0	0	3	0.26	0.5
Q99873	PRMT1	protein arginine methyltransferase 1, isoform CRA_a	40 kDa	5	9	2	2	2	0	0	2	0.17	0.2
P23246	SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated), isoform CRA_e	66 kDa	4	6	1	1	3	1	2	4	1	1
P41252	IARS	isoleucine-tRNA synthetase, isoform CRA_a	145 kDa	4	10	2	2	2	0	0	1	0.095	0.1
Q01813	PFKP	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type isoform 1	86 kDa	6	10	0	0	2	0	1	3	0.51	0.5
P49720	PSMB3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	23 kDa	2	5	1	3	2	0	0	2	0.17	0.3
A0A024R2P0	RPSA	ribosomal protein SA, isoform CRA_a	33 kDa	3	8	1	1	1	0	0	1	0.25	0.1
O43493	TGOLN2	trans-golgi network protein 2, isoform CRA_a	46 kDa	2	1	3	3	2	2	3	3	0.14	1.6
O94973	AP2A2	RecName: Full=AP-2 complex subunit alpha-2; AltName: Full=100 kDa coated vesicle protein C; AltName: Full=Adaptor pro	104 kDa	3	6	3	2	2	1	1	1	0.061	0.4
Q16706	MAN2A1	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	131 kDa	2	1	7	1	3	4	5	2	0.33	1.7
A8K2M0	PSMC4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4, isoform CRA_b	47 kDa	1	2	0	1	1	0	1	1	0.35	0.5
A0A024R6W0	GOT2	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2), isoform CRA_a	47 kDa	3	6	2	0	1	1	2	1	0.66	0.7
V9HWE1	HEL113	vimentin, isoform CRA_a	54 kDa	3	5	1	2	2	2	0	2	0.44	0.7
Q9Y678	COPG1	gamma1-COP	98 kDa	3	4	0	2	2	0	0	2	0.24	0.4
A3RJH1	DDX1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1, isoform CRA_d	82 kDa	2	4	1	0	2	0	0	0	0.049	0
P08571	CD14	CD14 antigen	40 kDa	5	2	3	5	4	2	3	1	0.25	0.5
A0A140VJJ2	ESD	esterase D/formylglutathione hydrolase, isoform CRA_b	31 kDa	4	6	2	1	1	0	1	1	0.17	0.3
Q9NTK5	OLA1	GTP-binding protein PTD004, isoform CRA_c	45 kDa	1	1	1	1	1	1	1	1	0.027	1.4
O00462	MANBA	mannosidase, beta A, lysosomal	101 kDa	2	1	3	3	3	5	3	2	0.16	1.9
A6NLN1	PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_a	59 kDa	3	7	1	1	1	1	1	1	0.39	0.5
Q9Y287	ITM2B	integral membrane protein 2B	30 kDa	2	2	3	1	1	4	3	3	0.013	2.8
Q16851	UGP2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	57 kDa	2	5	3	0	2	1	2	2	0.92	1
Q03405	PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor, isoform CRA_d, partial	26 kDa	5	1	3	2	1	3	3	3	0.16	1.7
P31943	HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H), isoform CRA_a	49 kDa	3	4	1	1	1	0	1	1	0.21	0.4
P19957	PI3	RecName: Full=Elafin; AltName: Full=Elastase-specific inhibitor; Short=ESI; AltName: Full=Peptidase inhibitor 3; Short=PI-	12 kDa	4	1	1	3	4	1	1	0	0.13	0.2
P60660	MYL6	MYL6 protein, partial	16 kDa	3	5	3	2	3	2	1	2	0.22	0.6
V9HWG1	HEL-S-134P	selenium binding protein 1, isoform CRA_a	52 kDa	3	1	3	1	1	1	2	3	0.35	1.5
Q969H8	MYDGF	chromosome 19 open reading frame 10, isoform CRA_a	19 kDa	2	2	1	2	3	3	3	3	0.0028	2.5
Q6EMK4	VASN	slit-like 2 (Drosophila)	72 kDa	2	0	5	3	3	3	3	2	0.52	1.3
Q8NB7	SUMF2	Sulfatase modifying factor 2	34 kDa	1	1	1	1	1	4	4	6	0.0001	7.5
P41091	EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa, isoform CRA_a	51 kDa	4	8	1	2	2	0	0	1	0.11	0.1
O43396	TXNL1	thioredoxin-like 1, isoform CRA_a	37 kDa	3	3	2	1	2	0	0	0	0.00093	0
P35556	FBN2	fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly), isoform CRA_a	315 kDa	1	0	2	1	0	6	1	1	0.18	5.4
A0A024R0Q4	PLD3	phospholipase D family, member 3, isoform CRA_b	55 kDa	4	2	4	1	1	3	3	1	0.48	1.4
V9HW48	SH3BGRL	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like, isoform CRA_b	13 kDa	3	3	3	2	2	0	0	3	0.24	0.5
P05114	HMGN1	RecName: Full=Non-histone chromosomal protein HMG-14; AltName: Full=High mobility group nucleosome-binding domain	11 kDa	3	3	1	1	1	0	0	1	0.087	0.2
A0A024RBS2	RPLP0	ribosomal protein, large, P0, isoform CRA_b	34 kDa	1	6	0	2	1	0	0	0	0.19	0
A0A0U2ZQU7	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial), isoform CRA_b	97 kDa	5	1	3	1	4	2	3	3	0.49	1.3
Q92484	SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A, isoform CRA_a	51 kDa	1	0	2	2	1	6	1	3	0.13	4.6
Q24JP5	TMEM132A	transmembrane protein 132A, isoform CRA_c	110 kDa	4	3	2	2	0	2	2	0	0.64	0.8

A0A024R728	<i>MET</i>	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor), isoform CRA_a	158 kDa	7	4	4	2	5	0	1	0	0.0073	0.1
Q5VVF5	<i>VLDLR</i>	very low density lipoprotein receptor, isoform CRA_a	93 kDa	4	4	2	4	2	0	0	0	0.0046	0
P14866	<i>HNRNPL</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	64 kDa	5	7	0	1	1	0	0	0	0.16	0
P30044	<i>PRDX5</i>	Peroxisome oxidoreductin 5	22 kDa	2	4	2	1	2	0	1	2	0.26	0.6
A0A024R1N4	<i>XRCC6</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa), isoform CRA_a	70 kDa	1	7	1	2	1	0	0	1	0.22	0.2
Q9BUD6	<i>SPON2</i>	spondin 2, extracellular matrix protein, isoform CRA_a	36 kDa	0	0	6	0	1	3	3	3	0.27	2.4
P42785	<i>PRCP</i>	RecName: Full=Lysosomal Pro-X carboxypeptidase; AltName: Full=Angiotensinase C; AltName: Full=Lysosomal carboxyp	56 kDa	4	1	2	4	4	0	2	1	0.15	0.4
V9HWC7	<i>PRDX6</i>	peroxiredoxin 6, isoform CRA_a	25 kDa	3	5	2	1	3	0	1	1	0.1	0.4
O00410	<i>IPO5</i>	RAN binding protein 5, isoform CRA_a	126 kDa	4	3	1	1	1	0	1	1	0.52	0.7
P29966	<i>MARCKS</i>	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate, isoform CRA_a	32 kDa	3	5	4	1	3	0	0	0	0.018	0
P10586	<i>PTPRF</i>	receptor-type tyrosine-protein phosphatase F isoform 2 precursor	212 kDa	6	2	4	1	0	0	0	0	0.11	0
V9HW72	<i>HEL-S-94n</i>	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein), isoform CRA_a	63 kDa	3	4	1	1	2	1	2	2	0.9	1
P15880	<i>RPS2</i>	ribosomal protein S2, isoform CRA_a	31 kDa	1	4	1	2	1	1	1	2	0.96	1
V9HW96	<i>HEL-S-100n</i>	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	57 kDa	3	4	0	3	1	1	2	2	0.96	1
P15848	<i>ARSB</i>	RecName: Full=Arylsulfatase B; Short=ASB; AltName: Full=N-acetylgalactosamine-4-sulfatase; Short=G4S; Flags: Precurs	60 kDa	1	0	0	3	0	3	3	3	0.015	4.6
O95373	<i>IPO7</i>	importin7, partial	116 kDa	1	3	0	2	3	0	0	1	0.13	0.2
Q53Y51	<i>DDT</i>	D-dopachrome tautomerase, isoform CRA_b	13 kDa	2	3	1	2	2	1	1	1	0.11	0.6
P20827	<i>EFNA1</i>	ephrin-A1, isoform CRA_a	24 kDa	3	0	1	2	3	2	2	1	0.69	1.2
Q14512	<i>FGFBP1</i>	fibroblast growth factor binding protein 1	26 kDa	4	1	1	3	3	2	2	3	0.75	1.1
P60981	<i>DSTN</i>	destrin (actin depolymerizing factor), isoform CRA_a	17 kDa	3	2	1	1	2	0	1	3	0.71	0.8
P15289	<i>ARSA</i>	RecName: Full=Arylsulfatase A; Short=ASA; AltName: Full=Cerebrosidase-sulfatase; Contains: RecName: Full=Arylsulfatase	54 kDa	2	1	1	3	2	2	3	2	0.1	1.8
Q6IAT9	<i>PSMB6</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 6	25 kDa	2	3	1	2	1	1	0	1	0.16	0.5
P50895	<i>BCAM</i>	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group), isoform CRA_b	77 kDa	1	3	5	1	1	0	1	1	0.31	0.4
P35270	<i>SPR</i>	sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase), isoform CRA_a	28 kDa	1	1	1	1	1	1	1	1	0.41	0.9
A0A109NGN6	<i>N/A</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5, isoform CRA_a	26 kDa	2	4	1	0	1	0	0	2	0.53	0.5
Q13214	<i>SEMA3B</i>	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	83 kDa	2	1	3	2	5	0	1	5	0.92	0.9
O75643	<i>SNRNP200</i>	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1, isoform CRA_b	245 kDa	2	4	0	2	2	0	0	2	0.29	0.3
A0A024R644	<i>CLN5</i>	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5, isoform CRA_a	46 kDa	2	0	2	3	3	2	2	3	0.32	1.5
P55268	<i>LAMB2</i>	laminin beta 2 chain	196 kDa	1	1	2	2	2	2	2	2	0.074	1.6
P50991	<i>CCT4</i>	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta), isoform CRA_c	58 kDa	1	4	1	2	1	0	1	1	0.28	0.4
Q96P70	<i>IPO9</i>	importin 9, isoform CRA_b	116 kDa	2	3	1	1	1	0	0	1	0.039	0.3
V9HW43	<i>HEL-S-102</i>	HSP27	23 kDa	2	4	1	1	1	0	0	2	0.36	0.4
A0A024RBI5	<i>CORO1C</i>	hypothetical protein DKFZp762H186.1 - human (fragment)	56 kDa	1	7	0	1	1	0	0	0	0.27	0
Q14520	<i>HABP2</i>	hyaluronan binding protein 2	63 kDa	0	0	6	0	2	3	4	4	0.13	2.7
V9HWE8	<i>ARHGDIA</i>	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha, isoform CRA_a	23 kDa	2	3	1	0	0	1	1	1	0.76	1.2
B2RAZ5	<i>B4GALT4</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 4, isoform CRA_a	40 kDa	2	0	2	2	3	1	4	5	0.093	2.5
Q09028	<i>RBBP4</i>	RecName: Full=Histone-binding protein RBBP4; AltName: Full=Chromatin assembly factor 1 subunit C; Short=CAF-1 subu	48 kDa	3	5	1	1	2	0	0	0	0.032	0
P35908	<i>KRT2</i>	keratin 2A (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens)	65 kDa	2	1	1	0	0	12	5	0	0.12	7.2
Q43286	<i>B4GALT5</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5, isoform CRA_a	45 kDa	2	1	2	2	2	1	1	2	0.41	1.2
Q9NZP8	<i>C1RL</i>	complement component 1, r subcomponent-like, isoform CRA_a	53 kDa	2	0	3	2	2	2	3	2	0.18	1.6
A0A024R794	<i>TNPO3</i>	transportin 3, isoform CRA_b	104 kDa	3	4	2	1	0	0	1	1	0.26	0.5
P68371	<i>TUBB4B</i>	Tubulin, beta 2C	50 kDa	1	4	2	2	2	0	0	2	0.17	0.3
Q14697	<i>GANAB</i>	glucosidase, alpha; neutral AB, isoform CRA_e	107 kDa	2	2	0	4	4	2	2	2	0.86	0.9
P12273	<i>PIP</i>	prolactin-induced protein, partial	9 kDa	3	0	4	1	1	5	4	3	0.045	3.8
P31327	<i>CPS1</i>	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial, isoform CRA_b	165 kDa	4	5	2	3	2	0	0	0	0.0041	0
V9HW37	<i>HEL-S-69</i>	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	60 kDa	2	3	2	1	2	1	2	2	0.52	1.1
Q99650	<i>OSMR</i>	Oncostatin M receptor	111 kDa	3	0	1	4	3	2	2	2	0.77	1.2
Q86SR1	<i>GALNT10</i>	Chain A, Crsytal Structure Of Pp-Galnac-T10 With Udp, Galnac And Mn2+	65 kDa	3	0	1	2	2	2	5	4	0.032	2.7
Q6PCE3	<i>PGM2L1</i>	glucose 1,6-bisphosphate synthase	70 kDa	1	4	1	1	1	0	1	1	0.38	0.6
Q9Y4K0	<i>LOXL2</i>	lysyl oxidase-like 2, isoform CRA_a	87 kDa	3	2	1	3	0	0	1	0	0.18	0.2
Q96JQ1		Raichu404X	85 kDa	2	2	2	1	2	1	1	1	0.15	0.8
Q53SS8	<i>PCBP1</i>	poly(rC) binding protein 1	37 kDa	2	4	1	1	3	0	0	1	0.059	0.2
P52895	<i>AKR1C2</i>	Chain A, Crystal Structure Of Human Type 3 Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase In Complex With Nadp(H)	37 kDa	2	3	2	0	2	0	0	2	0.42	0.5
P25398	<i>RPS12</i>	ribosomal protein S12, isoform CRA_d	15 kDa	3	4	1	1	2	0	0	3	0.46	0.5
P49589	<i>CARS</i>	cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic isoform b	85 kDa	2	3	1	2	2	1	0	0	0.019	0.2
P42285	<i>MTREX</i>	Superkiller viralicidic activity 2-like 2 (S. cerevisiae)	118 kDa	2	3	1	1	1	0	0	1	0.079	0.2
Q86SF2	<i>GALNT7</i>	PREDICTED: N-acetylgalactosaminyltransferase 7 isoform X1	75 kDa	0	0	5	1	1	5	4	2	0.16	2.9
P09237	<i>MMP7</i>	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	30 kDa	2	2	4	1	1	1	1	0	0.3	0.4
V9HW63	<i>PRDX4</i>	peroxiredoxin 4	31 kDa	3	3	1	2	4	1	0	1	0.24	0.6
P17655	<i>CAPN2</i>	calpain-2 catalytic subunit isoform 1	80 kDa	2	3	1	1	1	0	0	2	0.36	0.5
P49368	<i>CCT3</i>	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	61 kDa	1	6	0	3	2	0	0	3	0.49	0.5
Q96PD2	<i>DCBLD2</i>	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2, isoform CRA_a	85 kDa	3	2	2	2	1	1	0	1	0.051	0.4
Q8IUE6	<i>HIST2H2AB</i>	histone 2, H2ab	14 kDa	0	4	1	1	1	0	0	2	0.26	0.4

P30085	<i>CMPK1</i>	cytidine monophosphate kinase CMP	22 kDa	2	2	3	1	1	0	1	1	0.29	0.6
V9HWD6	<i>HEL-S-1</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide, isoform CRA_a	28 kDa	1	2	2	1	0	0	0	1	0.14	0.3
Q14517	<i>FAT1</i>	homologue of Drosophila Fat protein	506 kDa	9	0	1	3	1	0	1	2	0.48	0.5
Q9NSC7	<i>ST6GALNAC1</i>	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1, isoform CRA_a	69 kDa	0	0	1	1	1	5	5	5	0.0001	11
P11586	<i>MTHFD1MTHF</i>	RecName: Full=C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic; Short=C1-THF synthase; Includes: RecName: Full=Methylenetetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	102 kDa	1	9	2	0	1	0	0	1	0.34	0.2
P61163	<i>ACTR1ACTRN</i>	ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast), isoform CRA_a	43 kDa	1	4	1	1	1	0	0	1	0.17	0.3
P07355	<i>ANXA2</i>	RecName: Full=Annexin A2; AltName: Full=Annexin II; AltName: Full=Annexin-2; AltName: Full=Calpactin I heavy chain; AltName: Full=Annexin A2	39 kDa	2	1	1	1	1	1	1	3	0.018	2.6
A0A024R7Z5	<i>SDCBP</i>	Syndecan binding protein (syntenin)	32 kDa	2	1	1	3	3	1	0	2	0.42	0.6
Q6ZRP7	<i>QSOX2</i>	sulfhydryl oxidase 2 precursor	78 kDa	2	0	1	0	2	2	4	4	0.0041	4.7
11321565	<i>MATN3</i>	matrilin-3 precursor	53 kDa	4	0	1	4	3	2	3	2	0.66	1.2
P08572	<i>COL4A2</i>	collagen alpha-2(IV) chain preproprotein	168 kDa	0	3	4	0	4	1	1	1	0.52	0.6
Q16610	<i>ECM1</i>	extracellular matrix protein 1, isoform CRA_b	64 kDa	1	0	1	0	0	8	8	0	0.04	25
V9HWH9	<i>HEL-S-43 S10</i>	human S100C protein	12 kDa	2	1	3	2	1	0	1	1	0.19	0.4
P23142	<i>FBLN1</i>	fibulin 1, isoform CRA_d	74 kDa	1	2	1	1	1	1	1	1	0.034	1.5
P06737	<i>PYGL</i>	Chain A, Human Liver Glycogen Phosphorylase A Complexed With Amp	97 kDa	2	2	2	2	2	0	0	2	0.041	0.3
Q5U0Q1	<i>DKFZp686L11</i>	GAP SH3 binding protein	52 kDa	2	5	1	1	2	0	0	1	0.095	0.2
Q92692	<i>NECTIN2</i>	nectin-2 isoform delta precursor	58 kDa	2	2	4	0	2	0	1	1	0.3	0.4
A0A024R9C1	<i>PABPC1</i>	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_b	71 kDa	2	4	1	2	2	0	0	1	0.024	0.2
Q00839	<i>HNRNPU</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	91 kDa	1	4	1	1	1	1	0	0	0.22	0.3
B0QY90	<i>EIF3L</i>	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein, isoform CRA_a	55 kDa	1	3	1	2	1	0	0	1	0.032	0.2
Q14767	<i>LTBP2</i>	latent transforming growth factor beta binding protein 2, isoform CRA_a	195 kDa	4	3	2	0	0	7	0	1	0.39	2.6
D3DPU2	<i>CAP1</i>	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast), isoform CRA_a	52 kDa	3	4	2	0	1	0	0	1	0.14	0.2
P25786	<i>PSMA1</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1, isoform CRA_b	34 kDa	1	3	1	1	0	0	0	0	0.088	0
P23588	<i>EIF4B</i>	eukaryotic translation initiation factor 4B	69 kDa	1	3	0	2	1	0	0	0	0.078	0
Q7Z304	<i>MAMDC2</i>	MAM domain containing 2, isoform CRA_a	78 kDa	0	0	0	0	0	13	5	2	0.064	INF
Q13344	<i>N/A</i>	fus-like protein, partial	53 kDa	2	3	1	1	1	0	1	1	0.21	0.6
Q0VGD6	<i>HNRPR</i>	HNRPR protein, partial	68 kDa	1	4	1	1	2	0	1	1	0.24	0.5
B2R4R9	<i>RPS28</i>	ribosomal protein S28, isoform CRA_a	8 kDa	2	3	1	2	2	0	0	0	0.0048	0
O75533	<i>SF3B1</i>	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	146 kDa	1	5	0	1	1	0	0	2	0.56	0.5
Q10588	<i>BST1</i>	RecName: Full=ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2; AltName: Full=ADP-ribosyl cyclase 2; AltName: Full=beta-5-phosphoribosyl transferase 2	36 kDa	1	0	3	0	1	6	5	3	0.01	7.2
P15151	<i>PVR</i>	poliovirus receptor, isoform CRA_a	40 kDa	1	1	2	1	1	3	2	1	0.093	2.4
Q08257	<i>CRYZ</i>	crystallin, zeta (quinone reductase), isoform CRA_b	35 kDa	1	5	1	1	1	1	1	1	0.68	0.8
Q9GZM7	<i>TINAGL1</i>	oxidized-LDL responsive gene 2	52 kDa	1	0	0	6	2	1	1	1	0.68	0.6
P45877	<i>PPIC</i>	RecName: Full=Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C; Short=PPIase C; AltName: Full=Cyclophilin C; AltName: Full=Rotamase C	23 kDa	0	0	3	0	2	3	3	3	0.017	3.9
P53618	<i>COPB1</i>	RecName: Full=Coatomer subunit beta; AltName: Full=Beta-coat protein; Short=Beta-COP	107 kDa	2	4	1	2	2	0	0	1	0.045	0.2
P30050	<i>RPL12</i>	Ribosomal protein L12	18 kDa	1	5	0	1	2	0	0	0	0.18	0
Q6FH20	<i>NTS</i>	neurotensin, isoform CRA_b	20 kDa	2	0	1	3	2	0	0	0	0.17	0
Q6FHV6	<i>ENO2</i>	enolase 2 (gamma, neuronal), isoform CRA_a	47 kDa	2	2	2	1	2	0	1	1	0.12	0.6
Q9BWD1	<i>ACAT2</i>	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase), isoform CRA_a	41 kDa	1	1	1	1	1	1	1	2	0.03	1.8
P00492	<i>HPRT1</i>	Chain A, The Crystal Structure Of Human Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase With Bound Gmp	24 kDa	1	2	1	1	1	1	1	1	0.41	1.2
P68431	<i>HIST1H3A</i>	histone H3.1	15 kDa	1	2	1	1	1	1	1	1	0.47	1.1
A0A024R396	<i>C11orf54</i>	chromosome 11 open reading frame 54, isoform CRA_a	35 kDa	1	1	2	1	2	0	1	1	0.29	0.6
O14657	<i>TOR1B</i>	torsin family 1, member B (torsin B)	38 kDa	0	0	3	2	3	1	2	3	0.5	1.4
A0A0U5JA19	<i>TNLG1B</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	28 kDa	1	1	5	0	2	1	1	1	0.6	0.5
P19875	<i>CXCL2</i>	macrophage inflammatory protein 2 alpha, partial	8 kDa	3	1	1	2	2	0	2	0	0.24	0.4
Q05DH1	<i>PSMA7</i>	PSMA7 protein, partial	27 kDa	2	3	0	1	1	0	0	0	0.063	0
Q15084	<i>PDIA6</i>	protein disulfide isomerase-related protein 5, partial	46 kDa	2	2	1	3	4	0	0	0	0.062	0
A0A024R5Q7	<i>ADSS</i>	adenylosuccinate synthase, isoform CRA_a	50 kDa	2	4	1	0	2	0	1	0	0.21	0.2
P30048	<i>PRDX3</i>	Peroxisome oxidoreductin 3	28 kDa	4	3	2	0	1	0	0	1	0.15	0.2
P17987	<i>TCP1</i>	t-complex 1, isoform CRA_a	60 kDa	1	6	0	1	0	1	1	2	0.85	1.2
Q6IBA2	<i>PC4</i>	SUB1 homolog (S. cerevisiae), isoform CRA_a	14 kDa	1	3	0	2	1	0	0	0	0.093	0
Q05639	<i>EEF1A2</i>	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	50 kDa	1	4	0	1	1	1	0	1	0.87	1
P50897	<i>PPT1</i>	palmitoyl-protein thioesterase	34 kDa	1	0	1	3	2	2	4	4	0.024	3.1
P12004	<i>PCNA</i>	proliferating cell nuclear antigen, isoform CRA_a	29 kDa	2	4	0	2	1	0	0	2	0.31	0.4
P20062	<i>TCN2</i>	transcobalamin II; macrocytic anemia, isoform CRA_c	47 kDa	0	0	5	1	0	2	2	3	0.32	2.2
P53004	<i>BLVRA</i>	Chain A, Crystal Structure Of Human Biliverdin Reductase A (Casp Target)	33 kDa	2	2	1	1	2	1	1	1	0.44	0.9
P04083	<i>ANXA1</i>	RecName: Full=Annexin A1; AltName: Full=Annexin I; AltName: Full=Annexin-1; AltName: Full=Calpactin II; AltName: Full=Annexin A1	39 kDa	1	1	1	1	1	1	1	3	0.16	2.4
P13640	<i>MT1G</i>	metallothionein-1G isoform 1	6 kDa	1	1	2	0	0	1	1	1	0.53	1.5
P43034	<i>PAFAH1B1</i>	RecName: Full=Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha; AltName: Full=Lissencephaly-1 protein; Short=L1	47 kDa	1	5	1	0	0	0	1	1	0.71	0.6
Q15155	<i>NOMO1</i>	pm5 protein	131 kDa	1	0	0	4	2	2	2	2	0.39	1.7
Q15046	<i>KARS</i>	lysyl-tRNA synthetase	71 kDa	3	3	0	1	1	0	0	1	0.18	0.3
P14314	<i>PRKCSH</i>	RecName: Full=Glucosidase 2 subunit beta; AltName: Full=80K-H protein; AltName: Full=Glucosidase II subunit beta; AltName: Full=80K-H protein	59 kDa	0	2	0	4	1	2	0	1	0.94	0.9
P35613	<i>BSGUNQ6505</i>	Chain A, Crystal Structure Of The Extracellular Portion Of Hab18gCD147	20 kDa	2	1	1	1	1	1	2	1	0.17	1.6

Q9Y4L1	<i>HYOU1</i>	oxigen-regulated protein 150	111 kDa	2	2	2	3	2	1	2	1	0.47	0.8
Q13509	<i>TUBB3</i>	hCG1983504, isoform CRA_a	50 kDa	2	3	1	1	1	0	0	1	0.17	0.2
P15170	<i>GSPT1</i>	GSPT1 protein	68 kDa	1	1	1	1	1	0	0	1	0.1	0.4
B2R491	<i>RPS4X</i>	ribosomal protein S4, X-linked, isoform CRA_a	43 kDa	1	2	0	1	2	0	0	2	0.68	0.7
P17405	<i>SMPD1</i>	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase), isoform CRA_c	70 kDa	0	0	0	2	2	2	3	5	0.013	5
Q99523	<i>SORT1</i>	sortilin 1	97 kDa	0	0	1	0	0	4	3	5	0.00014	26
Q76LA1	<i>CSTB</i>	cystatin B (stefin B), isoform CRA_a	11 kDa	2	3	1	1	0	0	1	0	0.23	0.3
Q02952	<i>AKAP12</i>	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12, isoform CRA_a	182 kDa	2	4	0	1	1	0	0	0	0.065	0
P12931	<i>SRC</i>	Chain A, Src Kinase In Complex With A Quinazoline Inhibitor	60 kDa	2	3	2	0	2	0	0	0	0.028	0
A0A024R2X3	<i>HYAL1</i>	hyaluronoglucosaminidase 1, isoform CRA_a	48 kDa	2	0	0	4	3	1	3	0	0.84	0.9
Q01459	<i>CTBS</i>	Di-N-acetylchitinase	44 kDa	1	1	1	1	1	3	2	1	0.049	3
A0A024RC55	<i>MFGE8</i>	milk fat globule-EGF factor 8 protein, isoform CRA_a	43 kDa	2	1	2	1	1	1	2	2	0.1	1.6
A4D0V4	<i>CAPZA2</i>	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2, isoform CRA_a	32 kDa	3	4	1	0	1	0	0	1	0.21	0.2
Q32P28	<i>P3H1</i>	RecName: Full=Prolyl 3-hydroxylase 1; AltName: Full=Growth suppressor 1; AltName: Full=Leucine- and proline-enriched p	83 kDa	1	0	1	0	3	1	2	4	0.11	3
A0A024RA87	<i>SEPT7</i>	septin 7, isoform CRA_a	45 kDa	1	3	0	1	0	1	0	1	0.99	1
P54136	<i>RARS</i>	arginyl-tRNA synthetase	75 kDa	1	6	0	1	1	0	0	0	0.22	0
P06576	<i>ATP5F1B</i>	RecName: Full=ATP synthase subunit beta, mitochondrial; Flags: Precursor	57 kDa	1	1	1	0	1	1	1	1	0.07	1.8
A0A024RCE1	<i>TSPAN4</i>	tetraspanin 4, isoform CRA_a	26 kDa	3	1	1	3	2	0	0	1	0.077	0.2
P49773	<i>HINT1</i>	Histidine triad nucleotide binding protein 1	14 kDa	2	3	1	0	1	0	0	0	0.21	0
P53621	<i>COPA</i>	coatamer protein complex, subunit alpha, isoform CRA_a	138 kDa	1	4	0	1	1	0	0	1	0.31	0.3
P99999	<i>CYCS</i>	cytochrome c	12 kDa	2	0	1	1	0	1	2	0	0.71	1.3
P07384	<i>CAPN1</i>	RecName: Full=Calpain-1 catalytic subunit; AltName: Full=Calcium-activated neutral proteinase 1; Short=CANP 1; AltName	82 kDa	1	1	1	1	1	1	1	1	0.027	1.4
A0A024R1A4	<i>UBE2L3</i>	ubiquitin-conjugating enzyme UbcH7	18 kDa	0	0	1	1	1	1	1	0	0.59	1.4
Q5U0I6	<i>RAB1A</i>	RAB1A, member RAS oncogene family, isoform CRA_b	23 kDa	2	2	1	0	1	0	2	1	0.78	1.2
Q53XL8	<i>PSMC1</i>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1, isoform CRA_a	49 kDa	1	4	0	1	1	0	0	1	0.31	0.3
M0R210	<i>RPS16</i>	ribosomal protein S16, isoform CRA_a	14 kDa	1	3	0	1	1	0	0	1	0.3	0.3
Q9UKM7	<i>MAN1B1</i>	mannosidase, alpha, class 1B, member 1, isoform CRA_c	80 kDa	1	0	3	1	1	1	2	3	0.078	2.8
Q8WX77	<i>IGFBPL1</i>	insulin-like growth factor binding protein-like 1	29 kDa	0	0	2	0	2	0	1	4	0.36	2.6
P52292	<i>KPNA2</i>	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1), isoform CRA_b	58 kDa	2	3	1	0	1	0	0	1	0.21	0.3
A2RUM7	<i>RPL5</i>	ribosomal protein L5	34 kDa	1	3	0	1	1	0	0	0	0.09	0
P02750	<i>LRG1</i>	leucine-rich alpha-2-glycoprotein	38 kDa	1	0	1	3	3	1	1	1	0.64	0.7
P78504	<i>JAG1</i>	Jagged 1 (Alagille syndrome)	134 kDa	3	1	0	1	1	1	1	1	0.7	1.2
P56537	<i>EIF6</i>	integrin beta 4 binding protein, isoform CRA_b	28 kDa	2	3	1	1	1	0	0	0	0.017	0
O00232	<i>PSMD12</i>	proteasome 26S non-ATPase subunit 12 isoform 1 variant, partial	53 kDa	1	3	0	1	1	0	1	1	0.67	0.7
A0A024RCA7	<i>RPLP2</i>	ribosomal protein, large, P2, isoform CRA_a	12 kDa	1	4	0	2	1	0	0	1	0.25	0.2
Q07654	<i>TFF3</i>	Chain 1, Solution Structure Of The Disulphide-Linked Dimer Of Human Intestinal Trefoil Factor (Tff3)	7 kDa	0	0	2	1	1	2	2	1	0.091	2.8
A0A024R525	<i>FTH1</i>	ferritin, heavy polypeptide 1, isoform CRA_a	21 kDa	2	4	1	1	2	0	0	0	0.12	0
A4D275	<i>ARPC1B</i>	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa, isoform CRA_a	41 kDa	3	3	0	1	1	0	0	0	0.069	0
P35475	<i>IDUA</i>	alpha-L-iduronidase precursor	73 kDa	0	0	2	2	0	2	2	3	0.029	3.4
A0A024RA40	<i>CPVL</i>	carboxypeptidase, vitellogenic-like, isoform CRA_a	54 kDa	0	2	3	1	3	0	0	0	0.071	0
P24534	<i>EEF1B2</i>	elongation factor 1-beta	25 kDa	1	1	1	1	1	0	1	1	0.66	0.8
Q09328	<i>MGAT5</i>	RecName: Full=Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A; AltName: Full=Alpha-mannosid	85 kDa	1	0	1	1	2	1	1	1	0.93	1
D3DVV9	<i>PTPNS1</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1, isoform CRA_a	55 kDa	1	1	2	1	1	0	0	0	0.013	0
P11717	<i>IGF2R</i>	insulin-like growth factor 2 receptor	274 kDa	2	1	1	1	0	1	0	0	0.43	0.5
P30530	<i>AXL</i>	AXL receptor tyrosine kinase, isoform CRA_a	97 kDa	1	1	3	0	0	1	0	1	0.79	0.7
Q06210	<i>GFPT1</i>	glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	77 kDa	1	4	0	1	1	0	0	1	0.31	0.3
P62269	<i>RPS18</i>	ribosomal protein S18, isoform CRA_b	18 kDa	2	3	0	1	1	0	0	1	0.2	0.3
O76003	<i>GLRX3</i>	thioredoxin-like 2, isoform CRA_a	37 kDa	1	1	0	1	1	0	1	1	0.88	1.1
Q53TN2	<i>LANCL1</i>	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial), isoform CRA_a	45 kDa	2	1	1	1	1	0	0	1	0.075	0.3
Q6FI18	<i>CYR61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61, isoform CRA_a	42 kDa	1	1	1	0	0	2	2	1	0.014	4.4
P19438	<i>TNFRSF1A</i>	tumor necrosis factor alpha inhibitor	18 kDa	2	1	1	2	0	0	0	0	0.078	0
Q92520	<i>FAM3C</i>	family with sequence similarity 3, member C	25 kDa	0	0	2	0	1	1	1	2	0.14	2.7
Q13421	<i>MSLN</i>	mesothelin or CAK1 antigen precursor	69 kDa	2	0	0	3	1	1	1	0	0.73	0.7
Q53YK7	<i>PRNP</i>	prion protein	28 kDa	2	1	0	1	1	1	0	0	0.39	0.4
Q99798	<i>ACO2</i>	aconitase 2, mitochondrial, isoform CRA_a	85 kDa	1	1	1	0	1	0	0	0	0.028	0
Q76M96	<i>CCDC80</i>	Coiled-coil domain containing 80	108 kDa	2	0	1	0	0	3	2	2	0.0088	5.9
P14735	<i>IDE</i>	Chain A, Crystal Structure Of Human Insulin-Degrading Enzyme In Complex With Amyloid-Beta (1-40)	115 kDa	1	1	1	1	1	0	1	1	0.66	0.8
Q92187	<i>ST8SIA4</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4, isoform CRA_a	19 kDa	0	0	1	1	1	3	1	3	0.021	5.5
Q96T76	<i>MMS19</i>	MMS19 nucleotide excision repair homolog (S. cerevisiae)	113 kDa	2	3	0	1	2	0	1	1	0.35	0.6
Q13332	<i>PTPRS</i>	receptor-type tyrosine-protein phosphatase S isoform 1 precursor	217 kDa	2	1	2	2	0	0	1	1	0.43	0.6
Q9NPR2	<i>SEMA4B</i>	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B	93 kDa	2	0	3	1	1	0	2	0	0.59	0.6
A2RU34	<i>CNTNAP3</i>	CNTNAP3 protein	132 kDa	0	0	0	0	1	2	3	5	0.0012	21
P28827	<i>PTPRM</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M, isoform CRA_a	166 kDa	4	0	0	3	2	1	0	1	0.43	0.5

Q93009	<i>USP7</i>	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated), isoform CRA_a	128 kDa	1	3	1	1	1	0	1	1	0.36	0.6
P01023	<i>A2M</i>	alpha-2-macroglobulin	163 kDa	1	0	1	2	0	3	1	0	0.37	2.3
P46926	<i>GNPDA1</i>	RecName: Full=Glucosamine-6-phosphate isomerase 1; AltName: Full=Glucosamine-6-phosphate deaminase 1; Short=GN	33 kDa	1	2	1	0	0	0	1	1	0.83	1.2
Q9Y230	<i>RUVBL2</i>	RuvB-like 2 (E. coli), isoform CRA_a	46 kDa	1	3	1	0	1	0	0	1	0.3	0.4
A0A024R179	<i>NCBP1</i>	nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa, isoform CRA_a	92 kDa	1	3	0	1	1	0	0	0	0.081	0
Q5T4S7	<i>UBR4</i>	p600	574 kDa	1	3	0	2	1	0	0	0	0.075	0
P05556	<i>ITGB1</i>	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12), isoform CRA_a	88 kDa	6	1	1	0	1	0	0	0	0.24	0
Q13444	<i>ADAM15</i>	MDC15	88 kDa	1	0	2	0	0	2	3	3	0.0026	6
P31689	<i>DNAJA1</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1, isoform CRA_b	37 kDa	1	2	0	1	1	0	0	0	0.04	0
Q27J81	<i>INF2</i>	hCG2029577, isoform CRA_c	125 kDa	1	1	1	0	1	0	0	0	0.028	0
Q9UBX5	<i>FBLN5</i>	fibulin 5, isoform CRA_b	50 kDa	0	0	0	1	0	3	2	2	0.0029	14
P49915	<i>GMPS</i>	guanine monphosphate synthetase, isoform CRA_b	77 kDa	2	3	0	1	1	0	0	0	0.056	0
P15907	<i>ST6GAL1</i>	RecName: Full=Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1; Short=Alpha 2,6-ST 1; AltName: Full=B-cell antigen CD75;	47 kDa	0	0	3	0	1	1	2	0	0.65	1.6
Q11206	<i>ST3GAL4</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4, isoform CRA_a	38 kDa	0	0	0	0	1	1	5	2	0.043	19
Q8IWU5	<i>SULF2</i>	sulfatase 2, isoform CRA_a	100 kDa	0	0	1	0	1	3	1	1	0.073	5.7
P13521	<i>SCG2</i>	secretogranin II (chromogranin C)	71 kDa	1	0	0	1	0	3	1	1	0.071	6
P25311	<i>AZGP1</i>	alpha-2-glycoprotein 1, zinc, isoform CRA_a	34 kDa	0	0	1	0	0	3	2	1	0.018	14
Q15198	<i>PDGFRL</i>	platelet-derived growth factor receptor-like	42 kDa	1	0	1	1	1	0	0	0	0.028	0
Q14031	<i>COL4A6</i>	RecName: Full=Collagen alpha-6(IV) chain; Flags: Precursor	164 kDa	0	0	3	0	0	2	2	2	0.061	4.1