

Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Efecto terapéutico de nanopartículas *core-shell*
de Au-CoFe₂O₄ funcionalizadas, en cáncer de
pulmón de células pequeñas (SCLC).

TESIS

Que presenta la:

M. en C. ROCÍO VILLALOBOS MANZO

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis

DR. JOSÉ ISABEL TAPIA RAMÍREZ

Al eterno creador del universo.

A Joel, Elizabeth, MAC y COCA.

A Sofía, mi amor.

A Marcos, mi pompita.

Nunca está de más agradecer...

Al eterno creador del universo, por permitirme estar un día más colmada de cientos de bendiciones.

Elizabeth y Joel, a ustedes primordialmente, gracias por su amor desde tiempos inmemoriales, por permitirme ser, hacer y deshacer; por ser mi puerto seguro a pesar de mi frenesí y mi desacato; por los sacrificios hechos todos estos años al respaldar mis decisiones y todo lo que ellas han implicado. Jamás habrá reciprocidad que iguale lo que me han dado, pero sin duda este trabajo es suyo; gracias por ser el amor hecho personas en mi vida; nadxee' stale látu. A MAC y a Suani por darme motivos vivientes para ser feliz y por consentirme en mis visitas a casa. A Sofía y a Marquitos, mis favoritos, los mejores, gracias por todo el cariño que me envían con sus "¿cuándo vienes, tía?", le dan un sentido extraordinario a mi vida al estar amándome cada día un poquito más a pesar de la distancia, son magníficos, son mi más. A los que ya no están pero están. A los que son mi familia por elección. A COCA, las palabras siempre serán escasas pero mil gracias por tu amor y apoyo incesante, por tu paciencia, por compartirme de tus experiencias académicas y estar echándome porras en mis días insupportables, pero sobre todo por estar firme en las buenas, en las malas y en las peores, ¡Nadxeeeli ne guenda stine! ¡Que la vida nos alcance, familia amada!

A las y los amigas(os) y compañeras(os) que son parte de mi historia, que de alguna forma han sumado a mi vida personal y académica, y que no me es posible nombrar uno a uno, pero que saben que les quiero y aprecio. A las personas que son parte del Laboratorio 2 del DGBM; a la UGPM, a Emmanuel por su tiempo y esmero. A Gaby Mora por su amable atención estos años.

A mi padre académico, el Dr. José Tapia Ramírez, por el conocimiento y experiencia compartida, por el soporte dado a las ideas que surgieron y su disponibilidad para que este proyecto marchase lo más posible, y sobretodo por su paciencia y confianza. A mis asesores, el Dr. Efraín Garrido, el Dr. Jaime García, el Dr. Mario Moreno y en especial al Dr. Manuel Hernández por su tiempo, por las enseñanzas y por los cafés acompañados de buenas charlas.

Por último al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado con la beca número 632129 gracias a la cual se pudo llevar a cabo este proyecto y obtener el grado de Doctora en Ciencias en la especialidad de Genética y Biología Molecular.

Desde los afectos... ¡Gracias totales!

-Ro.

Resumen

El cáncer de pulmón es, en la actualidad, una de las principales neoplasias malignas causantes de gran cantidad de muertes en todo el mundo. En 2020 se estimaron 2.2 millones de casos y 1.8 millones de muertes (IARC, 2020). Hasta la fecha, los marcadores de diagnóstico y pronóstico tempranos para el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) no se han identificado ni implementado sistemáticamente, por lo que la mayoría de los pacientes aún reciben tratamientos estándar. En el presente proyecto de investigación, en primer lugar, utilizamos la proteómica para identificar un marcador de membrana sobreexpresado en SCLC y, en segundo lugar, utilizamos este marcador para funcionalizar nanopartículas magnéticas de núcleo y cubierta (mCSNP). En particular, llevamos a cabo espectrometría de masas sin etiquetas en combinación con un enfoque de movilidad iónica para identificar, a partir de nuestras líneas celulares, las proteínas con mayor abundancia en el SCLC. Nuestra atención se centró en los receptores de membrana debido a su potencial aplicación como dianas de mCSNP. La proteína Transferrin Receptor (TfR1), también conocida como Cluster of Differentiation 71 (CD71), se sobreexpresó significativamente presentando un aumento de hasta 32 veces con respecto a la célula control, esto se confirmó utilizando otras metodologías como western blot, citometría de flujo e inmunofluorescencia. Los resultados fueron consistentes en todas las metodologías. También se definió que el carboplatino es el fármaco quimioterapéutico con mayor efecto citotóxico contra las células cancerosas y con menos efectos en las células control. A continuación, se evaluó la cinética de la endocitosis mediante una metodología de citometría de flujo, basada en la cuantificación de la fluorescencia, lo que indica que los receptores se activaron correctamente con el TfR1 soportado en los mCSNP. Nuestra metodología y resultados son importantes para obtener información esencial para la identificación de marcadores en diferentes tipos de células cancerosas y el diseño de mCSNP's, lo que elucida el camino para el diagnóstico temprano y oportuno, el seguimiento de la enfermedad y la elección de un tratamiento adecuado basado en nanomedicina.

Palabras clave: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC); transferrin receptor (TfR1); label free; espectrometría de masas; nanopartículas.

Abstract

Lung cancer is, currently, one of the main malignancies causing deaths worldwide. To date, early prognostic and diagnostic markers for small cell lung cancer (SCLC) have not been systematically identified and implemented, so most patients receive standard treatments yet. In the present study, we first, applied proteomics to identify a membrane marker for lung cancer and, second, used this marker to functionalize magnetic core-shell nanoparticles (mCSNP's). Particularly, we carried out label-free mass spectrometry in combination with an ion-mobility approach to identify, from our cell lines, 220 proteins with increased abundance in small cell lung cancer (SCLC). Our attention was focused on membrane receptors due to their potential application as mCSNP's targets; to this end, the Transferrin Receptor (TfR1) protein, also known as Cluster of Differentiation 71 (CD71), was significantly overexpressed presenting up to a 32-fold increase with respect to the control cell, this was confirmed using other methodologies as western blot, flow cytometry and immunofluorescence. Results are consistent across all methodologies. Kinetics of endocytosis was, then, evaluated by a flow cytometry methodology, based on fluorescence quantification, indicating that receptors were properly activated with the TfR1 supported on the mCSNP's. Our methodology and results are important in obtaining essential information for identifying markers in different types of cancer cells and designing mCSNP's, what paves the way for early and timely diagnosis, disease monitoring and choosing a proper treatment based on nanomedicine.

Keywords: small cell lung cancer (SCLC); transferrin receptor (TfR1); cluster of differentiation 71 (CD71) label-free; mass spectrometry; nanoparticles.

Contenido

Resumen	iii
Abstract	iv
1. INTRODUCCIÓN	2
2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES	5
2.1. Cáncer	5
2.1.1. Cáncer de pulmón	10
2.1.1.1. Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).....	15
2.1.1.2. Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)	16
2.1.2. Tratamientos convencionales	19
2.2. Nanomedicina y nanopartículas	21
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	28
4. OBJETIVOS.....	30
4.1. General:.....	30
4.2. Específicos:	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1. SCLC H69AR (ATCC® CRL-11351)	33
5.2. MRC5 (ATCC® CCL-171™).....	34
5.3. Label-Free DIA Mass Spectrometry	35
5.4. Western Blot.....	42
5.5. Citometría de flujo.....	44
5.6. Inmunofluorescencia (IF)	46
5.7. Nanopartículas	47
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	96
Referencias	98
8. Artículo Producto de la investigación.....	109
Anexos	129

Índice De Figuras

Figura 1 Diferencia en la división celular de una célula normal y una cancerosa.	5
Figura 2 Las alteraciones en el cáncer, Izquierda: propuesta de Hanahan y Weinberg (2011) y a la derecha: propuesta de Hanahan con 4 alteraciones adicionales (Hanahan, 2022).	8
Figura 3 Descripción general de la cascada metastásica: los cinco pasos clave de la metástasis incluyen invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización	9
Figura 4 Factores determinantes de la metástasis (Fares et al., 2020).	10
Figura 5 Incidencia y mortalidad de Cáncer a nivel mundial, Globocan 2020.	11
Figura 6 Incidencia y mortalidad de cáncer en México, Globocan 2020 (IARC, 2020).	12
Figura 7 Clasificación principal del cáncer de pulmón.	15
Figura 8 Carcinoma de células pequeñas. En la evaluación citológica (tinción de hematoxilina-eosina), son evidentes las características nucleares (patrón de cromatina en “sal y pimienta”) y citoplasma escaso.	17
Figura 9 Sitios comunes de metástasis en SCLC (Rudin et al., 2021).	18
Figura 10 Diferencias entre la orientación pasiva y activa de las nanopartículas.	21
Figura 11 Estrategias de funcionalización de nanopartículas (Sanità, Carrese, & Lamberti, 2020).	23
Figura 12 Diferencias entre la orientación pasiva y activa de las nanopartículas(Sanità et al., 2020).	24
Figura 13 Morfología de las células H69.	33
Figura 14 Micrografía celular de células MRC5 con baja y alta densidad.	34
Figura 15 Label Free.	37
Figura 16 SDS-PAGE flow. Tomado de www.sigmaaldrich.com .	42
Figura 17 Flujo metodológico de la inmunoelectrotransferencia e inmunodetección. Tomado de www.sigmaaldrich.com .	43
Figura 18 Inmunofluorescencia indirecta.	46
Figura 19 Reacción química de MTT.	51
Figura 20 A) Difractograma de rayos X de una muestra de nanopartículas de hierro sintetizada B) Ficha reportada para la magnetita, que muestra un excelente perfil de coincidencia.	53
Figura 21 Micrografías electrónicas de barrido de magnetita sintetizada.	54
Figura 22 TEM de magnetita dopado con oro.	54
Figura 23 Reacción química resumida de la decomposición térmica de ferrita de cobalto.	55
Figura 24 TEM y XRD de ferrita de cobalto.	55
Figura 25 STEM-HAADF. (a) Distribución del tamaño de partícula de CoFe_2O_4 , (b) Imagen STEM-HAADF corregida por Cs de bajo aumento de CoFe_2O_4 que muestra varias NP y una distribución muy estrecha, (c) Imagen STEM-HAADF corregida por Cs de CoFe_2O_4 (d) Perfiles EDS de NPs de CoFe_2O_4	56
Figura 26 Scan Mapping de la nanopartícula con núcleo de ferrita de cobalto y recubrimiento de oro.	57

Figura 27 Histograma que representa la fiabilidad y confianza de los péptidos detectados, un total de 123.724 péptidos; el 86,92% de ellos caen en un error máximo de ± 10 ppm. _____	58
Figura 28 Gráfico circular que representa los tipos de péptidos identificados, la mayoría de ellos 79.1%, son péptidos de alta calidad denominados PepFrag1. _____	59
Figura 29 La mayoría de los péptidos PepFrag1 se concentran a un máximo de ± 10 ppm en todo el rango m/z analizado (puntos negros), además estos péptidos se condensan principalmente en m/z 500-900. _____	59
Figura 30 Gráficos de movilidad iónica frente a m/z. _____	60
Figura 31 Rango dinámico de proteínas de membrana cuantificadas, Fiabilidad y confianza (1.298 identificadas). En magenta, proteínas de la línea celular MRC5 y en verde, proteínas de la línea celular H69AR. El eje de abscisas corresponde al número de proteínas cuantificadas (ID's); el eje de ordenadas corresponde al promedio de intensidades Hi3 para cada proteína detectada (los valores se representan como logaritmo en base 10). _____	60
Figura 32 Mapa de calor que representa la abundancia relativa de 548 proteínas de membrana filtradas para ambas líneas celulares. Se utilizaron triplicados para ambas condiciones para generar el gráfico. La abundancia relativa se representa mediante "Z-Score". Se observaron diferencias marcadas en la expresión entre ambas líneas celulares. _	61
Figura 33 Gráfico de volcán que representa todas las proteínas filtradas; los círculos grises son proteínas sin cambios (186), los círculos rojos proteínas reguladas al alza o sobreexpresadas (188), círculos verdes proteínas reguladas a la baja o subexpresadas (174). El eje de abscisas corresponde al valor p de cada proteína detectada en el triplicado técnico (los valores se representan como $-\text{Log}_{10}$) y el eje de ordenadas corresponde a la relación de la media de intensidades Hi3 (H69AR / MRC5) para cada proteína detectada (los valores se representan como logaritmo base 2 _____	62
Figura 34 Vías del Reactoma. Vías del Reactoma. Las proteínas expresadas diferencialmente están involucradas en 212 vías biológicas con $\text{FDR} \leq 0.05$. El gráfico de barras muestra las 50 vías biológicas principales. Los valores de FDR se transformaron a un logaritmo de base 10 negativo, lo que significa que los valores más grandes en el eje de abscisas indican rutas mejor representadas. _____	74
Figura 35 Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente entre la línea normal y SCLC. El interactoma revela la importancia de estas proteínas en el metabolismo de ambas líneas celulares con énfasis principal en la proliferación celular ya que muchas de ellas participan en procesos específicos como ciclo celular (esferas azules), síntesis de proteínas (esferas rojas), respuesta inmune (esferas amarillas) y tráfico vesicular (esferas verdes). Entre ellos destacamos TfR1 (círculo negro), que tiene un grado de interconexión alto que impacta en las acciones downstream. _____	80
Figura 36 Interactoma de la proteína TfR1 (TFRC). _____	80
Figura 37 Representación gráfica del mecanismo de internalización de Fe^{3+} a través de receptores de transferrina (TfR1). El receptor de transferrina-1 (TfR1) se agrupa en pozos recubiertos de clatrina a través de interacciones de clasificación con AP-2 (proteína adaptadora de clatrina-2) y PICALM (Proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol). Las vesículas endocíticas brotan rápidamente, se recluta EEA1 (antígeno 1 asociado al endosoma temprano) y los endosomas experimentan una fusión homotípica	

mediada por Rab5. Los endosomas se acidifican debido a la actividad V-ATPasa (H⁺-ATPasa vacuolar), y un pH bajo promueve la descarga de hierro, mientras que la apo-Tf permanece unida a TfR1. El transportador de metal divalente-1 (DMT1) media la liberación de hierro al citoplasma. El reciclaje implica vías lentas (Rab4/Rab11) y rápidas (Rab4); D-AKAP2 (proteína 2 de anclaje de quinasa A de doble especificidad) regula el tráfico a través del compartimento de reciclaje endocítico hacia estas vías. Las nexinas de clasificación (SNX3 y SNX4) ayudan a dirigir el Tf-TfR1 complejo para volver a la superficie celular donde el complejo de exoquiste media la fusión. Sec15l1, un componente del exoquiste, ayuda a dirigir el reciclaje TfR1. (Wessling-Resnick, 2018). _____ 81

Figura 38 | Análisis de expresión de TRFC. Los rangos dinámicos de las células H69AR y MRC5 muestran la posición de la proteína TRFC; en las células tumorales (primer plano) TRFC se clasifica en el número 15, mientras que en las células normales (fondo) se clasifica en el número 725, la diferencia en abundancia fue un cambio de ≈ 33 veces (H69AR / MRC5). _____ 83

Figura 39 | Proteínas de membrana se sobreexpresadas en las células H69AR frente a las células de control MRC5. _____ 84

Figura 40 | Análisis por Westernblot de la abundancia del receptor de transferrina en células MRC5 y H69AR. TRFC está altamente regulado al alza en la línea celular H69AR, presentando un cambio diez veces más en comparación con la línea celular pulmonar normal. _____ 85

Figura 41 | Análisis de las líneas celulares control (MRC5) y tumoral (SCLC), por Citometría de Flujo. Para la identificación de dos diferentes receptores de membrana (TRFC= receptor tipo 1 de transferrina, IGFR= Receptor de Insulina), se usó un mix de anticuerpos. El gráfico de la fluorescencia media indica una señal TRFC (B- +) en un 86% y señal nula para FOLR. _ 86

Figura 42 | Análisis por citometría de Flujo de las líneas celulares control (MRC5) y tumoral (SCLC). La identificación de los receptores membrana se realizó con un mix de anticuerpos (TRFC= receptor tipo 1 de transferrina, IGFR= Receptor de Insulina), la fluorescencia media indica una señal TRFC (B-+) en un 87% con un 7% de doble señal, TRFC-IGFR (B ++). _____ 86

Figura 43 | Inmunofluorescencia indirecta del receptor TfR1. A) IF en células MRC5. B) IF en células de SCLC. Anticuerpo primario anti-CD71 a una dilución de 1:500, anticuerpo secundario anti-ratón-AF488, 1:750. _____ 87

Figura 44 | Electroforesis capilar en Agilent analyzer. Cuantificación de transferrina presente en el sobrenadante después de la funcionalización y separación de las nanopartículas. _____ 88

Figura 45 | Citometría de flujo para medir la internalización endocítica en células normales y SCLC. Las células MRC5 y H69AR se incubaron con Tf-AF488 (Tf) y CSNPs-Tf-AF488 (CSNP-Tf). Tf-AF488 se usó como control positivo para medir el valor máximo de fluorescencia de la endocitosis en ambas líneas celulares. Las células se incubaron a 37 °C para permitir la internalización de Tf-AF488 y el complejo CSNP en t = 0.5, 8 y 16 h. **(a.1)** Muestra blanco, **(a.2)** Perfiles representativos de t = 0.5 h y t = 16 h de internalización del complejo CSNP en una línea celular de control (MRC5); observamos que la fluorescencia (nivel de endocitosis) es la misma en los blancos y t = 0.5 y 16 h. **(b.1)** Muestra en blanco. **(b.2)** Perfiles representativos de t = 0.5 h y t = 16 h del complejo CSNP en la línea celular SCLC (H69AR), observamos que la fluorescencia (nivel de endocitosis) es diferente en el t = 0.5 y t = 16 h, en **(b.3)** el gráfico muestra el cambio del porcentaje controlado de fluorescencia media de

Tf-AF488 (barras negras) y el complejo CSNP (barras grises) frente al tiempo, la expresión de los datos como la media \pm SEM.	89
Figura 46 Efecto del irinotecán sobre las líneas celulares normal (MRC5) cancerosa (H69AR). La viabilidad fue determinada por MTT.	90
Figura 47 Efecto del carboplatino sobre la viabilidad celular en las líneas celulares MRC5 y H69AR. La viabilidad fue determinada por MTT.	91
Figura 48 Efecto de nanopartículas funcionalizadas con irinotecán sobre la viabilidad celular en las líneas celulares MRC5 y H69AR.	92
Figura 49 Resonancia magnética de imagen, ratón control.	93
Figura 50 Resonancia magnética de imagen, ratón con tumor inducido.	93

Índice de Tablas

Tabla 1 Resumen de estadísticas del cáncer en México, Globocan 2020 (IARC, 2020)	12
Tabla 2 Clasificación de tumores de pulmón según la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Travis et al., 2015)	13
Tabla 3 Características histológicas generales de tumores neuroendocrinos de pulmón (Araujo et al., 2019)	14
Tabla 4 Fármacos quimioterapéuticos aprobados por la FDA para el tratamiento de NSCLC (García-Fernández, Fornaguera, & Borrós, 2020)	20
Tabla 5 Nanoformulaciones en fases clínicas y aprobadas para el tratamiento de cáncer de pulmón (P. P. Nayak, Narayanan, Kaveri Badekila, & Kini, 2021)	26
Tabla 6 Proteínas up-regulated y exclusivas en células H69AR	63

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres con mayor incidencia en el ser humano a nivel mundial. En 2020 se estimaron 2.2 millones de casos y 1.8 millones de muertes (IARC, 2020). Dicha enfermedad está registrada mundialmente como el tipo de cáncer más común en los hombres (1.2 millones, 16.7% del total). La mortalidad por cáncer de pulmón en mujeres, ha experimentado un incremento significativo en los últimos años, con un crecimiento anual del 4,1% (Bray et al., 2018; Cabanes Domenech, Pérez-Gómez, Aragonés, Pollán, & López-Abente, 2009).

El cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos según el aspecto histológico: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, ~13 % de todos los casos) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, ~85 % de todos los casos). El SCLC es un tipo de cáncer de pulmón más agresivo, que tiene una supervivencia a los 5 años de ~7 % y se relaciona principalmente con el hábito de fumar (Mohammad Norouzi & Hardy, 2021).

La principal dificultad asociada con la detección del cáncer de pulmón es que los métodos de detección existentes, incluida la biopsia bronquial y la tomografía computarizada (TC), dependen en gran medida del tamaño del tumor y requieren equipo médico específico, lo que a menudo se asocia con costos elevados.

Existen procedimientos convencionales que se pueden utilizar contra diversos tipos de cáncer, como la quimioterapia o la radioterapia, pero se ven obstaculizados por los numerosos efectos secundarios. Desafortunadamente, el cáncer de pulmón se diagnostica en estadios avanzados, cuando involucran invasión tumoral local o metástasis a distancia, y no son tratables con cirugía (Sarkar et al., 2016; Thakur, 2019) debido a la falta de un diagnóstico en etapa temprana, principalmente por la ausencia de síntomas clínicos en los estadios iniciales. A causa de los muchos eventos adversos tanto del diagnóstico como de las terapias utilizadas, es imperativo desarrollar continuamente estrategias nuevas y mejoradas para tratar a las personas con cáncer (Lee, Loo, Traini, & Young, 2015).

Las nanopartículas y los materiales nanoestructurados tienen un papel importante en la nanobiomedicina debido a sus características y múltiples dominios de aplicación (Bayda, Adeel, Tuccinardi, Cordani, & Rizzolio, 2020; Jeevanandam, Barhoum, Chan, Dufresne, & Danquah, 2018).

La principal ventaja de la nanotecnología para el tratamiento del cáncer está asociada con la focalización en tumores, lo que implica la capacidad de diferenciar células malignas de células no malignas, por ejemplo una vez identificado qué receptor está sobreexpresado se podrá diseñar una orientación activa y erradicar las células tumorales de una manera específica (Crintea et al., 2021).

En esta investigación se plantea el uso de materiales a nanoescala, nanopartículas de magnetita (CoFe_2O_4) recubiertas con oro (magnetic core-shell NPs, mCSNPs), modificadas selectivamente en su superficie, después de identificar que la proteína sobre-expresada en membrana en el SCLC es el Receptor de transferrina tipo 1 (TfR1), y que el fármaco que tiene mayor efecto citotóxico en las células tumorales es el carboplatino.

CAPÍTULO 2

GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2.1. Cáncer

El cuerpo humano está constituido por trillones de células que contienen ácido desoxirribonucleico (ADN); estas células sufren un proceso de división, llamado ciclo celular, el cual es esencial para reemplazar las células desgastadas o dañadas en los distintos sistemas del organismo. Siempre que una célula sana se divide se generan dos células nuevas, cada una de éstas idéntica a la original. Este proceso de reproducción celular es absolutamente esencial para que todos los tejidos, órganos y los distintos sistemas del cuerpo humano tengan una operación correcta (Walker, 2006).

Normalmente, el comportamiento celular, especialmente la replicación y división de células, están regulados de una manera específica y sincronizada. La replicación de células sólo se puede llevar a cabo bajo condiciones concretas, como cuando el cuerpo necesita del crecimiento de un tejido o de la muerte celular (Pelengaris & Khan, 2006). Se debe tener claro que numerosos procesos reguladores deben llevarse a cabo para fomentar la proliferación celular. El primer mecanismo de señalización del crecimiento es la dependencia, en el cual la división celular se promueve por la presencia de factores de supervivencia y crecimiento tejido específico (Martin & Mulrooney, 2004). La **Figura 1** presenta la diferencia en la división celular de una célula normal y una cancerosa.

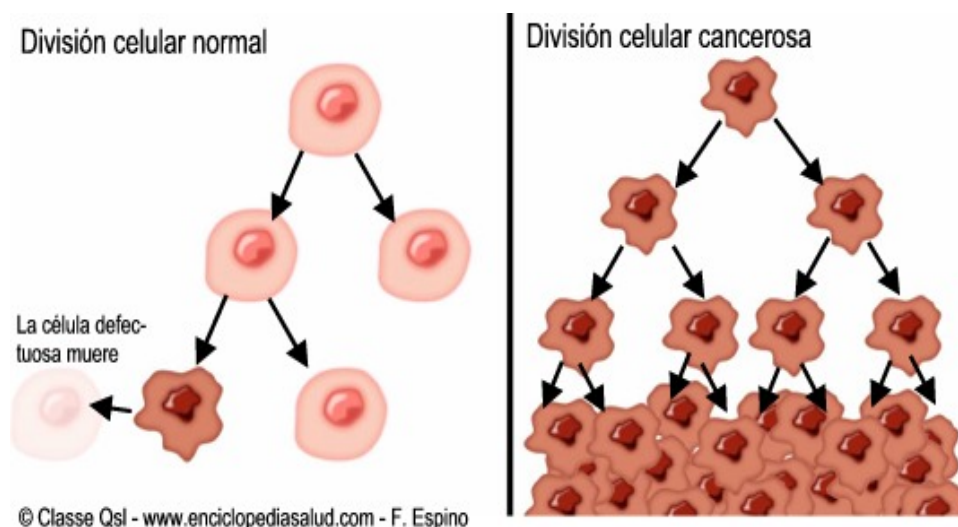


Figura 1 | Diferencia en la división celular de una célula normal y una cancerosa.

La división celular se controla por un equilibrio de dos tipos de genes: los que estimulan la proliferación celular (proto-oncogenes) y los que inhiben la división celular (genes supresores de tumores, TSGs) (Merkle & Loescher, 2005).

Los protooncogenes generalmente están involucrados en vías que promueven el crecimiento celular. Estos genes pueden hacer que las células normales se vuelvan cancerosas cuando son activadas por mutaciones o alteraciones. Las mutaciones en los protooncogenes suelen ser de naturaleza dominante, y las versiones mutadas de estos genes se conocen como oncogenes (McDuff & Turner, 2011).

Los TSG se consideran otro tipo de genes cruciales, que están involucrados en la reparación del daño del ADN, la inhibición de la división celular, la inducción de la apoptosis y la supresión de la metástasis. Por lo tanto, la pérdida de la función de los TSG daría lugar a la aparición y progresión del cáncer (W. Sun & Yang, 2010).

Los TSG se clasifican ampliamente en cinco tipos:

- 1) Genes que codifican proteínas intracelulares, que controlan la progresión hacia una etapa específica del ciclo celular (p. ej., pRB y p16) (Leiderman, Kiss, & Mukai, 2007).
- 2) Genes que codifican receptores o transductores de señales para hormonas secretadas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación celular (p. ej., factor de crecimiento transformante (p. ej. TGF- β) (A. L. Smith, Robin, & Ford, 2012).
- 3) Genes que codifican proteínas de puntos de control que desencadenan detención del ciclo en respuesta a daños en el ADN o defectos cromosómicos (p. ej., proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1 (BRCA1), p16 y p14) (Savage & Harkin, 2015).
- 4) Genes que codifican proteínas que inducen la apoptosis (p. ej., p53) (S. K. Nayak, Panesar, & Kumar, 2009).

- 5) Genes que codifican proteínas involucradas en la reparación de errores en el ADN (p. ej., p53 y proteína 2 de reparación de errores de emparejamiento de ADN (MSH2)) (L.-H. Wang, Wu, Rajasekaran, & Shin, 2018)

Desde el punto de vista molecular, el cáncer se inicia debido a la acumulación de alteraciones en estos genes que son esenciales para el control de la proliferación y la muerte celular.

En el año 2001, Hanahan y Weinberg postularon que la gran mayoría de los tipos de cáncer en humanos compartían alteraciones moleculares, bioquímicas y celulares. De tal forma que estos autores sugirieron que el fenotipo de una célula cancerígena se manifestaba por seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, que en conjunto podían dar lugar a un crecimiento maligno, que se caracteriza por presentar: capacidad de proliferar de una manera independiente mediante señales mitogénicas, insensibilidad a la señalización antiproliferativa, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y por último, invasión de tejidos circundantes, y capacidad de diseminación y metástasis. Posteriormente, estos autores propusieron dos nuevas alteraciones para el desarrollo de un tumor: la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular con el fin de sustentar de una manera eficaz la proliferación neoplásica, y la capacidad de las células tumorales de evadir al sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011). Recientemente Hanahan adicionó nuevas marcas emergentes y características habilitadoras (Hanahan, 2022), la **Figura 2** representa las propuestas realizadas por estos autores y las modificaciones hasta la actualidad. La naturaleza de estas alteraciones puede ser diversa, tratándose, entre otras, de mutaciones puntuales, cambios epigenéticos, amplificaciones, deleciones cromosómicas, translocaciones, pérdida de heterocigosidad y alteraciones en la regulación transcripcional, y cambios en los niveles de expresión génica (Díes López-Ayllón, 2013).

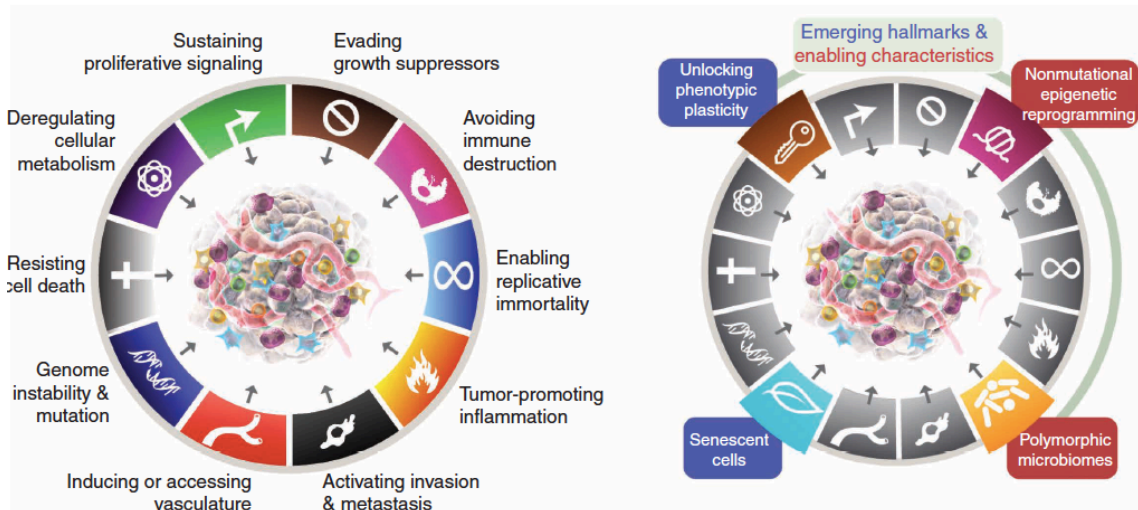


Figura 2 | Las alteraciones en el cáncer, Izquierda: propuesta de Hanahan y Weinberg (2011) y a la derecha: propuesta de Hanahan con 4 alteraciones adicionales (Hanahan, 2022).

Los tumores están clasificados en benignos y malignos. Un tumor benigno no significa una amenaza para la vida y no se expande a otras partes del cuerpo. Las células de los tumores malignos son cancerosas, crecen y tienen una tasa rápida de reproducción y son capaces de vivir más que las células normales. También son capaces de salir de su sitio de origen y viajar a otras partes del cuerpo, lo cual es llamado metástasis, así a menudo las células cancerosas toman una ruta rápida y directa hacia otros órganos por medio de su entrada al sistema sanguíneo (Roth, 2008).

El desarrollo de tumores secundarios en una parte del cuerpo diferente a la del cáncer primario original se denomina “metástasis”, a pesar de que la metástasis es la causa principal del fracaso de la terapia contra el cáncer y la mortalidad, sigue siendo poco conocido. En los pacientes con cáncer, diariamente se libera a la circulación una gran cantidad de células cancerosas; sin embargo, los estudios en modelos animales sugieren que <math><0.1\%</math> de las células tumorales hacen metástasis. El desarrollo de metástasis (**Figura 3**) requiere que las células cancerosas abandonen su sitio primario, circulen en el torrente sanguíneo, soporten la presión en los vasos sanguíneos, se aclimaten a un nuevo entorno celular en un sitio secundario y que escapen del combate mortal con las células inmunitarias (Maitra, 2019).

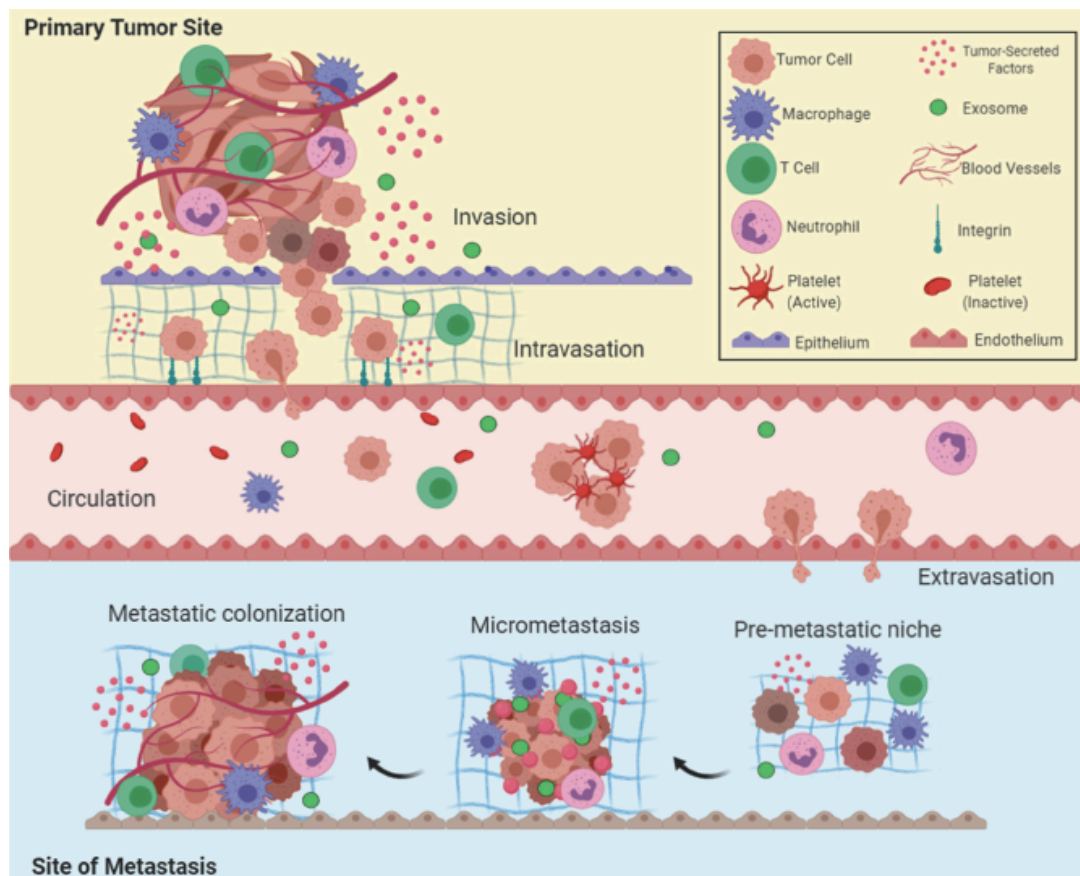


Figura 3 | Descripción general de la cascada metastásica: los cinco pasos clave de la metástasis incluyen invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización

La cascada de la metástasis es la consecuencia de la inestabilidad cromosómica provocada por errores continuos durante la mitosis (**Figura 4**). La activación de la invasión y la metástasis se desencadena por factores epigenéticos inducidos por estímulos ambientales, como el envejecimiento y las alteraciones circadianas; señales adhesivas de los componentes de la matriz extracelular (MEC), como el colágeno y la fibrina; presiones mecánicas de MEC, incluidas tensión y compresión; interacciones célula-célula; señales solubles, como factores de crecimiento y citocinas; y la microbiota intratumoral (Fares, Fares, Khachfe, Salhab, & Fares, 2020).

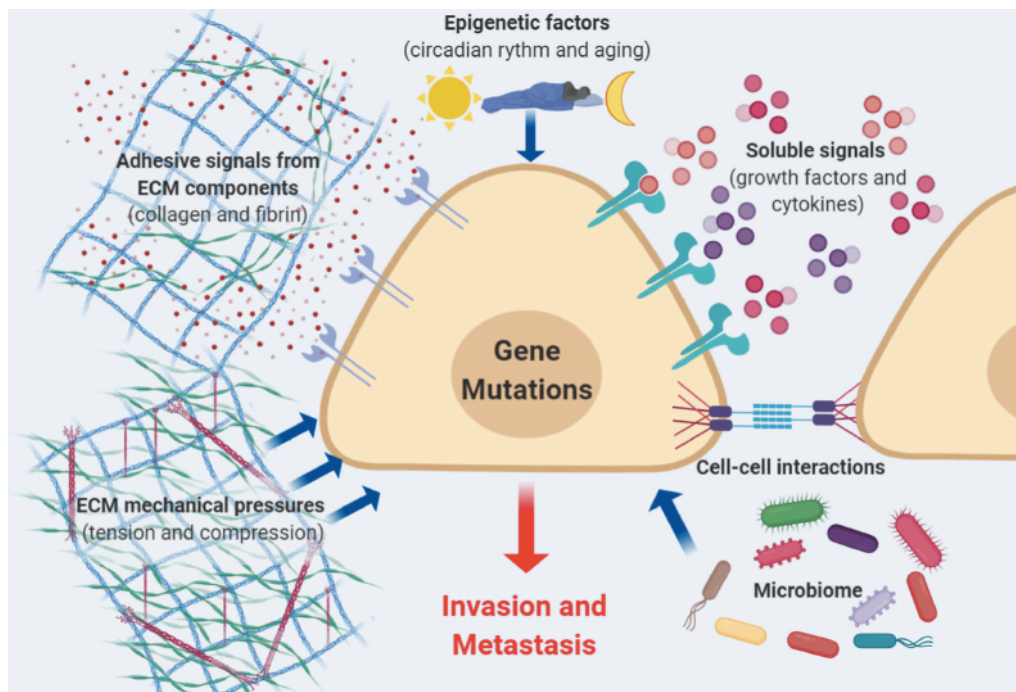


Figura 4 | Factores determinantes de la metástasis (Fares et al., 2020).

2.1.1. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el crecimiento descontrolado de células anormales en uno o ambos pulmones, estas células no llevan a cabo las funciones de las células pulmonares normales y no se desarrollan en tejido pulmonar sano; a medida que crecen las células anormales pueden formar tumores e interferir con el funcionamiento del pulmón, que es el que proporciona oxígeno a través de la sangre (CancerCare, 2016). En muchos de los casos el cáncer de pulmón comienza en el revestimiento celular de los bronquios, pero podría empezar en la tráquea, bronquiolos o alveolos. El tumor original que se forma en el pulmón por las células cancerosas es llamado tumor primario (Casado, 2008). Se origina a partir de un crecimiento agresivo y desordenado de células procedentes de estructuras broncopulmonares. Inicialmente, el tumor suele ser asintomático y a medida que aumenta de volumen, tiende a invadir otras estructuras del pulmón o de la vecindad como la pleura, los músculos, los ganglios y el corazón. Es por lo tanto, un tumor localmente muy agresivo, que puede producir a menudo metástasis a distancia. Es frecuente, en este tipo de cáncer, que la metástasis se produzca en huesos, cerebro e hígado, y agresivamente en otros lóbulos de los propios pulmones (Chiang & Massague, 2008), aunque se tiene claro que la metástasis puede aparecer en cualquier otro órgano.

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres con mayor incidencia en el ser humano a nivel mundial. En 2020 se estimaron 2.2 millones de casos y 1.8 millones de muertes (**Figura 5**). Dicha enfermedad está registrada mundialmente como el tipo de cáncer más común en los hombres (1.2 millones, 16.7% del total). La mortalidad por cáncer de pulmón en mujeres, ha experimentado un incremento significativo en los últimos años, con un crecimiento anual del 4,1% (Cabanes Domenech et al., 2009)(Jemal, Siegel, Xu, & Ward, 2010).

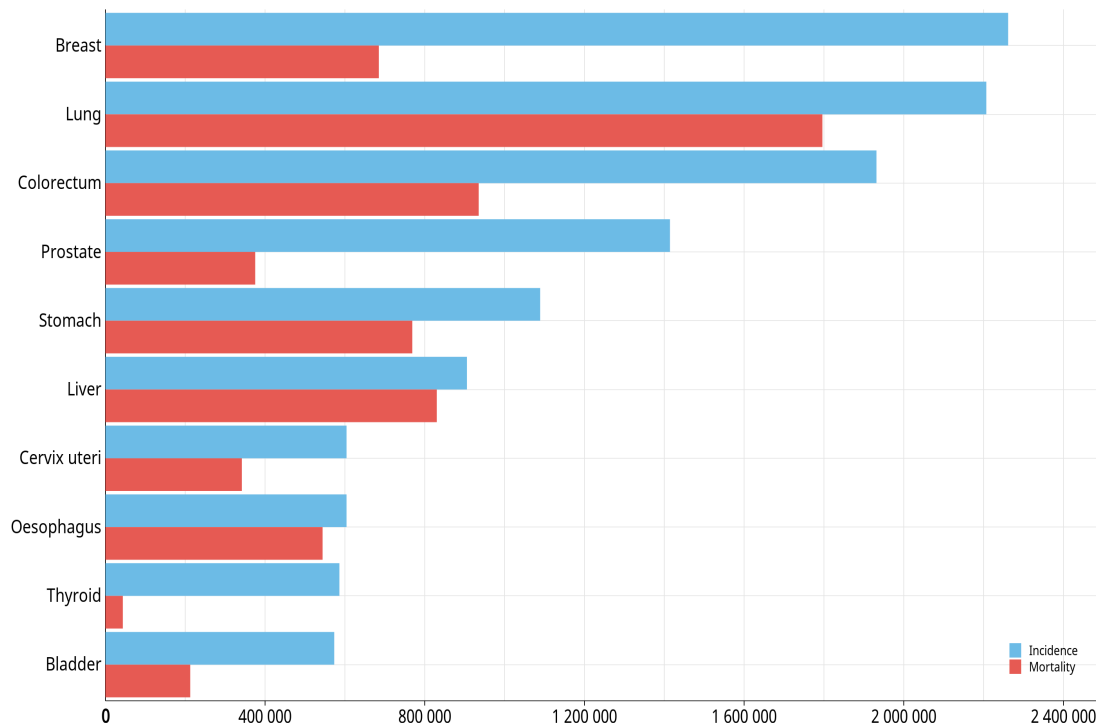


Figura 5 | Incidencia y mortalidad de Cáncer a nivel mundial, Globocan 2020.

En cuanto a las estadísticas registradas para México en 2020 (IARC, 2020) se tiene que hay una mayor ocurrencia de cáncer en las mujeres, tan sólo en 2020 hubieron 105 963 nuevos casos y 46 082 de muertes, también por arriba de los números en los hombres (**Tabla 1**). Se registró que el cáncer de pulmón es la cuarta principal causa de mortandad representando un 8% del total de muertes por cáncer en el 2020, aproximadamente 7100, es decir el 93% del total de los casos registrados ese año (**Figura 6**).

Tabla 1 | Resumen de estadísticas del cáncer en México, Globocan 2020 (IARC, 2020).

Summary statistic 2020			
	Males	Females	Both sexes
Population	63 071 486	65 861 267	128 932 753
Number of new cancer cases	89 536	105 963	195 499
Age-standardized incidence rate (World)	139.7	142.4	140.4
Risk of developing cancer before the age of 75 years (%)	14.7	14.1	14.3
Number of cancer deaths	44 140	46 082	90 222
Age-standardized mortality rate (World)	67.2	60.4	63.2
Risk of dying from cancer before the age of 75 years (%)	6.9	6.5	6.7
5-year prevalent cases	237 855	292 747	530 602
Top 5 most frequent cancers excluding non-melanoma skin cancer (ranked by cases)	Prostate Colorectum Stomach Lung Non-Hodgkin lymphoma	Breast Cervix uteri Thyroid Colorectum Corpus uteri	Breast Prostate Colorectum Thyroid Cervix uteri

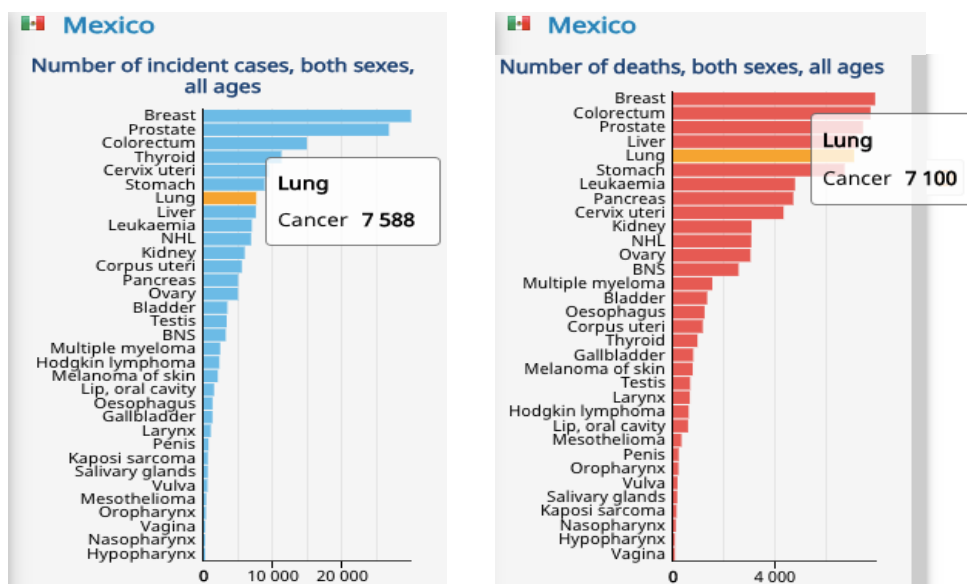


Figura 6 | Incidencia y mortalidad de cáncer en México, Globocan 2020 (IARC, 2020).

Del cáncer de pulmón existen varios tipos de que se pueden desarrollar en los pulmones y son clasificados por su apariencia y por sus características histológicas cuando son observados en el microscopio (Tabla 2/F8). Cada uno tiende a comportarse de diferente manera y ser generado por diferentes vías (Falk & Williams, 2009). La clasificación del cáncer de pulmón según la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye cuatro tipos histológicos principales: adenocarcinoma, carcinoma

de células escamosas, tumores neuroendocrinos y carcinoma de células grandes (Araujo et al., 2019). Estas clases se subdividen a su vez y además existen otros tumores pulmonares menos comunes, como el carcinoma sarcomatoide y carcinoide.

Tabla 2 | Clasificación de tumores de pulmón según la Organización Mundial de la Salud (WHO) (Travis et al., 2015).

Classification of Malignant Epithelial Tumors
Adenocarcinoma
Lepidic adenocarcinoma
Acinar adenocarcinoma
Papillary adenocarcinoma
Micropapillary adenocarcinoma
Solid adenocarcinoma
Invasive mucinous adenocarcinoma
Mixed invasive mucinous and Nonmucinous adenocarcinoma
Colloid adenocarcinoma
Fetal adenocarcinoma
Enteric adenocarcinoma
Minimally invasive adenocarcinoma
Nonmucinous
Mucinous
Preinvasive lesions
Atypical adenomatous hyperplasia
Adenocarcinoma in situ
Nonmucinous
Mucinous
Squamous cell carcinoma
Keratinizing squamous cell carcinoma
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma
Basaloid squamous cell carcinoma
Preinvasive lesion
Squamous cell carcinoma in situ
Neuroendocrine tumors
Small cell carcinoma
Combined small cell carcinoma
Large cell neuroendocrine carcinoma
Combined large cell neuroendocrine carcinoma
Carcinoid tumors
Typical carcinoid tumor
Atypical carcinoid tumor
Preinvasive lesion
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia
Large cell carcinoma

Se tiene especial interés en los tumores neuroendocrinos del pulmón que incluyen un espectro de lesiones desde las neoplasias pulmonares indolentes hasta las más agresivas. Los cuatro tumores neuroendocrinos principales del pulmón son el carcinoide típico (TC), el carcinoide atípico (AC), el carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC) y el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (**Tabla 3**). Las principales características histopatológicas distintivas de estos tumores incluyen la presencia de características morfológicas neuroendocrinas en combinación con evidencia inmunohistoquímica de diferenciación neuroendocrina (expresión de marcadores neuroendocrinos). En general, es útil pensar en estos tumores según sus características clínicas. Los tumores carcinoideos tienden a ocurrir

en no fumadores más jóvenes y son menos agresivos, mientras que SCLC y LCNEC ocurren en fumadores y se comportan de manera agresiva.

Tabla 3 | Características histológicas generales de tumores neuroendocrinos de pulmón (Araujo et al., 2019).

Diagnosis	Morphologic Features	Mitotic Count Per Square Millimeter
Typical carcinoid tumor	Neuroendocrine morphologic features, minimal cytologic atypia	<2
Atypical carcinoid tumor	Neuroendocrine morphologic features with or without focal necrosis	2–10
Large cell neuroendocrine carcinoma	High-grade neuroendocrine carcinoma—larger cells with prominent nucleoli	>10
Small cell carcinoma	High-grade neuroendocrine carcinoma—smaller cells with inconspicuous nucleoli	>10

Para fines clínicos histológicos, las clases se agrupan en dos categorías principales de cáncer de pulmón dependiendo de su morfología celular: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (**Figura 7**) (Bade & Dela Cruz, 2020; Dela Cruz, Tanoue, & Matthay, 2011). SCLC incluye una categoría llamada carcinoma de células pequeñas combinadas. NSCLC incluye carcinoma de células escamosas (SCC), carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma (Franklin, Noguchi, & Gonzalez, 2010). El carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se considera un tipo de cáncer agresivo, pero palidece en sí, en comparación con el SCLC en términos de agresividad (Inamura, 2017; Wu, Ruan, Yang, & Mei, 2017).

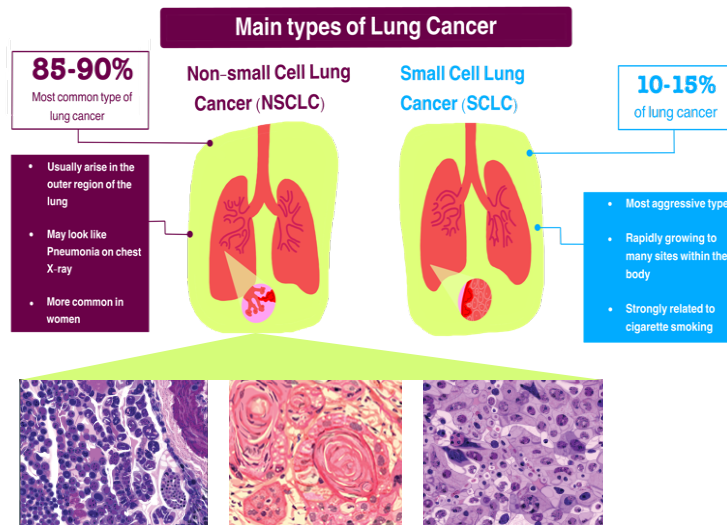


Figura 7 | Clasificación principal del cáncer de pulmón.

El diagnóstico de cáncer de pulmón se puede hacer en base a muestras de tejido, como muestras de biopsia endobronquial y transbronquial o muestras resecaadas. También se realiza mediante la evaluación de muestras citológicas de procedimientos como la aspiración con aguja fina (FNA) transbronquial o transtorácica, cepillados y lavados bronquiales o broncoalveolar, y el lavado o evaluación de esputo o líquido pleural. El éxito del diagnóstico depende de varios factores que incluyen la ubicación (accesibilidad), el tamaño, el tipo de tumor y los aspectos técnicos del procedimiento de diagnóstico, incluido el nivel de experiencia del broncoscopista y el patólogo (Ehya & Young, 2003). En general, las lesiones centrales como los carcinomas de células escamosas y SCLC, o lesiones endobronquiales como los tumores carcinoides, se diagnostican más fácilmente con un examen broncoscópico, mientras que las lesiones periféricas como los adenocarcinomas y los carcinomas de células grandes son más susceptibles a la FNA transtorácica o a la biopsia (Araujo et al., 2019).

2.1.1.1. Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

Dentro del NSCLC se encuentran tres tipos de tumores: Adenocarcinoma, Carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinomas de células grandes. Aproximadamente el 75%-80% de todos los cánceres de pulmón son NSCLC (Franklin et al., 2010). Aunque los subtipos pueden diferir de la incidencia según el sexo, la raza y la edad, se agrupan debido a las similitudes en curso y respuesta al tratamiento.

SCC surge con más frecuencia en los bronquios segmentarios proximales y se asocia con metaplasia escamosa; los tumores se componen de capas de células epiteliales, que pueden ser mal o bien diferenciados. SCC puede ser detectado por examen citológico de las células exfoliadas en su forma más temprana, carcinoma *in situ*, donde el epitelio escamoso estratificado se reemplaza con células escamosas malignas. Si no se controla, el tumor finalmente invade y obstruye el lumen bronquial.

SCC tiende a ser de crecimiento lento y puede tardar años en desarrollarse a partir de un carcinoma *in situ* a un tumor clínicamente evidente (Franklin et al., 2010). El adenocarcinoma es la forma más común de cáncer de pulmón, lo que representa casi el 40% de todos los cánceres de pulmón (Franklin et al., 2010). Este tipo de cáncer se presenta como un tumor periférico, que surge de la superficie del epitelio alveolar o las glándulas mucosas bronquiales; también puede surgir de áreas de infecciones o cicatrices anteriores. Los tumores de adenocarcinoma producen mucina y forman glándulas. El carcinoma broncoalveolar es una subclasificación del adenocarcinoma que parece tener propiedades clínicas y patológicas distintas (Franklin et al., 2010).

Los estadios de este tipo de cáncer de pulmón son: I, donde el cáncer es localizado solamente en los pulmones sin haberse propagado a los nódulos linfáticos; II, el cáncer está en el pulmón y cercano a los nódulos linfáticos; III, el cáncer está en el pulmón y en los ganglios linfáticos a mitad del pecho. Se presentan dos subtipos IIIA, que es cuando el cáncer se ha propagado solamente a los ganglios linfáticos en el mismo sitio del pecho donde se ha iniciado el cáncer y el subtipo IIIB, que es cuando se ha propagado a los ganglios linfáticos en el lado opuesto del pecho o por encima de la clavícula. El estadio IV es el estado más avanzado, es cuando el cáncer de pulmón se ha propagado a ambos pulmones, al área fluida alrededor de los ellos y a otras partes del cuerpo, a otros órganos (NCCN, 2013).

2.1.1.2. Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)

SCLC es un tumor maligno epitelial de tipo neuroendocrino que consiste en células pequeñas y ovaladas, con escaso citoplasma, bordes celulares mal definidos, cromatina finamente granular y nucléolos ausentes o poco visibles (**Figura 8**). Se clasifica como un tumor de carcinoma neuroendocrino de alto grado que se produce habitualmente en las vías respiratorias centrales. (Houlihan & Paolilli, 2004)

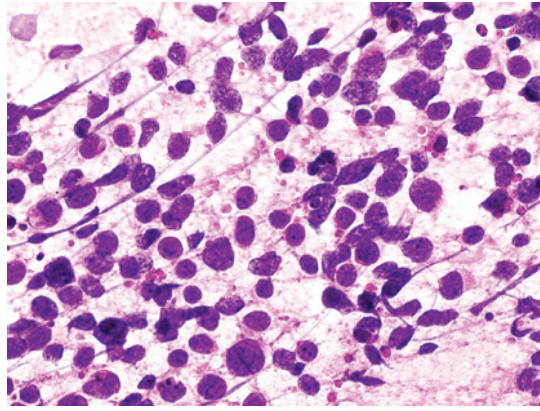


Figura 8 | Carcinoma de células pequeñas. En la evaluación citológica (tinción de hematoxilina-eosina), son evidentes las características nucleares (patrón de cromatina en “sal y pimienta”) y citoplasma escaso.

El SCLC está caracterizado por un tiempo de duplicación rápido, tasa alta de crecimiento y el desarrollo precoz de metástasis, aunque la mayoría de los SCLC se generan en el pulmón pueden expandirse a sitios extra pulmonares, presentando un comportamiento biológico y clínico similar (NCCN, 2013).

SCLC es menos común que el NSCLC, representa el 15% de los cánceres de pulmón. La clasificación de la OMS de SCLC incluye una variante conocida como carcinoma de células pequeñas combinado, que se define como un carcinoma de células pequeñas con un componente de cualquier subtipo histológico de NSCLC. Entre los subtipos de cáncer de pulmón, la más alta asociación entre el grado de exposición al tabaco y el riesgo se produce en el SCLC y SCC (Franklin et al., 2010).

Los tumores primarios de SCLC tienden a estar ubicados en el centro y típicamente se presenta como una larga masa hiliar y mediastinal voluminosa que causa tos y disnea, los pacientes presentan con frecuencia síntomas de la enfermedad metastásica generalizada como pérdida de peso, debilidad, dolor de huesos y sistema neurológico comprometido (NCCN, 2013). Existen dos estadios en esta clasificación: estadio limitado, que es cuando el cáncer está sólo en un sitio del pecho, envolviendo una parte del pulmón y cercano a los ganglios linfáticos; el estadio extensivo, se refiere a que el cáncer se ha propagado a otras regiones del pecho y a otros órganos del cuerpo (CancerCare, 2016). Los sitios comunes de diseminación metastásica incluyen la diseminación linfática a los ganglios linfáticos hiliares y mediastínicos y la diseminación hematogena al pulmón contralateral, el cerebro, el hígado, las glándulas suprarrenales y los huesos (**Figura 9**). Las células tumorales circulantes son comunes

en pacientes con SCLC y se encuentran tanto como células aisladas como en pequeños grupos (Rudin, Brambilla, Faivre-Finn, & Sage, 2021).

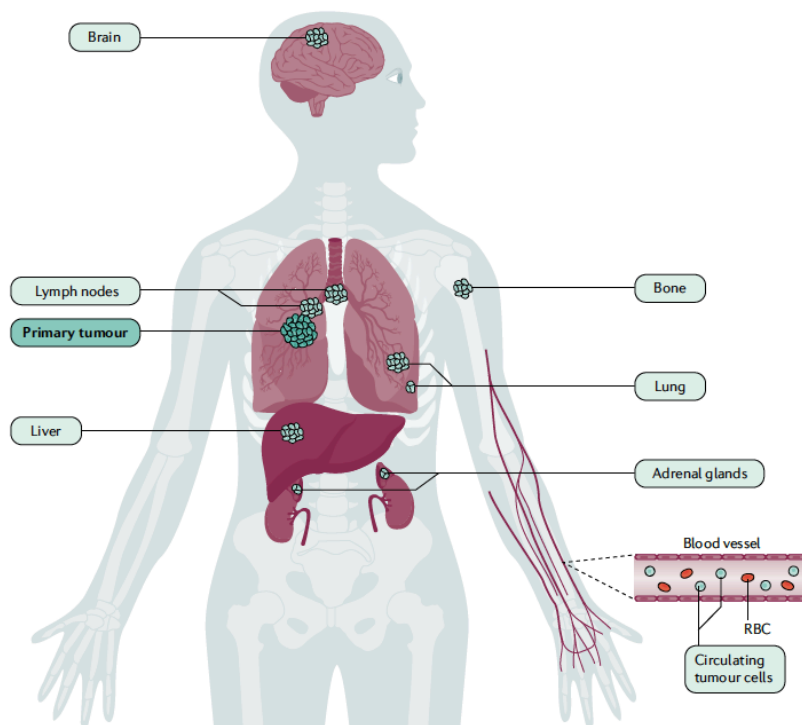


Figura 9 | Sitios comunes de metástasis en SCLC (Rudin et al., 2021).

SCLC es altamente sensible a la quimio y radioterapia, no obstante, la mayoría de los pacientes mueren por enfermedades recurrentes. En los pacientes en estadio limitado, el objetivo del tratamiento es curar mediante quimioterapia más radioterapia torácica. En los pacientes con SCLC de estadio extensivo la quimioterapia sólo puede aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia que resulta muy baja.

SCLC es una enfermedad agresiva, en estadio limitado es más curable que la enfermedad en estadio extenso. Antes del uso de la quimioterapia, los pacientes diagnosticados con la enfermedad en estadio limitado sobrevivieron unos tres meses. La media de supervivencia con la quimioterapia es de 10-14 meses, con una supervivencia a los cinco años del 10% (Huang, Shepherd, & Kelly, 2010). SCLC exhibe un alto grado de diferenciación neuroendocrina con la expresión de una amplia variedad de neuropéptidos y receptores de neuropéptidos, varios de éstos tienen potencial mitogénico y se han demostrado ser mediadores de la proliferación de SCLC (Adams, Tyson, & Ginex, 2004).

2.1.2. Tratamientos convencionales

Las opciones de tratamiento para el cáncer de pulmón generalmente incluyen resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia y terapia dirigida. La resección quirúrgica del tumor es la modalidad terapéutica más efectiva y se usa a menudo en los NSCLC en estadio I y II como lobectomía o neumonectomía. Sin embargo, en estadios avanzados y en presencia de diseminación metastásica de cáncer de pulmón (CPNM en estadios III y VI; y SCLC cuando el cáncer no se encuentra en estadios muy tempranos), la resección del tumor es a menudo limitada.

Desafortunadamente, el cáncer de pulmón se diagnostica frecuentemente en el estadio III o IV, o incluso más tarde, debido a la ausencia de síntomas clínicos en los estadios iniciales. Los cánceres de pulmón que se detectan en etapas avanzadas con invasión tumoral local o metástasis a distancia, no son tratables con cirugía (Sarkar et al., 2016; Thakur, 2019). Por lo tanto, es necesario monitorear continuamente a esos pacientes en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. En estadios avanzados aparecen tos continua, dolor torácico o pérdida de peso, reduciendo considerablemente la calidad y esperanza de vida del paciente (Gridelli et al., 2015; Peters et al., 2012; Silvestri et al., 2013).

La quimioterapia y la radioterapia son modalidades terapéuticas esenciales, ya sea como terapias neoadyuvantes para mejorar la resecabilidad del tumor o terapias adyuvantes para pacientes que se sometieron a una resección quirúrgica o también para aquellos que no son elegibles para ella. La quimioterapia basada en platino (como cisplatino y carboplatino) se considera el tratamiento estándar para el NSCLC avanzado (**Tabla 4**) y a menudo, se combina con taxanos (como paclitaxel [PTX] o docetaxel) o gemcitabina (Hussain, 2016). De manera similar, la quimioterapia estándar para SCLC incluye un agente basado en platino más etopósido (A. Sun et al., 2019). Las combinaciones de quimioterapia basada en platino con terapia dirigida (como los inhibidores de la tirosina cinasa: gefitinib, erlotinib y afatinib dirigidos a EGFR; crizotinib y ceritinib dirigidos a ALK; o bevacizumab dirigidos a VEGF) han mostrado beneficios terapéuticos adicionales en términos de mejora de la supervivencia libre de progresión (PFS) y tasa de respuesta (Bahman, Elkaissi, Greish, & Taurin, 2019). Además, la inmunoterapia ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento del NSCLC, lo que llevó a la aprobación por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de nivolumab y

pembrolizumab, que se dirigen a la muerte programada 1 (PD-1) y mejoran la supervivencia de los pacientes con NSCLC avanzado que han llevado quimioterapia anteriormente (Sul et al., 2016).

Tabla 4 | Fármacos quimioterapéuticos aprobados por la FDA para el tratamiento de NSCLC (García-Fernández et al., 2020)

Generic Name (Brand Name)	Mechanism of Action
Carboplatin (Paraplatin®)	Alkylating agent
Docetaxel (Taxotere®)	Mitotic inhibitor
Doxorubicin Hydrochloride (Adryamycin®, Rubex®)	Topoisomerase inhibitor
Gemcitabine Hydrochloride (Gemzar®)	Antimetabolite
Lurtotecan (OSI-211)	Topoisomerase inhibitor
Mechlorethamine Hydrochloride (Mustargen®)	Alkylating agent
Methotrexate (Trexall™, Rheumatrex®)	Antimetabolite
Paclitaxel (Taxol®)	Mitotic inhibitor
Paclitaxel–Albumin-stabilized Nanoparticle Formulation (Abraxane®)	Mitotic inhibitor
Pemetrexed Disodium (Alimta®)	Antimetabolite
Vinorelbine Tartrate (Navelbine®)	Tubuline-binding agent

No obstante, la quimioterapia normalmente se enfrenta a varios desafíos, incluida la baja solubilidad acuosa, la vida media corta, la eliminación rápida y la distribución inespecífica de los agentes quimioterapéuticos ya que afectan indiscriminadamente a las células cancerosas, así como a los tejidos sanos (Baskar, Ann-Lee, Yeo, & Yeoh, 2012; Baskar, Dai, Wenlong, Yeo, & Yeoh, 2014), además de su amplia toxicidad sistémica y efectos adversos (M. Norouzi, Nazari, & Miller, 2017; Mohammad Norouzi, 2018; Mohammad Norouzi, Nazari, & Miller, 2016; Mohammad Norouzi, Yathindranath, Thliveris, & Miller, 2020). En este contexto, la quimioterapia y radioterapia a menudo se asocia con efectos secundarios adversos sistémicos que incluyen neuropatía periférica, nefrotoxicidad y mielosupresión, como anemia, neutropenia, náuseas, diarrea y otros síntomas gastrointestinales, y para reducir la gravedad y frecuencia de estos eventos se requiere la ingesta adicional de drogas (Macdonald, 2009). Por lo tanto, para limitar la toxicidad fuera del objetivo a niveles tolerables, las dosis quimioterapéuticas administradas deben limitarse, lo que da como resultado una eficacia terapéutica sub-óptima en pacientes con cáncer de pulmón (Hanada et al., 2010). Además, la sobreexpresión del miembro 1 de la subfamilia B del cassette de unión a ATP (ABCB1) (también conocida como glicoproteína P (P-gp)) y la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MRP1) conduce a la resistencia a los fármacos en las células de cáncer de pulmón, que es un factor importante que contribuye al fracaso de la quimioterapia y la terapia dirigida (Berger et al., 2005; Wangari-Talbot & Hopper-Borge, 2013).

2.2. Nanomedicina y nanopartículas

La nanotecnología generalmente tiene el potencial de proporcionar soluciones novedosas y de cambio de paradigma a los problemas médicos actuales. Se han explorado en las últimas décadas estrategias específicas que prometen ser efectivas para las terapias anticancerígenas que tienen la habilidad de superar las limitaciones comunes de los tratamientos tradicionales (quimioterapia, radioterapia y cirugía), la nano medicina es la principal (Farrell, Ptak, Panaro, & Grodzinski, 2011; T Lammers, Hennink, & Storm, 2008; Twan Lammers, Kiessling, Hennink, & Storm, 2012). En el ámbito de la oncología, la nanotecnología puede permitir la administración dirigida de agentes de imágenes para diagnóstico y terapias a tejidos cancerosos, terapia fotodinámica, hipertermia local mejorada y radioterapia (**Figura 10**) (Farrell et al., 2010; Mohammad Norouzi, 2020). En este contexto, para abordar los resultados curativos óptimos, en particular en la enfermedad metastásica, y para desarrollar modalidades terapéuticas más eficaces con una toxicidad sistémica reducida y una farmacocinética mejorada, la nanomedicina ha atraído mucho la atención recientemente en el tratamiento de muchos tipos de cáncer.

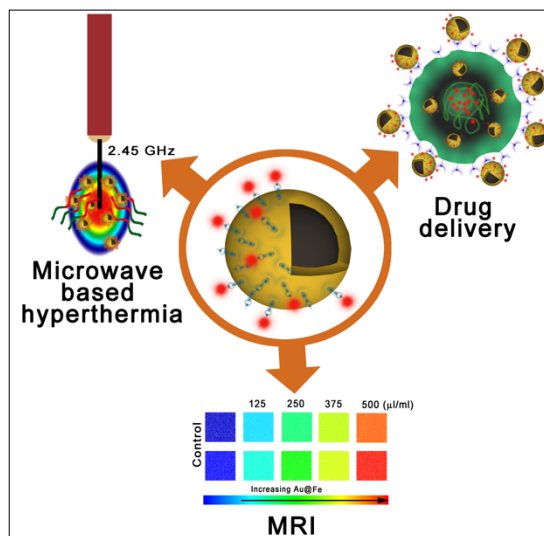


Figura 10 | Diferencias entre la orientación pasiva y activa de las nanopartículas.

Las nanopartículas (NPs), de acuerdo a la American Society for Testing and Materials (ASTM) son partículas con medidas que van desde 1 a 100 nm en dos o tres dimensiones (ASTM, 2006). Las nanopartículas como vehículos de administración de moléculas terapéuticas tienen varias ventajas sobre la administración sistémica convencional, como:

- (i) mejorar la farmacocinética al extender el tiempo de circulación de las moléculas terapéuticas y superar su solubilidad acuosa limitada, al tiempo que las protegen de la inactivación temprana o la biodegradación (Bernabeu, Cagel, Lagomarsino, Moretton, & Chiappetta, 2017).
- (ii) entregar dosis más altas de moléculas terapéuticas a la zona del tumor a través de mecanismos de focalización pasiva o activa (Gabizon, Shmeeda, & Barenholz, 2003),
- (iii) entrega de múltiples moléculas terapéuticas para efectos sinérgicos en una sola plataforma (Tzogani et al., 2020), y
- (iv) superar la resistencia a múltiples fármacos y la acción del transportador de flujo a través de la internalización mediada endocitosis (Yuan et al., 2016).

Los aspectos más vitales de la nanotecnología son el desarrollo de un método de síntesis adecuado que pueda reducir la toxicidad, las modificaciones de la superficie y el diseño terapéutico de la formulación ya que estos agentes poseerán un uso crucial como herramientas terapéuticas y de diagnóstico (Baetke, Lammers, & Kiessling, 2015; Zhang, Liu, Shen, & Gurunathan, 2016). Las nanopartículas se pueden clasificar según su tamaño, morfología y carga superficial utilizando técnicas microscópicas avanzada (Baer et al., 2013; Sundar, Kundu, & Kundu, 2010). En particular, el tamaño de las nanopartículas tiene un efecto fundamental en la liberación del fármaco: poseen una mayor relación superficie/masa que otros compuestos, lo que significa una capacidad mejorada para unir, absorber y transportar agentes terapéuticos (Caldorera-Moore, Guimard, Shi, & Roy, 2010). Debido a su tamaño, geometría y gran área de superficie, las nanopartículas cargadas de fármacos pueden atravesar la barrera hematoencefálica y su capacidad para ingresar al sistema pulmonar o ser absorbida es muy alta (Jain & Thareja, 2019; Mourdikoudis, Pallares, & Thanh, 2018). Las NPs de metales nobles y más específicamente las nanopartículas de Oro (GNPs) han sido de interés para la comunidad científica debido a que exhiben propiedades físico-químicas únicas como la de unirse a grupos aminos y tioles, permitiendo la funcionalización en su superficie para su aplicación biomédica (Shukla et al., 2005; Valenzuela, 2013). Las modificaciones superficiales de las nanopartículas también son un aspecto vital ya que permiten la orientación de fármacos en términos de adhesión e invasión celular y transporte celular. Los propósitos de anclar medicamentos a las nanopartículas son una mejor administración en los tejidos de interés y absorción por las células y/o una reducción de la citotoxicidad a través de

una liberación controlada (Gheorghe, Niculescu, Bîrcă, & Grumezescu, 2021). El acoplamiento de distintas proteínas, como los anticuerpos, a la superficie de las nanopartículas (**Figura 11**) puede permitir un direccionamiento inmunológico más específico de las partículas a ciertas células u órganos (Bertrand, Wu, Xu, Kamaly, & Farokhzad, 2014). Después de que las nanopartículas ingresan al cuerpo humano a través de la circulación sistémica, se produce una interacción partícula-proteína (Hoet, Brüske-Hohlfeld, & Salata, 2004).

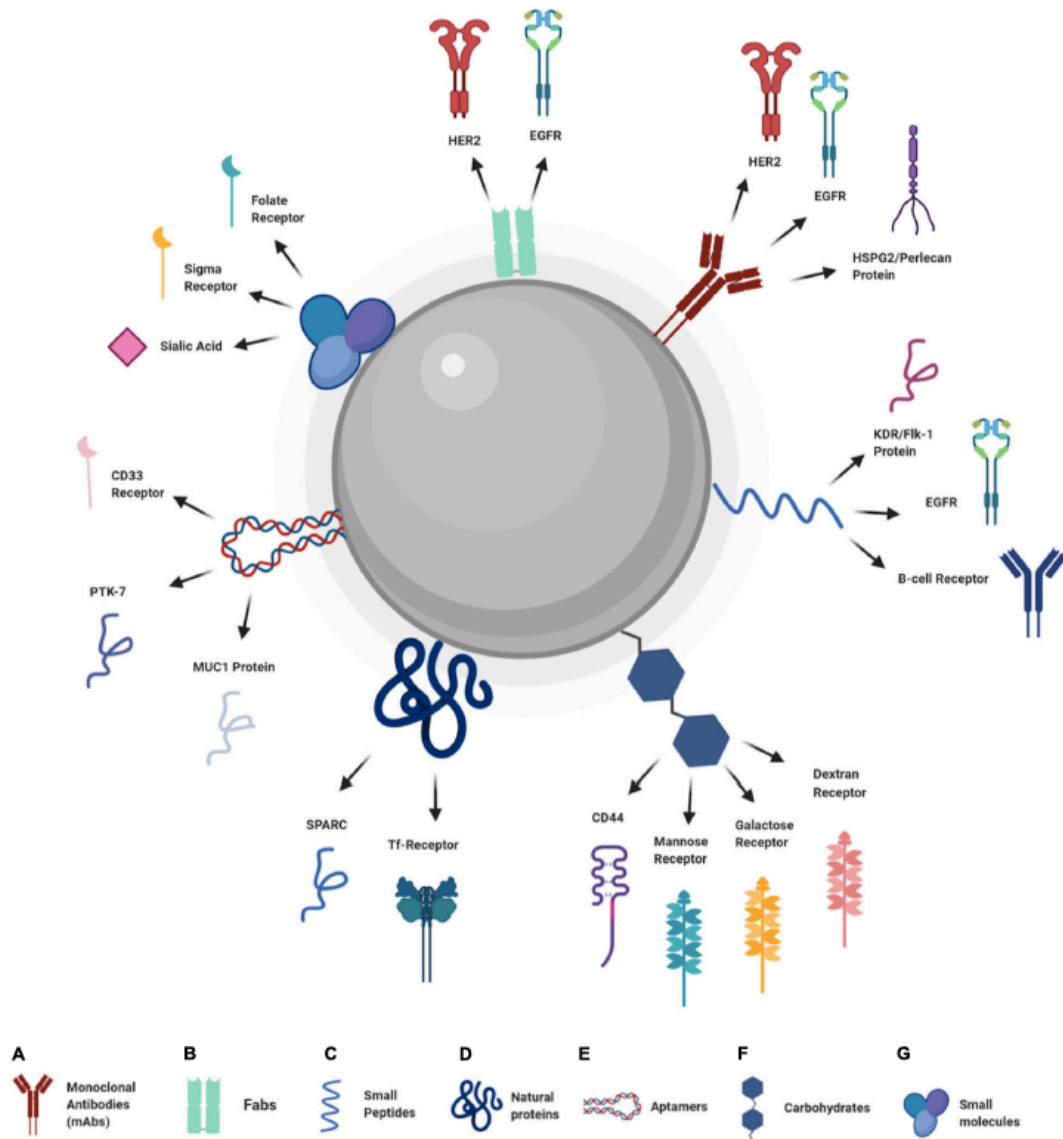


Figura 11 | Estrategias de funcionalización de nanopartículas (Sanità, Carrese, & Lamberti, 2020).

La acumulación de nanopartículas en la zona tumoral está mediada principalmente por mecanismos de direccionamiento pasivos y activos (**Figura 12**). En la orientación pasiva, los tamaños pequeños de las nanopartículas les permiten acumularse

específicamente en los sitios del tumor a través de la vasculatura deficiente del tumor, conocido como Efecto de Retención y Permeabilidad mejorada (EPR) (Morales-Cruz et al., 2019). El efecto EPR generalmente se aplica a partículas menores de 200 nm (Jasim, Abdelghany, & Greish, 2017; Mohammad Norouzi et al., 2020). Además, la acumulación de nanopartículas en los sitios del tumor se puede atribuir a sus interacciones con los macrófagos asociados al tumor, lo que mejora su captación intratumoral (Belgiovine, D'Incalci, Allavena, & Frapolli, 2016). En la orientación activa, los ligandos de alta afinidad con la capacidad de unirse a los receptores sobreexpresados por las células cancerosas se decoran en las superficies de las nanopartículas que se dirigen tanto a las células tumorales como a las lesiones metastásicas (Engelberg, Netzer, Assaraf, & Livney, 2019).

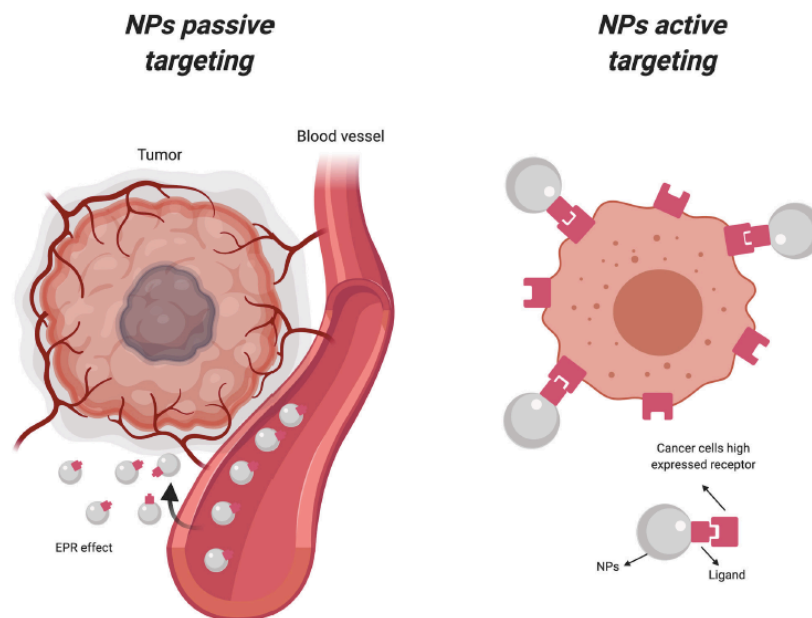


Figura 12 | Diferencias entre la orientación pasiva y activa de las nanopartículas (Sanità et al., 2020).

De igual forma las GNPs se consideran una excelente opción para inducir muerte celular o apoptosis por su capacidad de generar hipertermia en los tejidos, esto se lleva a cabo aprovechando sus cualidades metálicas. Cuando se aplica a GNPs una fuente de energía como un laser que produce radiación electromagnética no ionizante, se tiende a una generación de calor debido a la excitación y relajación de los electrones (Cherukuri & Curley, 2010), esto a su vez lleva a una mayor elevación de la temperatura y por lo tanto se logra un daño irreversible en los tejidos tumorales, es decir, se tiene disminución del tumor (Stern et al., 2007). No obstante, aun existe varios aspectos por elucidar en el campo de la nano medicina, esencialmente aquéllos

relacionados con los impactos clínicos que pueda tener el uso de las NPs en la terapia contra el cáncer.

Se han desarrollado y probado una amplia variedad de nanoformulaciones como agentes terapéuticos potenciales para el cáncer de pulmón en estudios preclínicos. Sin embargo, solo muy pocas de las nanoformulaciones se tradujeron con éxito en aplicaciones clínicas (P. P. Nayak et al., 2021).

La administración de nanoformulaciones para el cáncer de pulmón generalmente sigue las vías de inhalación parenteral, oral, intraocular, transdérmica o pulmonar (Azarmi, Roa, & Löbenberg, 2008). Sin embargo, se ha preferido una infusión intravenosa (administración parenteral) en la mayoría de los tratamientos. DOTAP desarrollado por Genprex se administró de manera segura por vía intravenosa en pacientes con cáncer de pulmón tratados previamente con quimioterapia basada en platino (C. Lu et al., 2012).

DOTAP es un complejo de colesterol y liposomas que transfiere un gen supresor de tumores llamado TUSC2 (Fus1), que evita que el tejido forme células cancerosas. DOTAP está actualmente completando un ensayo clínico de fase I para el tratamiento de pacientes con NSCLC. Otro ejemplo de nanoformulación administrada por vía intravenosa en el cáncer de pulmón es el TargomiRs (EnGeneIC) (Reid et al., 2013). Los TargomiR son minicélulas bacterianas no vivas que contienen un micro ARN (miARN) mimético basado en miR-16 dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que se expresa en las células cancerosas. Ha completado el ensayo clínico de fase I en pacientes con mesotelioma pleural maligno recurrente (van Zandwijk et al., 2017). En consecuencia, también se han desarrollado y probado nanoformulaciones de cisplatino, camptotecina y docetaxel para el tratamiento del cáncer de pulmón. Algunas de ellas han completado los ensayos clínicos de fase I y fase II que se describen en la Tabla 5.

Tabla 5 | Nanoformulaciones en fases clínicas y aprobadas para el tratamiento de cáncer de pulmón (P. P. Nayak et al., 2021).

Name	Formulation	Therapeutic application	Clinical stage
TargomiRs (EnGeneIC)	Mir-16-based miRNA mimic	Recurrent malignant pleural mesothelioma and NSCLC	Phase I
DOTAP (Genprex Inc.)	Cholesterol NPs encapsulating gene TUSC2	NSCLC	Phase I
XMT-1001 (Mersana Therapeutics)	Polymer-camptothecin	SCLC and NSCLC	Phase I
OSI-211 (Canadian Cancer Trials Group)	Liposomal lurtotecan	Advanced or metastatic lung cancer	Phase I
DNIB0600A (Genentech)	Ab-MMAE conjugate	NSCLC	Phase I
NKTR-102 (Nektar Therapeutics)	PEG-irinotecan	Relapsed SCLC	Phase II
BIND-014 (BIND Therapeutics)	Docetaxel NPs	NSCLC	Phase II
CRLX101 (NewLink Genetics Corporation)	Camptothecin-cyclodextrin PEG	Relapsed/refractory SCLC	Phase I/II
NC-6004 (Nanocarrier Co.)	Nanoparticle cisplatin	NSCLC	Phase I/II
Doxil (Johnson & Johnson)	Liposomal doxorubicin	Advanced NSCLC	Phase II
MM-398 (Merrimack Pharmaceuticals)	Liposomal irinotecan	SCLC	Phase I/III
Genexol-PM (Samyang Biopharmaceuticals Corporation)	Paclitaxel loaded polymeric micelle	Advanced NSCLC	Approved (FDA: 2007)
Abraxane (Celgene)	Albumin-bound paclitaxel	Squamous cell NSCLC	Approved (FDA: 2012)

CAPÍTULO 3

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- **¿Las nanopartículas funcionalizadas para una molécula blanco adecuada y con un fármaco quimioterapéutico puede servir como método de tratamiento para el SCLC?**
- **¿Cuál es la molécula blanco en el SCLC?**
- **¿Qué fármaco podría ser efectivo para atacar efectivamente las células del SCLC?**

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

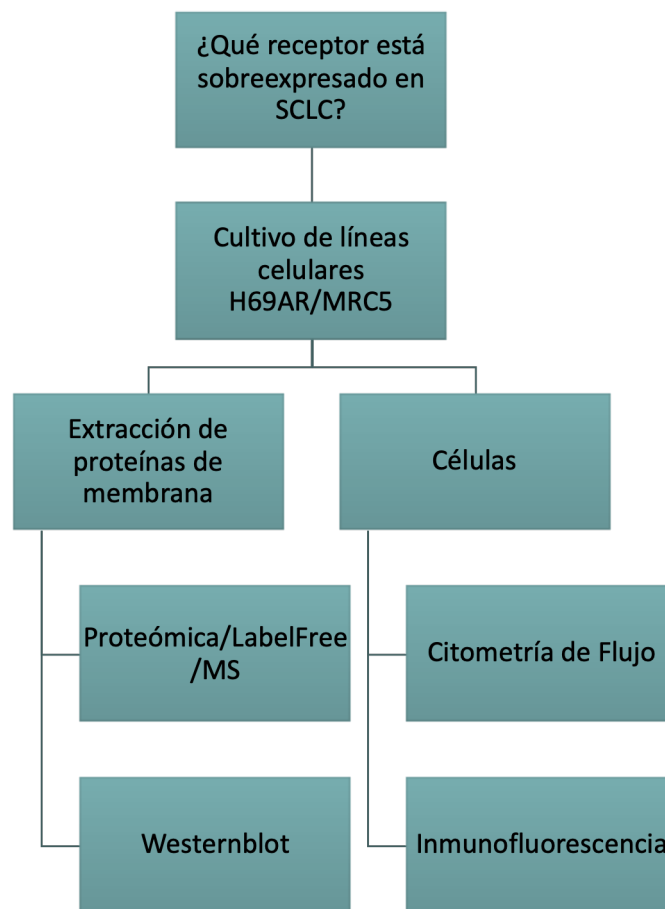
4. OBJETIVOS

4.1. General:

- Evaluar en un modelo de SCLC el efecto terapéutico de las nanopartículas core-shell de CoFe_2O_4 funcionalizadas.

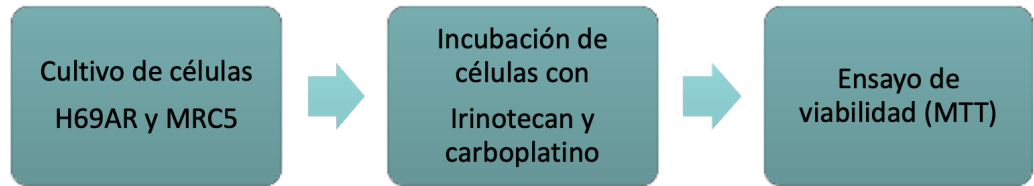
4.2. Específicos:

- Identificar el receptor de membrana sobreexpresado en SCLC.



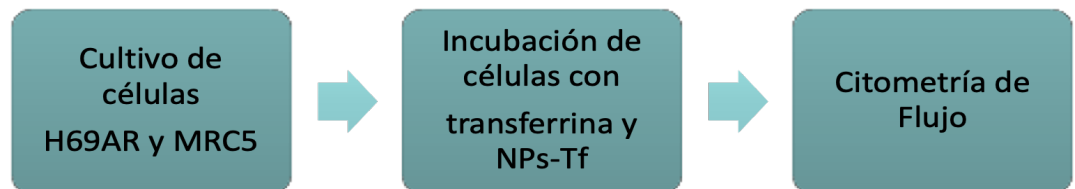
Esquema 1. Flujo metodológico del objetivo 1.

- **Identificar el fármaco con mejor efecto citotóxico en SCLC.**



Esquema 2. Flujo metodológico general del objetivo 2.

- **Funcionalizar nanopartículas.**
- **Evaluar la activación de la endocitosis de las nanopartículas.**



Esquema 3. Flujo metodológico general del objetivo 4.

- **Evaluar *in vitro* el efecto terapéutico de las NPsCS funcionalizadas.**
- **Evaluar *in vivo* el efecto terapéutico de las NPsCS funcionalizadas.**

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. SCLC H69AR (ATCC® CRL-11351)

La línea celular SCLC H69AR (ATCC® CRL-11351), utilizada como línea celular cancerosa, se estableció a partir de la línea celular NCI-H69 [H69] (ATCC® HTB119™) de SCLC de la American Type Culture Collection (ATCC) que proviene del pulmón de un ser humano (*Homo sapiens*), un hombre caucásico de 55 años con carcinoma de pulmón de células pequeñas.

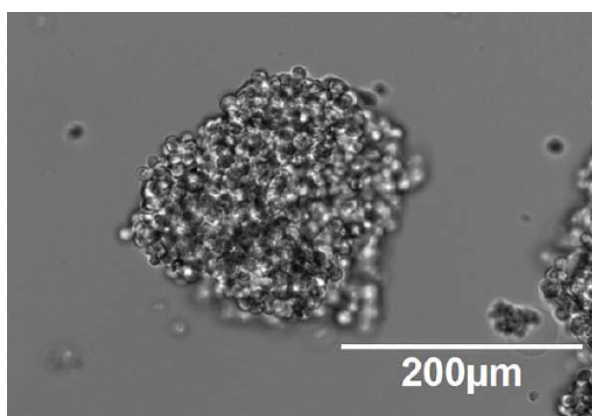


Figura 13 | Morfología de las células H69.

La línea celular H69AR es resistente a múltiples fármacos, aproximadamente 50 veces más resistente a la adriamicina en comparación con la línea celular original NCI-H69. También tiene resistencia cruzada a los análogos de antraciclina, incluidos daunomicina, epirrubicina, menogaril y mitoxantrona, así como a acivicina, etopósido, gramicidina D, colchicina y los alcaloides de Vinca, vincristina y vinblastina. Las células muestran poca o ninguna resistencia cruzada a la bleomicina, el 5-fluorouracilo y el carboplatino. Tienen una ligera sensibilidad colateral a la 1-dehidrotestosterona y la lidocaína.

El medio de cultivo para esta línea celular es el medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, L-glutamina (2 mM) y antibióticos (100 U /ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina).

5.2. MRC5 (ATCC® CCL-171™)

Se usó una línea celular de fibroblastos de pulmón MRC5 (ATCC® CCL171) como control. MRC-5 derivó de tejido pulmonar normal de un feto masculino caucásico de 14 semanas de edad, procedimiento realizado por J.P. Jacobs en septiembre de 1966. Esta es una línea celular humana diploide normal con cariotipo 46,XY.

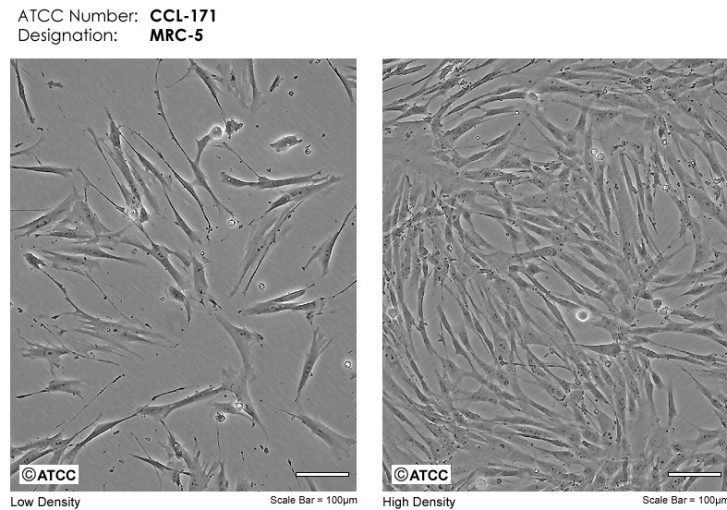


Figura 14 | Micrografía celular de células MRC5 con baja y alta densidad.

El medio base para esta línea celular es el medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con FBS al 10% y antibióticos (Penicilina-estreptomicina 1% y crecidas en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C.

Kit de extracción de proteínas de membrana Mem-PER™ Plus (Cat. 89842-Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA)

El kit de extracción de proteínas de membrana Thermo Scientific™ Mem-PER™ Plus se utiliza para el enriquecimiento de proteínas integrales de membrana y proteínas asociadas a la membrana a partir de células o tejidos de mamíferos cultivados. El kit utiliza un protocolo de extracción selectiva basado en un detergente suave, que elimina la molestia de la separación de fases basada en la hidrofobicidad, lo que permite una mejor reproducibilidad y un mayor rendimiento.

Las células se permeabilizan con un detergente suave para permitir la liberación de proteínas citosólicas solubles. Luego, un segundo detergente solubiliza las proteínas de membrana. Las eficiencias de extracción variarán dependiendo del número de

veces que la(s) proteína(s) integral(es) de membrana de interés atraviese la bicapa lipídica. Las proteínas de membrana con al menos 1 o 2 dominios transmembrana normalmente se extraen con una eficacia de hasta el 90%. La contaminación cruzada de proteínas citosólicas en la fracción de membrana suele ser inferior al 10%.

Para cada muestra biológica (líneas celulares H69AR y MRC5), se recolectaron, lavaron y centrifugaron 6×10^6 células. Las proteínas citosólicas se aislaron en la fracción sobrenadante después de agregar Permeabilization Buffer™ y mezclar a 4 °C durante 10 min. El homogeneizado se centrifugó a $16\,000 \times g$ a 4 °C durante 10 min; las proteínas de membrana se aislaron en la fracción sobrenadante después de agregar Solubilization Buffer™ y mezclar a 4 °C durante 30 min; el homogeneizado se centrifugó a $16\,000 \times g$ a 4 °C durante 15 minutos. Luego de recolectar las proteínas, se agregó un cóctel de inhibidores de proteasa para mantener la integridad de la proteínas.

Kit Cuant. 2-D. Cuantificación De Proteínas (Cat. Ge80-6483-56)

El kit 2-D Quant está diseñado para determinar con precisión las concentraciones de proteínas en muestras para electroforesis. El ensayo se basa en la unión específica de iones de cobre a proteínas. Las proteínas se precipitan cuantitativamente mientras que las sustancias que interfieren se dejan en solución. Las proteínas precipitadas se resuspenden en una solución que contiene cobre y el cobre no unido se mide con un agente colorimétrico. La densidad de color que se desarrolla en el procedimiento del kit 2-D Quant está inversamente relacionada con la concentración de proteína, la absorbancia a 480 nm está relacionada inversamente con la concentración de proteína. con una respuesta lineal a la proteína en el rango de 0 a 50 µg y un rango de volumen de 1 a 50 µl.

5.3. Label-Free DIA Mass Spectrometry

La cuantificación de proteínas sin etiquetas (Label Free) es un método basado en espectrometría de masas para identificar y cuantificar cambios relativos en dos o más

muestras biológicas en lugar de usar un compuesto que contiene isótopos estables para etiquetar proteínas. No hay límite en el número de muestras en la cuantificación de proteínas sin etiquetas y en principio, es aplicable a cualquier tipo de muestra, incluidos los materiales que no se pueden etiquetar directamente (por ejemplo, muestras clínicas). Es ideal para análisis de muestras de descubrimiento de biomarcadores.

Principios

En general, los enfoques sin etiquetas se pueden dividir en dos grupos distintos según el método utilizado para la extracción de datos. Por un lado, la cuantificación se puede inferir contando el número de péptidos o espectros asignados a una determinada proteína, por lo que se denominan genéricamente métodos de conteo espectral. Por otro lado, cuando la cromatografía líquida se combina con la espectrometría de masas, los valores cuantitativos se pueden medir a través de la extracción del área de los picos cromatográficos de los iones precursores: el área bajo la curva (AUC) o los métodos de intensidad de señal MS1.

En cuanto a los métodos de conteo espectral, la cuantificación relativa de proteínas se logra comparando el número de espectros MS/MS identificados de la misma proteína, que se ha demostrado que se correlaciona directamente con la abundancia de proteínas. Algunos investigadores creen que es posible porque un aumento en la abundancia de proteínas normalmente da como resultado un aumento en la cantidad de sus péptidos proteolíticos. Las cantidades cada vez mayores de digeridos generalmente conducen a un aumento en la cobertura de secuencias de proteínas, el número de péptidos únicos identificados y el número de espectros MS/MS totales identificados (recuento espectral) para cada proteína. Debido a la facilidad de implementación, no se han desarrollado herramientas o algoritmos específicos especialmente para enfoques de conteo espectral pero la normalización y el análisis estadístico de conjuntos de datos de conteo espectral son necesarios para la detección precisa y confiable de cambios de proteínas en mezclas complejas.

En cuanto a los métodos de intensidad de iones, se ha observado que la intensidad de la señal de la ionización por electropulverización (ESI) se correlaciona con la concentración de iones. La altura o el área de un pico en una determinada relación masa-carga (m/z) de un espectro de masas refleja el número de iones para esa m/z detectados por el espectrómetro de masas en un momento dado, lo que generalmente se conoce como la abundancia de iones. Aunque la abundancia de iones no se puede usar para inferir directamente la concentración absoluta de proteínas o péptidos (debido a la diferente eficiencia de ionización de cada péptido), se puede usar la comparación de la proporción de abundancias de iones entre péptidos idénticos obtenidos en diferentes experimentos para estimar la expresión diferencial. Existe software disponible para los métodos de cuantificación de proteínas basados en la intensidad máxima de MS de los péptidos identificados, como Pavel, Drik, MassView, SIEVE, ProteinLynx, Nathan, etc (Zhu, Smith, & Huang, 2010).

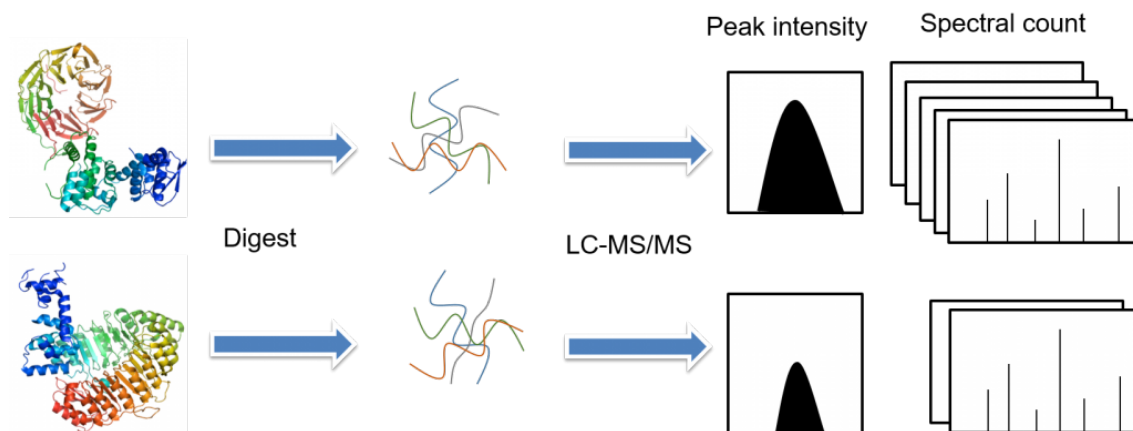


Figura 15 | Label Free.

Hay varios pasos fundamentales involucrados en la proteómica cuantitativa sin etiquetas, incluida la preparación de muestras (extracción, reducción, alquilación y digestión de proteínas), separación de muestras mediante cromatografía líquida y análisis mediante espectrometría de masas en tándem, y análisis de datos (identificación de péptidos/proteínas, cuantificación y análisis estadístico). En los métodos proteómicos cuantitativos sin etiquetas, cada muestra se prepara por separado y luego se somete a procesos individuales de LC-MS/MS o LC/LC-MS/MS. La cuantificación se basa en la comparación de la intensidad máxima del mismo péptido o el recuento espectral de la misma proteína.

Ventajas y limitaciones

La cuantificación sin etiqueta es un enfoque atractivo por tres razones principales. En primer lugar, se elimina la variabilidad que puede introducir el etiquetado químico. En segundo lugar, las etiquetas químicas y metabólicas suelen ser caras. En tercer lugar, el tiempo de preparación de la muestra se reduce significativamente mediante la eliminación de numerosos pasos. Si bien la abundancia relativa de etiquetas químicas o metabólicas se puede medir fácilmente, la cuantificación sin etiquetas debe basarse en otros parámetros, como el péptido o el recuento espectral, que también tiene limitaciones inherentes. Otros problemas asociados con la cuantificación basada en MS sin etiquetas son la cobertura de secuencias y el grado de fraccionamiento de muestras complejas antes del análisis en un espectrómetro de masas (Wong & Cagney, 2010).

El método Label Free se ha convertido en uno de los métodos cuantitativos más utilizados para el análisis de proteínas, como la identificación de perfiles de expresión en diferentes procesos biológicos, el diagnóstico de enfermedades y biomarcadores de cáncer, el seguimiento de cambios de proteomas de procesos biológicos y el estudio de redes de interacción de proteínas, etc.

Procesamiento de muestras para espectrometría de masas

Se prepararon cantidades iguales de proteína de ambas líneas celulares para estudios proteómicos. El grupo de proteínas (40 µg) para cada condición y la réplica biológica se sometieron a SDS-PAGE al 10 % y se les permitió avanzar aproximadamente 1 cm dentro del gel; los fragmentos de gel resultantes se digirieron enzimáticamente según el protocolo modificado de Shevchenko et al. 2006 (Shevchenko, Tomas, Havli, Olsen, & Mann, 2006).

Cuantificación relativa mediante espectrometría de masas DIA sin etiquetas

El análisis proteómico cuantitativo (condiciones espectrométricas y cromatográficas) se realizó en un UPLC Nano Acquity M-Class acoplado a un espectrómetro de masas

QTOF Synapt G2-Si (Waters; Milford, MA, EE. UU.), según el método de Ríos-Castro et al., 2020 (Ríos-Castro et al., 2020).

Análisis de los datos

Los archivos *.raw generados se analizaron en el software Progenesis Q1 para Proteomics v3.0.3 (Waters; Milford, MA) de acuerdo con la configuración reportada en el estudio de Vázquez-Procopio J, et al., 2020 (Vásquez-Procopio et al., 2020), con las siguientes modificaciones: utilizamos una base de datos concatenada *.fasta *Homo sapiens* (descargada de Uniprot, que contiene 73,099 secuencias de proteínas, última modificación el 27 de junio de 2018). Synapt G2-Si se calibró con fragmentos de fibrinopéptido [Glu1] mediante la fragmentación del ión precursor $[M + 2H]^{2+} = 785,84261$ de 32 eV con un resultado de menos de 1,1 ppm en todas las mediciones de MS/MS. La relación se calculó en función de la respuesta de señal de MS promedio de los tres péptidos trípticos más intensos (Top3) de cada proteína caracterizada en la muestra H69AR (células tumorales) por el Top3 de cada proteína caracterizada en la muestra MRC5 (células control). Los datos de proteómica de espectrometría de masas se depositaron en ProteomeXchange Consortium a través del repositorio de socios PRIDE (Perez-Riverol et al., 2019) con el identificador de conjunto de datos PXD015405.

Análisis Bioinformático

Los perfiles de expresión se visualizaron como un mapa de calor, que se generó utilizando un servidor web heatmapper (Babicki et al., 2016), disponible en línea (<http://heatmapper.ca/>; consultado el 28 de febrero de 2020). Se utilizaron los métodos de enlace completo y de Pearson como métodos de agrupamiento y medición de distancia, respectivamente. El “z-Score” se calculó con la siguiente ecuación:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

donde, x = abundancia Top3 de una proteína en una sola inyección, μ = abundancia media Top3 por proteína (todas las inyecciones), y σ = desviación estándar.

Las proteínas expresadas diferencialmente se clasificaron de acuerdo con las rutas biológicas utilizando la base de datos Reactome contenida en STRING v11 (disponible en línea: <https://string-db.org/>; consultado el 8 de noviembre de 2019). Todas las vías biológicas resultantes con una FDR (False Discovery Rate) $\leq 0,05$ (altamente confiable) se exportaron como un archivo *.tsv para ser graficadas (las FDR se convirtieron a $-\log_{10}$) como un gráfico de barras usando el software TIBCO Spotfire v7.0.0 (Somerville , MA, EE. UU.). Los interactomas de proteínas expresadas diferencialmente también se crearon en STRING, con las siguientes configuraciones: base de datos de *Homo sapiens*; experimentos, base de datos, coexpresión, vecindad, fusión de genes y coocurrencia como fuente de interacción activa, y 0,4 como puntuación de confianza. Se construyó un interactoma TfR1 utilizando el software Cytoscape v3.8.0 (disponible para descargar: <https://cytoscape.org/>) a través de la aplicación ReactomeFIPlugIn v7.2.3.

SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida se forman por la reacción de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) que da como resultado una matriz de gel altamente reticulada. El gel actúa como un tamiz a través del cual se mueven las proteínas en respuesta al campo eléctrico. Las proteínas contienen una carga general positiva o negativa; esto permite el movimiento de una molécula de proteína hacia el punto isoeléctrico en el que la molécula no tiene carga neta. Al desnaturalizar las proteínas y darles una carga negativa uniforme, es posible separarlas según el tamaño a medida que migran hacia el electrodo positivo (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme,

que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS). En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño: el SDS se une en una proporción aproximada de 1.4 g SDS/g proteína. Los complejos proteína/SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, donde la cadena proteica es distendida y solubilizada por el detergente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa (Lomonte, 2007). En la separación de las proteínas por PAGE usamos el protocolo descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Se usaron geles con entrecruzamiento del 10%

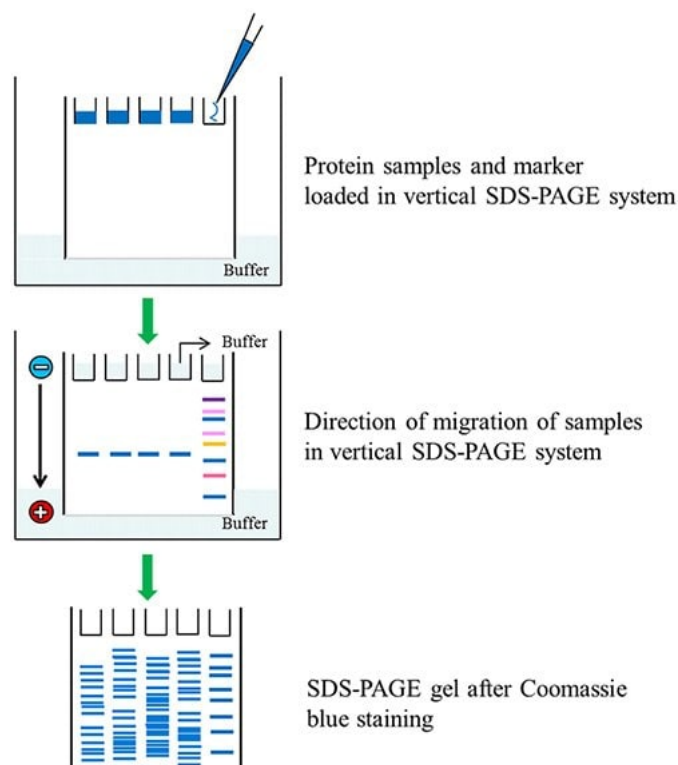


Figura 16 | SDS-PAGE flow. Tomado de www.sigmaaldrich.com.

5.4. Western Blot

La transferencia Western o inmunoelectrotransferencia es una técnica analítica bien establecida para detectar, analizar y cuantificar proteínas (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Este método se utiliza para detectar moléculas proteicas específicas en muestras complejas como homogeneizados de tejidos y lisados celulares.

La transferencia Western implica normalmente la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa o de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Una vez transferidas las proteínas, pueden teñirse para su visualización e identificarse directamente mediante secuenciación N-terminal, espectrometría de masas o inmunodetección.

En la inmunodetección de la transferencia Western, las proteínas se identifican mediante su unión a anticuerpos específicos. Normalmente se utiliza un anticuerpo primario en combinación con un anticuerpo secundario conjugado con HRP o AP para la detección quimioluminiscente o colorimétrica utilizando un sustrato adecuado. También puede utilizarse un anticuerpo primario o secundario marcado con fluorescencia para la visualización directa.

La inmunoelectrotransferencia se utiliza para detectar la presencia de proteínas específicas, determinar el alcance de las modificaciones postraduccionales, verificar la expresión de proteínas en aplicaciones de clonación, analizar los niveles de expresión de proteínas y biomarcadores, en la cartografía de epítopos de anticuerpos y para comprobar la presencia de marcadores de enfermedad en entornos clínicos. [Merck, www.sigmaaldrich.com.]

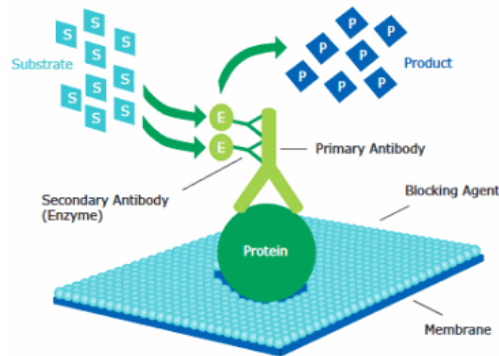
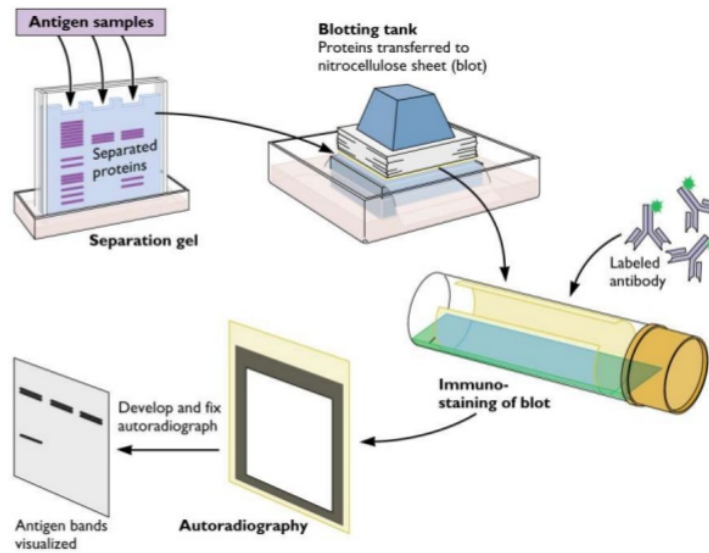


Figura 17 | Flujo metodológico de la inmunoelectrotransferencia e inmunodetección. Tomado de www.sigmaaldrich.com.

Para la identificación de receptor de membrana del proyecto inicialmente se hicieron análisis basados en lo reportado en la literatura, se analizaron prospectos de receptores tales como el receptor de folatos (FOLR1) y el receptor de insulina (IGFR).

Sobre la base de los resultados del análisis espectrométrico, se realizó un análisis de transferencia Western para confirmar el receptor sobreexpresado en SCLC. Se prepararon cantidades iguales (20 µg) de proteína y se corrieron en gel SDS/PAGE; las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó durante la noche con anti-CD71 de cabra (Santa Cruz Biotechnology, sc-32272, Dallas, TX, EE. UU.) y anti-β-actina monoclonal a 4 °C. Después del lavado, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP durante

2 horas a temperatura ambiente. Las bandas que contenían las proteínas se visualizaron en una película de rayos X (Kodak, Rochester, NY, EE. UU.) utilizando un kit de quimioluminiscencia mejorada (Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer, Inc. Waltham, MA, EE. UU.). El análisis densitométrico de las bandas de Western blot se realizó utilizando el software Image Studio™ Versión 5.2.5. (Lincoln, NE, EE. UU.)

5.5. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar y cuantificar de manera simultánea múltiples características celulares a medida que son transportadas en un fluido e incididas por un haz de luz. El citómetro de flujo mide el tamaño y la granularidad de la célula, así como la fluorescencia relativa de la misma. Estas características se determinan usando un sistema óptico acoplado a un procedimiento electrónico que graba la manera en que la célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia (Marti, Stetler-Stevenson, Bleesing, & Fleisher, 2001). Un citómetro de flujo se encuentra compuesto por tres principales sistemas, el de fluidos, el óptico, y el electrónico (Shapiro, 2003).

El marcaje celular con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, representa un paso crucial para la identificación de subtipos celulares mediante el uso de la técnica de citometría de flujo (Barberena, Cervantes Ríos, & Ortiz Muñiz, 2014). Los anticuerpos monoclonales permiten detectar y “etiquetar” poblaciones específicas de células. Esta tecnología consiste en la creación de un anticuerpo que sea capaz de unirse a una estructura específica (antígeno), mismo que se expresa en el tipo celular que se requiere identificar. Adicionalmente, este anticuerpo debe contener una unión covalente a un fluorocromo, que emitirá luz fluorescente cuando sea excitado por el láser (Mao & Mullins, 2010); de este modo, la célula se “tiñe” y facilitará la identificación de las células que se unieron al anticuerpo o marcador.

Para análisis de receptores

Las células en monocapa H69AR (ATCC® CRL-11351) y MRC5 (ATCC® CCL171) se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina-EDTA a 37 °C durante 5 min. Las células se recogieron y se resuspendieron en un medio. Se contabilizó la supervivencia de las

células usando un ensayo de exclusión con colorante azul tripano. El número de células en la suspensión se ajustó a 5×10^5 células por muestra por línea celular (muestra 1: Blanco y muestra 2: mezcla de anticuerpos contra el receptor de folato y el receptor CD71). Las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS para remover el medio de cultivo por centrifugación por 5 min. Las células se resuspendieron en 100 μ L de PBS-EDTA y luego la muestra 1 se incubó, sin anticuerpo específico, solo con FBS al 0,5 %, y la muestra 2 se incubó con el anticuerpo conjugado con AF488 anti-HUMAN FOLR1 (R&D Systems, FAB5646G, Minneapolis, MN , EE. UU.) y el anticuerpo conjugado con PE anti-CD71 humano de ratón (BD Pharmingen, 555537, East Rutherford, NJ, EE. UU.). Después de incubar durante 30 min, las muestras se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

Para los Estudios de Endocitosis

Se ajustó el número de células en la suspensión y se sembraron 1.5×10^5 células en 1 mL de medio de cultivo suplementado, de acuerdo a cada línea celular, en placas de 12 pozos, después de incubar las muestras con 2 μ g/mL de transferrina conjugada con Alexa Fluor™ 488 conjugado (Tf-AF488, Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, EE. UU.) y nanopartículas de oro conjugadas con transferrina durante 0.5, 8 y 16 h a 37 °C en una incubadora humidificada (5% de CO₂), las células se lavaron dos veces con 3 mL de PBS para eliminar la transferrina no absorbida, se centrifugación durante 5 min. Las suspensiones celulares finales se realizaron en 100 μ L de PBS-EDTA y se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

Agregamos 0.2 μ g del conjugado Tf-AF488 para tener un control positivo del nivel endocítico en ambas líneas celulares (MRC5 y H69AR). La fluorescencia total de Tf-AF488 a los tiempos= 0.5, 8 y 16 h se midió mediante citometría de flujo como una señal endocítica positiva máxima. Con respecto al complejo CSNP-TF, agregamos un volumen respectivo para obtener la concentración final de Tf de 0.2 μ g en el medio de incubación.

5.6. Inmunofluorescencia (IF)

La inmunocitoquímica (ICC) se refiere a la inmunotinción de líneas celulares cultivadas o células primarias, incluidos frotis, hisopos y aspirados de células. ICC ofrece un medio semicuantitativo para analizar la abundancia relativa, la conformación y la localización subcelular de los antígenos de interés. Las técnicas tradicionales de ICC utilizan la detección cromogénica en la que los anticuerpos conjugados con enzimas convierten los sustratos cromógenos en un precipitado coloreado en el lugar de la reacción. Sin embargo, la detección cromogénica ha perdido popularidad con la llegada de las etiquetas inmunofluorescentes.

En los ensayos de inmunocitoquímica/inmunofluorescencia (ICC/IF), los antígenos celulares se visualizan utilizando anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos (detección directa) o un método de dos pasos (detección indirecta) que implica un anticuerpo primario no marcado seguido de un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo. Al combinar diferentes anticuerpos marcados con fluorocromos, el ICC/IF multiplexado puede detectar varios antígenos en la misma muestra.

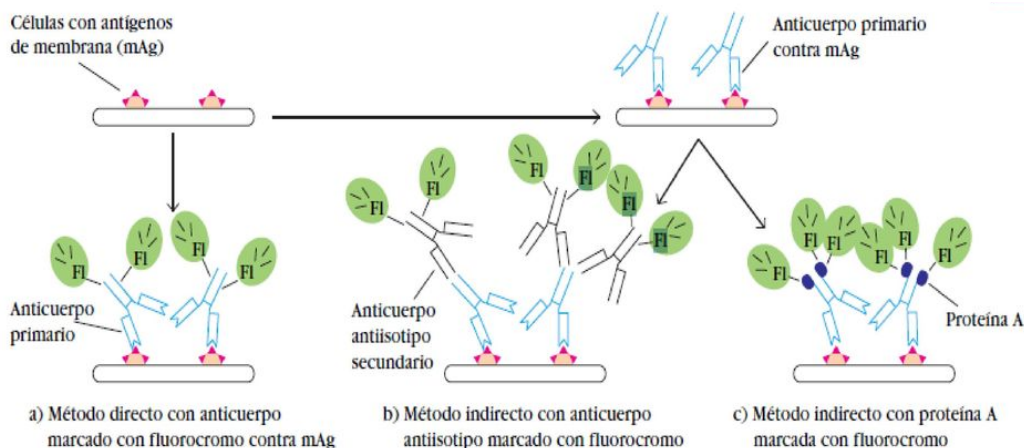


Figura 18 | Inmunofluorescencia indirecta.

Las células MRC5 y H69AR se sembraron en cubreobjetos, después de 24 horas se lavaron tres veces con PBS 1X y procedió a fijarlas con paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS durante 30 min. Las células no fueron permeabilizadas debido a que la localización del receptor proteico de nuestro interés está en la membrana. El anticuerpo anti-CD71 diluido 1:500 se incubó a 4 °C durante la noche; se incubó el

anticuerpo secundario anti-ratón-AF488, 1:750, y las muestras se montaron utilizando Vectashield HardSet Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). Posteriormente, las muestras procesadas se analizaron utilizando un microscopio de barrido láser confocal de epifluorescencia Cytation C10 (Bio-Tek, Santa Clara, CA, EE. UU.).

5.7. Nanopartículas

Preparación de Nanopartículas Magnéticas Por El Método Turkevich

Se utilizó un método de co-precipitación simple (Método Turkevich) para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro. 50 mL de NaOH 1.5M fue usado como agente reductor. Un volumen de 10 mL de agua desionizada fue desgasificado con nitrógeno gaseoso y después se añadió 1mM de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.85ml de HCl. Entonces la solución fue mezclada y posteriormente se añadió la solución de NaOH bajo agitación constante con una atmósfera de nitrógeno a 80°C por 1.5h. Se formaron polvos sólidos negros que se separaron usando un imán y se lavaron con agua destilada y etanol 3 veces cada uno. El precipitado negro se separó y se lavó para ser utilizado para la síntesis de NPs core-shell.

Preparación de solución semilla de óxido de hierro Fe_3O_4 .

Solución de semilla de óxido de hierro se preparó utilizando 5 ml de solución de Fe_3O_4 de Au y luego se diluyó con 25 mL de agua destilada. 5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO, 0,2% w / v) añadido para la eliminación de la aglomeración en las partículas, y se agitó bajo atmósfera de N_2 . La temperatura se mantuvo a 80 ° C durante todo el experimento por 3 h.

Preparación de la solución semilla de Oro.

La solución de semilla de oro se preparó inicialmente mezclando 1 mL de CTAB (0.1 M) y 2 mL de Ácido Áscorbico (AA) 1 mM, después se añadió a 50 mL de solución de HAuCl_4 (0.3 M).

Síntesis de Nanopartículas core/shell Au-Fe₃O₄.

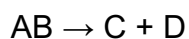
La solución semilla de óxido de hierro y la solución semilla de oro se mezclaron, sintetizándose así nanopartículas core-shell de Au-Fe₃O₄. Inicialmente, la solución semilla de oro de color violeta se añadió gota a gota a la solución de óxido de hierro de color marrón. Esta mezcla se mantuvo bajo agitación constante durante 6 horas hasta que la solución de color marrón se volvió púrpura oscuro.

Decomposición térmica (DT, Thermal Decomposition)

La síntesis por decomposición térmica normalmente se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas y temperaturas muy por encima del punto de inflamación de los vapores orgánicos generados por la mezcla de reacción. Una de las principales ventajas de este método es el mejor control que se puede tener de la forma y tamaño de las nanopartículas, la desventaja para las aplicaciones en óxidos metálicos es la pérdida de las propiedades magnéticas debido a que los precursores organometálicos en ausencia de oxígeno han dado partículas con fases mixtas de óxido de hierro, defectos cristalinos y peores propiedades magnéticas (Unni et al., 2017).

Síntesis de Nanopartículas Magnéticas Au-CoFe₂O₄ Core-Shell (mCSNP's) por el Método de Decomposición Térmica (DT)

La síntesis de nanopartículas de magnetita Fe₃O₄ dopada con cobalto se llevó a cabo mediante el proceso denominado Descomposición Térmica (TD), que consiste en la reacción de un compuesto precursor que se produce al aumentar la temperatura (aproximadamente 250-270°C) para producir dos o más compuestos. La DT se produce del precursor de acetilacetonato de hierro (III) 1 mmol (Sigma 97%) más acetato de cobalto 0.5 mmol (Sigma Aldrich 97%) añadiendo un tensioactivo orgánico como Triton X-100 (0.1M). Esto conduce a la formación de nanopartículas monodispersas dopadas con óxido de hierro (CoFe₂O₄).



La mezcla se colocó en un matraz volumétrico conectado a un sistema de enfriamiento impulsado por agua helada y una bomba para hacer circular ésta dentro de un tubo refrigerante y permitir que la reacción se lleve a cabo por el tiempo requerido, se expuso la reacción a una atmósfera de nitrógeno (N₂), durante 10 minutos a una

temperatura de 260°C, posteriormente la solución se calentó durante 60 minutos hasta que adquirió el color oscuro característico de la magnetita. La producto obtenido de aproximadamente 15 mL se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se centrifugó 5 veces a 8,000 rpm, en los tres primeros lavados se añadieron 5 mL de metanol 98% y los dos últimos ciclos se realizaron con 5 mL de agua mili Q 800 Ohm. Finalmente, se retiró el agua milli Q y se añadieron 15 mL de agua bidestilada. Todas las soluciones se estandarizaron a un pH fisiológico de 7.35-7.45 utilizando el potenciómetro Mettler Toledo™.

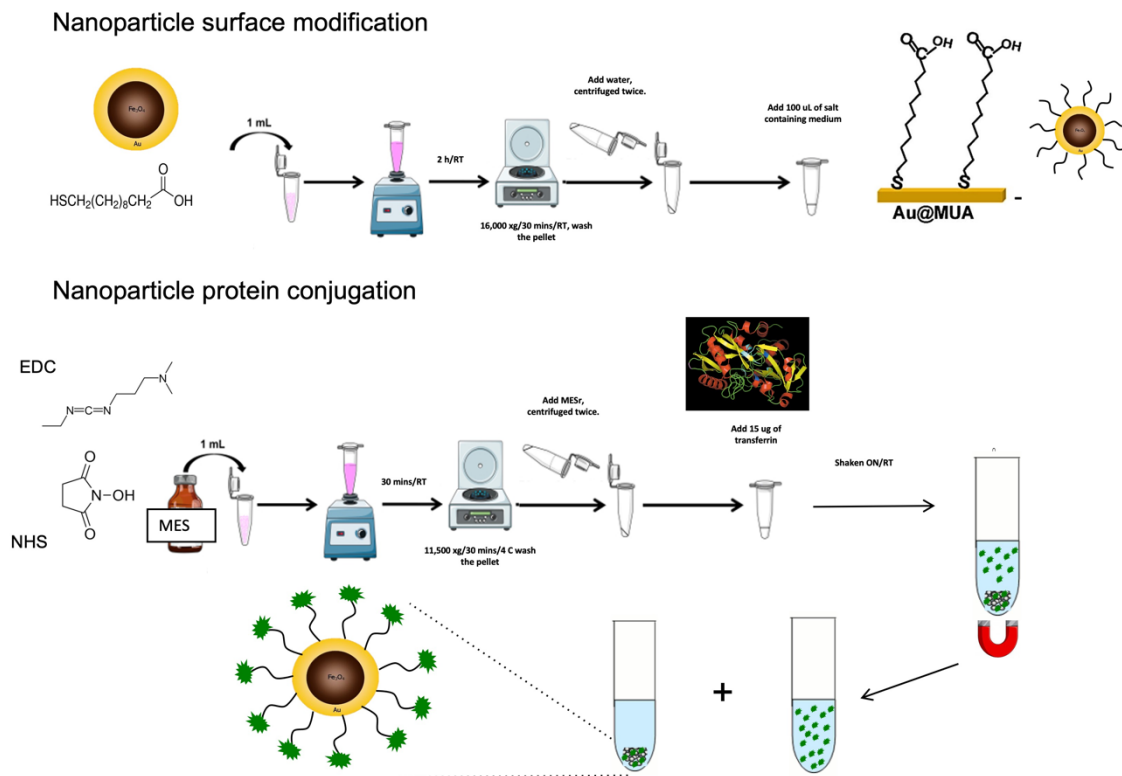
La síntesis de la solución de semilla de Au (Solución 1) se preparó utilizando 0.5 mL (1 M, CTAB), 1 mL (50 mM, ácido L-ascórbico) y 100 µL (1 M, solución de H₂AuCl₄). Todo el mix se sonicó durante 30 minutos. La solución de semilla de oro recién preparada se usó para generar la carcasa de oro de la nanopartícula.

Como solución 2 se utilizó la preparación de nanopartículas de ferrita de cobalto. Para la síntesis del core-shell se utilizaron las soluciones 1 y 2. Inicialmente, se añadió gota a gota la solución 2 a la solución 1. Esta mezcla de solución se agitó durante 3 horas continuamente hasta que hubo un cambio de color. Posteriormente, estas nanopartículas core-shell se separaron magnéticamente usando un magneto y se lavaron dos veces con una mezcla de hexano y etanol para obtener NP de alta pureza excluyendo el exceso de oro. Las NP lavadas se centrifugaron dos veces para eliminar el exceso de Triton X-100 de la solución.

Funcionalización de Nanopartículas Magnéticas Au Core-Shell

La modificación del núcleo-corteza de oro se llevó a cabo utilizando el ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA). Posteriormente, se conjugó transferrina (Transferrin-Alexa Fluor 488 de Invitrogen) al core-shell; las nanopartículas funcionalizadas con transferrina se separaron de la transferrina libre mediante lavado y concentración con un imán. La metodología (**Esquema 4**) se adaptó con algunas modificaciones de los Protocolos de Springer (Craig, Allen, & Mason, 2010). Luego del proceso de funcionalización se realizó electroforesis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Santa Clara, CA, USA) para determinar si la transferrina se había unido correctamente a la

nanopartícula, para lo cual se analizó el sobrenadante que contenía transferrina disuelta en PBS.



Esquema 4 | Funcionalización de la nanopartícula.

Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa presentes en las células viables con metabolismo activo, éstas convierten el MTT en formazán (**Figura 19**), un compuesto coloreado de color azul/púrpura con una absorbancia máxima cercana a 570 nm, esto permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Riss et al., 2004). Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

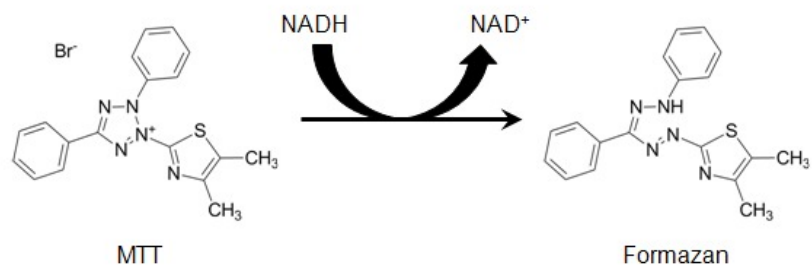


Figura 19 | Reacción química de MTT.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y caracterización de nanopartículas core-shell de oro

Se probaron dos métodos para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro, en el principio se utilizó un método de co-precipitación simple (Método Turkevich, como se describió en la sección de métodos). A partir de esto el material obtenido se analizó por difracción de rayos X (**Figura 20**) para confirmar la calidad de la reacción y del material obtenido, y que el método de síntesis se llevó a cabo de manera apropiada.

La Figura 20 muestra el difractograma del material sintetizado por el método Turkevich, identificado claramente como magnetita (Fe_3O_4), como se muestra en la gráfica, además, se incluye la ficha reportada para este tipo de material en el ICDD, para efectos de comparación.

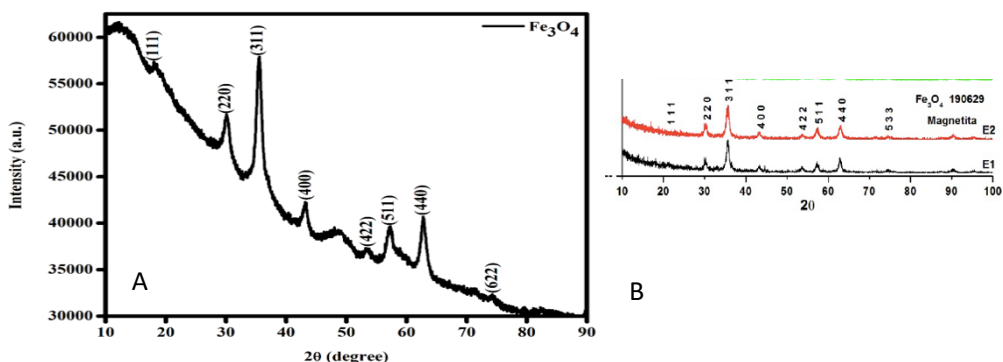


Figura 20 | A) Difractograma de rayos X de una muestra de nanopartículas de hierro sintetizada B) Ficha reportada para la magnetita, que muestra un excelente perfil de coincidencia.

Con el fin de obtener mayor comprensión del material de magnetita sintetizado, se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM), para apreciar la morfología y el tamaño de dicho material. En la **Figura 21** se observa que el material es homogéneo, presenta morfología redonda y el tamaño de partícula es mucho menor a 10 nm. El tamaño obtenido es el deseable para este tipo de materiales y el objetivo del proyecto, sin embargo, el material está densamente aglomerado (Figura 21-B), lo que no es adecuado para su posterior funcionalización

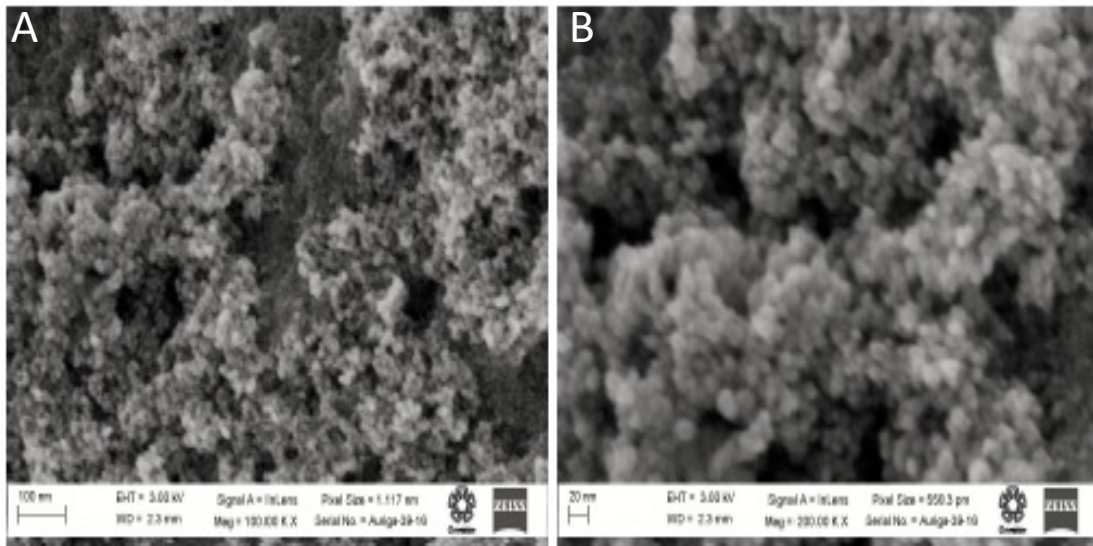


Figura 21 | Micrografías electrónicas de barrido de magnetita sintetizada.

Posteriormente se realizó el dopado con oro sobre la magnetita, y a continuación se realizaron análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Tal como se puede observar en la Figura 22, el tamaño de las nanopartículas de oro no supera los 10 nm (Figura 22-A), pero se detectó que la morfología de las nanopartículas no es homogénea en su totalidad, lo que es una característica no deseable para los fines de este proyecto, debido a que el uso que se le pretende dar es estrictamente necesario que el tamaño y la forma sean lo más homogéneos posibles.

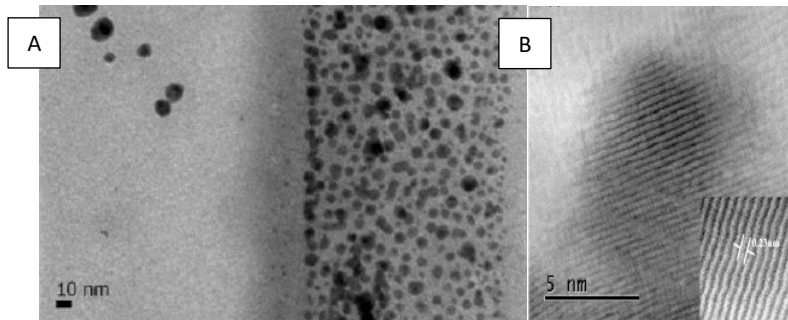


Figura 22 | TEM de magnetita dopado con oro.

Debido a que el método de síntesis simple de Turkevich no arrojó los resultados deseados en cuanto a la homogeneidad de las nanopartículas se optó por probar otros métodos y materiales de síntesis, lo que nos llevó en nuestro grupo de investigación a decidir usar el método de decomposición térmica (DT) para probar la síntesis de nuevos materiales, esta parte del trabajo se llevó a cabo en colaboración estrecha con

el Dres. Goldie Oza, M. Medina y los resultados se referencian en publicaciones Medina M. 2020 (Medina et al., 2020) y Villalobos-Manzo R. (2022) (Villalobos-Manzo et al., 2022). Se consideraron varias opciones para las nuevas reacciones, y finalmente se decidió utilizar ferrita dopada de cobalto para este proyecto. (**Figura 23**, reacción química)

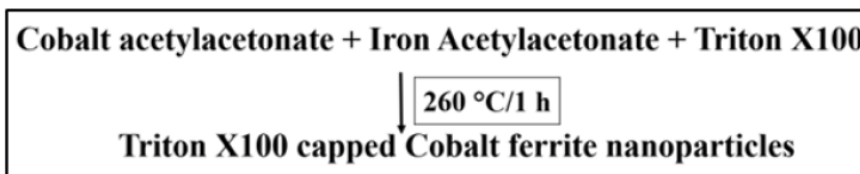


Figura 23 | Reacción química resumida de la decomposición térmica de ferrita de cobalto.

El nuevo material sintetizado, la ferrita de cobalto, también se analizó por TEM, en la **Figura 24-A**, se puede observar que el tamaño de las nanopartículas es menor a 10 nm, la distribución y su forma es bastante más homogénea. El estudio por difracción de rayos X mostró los picos característicos de la ferrita de cobalto (**Figura 24-B**), lo que nos permite asumir que el método de síntesis se llevó a cabo de manera apropiada y que el material tiene las características fisicoquímicas deseables.

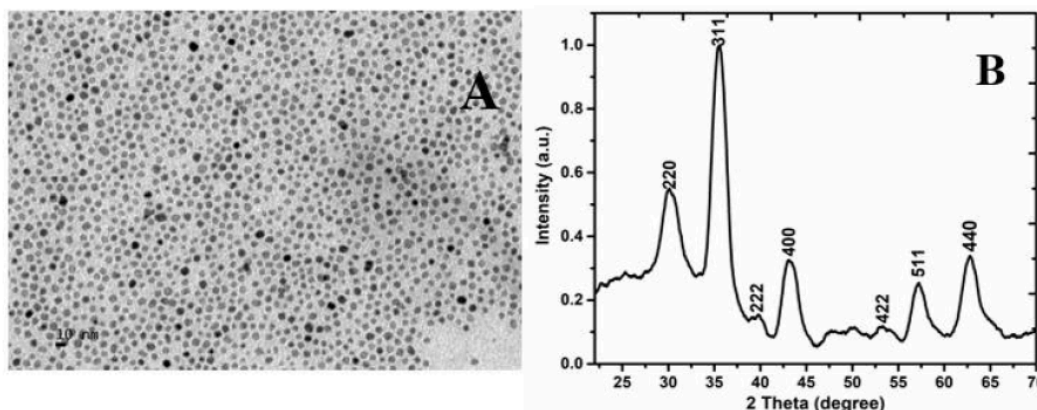


Figura 24 | TEM y XRD de ferrita de cobalto.

Como parte de la caracterización estructural del material, también se utilizó la técnica de STEM-HAADF (High-angle annular dark-field scanning transmission electron microscopy) con corrección de la aberración esférica para los estudios estadísticos realizados en varias muestras de nanopartículas. Este análisis reveló que el intervalo

de tamaños es muy estrecho de entre 2 y 9 nm con un promedio de 5.5 ± 1.2 nm de tamaño como podemos observar en la **Figura 25** (a), en el panel (b) de la misma figura, se revela la buena y estrecha distribución de las NPs, tamaños homogéneos y formas esféricas, lo que permite inferir que se tuvo un buen control de las condiciones de síntesis, el panel (c) mostrando una alta resolución comprueba nuevamente que el material tiene forma esférica y su tamaño va de 5-6 nm y el panel (d) muestra el espectro de los elementos d el material sintetizado, la presencia elemental de Co, Fe, O corresponden a NPs y C y Cu corresponden a los elementos presentes en la red donde se montó la muestra.

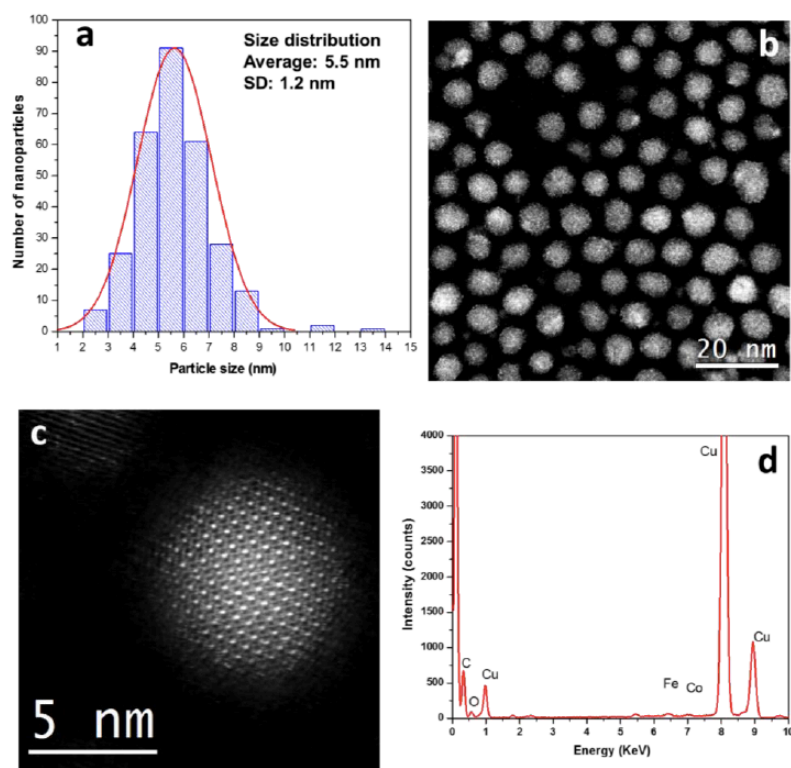


Figura 25 | STEM-HAADF. (a) Distribución del tamaño de partícula de CoFe_2O_4 , (b) Imagen STEM-HAADF corregida por Cs de bajo aumento de CoFe_2O_4 que muestra varias NP y una distribución muy estrecha, (c) Imagen STEM-HAADF corregida por Cs de CoFe_2O_4 (d) Perfiles EDS de NPs de CoFe_2O_4

La **Figura 26** representa un scan mapping que revela que exitosamente obtuvimos un material con estructura núcleo-coraza de tamaño aproximado a 10 nm.

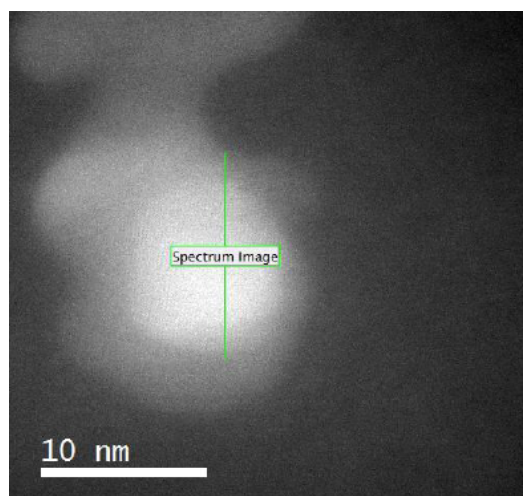


Figura 26 | Scan Mapping de la nanopartícula con núcleo de ferrita de cobalto y recubrimiento de oro.

Proteómica

A continuación se presentan los resultados que permiten cumplir con el segundo objetivo de esta investigación que fue identificar el receptor de membrana sobreexpresado en SCLC, siguiendo con la funcionalización superficial de las nanopartículas core-shell para finalmente evaluar *in vitro* su efecto terapéutico en SCLC.

El segundo objetivo del proyecto fue determinar un marcador tumoral característico de la línea celular de Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), con la finalidad de que dicha proteína o receptor sea la molécula blanco ó diana para que se use en la plataforma nanoterapéutica. En la literatura no hay alguna referencia al respecto. Inicialmente se realizó una búsqueda por proteómica de diferencias entre las proteínas de membrana de dos líneas celulares; la normal (MRC5) y la de SCLC (H69AR). El análisis reportó 123.724 péptidos (iones $z = 2 +$ o superior) en todo este estudio. El 86,92% de estos péptidos cayeron en un intervalo máximo de ± 10 ppm (**Figura 27**), lo que indica que la calibración del espectrómetro de masas fue adecuada.

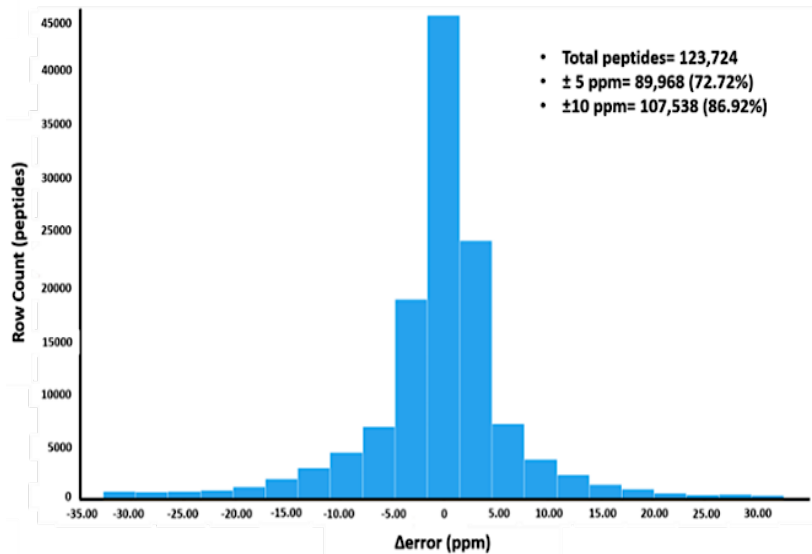


Figura 27 | Histograma que representa la fiabilidad y confianza de los péptidos detectados, un total de 123.724 péptidos; el 86,92% de ellos caen en un error máximo de ± 10 ppm.

Hay seis tipos de péptidos identificados, la mayoría de ellos, 79,1%, son péptidos de alta calidad denominados PepFrag1 (**Figura 28**), estos péptidos se condensan principalmente en m/z 500-900, que es lo esperado en experimentos proteómicos (**Figura 29**). Estos péptidos fueron los más confiables en el estudio ya que se identificaron durante la búsqueda en la base de datos pass-1 a través del algoritmo del software Progenesis, 6% representan péptidos de escisión perdidos, lo que indica que la actividad enzimática de la tripsina fue eficiente, 10% fueron péptidos con modificaciones variables incluyendo PTMs (VarMod), 3.8% se consideran PepFrag2 que representan péptidos con menos confiabilidad porque fueron identificados con menos restricciones durante la búsqueda en la base de datos, y finalmente, la pérdida neutra de H₂O y NH₃, así como los péptidos fragmentados en la fuente de iones (iones InSource) representan <1% del total de péptidos.

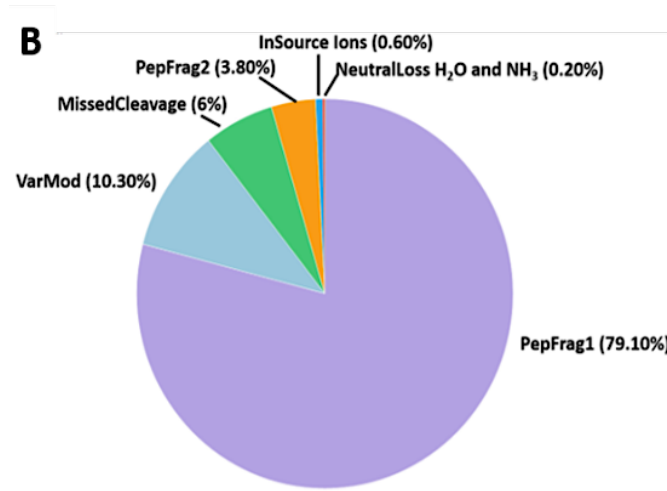


Figura 28 | Gráfico circular que representa los tipos de péptidos identificados, la mayoría de ellos 79.1%, son péptidos de alta calidad denominados PepFrag1.

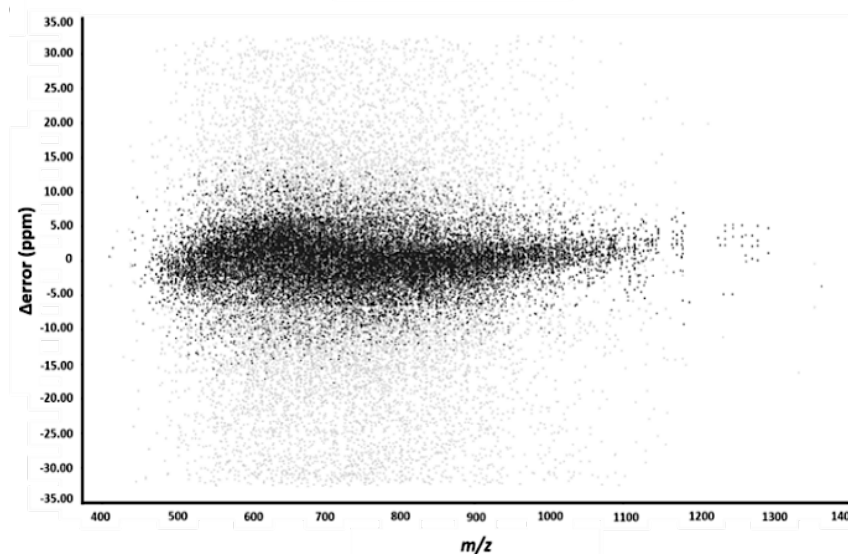


Figura 29 | La mayoría de los péptidos PepFrag1 se concentran a un máximo de ± 10 ppm en todo el rango m/z analizado (puntos negros), además estos péptidos se condensan principalmente en m/z 500-900.

El análisis completo a nivel de péptidos presenta un ajuste adecuado en términos de calibración, operabilidad de la fuente de ionización y efectividad enzimática (**Figura 30**), este gráfico representa la forma en la que los iones (solo péptidos) se mueven dentro de la celda de movilidad de Synapt G2-Si, después de eliminar los iones $z=1^+$ en función de sus tiempos de deriva; puntos verdes, iones $z=2^+$, puntos rojos, iones $z=3^+$, otros colores, iones con estados de carga superiores. Estos iones (123.724 péptidos) se utilizaron para la identificación y cuantificación en modo UDMSE.

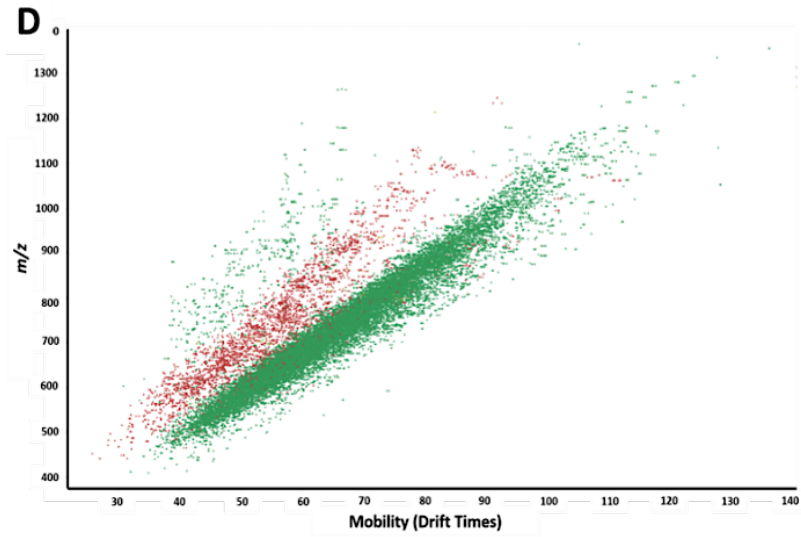


Figura 30 | Gráficos de movilidad iónica frente a m/z.

Estos péptidos corresponden a 1.298 proteínas cuantificadas, que se comparten en ambas líneas celulares, con un promedio de 9 péptidos por proteína en un rango dinámico ≈ 6.5 órdenes de magnitud (expresados como logaritmo \log_{10}) revelando una buena sensibilidad del espectrómetro y una normalización correcta de la inyección ya que ambos rangos dinámicos (MRC5 y H69AR) están ajustados correctamente (Figura 31).

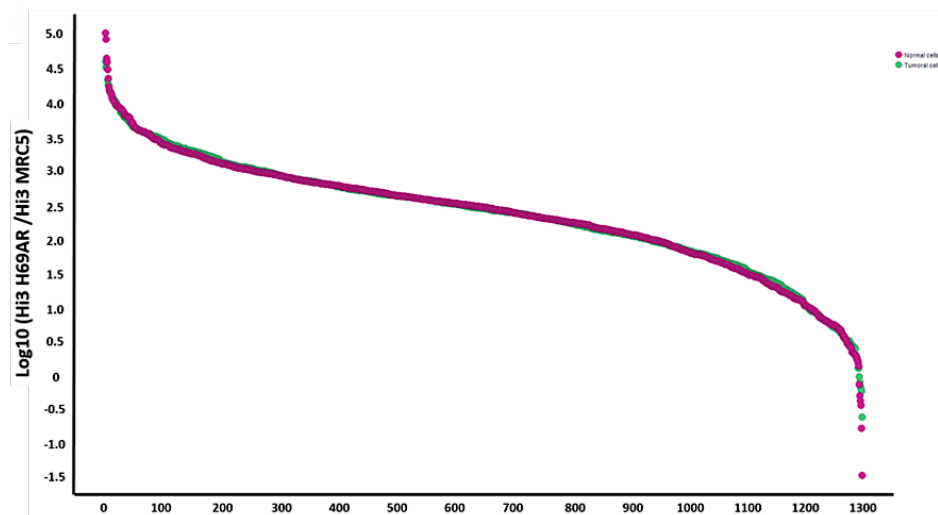


Figura 31 | Rango dinámico de proteínas de membrana cuantificadas, Fiabilidad y confianza (1.298 identificadas). En magenta, proteínas de la línea celular MRC5 y en verde, proteínas de la línea celular H69AR. El eje de abscisas corresponde al número de proteínas cuantificadas (ID's); el eje de ordenadas corresponde al promedio de intensidades Hi3 para cada proteína detectada (los valores se representan como logaritmo en base 10).

Las proteínas cuantificadas se filtraron ($CV \leq 0.30$, al menos 2 péptidos/proteína, considerando al menos un péptido único, las proteínas que se replicaron solo 3/3, valor de p ANOVA ≤ 0.05) y se descartaron las proteínas "Invertidas". Mediante el análisis de expresión realizado con un mapa de calor, se pudo visualizar la formación de cuatro cuadrantes diferenciados entre sí, en términos de abundancia, lo que indica diferencias marcadas en el perfil de expresión de proteínas de membrana entre ambas líneas celulares (**Figura 32**), lo que era de esperar por la naturaleza de éstas (Mirski, Gerlach, & Cole, 1987; Yamamoto, Lin, Lowe, Warren, & White, 1990),

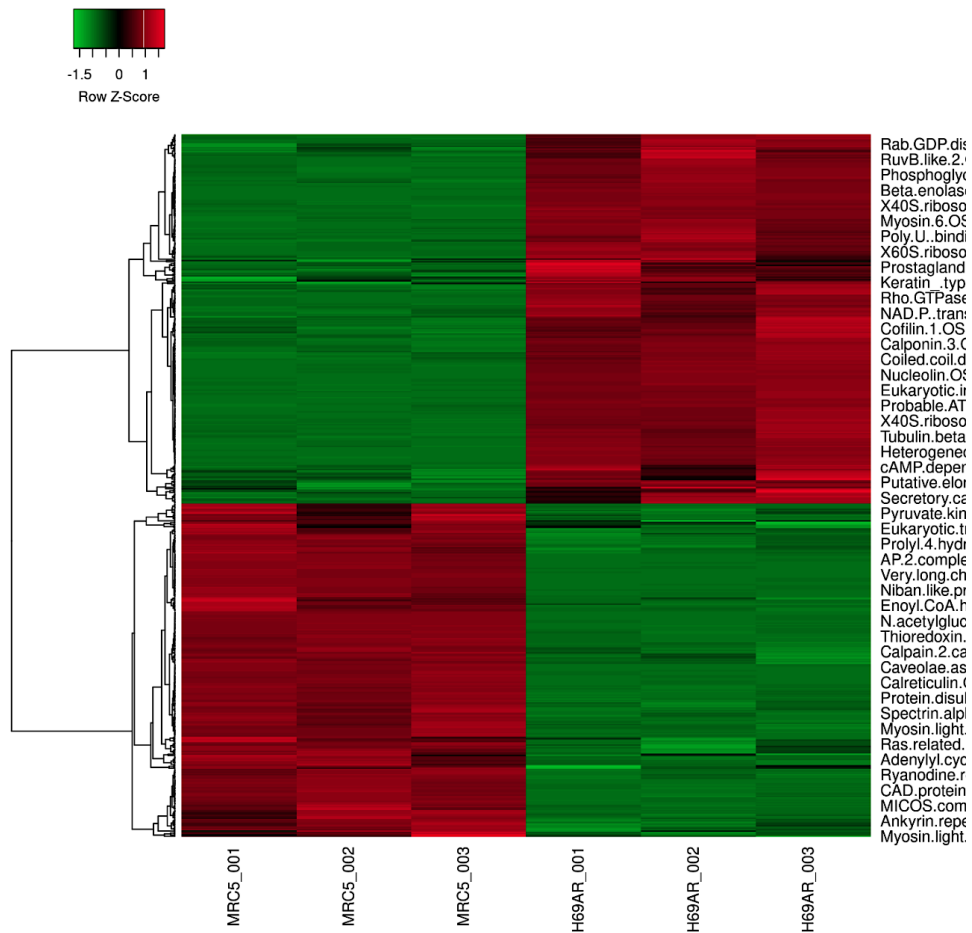


Figura 32 | Mapa de calor que representa la abundancia relativa de 548 proteínas de membrana filtradas para ambas líneas celulares. Se utilizaron triplicados para ambas condiciones para generar el gráfico. La abundancia relativa se representa mediante "Z-Score". Se observaron diferencias marcadas en la expresión entre ambas líneas celulares.

Sin embargo, no todas las proteínas analizadas en el mapa de calor se consideraron expresadas diferencialmente. Por tal motivo, dispersamos las proteínas en un diagrama de volcán utilizando un valor de corte de 1.2, expresado como logaritmo en base 2 (\log_2) (Ríos-Castro et al., 2020), y finalmente se reportaron 188 proteínas que se regulan al alza en células H69AR y 174 subexpresadas en células MRC5 (**Figura 33**).

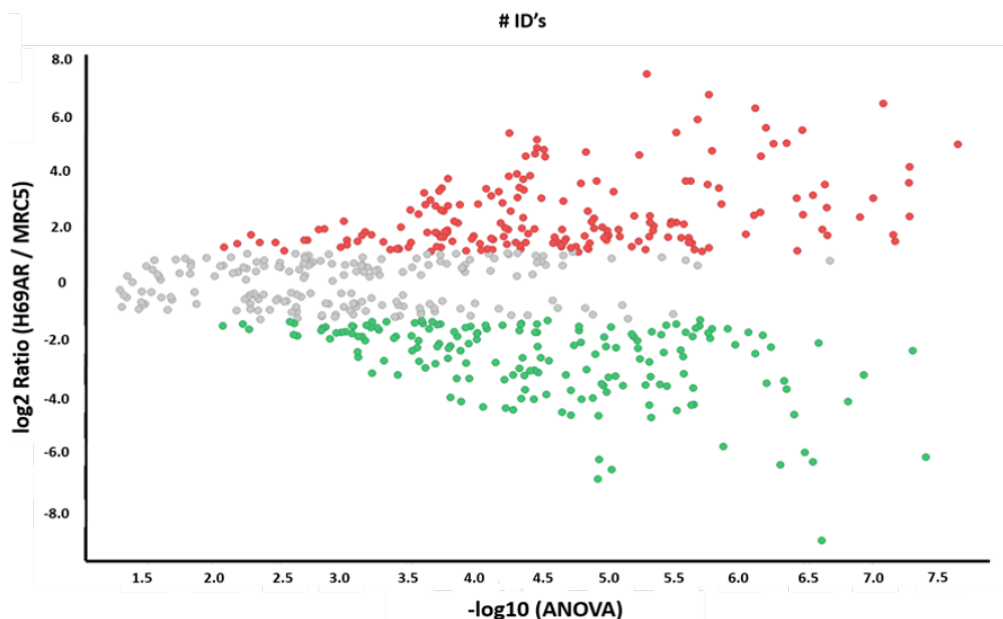


Figura 33 | Gráfico de volcán que representa todas las proteínas filtradas; los círculos grises son proteínas sin cambios (186), los círculos rojos proteínas reguladas al alza o sobreexpresadas (188), círculos verdes proteínas reguladas a la baja o subexpresadas (174). El eje de abscisas corresponde al valor p de cada proteína detectada en el triplicado técnico (los valores se representan como $-\log_{10}$) y el eje de ordenadas corresponde a la relación de la media de intensidades Hi3 (H69AR / MRC5) para cada proteína detectada (los valores se representan como logaritmo base 2

Además, identificamos 32 y 33 proteínas exclusivas en H69AR (Tabla 6) y MRC5 respectivamente (Tabla completa: Tabla A1 en Anexos). Todas las proteínas identificadas en este trabajo con sus correspondientes medidas espectrométricas se resumen en la Tabla A2, ver anexo. El FDR para todo el estudio, considerando al menos 8 péptidos para cada proteína, se obtuvo como 2.5% (nivel de proteína) y 2.75% (nivel de péptido).

Table 6 | Proteínas up-regulated y exclusivas en células H69AR.

Proteins up-regulated in H69AR cell line					
Accession	Description	Peptide Count	Unique peptides	Confidence score	Max Fold change
Q9C0G6	Dynein heavy chain 6_ axonemal	29	1	108.37	Exclusive in H69AR
P58107	Epiplakin	23	1	73.87	Exclusive in H69AR
Q7Z333	Probable helicase senataxin	17	1	63.52	Exclusive in H69AR
P07196	Neurofilament light polypeptide	6	4	45.06	Exclusive in H69AR
Q6ZQQ6	WD repeat-containing protein 87	12	1	36.39	Exclusive in H69AR
P98161	Polycystin-1 OS=Homo sapiens	7	1	32.84	Exclusive in H69AR
Q6TFL3	Coiled-coil domain-containing protein 171	8	1	30.99	Exclusive in H69AR
E9PD68	Dihydropyrimidinase-related protein 1	5	1	30.50	Exclusive in H69AR
Q8IZP2	Putative protein FAM10A4	5	1	28.75	Exclusive in H69AR
Q8IWI9	MAX gene-associated protein	8	2	26.96	Exclusive in H69AR
A0A0D9SFK2	Unconventional myosin-XVIIIa	7	1	25.05	Exclusive in H69AR
Q14498	RNA-binding protein 39	4	2	19.58	Exclusive in H69AR
Q66GS9	Centrosomal protein of 135 kDa	4	1	17.41	Exclusive in H69AR
A0A087X1B2	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	3	1	16.39	Exclusive in H69AR
Q9P0Z9	Peroxisomal sarcosine oxidase	3	1	14.86	Exclusive in H69AR

Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens	3	1	14.73	Exclusive in H69AR
O94823	Probable phospholipid- transporting ATPase VB	4	1	14.59	Exclusive in H69AR
Q13515	Phakinin	4	1	13.60	Exclusive in H69AR
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_ cytoplasmic	3	1	12.72	Exclusive in H69AR
Q96S21	Ras-related protein Rab-40C	3	1	12.55	Exclusive in H69AR
A0A0C4DGQ6	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A	2	1	11.97	Exclusive in H69AR
Q69YQ0	Cytospin-A	4	1	11.83	Exclusive in H69AR
G3V438	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 (Fragment)	2	1	11.02	Exclusive in H69AR
Q5TH69	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3	3	1	9.91	Exclusive in H69AR
B4DWR3	Prefoldin subunit 3	2	1	9.70	Exclusive in H69AR
G3V2D8	Zinc finger FYVE domain- containing protein 26	3	1	8.34	Exclusive in H69AR
Q5BKZ1	DBIRD complex subunit ZNF326	2	1	7.83	Exclusive in H69AR
P62266	40S ribosomal protein S23	2	1	7.71	Exclusive in H69AR
Q9ULX5	RING finger protein 112	2	1	7.38	Exclusive in H69AR
B1ANM0	Galectin (Fragment)	2	1	6.57	Exclusive in H69AR
K7EJ84	Dystrobrevin alpha (Fragment)	1	1	6.08	Exclusive in H69AR
P58397	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12	2	1	6.03	Exclusive in H69AR

P07910-2	Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	12	1	102.95	187.47
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	16	3	95.29	113.10
P52292	Importin subunit alpha-1	7	3	43.23	89.93
O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	3	2	15.85	80.34
F8W6I7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9	2	78.38	61.31
K7ENG2	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	3	2	19.67	49.85
P43243	Matrin-3	11	7	69.95	46.94
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	15	9	112.75	44.40
E9PGT6	COP9 signalosome complex subunit 8	2	1	12.37	43.70
Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	2	2	12.48	36.95
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	11	6	44.37	34.17
P33527	Multidrug resistance-associated protein 1	63	50	381.14	33.49
P02786	Transferrin receptor protein 1	28	18	173.00	32.86
P23246	Splicing factor_ proline- and glutamine-rich	7	6	45.73	30.12
P30626	Sorcin	6	5	29.52	29.06
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	26	14	141.98	28.05
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	18	9	107.40	27.24
P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	12	3	59.28	26.25
O14980	Exportin-1	10	7	61.64	25.29
O43592	Exportin-T	6	2	32.56	24.58
O60812	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	8	1	50.00	24.50

P12277	Creatine kinase B-type	19	14	100.42	24.28
A0A1W2PQ51	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	14	3	92.13	18.95
Q9Y230	RuvB-like 2	7	5	42.68	15.77
A0A0J9YVP6	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (Fragment)	3	2	17.61	15.19
Q96QB1	Rho GTPase-activating protein 7	13	2	51.83	15.08
P16435	NADPH—cytochrome P450 reductase	7	2	44.57	14.16
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	7	2	28.76	13.85
Q32P51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	17	5	63.56	13.38
P38159	RNA-binding motif protein_X chromosome	5	2	33.69	13.29
P35637	RNA-binding protein FUS	6	4	30.62	13.25
P13929	Beta-enolase	8	1	47.83	12.77
C9JDM3	Ran-specific GTPase-activating protein (Fragment)	2	2	15.43	12.56
P55011	Solute carrier family 12 member 2	9	3	40.26	12.16
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B	9	3	65.69	12.12
P61086	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	6	1	40.68	11.28
O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	17	6	73.50	11.22
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC	6	3	35.00	11.19
Q9UKA9	Polypyrimidine tract-binding protein 2	3	2	19.89	11.03
Q92616	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	21	6	80.91	10.69
P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	20	9	90.79	10.37
Q9Y265	RuvB-like 1	8	6	40.61	10.30
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	10	5	56.73	10.23

O15018	PDZ domain-containing protein 2	9	3	27.87	9.97
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	3	2	19.95	9.33
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III	8	3	50.04	9.28
P23526	Adenosylhomocysteinase	6	2	28.93	8.85
P19338	Nucleolin	33	23	168.76	8.73
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	13	9	86.47	8.69
Q8WXF1	Paraspeckle component 1	3	3	19.05	8.69
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	5	3	28.53	8.32
A0A087WVC4	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	4	1	20.52	8.16
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	28	3	106.67	7.73
A0A024RCR6	HLA-B associated transcript 3_ isoform CRA_a	3	2	15.52	7.58
B4DHE8	cDNA FLJ56904_ highly similar to RNA-binding protein Musashi homolog 2	5	3	32.26	7.56
A0A087WXQ7	POTE ankyrin domain family member C	2	1	10.94	7.48
Q92538	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1	2	1	10.40	7.45
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein_mitochondrial	4	1	24.42	7.19
P43246	DNA mismatch repair protein Msh2	7	2	35.87	7.18
P06748	Nucleophosmin	10	8	78.67	6.94
P13533	Myosin-6	10	1	37.30	6.56
Q10472	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	6	3	33.57	6.50
A0A087WYT3	Prostaglandin E synthase 3	2	1	9.18	6.32

P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	15	4	72.22	6.29
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	12	9	56.82	6.28
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	7	5	44.64	6.15
Q9NQT8	Kinesin-like protein KIF13B	9	2	42.97	5.88
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	19	15	96.51	5.77
P62258	14-3-3 protein epsilon	15	9	121.45	5.67
P05455	Lupus La protein	5	2	30.27	5.61
Q14974	Importin subunit beta-1	18	16	106.06	5.60
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	68	25	399.63	5.52
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	8	4	43.33	5.47
Q96BY6	Dedicator of cytokinesis protein 10	9	3	30.38	5.40
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	14	6	91.36	5.34
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	2	2	13.95	4.95
Q02878	60S ribosomal protein L6	3	3	18.77	4.94
P84085	ADP-ribosylation factor 5	6	3	30.83	4.86
P06733	Alpha-enolase	33	20	180.33	4.83
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	8	4	33.44	4.79
P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	3	1	15.31	4.78
Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	9	6	50.35	4.72
A0A087X054	Hypoxia up-regulated protein 1	13	6	71.24	4.72
Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	8	3	43.33	4.62
P69849	Nodal modulator 3	13	9	81.60	4.56
Q12931	Heat shock protein 75 kDa_mitochondrial	13	8	91.17	4.39

Q9UI47	Catenin alpha-3	5	1	23.70	4.28
Q9P2D1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	19	5	66.39	4.28
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	9	6	54.48	4.23
O95197	Reticulon-3	11	4	47.85	4.17
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	19	9	92.60	4.14
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase_cytoplasmic	12	3	59.77	4.08
P56192	Methionine—tRNA ligase_cytoplasmic	9	3	55.65	4.08
A0A087WTT1	Polyadenylate-binding protein	10	3	72.79	4.05
D6RAF8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment)	7	3	47.86	4.04
P62701	40S ribosomal protein S4_X isoform	6	6	42.46	4.03
P25398	40S ribosomal protein S12	2	2	6.11	4.01
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	5	2	19.12	3.99
Q9UJZ1	Stomatin-like protein 2_mitochondrial	5	3	32.02	3.96
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	19	4	101.31	3.90
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2	1	13.52	3.90
Q9Y2I7	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase	15	3	52.59	3.80
E7EP17	Dynein heavy chain 9_axonemal	7	1	25.66	3.78
K7ERF1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	2	1	12.19	3.76
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	3	2	6.65	3.76
Q4VXU2	Polyadenylate-binding protein 1-like	10	4	56.35	3.75

Q96A33	Coiled-coil domain-containing protein 47	2	2	11.80	3.66
P34897	Serine hydroxymethyltransferase_mitochondrial	11	3	54.59	3.63
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	10	5	62.84	3.60
P35916	Vascular endothelial growth factor receptor 3	4	1	15.44	3.51
A0A087WWK8	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1	3	1	10.63	3.51
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	47	17	347.54	3.51
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	22	12	105.92	3.50
P48449	Lanosterol synthase	8	1	45.20	3.49
P08754	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	5	1	33.18	3.49
P62263	40S ribosomal protein S14	2	2	6.16	3.44
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	5	2	29.54	3.43
A0A0B4J1R6	Transketolase	10	3	63.68	3.41
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	14	8	85.23	3.39
P62714	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	4	2	25.56	3.37
Q04917	14-3-3 protein eta	8	1	76.09	3.35
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	8	4	44.31	3.34
P21912	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_mitochondrial	12	5	59.21	3.34
P46783	40S ribosomal protein S10	2	1	14.55	3.34
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	13	9	74.24	3.31
B7Z9C2	cDNA FLJ58569_ highly similar to Nucleosome assembly protein 1-like 1	3	3	20.82	3.29

A0A2R8Y543	Catenin beta-1	4	1	21.70	3.28
P60174	Triosephosphate isomerase	19	11	97.12	3.26
A6NHL2	Tubulin alpha chain-like 3	3	1	30.08	3.25
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	6	3	35.66	3.23
P61981	14-3-3 protein gamma	17	10	84.93	3.20
O96008	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	4	2	27.66	3.19
O95831	Apoptosis-inducing factor 1_ mitochondrial	8	6	48.44	3.12
Q9Y536	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A	3	1	14.95	3.10
E9PLA9	Caprin-1 (Fragment)	2	2	11.22	3.10
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	13	7	105.51	3.09
J3QS41	Probable helicase with zinc finger domain	6	1	18.61	3.08
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	4	3	21.02	3.02
P13637	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	11	1	56.11	3.00
Q13185	Chromobox protein homolog 3	4	1	27.60	3.00
Q13885	Tubulin beta-2A chain	28	5	189.15	3.00
Q9BUP0	EF-hand domain-containing protein D1	3	2	16.60	2.98
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	5	1	26.47	2.97
E9PBL0	E3 ISG15—protein ligase HERC5	3	1	15.69	2.96
Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93	9	4	52.00	2.92
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	22	15	114.35	2.92
O75116	Rho-associated protein kinase 2	15	1	56.93	2.91
Q15417	Calponin-3	6	2	36.99	2.91
K7EKI0	Envoplakin	7	1	24.74	2.91

P32119	Peroxiredoxin-2	4	2	28.62	2.90
Q16658	Fascin	10	6	58.22	2.90
P07437	Tubulin beta chain	25	2	218.87	2.88
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	24	10	159.96	2.86
Q14240	Eukaryotic initiation factor 4A-II	22	5	107.25	2.86
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	19	5	110.41	2.85
P35268	60S ribosomal protein L22	3	1	16.28	2.85
A0A087WUS0	40S ribosomal protein S24	2	1	13.62	2.79
Q92598	Heat shock protein 105 kDa	8	2	42.55	2.74
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein_mitochondrial	28	11	148.59	2.72
P13639	Elongation factor 2	31	19	150.09	2.70
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	8	3	36.52	2.65
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	16	10	109.73	2.64
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	17	13	91.41	2.62
P68371	Tubulin beta-4B chain	32	8	201.07	2.62
P62249	40S ribosomal protein S16	7	5	32.18	2.59
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	7	3	32.15	2.59
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	5	3	28.17	2.58
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	5	2	28.46	2.58
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	20	9	134.10	2.56
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	9	3	51.90	2.56
Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	9	6	54.18	2.56
P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	7	1	49.57	2.51

P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	16	6	93.59	2.49
P62424	60S ribosomal protein L7a	6	4	41.53	2.49
Q86VI3	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	8	1	34.67	2.48
O60716	Catenin delta-1	8	3	45.92	2.48
P63244	Receptor of activated protein C kinase 1	11	8	54.24	2.48
P62269	40S ribosomal protein S18	3	1	19.29	2.46
P23396	40S ribosomal protein S3	23	15	108.38	2.46
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	14	7	78.94	2.44
P09211	Glutathione S-transferase P	10	9	92.47	2.44
P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	10	5	49.98	2.42
P62753	40S ribosomal protein S6	6	4	36.89	2.39
Q99497	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	3	1	21.86	2.38
Q9HDC9	Adipocyte plasma membrane-associated protein	12	7	60.20	2.38
P68363	Tubulin alpha-1B chain	24	8	158.13	2.36
B4DKY1	Cysteine—tRNA ligase_cytoplasmic	6	4	25.77	2.34
P08865	40S ribosomal protein SA	10	5	56.08	2.30

Las proteínas expresadas diferencialmente (427 proteínas) se analizaron en STRING y los resultados muestran que las proteínas participan en 212 rutas biológicas (**Figura 34**). Los valores de FDR se transformaron a un logaritmo de base 10 negativo, lo que significa que los valores más grandes en el eje de abscisas indican rutas mejor representadas. Muchos de ellos, participan en procesos biológicos relacionados con el desarrollo de tumores como los involucrados en el ciclo celular, la respuesta inmune, la síntesis de proteínas y el transporte de vesículas.

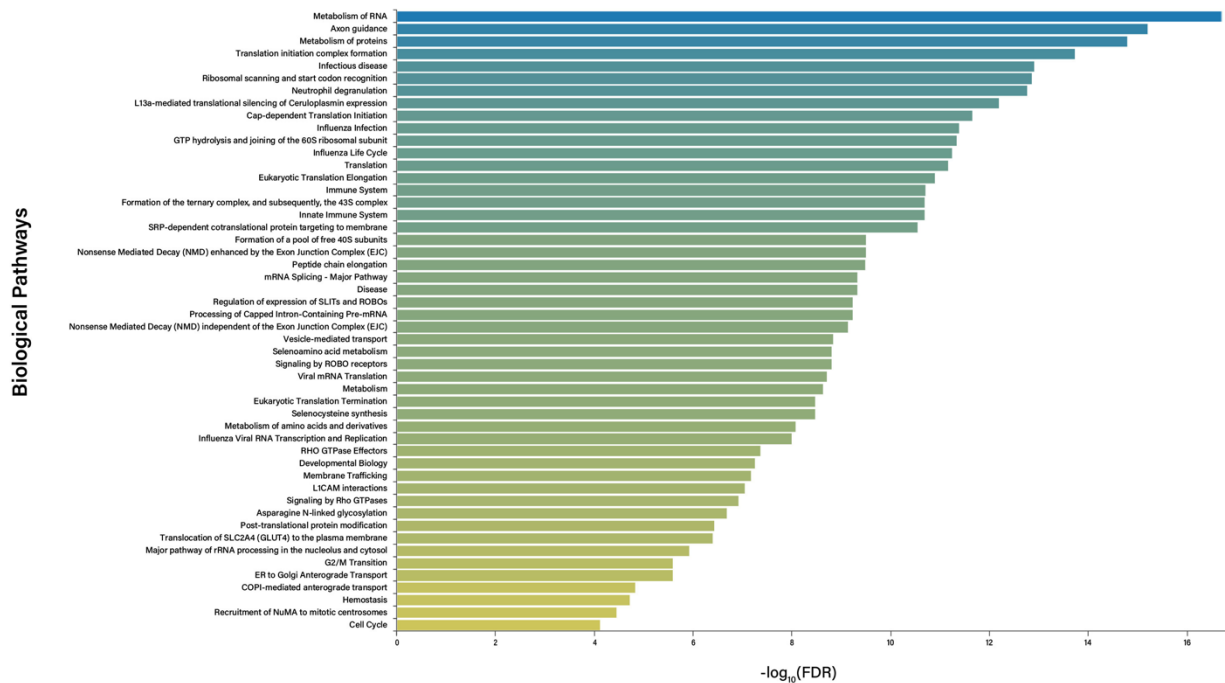


Figura 34 | Vías del Reactoma. Las proteínas expresadas diferencialmente están involucradas en 212 vías biológicas con $FDR \leq 0.05$. El gráfico de barras muestra las 50 vías biológicas principales. Los valores de FDR se transformaron a un logaritmo de base 10 negativo, lo que significa que los valores más grandes en el eje de abscisas indican rutas mejor representadas.

La vía mejor representada es la del metabolismo del ARN ($FDR = 2,06 \times 10^{-17}$); varios grupos de proteínas están participando en esta vía, como las helicasas de ARN de caja DEAD (DDX21, DDX39A, DDX39B, DDX46, DDX5, DHX9), estas proteínas son importantes en el proceso carcinogénico porque muchas de ellas están involucradas en la progresión y detención del ciclo celular, migración e invasión celular, apoptosis, coactivación de factores de transcripción involucrados en el desarrollo de tumores y participan en la regulación aberrante del ARN que desencadena el crecimiento celular (Fuller-Pace, 2013).

Otro cúmulo importante está formado por ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPF, HNRNPH2, HNRNPK, HNRNPR, HNRNPU, HNRNPUL1), que participan en una amplia gama de funciones en la reparación del ADN, la biogénesis de los telómeros, la remodelación cromosómica, la señalización celular y la regulación de la expresión génica tanto a

nivel transcripcional como traduccional mediante la influencia directa en el empalme del pre-ARNm a través de la unión específica del sitio con el ARN diana (Han, Li, & Zhang, 2013; Zhou, Shanas, Nelson, Bhattacharyya, & Shi, 2010).

La vía biológica implicada en la formación del complejo de iniciación de la traducción también está bien representada ($FDR = 1,94 \times 10^{-14}$) porque está formada por otros grupos que contienen factores de iniciación de la traducción eucariota (EIF3B, EIF3K, EIF4A1, EIF4A2, EIF4H). Las subunidades de eIF3 junto con otras subunidades de eIF ayudan a estabilizar la subunidad ribosómica 40S y muchas de ellas están reguladas positivamente en diferentes tipos de cáncer como mama, cuello uterino, pulmón, carcinoma de células escamosas, colorrectal, neuroblastoma, próstata, pulmón de células no pequeñas. Por otro lado, se ha informado que otras subunidades como eIF3F están reguladas a la baja en cáncer de mama, cáncer de vulva, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, entre otros (Ali, Ur Rahman, Jia, & Jiang, 2017). En este trabajo todos los factores de iniciación de la traducción eucariotas se reportan sobre-regulados y de acuerdo con este resultado, detectamos varias subunidades de proteínas ribosomales (RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS16, RPS18, RPS19, RPS23, RPS24, RPS3, RPS4X, RPS6, RPS8, RPSA) también reguladas al alza, lo que indica una alta presencia de eventos de traducción, esta desregulación a menudo se asocia con una función aberrante y perturbaciones en la expresión de componentes de la maquinaria de traducción en el cáncer (Bhat et al., 2015; Lindqvist, Tandoc, Topisirovic, & Furic, 2018).

El cáncer es una enfermedad multifactorial que tiene la capacidad de activar el sistema inmunológico innato y adquirido (Adam, Odhav, & Bhoola, 2003), esta vía biológica está bien representada en nuestros resultados ($FDR = 2.04 \times 10^{-11}$). Se encontraron desreguladas las proteínas importantes que participan en su regulación, por ejemplo, el interferón $\lambda 1$ (IFNL1), que activa la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) a través de la cascada Jak-STAT con el objetivo de activar la inmunidad y la citotoxicidad (Critchley-Thorne et al., 2009; Lasfar, Zloza, Silk, Lee, & Cohen-Solal, 2019; Syedbasha & Egli, 2017), se detectó solo en la línea celular MRC5, lo que indica

un mecanismo de defensa deteriorado en la línea celular H69AR, ya que estas células no pueden enviar señales externas para ser eliminadas.

Una característica importante de las células cancerosas es que adquieren antigenicidad, que el sistema inmunológico reconoce como no propio (Adam et al., 2003), por lo que la vía ubiquitina-proteosoma está activa para presentar antígenos a efectores como las células T (CTL CD8⁺) (Setiadi et al., 2008); en este sentido, la presencia regulada al alza de subunidades del proteosoma (PSMC3, PSMD11, PSMD12) o inmunoproteosoma (PSME1) (Yang et al., 2009), así como enzimas asociadas con ubiquitinación (UBA1, UBE2K, UBR) indican que el proceso de degradación de los antígenos es activo; pero por el contrario, encontramos la proteína TAP1 solo en las células MRC5, esta proteína es muy importante para la unión del antígeno al MCH clase-I por lo que los resultados sugieren que aunque se generan antígenos, estos no se unen al MCH clase-I en el retículo endoplásmico para alcanzar la membrana celular resultando en una presentación de antígeno aberrante en la línea celular H69AR, que es un mecanismo para evadir la respuesta inmune (Pedersen et al., 2017); este resultado amplía las observaciones previas, se ha visto que en la línea celular de SCLC, la presencia de un alelo defectuoso en TAP1 provoca un cambio de aminoácidos que conduce a una presentación defectuosa del antígeno (Chen et al., 1996), además, la restauración de la actividad de TAP1 en las células tumorales aumenta la susceptibilidad a la muerte mediada por CTL (Setiadi et al., 2008).

El ciclo celular es un proceso en el que las moléculas participantes deben estar perfectamente coordinadas para mantener la integridad del ADN; las desregulaciones del ciclo pueden deberse al cambio en la expresión de moléculas de andamiaje como las proteínas 14-3-3 (Hermeking & Benzinger, 2006), se encontró que algunas de estas proteínas estaban reguladas al alza (YWHAE, YWHAG, YWHAH, YWHAZ) dentro de la ruta del ciclo celular (FDR = 8.02×10^{-5}), su función es unir sus sustratos preferiblemente mediante motivos de fosforilación (RSXpSXP o RXXXpSXP) (Yaffe et al., 1997); muchos de sus sustratos como las quinasas dependientes de ciclina (CDK's), p27, p53, proteínas del ciclo de división celular (CDC's) participan en la progresión del ciclo celular para que puedan detener o activar las fases G1-S, G2-M (Hermeking & Benzinger, 2006). Las proteínas 14-3-3 también están relacionadas con el ensamblaje de microtúbulos porque pueden adaptar la proteína τ -fosforilada

(Sluchanko & Gusev, 2010), que es responsable del ensamblaje, y formar un complejo tripartito (14-3-3, proteína τ , tubulinas) por lo que tiene sentido que hayamos detectado algunas proteoformas de tubulina reguladas al alza (TUBA1B, TUBAL3, TUBB, TUBB2A, TUBB4B) y, como es ampliamente conocido, los microtúbulos son esenciales durante la progresión mitótica en el ciclo celular (D. Katsetos & Draber, 2012), así pues muchos fármacos como la vincristina, vinblastina y colchicina desestabilizan los microtúbulos y otros que los estabilizan, como el paclitaxel y la epotilona, se utilizan como agentes antitumorales (D. Katsetos & Draber, 2012).

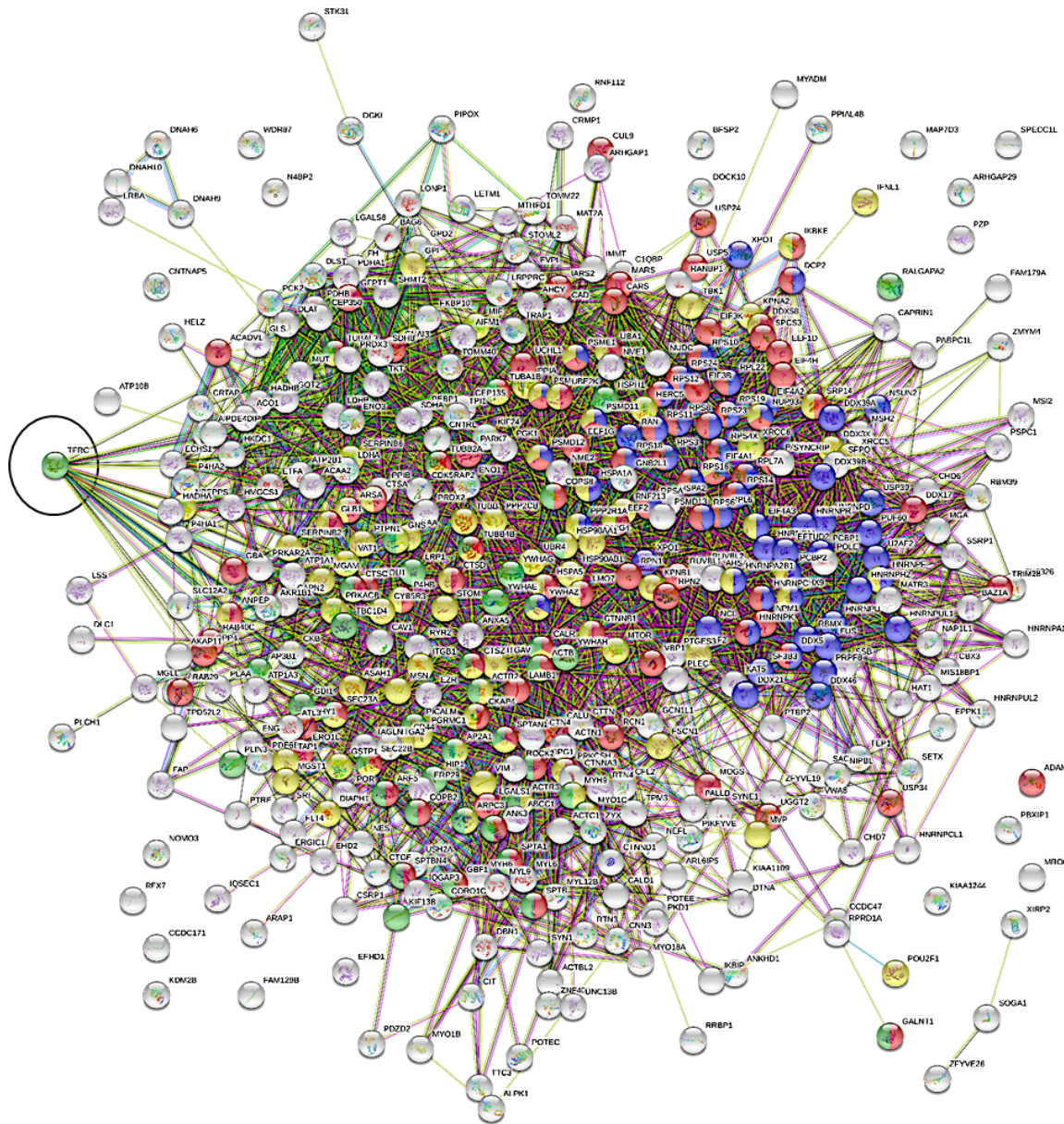
Por otro lado, los filamentos compuestos por proteínas del citoesqueleto como las tubulinas y actinas, así como las proteínas 14-3-3, tienen un papel extremadamente importante durante el transporte mediado por vesículas, los microtúbulos funcionan como un riel o pista sobre las que se mueven las proteínas motoras que transportan las vesículas recubiertas COPII que provienen llevando su carga del retículo endoplásmico hacia el *cis*-golgi (Hughson, 2010). Detectamos proteínas desreguladas asociadas con COPII como SEC23A, un componente del complejo 23/24 (Khoriaty et al., 2018) y SEC22B, una SNARE (del inglés '**SNAP** -Soluble NSF Attachment Protein- Receptor), involucrada en el reconocimiento y fusión a membrana *cis*-golgi) (Mancias & Goldberg, 2007), esta proteína se utiliza como marcador COPII (Ge, Zhang, & Schekman, 2014). Adicionalmente, detectamos componentes desregulados de COPI (COPB2, CPG1) y factor de ribosilación de ADP 5 (ARF5), que tiene la particularidad de que puede formar vesículas de COPI de la misma manera que lo hace ARF1 (Popoff et al., 2011); vislumbrando el tráfico de vesículas aberrantes desde *cis*-golgi a *trans*-golgi (Gurel, Hatch, & Higgs, 2014; Hughson, 2010). Curiosamente, detectamos los componentes principales (CLTC y CLTCL1) del tercer gran complejo con estructura de jaula, el complejo de clatrina, sin embargo, no están desregulados. Las jaulas de clatrina utilizan filamentos de actina durante la endocitosis para organizar espacialmente la maquinaria endocítica, deformar e invaginar la membrana plasmática, disolver la barrera cortical de actina, generar fuerza durante o después de la reacción de fisión y mover la vesícula hacia el citoplasma (Qualmann, Kessels, & Kelly, 2000); en este sentido, una desregulación de los filamentos de actina podría conducir a un mal funcionamiento de la endocitosis. Un dato contradictorio fue que encontramos reguladas a la baja actina (ACTB), proteínas relacionadas con actina (ACTR2, ACTR3, ARPC3) e incluso proteínas asociadas con actina (Capmany et al.,

2019; A. S. Smith et al., 2019) (ANK3, MYO1C, MYH9), ya que todas participan en la motilidad celular.

Sin embargo, se detectó que la proteína 1 del receptor de transferrina (TfR1) estaba regulada al alza. El TfR1 se ha estudiado ampliamente y se sabe que podría ser internalizado por vesículas recubiertas de clatrina (Hehnly & Stamnes, 2007; Mayle, Le, & Kamei, 2012), por lo general la interacción con actina durante el inicio de la formación de vesículas está mediada por la familia ERM, proteínas que contienen dominios PDZ, sin embargo, la iniciación de la formación de vesículas mediada por TfR1, que es deficiente en dominios PDZ, tampoco usa proteínas ERM, y en consecuencia, la actina pudiera no estar involucrada (Hehnly & Stamnes, 2007); lo que podría explicar los niveles de abundancia reportados en este trabajo para las proteínas que participan en la formación de vesículas recubiertas de clatrina. Los niveles de expresión de COPI, COPII y vesículas recubiertas de clatrina juegan un papel importante en los procesos carcinogénicos (Mellman & Yarden, 2013; Shtutman & Roninson, 2011; Y. Wang et al., 2018) ya que su regulación positiva se correlaciona principalmente con la proliferación celular; sin embargo, detectamos subunidades de estos complejos principalmente regulados a la baja, por lo que se deben realizar otros estudios moleculares para comprender su papel en la línea celular H69AR.

Visualizando el interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente pudimos notar un alto grado de interconexión entre ellas (**Figura 35**), lo que sugiere mecanismos moleculares totalmente diferenciados entre las líneas celulares. Esta red altamente interconectada se obtuvo en el algoritmo STRING utilizando 427 proteínas que se detectaron expresadas diferencialmente. En ambas líneas celulares el efecto que ejercen a nivel molecular, se puede diferenciar ya que la abundancia de cada una de las proteínas en una línea celular, es contraria en la otra. Muchas de las proteínas más interconectadas son las implicadas en el tráfico vesicular; pero entre ellos, centramos nuestra atención en TfR1, mencionado anteriormente, porque impacta la función de muchas otras proteínas del tráfico de vesículas como ACTR3, AP2A1, ACTR2, ARPC3, YWHAZ e incluso con HIP1, que regula el ensamblaje de jaulas de clatrina (Kawabata 2019) a través de su interacción directa (Legendre-Guillemain et al., 2005); en consecuencia, el TfR1 puede ejercer diversas acciones sobre vías

biológicas importantes dentro de las células cancerosas, como el metabolismo del



ARN, la formación del complejo de iniciación de la traducción, el sistema inmunológico, el ciclo celular, la endocitosis mediada por clatrina, el transporte mediado por vesículas, el tráfico de membranas y la gemación de vesículas derivadas de la clatrina, principalmente mediada por su interacción directa con proteínas desreguladas relacionadas con actina y proteínas de andamiaje ubicuas como YWHAZ (Figura 36).

Figura 35 | Interactoma de las proteínas expresadas diferencialmente entre la línea normal y SCLC. El interactoma revela la importancia de estas proteínas en el metabolismo de ambas líneas celulares con énfasis principal en la proliferación celular ya que muchas de ellas participan en procesos específicos como ciclo celular (esferas azules), síntesis de proteínas (esferas rojas), respuesta inmune (esferas amarillas) y tráfico vesicular (esferas verdes). Entre ellos destacamos TfR1 (círculo negro), que tiene un grado de interconexión alto que impacta en las acciones downstream.

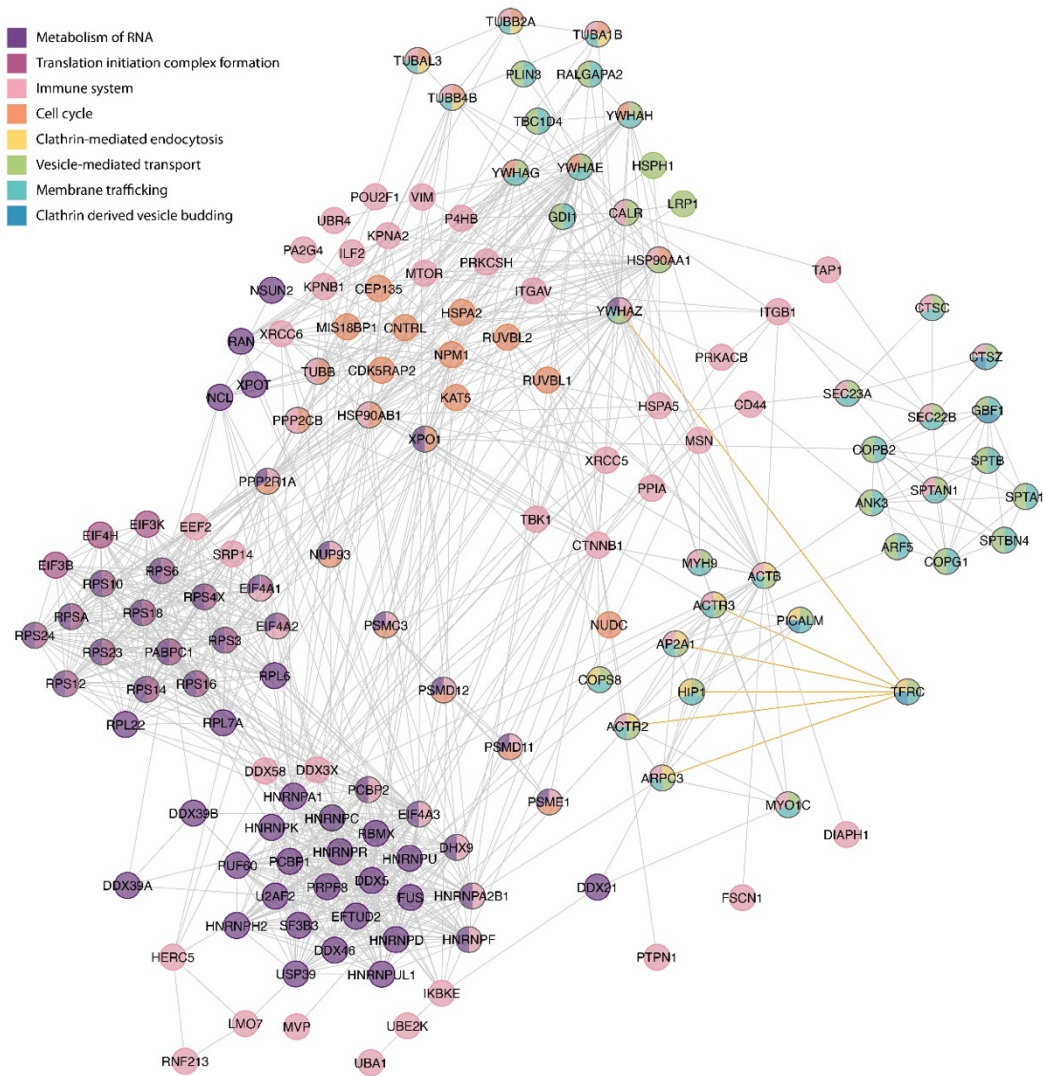


Figura 36 | Interactoma de la proteína TfR1 (TFRC).

Además, consideramos que TfR1 es importante por dos razones adicionales: a) uno de los objetivos de este trabajo fue detectar proteínas de la membrana plasmática que funcionan como receptores que pueden servir como diana para las CSNPs funcionalizadas; en este sentido, el TfR1 funciona como un receptor importante expresado en la membrana, ya que la captación de hierro mediada por transferrina

representa el principal mecanismo utilizado por las células de vertebrados para adquirir hierro del medio ambiente y proliferar (Wessling-Resnick, 2000) (**Figura 37**).

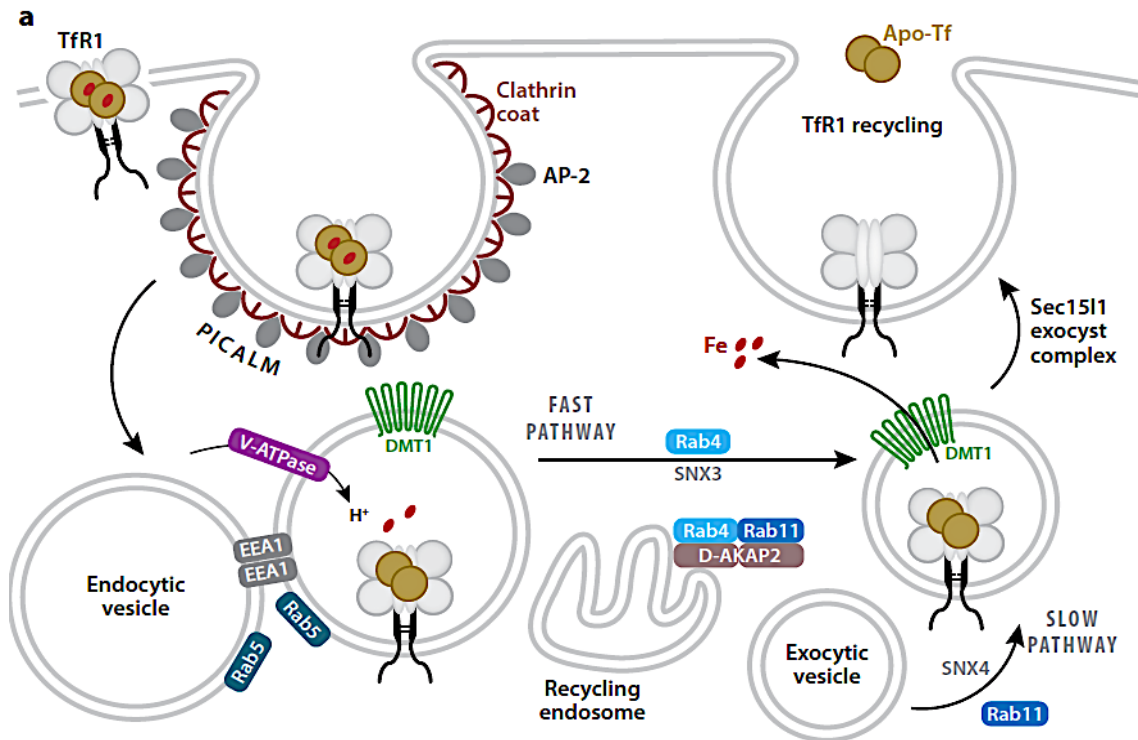


Figura 37 | Representación gráfica del mecanismo de internalización de Fe^{3+} a través de receptores de transferrina (TfR1). El receptor de transferrina-1 (TfR1) se agrupa en pozos recubiertos de clatrina a través de interacciones de clasificación con AP-2 (proteína adaptadora de clatrina-2) y PICALM (Proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol). Las vesículas endocíticas brotan rápidamente, se recluta EEA1 (antígeno 1 asociado al endosoma temprano) y los endosomas experimentan una fusión homotípica mediada por Rab5. Los endosomas se acidifican debido a la actividad V-ATPasa (H^+ -ATPasa vacuolar), y un pH bajo promueve la descarga de hierro, mientras que la apo-Tf permanece unida a TfR1. El transportador de metal divalente-1 (DMT1) media la liberación de hierro al citoplasma. El reciclaje implica vías lentas (Rab4/Rab11) y rápidas (Rab4); D-AKAP2 (proteína 2 de anclaje de quinasa A de doble especificidad) regula el tráfico a través del compartimento de reciclaje endocítico hacia estas vías. Las nexinas de clasificación (SNX3 y SNX4) ayudan a dirigir el Tf-TfR1 complejo para volver a la superficie celular donde el complejo de exocitosis media la fusión. Sec15l1, un componente del exocitosis, ayuda a dirigir el reciclaje TfR1. (Wessling-Resnick, 2018).

El mecanismo se basa en la internalización de Fe^{3+} a través de su ligando (Kawabata 2019), transferrina (TF), cuando TF se une a TRFC, el complejo TF/TRFC es endocitado por fosas recubiertas de clatrina (Hehnly & Stamnes, 2007; Kawabata, 2019), dentro del endosoma, el Fe^{3+} se convierte en Fe^{2+} mediante metaloreductasas

y se dirige al citosol a través de sus transportadores correspondientes (Gammella et al.2017; Kawabata 2019). Es importante mencionar que la transferrina libera el hierro de un ambiente ácido (Y. Lu & Low, 2002), y este ambiente ácido también es extremadamente útil ya que el enlace en las nanopartículas portadoras de fármacos potenciales ó quimioterapéuticos podría romperse, y así tener el fármaco biodisponible. Es deseable que los receptores seleccionados tengan expresión alta en las membranas de la línea celular H69AR y como mencionamos anteriormente, el TfR1 satisface esa característica, porque hay más abundancia en las células tumorales en comparación con las células no tumorales (Gammella, Buratti, Cairo, & Recalcati, 2017); para poner esta observación en contexto, TFRC es la 27^a proteína en el rango dinámico del proteoma de la línea celular H69AR, mientras que en MRC5 el rango dinámico es 725^a (**Figura 38**); además, y considerando solo proteínas reguladas al alza en la línea celular tumoral, TfR1 ocupa el puesto 15 en términos de abundancia y sólo un receptor es más abundante, el componente 1 del receptor de progesterona asociado a la membrana (PGRMC1), pero no se seleccionó porque la abundancia relativa es 9,33 veces en H69AR en comparación con MRC5 (32,86 veces para TRFC) (**Figura 39**) y porque es menos selectivo, puede unirse a una amplia variedad de moléculas como esteroides, hemes y progesterona (Cahill & Medlock, 2017).

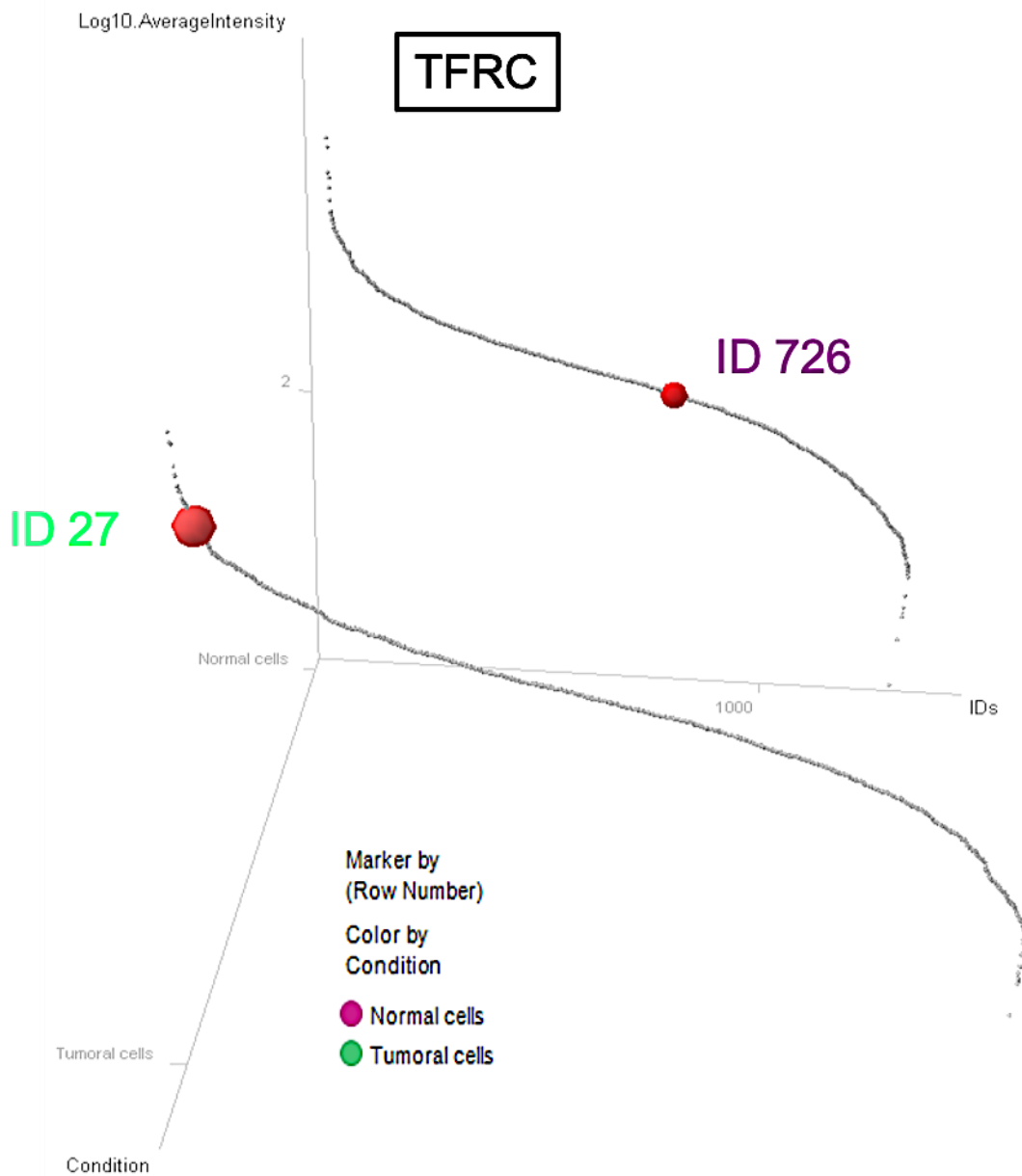


Figura 38 | Análisis de expresión de TRFC. Los rangos dinámicos de las células H69AR y MRC5 muestran la posición de la proteína TRFC; en las células tumorales (primer plano) TRFC se clasifica en el número 15, mientras que en las células normales (fondo) se clasifica en el número 725, la diferencia en abundancia fue un cambio de ≈ 33 veces (H69AR / MRC5).

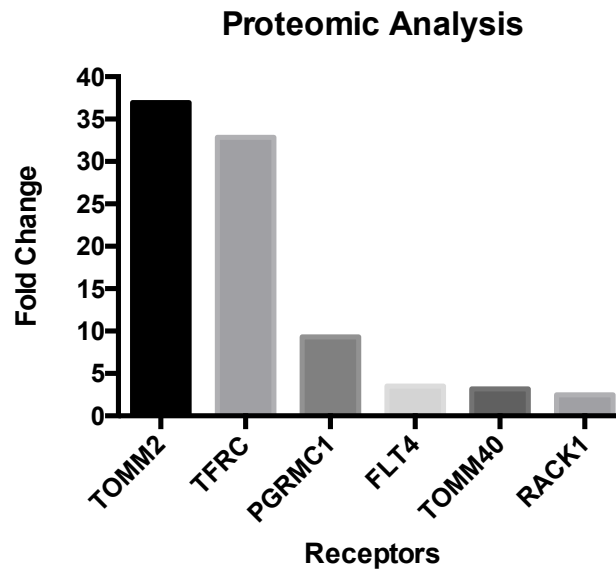


Figura 39 | Proteínas de membrana se sobreexpresadas en las células H69AR frente a las células de control MRC5.

La expresión diferencial de TfR1 se corroboró utilizando otras metodologías como Western blot. En la **Figura 40** podemos observar la banda de TfR1 se visualiza más en células cancerosas que en la muestra de células normales. Este resultado está acorde con la literatura donde se describe que CD71, (una glicoproteína de membrana homodimérica tipo II, ~95 kDa) se une y ayuda a la entrada de su ligando en las células para la liberación de hierro (Gammella et al., 2017); y citometría de flujo en la que realizamos los experimentos haciendo una comparación entre TFRC y Receptor de Folato (FOLR) (**Figura 41**); y entre TFRC y Receptor del factor de crecimiento de insulina (IGFR) (**Figura 42**), en ambos análisis la fluorescencia observada en el gráfico es > 85% en el cuadrante B \bar{F} correspondiente a la señal TfR1.

Western Blot

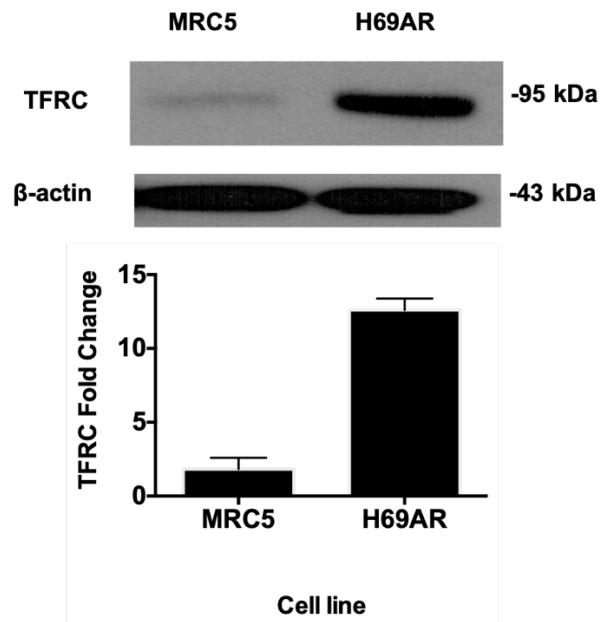


Figura 40 | Análisis por Westernblot de la abundancia del receptor de transferrina en células MRC5 y H69AR. TFRC está altamente regulado al alza en la línea celular H69AR, presentando un cambio diez veces más en comparación con la línea celular pulmonar normal.

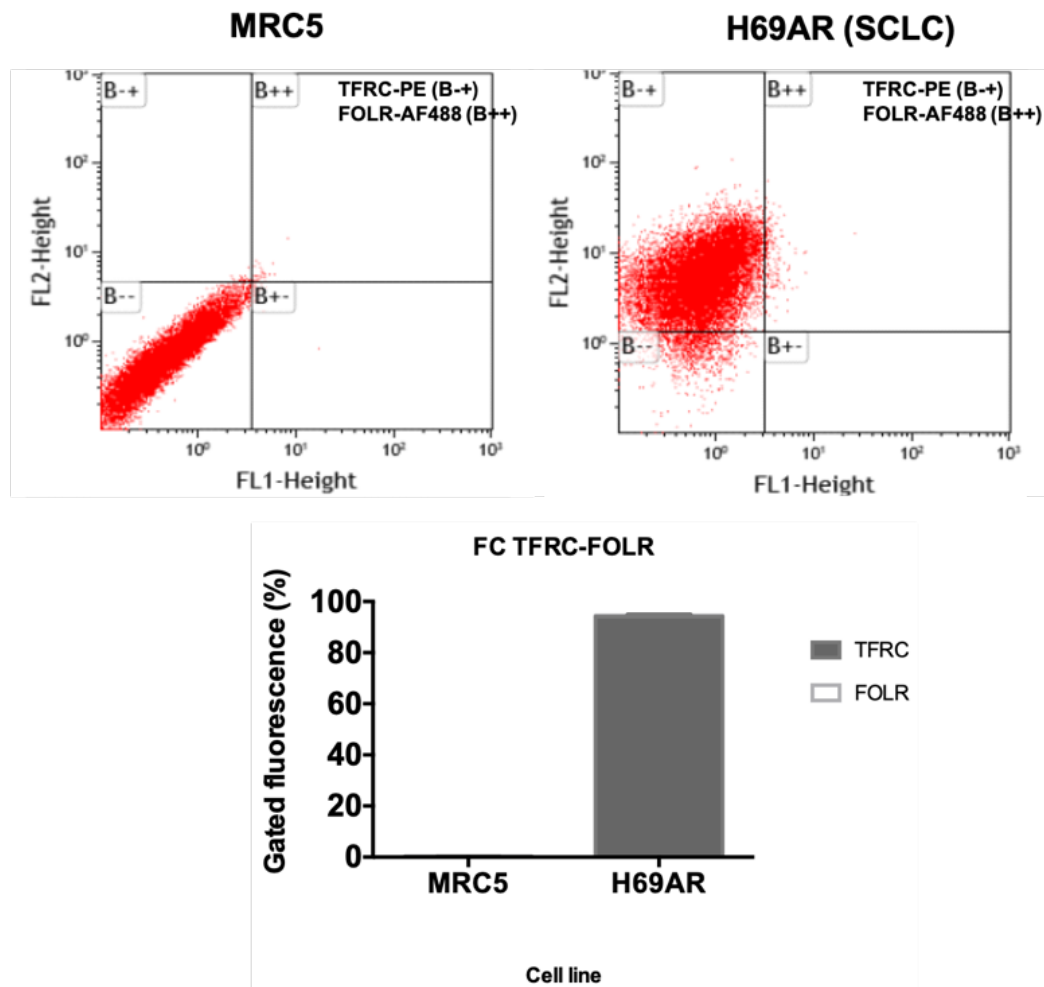


Figura 41 | Análisis de las líneas celulares control (MRC5) y tumoral (SCLC), por Citometría de Flujo. Para la identificación de dos diferentes receptores de membrana (TRFC= receptor tipo 1 de transferrina, IGFR= Receptor de Insulina), se uso un mix de anticuerpos. El gráfico de la fluorescencia media indica una señal TRFC (B- +) en un 86% y señal nula para FOLR.

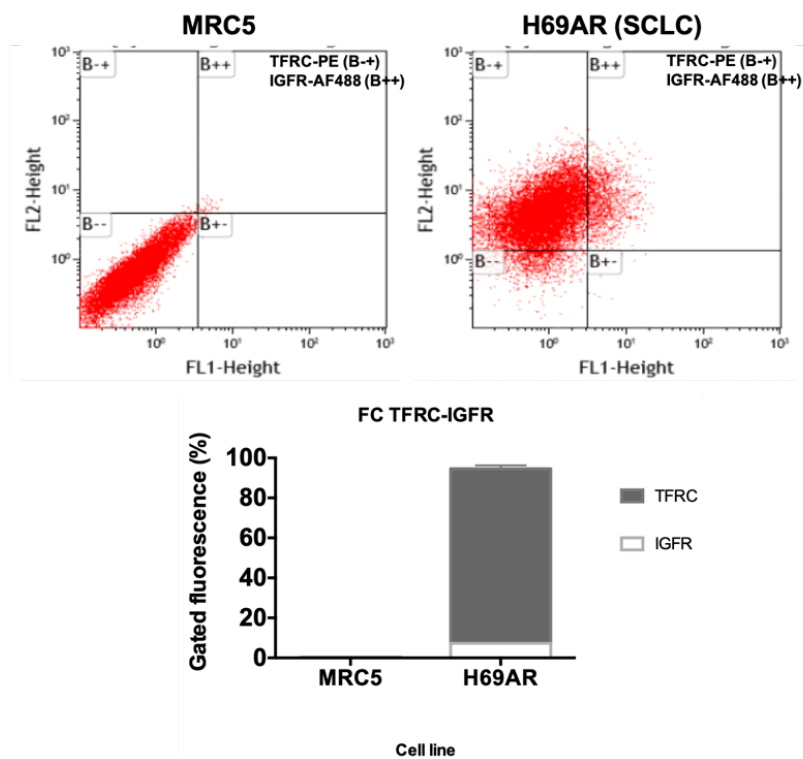


Figura 42 | Análisis por citometría de Flujo de las líneas celulares control (MRC5) y tumoral (SCLC). La identificación de los receptores membrana se realizo con un mix de anticuerpos (TRFC= receptor tipo 1 de transferrina, IGFR= Receptor de Insulina), la fluorescencia media indica una señal TRFC (B-+) en un 87% con un 7% de doble señal, TFRC-IGFR (B ++).

Otra de las metodologías utilizadas para confirmar los resultados proteómicos fue la inmunofluorescencia. En la Figura 43 se puede observar el resultado del análisis por microscopía de la presencia del receptor membranal TfR1 en la línea celular control MRC5 (Figura 43-A) y en la línea celular de SCLC (Figura 43-B), donde se puede notar que en las células hay una expresión diferencial de TfR1 (señal en verde).

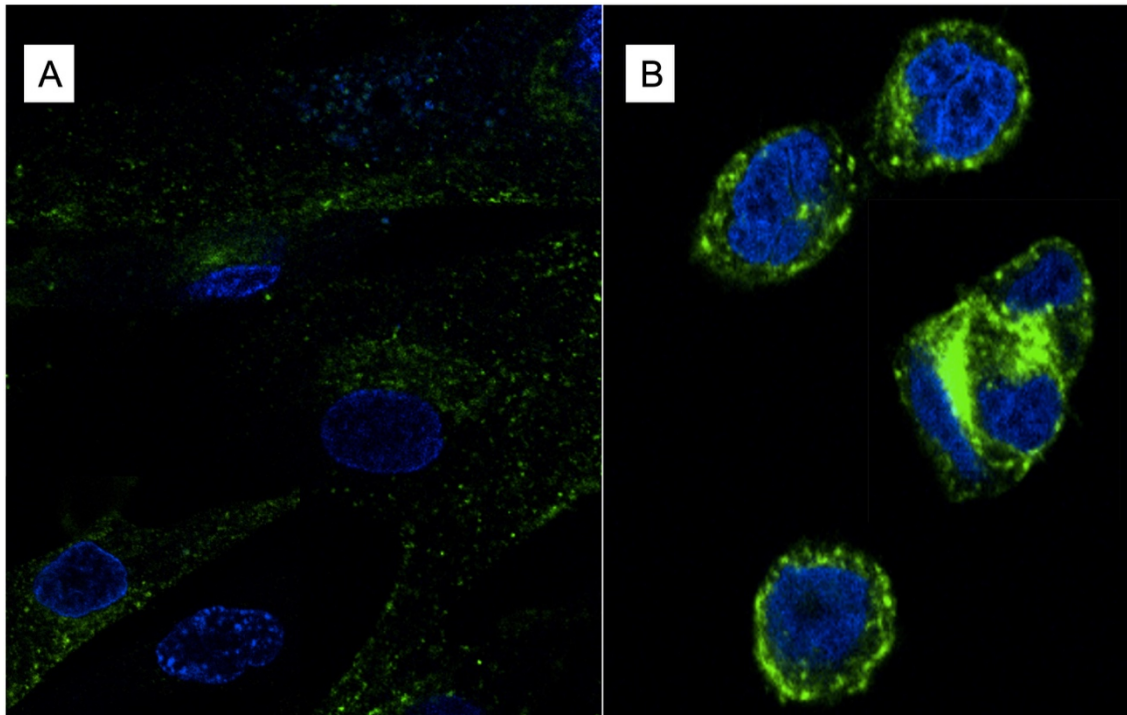


Figura 43 | Inmunofluorescencia indirecta del receptor Tfr1. A) IF en células MRC5. B) IF en células de SCLC. Anticuerpo primario anti-CD71 a una dilución de 1:500, anticuerpo secundario anti-ratón-AF488, 1:750.

Los resultados proteómicos hasta ahora obtenidos confirman que en la línea celular H69AR la expresión de Tfr1 es mucho mayor en comparación con la línea celular MRC5. Es importante señalar que los resultados obtenidos concuerdan en las cuatro metodologías utilizadas, confirmando que el Tfr1 es un receptor de membrana sobreexpresado en la línea celular tumoral y que es la proteína que utilizaremos como diana para la implementación de la terapia con nanopartículas para el cáncer de pulmón de células pequeñas en este proyecto.

Después de los resultados anteriores se procedió a realizar la modificación superficial de las nanopartículas core-shell proceso que se denomina funcionalización para poder pegar la transferrina (molécula de unión al receptor sobreexpresado Tfr1) haciendo uso del ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) como ligando. La metodología utilizada con algunas modificaciones se tomó de Springer Protocols como se muestra en el **Esquema 1** (Craig et al., 2010). La unión de la transferrina se cuantificó primero haciendo una separación física de las nanopartículas mediante el uso de un imán y

retirando el sobrenadante, lo que implicó extraer el exceso de transferrina disuelta en PBS. El residuo se analizó por electroforesis capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer) para la cuantificación de proteína excedente. En la **Figura 44** del gel se puede observar la banda de transferrina, una glicoproteína de 79 kDa, a partir de la cual se realizó el análisis cuantitativo, la cantidad de proteína obtenida en el sobrenadante fue de 10,34 μg de Tf y considerando que en el proceso de unión se adicionó inicialmente una cantidad de transferrina (Tf) de 15 μg , con esta metodología se comprobó que se unieron correctamente 5 μg de proteína a la superficie de oro de las nanopartículas. Después, se procedió a realizar los análisis de la activación de la endocitosis a través del receptor de transferrina tipo 1.

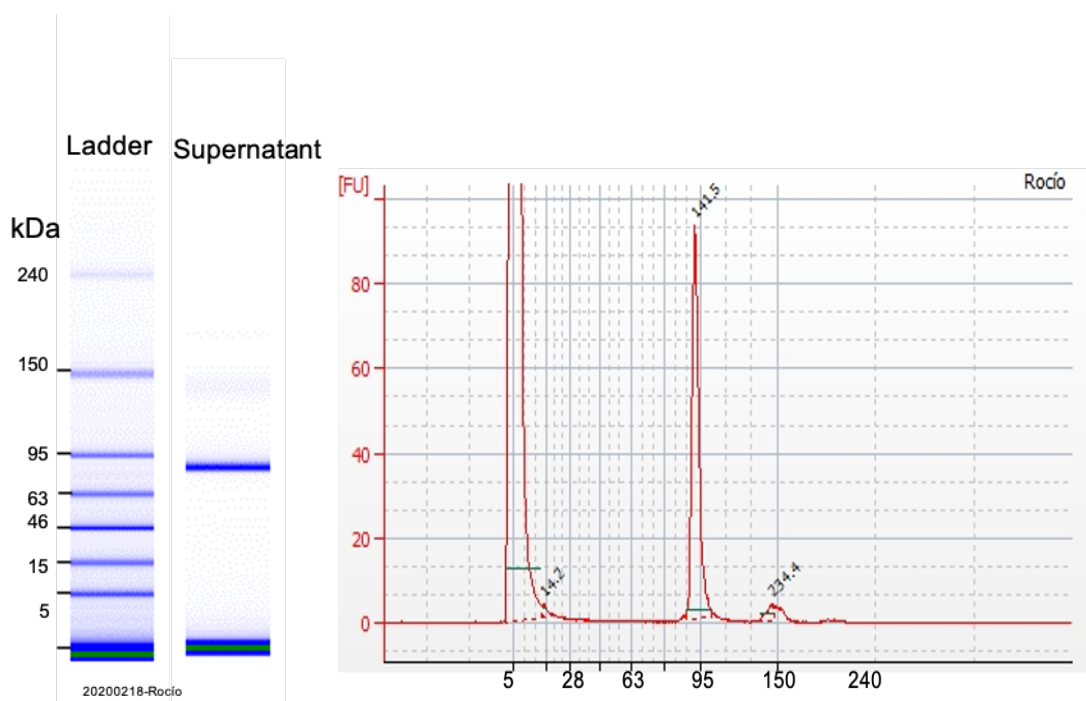


Figura 44 | Electroforesis capilar en Agilent analyzer. Cuantificación de transferrina presente en el sobrenadante después de la funcionalización y separación de las nanopartículas.

Los ensayos de endocitosis se realizaron con transferrina en su forma pura como control positivo de activación de la endocitosis mediada por el TfR1, esto con la finalidad de comparar qué tanto se activaba la endocitosis del complejo de CSNPs-Tf. En la **Figura 45**; se observa que los histogramas del grupo de células normales muestran una fluorescencia media insignificante a las 0.5 h y 16 h, este resultado es

el mismo en la proteína sola como del complejo CSNPs (Figura 45a.1-45a.2), esto se debe a que en condiciones normales células (línea celular MRC5) la expresión del TfR1 es muy baja y la endocitosis mediada por este receptor no se activa. Respecto a la línea de células cancerosas (H69AR) se observa que en principio es una población de células morfológicamente diferentes (**Figura 45-b.1**); y en **45-b.2** se observan histogramas de fluorescencia a las 0.5 y 16 h del complejo CSNPs en el que se detectó un cambio con respecto al tiempo, es decir, cuanto mayor es el tiempo de incubación, mayor es el nivel de activación de la endocitosis de Tf. El panel **45-b.3** muestra una comparación entre los niveles de endocitosis obtenidos de TF solo (control positivo, barras negras) y la endocitosis del complejo (barras grises); esto significa que el TFRC se expresa y se activa mayormente en las células cancerosas comparadas con las células normales

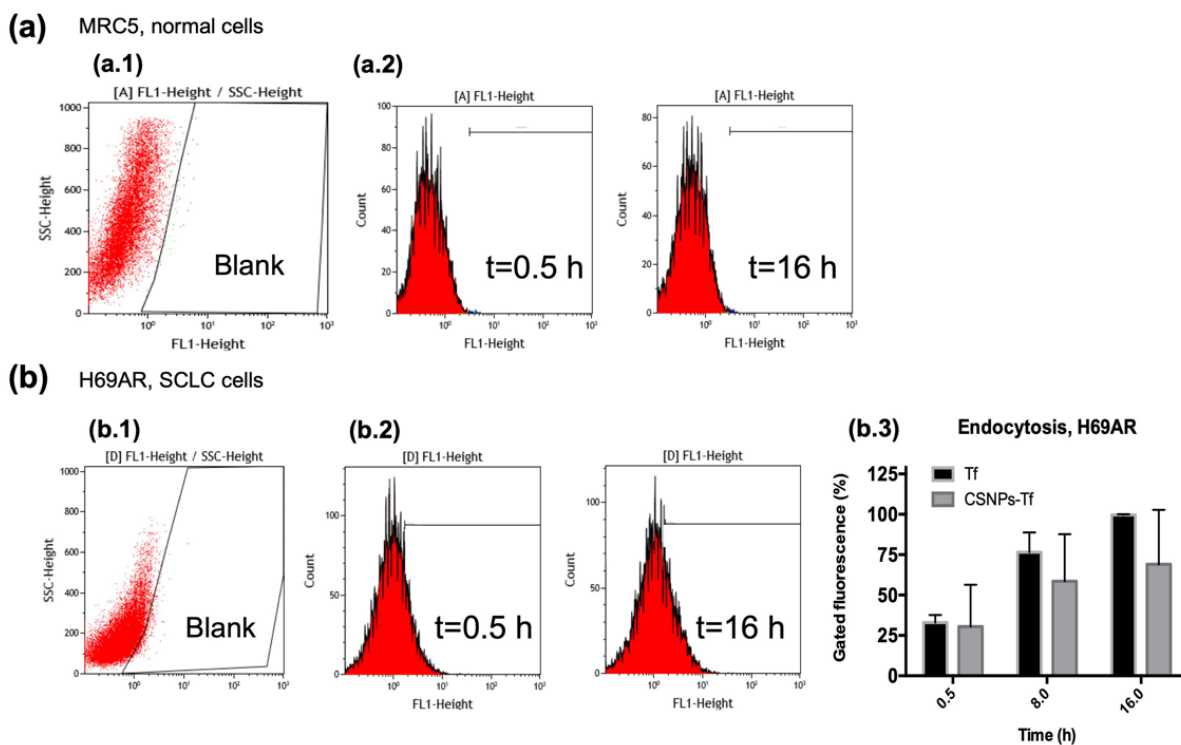


Figura 45 | Citometría de flujo para medir la internalización endocítica en células normales y SCLC. Las células MRC5 y H69AR se incubaron con Tf-AF488 (Tf) y CSNPs-Tf-AF488 (CSNP-Tf). Tf-AF488 se usó como control positivo para medir el valor máximo de fluorescencia de la endocitosis en ambas líneas celulares. Las células se incubaron a 37 °C para permitir la internalización de Tf-AF488 y el complejo CSNP en $t = 0.5, 8$ y 16 h. **(a.1)** Muestra blanco, **(a.2)** Perfiles representativos de $t = 0.5$ h y $t = 16$ h de internalización del complejo CSNP en una línea celular de control (MRC5); observamos que la fluorescencia (nivel de endocitosis) es la misma en los blancos y $t = 0.5$ y 16 h. **(b.1)** Muestra en blanco. **(b.2)** Perfiles representativos de $t = 0.5$ h y $t = 16$ h del complejo CSNP en la línea celular SCLC (H69AR), observamos que la fluorescencia (nivel de endocitosis) es diferente en el $t = 0.5$ y $t = 16$ h,

en (b.3) el gráfico muestra el cambio del porcentaje controlado de fluorescencia media de Tf-AF488 (barras negras) y el complejo CSNP (barras grises) frente al tiempo, la expresión de los datos como la media \pm SEM.

Otro factor primordial para la funcionalización de las nanopartículas para su uso terapéutico en SCLC fue la elección del fármaco quimioterapéutico para ello comparamos la citotoxicidad del irinotecán y del carboplatino frente a la línea celular de cáncer de pulmón (H69AR) y la línea celular normal (MRC5). Se ha demostrado previamente que el irinotecán es citotóxico para un panel de líneas de células cancerosas que incluyen SCLC (Matsumura et al., 2005; Van Ark-Otte et al., 1998), Por otro lado, se describió que el carboplatino es una buena opción frente a H69AR, una línea celular de cáncer quimioresistente. En cada experimento, comparamos la citotoxicidad de los fármacos en las células y la presentamos como porcentaje de viabilidad sobre las concentraciones de fármaco. En cada uno de los experimentos, la citotoxicidad del irinotecán fue grave tanto en la línea celular normal como en la cancerosa, lo que llevó la viabilidad de las células al 20% con solo 0,05 mM (**Figura 46**).

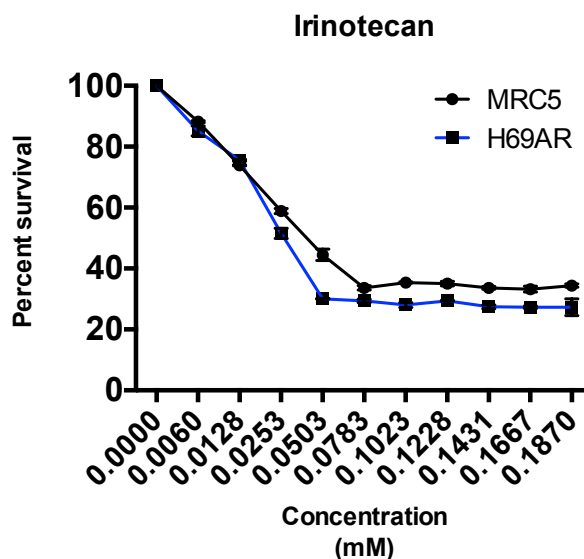


Figura 46 | Efecto del irinotecán sobre las líneas celulares normal (MRC5) cancerosa (H69AR). La viabilidad fue determinada por MTT.

Por otro lado, el carboplatino mostró una buena tendencia a disminuir la viabilidad celular de las células tumorales a menos del 60% mientras que las células normales permanecen viables en un 95% a la misma concentración (**Figura 47**).

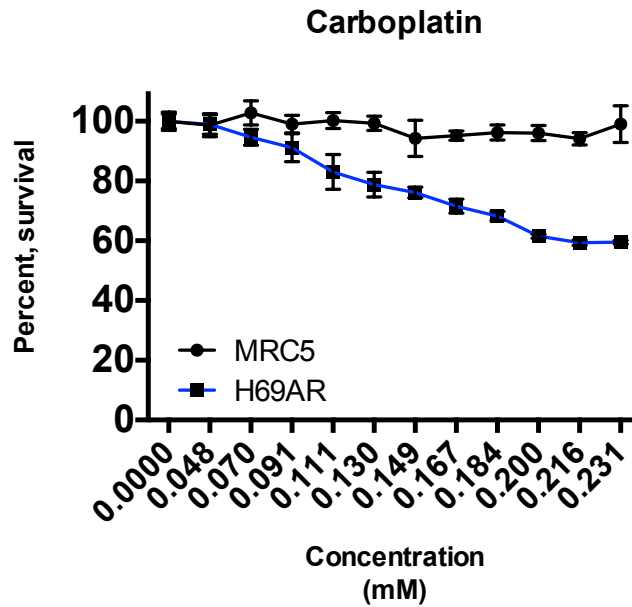


Figura 47 | Efecto del carboplatino sobre la viabilidad celular en las líneas celulares MRC5 y H69AR. La viabilidad fue determinada por MTT.

También se realizó un análisis de viabilidad para la línea celular normal y cancerosa con las nanopartículas solas, con el fin de tener conocimiento de las concentraciones adecuadas para el tratamiento sin que se genere un efecto citotóxico en las células (**Figura 48**).

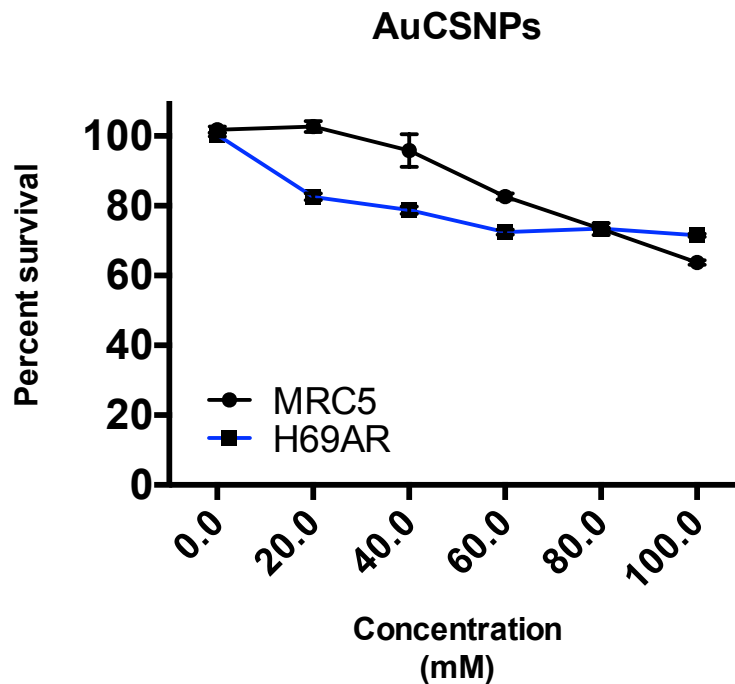


Figura 48 | Efecto de nanopartículas funcionalizadas con irinotecán sobre la viabilidad celular en las líneas celulares MRC5 y H69AR.

Resonancia Magnética De Imagen

El análisis por esta metodología se basa en el cambio de energía que presentan los átomos de hidrógeno que abundan en el organismo al someterse a un campo magnético, lo cual genera un contraste específico respecto a la proporción de la presencia de dichos átomos, en relación con las nanopartículas inyectadas vía intravenosa. En las **Figuras 49 y 50** se muestran los resultados de distribución de las nanopartículas de núcleo de ferrita y cubierta de oro, no funcionalizadas, las imágenes fueron obtenidas por Resonancia Magnética de Imagen. Las nanopartículas utilizadas en este estudio generan un contraste distinto. Se obtienen imágenes con tonos de grises, pero para percibir mejor, los tonos fueron cambiados a color verde y fondo azul, como los que se muestran en las figuras. En la figura 49 se muestran ratones control donde no se presentan tumores y en la 50 se analizó un ratón con tumor de SCLC y de izquierda a derecha, los tiempos en los cuales se tomaron las imágenes (0.5, 8 y 24 horas) y así determinar cuál era el tiempo de residencia en el organismo de las NPs y hacia dónde se dirigían. Las flechas en las imágenes indican la zona renal de los ratones. En la literatura se ha encontrado que las NPs al ser pequeñas tienden a permanecer en el organismo y posteriormente se dirigen al riñón para ser

excretadas. Este análisis de imágenes confirmó esto, observando la zona se puede identificar el cambio de contraste en color verde presentado a las 8 horas con respecto a la imagen de 0.5 horas, lo que indica que las NPs se encuentran almacenadas ahí para ser excretadas por la orina, y a las 24 horas estas partículas han sido eliminadas del organismo. En todos los ratones analizados se presentó el mismo comportamiento confirmando así que las NPs no permanecen más de un día después de haber sido suministradas a los ratones, característica que se ha identificado para diferentes sistemas reportados en la literatura que hacen uso de una línea celular diferente.

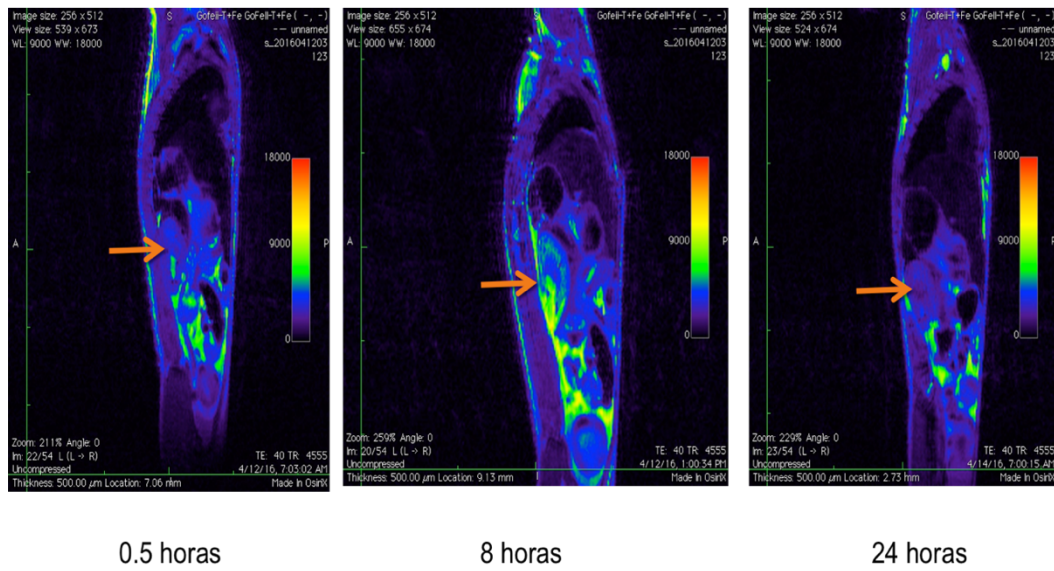


Figura 49 | Resonancia magnética de imagen, ratón control.

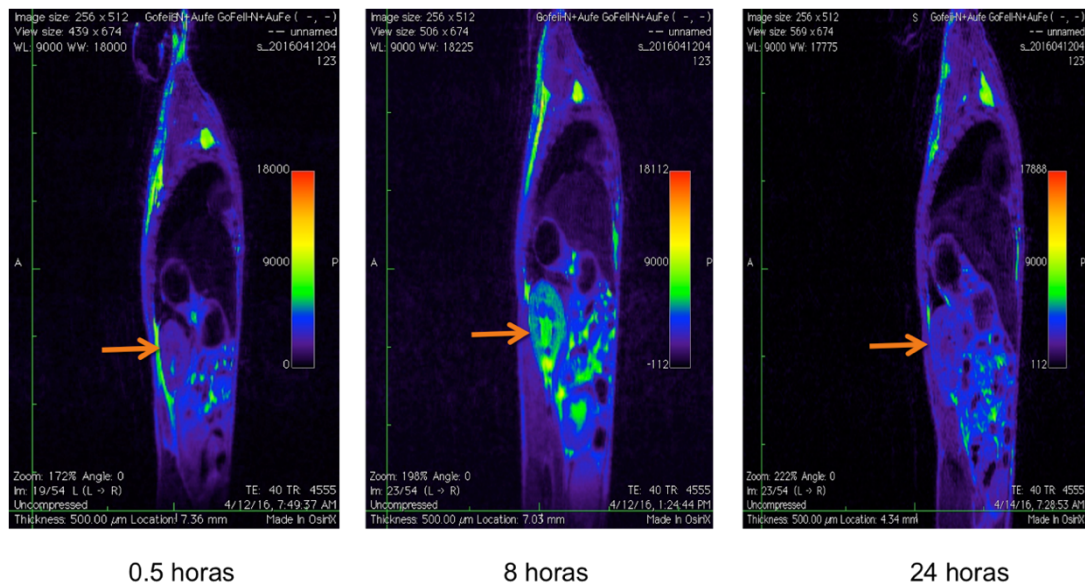


Figura 50 | Resonancia magnética de imagen, ratón con tumor inducido.

Este tipo de estudios son valiosos porque actualmente implementar métodos de diagnóstico tempranos para los pacientes que tienen algún tipo de cáncer resulta de vital importancia y las NPs como herramientas ayudarán en este ámbito.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) es una de las patologías más agresivas en la actualidad, esta investigación trató de identificar y de proponer qué elementos podían permitirnos funcionalizar las nanopartículas de oro para poder utilizarlo como método teragnóstico. Con base en lo expuesto anteriormente se concluye que:

- ✓ El receptor de transferrina tipo 1 (TfR1) está sobre expresado en el SCLC, y que por tanto es un blanco terapéutico esencial. Esto fue el primer paso para implementar un nanosistema basado en la orientación activa de la terapia contra el cáncer de pulmón de células pequeñas.
- ✓ La endocitosis se activa principalmente en las células malignas al funcionalizar las nanopartículas con el ligando (transferrina), así el nanocomplejo es internalizado por dichas células en su mayoría.
- ✓ El carboplatino es un fármaco con alto potencial para disminuir la viabilidad de las células de cáncer de pulmón manteniendo la integridad de las células control.
- ✓ Las nanopartículas utilizadas tienen las propiedades físicas, químicas y magnéticas ideales y sin efectos citotóxicos para ser potencialmente utilizado como método teragnóstico para el SCLC.

Este trabajo es un punto de partida para elucidar el camino hacia la implementación de un nanosistema que funcione como método de diagnóstico y de tratamiento contra el SCLC, vale la pena explorar mayormente su potencial contra el cáncer de pulmón.

Se tienen las siguientes perspectivas del trabajo:

- Ahondar más en los experimentos de viabilidad con nanopartículas funcionalizadas.
- Aplicar la terapia *in vivo*, al modelo murino propuesto, para analizar los efectos a nivel sistémico.
- Realizar RMI en el modelo murino con las nanopartículas funcionalizadas.
- Analizar proteínas apoptóticas de los tumores generados en ratones para determinar la efectividad de la terapia.
- Considerando el potencial de las nanopartículas, implementar terapia hipertérmica.

Referencias

- Adam, J. K., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2003). Immune responses in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(1), 113–132. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(03\)00056-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00056-1)
- Adams, L. A., Tyson, L. B., & Ginex, P. K. (2004). Small Cell Lung Cancer. In N. G. Houlihan & L. B. Tyson (Eds.), *Site-specific cancer series: Lung Cancer* (pp. 87–130).
- Ali, M. U., Ur Rahman, M. S., Jia, Z., & Jiang, C. (2017). Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(6), 1010428317709805. <https://doi.org/10.1177/1010428317709805>
- Araujo, L. H., Horn, L., Merritt, R. E., Shilo, K., Xu-Welliver, M., & Carbone, D. P. (2019). Cancer of the Lung: Non-Small Cell Lung Cancer and Small Cell Lung Cancer. *Abeloff's Clinical Oncology*, 1108-1158.e16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47674-4.00069-4>
- ASTM. (2006). Standard Terminology Relating to Nanotechnology. *American Society for Testing and Materials, E2456*, 4. <https://doi.org/10.1520/C0071-12.2>
- Azarmi, S., Roa, W. H., & Löbenberg, R. (2008). Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.006>
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>
- Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
- Baer, D. R., Engelhard, M. H., Johnson, G. E., Laskin, J., Lai, J., Mueller, K., ... Moon, D. (2013). Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles: Important needs and challenging opportunities. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 31(5). <https://doi.org/10.1116/1.4818423>
- Baetke, S. C., Lammers, T., & Kiessling, F. (2015). Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *British Journal of Radiology*. <https://doi.org/10.1259/bjr.20150207>
- Bahman, F., Elkaissi, S., Greish, K., & Taurin, S. (2019). Polymeric Micelles in Management of Lung Cancer. In *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815720-6.00008-3>
- Barberena, E. C., Cervantes Ríos, E., & Ortiz Muñoz, A. R. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio: citometría de flujo*. Universidad Autónoma Metropolitana. Retrieved from <https://catalogo.altexto.mx/manual-de-practicas-de-laboratorio-citometria-de-flujo-jorgg.html>
- Baskar, R., Ann-Lee, K., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Science*, 9(3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00024>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Belgiovine, C., D'Incalci, M., Allavena, P., & Frapolli, R. (2016). Tumor-associated

- macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2166-5>
- Berger, W., Setinek, U., Hollaus, P., Zidek, T., Steiner, E., Elbling, L., ... Micksche, M. (2005). Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: Prognostic implications. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131(6). <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0653-9>
- Bernabeu, E., Cagel, M., Lagomarsino, E., Moreton, M., & Chiappetta, D. A. (2017). Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.016>
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., & Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd4505>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cabanes Domenech, A., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., Pollán, M., & López-Abente, G. (2009). La situación del cáncer en España, 1975-2006. *Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III, 1975–2006*. Retrieved from http://www.isciii.es/htdocs/publicaciones/documentos/SituacionCancerenEspana1975_2006_2010.pdf
- Cahill, M. A., & Medlock, A. E. (2017). Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.12.020>
- Caldorera-Moore, M., Guimard, N., Shi, L., & Roy, K. (2010). Designer nanoparticles: Incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opinion on Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1517/17425240903579971>
- CancerCare. (2016). Lung Cancer 101.
- Capmany, A., Yoshimura, A., Kerdous, R., Caorsi, V., Lescure, A., Del Nery, E., ... Schauer, K. (2019). MYO1C stabilizes actin and facilitates the arrival of transport carriers at the Golgi complex. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.225029>
- Casado, D. I. (2008). *Cáncer de pulmón microcítico*. Arán Ediciones, S.L. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=5bfXgg9izv0C>
- Chen, H. L., Gabilovich, D., Tampé, R., Girgis, K. R., Nadaf, S., & Carbone, D. P. (1996). A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng0696-210>
- Cherukuri, P., & Curley, S. A. (2010). Use of nanoparticles for targeted, noninvasive thermal destruction of malignant cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 624, 359–373. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_24
- Chiang, A., & Massague, J. (2008). Molecular Basis of Metastasis — NEJM. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0805239>
- Craig, G. A., Allen, P. J., & Mason, M. D. (2010). Synthesis, characterization, and functionalization of gold nanoparticles for cancer imaging. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 624, 177–193. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609->

- Crintea, A., Dutu, A. G., Samasca, G., Florian, I. A., Lupan, I., & Craciun, A. M. (2021). The nanosystems involved in treating lung cancer. *Life*, *11*(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/life11070682>
- Critchley-Thorne, R. J., Simons, D. L., Yan, N., Miyahira, A. K., Dirbas, F. M., Johnson, D. L., ... Lee, P. P. (2009). Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901329106>
- D. Katsetos, C., & Draber, P. (2012). Tubulins as Therapeutic Targets in Cancer: from Bench to Bedside. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/138161212800626193>
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001>
- Días López-Ayllón, B. (2013). Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de cancer stem cells (CSC) derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP). Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/282119>
- Ehya, H., & Young, N. A. (2003). Cytologic approach to tumors of the tracheobronchial tree. *Chest Surgery Clinics of North America*, *13*(1), 41–62. [https://doi.org/10.1016/s1052-3359\(02\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s1052-3359(02)00044-3)
- Engelberg, S., Netzer, E., Assaraf, Y. G., & Livney, Y. D. (2019). Selective eradication of human non-small cell lung cancer cells using aptamer-decorated nanoparticles harboring a cytotoxic drug cargo. *Cell Death and Disease*, *10*(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1870-0>
- Falk, S., & Williams, C. (2009). *Lung Cancer*. OUP Oxford. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=R4EFRj-MV3YC>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Farrell, D., Alper, J., Ptak, K., Panaro, N. J., Grodzinski, P., & Barker, A. D. (2010). Recent advances from the national cancer institute alliance for nanotechnology in cancer. In *ACS Nano* (Vol. 4). <https://doi.org/10.1021/nn100073g>
- Farrell, D., Ptak, K., Panaro, N. J., & Grodzinski, P. (2011). Nanotechnology-based cancer therapeutics - Promise and challenge - Lessons learned through the NCI alliance for nanotechnology in cancer. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0214-7>
- Franklin, W. A., Noguchi, M., & Gonzalez, A. (2010). Molecular and cellular pathology of lung cancer. In D. P. Pass, D. H. Carbone, J. D. Johnson, J. D. Minna, G. V. Scagliotti, & A. T. Turrisi (Eds.), *Principles and practice of lung cancer* (4th ed., pp. 287–324). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fuller-Pace, F. V. (2013). DEAD box RNA helicase functions in cancer. *RNA Biology*. <https://doi.org/10.4161/rna.23312>
- Gabizon, A., Shmeeda, H., & Barenholz, Y. (2003). Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: Review of animal and human studies. *Clinical Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342050-00002>
- Gammella, E., Buratti, P., Cairo, G., & Recalcati, S. (2017). The transferrin receptor: The cellular iron gate. *Metallomics*. <https://doi.org/10.1039/c7mt00143f>
- García-Fernández, C., Fornaguera, C., & Borrós, S. (2020). Nanomedicine in non-small cell lung cancer: From conventional treatments to immunotherapy. *Cancers*, *12*(6), 1–26. <https://doi.org/10.3390/cancers12061609>

- Ge, L., Zhang, M., & Schekman, R. (2014). Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.04135>
- Gheorghe, D. C., Niculescu, A. G., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Nanoparticles for the treatment of inner ear infections. *Nanomaterials*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/nano11051311>
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., ... Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*(1), 15009. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
- Gurel, P. S., Hatch, A. L., & Higgs, H. N. (2014). Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.033>
- Han, N., Li, W., & Zhang, M. (2013). The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.122506>
- Hanada, K., Asano, K., Nishimura, T., Chimata, T., Matsuo, Y., Tsuchiya, M., & Ogata, H. (2010). Use of a toxicity factor to explain differences in nephrotoxicity and myelosuppression among the platinum antitumour derivatives cisplatin, carboplatin and nedaplatin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *60*(3). <https://doi.org/10.1211/jpp.60.3.0006>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hehnlly, H., & Stamnes, M. (2007). Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.094>
- Hermeking, H., & Benzinger, A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2006.03.002>
- Hoet, P. H. M., Brüske-Hohlfeld, I., & Salata, O. V. (2004). Nanoparticles - Known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>
- Houlihan, N. G., & Paolilli, D. E. (2004). Overview of Lung Cancer. In N. G. Houlihan & L. B. Tyson (Eds.), *Site-specific cancer series: Lung Cancer*. (2nd ed., pp. 1–4).
- Huang, C. H., Shepherd, F. A., & Kelly, K. (2010). Chemotherapy for small cell lung cancer. In H. I. Pass, D. P. Carbone, D. H. Johnson, J. D. Minna, G. V. Scagliotti, & A. T. Turrisi (Eds.), *Principles and practice of lung cancer* (4th ed., pp. 847–866). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hughson, F. M. (2010). Copy Coats: COPI Mimics Clathrin and COPII. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.031>
- Hussain, S. (2016). Nanomedicine for treatment of lung cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 890). https://doi.org/10.1007/978-3-319-24932-2_8
- IARC. (2020). Mexico Source: Globocan 2020. *International Agency for Research on Cancer WHO*, 929, 1–2. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, *7*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193>
- Jain, A. K., & Thareja, S. (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*.

- <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1561457>
- Jasim, A., Abdelghany, S., & Greish, K. (2017). Current Update on the Role of Enhanced Permeability and Retention Effect in Cancer Nanomedicine. In *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809717-5.00002-6>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60(5), 277–300. <https://doi.org/10.3322/caac.20073>
- Kawabata, H. (2019). Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>
- Khoriaty, R., Hesketh, G. G., Bernard, A., Weyand, A. C., Mellacheruvu, D., Zhu, G., ... Ginsburg, D. (2018). Functions of the COPII gene paralogs SEC23A and SEC23B are interchangeable in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805784115>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lammers, T, Hennink, W. E., & Storm, G. (2008). Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *British Journal of Cancer*, 99(3), 392–397. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604483>
- Lammers, Twan, Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.063>
- Lasfar, A., Zloza, A., Silk, A. W., Lee, L. Y., & Cohen-Solal, K. A. (2019). Interferon Lambda: Toward a Dual Role in Cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research : The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 39(1), 22–29. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0046>
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Traini, D., & Young, P. M. (2015). Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: Advantages and challenges. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.08.009>
- Legendre-Guillemain, V., Metzler, M., Lemaire, J. F., Philie, J., Gan, L., Hayden, M. R., & McPherson, P. S. (2005). Huntingtin Interacting Protein 1 (HIP1) regulates clathrin assembly through direct binding to the regulatory region of the clathrin light chain. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408430200>
- Leiderman, Y. I., Kiss, S., & Mukai, S. (2007). Molecular genetics of RB1 - The retinoblastoma gene. *Seminars in Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1080/08820530701745165>
- Lindqvist, L. M., Tandoc, K., Topisirovic, I., & Furic, L. (2018). Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.11.003>
- Lomonte, B. (2007). Manual de Metodos Inmunológicos. *Métodos Inmunológicos*, 138. Retrieved from http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/9244/2007_Manual_Metodos_Inmunologicos_completo_web.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Lu, C., Stewart, D. J., Lee, J. J., Ji, L., Ramesh, R., Jayachandran, G., ... Roth, J. A. (2012). Phase I clinical trial of systemically administered TUSC2(FUS1)-nanoparticles mediating functional gene transfer in humans. *PloS One*, 7(4).

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034833>
- Lu, Y., & Low, P. S. (2002). Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents, *54*, 675–693.
- Macdonald, V. (2009). Chemotherapy: Managing side effects and safe handling. *Canadian Veterinary Journal*, *50*(6).
- Maitra, A. (2019, March). Molecular envoys pave the way for pancreatic cancer to invade the liver. *Nature*. England. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-00710-z>
- Mancias, J. D., & Goldberg, J. (2007). The Transport Signal on Sec22 for Packaging into COPII-Coated Vesicles Is a Conformational Epitope. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.017>
- Mao, S.-Y., & Mullins, J. M. (2010). Conjugation of fluorochromes to antibodies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *588*, 43–48. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_6
- Marti, G. E., Stetler-Stevenson, M., Bleesing, J. J. H., & Fleisher, T. A. (2001). *Introduction to flow cytometry. Seminars in Hematology* (Vol. 38). [https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(01\)90043-5](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(01)90043-5)
- Martin, S., & Mulrooney, T. (2004). Biology of Lung Cancer. In N. G. Houlihan & L. B. Tyson (Eds.), *Site-specific cancer series: Lung Cancer*. (2nd ed., pp. 5–20).
- Matsumura, T., Takigawa, N., Kiura, K., Shibayama, T., Chikamori, M., Tabata, M., ... Tanimoto, M. (2005). Determinants of cisplatin and irinotecan activities in human lung adenocarcinoma cells: Evidence of cisplatin accumulation and topoisomerase I activity. *In Vivo*.
- Mayle, K. M., Le, A. M., & Kamei, D. T. (2012). The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.009>
- McDuff, F. K. E., & Turner, S. D. (2011). Jailbreak: Oncogene-induced senescence and its evasion. *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.07.004>
- Medina, M. A., Oza, G., Gonz, M., Antaño-I, R., Vera, A., Leija, L., ... Arriaga, L. G. (2020). Synthesis, Characterization and Magnetic Hyperthermia of Monodispersed Cobalt Ferrite Nanoparticles for Cancer Therapeutics. *Molecules*, *25*(19).
- Mellman, I., & Yarden, Y. (2013). Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016949>
- Merkle, C. J., & Loescher, L. J. (2005). Biology of cancer. In C. Yarbrow & M. Goodman (Eds.), *Cancer nursing: Principles and practice*. (6th ed., pp. 3–25). Sudbury, MA: Jones & Bartlett.
- Mirski, S., Gerlach, J., & Cole, S. (1987). Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin. *Cancer Research*, *47*(10), 2594–2598.
- Morales-Cruz, M., Delgado, Y., Castillo, B., Figueroa, C. M., Molina, A. M., Torres, A., ... Griebenow, K. (2019). Smart targeting to improve cancer therapeutics. *Drug Design, Development and Therapy*, *13*, 3753–3772. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S219489>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Nayak, P. P., Narayanan, A., Kaveri Badekila, A., & Kini, S. (2021). NANOPARTICLE-BASED DRUG DELIVERY (M GOGOI, SECTION EDITOR) Nanomedicine in Cancer Clinics: Are We There Yet?, 43–55. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s40139-021-00220-6>
- Nayak, S. K., Panesar, P. S., & Kumar, H. (2009). p53-Induced apoptosis and inhibitors of p53. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(21), 2627–2640.

- <https://doi.org/10.2174/092986709788681976>
NCCN. (2013). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer.
- Norouzi, M., Nazari, B., & Miller, D. W. (2017). Electrospun-based systems in cancer therapy. In *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101022-8.00013-2>
- Norouzi, Mohammad. (2018). Recent advances in brain tumor therapy: application of electrospun nanofibers. *Drug Discovery Today*.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.02.007>
- Norouzi, Mohammad. (2020). Gold Nanoparticles in Glioma Theranostics. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104753>
- Norouzi, Mohammad, & Hardy, P. (2021). Clinical applications of nanomedicines in lung cancer treatment. *Acta Biomaterialia*, 121, 134–142.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.009>
- Norouzi, Mohammad, Nazari, B., & Miller, D. W. (2016). Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug Discovery Today*.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.07.006>
- Norouzi, Mohammad, Yathindranath, V., Thliveris, J. A., & Miller, D. W. (2020). Salinomycin-loaded iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy. *Nanomaterials*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/nano10030477>
- Pedersen, M. H., Hood, B. L., Beck, H. C., Conrads, T. P., Ditzel, H. J., & Leth-Larsen, R. (2017). Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncot Immunology*. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1305531>
- Pelengaris, S., & Khan, M. (2006). DNA replication and the cell cycle. In S. Pelengaris & M. Khan (Eds.), *The molecular biology of cancer* (pp. 88–119). Malden, MA.: Blackwell Publishing Ltd.
- Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., ... Vizcaíno, J. A. (2019). The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1106>
- Peters, S., Adjei, A. A., Gridelli, C., Reck, M., Kerr, K., & Felip, E. (2012). Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(SUPPL. 7).
<https://doi.org/10.1093/annonc/mds226>
- Popoff, V., Langer, J. D., Reckmann, I., Hellwig, A., Kahn, R. A., Brügger, B., & Wieland, F. T. (2011). Several ADP-ribosylation factor (Arf) isoforms support COPI vesicle formation. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.261800>
- Qualmann, B., Kessels, M. M., & Kelly, R. B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*.
<https://doi.org/10.1083/jcb.150.5.F111>
- Reid, G., Pel, M. E., Kirschner, M. B., Cheng, Y. Y., Mugridge, N., Weiss, J., ... van Zandwijk, N. (2013). Restoring expression of miR-16: A novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Annals of Oncology*, 24(12).
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdt412>
- Ríos-Castro, E., Souza, G. H. M. F., Delgadillo-Álvarez, D. M., Ramírez-Reyes, L., Torres-Huerta, A. L., Velasco-Suárez, A., ... Tapia-Ramírez, J. (2020). Quantitative Proteomic Analysis of MARC-145 Cells Infected with a Mexican Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain Using a Label-Free Based DIA approach. *Journal of the American Society for Mass*

- Spectrometry*. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00134>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, (Md), 1–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
- Roth, J. A. (2008). Targeted Genetic Therapy for Lung Cancer. In *Lung Cancer* (pp. 411–420). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470696330.ch26>
- Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. New York. https://doi.org/574.873224_1/1989
- Sanità, G., Carrese, B., & Lamberti, A. (2020). Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(November). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>
- Sarkar, S., Osama, K., Jamal, Q., Kamal, M., Sayeed, U., Khan, M., ... Akhtar, S. (2016). Advances and Implications in Nanotechnology for Lung Cancer Management. *Current Drug Metabolism*, 18(1). <https://doi.org/10.2174/1389200218666161114142646>
- Savage, K. I., & Harkin, D. P. (2015). BRCA1, a “complex” protein involved in the maintenance of genomic stability. *The FEBS Journal*, 282(4), 630–646. <https://doi.org/10.1111/febs.13150>
- Setiadi, A. F., Omilusik, K., David, M. D., Seipp, R. P., Hartikainen, J., Gopaul, R., ... Jefferies, W. A. (2008). Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5270>
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry*. *Practical Flow Cytometry*. <https://doi.org/10.1002/0471722731>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Shtutman, M., & Roninson, I. B. (2011). A subunit of coatomer protein complex offers a novel tumor-specific target through a surprising mechanism. *Autophagy*. <https://doi.org/10.4161/auto.7.12.17659>
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., & Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*. <https://doi.org/10.1021/la0513712>
- Silvestri, G. A., Gonzalez, A. V., Jantz, M. A., Margolis, M. L., Gould, M. K., Tanoue, L. T., ... Detterbeck, F. C. (2013). Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5 SUPPL). <https://doi.org/10.1378/chest.12-2355>
- Sluchanko, N. N., & Gusev, N. B. (2010). 14-3-3 Proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochemistry (Moscow)*. <https://doi.org/10.1134/S0006297910130031>
- Smith, A. L., Robin, T. P., & Ford, H. L. (2012). Molecular pathways: targeting the TGF- β pathway for cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(17), 4514–4521. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3224>

- Smith, A. S., Pal, K., Nowak, R. B., Demenko, A., Zaninetti, C., Da Costa, L., ... Fowler, V. M. (2019). MYH9-related disease mutations cause abnormal red blood cell morphology through increased myosin-actin binding at the membrane. *American Journal of Hematology*. <https://doi.org/10.1002/ajh.25472>
- Stern, J. M., Stanfield, J., Lotan, Y., Park, S., Hsieh, J.-T., & Cadeddu, J. a. (2007). Efficacy of Laser-Activated Gold Nanoshells in Ablating Prostate Cancer Cells in Vitro. *Journal of Endourology*, 21(8), 939–943. <https://doi.org/10.1089/end.2007.0437>
- Sul, J., Blumenthal, G. M., Jiang, X., He, K., Keegan, P., & Pazdur, R. (2016). FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Whose Tumors Express Programmed Death-Ligand 1. *The Oncologist*, 21(5). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0498>
- Sun, A., Durocher-Allen, L. D., Ellis, P. M., Ung, Y. C., Goffin, J. R., Ramchandrar, K., & Darling, G. (2019). Initial management of small-cell lung cancer (limited- and extensive-stage) and the role of thoracic radiotherapy and first-line chemotherapy: a systematic review. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 26(3). <https://doi.org/10.3747/co.26.4481>
- Sun, W., & Yang, J. (2010). Functional mechanisms for human tumor suppressors. *Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.7150/jca.1.136>
- Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>
- Syedbasha, M., & Egli, A. (2017). Interferon Lambda: Modulating immunity in infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00119>
- Thakur, C. (2019). An Overview, Current Challenges of Drug Resistance, and Targeting Metastasis Associated With Lung Cancer. In *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815720-6.00002-2>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., ... WHO Panel. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(9), 1243–1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
- Tzogani, K., Penttilä, K., Lapveteläinen, T., Hemmings, R., Koenig, J., Freire, J., ... Pignatti, F. (2020). EMA Review of Daunorubicin and Cytarabine Encapsulated in Liposomes (Vyxeos, CPX-351) for the Treatment of Adults with Newly Diagnosed, Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia or Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-Related Changes. *The Oncologist*, 25(9). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0785>
- Unni, M., Uhl, A. M., Savliwala, S., Savitzky, B. H., Dhavalikar, R., Garraud, N., ... Rinaldi, C. (2017). Thermal Decomposition Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Diminished Magnetic Dead Layer by Controlled Addition of Oxygen. *ACS Nano*, 11(2), 2284–2303. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00609>
- Valenzuela, C. S. A.-R. N. G. (2013). Nanomedicina y Nanoterapias para Deteccion,

- cura y tratamiento del cancer. *Nanotecnología*, 3-4-5. Retrieved from <http://www.nanoporundia.org/web/wp-content/uploads/2014/04/nanomedicina-y-nanoterapias-para-deteccion-cura-y-tratamiento-del-cancer.pdf>
- Van Ark-Otte, J., Kedde, M. A., Van der Vijgh, W. J. F., Dingemans, A. M. C., Jansen, W. J. M., Pinedo, H. M., ... Giaccone, G. (1998). Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.362>
- van Zandwijk, N., Pavlakis, N., Kao, S. C., Linton, A., Boyer, M. J., Clarke, S., ... Reid, G. (2017). Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *The Lancet. Oncology*, 18(10), 1386–1396. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30621-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30621-6)
- Vásquez-Procopio, J., Osorio, B., Cortés-Martínez, L., Hernández-Hernández, F., Medina-Contreras, O., Riós-Castro, E., ... Missirlis, F. (2020). Intestinal response to dietary manganese depletion in: *Drosophila*. *Metallomics*. <https://doi.org/10.1039/c9mt00218a>
- Villalobos-Manzo, R., Riós-Castro, E., Hernández-Hernández, J. M., Oza, G., Medina, M. A., & Tapia-Ramírez, J. (2022). Identification of Transferrin Receptor 1 (TfR1) Overexpressed in Lung Cancer Cells, and Internalization of Magnetic Au-CoFe₂O₄ Core-Shell Nanoparticles Functionalized with Its Ligand in a Cellular Model of Small Cell Lung Cancer (SCLC). *Pharmaceutics*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081715>
- Walker, J. (2006). *Lung Cancer: Current and Emerging Trends in Detection and Treatment*. Rosen Publishing Group. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=0VfKAKwDIW4C>
- Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647–2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>
- Wang, Y., Chai, Z., Wang, M., Jin, Y., Yang, A., & Li, M. (2018). COPB2 suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest in human colon cancer by regulating cell cycle-related proteins. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5506>
- Wangari-Talbot, J., & Hopper-Borge, E. (2013). Drug Resistance Mechanisms in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Journal of Cancer Research Updates*, 2(4), 265–282. <https://doi.org/10.6000/1929-2279.2013.02.04.5>
- Wessling-Resnick, M. (2000). Iron Transport.
- Wessling-Resnick, M. (2018). Crossing the Iron Gate: Why and How Transferrin Receptors Mediate Viral Entry. *Annual Review of Nutrition*. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051749>
- Wong, J. W. H., & Cagney, G. (2010). An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 604, 273–283. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-444-9_18
- Wu, X., Ruan, L., Yang, Y., & Mei, Q. (2017). Analysis of gene expression changes associated with human carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung carcinoma. *Biological Research*, 50(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0108-9>
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., ... Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80487-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80487-0)
- Yamamoto, R., Lin, L. S., Lowe, R., Warren, M. K., & White, T. J. (1990). The human lung fibroblast cell line, MRC-5, produces multiple factors involved with megakaryocytopoiesis. *Journal of Immunology*, 144(5), 1808–1816.

- Yang, Z., Gagarin, D., St. Laurent, G., Hammell, N., Toma, I., Hu, C. A., ... McCaffrey, T. A. (2009). Cardiovascular inflammation and lesion cell apoptosis: A novel connection via the interferon-inducible immunoproteasome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.189407>
- Yuan, Y., Cai, T., Xia, X., Zhang, R., Chiba, P., & Cai, Y. (2016). Nanoparticle delivery of anticancer drugs overcomes multidrug resistance in breast cancer. *Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1178825>
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*.
<https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
- Zhou, R., Shanas, R., Nelson, M. A., Bhattacharyya, A., & Shi, J. (2010). Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53. *International Journal of Cancer*.
<https://doi.org/10.1002/ijc.24744>
- Zhu, W., Smith, J. W., & Huang, C.-M. (2010). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 840518.
<https://doi.org/10.1155/2010/840518>

8. Artículo producto de la investigación.



Article

Identification of Transferrin Receptor 1 (TfR1) Overexpressed in Lung Cancer Cells, and Internalization of Magnetic Au-CoFe₂O₄ Core-Shell Nanoparticles Functionalized with Its Ligand in a Cellular Model of Small Cell Lung Cancer (SCLC)

Rocío Villalobos-Manzo ¹, Emmanuel Ríos-Castro ², José Manuel Hernández-Hernández ³, Goldie Oza ⁴, Mauricio A. Medina ⁵ and José Tapia-Ramírez ^{1,*}

¹ Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN, Ciudad de México 07360, Mexico

² Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM), LaNSE, Cinvestav-IPN, Ciudad de México 07360, Mexico

³ Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Ciudad de México 07360, Mexico

⁴ Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), Parque Tecnológico de Querétaro s/n Sanfandila, Pedro Escobedo, Querétaro 76703, Mexico

⁵ Programa de Nanociencias y Nanotecnología, Cinvestav-IPN, Ciudad de México 07360, Mexico

* Correspondence: jtapia@cinvestav.mx; Tel: +52-55-5747-3800 (ext. 5368)



Citation: Villalobos-Manzo, R.; Ríos-Castro, E.; Hernández-Hernández, J.M.; Oza, G.; Medina, M.A.; Tapia-Ramírez, J. Identification of Transferrin Receptor 1 (TfR1) Overexpressed in Lung Cancer Cells, and Internalization of Magnetic Au-CoFe₂O₄ Core-Shell Nanoparticles Functionalized with Its Ligand in a Cellular Model of Small Cell Lung Cancer (SCLC). *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1715. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081715>

Academic Editor: Ya-Fen Huang

Received: 9 June 2022

Accepted: 2 August 2022

Published: 17 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Lung cancer is, currently, one of the main malignancies causing deaths worldwide. To date, early prognostic and diagnostic markers for small cell lung cancer (SCLC) have not been systematically and clearly identified, so most patients receive standard treatment. In the present study, we combine quantitative proteomics studies and the use of magnetic core-shell nanoparticles (mCSNP's), first to identify a marker for lung cancer, and second to functionalize the nanoparticles and their possible application for early and timely diagnosis of this and other types of cancer. In the present study, we used label-free mass spectrometry in combination with an ion-mobility approach to identify 220 proteins with increased abundance in small cell lung cancer (SCLC) cell lines. Our attention was focused on cell receptors for their potential application as mCSNP's targets; in this work, we report the overexpression of Transferrin Receptor (TfR1) protein, also known as Cluster of Differentiation 71 (CD71) up to a 30-fold increase with respect to the control cell. The kinetics of endocytosis, evaluated by a flow cytometry methodology based on fluorescence quantification, demonstrated that receptors were properly activated with the transferrin supported on the magnetic core-shell nanoparticles. Our results are important in obtaining essential information for monitoring the disease and/or choosing better treatments, and this finding will pave the way for future synthesis of nanoparticles including chemotherapeutic drugs for lung cancer treatments.

Keywords: label-free; mass spectrometry; nanoparticles; small cell lung cancer (SCLC); transferrin receptor (TfR1); cluster of differentiation 71 (CD71)

1. Introduction

Lung Cancer is the most frequent cause of lethality among all types of cancer worldwide with an estimated 2.2 million new cases of lung cancer per year, and 1.79 million deaths by the year 2020. (International Agency for Research on Cancer) [1]. There is strong evidence linking smoking to 85% of the incidence of lung cancer [2], as well as further risk factors such as occupational exposure to asbestos and combustion fumes, and environmental exposure to arsenic and air pollution. Whilst these factors remain the major contributors in the developing world, 15% of lung cancer cases occur in the lives of those who were never smokers [3]. Inherited genetic factors are thought to play a minor role in the susceptibility to developing SCLC. Genetic variation does contribute to the risk of nicotine addiction and might thereby indirectly influence SCLC risk [4].

The main challenge in improving the poor survival rate (5-year survival, approximately 15%) of this disease is to develop better strategies to stratify high-risk populations, for early diagnosis and selection of appropriate treatment for different subsets of lung cancer. The mortality associated with this disease is high, primarily because most lung cancers are diagnosed at advanced stages when the options for treatment are mostly palliative [5].

Lung tumors are the result of a multistep process in which normal lung cells accumulate multiple genetic and epigenetic abnormalities and progress into cells with malignant biologic capabilities [6]. The two main types of lung cancer, identified based on the histologic, clinical, and neuroendocrine characteristics, are small cell lung cancer (SCLC, representing 15% of the cases) and Non-small cell lung cancer (NSCLC, representing approximately 85% of the cases). Although NSCLC displays numerous histologic patterns, most tumors can be grouped into three main categories: squamous cell carcinoma (30%), adenocarcinoma (40%), and large cell carcinoma (3–9%) [7]. NSCLC and SCLC differ molecularly, showing many genetic alterations and exhibiting subtype specificity [8].

SCLC is a poorly differentiated high-grade neuroendocrine tumor that is commonly located centrally in the major airways but may occur peripherally in the lungs in about 5% of the cases. SCLCs are typically situated in a peribronchial location with infiltration of the bronchial submucosa and peribronchial tissue [5] presenting a high growth rate and early development of metastases and have a strong association with cigarette smoking. Incidence rates of SCLC are higher in men than in women, but a higher percentage of lung cancers are of the SCLC type in women than in men [9]. SCLC consists of cytologically malignant epithelioid cells with scant cytoplasm, nuclei with granular (“salt and pepper”) chromatin without prominent nucleoli, and more than 10 mitoses per 2 mm² (usually more than 50 mitoses per 2 mm²) [10]. The tumor cells are arranged in sheets, but there are also rosettes, trabeculae, or peripheral palisading of cells along the edges of nests [5].

Progress in the treatment of SCLC has been very limited. The traditional treatments used to deal with this type of pathologies are radiotherapies, chemotherapies, and surgeries. Platinum-etoposide-based regimens have been the mainstay of treating this disease for many years. There have been very few signs of success in targeted therapy, and there are none in routine clinical use [11]. Moreover, in most patients, the therapy causes side effects, which lead to a low quality of life [12].

The treatment of patients with SCLC is complicated, since they usually have multiple important comorbidities due to tobacco use such as chronic obstructive pulmonary disease, ischemic cardiopathy, and hypertension, thus deteriorating their functional status. In addition, SCLC is highly aggressive and is accompanied in general by significant weight loss, fatigue, and symptoms related to bulky intrathoracic disease and/or metastasis that contribute to the patients’ frailty and obstruct optimal oncologic treatment [13].

In this scenario, the academy and pharmaceutical industry conduct their research to propose alternative diagnostic methods and treatments. In this sense, nanomedicine seems to be a promising technology to diagnose and also treat lung cancer in general. The designing bases of cancer nanomedicine, in particular for solid tumors, are: (i) the enhanced permeation and retention effect (EPR) and (ii) the cancer cell-specific affinity targeting. Their appropriate design, as well as the study of their impact on cancer nanomedicine, extends the therapeutic window by enhancing the efficacy and reducing the toxicity [14,15]. For instance, more accumulation in target sites, thereby less exposure to other healthy cells, is expected by the identification of the overexpressed membrane receptors on the cancer cells.

Several research groups have been working with magnetic and plasmonic nanoplatforms and have been evaluating their behavior as imaging contrast agents, hyperthermia properties, and obviously their application in the controlled delivery of drugs, however, the specificity of recognition of the nanoplatforms has been very limited.

In the present study, we used label-free mass spectrometry in combination with an ion-mobility (IM-MS) approach to evaluate differences in the proteome of enriched membranes in a human aggressive and multidrug-resistant SCLC cell line H69AR (ATCC® CRL-11351).

This cell line was used to generate tumors in immunodeficient mice to carry out an *in vivo* analysis (data not shown); also, MRC5 (ATCC[®] CCL171), a non-tumor fibroblast lung cell line was used. In this way, we were searching for which protein receptors are up-regulated in cancer versus normal cells. One of the most up-regulated membrane receptors in SCLC cell lines was identified as Transferrin Receptor 1, TfR1. Together, the finding and the experimental results allowed us to propose transferrin as a ligand on magnetic core-shell nanoparticles (mCSNP's) because it leads to proper nanoparticle endocytosis through a receptor. The identification of the TfR1 receptor, overexpressed in lung cancer, will be essential to treat this and other types of cancer in the near future.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

SCLC cell line H69AR (ATCC[®] CRL-11351), used as cancer cell line, was cultured in an RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2 mM), and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin). A lung fibroblast cell line MRC5 (ATCC[®] CCL171) was used as the control. The latter cell line was cultured in a Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS and antibiotics in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C.

2.2. Sample Processing for Mass Spectrometry

The identification of the overexpressed receptor SCLC accounted for the extraction. The membrane protein extraction of both cell lines was performed with a Mem-PER[™] Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Scientific[™], Waltham, MA, USA), after collecting the proteins, a protease inhibitor cocktail was added to maintain the integrity of the proteins; equal amounts of protein were prepared for proteomic studies. The kit allows preferential solubilization of integral membrane proteins and membrane-associated proteins, the degree of contamination with cytosolic proteins is less than 10%.

For each biological sample (H69AR and MRC5 cell lines), 6×10^6 cells were harvested, washed, and centrifuged. The cytosolic proteins were isolated in the supernatant fraction after adding Permeabilization Buffer[™] and mixing at 4 °C for 10 min. The homogenate was centrifuged at $16,000 \times g$ at 4 °C for 10 min; membrane proteins were isolated in the supernatant fraction after adding Solubilization Buffer[™] and mixing at 4 °C for 30 min; the homogenate was centrifuged at $16,000 \times g$ at 4 °C for 15 min. Protein concentrations were measured using a 2-D Quant Kit[™] (GE Healthcare[™], Chicago, IL, USA) according to the manufacturer's recommendations. Protein pool (40 µg) for each condition and biological replicate were subjected to 10% SDS-PAGE and allowed to advance for about 1 cm within the gel; the resulting gel fragments were enzymatically digested according to the modified protocol of Shevchenko et al. 2006 [16].

2.3. Relative Quantification by Label-Free DIA Mass Spectrometry

The quantitative proteomic analysis (spectrometric and chromatographic conditions) was performed in a UPLC Nano Acquity M-Class coupled with a QTOF Mass Spectrometer Synapt G2-Si (Waters; Milford, MA, USA), according to the method of Ríos-Castro et al., 2020 [17].

2.4. Data Analysis

Generated *.raw files were analyzed in Progenesis QI for Proteomics v3.0.3 software (Waters; Milford, MA, USA) according to the settings reported in the study of Vázquez-Procopio J, et al., 2020 [18], with the following modifications: we used a concatenated *.fasta *Homo sapiens* database (downloaded from Uniprot, containing 73,099 protein sequences, last modification on 27 June 2018). Synapt G2-Si was calibrated with [Glu1]-fibrinopeptide fragments through the precursor ion $[M + 2H]^{2+} = 785.84261$ fragmentation of 32 eV with a result of less than 1.1 ppm across all MS/MS measurements. The ratio was calculated based on the average MS signal response of the three most intense tryptic peptides (Top3) of each

characterized protein in the H69AR (tumor cells) sample by the Top3 of each characterized protein in the MRC5 (normal cells) sample. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [19] partner repository with the dataset identifier PXD015405.

2.5. Bioinformatic Analysis

Expression profiles were visualized as a heat map, which was generated using a web server heatmapper [20], available online (<http://heatmapper.ca/>; accessed on 28 February 2020). Complete linkage and Pearson methods were used as clustering and distance measurement methods, respectively. “z-Score” was calculated with the following equation:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

where, x = Top3 abundance of a protein in a single injection, μ = mean abundance Top3 per protein (all injections), and σ = standard deviation.

Differentially expressed proteins were classified according to the biological pathways using the Reactome database contained in STRING v11 (available online: <https://string-db.org/>; accessed on 8 November 2019). All resulting biological pathways with an FDR (False Discovery Rate) ≤ 0.05 (highly reliable) were exported as a *.tsv file to be plotted (FDRs were converted to $-\log_{10}$) as a bar graph using TIBCO Spotfire software v7.0.0 (Somerville, MA, USA). Interactomes of differentially expressed proteins were made in STRING too, with the following settings: *Homo sapiens* database; textmining, experiments, database, co-expression, neighborhood, gene fusion, and co-occurrence as active interaction source, and 0.4 as a confidence score. A TfR1 interactome was constructed using Cytoscape software v3.8.0 (available for download: <https://cytoscape.org/>) through the ReactomeFIPugin v7.2.3 application.

2.6. Western Blot

Based on spectrometric analysis results, western blot analysis was performed to confirm the overexpressed receptor in SCLC. Equal amounts (20 μ g) of protein were prepared and run in SDS/PAGE gel; proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated overnight with goat anti-CD71 (Santa Cruz Biotechnology, sc-32272, Dallas, TX, USA) and monoclonal anti- β -actin at 4 °C. After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 2 h at room temperature. The bands containing the proteins were visualized on an X-ray film (Kodak, Rochester, NY, USA) using an enhanced chemiluminescence (Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer, Inc. Waltham, MA, USA) kit. Densitometric analysis of Western blot bands was performed using the software Image Studio™ Version 5.2.5. (Lincoln, NE, USA).

2.7. Flow Cytometry

2.7.1. For the Overexpressed Receptor

The monolayer H69AR (ATCC® CRL-11351) and MRC5 (ATCC® CCL171) cells were washed with PBS and incubated with trypsin-EDTA at 37 °C for 5 min. The cells were collected and re-suspended in a medium. Survival of all cells was counted using a trypan blue dye exclusion assay. The cell number in the suspension was adjusted to 5×10^5 cells per sample per cell line (sample 1: Blanc and sample 2: mix of folate receptor and CD71 receptor antibodies). The cells were washed twice with 1 mL of PBS to remove the culture medium by centrifugation for 5 min. Cells were resuspended in 100 μ L of PBS-EDTA and then sample 1 was incubated, without specific antibody, only with 0.5% FBS, and sample 2 was incubated with anti-Human FOLR1 AF488-conjugated antibody (R&D Systems, FAB5646G, Minneapolis, MN, USA) and mouse anti-Human CD71 PE-conjugated antibody (BD Pharmingen, 555537, East Rutherford, NJ, USA). After incubating for 30 min, the samples were analyzed immediately by flow cytometry.

2.7.2. For the Endocytosis Studies

The cell number in the suspension was adjusted, and 1.5×10^5 cells in 1000 μL of medium were seeded to use for the cellular uptake test. After incubating the samples with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Transferrin Alexa Fluor™ 488 Conjugate (TF-AF488, Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) and transferrin conjugated gold nanoparticles for 0.5, 8, and 16 h at 37 °C in a humidified incubator (5% CO_2), the cells were washed twice with 3 mL of PBS to remove untaken transferrin by centrifugation for 5 min. The cell suspensions were suspended in 100 μL of PBS-EDTA and analyzed immediately by flow cytometry.

We added 0.2 μg of the TF-AF488 conjugate to have positive control of the endocytic level in both cell lines (MRC5 normal and H69 cancer cell lines). Total TF-AF488 fluorescence at $t = 0.5, 8,$ and 16 h was measured by flow cytometry as a positive-maximum endocytic signal. Regarding the CSNP-TF complex, we added a respective volume to get the TF final concentration of 0.2 μg in the medium of incubation.

2.8. Synthesis of Nanoparticles

2.8.1. Synthesis of Monodispersed Cobalt Ferrite Nanoparticles

The synthesis and characterization of monodisperse cobalt ferrite nanoparticles (CFNPs) have been previously described [21]. Cobalt acetylacetonate and Iron acetylacetonate react with the nonionic surfactant Triton-X100, the synthesis of nanoparticles of Fe_2O_4 magnetite doped with cobalt was carried out by the process of Thermal Decomposition (TD), which involves the reaction of a precursor compound that occurs by increasing the temperature (roughly 250–270 °C) to produce two or more compounds. TD of iron(III) acetylacetonate 1 mmol (Sigma 97%) precursor plus cobalt acetylacetonate 0.5 mmol (Sigma Aldrich 97%, San Louis, MO, USA) plus an organic surfactant as Triton X-100 (0.1 M).

The mixture was placed in a volumetric flask connected to a cooling system driven by ice water and a pump to circulate the cold water inside a refrigerant tube and allow the reaction to be carried out for the required time under Nitrogen (N_2) atmosphere, during 10 min of exposure and a temperature of 260 °C, the solution was heated for 60 min until it acquires the characteristic dark color of magnetite.

Approximately 15 mL solution was left at room temperature for 24 h and subsequently centrifuged in 5 cycles at 8000 RPM, the first three adding 5 mL of methanol 98% and the last two cycles adding 5 mL water milli Q 800 Ohm.

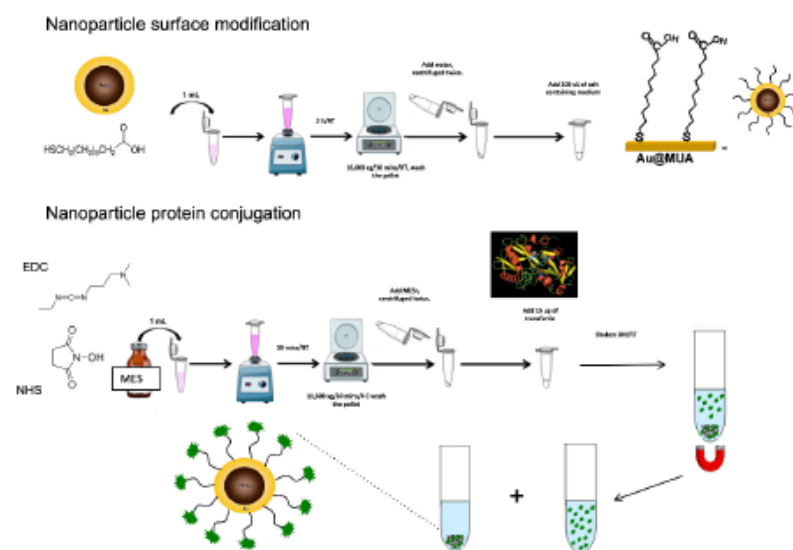
The characterization showed the presence of CoFe_2O_4 nanoparticles of 5 nm on average with superparamagnetic properties. The morphology and size of cobalt ferrite nanoparticle were characterized using transmission electron microscopy (TEM JEM-ARM200F, Jeol, Tokyo, Japan) and HAADF-STEM (High-Angle Annular Dark-Field scanning Transmission Electron Microscopy). In order to reduce the toxicity of the cobalt-iron nanoparticle, a gold coating was formed on the nanoparticle. The coating is fundamental to get a uniform sample and enhanced biological capacities, otherwise, CoFe_2O_4 would be toxic for “In Vitro” or animal models. The gold coating also drives for an enhanced half-life in the system.

2.8.2. Synthesis of Magnetic Au- CoFe_2O_4 Core-Shell Nanoparticles (mCSNP's)

The synthesis of Au seed solution (Solution 1) was prepared by using 0.5 mL (1 M, CTAB), 1 mL (50 mM, L-Ascorbic acid), and 100 μL (1 M, HAuCl_4 solution). The whole complex was sonicated for 30 min. The freshly prepared gold seed solution was used for Au shell coating. The preparation of cobalt ferrite nanoparticles was used as solution 2. Solutions 1 y 2 were used to synthesize the core-shell. Initially, 1 part of solution 2 was added dropwise to solution 1. This solution mixture was stirred for 3 h continuously until there was a color change. Then, these core-shell nanoparticles were magnetically separated using a magnet and they were washed twice with a mixture of hexane and ethanol to obtain high purity NPs excluding excess gold NPs. The washed NPs were centrifuged again twice to remove excess Triton X-100 from the solution.

2.9. Functionalization of Au Core-Shell Magnetic Nanoparticles

Modification of the gold core-shell was carried out using 11-mercaptoundecanoic acid (MUA). Subsequently, transferrin (Transferrin -Alexa Fluor 488 of Invitrogen) was conjugated to the core-shell; the transferrin-functionalized nanoparticles were separated from the free transferrin by washing and concentration with a magnet. The methodology (Scheme 1) was adapted with some modifications from Springer Protocols [22]. After the functionalization process, electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Santa Clara, CA, USA) was carried out to determine if the transferrin had been properly bound to the nanoparticle, for which the supernatant containing transferrin dissolved in PBS was analyzed.



Scheme 1. Methodology for functionalization of mCSNPs adapted with some modifications from Springer Protocols [22].

2.10. Immunofluorescence of TfR1 in Cells

The cells MRC5 and H69AR were seeded on coverslips, after 24 h they were washed three times with PBS 1X after they were fixed with 4% (*w/v*) paraformaldehyde in PBS for 30 min. The cells were not permeabilized because the location of the protein receptor of our interest is in the membrane. The anti CD71 ab diluted 1:500 was incubated at 4 °C overnight; the secondary goat anti-mouse-AF488, 1:750 was incubated, and the samples were embedded using Vectashield HardSet Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Subsequently, the processed samples were analyzed using an epifluorescence confocal laser scanning microscope Cytation C10 (BioTek, Santa Clara, CA, USA).

3. Results

3.1. Proteomic Analysis

As a result of quantitative proteomics analysis; 123,724 peptides were detected (ions $z = 2^+$ or superior) in the entire study, and 86.92% of these peptides fell at a maximum of ± 10 ppm. A complete analysis at the peptide level exhibited an adequate adjustment in terms of calibration, ionization source operability, and enzymatic effectiveness (Figure S1). These peptides represent 1298 quantified proteins shared in both cell lines with an average of nine peptides per protein in a dynamic range of ~ 6.5 orders of magnitude (expressed as

log₁₀ logarithm) revealing good sensitivity of the spectrometer and correct normalization of the injection since both dynamic ranges (MRC5 and H69AR) are properly adjusted (Figure S2A). Quantified proteins were filtered ($CV \leq 0.30$, at least two peptides/protein, considering at least one unique peptide, proteins that replicated only 3/3, and ANOVA p -value ≤ 0.05); additionally, “reversed” proteins were discarded. Through the expression analysis performed with a heat map, the formation of four quadrants differentiated from each other in terms of abundance could be visualized, indicating marked differences in the expression profile of membrane proteins between both cell lines (Figure S3), what was expected because of the nature of both cell lines [23,24], however, not all the proteins analyzed in the heat map were considered as differentially expressed. For such reason, we scattered the proteins in a volcano plot using a cut-off value of 1.2, expressed as base 2 logarithm (\log_2) [4,17], and finally, 188 proteins up-regulated in H69AR cells and 174 in MRC5 cells were reported (Figure S2B); besides, we reported 32 and 33 exclusive proteins in H69AR and MRC5, respectively (Table S1). All proteins identified in this work with their corresponding spectrometric measurements are summarized in Table S2.

3.2. Bioinformatics

Differentially expressed proteins (427 proteins) were analyzed in STRING and the results show that the proteins participate in 212 biological pathways according to Reactome (Table S3). Additionally, within the top 50 biological pathways (Figure 1), some of them, like the metabolism of RNA (FDR = 2.06×10^{-17}), the formation of a translation initiation complex (FDR = 1.94×10^{-14}), and the cell cycle pathway (FDR = 8.02×10^{-5}), actively participate in processes related to the development of tumors such as those involved in the cell cycle, immune response, protein synthesis, and vesicle transport.

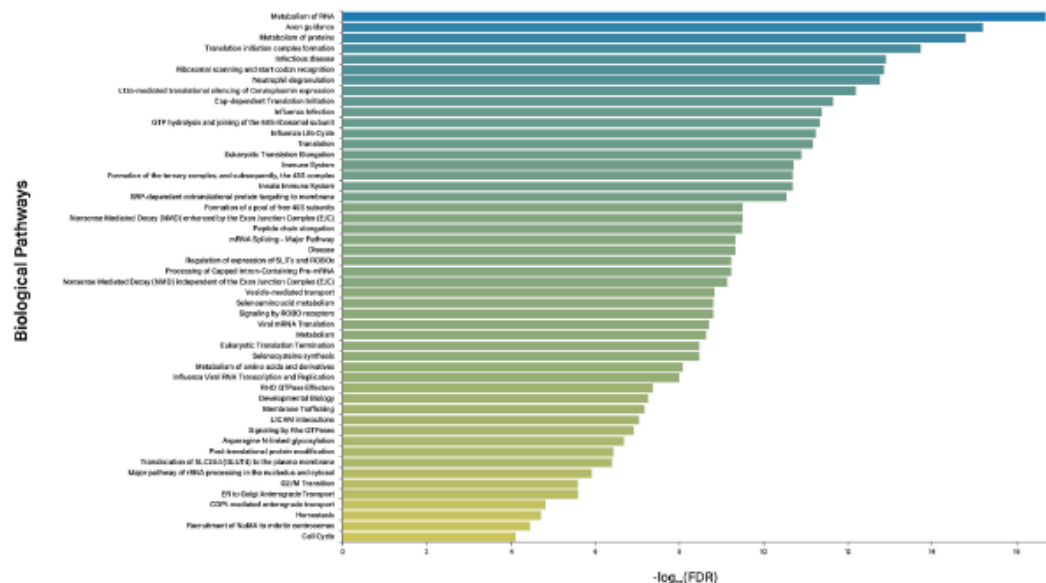


Figure 1. Reactome Pathways. Differentially expressed proteins are involved in 212 biological pathways with $\text{FDR} \leq 0.05$. The bar plot shows the top 50 biological pathways. FDR values were transformed to a negative base 10 logarithm, which means that larger values on the abscissa axis indicate better-represented pathways.

Visualizing the interactome of the differentially expressed proteins, we could notice a high degree of interconnection between them (Figure S4), which hints at totally differentiated molecular mechanisms between cell lines. Many of the most interconnected proteins are those involved with vesicular trafficking; but among them, we focus our attention on TfR1 (TFRC, CD71) because it impacts the function of many other proteins of vesicle trafficking such as ACTR3, AP2A1, ACTR2, ARPC3, YWHAZ, and even HIP1, which regulates the assembly of clathrin cages [25,26], through its direct interaction [27]; consequently, these proteins trigger effects on downstream pathways like those involved in the cell cycle, immune response, and RNA metabolism and translation (Figure 2). The analysis of the biological pathways of the interactome, in Figure 2, allows us to observe several protein clusters that are important from the point of view of carcinogenic processes, for example for DEAD-Box RNA helicases; the cluster of nuclear heterogeneous Ribonucleoproteins (HNRNPA1, HNRNPA2B1, and other), which are involved in DNA repair processes, chromatin remodeling and regulation of gene expression, or the cluster of translation initiation factors that have been found to be overregulated in several types of cancer (Figure 2).

Metabolism of RNA was the main biological pathway altered, in which several clusters of proteins showed participation, such as DEAD-box RNA helicases (DDX21, DDX39A, DDX39B, DDX46, DDX5, and DHX9). These proteins are important in the carcinogenic process because many of them are involved in the progression and arrest of the cell cycle, cell migration and invasion, apoptosis, coactivation of transcription factors involved in tumor development, and aberrant regulation of RNA, which triggers cell growth [28].

Another important cluster is formed with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPF, HNRNPH2, HNRNPK, HNRNPR, HNRNPU, and HNRNPUL1), which participate in a wide range of roles in DNA repair, telomere biogenesis, chromosome remodeling, cell signaling, and regulating the gene expression at both the transcriptional and translational levels by direct influence on pre-mRNA splicing through site-specific binding with the target RNA [29,30].

The biological pathway involved in the formation of a translation initiation complex is also well represented because it is formed by other clusters containing eukaryotic translation initiation factors (EIF3B, EIF3K, EIF4A1, EIF4A2, and EIF4H). The eIF3 subunits in conjunction with other eIF subunits help to stabilize the 40S ribosomal subunit and many of them are up-regulated in different types of cancer such as breast, cervix, lung, squamous cell, colorectal, neuroblastoma, prostate, and non-small cell lung cancers. On the other hand, other subunits like eIF3F have been reported to be down-regulated in breast cancer, vulvar cancer, pancreatic cancer, and ovarian cancer among others [31].

In this work, all eukaryotic translation initiation factors are reported to be up-regulated and in agreement with this result, and we detected several subunits of ribosomal proteins (RPS10, RPS11, RPS12, RPS14, RPS16, RPS18, RPS19, RPS23, RPS24, RPS3, RPS4X, RPS6, RPS8, and RPSA) up-regulated too, indicating a high presence of translational events. This dysregulation is often associated with aberrant function and perturbations in the expression of components of the translation machinery in cancer [32,33].

The presence of proteins such as hNRP, DEAD-Box RNA helicases, eukaryotic translation initiation factors, or ribosomal proteins, which a priori could not be considered as membrane proteins, is constant in different proteomic studies of membrane enrichment in different cell lines. In a recent article Statello et al. 2021 [34], mention that the interaction of several HNRNPs with RNA facilitates the transport of RNAs into exosomes. One possibility of finding these HNRNPs in our analysis is that in the extraction process, we are including the exosomes and the proteins included within these extracellular vesicles. On the other hand, exosomes are matured into multivesicular bodies from late endosomes [35,36] and can carry proteins associated with the endoplasmic reticulum or proteins that are in the process of translocation, elsewhere, in the cell. In cancer cells, the vesicles or exosomes are found to be loaded with different types of biomolecules (DNA, non-coding RNAs, miRNA, tumor antigens, proteins) that do not appear in non-cancerous cells.

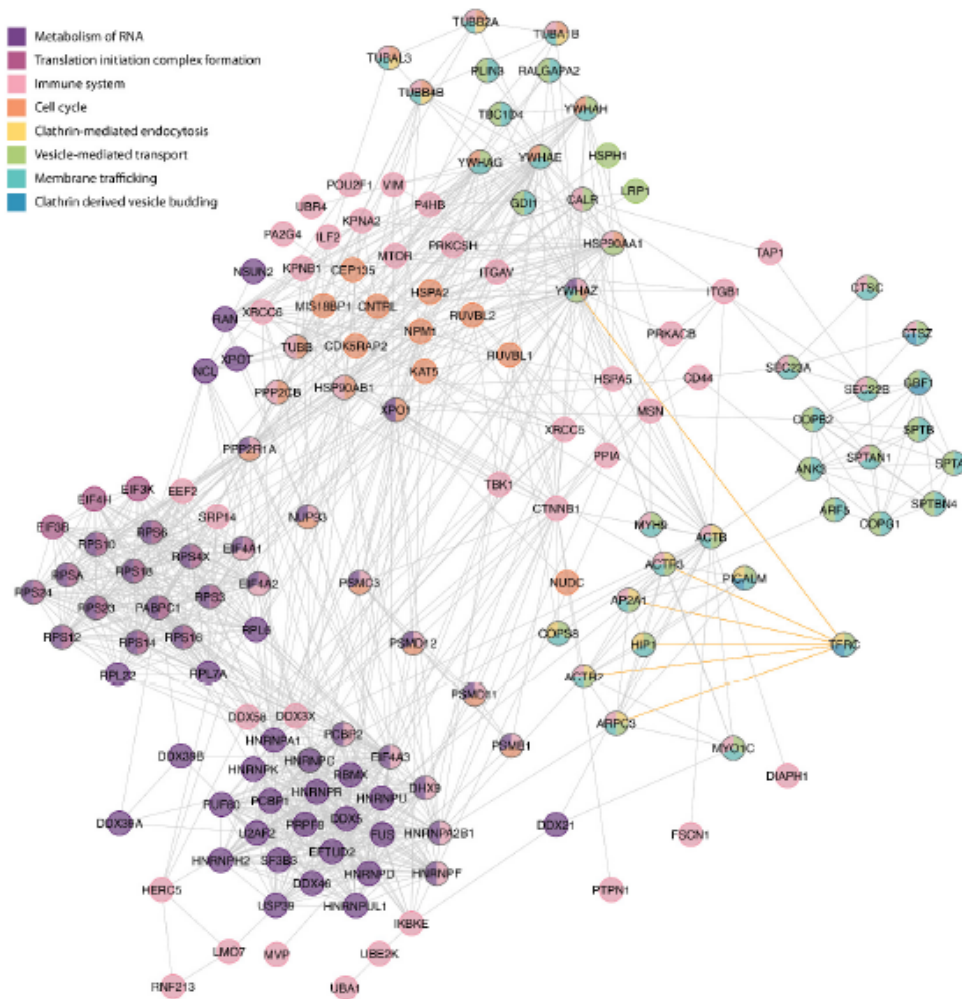


Figure 2. Tfr1 (TFRC) proteins interactome. Tfr1 can exert varied actions on important biological pathways within the cancer cells such as metabolism of RNA, translation initiation complex formation, immune system, cell cycle, clathrin-mediated endocytosis, vesicle-mediated transport, membrane trafficking, and clathrin-derived vesicle budding, mainly mediated by its direct interaction with dysregulated actin-related proteins and ubiquitous scaffolding proteins such as YWHAZ.

3.3. Validation of Differential Expression of Tfr1

Differential expression of Tfr1 using MS showed marked differences between the two cell types. To put this in context, Tfr1 is the 27th protein in the dynamic range of the H69AR cell line proteome, while the MRC5 dynamic range is 725th (Figure 3A); additionally and considering only up-regulated proteins in the tumor cell line, Tfr1 is 15th in terms of abundance and only one receptor was observed as more abundant, the membrane-associated progesterone receptor component 1 (PGRMC1), but was not selected because its relative abundance in H69AR is 9.33 fold compared to 32.86 fold of Tfr1 in

MRC5 and because PGRMC1 is less selective, it can bind a wide variety of molecules like sterols, hemes, and progesterone [37].

Parallel to MS, the differential expression of TfR1 was corroborated using other methodologies like Western blot; we observed TfR1 band was more expressed in the cancer cell protein sample than in the normal cell sample (Figure 3(B.1)), this result is in line with the literature reporting that TfR1/Cd71 (a homodimeric type II membrane glycoprotein, ~95 kDa) binds to, and assists entry of its ligand into cells for the delivery of iron, the plot evidencing increased abundance (Figure 3(B.2)), and flow cytometry (Figure 3(C) in which we observed that fluorescence in the plot is 90% (Figure 3(C.3)) in quadrant B+ corresponding to Tf (Figure 3(C.2)); both techniques showed much higher expression in the H69AR cell line compared to the MRC5 cell line, noting that the result of three different techniques was concordant.

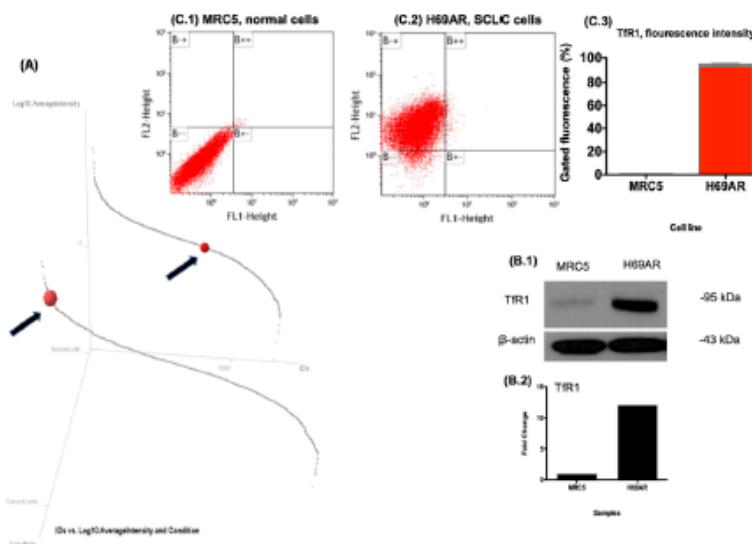


Figure 3. Expression analysis of TfR1. (A) Dynamic ranges of H69AR and MRC5 cells show the position of the TfR1 protein; in tumor cells (foreground), TfR1 is ranked at number 15, while in normal cells (background), it is ranked at number 725. The difference in abundance was ~33-fold change (H69AR/MRC5) (B.1) Western blot analysis, indicating that the transferrin receptor was highly up-regulated in the H69AR cell line, presenting a change ten times more compared with the normal lung cell line (B.2). (C.1) Flow cytometry plots and the graphs of the fluorescence indicating a TfR1/TFRC signal (B+) in a 90% gated (C.2). (B-: double negative signal, B-+: single positive signal (PE), B++: double positive signal (PE and AF488), B+-: single positive signal (AF488)). (C.3) Fluorescence intensity graph, in MRC5 and H69R cells.

3.4. Immunofluorescence of Transferrin Receptor

The immunofluorescence technique was used as another way to corroborate the presence of the protein in the plasmatic membrane of the tumoral cells and its overexpression on them. As we can observe in Figure 4 the intense green signal corresponds to the TfR1.

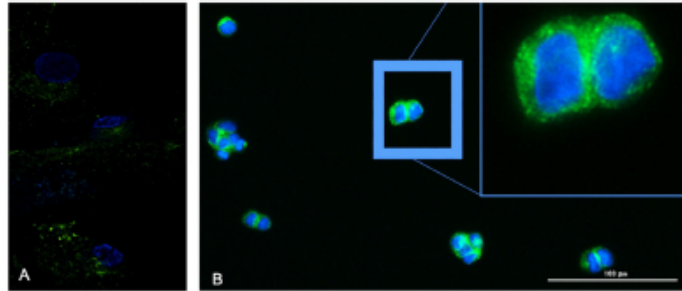


Figure 4. Tfr1 is present to a greater extent throughout the plasmatic membrane of H69AR (B) than in MRC5 (A) cell line. Indirect immunofluorescence image of Tfr1 protein labeled with anti CD71 as a primary antibody, 1:500 incubated overnight and the secondary goat anti-mouse-FITC, 1:750 was incubated for 1 h at room temperature.

3.5. Synthesis and Functionalization of mCSNPs

In the present work, we use the thermal decomposition method, to carry out the synthesis of cobalt-iron nanoparticles with magnetic properties, characterization, and hyperthermia properties that have been previously reported [21,38]. In Figure 5 we show the results of transmission electron microscopy when analyzing a preparation of the magnetic cobalt-iron nanoparticles with the gold shell, performed under the conditions described in material and methods, the morphology and size of the magnetic Au-CoFe₂O₄ core-shell nanoparticles (mCSNPs) were homogeneous, nearly monodisperse, spherical and of a regular size of 5–10 nm. Further, high-angle annular dark-field imaging was obtained from preparation of Au-CoFe₂O₄ Core-shell, the scan mapping revealing a core-shell nanoparticle with Au shell and Co and Fe as a core (Figure 6).

In the second part of this work, we carried out the functionalization of our core-shell nanoparticle (Au-CoFe₂O₄) with the Tfr1 target molecule, the transferrin (Tf). The objective was to increase the efficiency with which the core-shell nanoparticle can recognize the target cancer cell. The efficiency with which transferrin binds to the Au-CoFe₂O₄ core-shell nanoparticle depends, among other factors, on the length of the linker and the protein, in our case we used an 11-carbon linker (MUA). The binding of transferrin was monitored by microfluidic electrophoresis on the Agilent 2100 system. The transferrin bound to the nanoparticle can be separated by a magnet, and the unbound transferrin remains in the supernatant. The initial concentration in the binding assay was 15 μg of Tf. The gel image (Figure S5), shows the 79 kDa band corresponding to transferrin glycoprotein. When quantitative analysis of this band was performed, the amount of protein obtained in the supernatant was 10.34 μg of protein, therefore the difference of 4.66 μg corresponds to the core-shell nanoparticle-transferrin complex. With this complex, we proceeded to perform the transferrin receptor-mediated endocytosis analysis.

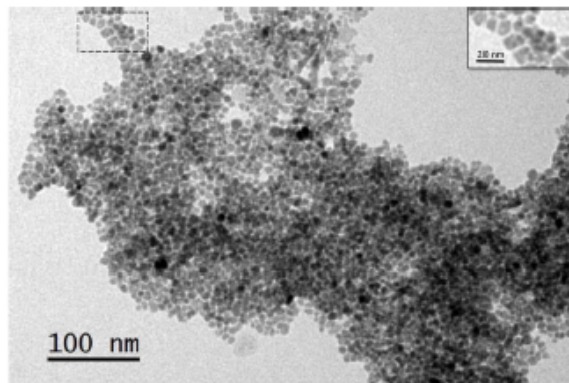


Figure 5. TEM micrograph of Au-CoFe₂O₄ mCSNPs, exhibiting monodisperse NPs of size 5–10 nm.

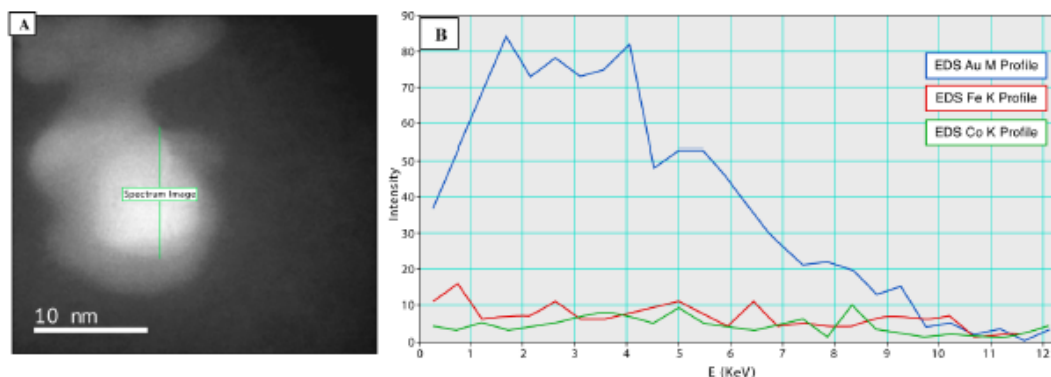


Figure 6. (A) HAADF imaging, Au-CoFe₂O₄ TX-100 0.1 M CTAB 0.1 M. (B) Core-shell scan mapping revealing a Core-shell nanoparticle, Au as a shell and Co-Fe as a Core.

3.6. Endocytosis Assays

Finally, the endocytosis assay for transferrin was performed allowing the activation of TfR1 according to the results of flow cytometry related to the endocytosis of the mCSNP-Tf complex (Figure 7). Figure 7(a.1) shows the blank lecture of the group of normal cells that were gated, and displayed histograms of fluorescence at 0.5 h and 16 h of CSNP complex in which the change was negligible (Figure 7(a.2)); this is because, in normal cells (MRC5 cell line), the expression of the TfR1 is very low. The cancer cell line (H69AR) displayed a different gated cell population in the blank lecture (Figure 7(b.1)). Figure 7(b.2) displays histograms of fluorescence at 0.5 h and 16 h of the CSNP complex in which a proportional change with respect to time was observed, i.e., the longer the incubation time, the higher the level of endocytosis of Tf. Figure 7(b.3) shows a comparison between the levels of endocytosis obtained of Tf alone (positive control, black bars) and the endocytosis of the complex (grey bars); The assay results show that overexpression of the transferrin receptor TfR1, in H69AR cells is functional and facilitate endocytosis of transferrin-functionalized core-shell nanoparticles.

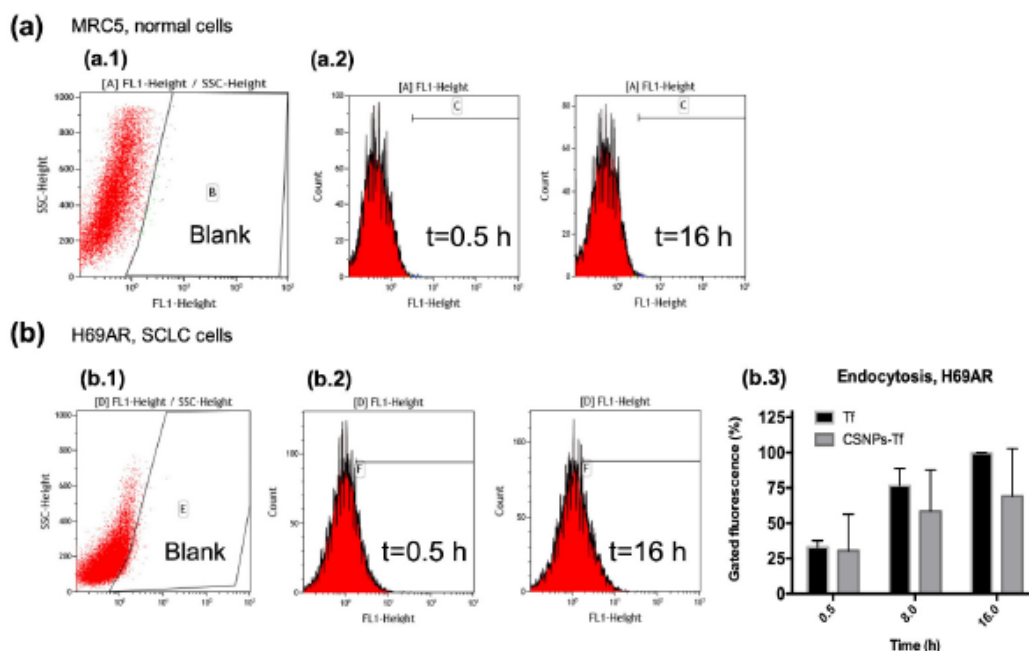


Figure 7. 1 Flow cytometry gatings for measuring the endocytic internalization in normal and SCLC cells. MRC5 and H69AR cells were incubated with Tf-AF488 (Tf) conjugated and CSNPs-Tf-AF488 conjugated (CSNP-Tf). Tf-AF488 was used as a positive control to measure the maximum fluorescence value of endocytosis in both cell lines. Cells were incubated at 37 °C to allow internalization of Tf-AF488 and the CSNP complex at $t = 0.5, 8,$ and 16 h. **(a.1)** Cells were first gated by side scatter versus forward scatter in a blank sample. **(a.2)** Representative profiles of $t = 0.5$ h and $t = 16$ h of internalization of the CSNP complex in a control cell line (MRC5); we observed that fluorescence (endocytosis level) is the same in blanks and $t = 0.5$ and 16 h. **(b.1)** Cells were first gated by side scatter versus forward scatter in a blank sample. **(b.2)** Representative profiles of $t = 0.5$ h and $t = 16$ h of the CSNP complex in the SCLC cell line (H69AR), we observed that fluorescence (endocytosis level) is different $t = 0.5$ and $t = 16$ h, in **(b.3)** the graph shows the change of the gated percentage of fluorescence of Tf-AF488 (black bars) and the CSNP complex (gray bars) versus time, the expression of the data as the means \pm SEM.

4. Discussion

Cancer is a multifactorial disease that involves the deregulation of multiple proteins which impact cell function allowing, among other things, cellular immortality in a plethora of tissues. In this sense, it is evident that the continuous search for key proteins to understand the molecular processes of the disease, as well as the search for potential biomarkers that may be targets of novel pharmacological treatments is required. We focus the attention on this last statement; one of the goals of nanomedicine is to find a protein that is highly expressed and actively participates in the molecular mechanism of the disease, thus can be blocked using different products and nanotherapeutics platforms in order to reduce its activity and cancerous phenotype [39]. Between those platforms, we can mention mCSNPs that can work through active targeting mode carrying drugs or antibodies that negatively affect the activity of the target molecule; that way we performed relative quantification based on MS in an enriched membrane of cancer cell type searching potential targets for mCSNPs. More than four hundred proteins were reported as deregulated and multiple biological pathways were altered according to the Reactome database.

Cancer has the ability to activate the innate and acquired immune system [25,40], and this biological pathway is well represented in our results ($FDR = 2.04 \times 10^{-11}$). Important proteins involved in its regulation were found dysregulated, for example, interferon $\lambda 1$ (IFNL1), which activates the expression of interferon-stimulated genes through the Jak-STAT cascade with the goal of activating immunity and cytotoxicity [41–43] was detected only in the MRC5 cell line, indicating an impaired defense mechanism in the H69AR cell line since these cells cannot send external signals to be eliminated.

An important characteristic of cancer cells is acquired antigenicity, which is recognized by the immune system as non self [40], whereby the ubiquitin-proteasome pathway is active to present antigens to effectors like T-cells ($CD8^+$ CTLs) [44]; in this sense, the up-regulated presence of subunits, either proteasomes (PSMC3, PSMD11, and PSMD12) or immunoproteasomes (PSME1) [45], as well as enzymes associated with ubiquitination (UBA1, UBE2K, and UBR), indicates that the degradative process of antigens is active; but on the contrary, we found TAP1 protein only in MRC5 cells. This protein is very important for the binding of antigen to the major histocompatibility complex (MHC) class-I, so the results suggest that although antigens are generated, they are not bound to MHC class-I in the endoplasmic reticulum to reach the cell membrane resulting in an aberrant antigen presentation in the H69AR cell line, which is a mechanism to evade the immune response [46]. This result extends previous observations. It has been observed that in a SCLC cell line, the presence of a defective allele in TAP1 causes a change of amino acids, which leads to a defective presentation of antigen [47]; in addition, the restoration of TAP1 activity in tumor cells increases the susceptibility to CTL-mediated killing [44].

The cell cycle is a process in which the participating molecules must be perfectly coordinated to maintain the integrity of the DNA; cycle dysregulations may be due to the change in the expression of scaffolding molecules such as 14-3-3 proteins [48]. Some of these proteins were found to be up-regulated (YWHAE, YWHAG, YWHAH, and YWHAZ) within the cell cycle pathway ($FDR = 8.02 \times 10^{-5}$), and their function is to bind their substrates preferably via phosphorylation motifs (RSXpSXP or RXXXpSXP) [49]; many of the substrates like cyclin-dependent Kinases (CDK's), p27, p53, cell division cycle proteins participate in the progression of the cell cycle so they can arrest or activate the G1-S and G2-M phases [48]. 14-3-3 proteins also are related to the assembling of microtubules because they can adapt phosphorylated Tau-protein [50], which is responsible for assembling, and form a tripartite complex (14-3-3, Tau-protein, tubulins) so it makes sense that we have detected some up-regulated tubulin proteoforms (TUBA1B, TUBAL3, TUBB, TUBB2A, and TUBB4B), and as it is widely known that microtubules are essential during mitotic progression in the cell cycle [51], many drugs like vincristine, vinblastine, and colchicine, which destabilize the microtubules, and others that stabilize them, like paclitaxel and epothilone, are used as antitumor agents [51].

On the other hand, cytoskeleton proteins like tubulin and actin as well as 14-3-3 proteins have an extremely important role during vesicle-mediated-transport ($FDR = 1.51 \times 10^{-9}$) because microtubules might be useful as a track helping to coat complex protein II (COPII), which arrives from the endoplasmic reticulum to *cis*-Golgi carrying its cargo [25]. We detected dysregulated proteins associated with COPII as SEC23A, a component of the complex [52], and SEC22B, which is a cargo that is binding with COPII through a structural epitope that works as a transport signal [53]. This protein is used as a COPII marker [54]. Additionally, we detected dysregulated components of COPI (COPB2 and COPG1) and ADP-ribosylation factor 5 (ARF5), which have the particularity that they can form COPI vesicles in the same way as ARF1 does [55], glimpsing aberrant vesicle trafficking from *cis*-Golgi to *trans*-Golgi [25,56]. Interestingly, we detected the principal components (CLTC and CLTCL1) of the third large complex with a cage structure, clathrin complex; nevertheless, they are not dysregulated. Clathrin cages use actin filaments during the endocytosis to spatially organize the endocytic machinery, deform and invaginate the plasma membrane, dissolve the cortical microfilaments barrier, generate force during or after the fission reaction, and move the vesicle into the cytoplasm [57]; in this sense,

from low molecular weight ligands like curcumin [72,73] monoclonal antibodies [74–77], miRNAs like miR-320 [78], liposomal nanoparticles targeted by a single-chain antibody fragment to the TfR1 delivering SGT-53 in combination with gemcitabine [79] and T7 and ¹⁸F-A7R dual peptides-modified liposomes codelivery doxorubicin and vincristine [80,81]. Nanoparticles synthesized with Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) carrying surfactant 77KS and doxorubicin using transferrin as ligand targeting on TfR1, have also been tested with positive effects [82], but no attempt has yet been made to use transferrin functionalized mCSNPs, which could serve as a promising strategy since our results indicate that this can be applied but, this nanoparticle must codelivery some anticancer drug in a specific and controlled manner [83–85], exploiting endocytosis and allowing for better cellular and subcellular targeting of drugs, leading to therapies with better efficacy and improved tolerability in order to diminish the cancerous phenotype; which is our next objective. Although this approach is conceptually straightforward and has been successfully used by marketed nanomedicines, it is often challenging practically [86,87].

Quantitative proteomics studies and the use of core-shell nanoparticles, which we have previously shown to have magnetic properties and are attractive for application in the fields of theranostic imaging, cell tracking, hyperthermia, and drug delivery [20], provided an opportune tool to functionalize these nanoparticles with transferrin and target the TfR1 receptor.

5. Conclusions

The use of label-free DIA mass spectrometry in combination with ion-mobility (IM-MS) allowed the identification of TfR1, which was found significantly overexpressed in lung tumor cells. TfR1 is 32 times more abundant in tumors than in normal cells, which could be used to cover the mCSNP's surface together with drugs or antibodies for SCLC treatment. This approach would be valuable for the therapeutic effect, to have a more significant impact on the tumor cells, and, to some extent, to decrease the damage to healthy cells. With the use of magnetic Au-CoFe₂O₄ core-shell nanoparticles with paramagnetic properties, the main advantage of this nanoparticle nucleus-envelope is that it is constituted of two different nanomaterials, which can be effectively used for treatment. The gold coating provides a versatile functional surface platform as well as improves bioavailability and enhances liver and kidney clearance metabolism, capable of functionalization with transferrin, and represents a new alternative for early diagnosis and targeted and controlled drug delivery, for lung cancer and other types of cancer.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14081715/s1>.

Author Contributions: The manuscript was written through the contributions of all authors: Conceptualization, J.T.-R., R.V.-M., G.O. and J.M.H.-H.; methodology, M.A.M., E.R.-C. and G.O.; software, E.R.-C. and R.V.-M.; validation, R.V.-M. and J.T.-R.; formal analysis, E.R.-C.; investigation, R.V.-M., M.A.M. and G.O.; resources, J.T.-R.; data curation, E.R.-C.; writing—original draft preparation, R.V.-M. and E.R.-C.; writing—review and editing, R.V.-M., E.R.-C., J.M.H.-H. and J.T.-R.; visualization, R.V.-M.; supervision, J.T.-R.; project administration, J.T.-R.; funding acquisition, J.T.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Synapt G2-Si was acquired, thanks to financing from the National Council of Science and Technology (CONACYT) through the CONACYT Institutional Fund, Project No. BIO-2015-264360 and Complementary Support for the Consolidation of National Laboratories CONACYT, Project No. 295230.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD015405.

Acknowledgments: We acknowledge the kind support provided by Conacyt under the PhD scholarship No. 632129 to Rocío Villalobos-Marzo. We would like to acknowledge Gustavo Toyos and Andrea Velasco for help with the sampling process and the use of Cytoscape, respectively; Victor Tapia-Ramírez for help with the cell culturing and Victor Rosales Garcia for help with the flow cytometry analysis and Sirenia Gonzalez for help with TEM analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*; World Health Organization. Available online: <https://gco.iarc.fr/today> (accessed on 12 June 2022).
2. Yang, X.; Man, J.; Chen, H.; Zhang, T.; Yin, X.; He, Q.; Lu, M. Temporal trends of the lung cancer mortality attributable to smoking from 1990 to 2017: A global, regional and national analysis. *Lung Cancer* **2021**, *152*, 49–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Thandra, K.C.; Barsouk, A.; Saginala, K.; Aluru, J.S.; Barsouk, A. Epidemiology of lung cancer. *Contemp. Oncol.* **2021**, *25*, 45–52. [[CrossRef](#)]
4. Rudin, C.M.; Brambilla, E.; Faivre-Finn, C.; Sage, J. Small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 3. [[CrossRef](#)]
5. Wistuba, I.I.; Brambilla, E.; Noguchi, M. Classic Anatomic Pathology and Lung Cancer. In *IASLC Thoracic Oncology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
6. Herbst, R.S.; Heymach, J.V.; Lippman, S.M. Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1367–1380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Müller-Hermelink, H.K. Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. *Int. Agency Res. Cancer* **2004**. Available online: https://www.researchgate.net/publication/285709260_Pathology_and_Genetics_of_Tumors_of_the_Lung_Pleura_Thymus_and_Heart (accessed on 8 June 2022).
8. Larsen, J.E.; Minna, J.D. Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clin. Chest Med.* **2011**, *32*, 703–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Olak, J.; Colson, Y. Gender differences in lung cancer: Have we really come a long way, baby? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2004**, *128*, 346–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Müller-Hermelink, H.K.; Harris, C. World Health Organization classification of tumours. *Pathol. Genet. Tumours Lung Pleura Thymus Heart* **2004**, *10*, 179–184.
11. Hayashi, R.; Inomata, M. Small cell lung cancer; recent advances of its biology and therapeutic perspective. *Respir. Investig.* **2022**, *60*, 197–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Melosky, B.; Cheema, P.K.; Brade, A.; McLeod, D.; Liu, G.; Price, P.W.; Jao, K.; Schellenberg, D.D.; Juergens, R.; Leigh, N.; et al. Prolonging Survival: The Role of Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* **2020**, *25*, 981–992. [[CrossRef](#)]
13. Alvarado-Luna, G.; Morales-Espinosa, D. Treatment for small cell lung cancer, where are we now?—A review. *Transl. Lung Cancer Res.* **2016**, *5*, 26. [[PubMed](#)]
14. Bae, Y.H. Drug targeting and tumor heterogeneity. *J. Control. Release* **2009**, *133*, 2–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271–284. [[CrossRef](#)]
16. Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J.V.; Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2856–2860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rios-Castro, E.; Souza, G.H.M.F.; Delgadillo-Álvarez, D.M.; Ramírez-Reyes, L.; Torres-Huerta, A.L.; Velasco-Suárez, A.; Cruz-Cruz, C.; Hernández-Hernández, J.M.; Tapia-Ramírez, J. Quantitative Proteomic Analysis of MARC-145 Cells Infected with a Mexican Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain Using a Label-Free Based DIA approach. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31*, 1302–1312. [[CrossRef](#)]
18. Vásquez-Procopio, J.; Osorio, B.; Cortés-Martínez, L.; Hernández-Hernández, E.; Medina-Contreras, O.; Rios-Castro, E.; Comjean, A.; Li, F.; Hu, Y.; Mohr, S.; et al. Intestinal response to dietary manganese depletion in *Drosophila*. *Metallomics* **2020**, *12*, 218–240. [[CrossRef](#)]
19. Pérez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D.J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450. [[CrossRef](#)]
20. Babicki, S.; Arndt, D.; Marcu, A.; Liang, Y.; Grant, J.R.; Maciejewski, A.; Wishart, D.S. Heatmapper: Web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W147–W153. [[CrossRef](#)]
21. Medina, M.A.; Oza, G.; Ángeles-Pascual, A.; González M., M.; Antaño-López, R.; Vera, A.; Leija, L.; Reguera, E.; Arriaga, L.G.; Hernández Hernández, J.M.; et al. Synthesis, Characterization and Magnetic Hyperthermia of Monodispersed Cobalt Ferrite Nanoparticles for Cancer Therapeutics. *Molecules* **2020**, *25*, 4428. [[CrossRef](#)]

22. Craig, G.A.; Allen, P.J.; Mason, M.D. Synthesis, Characterization, and Functionalization of Gold Nanoparticles for Cancer Imaging. In *Cancer Nanotechnology. In Methods in Molecular Biology*; Grobmyer, S., Moudgil, B., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2010; Volume 624. [\[CrossRef\]](#)
23. Mirski, S.E.; Gerlach, J.H.; Cole, S.P. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2594–2598.
24. Yamamoto, R.; Lin, L.S.; Lowe, R.; Warren, M.K.; White, T.J. The human lung fibroblast cell line, MRC-5, produces multiple factors involved with megakaryocytopoiesis. *J. Immunol.* **1990**, *144*, 1808–1816. [\[PubMed\]](#)
25. Hughson, F.M. Copy Coats: COPI Mimics Clathrin and COPII. *Cell* **2010**, *142*, 19–21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Kawabata, H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 46–54. [\[CrossRef\]](#)
27. Legendre-Guillemain, V.; Metzler, M.; Lemaire, J.-F.; Philie, J.; Gan, L.; Hayden, M.; McPherson, P.S. Huntingtin Interacting Protein 1 (HIP1) Regulates Clathrin Assembly through Direct Binding to the Regulatory Region of the Clathrin Light Chain. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6101–6108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Fuller-Pace, F.V. DEAD box RNA helicase functions in cancer. *RNA Biol.* **2013**, *10*, 121–132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Zhou, R.; Shanas, R.; Nelson, M.A.; Bhattacharyya, A.; Shi, J. Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53. *Int. J. Cancer* **2010**, *126*, 395–404. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Han, N.; Li, W.; Zhang, M. The function of the RNA-binding protein hnRNP in cancer metastasis. *J. Cancer Res. Ther.* **2013**, *9*, 129. [\[CrossRef\]](#)
31. Ali, M.U.; Ur Rahman, M.S.; Jia, Z.; Jiang, C. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317709805. [\[CrossRef\]](#)
32. Bhat, M.; Robichaud, N.; Hulea, L.; Sonenberg, N.; Pelletier, J.; Topisirovic, I. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 261–278. [\[CrossRef\]](#)
33. Lindqvist, L.M.; Yandoc, K.; Topisirovic, I.; Furic, L. Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2018**, *48*, 104–111. [\[CrossRef\]](#)
34. Statello, L.; Maugeri, M.; Garre, E.; Nawaz, M.; Wahlgren, J.; Papadimitriou, A.; Lundqvist, C.; Lindfors, L.; Collén, A.; Sunnerhagen, P.; et al. Identification of RNA-binding proteins in exosomes capable of interacting with different types of RNA: RBP-facilitated transport of RNAs into exosomes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195969. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Février, B.; Raposo, G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 415–421. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Nawaz, M.; Camussi, G.; Valadi, H.; Nazarenko, I.; Ekström, K.; Wang, X.; Principe, S.; Shah, N.; Ashraf, N.M.; Fatima, F.; et al. The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat. Rev. Urol.* **2014**, *11*, 688–701. [\[CrossRef\]](#)
37. Cahill, M.A.; Medlock, A.E. Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *171*, 11–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Ravichandran, M.; Oza, G.; Velumani, S.; Ramirez, J.T.; Vera, A.; Leija, I. Design and evaluation of surface functionalized superparamagneto-plasmonic nanoparticles for cancer therapeutics. *Int. J. Pharm.* **2017**, *524*, 16–29. [\[CrossRef\]](#)
39. Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control. Release* **2015**, *200*, 138–157. [\[CrossRef\]](#)
40. Adam, J.K.; Odhav, B.; Bhoola, K.D. Immune responses in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *99*, 113–132. [\[CrossRef\]](#)
41. Critchley-Thorne, R.J.; Simons, D.L.; Yan, N.; Miyahira, A.K.; Dirbas, F.M.; Johnson, D.L.; Swetter, S.M.; Carlson, R.W.; Fisher, G.A.; Koong, A.; et al. Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9010–9015. [\[CrossRef\]](#)
42. Syedbasha, M.; Egli, A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 119. [\[CrossRef\]](#)
43. Lasfar, A.; Zloza, A.; Silk, A.W.; Lee, L.Y.; Cohen-Solal, K.A. Interferon Lambda: Toward a Dual Role in Cancer. *J. Interf. Cytokine Res.* **2019**, *39*, 22–29. [\[CrossRef\]](#)
44. Setiadi, A.F.; Omilusik, K.; David, M.D.; Seipp, R.P.; Hartikainen, J.; Gopaul, R.; Choi, K.B.; Jefferies, W.A. Epigenetic Enhancement of Antigen Processing and Presentation Promotes Immune Recognition of Tumors. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9601–9607. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Yang, Z.; Gagarin, D.; St. Laurent, G., III; Hammell, N.; Toma, I.; Hu, C.A.; Iwasa, A.; McCaffrey, T.A. Cardiovascular inflammation and lesion cell apoptosis: A novel connection via the interferon-inducible immunoproteasome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 1213–1219. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Pedersen, M.H.; Hood, B.L.; Beck, H.C.; Conrads, T.P.; Ditzel, H.J.; Leth-Larsen, R. Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncotarget* **2017**, *6*, e1305531. [\[CrossRef\]](#)
47. Chen, H.L.; Gabrilovich, D.; Tampé, R.; Girgis, K.R.; Nadaf, S.; Carbone, D.P. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 210–213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Hermeking, H.; Berzinger, A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 183–192. [\[CrossRef\]](#)
49. Yaffe, M.B.; Rittinger, K.; Volinia, S.; Caron, P.R.; Aitken, A.; Leffers, H.; Gamblin, S.J.; Smerdon, S.J.; Cantley, L.C. The Structural Basis for 14-3-3: Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* **1997**, *91*, 961–971. [\[CrossRef\]](#)
50. Sluchanko, N.N.; Gusev, N.B. 14-3-3 Proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochemistry* **2010**, *75*, 1528–1546. [\[CrossRef\]](#)

51. Katsetos, C.D.; Dräber, P. Tubulins as therapeutic targets in cancer: From bench to bedside. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2778–2792. [[CrossRef](#)]
52. Khoriaty, R.; Hesketh, G.G.; Bernard, A.; Weyand, A.C.; Mellacheruvu, D.; Zhu, G.; Hoenehroff, M.J.; McGee, B.; Everett, L.; Adams, E.J.; et al. Functions of the COPII gene paralogs SEC23A and SEC23B are interchangeable in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E7748–E7757. [[CrossRef](#)]
53. Mancias, J.D.; Goldberg, J. The Transport Signal on Sec22 for Packaging into COPII-Coated Vesicles Is a Conformational Epitope. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 403–414. [[CrossRef](#)]
54. Ge, L.; Zhang, M.; Schekman, R. Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment. *eLife* **2014**, *3*, e04135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Popoff, V.; Langer, J.D.; Reckmann, L.; Hellwig, A.; Kahn, R.A.; Brügger, B.; Wieland, E.T. Several ADP-ribosylation Factor (Arf) Isoforms Support COPI Vesicle Formation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35634–35642. [[CrossRef](#)]
56. Gurel, P.S.; Hatch, A.L.; Higgs, H.N. Connecting the Cytoskeleton to the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R660–R672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Qualmann, B.; Kessels, M.M.; Kelly, R.B. Molecular Links between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, F111–F116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Capmany, A.; Yoshimura, A.; Kerdous, R.; Caorsi, V.; Lescure, A.; Del Nery, E.; Coudrier, E.; Goud, B.; Schauer, K. MYO1C stabilizes actin and facilitates the arrival of transport carriers at the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs225029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Smith, A.S.; Pal, K.; Nowak, R.B.; Demenko, A.; Zaninetti, C.; Da Costa, L.; Favier, R.; Pecci, A.; Fowler, V.M. MYH9-related disease mutations cause abnormal red blood cell morphology through increased myosin-actin binding at the membrane. *Am. J. Hematol.* **2019**, *94*, 667–677. [[CrossRef](#)]
60. Hehnl, H.; Stammes, M. Regulating cytoskeleton-based vesicle motility. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2112–2118. [[CrossRef](#)]
61. Mayle, K.M.; Le, A.M.; Kamei, D.T. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 264–281. [[CrossRef](#)]
62. Shtutman, M.; Roninson, I.B. A subunit of coatomer protein complex offers a novel tumor-specific target through a surprising mechanism. *Autophagy* **2011**, *7*, 1551–1552. [[CrossRef](#)]
63. Mellman, I.; Yarden, Y. Endocytosis and Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a016949. [[CrossRef](#)]
64. Wang, Y.; Chai, Z.; Wang, M.; Jin, Y.; Yang, A.; Li, M. COPB2 suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest in human colon cancer by regulating cell cycle-related proteins. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *15*, 777–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wessling-Resnick, M. Iron transport. *Annu. Rev. Nutr.* **2000**, *20*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Gammella, E.; Buratti, P.; Cairo, G.; Recalcati, S. The transferrin receptor: The cellular iron gate. *Metallomics* **2017**, *9*, 1367–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lu, Y.; Low, P.S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 675–693. [[CrossRef](#)]
68. Chen, F.; Fan, Y.; Hou, J.; Liu, B.; Zhang, B.; Shang, Y.; Chang, Y.; Cao, P.; Tan, K. Integrated analysis identifies TfR1 as a prognostic biomarker which correlates with immune infiltration in breast cancer. *Ageing* **2021**, *13*, 21671–21699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Huang, N.; Wei, Y.; Cheng, Y.; Wang, X.; Wang, Q.; Chen, D.; Li, W. Iron metabolism protein transferrin receptor 1 involves in cervical cancer progression by affecting gene expression and alternative splicing in HeLa cells. *Genes Genom.* **2022**, *44*, 637–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Almeida, J.P.M.; Chen, A.L.; Foster, A.; Drezek, R. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 815–835. [[CrossRef](#)]
71. Shen, Y.; Li, X.; Dong, D.; Zhang, B.; Xue, Y.; Shang, P. Transferrin receptor 1 in cancer: A new sight for cancer therapy. *Am. J. Cancer Res.* **2018**, *8*, 916–931.
72. Jiao, Y.; Wilkinson, J., 4th; Pietsch, E.C.; Buss, J.L.; Wang, W.; Planalp, R.; Torti, F.M.; Torti, S.V. Iron chelation in the biological activity of curcumin. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1152–1160. [[CrossRef](#)]
73. Yang, C.; Ma, X.; Wang, Z.; Zeng, X.; Hu, Z.; Ye, Z.; Shen, G. Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**, *ume11*, 431–439. [[CrossRef](#)]
74. Moura, I.C.; Lepelletier, Y.; Arnulf, B.; England, P.; Baude, C.; Beaumont, C.; Bazarbachi, A.; Benhamou, M.; Monteiro, R.C.; Hermine, O. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* **2004**, *103*, 1838–1845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Callens, C.; Moura, I.C.; Lepelletier, Y.; Coulon, S.; Renand, A.; Dussiot, M.; Ghez, D.; Benhamou, M.; Monteiro, R.; Bazarbachi, A.; et al. Recent advances in adult T-cell leukemia therapy. Focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody. *Leukemia* **2008**, *22*, 42–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Daniels-Wells, T.R.; Widney, D.P.; Leoh, L.S.; Martinez-Maza, O.; Penichet, M.L. 2015. Efficacy of an Anti-transferrin Receptor Antibody Against AIDS-related non-Hodgkin Lymphoma: A Brief Communication. *J. Immunother.* **2015**, *38*, 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Shimosaki, S.; Nakahata, S.; Ichikawa, T.; Kitanaka, A.; Kameda, T.; Hidaka, T.; Kubuki, Y.; Kurosawa, G.; Zhang, L.; Sudo, Y.; et al. Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *485*, 144–151. [[CrossRef](#)]

78. Schaar, D.G.; Medina, D.J.; Moore, D.E.; Strair, R.K.; Ting, Y. miR-320 targets transferrin receptor 1 (CD71) and inhibits cell proliferation. *Exp. Hematol.* **2009**, *37*, 245–255. [[CrossRef](#)]
79. Camp, E.R.; Wang, C.; Little, E.C.; Watson, P.M.; Pirollo, K.E.; Rait, A.; Cole, D.J.; Chang, E.H.; Watson, D.K. Transferrin receptor targeting nanomedicine delivering wild-type p53 gene sensitizes pancreatic cancer to gemcitabine therapy. *Cancer Gene Ther.* **2013**, *20*, 222–228. [[CrossRef](#)]
80. Zhang, Y.; Zhai, M.; Chen, Z.; Han, X.; Yu, F.; Li, Z.; Xie, X.; Han, C.; Yu, L.; Yang, Y.; et al. Dual-modified liposome codelivery of doxorubicin and vincristine improve targeting and therapeutic efficacy of glioma. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 1045–1055. [[CrossRef](#)]
81. Seidu, T.A.; Kutoka, P.T.; Asante, D.O.; Farooq, M.A.; Alolga, R.N.; Bo, W. Functionalization of Nanoparticulate Drug Delivery Systems and Its Influence in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1113. [[CrossRef](#)]
82. Scheeren, L.E.; Nogueira-Librelotto, D.R.; Macedo, L.B.; de Vargas, J.M.; Mitjans, M.; Vinardell, M.P.; Rolim, C. Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with pH-responsive behavior: A synergistic approach for cancer therapy. *J. Nanoparticle Res.* **2020**, *22*, 1–18. [[CrossRef](#)]
83. Candelaria, P.V.; Leoh, L.S.; Penichet, M.L.; Daniels-Wells, T.R. Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 607692. [[CrossRef](#)]
84. Xie, Y.; Killinger, B.; Moszczynska, A.; Merkel, O.M. Targeted Delivery of siRNA to Transferrin Receptor Overexpressing Tumor Cells via Peptide Modified Polyethylenimine. *Molecules* **2016**, *21*, 1334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Soni, V.; Kohli, D.V.; Jain, S.K. Transferrin-conjugated liposomal system for improved delivery of 5-fluorouracil to brain. *J. Drug Target.* **2008**, *16*, 73–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Akinc, A.; Battaglia, G. Exploiting Endocytosis for Nanomedicines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a016980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Chang, T.M.S. Artificial cell evolves into nanomedicine, biotherapeutics, blood substitutes, drug delivery, enzyme/gene therapy, cancer therapy, cell/stem cell therapy, nanoparticles, liposomes, bioencapsulation, replicating synthetic cells, cell encapsulation/scaffold, biosorbent/immunosorbent haemoperfusion/plasmapheresis, regenerative medicine, encapsulated microbe, nanobiotechnology, nanotechnology. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2019**, *47*, 997–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

dysregulation of actin filaments could lead to endocytosis malfunction. Fascinatingly, we detected beta-actin proteins (ACTB), actin-related proteins (ACTR2, ACTR3, and ARPC3), and even actin-associated proteins [58,59] (ANK3, MYO1C, and MYH9) being mainly down-regulated, but in contrast, transferrin receptor protein 1 (TfR1) was found to be up-regulated. TfR1 has been widely studied and it could be internalized by clathrin-coated vesicles [60,61]; usually, the interaction with actin during the start of the formation of vesicles is mediated by ERM family proteins containing PDZ domains; nevertheless, the initiation of TfR1-mediated vesicle formation, which is deficient in PDZ domains, also does not use ERM proteins and consequently, actin is not involved [60], which could explain the levels of abundance reported in this work for the proteins participating in the formation of clathrin-coated vesicles. The expression levels of COPI, COPII, and clathrin-coated vesicles play a role in carcinogenic processes [62–64] since their up-regulation is mainly correlated with cell proliferation; nevertheless, we detected subunits of these complexes being mainly down-regulated and this is the reason why other molecular studies must be carried out to understand its role in the H69AR cell line.

We focus our attention on TfR1 because its effects can influence proteins of vesicular traffic that impact other important biological pathways altered in cancer. In addition, we consider TfR1 important for two additional reasons, (a) one of the goals of this work was to detect plasmatic membrane proteins that function as receptors that can serve as targets for functionalized mCSNPs; in this sense, TfR1 works like an important receptor expressed in membranes since transferrin-mediated iron uptake represents the major mechanism used by vertebrate cells to acquire iron from the environment [56,65]. The mechanism is based on the internalization of Fe^{3+} through its ligand [26,54], transferrin (TF). When TF binds to TfR1, the complex TF/TfR1 is endocytosed by clathrin-coated pits [26,60], and inside endosomes, Fe^{3+} is converted to Fe^{2+} by metalloreductases and directed to the cytosol by its corresponding transporters [26,66]. It is important to mention that transferrin releases iron in an acidic environment [67], and, this acidic environment also is extremely useful since the potential chemotherapeutic drugs bonded to the carrying nanoparticle could be broken to make the drug bioavailable. (b) It is desirable that selected receptors have a higher expression in membranes of cell line H69AR, and as we mentioned above, TfR1 satisfies that characteristic, because there is much more abundance in tumor cells compared with non-tumor cells.

Transferrin receptor 1 overexpression has been previously described in different types of cancer, including esophageal, colon, ovarian, lung, liver, glioma, and breast cancer; and generally, an increased expression correlates with poor prognosis. Additionally, Fei Chen et al. (2021) [68], using an integrated multi-analysis of different databases, establish that the increase in TfR1 expression is present in multiple different types of cancer, in coincidence with previous studies. They also highlight that in some types of cancer such as leukemia, lung, and sarcoma, the TfR1 receptor is underexpressed.

The well-known over-expression of TfR1 indicates an important role in molecular mechanisms of cancer [69] and, despite the vast amount of information about the role of a receptor, the molecular stoichiometry of the protein between a cancerous and a normal phenotype is usually missed; although it is true that a possible target must be expressed mainly in the cancer cell, a measure of specific levels of our potential target and comparing with other cells, can give us the security to select a moiety that can discriminate between targeted and non-targeted cells to deliver therapeutic agents to targeted cells or tissues [70], therefore, we think that is important since better strategies can be designed if we know either relative or absolute quantification by proteomics methods; in this manner, TfR1 represented a good election due its exacerbated deregulation between cell lines. Additionally, the fact that its propagation is throughout the plasmatic membrane, and is not predominantly in lysosomes, exosomes, or vesicles increases the probability of a better internalization of synthetic nanotherapeutic platforms [71] like, in our case, mCSNPs.

Some strategies regarding nanomedicine have been applied in different cell types either in vivo or in vitro, with a focus on blocking the mechanism of the action of TfR1, ranging

Anexos

Table A1. Proteínas diferencialmente expresadas. A través del análisis de Laber Free se tubo registro de 188 proteínas sobr-expresadas en membranas de las células H69AR y 174 en membranas de MRC5. También hubieron 32 and 33 proteínas reportadas exclusivamente en membranas de las células H69AR y en MRC5, respectivamente.

Proteins up-regulated in H69AR cell line

Accession	Description	Peptide Count	Unique peptides	Confidence score	Max Fold change
Q9C0G6	Dynein heavy chain 6_ axonemal	29	1	108.37	Exclusive in H69AR
P58107	Epiplakin	23	1	73.87	Exclusive in H69AR
Q7Z333	Probable helicase senataxin	17	1	63.52	Exclusive in H69AR
P07196	Neurofilament light polypeptide	6	4	45.06	Exclusive in H69AR
Q6ZQQ6	WD repeat-containing protein 87	12	1	36.39	Exclusive in H69AR
P98161	Polycystin-1 OS=Homo sapiens	7	1	32.84	Exclusive in H69AR
Q6TFL3	Coiled-coil domain-containing protein 171	8	1	30.99	Exclusive in H69AR
E9PD68	Dihydropyrimidinase-related protein 1	5	1	30.50	Exclusive in H69AR
Q8IZP2	Putative protein FAM10A4	5	1	28.75	Exclusive in H69AR
Q8IWI9	MAX gene-associated protein	8	2	26.96	Exclusive in H69AR
A0A0D9SFK2	Unconventional myosin-XVIIIa	7	1	25.05	Exclusive in H69AR
Q14498	RNA-binding protein 39	4	2	19.58	Exclusive in H69AR
Q66GS9	Centrosomal protein of 135 kDa	4	1	17.41	Exclusive in H69AR
A0A087X1B2	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	3	1	16.39	Exclusive in H69AR

Q9P0Z9	Peroxisomal sarcosine oxidase	3	1	14.86	Exclusive in H69AR
Q9NR30	Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens	3	1	14.73	Exclusive in H69AR
O94823	Probable phospholipid-transporting ATPase VB	4	1	14.59	Exclusive in H69AR
Q13515	Phakinin	4	1	13.60	Exclusive in H69AR
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase_ cytoplasmic	3	1	12.72	Exclusive in H69AR
Q96S21	Ras-related protein Rab-40C	3	1	12.55	Exclusive in H69AR
A0A0C4DGQ6	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A	2	1	11.97	Exclusive in H69AR
Q69YQ0	Cytospin-A	4	1	11.83	Exclusive in H69AR
G3V438	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 (Fragment)	2	1	11.02	Exclusive in H69AR
Q5TH69	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3	3	1	9.91	Exclusive in H69AR
B4DWR3	Prefoldin subunit 3	2	1	9.70	Exclusive in H69AR
G3V2D8	Zinc finger FYVE domain-containing protein 26	3	1	8.34	Exclusive in H69AR
Q5BKZ1	DBIRD complex subunit ZNF326	2	1	7.83	Exclusive in H69AR
P62266	40S ribosomal protein S23	2	1	7.71	Exclusive in H69AR
Q9ULX5	RING finger protein 112	2	1	7.38	Exclusive in H69AR
B1ANM0	Galectin (Fragment)	2	1	6.57	Exclusive in H69AR
K7EJ84	Dystrobrevin alpha (Fragment)	1	1	6.08	Exclusive in H69AR

P58397	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12	2	1	6.03	Exclusive in H69AR
P07910-2	Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	12	1	102.95	187.47
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	16	3	95.29	113.10
P52292	Importin subunit alpha-1	7	3	43.23	89.93
O14929	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	3	2	15.85	80.34
F8W6I7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9	2	78.38	61.31
K7ENG2	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	3	2	19.67	49.85
P43243	Matrin-3	11	7	69.95	46.94
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	15	9	112.75	44.40
E9PGT6	COP9 signalosome complex subunit 8	2	1	12.37	43.70
Q9NS69	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	2	2	12.48	36.95
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	11	6	44.37	34.17
P33527	Multidrug resistance-associated protein 1	63	50	381.14	33.49
P02786	Transferrin receptor protein 1	28	18	173.00	32.86
P23246	Splicing factor_ proline- and glutamine-rich	7	6	45.73	30.12
P30626	Sorcin	6	5	29.52	29.06
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	26	14	141.98	28.05
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	18	9	107.40	27.24
P20020	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	12	3	59.28	26.25
O14980	Exportin-1	10	7	61.64	25.29
O43592	Exportin-T	6	2	32.56	24.58

O60812	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	8	1	50.00	24.50
P12277	Creatine kinase B-type	19	14	100.42	24.28
A0A1W2PQ51	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	14	3	92.13	18.95
Q9Y230	RuvB-like 2	7	5	42.68	15.77
A0A0J9YVP6	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (Fragment)	3	2	17.61	15.19
Q96QB1	Rho GTPase-activating protein 7	13	2	51.83	15.08
P16435	NADPH--cytochrome P450 reductase	7	2	44.57	14.16
Q1KMD3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	7	2	28.76	13.85
Q32P51	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	17	5	63.56	13.38
P38159	RNA-binding motif protein_X chromosome	5	2	33.69	13.29
P35637	RNA-binding protein FUS	6	4	30.62	13.25
P13929	Beta-enolase	8	1	47.83	12.77
C9JDM3	Ran-specific GTPase-activating protein (Fragment)	2	2	15.43	12.56
P55011	Solute carrier family 12 member 2	9	3	40.26	12.16
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B	9	3	65.69	12.12
P61086	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	6	1	40.68	11.28
O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	17	6	73.50	11.22
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC	6	3	35.00	11.19
Q9UKA9	Polypyrimidine tract-binding protein 2	3	2	19.89	11.03
Q92616	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	21	6	80.91	10.69

P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	20	9	90.79	10.37
Q9Y265	RuvB-like 1	8	6	40.61	10.30
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	10	5	56.73	10.23
O15018	PDZ domain-containing protein 2	9	3	27.87	9.97
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	3	2	19.95	9.33
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III	8	3	50.04	9.28
P23526	Adenosylhomocysteinase	6	2	28.93	8.85
P19338	Nucleolin	33	23	168.76	8.73
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	13	9	86.47	8.69
Q8WXF1	Paraspeckle component 1	3	3	19.05	8.69
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	5	3	28.53	8.32
A0A087WVC4	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	4	1	20.52	8.16
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	28	3	106.67	7.73
A0A024RCR6	HLA-B associated transcript 3_ isoform CRA_a	3	2	15.52	7.58
B4DHE8	cDNA FLJ56904_ highly similar to RNA-binding protein Musashi homolog 2	5	3	32.26	7.56
A0A087WXQ7	POTE ankyrin domain family member C	2	1	10.94	7.48
Q92538	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1	2	1	10.40	7.45
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein_mitochondrial	4	1	24.42	7.19
P43246	DNA mismatch repair protein Msh2	7	2	35.87	7.18

P06748	Nucleophosmin	10	8	78.67	6.94
P13533	Myosin-6	10	1	37.30	6.56
Q10472	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	6	3	33.57	6.50
A0A087WYT3	Prostaglandin E synthase 3	2	1	9.18	6.32
P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	15	4	72.22	6.29
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	12	9	56.82	6.28
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	7	5	44.64	6.15
Q9NQT8	Kinesin-like protein KIF13B	9	2	42.97	5.88
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	19	15	96.51	5.77
P62258	14-3-3 protein epsilon	15	9	121.45	5.67
P05455	Lupus La protein	5	2	30.27	5.61
Q14974	Importin subunit beta-1	18	16	106.06	5.60
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	68	25	399.63	5.52
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	8	4	43.33	5.47
Q96BY6	Dedicator of cytokinesis protein 10	9	3	30.38	5.40
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	14	6	91.36	5.34
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	2	2	13.95	4.95
Q02878	60S ribosomal protein L6	3	3	18.77	4.94
P84085	ADP-ribosylation factor 5	6	3	30.83	4.86
P06733	Alpha-enolase	33	20	180.33	4.83
Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	8	4	33.44	4.79
P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	3	1	15.31	4.78

Q15029	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	9	6	50.35	4.72
A0A087X054	Hypoxia up-regulated protein 1	13	6	71.24	4.72
Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	8	3	43.33	4.62
P69849	Nodal modulator 3	13	9	81.60	4.56
Q12931	Heat shock protein 75 kDa_mitochondrial	13	8	91.17	4.39
Q9UI47	Catenin alpha-3	5	1	23.70	4.28
Q9P2D1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	19	5	66.39	4.28
O00231	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	9	6	54.48	4.23
O95197	Reticulon-3	11	4	47.85	4.17
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	19	9	92.60	4.14
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase_cytoplasmic	12	3	59.77	4.08
P56192	Methionine--tRNA ligase_cytoplasmic	9	3	55.65	4.08
A0A087WTT1	Polyadenylate-binding protein	10	3	72.79	4.05
D6RAF8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment)	7	3	47.86	4.04
P62701	40S ribosomal protein S4_X isoform	6	6	42.46	4.03
P25398	40S ribosomal protein S12	2	2	6.11	4.01
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	5	2	19.12	3.99
Q9UJZ1	Stomatin-like protein 2_mitochondrial	5	3	32.02	3.96
P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A	19	4	101.31	3.90
P14174	Macrophage migration inhibitory factor	2	1	13.52	3.90
Q9Y2I7	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase	15	3	52.59	3.80

E7EP17	Dynein heavy chain 9_ axonemal	7	1	25.66	3.78
K7ERF1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	2	1	12.19	3.76
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	3	2	6.65	3.76
Q4VXU2	Polyadenylate-binding protein 1-like	10	4	56.35	3.75
Q96A33	Coiled-coil domain-containing protein 47	2	2	11.80	3.66
P34897	Serine hydroxymethyltransferase_ mitochondrial	11	3	54.59	3.63
P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	10	5	62.84	3.60
P35916	Vascular endothelial growth factor receptor 3	4	1	15.44	3.51
A0A087WWK8	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1	3	1	10.63	3.51
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	47	17	347.54	3.51
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	22	12	105.92	3.50
P48449	Lanosterol synthase	8	1	45.20	3.49
P08754	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	5	1	33.18	3.49
P62263	40S ribosomal protein S14	2	2	6.16	3.44
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	5	2	29.54	3.43
A0A0B4J1R6	Transketolase	10	3	63.68	3.41
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	14	8	85.23	3.39
P62714	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	4	2	25.56	3.37
Q04917	14-3-3 protein eta	8	1	76.09	3.35
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	8	4	44.31	3.34

P21912	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_mitochondrial	12	5	59.21	3.34
P46783	40S ribosomal protein S10	2	1	14.55	3.34
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	13	9	74.24	3.31
B7Z9C2	cDNA FLJ58569_ highly similar to Nucleosome assembly protein 1-like 1	3	3	20.82	3.29
A0A2R8Y543	Catenin beta-1	4	1	21.70	3.28
P60174	Triosephosphate isomerase	19	11	97.12	3.26
A6NHL2	Tubulin alpha chain-like 3	3	1	30.08	3.25
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	6	3	35.66	3.23
P61981	14-3-3 protein gamma	17	10	84.93	3.20
O96008	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog	4	2	27.66	3.19
O95831	Apoptosis-inducing factor 1_mitochondrial	8	6	48.44	3.12
Q9Y536	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A	3	1	14.95	3.10
E9PLA9	Caprin-1 (Fragment)	2	2	11.22	3.10
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	13	7	105.51	3.09
J3QS41	Probable helicase with zinc finger domain	6	1	18.61	3.08
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	4	3	21.02	3.02
P13637	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	11	1	56.11	3.00
Q13185	Chromobox protein homolog 3	4	1	27.60	3.00
Q13885	Tubulin beta-2A chain	28	5	189.15	3.00
Q9BUP0	EF-hand domain-containing protein D1	3	2	16.60	2.98
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	5	1	26.47	2.97
E9PBLO	E3 ISG15--protein ligase HERC5	3	1	15.69	2.96

Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93	9	4	52.00	2.92
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	22	15	114.35	2.92
O75116	Rho-associated protein kinase 2	15	1	56.93	2.91
Q15417	Calponin-3	6	2	36.99	2.91
K7EKI0	Envoplakin	7	1	24.74	2.91
P32119	Peroxiredoxin-2	4	2	28.62	2.90
Q16658	Fascin	10	6	58.22	2.90
P07437	Tubulin beta chain	25	2	218.87	2.88
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	24	10	159.96	2.86
Q14240	Eukaryotic initiation factor 4A-II	22	5	107.25	2.86
P54652	Heat shock-related 70 kDa protein 2	19	5	110.41	2.85
P35268	60S ribosomal protein L22	3	1	16.28	2.85
A0A087WUS0	40S ribosomal protein S24	2	1	13.62	2.79
Q92598	Heat shock protein 105 kDa	8	2	42.55	2.74
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein_mitochondrial	28	11	148.59	2.72
P13639	Elongation factor 2	31	19	150.09	2.70
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	8	3	36.52	2.65
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	16	10	109.73	2.64
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	17	13	91.41	2.62
P68371	Tubulin beta-4B chain	32	8	201.07	2.62
P62249	40S ribosomal protein S16	7	5	32.18	2.59
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	7	3	32.15	2.59
P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	5	3	28.17	2.58
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	5	2	28.46	2.58

O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	20	9	134.10	2.56
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	9	3	51.90	2.56
Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	9	6	54.18	2.56
P55795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	7	1	49.57	2.51
P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	16	6	93.59	2.49
P62424	60S ribosomal protein L7a	6	4	41.53	2.49
Q86VI3	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	8	1	34.67	2.48
O60716	Catenin delta-1	8	3	45.92	2.48
P63244	Receptor of activated protein C kinase 1	11	8	54.24	2.48
P62269	40S ribosomal protein S18	3	1	19.29	2.46
P23396	40S ribosomal protein S3	23	15	108.38	2.46
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	14	7	78.94	2.44
P09211	Glutathione S-transferase P	10	9	92.47	2.44
P55884	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	10	5	49.98	2.42
P62753	40S ribosomal protein S6	6	4	36.89	2.39
Q99497	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	3	1	21.86	2.38
Q9HDC9	Adipocyte plasma membrane-associated protein	12	7	60.20	2.38
P68363	Tubulin alpha-1B chain	24	8	158.13	2.36
B4DKY1	Cysteine--tRNA ligase_ cytoplasmic	6	4	25.77	2.34
P08865	40S ribosomal protein SA	10	5	56.08	2.30

Proteins up-regulated in MRC5 cell line

Accession	Description	Peptide Count	Unique peptides	Confidence score	Max Fold change
------------------	--------------------	----------------------	------------------------	-------------------------	------------------------

Q6P0N0	Mis18-binding protein 1	9	1	38.53	Exclusive in MRC5
P05120	Plasminogen activator inhibitor 2	5	1	29.98	Exclusive in MRC5
Q6DD88	Atlastin-3	4	2	27.77	Exclusive in MRC5
Q96SN8	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2	5	1	22.86	Exclusive in MRC5
Q9Y678	Coatomer subunit gamma-1	5	1	21.92	Exclusive in MRC5
A0A0D9SEN1	Prolyl endopeptidase FAP	5	1	20.84	Exclusive in MRC5
H0YL12	Electron transfer flavoprotein subunit alpha_mitochondrial (Fragment)	3	3	20.13	Exclusive in MRC5
Q99973	Telomerase protein component 1	5	1	18.10	Exclusive in MRC5
Q969X5	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	3	1	17.26	Exclusive in MRC5
Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]_mitochondrial	3	1	17.15	Exclusive in MRC5
Q6ZUX3	TOG array regulator of axonemal microtubules protein 2	3	1	17.03	Exclusive in MRC5
Q9UBR2	Cathepsin Z	3	2	16.72	Exclusive in MRC5
Q9BXU1	Serine/threonine-protein kinase 31	4	1	15.85	Exclusive in MRC5
E9PDF6	Unconventional myosin-Ib	3	1	14.99	Exclusive in MRC5
H7C1F9	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-2 (Fragment)	4	1	13.96	Exclusive in MRC5
A0A140T9T7	Antigen peptide transporter 1	3	1	13.73	Exclusive in MRC5
A3KMH1	von Willebrand factor A domain-containing protein 8 OS=Homo	4	1	13.57	Exclusive in MRC5

	sapiens OX=9606 GN=VWA8 PE=1 SV=2				
P53804	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	4	1	13.54	Exclusive in MRC5
Q9UPU5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	3	1	13.30	Exclusive in MRC5
P04216	Thy-1 membrane glycoprotein	3	1	12.94	Exclusive in MRC5
Q5VZL5	Zinc finger MYM-type protein 4	3	1	12.09	Exclusive in MRC5
P22033	Methylmalonyl-CoA mutase_ mitochondrial	3	1	11.39	Exclusive in MRC5
E9PEZ1	Cullin-9	3	1	11.17	Exclusive in MRC5
A0A0C4DFN3	Monoglyceride lipase	2	1	10.40	Exclusive in MRC5
O60343	TBC1 domain family member 4	3	1	10.35	Exclusive in MRC5
Q96S97	Myeloid-associated differentiation marker	2	1	9.51	Exclusive in MRC5
P29279	Connective tissue growth factor	2	1	9.22	Exclusive in MRC5
E9PHY8	Maestro heat-like repeat- containing protein family member 1	3	1	8.97	Exclusive in MRC5
Q96AQ6	Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	2	1	8.90	Exclusive in MRC5
P10253	Lysosomal alpha-glucosidase	2	1	8.65	Exclusive in MRC5
A0A0A0MT46	POU domain protein (Fragment)	2	1	7.07	Exclusive in MRC5
O60706	ATP-binding cassette sub-family C member 9	2	1	6.61	Exclusive in MRC5
Q9UHD2	Serine/threonine-protein kinase TBK1	2	1	6.54	Exclusive in MRC5
A0A0B4J2A4	3-ketoacyl-CoA thiolase_ mitochondrial	3	1	17.91	0.43

P14314	Glucosidase 2 subunit beta	12	9	62.21	0.43
Q9Y281	Cofilin-2	4	1	28.25	0.42
P36776	Lon protease homolog_ mitochondrial	13	5	62.30	0.41
Q9NYU1	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2	6	2	20.33	0.41
H0YDM2	Protein SOGA1 (Fragment)	2	1	7.36	0.41
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b	5	2	34.44	0.41
P35913	Rod cGMP-specific 3'_5'-cyclic phosphodiesterase subunit beta	5	1	21.35	0.40
P04843	Dolichyl- diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase subunit 1	14	8	88.60	0.39
Q2LD37	Transmembrane protein KIAA1109	27	2	115.64	0.39
P27708	CAD protein	14	4	75.10	0.39
P07942	Laminin subunit beta-1	11	3	62.77	0.39
H0YE29	Rho GTPase-activating protein 1 (Fragment)	3	1	14.89	0.39
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	11	6	70.36	0.39
O75445	Usherin	15	2	54.73	0.39
Q4KWH8	1-phosphatidylinositol 4_5- bisphosphate phosphodiesterase eta-1	19	3	67.30	0.38
P35606	Coatomer subunit beta'	15	3	75.54	0.38
Q7Z7A1	Centriolin	18	2	66.23	0.38
P07954	Fumarate hydratase_ mitochondrial	4	3	20.81	0.38
Q16643	Drebrin	3	3	21.29	0.38
P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	39	29	236.71	0.38
P42345	Serine/threonine-protein kinase mTOR	4	1	14.15	0.37

O00370	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein	4	2	13.17	0.37
P60709	Actin_ cytoplasmic 1	59	23	310.29	0.37
O43707	Alpha-actinin-4	45	23	312.28	0.37
P60660	Myosin light polypeptide 6	8	4	60.66	0.37
Q9ULV4	Coronin-1C	5	3	28.88	0.36
Q96K21	Abscission/NoCut checkpoint regulator	3	2	14.62	0.36
Q07864	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	6	1	19.99	0.36
Q5VT06	Centrosome-associated protein 350	19	5	73.38	0.36
Q8WYK1	Contactin-associated protein-like 5	8	2	29.10	0.36
Q92736	Ryanodine receptor 2	27	2	98.33	0.35
Q6KC79	Nipped-B-like protein	6	3	21.39	0.35
Q06210	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	6	5	32.28	0.35
P10515	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex_ mitochondrial	7	2	35.14	0.35
Q08945	FACT complex subunit SSRP1	5	2	19.99	0.35
P12814	Alpha-actinin-1	40	15	342.86	0.35
O14795	Protein unc-13 homolog B	8	1	32.27	0.35
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	7	4	39.01	0.34
O95202	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	10	3	52.23	0.34
E9PEM5	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	4	1	17.94	0.33
Q5VU43	Myomegalin	11	3	56.64	0.33
P06756	Integrin alpha-V	9	2	47.80	0.33
Q07954	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	13	4	60.72	0.33

P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha_mitochondrial	21	10	118.79	0.32
H0YLX2	DNA-binding protein RFX7	5	2	18.17	0.32
Q70UQ0	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	4	1	21.26	0.32
Q8IVF4	Dynein heavy chain 10_axonemal	28	2	113.76	0.32
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	9	5	52.62	0.32
P26641	Elongation factor 1-gamma	17	8	80.32	0.32
P68032	Actin_alpha cardiac muscle 1	28	12	234.52	0.32
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	29	13	144.36	0.32
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	19	12	81.67	0.31
Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	8	2	28.03	0.31
Q9NRL2	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	4	2	12.80	0.31
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	31	26	194.90	0.31
P61158	Actin-related protein 3	6	2	36.55	0.31
Q58FF3	Putative endoplasmin-like protein	8	3	46.94	0.30
Q96QP1	Alpha-protein kinase 1	4	1	18.61	0.30
P55084	Trifunctional enzyme subunit beta_mitochondrial	4	2	31.58	0.30
P07237	Protein disulfide-isomerase	29	26	172.99	0.29
Q8IWZ3	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1	2	2	7.28	0.29
Q9H254	Spectrin beta chain_non-erythrocytic 4	25	2	129.64	0.29
Q99536	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	8	6	51.74	0.29

Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	8	1	36.75	0.29
P17655	Calpain-2 catalytic subunit	5	2	34.79	0.29
Q8NHM5	Lysine-specific demethylase 2B	3	2	10.04	0.29
Q13813	Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1	22	1	101.58	0.29
P27797	Calreticulin	16	9	91.14	0.28
P00505	Aspartate aminotransferase_ mitochondrial	7	3	48.92	0.28
Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase_ mitochondrial	8	5	36.38	0.27
P17301	Integrin alpha-2	16	1	94.09	0.27
P61160	Actin-related protein 2	8	6	48.48	0.27
Q13724	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	3	1	14.65	0.27
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_ mitochondrial	8	2	36.92	0.26
B9A067	MICOS complex subunit MIC60	4	2	19.96	0.26
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase_ mitochondrial	9	7	44.09	0.26
P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	7	1	27.91	0.25
P05556	Integrin beta-1	15	13	73.91	0.24
O14578	Citron Rho-interacting kinase	19	2	81.09	0.24
O00291	Huntingtin-interacting protein 1	7	1	27.27	0.24
P09382	Galectin-1	8	6	57.86	0.23
O00203	AP-3 complex subunit beta-1	4	2	13.44	0.23
Q14247	Src substrate cortactin	7	2	39.69	0.23
P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_ mitochondrial	5	1	30.43	0.22
Q5T7B8	Kinesin-like protein KIF24	6	2	18.61	0.22
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	18	4	68.79	0.22

P07339	Cathepsin D	16	9	84.99	0.22
Q8TD26	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6	9	1	30.82	0.22
O14950	Myosin regulatory light chain 12B	14	3	79.11	0.22
O60664	Perilipin-3	9	8	71.45	0.21
P09936	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	6	2	43.63	0.21
P15311	Ezrin	15	6	89.82	0.20
A0A087WYR3	Tumor protein D54	5	2	32.65	0.20
A0A024QZX5	Serpin B6	7	2	38.18	0.20
P35579	Myosin-9	105	65	763.97	0.20
P17813	Endoglin	3	2	15.08	0.19
Q70CQ2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34	7	1	27.82	0.19
Q9NZM1	Myoferlin	31	14	170.09	0.19
Q9UKA4	A-kinase anchor protein 11	3	1	7.57	0.18
P48681	Nestin	29	21	191.49	0.17
Q9Y263	Phospholipase A-2-activating protein	5	3	19.74	0.17
P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	9	2	48.79	0.17
P18031	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	4	2	17.03	0.17
Q96HE7	ERO1-like protein alpha	4	2	20.44	0.17
O75915	PRA1 family protein 3	2	1	11.50	0.16
Q15149	Plectin	74	2	438.34	0.16
F5H365	Protein transport protein SEC23	3	1	18.43	0.16
Q2TB90	Putative hexokinase HKDC1	2	1	7.13	0.15
P02549	Spectrin alpha chain_erythrocytic 1	21	4	66.72	0.15
A0A0G2JH68	Protein diaphanous homolog 1	2	1	7.54	0.15
Q12955	Ankyrin-3	27	6	100.27	0.15

P53634	Dipeptidyl peptidase 1	3	2	11.35	0.15
Q9NZJ4	Sacsin	30	4	124.88	0.13
Q9NQC3	Reticulon-4	9	3	59.37	0.13
Q8IWC1	MAP7 domain-containing protein 3	4	1	16.24	0.13
A0A0G2JLB3	Glucosylceramidase	3	1	19.26	0.12
P30084	Enoyl-CoA hydratase_ mitochondrial	5	3	34.43	0.12
Q7Z2Y8	Interferon-induced very large GTPase 1	17	2	63.87	0.12
O14966	Ras-related protein Rab-7L1	3	1	16.93	0.12
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3	12	10	83.15	0.11
E9PRY8	Elongation factor 1-delta	5	2	37.82	0.11
P21399	Cytoplasmic aconitate hydratase	3	1	14.97	0.11
Q52LW3	Rho GTPase-activating protein 29	6	1	18.99	0.11
P16070	CD44 antigen	11	9	62.09	0.11
Q96TA1	Niban-like protein 1	7	3	43.29	0.11
P20742	Pregnancy zone protein	5	2	16.31	0.11
P08758	Annexin A5	21	17	115.48	0.11
Q8WWI1	LIM domain only protein 7	12	3	65.01	0.10
E9PCX2	Aldose reductase	3	1	19.74	0.10
Q05682	Caldesmon	11	10	67.27	0.10
H0Y9T5	m7GpppN-mRNA hydrolase (Fragment)	2	1	7.60	0.10
P26038	Moesin	23	12	175.44	0.10
Q9C0G0	Zinc finger protein 407	7	2	24.51	0.09
P27487	Dipeptidyl peptidase 4	6	3	34.26	0.09
P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex_ mitochondrial	6	2	37.49	0.09

Q96P48	Arf-GAP with Rho-GAP domain_ ANK repeat and PH domain- containing protein 1	5	1	19.02	0.09
P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9	10	2	73.02	0.09
P17980	26S proteasome regulatory subunit 6A	4	2	19.27	0.08
C9JKI3	Caveolin (Fragment)	2	2	14.58	0.08
Q13492	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	6	3	34.17	0.08
P61009	Signal peptidase complex subunit 3	2	1	10.96	0.08
O94925	Glutaminase kidney isoform_ mitochondrial	5	2	28.80	0.08
A0A087WV00	Diacylglycerol kinase	3	1	12.66	0.08
Q8NF91-10	Isoform 10 of Nesprin-1	5	1	23.75	0.07
P16278	Beta-galactosidase	6	4	38.74	0.07
Q8WX93	Palladin	8	3	36.60	0.06
Q96AY3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	7	4	37.26	0.06
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	10	5	59.15	0.06
Q14764	Major vault protein	8	7	56.36	0.06
Q92993	Histone acetyltransferase KAT5	2	1	8.45	0.06
P08670	Vimentin	158	90	696.36	0.06
Q14164	Inhibitor of nuclear factor kappa- B kinase subunit epsilon	3	1	10.76	0.06
P49748	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial	9	7	60.87	0.05
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	11	6	58.90	0.05
A0A1B0GTM3	Acid ceramidase	4	2	23.45	0.05
O43451	Maltase-glucoamylase_ intestinal	3	1	12.41	0.05
P10620	Microsomal glutathione S- transferase 1	3	2	19.85	0.05

P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	6	3	38.39	0.05
O00159	Unconventional myosin-Ic	15	8	78.78	0.05
P10619	Lysosomal protective protein	2	2	13.39	0.04
E9PP21	Cysteine and glycine-rich protein 1	3	3	19.23	0.04
F6S8M0	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	3	3	20.12	0.04
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	13	1	89.06	0.04
O43852	Calumenin	7	7	40.02	0.04
P11277	Spectrin beta chain_ erythrocytic	18	1	71.79	0.02
Q01995	Transgelin	25	22	154.32	0.02
Q6NZI2	Caveolae-associated protein 1	11	10	57.67	0.01
P15144	Aminopeptidase N	8	4	49.17	0.01
Q14315	Filamin-C	57	36	386.56	0.01
P43304	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase_ mitochondrial	8	2	37.13	0.01
O95786	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58	2	2	6.69	0.01
O15460	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	7	4	38.39	0.01
P17600	Synapsin-1	3	3	5.71	0.00

Table A2. Identified proteins by mass spectrometry. On the first sheet "Total Proteins" are all proteins detected in the experiment, the raw intensities measured were provided. On the second sheet "Only ID proteins" are proteins which were not quantified, because they have not unique peptides. On the third sheet, "Exclusive Proteins" are proteins which are unique either on MRC5 or H69AR. On the fourth sheet "Quantified Proteins" are all shared proteins in both conditions (1,298), which could be quantified by the Hi3 method. On the fifth sheet "Unchanged", we reported 186 proteins which did not change the abundance between MRC5 and H69AR cell lines. On the sixth sheet "Up", we reported 188 proteins which are up-regulated in H69AR cell line; and finally, on the seventh sheet "Down", we reported 174 proteins which are down-regulated in H69AR cell line. "Unchanged", "Up", "Down" proteins were selected through a restrictive filter: a coefficient of variation (CV) ≤ 0.30 , at least 2 peptides per protein, considering in those at least 1 unique peptide and ANOVA ≤ 0.05 and that they have been detected in all triplicates.

Proteins up-regulated in H69AR cell line					
Accession	Peptide Count	Unique peptides	Confidence score	Max Fold change	Description
P08670	158	90	696.3562	17.5323435	Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM PE=1 SV=4
P60709	59	23	310.2941	2.68905147	Actin_ cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1
REVERSE34323	2	1	10.3834	9604.1615	Reversed Sequence 34323
P04406	40	22	142.8145	1.19953065	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1 SV=3
Q5VU43	11	3	56.6379	3.01754452	Myomegalin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDE4DIP PE=1 SV=3

P61009	2	1	10.9649	12.8733069	Signal peptidase complex subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPCS3 PE=1 SV=1
Q01995	25	22	154.322	60.8955526	Transgelin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAGLN PE=1 SV=4
P09382	8	6	57.8623	4.31765666	Galectin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS1 PE=1 SV=2
P68032	28	12	234.5224	3.17238455	Actin_ alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTC1 PE=1 SV=1
P35579	105	65	763.9655	4.96519794	Myosin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH9 PE=1 SV=4
O00291	7	1	27.2657	4.19660502	Huntingtin-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIP1 PE=1 SV=5
P11142	43	18	239.2036	1.68199648	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA8 PE=1 SV=1
P11021	39	29	236.7112	2.65623891	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA5 PE=1 SV=2
P27824	24	12	161.6345	1.63786002	Calnexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CANX PE=1 SV=2
P12814	40	15	342.8639	2.88941997	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN1 PE=1 SV=2
P14618	38	28	211.4319	1.17569317	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4
P21333	84	53	583.5784	1.2990451	Filamin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNA PE=1 SV=4
P07355	22	6	176.1815	1.31188897	Annexin A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2 PE=1 SV=2
P25705	25	18	123.3378	1.73125682	ATP synthase subunit alpha_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1A PE=1 SV=1
Q14315	57	36	386.5626	77.6623632	Filamin-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNC PE=1 SV=3
Q6S8J3	29	13	144.3595	3.17378743	POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POTEE PE=2 SV=3

O43707	45	23	312.2825	2.71905841	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN4 PE=1 SV=2
P04264	25	15	143.7107	1.31360674	Keratin_type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6
P14625	49	31	325.2162	1.25954401	Endoplasmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1
P06733	33	20	180.3256	4.82851058	Alpha-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO1 PE=1 SV=2
P00387	12	10	83.1546	8.75186967	NADH-cytochrome b5 reductase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R3 PE=1 SV=3
P16070	11	9	62.0904	9.09306481	CD44 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD44 PE=1 SV=3
P23284	19	12	81.6695	3.18822374	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIB PE=1 SV=2
P51149	19	12	103.9671	1.48419449	Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB7A PE=1 SV=1
REVERSE12005	4	1	14.389	3.06242287	Reversed Sequence 12005
P06576	37	28	155.8649	1.74706649	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3
Q15084	18	10	81.8596	1.16473686	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA6 PE=1 SV=1
Q07065	31	26	194.9039	3.24180089	Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKAP4 PE=1 SV=2
Q6P2S7	4	1	15.2229	1.5026006	Putative tetratricopeptide repeat protein 41 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTC41P PE=5 SV=3
P24534	4	2	30.1757	2.06257511	Elongation factor 1-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1B2 PE=1 SV=3
P27797	16	9	91.1406	3.50975139	Calreticulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALR PE=1 SV=1
P07237	29	26	172.9872	3.39468078	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3

P07737	11	9	47.1152	1.40920037	Profilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFN1 PE=1 SV=2
P30101	31	19	176.9943	2.02110733	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA3 PE=1 SV=4
P07437	25	2	218.8711	2.87822146	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB PE=1 SV=2
P21589	13	8	82.2812	204.285143	5'-nucleotidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NT5E PE=1 SV=1
Q5VTE0	25	20	108.2247	1.29381627	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1A1P5 PE=5 SV=1
P08238	68	25	399.6263	5.52493477	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4
Q01518	10	8	54.4804	1.92324593	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAP1 PE=1 SV=5
P18206	45	34	269.5096	2.07694488	Vinculin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VCL PE=1 SV=4
P55072	26	18	145.7097	2.15934392	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VCP PE=1 SV=4
Q03001-8	44	6	162.2625	1.53869293	Isoform 2 of Dystonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DST
Q8WWI1	12	3	65.0063	9.60516891	LIM domain only protein 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMO7 PE=1 SV=3
P04792	11	8	61.4387	1.88234075	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPB1 PE=1 SV=2
O60664	9	8	71.4511	4.65977609	Perilipin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLIN3 PE=1 SV=3
P62820	6	4	59.457	1.65269784	Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB1A PE=1 SV=3
P04083	13	12	73.3788	1.60318011	Annexin A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA1 PE=1 SV=2
P23528	11	5	65.7372	1.43185012	Cofilin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFL1 PE=1 SV=3

Q8NF91-10	5	1	23.7532	13.8461241	Isoform 10 of Nesprin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNE1
Q00610	50	22	310.474	1.34888278	Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTC PE=1 SV=5
P07900	47	17	347.5412	3.50836127	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5
Q6NZI2	11	10	57.668	69.2704044	Caveolae-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAVIN1 PE=1 SV=1
REVERSE3191	4	1	19.7589	6365.5093	Reversed Sequence 3191
P63104	13	7	105.5062	3.08562223	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1
P37802	18	13	90.388	1.12769095	Transgelin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TAGLN2 PE=1 SV=3
P09211	10	9	92.4715	2.44114219	Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSTP1 PE=1 SV=2
Q7Z794	7	2	37.8233	1.06971479	Keratin_type II cytoskeletal 1b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT77 PE=2 SV=3
P62241	5	3	40.7521	1.13389769	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS8 PE=1 SV=2
Q8TE73	12	1	42.8393	58.8280844	Dynein heavy chain 5_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH5 PE=1 SV=3
O00151	2	1	10.7514	210.332614	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDLIM1 PE=1 SV=4
P50454	14	10	90.7037	1.75464562	Serpin H1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINH1 PE=1 SV=2
REVERSE17592	4	2	20.8874	6244.66313	Reversed Sequence 17592
Q05682	11	10	67.2714	9.89098521	Caldesmon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALD1 PE=1 SV=3
P38646	20	17	120.0478	1.45820674	Stress-70 protein_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2
REVERSE24318	2	1	11.0996	36.6073506	Reversed Sequence 24318

P04899	9	5	60.8554	1.23227983	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAI2 PE=1 SV=3
P40939	21	10	118.7898	3.09846206	Trifunctional enzyme subunit alpha_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADHA PE=1 SV=2
P40926	18	11	108.7306	1.02453867	Malate dehydrogenase_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH2 PE=1 SV=3
O15173	4	1	21.8987	1.26547792	Membrane-associated progesterone receptor component 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGRMC2 PE=1 SV=1
P13645	19	12	128.087	1.45186943	Keratin_type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT10 PE=1 SV=6
P62937	22	12	105.9238	3.49781634	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIA PE=1 SV=2
J3KPS3	11	6	88.1283	1.09634637	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOA PE=1 SV=1
Q70CQ2	7	1	27.8177	5.16324918	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP34 PE=1 SV=2
O14950	14	3	79.1078	4.63092293	Myosin regulatory light chain 12B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL12B PE=1 SV=2
P15311	15	6	89.8167	4.89630215	Ezrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EZR PE=1 SV=4
Q96AY3	7	4	37.2602	15.9107984	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FKBP10 PE=1 SV=1
P61019	8	1	57.9962	1.04409367	Ras-related protein Rab-2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB2A PE=1 SV=1
P49755	3	2	19.6009	1.56969967	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMED10 PE=1 SV=2
P54709	5	1	31.6366	1.26576579	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1B3 PE=1 SV=1

Q5TB80	4	1	14.5078	19.1028132	Centrosomal protein of 162 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP162 PE=1 SV=2
REVERSE23006	13	2	53.0156	14.1794701	Reversed Sequence 23006
P22105	8	1	26.1817	111.275176	Tenascin-X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNXB PE=1 SV=5
Q99536	8	6	51.7365	3.47747071	Synaptic vesicle membrane protein VAT- 1 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAT1 PE=1 SV=2
P05556	15	13	73.906	4.08332955	Integrin beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGB1 PE=1 SV=2
P07339	16	9	84.9869	4.52587715	Cathepsin D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSD PE=1 SV=1
Q06830	16	9	66.168	1.2084614	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1
P10809	18	15	113.0598	1.25031072	60 kDa heat shock protein_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2
P10619	2	2	13.3868	22.5881321	Lysosomal protective protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSA PE=1 SV=2
P61981	17	10	84.9315	3.20428939	14-3-3 protein gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAG PE=1 SV=2
P00505	7	3	48.9216	3.54194529	Aspartate aminotransferase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOT2 PE=1 SV=3
Q14764	8	7	56.3594	16.4197473	Major vault protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MVP PE=1 SV=4
P08865	10	5	56.0772	2.30158944	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPSA PE=1 SV=4
P30041	11	8	46.0143	1.27278646	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX6 PE=1 SV=3
O00299	5	3	32.7929	1.01799769	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIC1 PE=1 SV=4
Q9NZR2	8	1	32.8078	12.4182444	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRP1B PE=1 SV=2

H7BZJ3	5	1	37.5748	2.00381398	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA3 PE=1 SV=1
Q8NHM5	3	2	10.0397	3.50713295	Lysine-specific demethylase 2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDM2B PE=1 SV=1
O94986	8	1	27.5524	1.46554002	Centrosomal protein of 152 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP152 PE=1 SV=4
P10599	1	1	7.6576	1.35071663	Thioredoxin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXN PE=1 SV=3
Q9Y2K7	2	1	7.0355	1.16733792	Lysine-specific demethylase 2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDM2A PE=1 SV=3
P22314	22	15	114.3512	2.91714213	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBA1 PE=1 SV=3
O75369	33	12	185.8881	1.90522778	Filamin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLNB PE=1 SV=2
P17600	3	3	5.7088	540.282303	Synapsin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYN1 PE=1 SV=3
P26641	17	8	80.3236	3.15469488	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1G PE=1 SV=3
Q9UHG3	15	11	90.624	2.11130422	Preylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3
P08758	21	17	115.4811	9.44875972	Annexin A5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA5 PE=1 SV=2
REVERSE29664	3	1	10.7398	10.5266565	Reversed Sequence 29664
O60506	20	9	134.0986	2.56200958	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNCRIP PE=1 SV=2
Q2TB90	2	1	7.133	6.46446322	Putative hexokinase HKDC1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HKDC1 PE=1 SV=3
P08195	18	10	88.4761	1.42994807	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC3A2 PE=1 SV=3
REVERSE20079	5	1	16.7255	28.816855	Reversed Sequence 20079

J3KNF5	12	1	57.5562	58.7482093	Centrosomal protein of 290 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP290 PE=1 SV=1
P07996	10	7	58.7692	28.025335	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=THBS1 PE=1 SV=2
P06756	9	2	47.7981	3.02493882	Integrin alpha-V OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGAV PE=1 SV=2
P23396	23	15	108.3799	2.45644959	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3 PE=1 SV=2
Q9NZM1	31	14	170.0858	5.33199864	Myoferlin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYOF PE=1 SV=1
P15144	8	4	49.1652	72.7206491	Aminopeptidase N OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANPEP PE=1 SV=4
Q96JQ2	3	1	12.0317	194.000589	Calmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLMN PE=1 SV=1
REVERSE31655	3	1	11.025	4.47703892	Reversed Sequence 31655
Q92993	2	1	8.4545	16.5454272	Histone acetyltransferase KAT5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KAT5 PE=1 SV=2
P68363	24	8	158.1333	2.35599239	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1B PE=1 SV=1
P13667	20	13	112.2349	2.06939125	Protein disulfide-isomerase A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDIA4 PE=1 SV=2
P10301	2	2	13.7273	134.873956	Ras-related protein R-Ras OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRAS PE=1 SV=1
P62913	2	2	14.4434	1.56463231	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL11 PE=1 SV=2
P84098	3	1	18.0513	1.82746271	60S ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL19 PE=1 SV=1
P30048	9	7	44.0854	3.89627028	Thioredoxin-dependent peroxide reductase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX3 PE=1 SV=3
A0A087X296	5	3	38.9354	437.06223	Prostaglandin G/H synthase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTGS1 PE=1 SV=1
Q9C0G0	7	2	24.5143	11.0975714	Zinc finger protein 407 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF407 PE=1 SV=2

Q9NQC3	9	3	59.3718	7.68057462	Reticulon-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN4 PE=1 SV=2
P61978	19	15	96.5083	5.77163795	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPK PE=1 SV=1
P51571	5	3	27.2622	1.03515547	Translocon-associated protein subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSR4 PE=1 SV=1
Q07020	9	5	35.1432	1.95932093	60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18 PE=1 SV=2
P07195	13	9	74.2419	3.30649307	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHB PE=1 SV=2
Q13162	9	4	60.023	1.73093569	Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX4 PE=1 SV=1
P31040	8	2	36.9163	3.86985424	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SDHA PE=1 SV=2
REVERSE42805	7	1	22.9125	4.2550071	Reversed Sequence 42805
P43304	8	2	37.1306	82.8722155	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPD2 PE=1 SV=3
Q9UBW7	4	1	17.9423	4.11184751	Zinc finger MYM-type protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZMYM2 PE=1 SV=1
P16615	16	6	103.2744	1.09847541	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2A2 PE=1 SV=1
P48681	29	21	191.4879	5.78089146	Nestin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NES PE=1 SV=2
A8MVZ9	2	1	9.4134	1.27543016	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOC PE=1 SV=1
Q13033	3	1	14.555	157.13639	Striatin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STRN3 PE=1 SV=3
P21796	14	9	103.2304	1.68383118	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC1 PE=1 SV=2

P35908	18	8	128.3072	2.01074737	Keratin_type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT2 PE=1 SV=2
Q8WXH0-7	16	3	56.9607	1.38992548	Isoform 7 of Nesprin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNE2
Q9Y490	35	13	189.4347	2.05757065	Talin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLN1 PE=1 SV=3
P51148	7	2	50.6947	1.54498727	Ras-related protein Rab-5C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB5C PE=1 SV=2
P36578	11	6	58.7735	1.33369659	60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL4 PE=1 SV=5
REVERSE26695	11	3	51.5953	515.171314	Reversed Sequence 26695
REVERSE16006	9	3	27.6437	1.91216003	Reversed Sequence 16006
P26038	23	12	175.4411	10.3903916	Moesin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MSN PE=1 SV=3
O75592	9	1	33.0922	10.2115546	E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYCBP2 PE=1 SV=4
REVERSE14272	2	1	7.0912	1.04324464	Reversed Sequence 14272
P08133	27	23	135.9664	19.7769108	Annexin A6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA6 PE=1 SV=3
P63244	11	8	54.2423	2.47557779	Receptor of activated protein C kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RACK1 PE=1 SV=3
A0A087WUS0	2	1	13.6153	2.7850972	40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS24 PE=1 SV=1
P14314	12	9	62.2075	2.35261544	Glucosidase 2 subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKCSH PE=1 SV=2
P61204	8	3	47.9494	1.88457589	ADP-ribosylation factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF3 PE=1 SV=2
P27105	6	3	38.3881	21.5211674	Erythrocyte band 7 integral membrane protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOM PE=1 SV=3
O00264	3	2	19.9499	9.32581794	Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGRMC1 PE=1 SV=3

P62753	6	4	36.8939	2.38583727	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS6 PE=1 SV=1
A0A0A0MR02	7	4	53.9386	1.20347511	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VDAC2 PE=1 SV=1
Q9BUF5	22	8	107.6233	2.23673643	Tubulin beta-6 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB6 PE=1 SV=1
P00558	16	10	109.7323	2.63626048	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3
O75396	5	2	34.4432	2.43450128	Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC22B PE=1 SV=4
H0Y3H2	3	1	10.9832	83.3249903	ATP-binding cassette sub-family A member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA3 PE=1 SV=1
P17980	4	2	19.2695	11.7892555	26S proteasome regulatory subunit 6A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMC3 PE=1 SV=3
Q96QK1	12	8	67.8441	1.14664802	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS35 PE=1 SV=2
P28066	3	2	17.5895	2.27187616	Proteasome subunit alpha type-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA5 PE=1 SV=3
P07858	4	4	12.842	1550.30752	Cathepsin B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSB PE=1 SV=3
P36542	2	1	11.5506	2.16139062	ATP synthase subunit gamma_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1C PE=1 SV=1
Q14697	13	11	95.9546	2.1733909	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GANAB PE=1 SV=3
REVERSE14116	11	1	35.5894	1.27981737	Reversed Sequence 14116
REVERSE20193	5	1	18.2891	26.3627295	Reversed Sequence 20193
E9PCX2	3	1	19.7432	9.80477301	Aldose reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKR1B1 PE=1 SV=1
Q08J23	8	1	36.7479	3.48278386	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NSUN2 PE=1 SV=2

O75915	2	1	11.5016	6.11904398	PRA1 family protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARL6IP5 PE=1 SV=1
Q96JB1	24	1	76.7866	1.68350452	Dynein heavy chain 8_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH8 PE=1 SV=2
O00410	14	9	86.6293	1.40219002	Importin-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO5 PE=1 SV=4
J3KSB5	4	1	13.3923	1.54399465	Neurofibromin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NF1 PE=1 SV=1
P46940	26	13	166.9475	1.12243912	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQGAP1 PE=1 SV=1
P04844	9	5	52.6195	3.15183036	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPN2 PE=1 SV=3
REVERSE30012	2	1	7.2113	430.480278	Reversed Sequence 30012
P14868	3	1	14.3186	244.314185	Aspartate--tRNA ligase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DARS PE=1 SV=2
REVERSE8549	16	1	54.0079	2.97806314	Reversed Sequence 8549
P62269	3	1	19.2893	2.45829204	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS18 PE=1 SV=3
A0A0G2JLB3	3	1	19.2594	8.06399812	Glucosylceramidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GBA PE=1 SV=1
P11277	18	1	71.794	53.0033089	Spectrin beta chain_ erythrocytic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTB PE=1 SV=5
P61106	8	6	70.2961	1.44334849	Ras-related protein Rab-14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB14 PE=1 SV=4
O00159	15	8	78.775	21.8163878	Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1C PE=1 SV=4
P49411	6	3	36.3754	1.32725993	Elongation factor Tu_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUFM PE=1 SV=2
P39656	7	5	42.8252	1.1493979	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDOST PE=1 SV=4

P30044	6	1	34.6787	1.15795773	Peroxisredoxin-5_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX5 PE=1 SV=4
A6NMY6	23	3	135.204	1.46834004	Putative annexin A2-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA2P2 PE=5 SV=2
Q14247	7	2	39.6934	4.41681988	Src substrate cortactin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTTN PE=1 SV=2
P19338	33	23	168.757	8.72709931	Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=3
Q5T7B8	6	2	18.6091	4.48747314	Kinesin-like protein KIF24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF24 PE=1 SV=2
Q9NSV4	3	3	11.8575	410.624337	Protein diaphanous homolog 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DIAPH3 PE=1 SV=4
P02549	21	4	66.722	6.54831384	Spectrin alpha chain_ erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTA1 PE=1 SV=5
Q9NRL2	4	2	12.7972	3.21755624	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAZ1A PE=1 SV=2
Q07864	6	1	19.9933	2.7712232	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLE PE=1 SV=5
P60842	24	10	159.9562	2.85820159	Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A1 PE=1 SV=1
Q16643	3	3	21.2911	2.65135151	Drebrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DBN1 PE=1 SV=4
P37837	8	5	43.4214	1.40583572	Transaldolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TALDO1 PE=1 SV=2
Q00325	5	3	24.9828	1.4118594	Phosphate carrier protein_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A3 PE=1 SV=2
Q9Y577	3	1	13.0838	134.539783	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM17 PE=1 SV=1

J3KRE2	3	3	20.142	1.97954513	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGDI1 PE=1 SV=1
REVERSE13279	3	1	14.5313	30.8271134	Reversed Sequence 13279
A0A087WV00	3	1	12.6615	13.1371458	Diacylglycerol kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DGKI PE=1 SV=1
A0A087WV22	3	2	17.3664	1.65497733	60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL10 PE=1 SV=1
C9JKI3	2	2	14.5805	12.0025833	Caveolin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAV1 PE=1 SV=1
P61026	12	8	55.1707	1.50430373	Ras-related protein Rab-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB10 PE=1 SV=1
P55084	4	2	31.5754	3.35215948	Trifunctional enzyme subunit beta_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADHB PE=1 SV=3
P22897	5	1	18.4183	55.3498358	Macrophage mannose receptor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRC1 PE=1 SV=1
Q5JU85	2	1	7.9309	7.31190419	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQSEC2 PE=1 SV=2
P04843	14	8	88.5956	2.53604614	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPN1 PE=1 SV=1
P34932	12	5	68.0148	1.76788494	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA4 PE=1 SV=4
A8MUS3	2	2	13.2588	1.71408975	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL23A PE=1 SV=1
Q8NEZ4	5	2	19.6097	19.7471487	Histone-lysine N-methyltransferase 2C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KMT2C PE=1 SV=3
REVERSE71570	7	1	23.2861	22.7419387	Reversed Sequence 71570
P30086	4	3	21.0213	3.01686559	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PEBP1 PE=1 SV=3
Q9Y2C9	3	1	11.2957	14.3835212	Toll-like receptor 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TLR6 PE=1 SV=2

Q6IA86	2	1	7.0205	7.04273006	Elongator complex protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELP2 PE=1 SV=2
G3V1B3	3	1	17.6386	1.65326883	60S ribosomal protein L21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL21 PE=1 SV=1
P14174	2	1	13.5201	3.90189223	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MIF PE=1 SV=4
P18085	13	10	54.5218	1.44250163	ADP-ribosylation factor 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF4 PE=1 SV=3
Q969H8	5	5	21.0446	58.3074069	Myeloid-derived growth factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYDGF PE=1 SV=1
P78527	26	11	127.8312	1.11027001	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKDC PE=1 SV=3
Q9ULV4	5	3	28.8847	2.74437711	Coronin-1C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CORO1C PE=1 SV=1
P68371	32	8	201.0696	2.624535	Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB4B PE=1 SV=1
Q00839	13	9	86.4707	8.68870485	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPU PE=1 SV=6
P26373	6	6	27.2624	2.19260406	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13 PE=1 SV=4
Q12906	13	7	81.5123	2.12229191	Interleukin enhancer-binding factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF3 PE=1 SV=3
P00338	17	13	91.4103	2.62490999	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHA PE=1 SV=2
P20742	5	2	16.308	9.30025677	Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PZP PE=1 SV=4
Q8NHW5	4	3	21.0729	1.58841114	60S acidic ribosomal protein P0-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPLP0P6 PE=5 SV=1
A0A2R8Y738	2	2	21.0655	2.2439935	Ribosomal protein L15 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL15 PE=1 SV=1

Q9UKA4	3	1	7.5749	5.40564781	A-kinase anchor protein 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKAP11 PE=1 SV=1
Q99832	11	7	63.3864	1.68622419	T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT7 PE=1 SV=2
REVERSE10323	38	6	143.7848	2.082321	Reversed Sequence 10323
Q96M86	13	1	53.7593	589.608686	Dynein heavy chain domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNHD1 PE=2 SV=2
P60174	19	11	97.1152	3.26407689	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPI1 PE=1 SV=3
Q6KC79	6	3	21.391	2.83445759	Nipped-B-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NIPBL PE=1 SV=2
Q8TC59	5	1	16.4993	1.67528074	Piwi-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIWIL2 PE=1 SV=1
O75436	5	2	27.2591	1.83644223	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS26A PE=1 SV=2
D6RAF8	7	3	47.8574	4.03948016	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPD PE=1 SV=1
P0CG47	9	6	59.5273	2.11848197	Polyubiquitin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBB PE=1 SV=1
Q15365	5	1	26.4734	2.97360385	Poly(rC)-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP1 PE=1 SV=2
P46821	5	2	18.4743	23.431796	Microtubule-associated protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP1B PE=1 SV=2
Q52LW3	6	1	18.993	9.08627483	Rho GTPase-activating protein 29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGAP29 PE=1 SV=2
REVERSE33819	17	4	70.4274	35.6423956	Reversed Sequence 33819
P62424	6	4	41.5336	2.49289908	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7A PE=1 SV=2
Q6NVV1	2	1	12.9447	1.77293362	Putative 60S ribosomal protein L13a protein RPL13AP3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL13AP3 PE=5 SV=1

Q15907	13	10	67.8979	1.16869128	Ras-related protein Rab-11B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB11B PE=1 SV=4
P35527	13	4	76.7095	1.0084774	Keratin_type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT9 PE=1 SV=3
REVERSE26651	7	3	25.957	3.10724281	Reversed Sequence 26651
P12111	15	6	83.1751	198.716829	Collagen alpha-3(VI) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL6A3 PE=1 SV=5
A0A2R8YD45	3	3	20.4821	120.110364	Tripeptidyl-peptidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPP1 PE=1 SV=1
REVERSE19171	8	2	35.7573	22.5740299	Reversed Sequence 19171
Q03001-9	16	2	66.4231	152.337109	Isoform 4 of Dystonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DST
Q13561	8	6	49.229	1.53412154	Dynactin subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCTN2 PE=1 SV=4
O43451	3	1	12.4146	19.7826226	Maltase-glucoamylase_intestinal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGAM PE=1 SV=5
O95197	11	4	47.8455	4.1658357	Reticulon-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTN3 PE=1 SV=2
REVERSE8542	8	1	24.5286	20.3395104	Reversed Sequence 8542
P47755	4	3	22.7091	1.24481916	F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA2 PE=1 SV=3
Q5T4S7	8	2	28.0342	3.21238173	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBR4 PE=1 SV=1
Q8TD26	9	1	30.8173	4.62627563	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD6 PE=1 SV=4
O15460	7	4	38.3892	118.246506	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HA2 PE=1 SV=1
REVERSE8949	6	1	27.8473	72.6646467	Reversed Sequence 8949
A0A0B4J2A4	3	1	17.9088	2.32155413	3-ketoacyl-CoA thiolase_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAA2 PE=1 SV=1

P46013	6	2	18.8296	2.88285134	Proliferation marker protein Ki-67 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MKI67 PE=1 SV=2
REVERSE23397	3	2	13.6324	17.6322984	Reversed Sequence 23397
O75445	15	2	54.7292	2.57863496	Usherin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USH2A PE=1 SV=3
P20337	5	2	49.0201	270.946879	Ras-related protein Rab-3B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB3B PE=1 SV=2
P61160	8	6	48.4803	3.70872315	Actin-related protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTR2 PE=1 SV=1
O43242	4	1	19.6266	7.45866254	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD3 PE=1 SV=2
P62826	12	9	56.8168	6.283141	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAN PE=1 SV=3
P47756	10	8	58.9832	1.03553919	F-actin-capping protein subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZB PE=1 SV=4
P06753	7	1	27.9085	4.05249842	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=2
E9PRY8	5	2	37.8248	8.99181953	Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1D PE=1 SV=1
Q9BSJ8	13	8	80.4892	2.10444679	Extended synaptotagmin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESYT1 PE=1 SV=1
REVERSE30754	7	4	25.9273	1.29552921	Reversed Sequence 30754
Q13724	3	1	14.6456	3.76412466	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MOGS PE=1 SV=5
Q99798	8	4	44.9639	28.5465963	Aconitate hydratase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACO2 PE=1 SV=2
P62879	6	3	27.0555	1.15071256	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNB2 PE=1 SV=3
P13674	7	4	39.0112	2.91410296	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P4HA1 PE=1 SV=2

O95782	11	6	70.3564	2.56993796	AP-2 complex subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2A1 PE=1 SV=3
O60716	8	3	45.924	2.48192722	Catenin delta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNND1 PE=1 SV=1
P06744	10	5	62.8365	3.59944822	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GPI PE=1 SV=4
A0A087WVC4	4	1	20.5236	8.16224136	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKACB PE=1 SV=1
REVERSE26950	3	1	11.2562	6.72703383	Reversed Sequence 26950
A0A024QZX5	7	2	38.1811	4.95921154	Serpin B6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINB6 PE=1 SV=1
P49748	9	7	60.8721	18.8228225	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACADVL PE=1 SV=1
Q9P2E9	11	6	58.8982	19.0897723	Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RRBP1 PE=1 SV=5
E9PP21	3	3	19.2292	23.8915898	Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSRP1 PE=1 SV=1
REVERSE37718	6	1	20.5198	5.26176303	Reversed Sequence 37718
Q02809	7	6	43.0629	2.03232171	Procollagen-lysine_2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLOD1 PE=1 SV=2
Q9HDC9	12	7	60.2048	2.3805489	Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APMAP PE=1 SV=2
Q12931	13	8	91.1728	4.39099731	Heat shock protein 75 kDa_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRAP1 PE=1 SV=3
P54578	8	4	46.396	1.20486881	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP14 PE=1 SV=3
Q86VV8	3	1	11.8864	1.82650905	Rotatin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTTN PE=1 SV=3
P16278	6	4	38.7443	14.716072	Beta-galactosidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLB1 PE=1 SV=2

A0A0A0MS51	5	3	32.5613	163.240811	Gelsolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSN PE=1 SV=1
P31150	9	2	48.786	5.90866485	Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GDI1 PE=1 SV=2
O14795	8	1	32.2738	2.89687433	Protein unc-13 homolog B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNC13B PE=1 SV=2
P54886	8	4	41.5628	1.01741135	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH18A1 PE=1 SV=2
Q9UIJ7	2	1	11.3183	260.421608	GTP:AMP phosphotransferase AK3_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AK3 PE=1 SV=4
O75165	7	3	27.7685	17.9506168	DnaJ homolog subfamily C member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJC13 PE=1 SV=5
P15880	9	6	56.9584	1.45492131	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS2 PE=1 SV=2
Q06323	9	6	54.1845	2.55713605	Proteasome activator complex subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSME1 PE=1 SV=1
P41250	5	2	24.9011	1.0896588	Glycine--tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GARS PE=1 SV=3
F6S8M0	3	3	20.1208	24.2765452	N-acetylglucosamine-6-sulfatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNS PE=1 SV=1
Q08945	5	2	19.9947	2.87781499	FACT complex subunit SSRP1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSRP1 PE=1 SV=1
P50995	2	1	10.77	2.03111327	Annexin A11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA11 PE=1 SV=1
P20339	10	5	45.7987	1.82393021	Ras-related protein Rab-5A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB5A PE=1 SV=2
P35913	5	1	21.3521	2.48784905	Rod cGMP-specific 3'_5'-cyclic phosphodiesterase subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDE6B PE=1 SV=2
P36957	6	2	37.4936	11.4450493	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2- oxoglutarate dehydrogenase complex_

					mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLST PE=1 SV=4
Q9Y262	7	4	37.0985	1.57519245	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3L PE=1 SV=1
Q13127	3	2	11.1245	1.05841157	RE1-silencing transcription factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=REST PE=1 SV=3
A0A2R8YEG7	1	1	3.0492	3.73178041	NACHT_ LRR and PYD domains- containing protein 3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NLRP3 PE=1 SV=1
A0A0C4DFV9	2	1	12.3897	1.96005023	Protein SET OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SET PE=1 SV=1
P04114	49	9	202.9387	1.66368435	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2
Q9NZN4	10	5	59.1497	16.2732829	EH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EHD2 PE=1 SV=2
REVERSE18217	6	1	21.4449	1.51597781	Reversed Sequence 18217
Q07812	5	2	33.3653	1.81479664	Apoptosis regulator BAX OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAX PE=1 SV=1
REVERSE34246	2	1	6.61	214.113668	Reversed Sequence 34246
O14818	6	3	37.9036	1.52779763	Proteasome subunit alpha type-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA7 PE=1 SV=1
REVERSE12664	6	2	19.0964	2.2283682	Reversed Sequence 12664
REVERSE39021	10	2	39.7014	17.4326954	Reversed Sequence 39021
P28330	2	1	13.7616	1.66749918	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACADL PE=1 SV=2
P53621	18	4	84.2524	1.13609645	Coatomer subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPA PE=1 SV=2
P13489	7	4	38.0324	1.31601014	Ribonuclease inhibitor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNH1 PE=1 SV=2
Q9NY65	14	2	100.3211	1.72021349	Tubulin alpha-8 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA8 PE=1 SV=1

Q96I99	6	3	34.2564	188.384065	Succinate--CoA ligase [GDP-forming] subunit beta_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUCLG2 PE=1 SV=2
H0YGW7	2	1	8.5926	1.68951176	ATP-binding cassette sub-family F member 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCF1 PE=1 SV=1
Q4KWH8	19	3	67.2965	2.62308711	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLCH1 PE=1 SV=1
H0YE29	3	1	14.8928	2.56821919	Rho GTPase-activating protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGAP1 PE=1 SV=1
Q5TC82	3	1	9.3222	26.3116486	Roquin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RC3H1 PE=1 SV=1
REVERSE71131	4	2	13.9455	2.87487469	Reversed Sequence 71131
Q96P48	5	1	19.0169	11.6731069	Arf-GAP with Rho-GAP domain_ANK repeat and PH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARAP1 PE=1 SV=3
Q9NZI8	6	2	33.5721	1.38046224	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2
Q14974	18	16	106.0629	5.60358254	Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNB1 PE=1 SV=2
REVERSE33438	3	1	10.7201	229.695614	Reversed Sequence 33438
P24844	10	2	73.0152	11.6808509	Myosin regulatory light polypeptide 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL9 PE=1 SV=4
REVERSE38334	6	1	22.197	25.3801704	Reversed Sequence 38334
P20618	3	2	15.6085	1.0785228	Proteasome subunit beta type-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMB1 PE=1 SV=2
Q9Y281	4	1	28.2468	2.36868326	Cofilin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFL2 PE=1 SV=1
P53420	1	1	3.1343	3.67979973	Collagen alpha-4(IV) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL4A4 PE=1 SV=3
H0YLX2	5	2	18.1655	3.10961679	DNA-binding protein RFX7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RFX7 PE=1 SV=2

REVERSE12894	4	1	13.0324	15.7221578	Reversed Sequence 12894
REVERSE71386	8	3	26.9717	2.49658026	Reversed Sequence 71386
P04179	4	2	28.9417	90.1549198	Superoxide dismutase [Mn]_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOD2 PE=1 SV=3
P31946	9	3	84.1015	1.4898186	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAB PE=1 SV=3
REVERSE6567	30	3	114.4747	2.25297326	Reversed Sequence 6567
P07099	3	1	14.99	1.70305128	Epoxide hydrolase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPHX1 PE=1 SV=1
O43852	7	7	40.0201	25.926495	Calumenin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CALU PE=1 SV=2
Q12767	4	1	18.1182	22.298955	Transmembrane protein 94 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM94 PE=1 SV=1
A0A0A0MSQ0	11	3	71.7505	1.07744522	Plastin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLS3 PE=1 SV=1
H0Y720	3	1	14.0246	9.62412743	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNRC6B PE=1 SV=1
P18124	7	5	33.7303	2.29531822	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL7 PE=1 SV=1
P13639	31	19	150.093	2.69603928	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF2 PE=1 SV=4
Q14164	3	1	10.7619	17.5415247	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IKBKE PE=1 SV=1
P05023	14	7	78.9359	2.44286021	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1A1 PE=1 SV=1
E9PKG1	5	2	27.6068	1.62091573	Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRMT1 PE=1 SV=1
A2VDJO	6	1	25.5046	1.13375624	Transmembrane protein 131-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM131L PE=1 SV=2
REVERSE39970	33	2	121.9678	12.4042387	Reversed Sequence 39970

Q14240	22	5	107.2507	2.85820159	Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A2 PE=1 SV=2
P606649	8	4	60.664	2.72116821	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=2
P50991	9	2	47.0873	1.2685448	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT4 PE=1 SV=4
Q9H8Y8	2	1	9.5257	1.11156617	Golgi reassembly-stacking protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GORASP2 PE=1 SV=3
P30050	4	3	20.2776	1.75098051	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL12 PE=1 SV=1
Q12905	8	4	44.3121	3.34334483	Interleukin enhancer-binding factor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ILF2 PE=1 SV=2
Q8TCT9	3	2	16.0961	4.69894172	Minor histocompatibility antigen H13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HM13 PE=1 SV=1
Q58FF3	8	3	46.9378	3.29837411	Putative endoplasmic-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90B2P PE=5 SV=1
P17301	16	1	94.0926	3.67467822	Integrin alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA2 PE=1 SV=1
P17612	4	1	21.757	1.03130121	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKACA PE=1 SV=2
P24752	5	3	32.9327	1.54584212	Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACAT1 PE=1 SV=1
Q7Z2Y8	17	2	63.8679	8.53306298	Interferon-induced very large GTPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GVINP1 PE=2 SV=2
P27348	10	5	92.4734	4.6885948	14-3-3 protein theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAQ PE=1 SV=1
J3KNV1	4	1	20.9949	24.621472	Zinc finger protein 292 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF292 PE=1 SV=1
Q13885	28	5	189.1478	3.00040841	Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBB2A PE=1 SV=1

MOQXB5	2	2	13.8411	198.580753	Persulfide dioxygenase ETHE1_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETHE1 PE=1 SV=1
D6RFH4	1	1	7.7644	3.09201929	Cytochrome b5 type B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5B PE=1 SV=1
Q14204	52	16	277.6904	1.05987796	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5
Q9NR12	4	1	22.2073	8.11165556	PDZ and LIM domain protein 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDLIM7 PE=1 SV=1
P42704	28	11	148.5876	2.72201962	Leucine-rich PPR motif-containing protein_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRPPRC PE=1 SV=3
P62714	4	2	25.5599	3.37293543	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP2CB PE=1 SV=1
P12277	19	14	100.4168	24.2833005	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKB PE=1 SV=1
P62258	15	9	121.4454	5.66926388	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAE PE=1 SV=1
P11216	14	4	68.456	1.60726591	Glycogen phosphorylase_ brain form OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYGB PE=1 SV=5
P35268	3	1	16.2809	2.84883382	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL22 PE=1 SV=2
A0A1B0GTM3	4	2	23.4513	19.1516906	Acid ceramidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASAH1 PE=1 SV=1
REVERSE12257	12	4	48.6561	1.01280495	Reversed Sequence 12257
P18031	4	2	17.0344	5.92461331	Tyrosine-protein phosphatase non- receptor type 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTPN1 PE=1 SV=1
Q8WUD1	10	2	54.4819	1.19135166	Ras-related protein Rab-2B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB2B PE=1 SV=1
REVERSE24615	30	5	113.3402	144.924792	Reversed Sequence 24615
E7ESA6	3	1	17.8987	6.23560669	Focal adhesion kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTK2 PE=1 SV=1

REVERSE28332	9	2	34.5674	8.8732502	Reversed Sequence 28332
Q06418	3	1	13.853	1.79298765	Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TYRO3 PE=1 SV=1
F5GYQ1	1	1	6.2851	6.48625168	V-type proton ATPase subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6V0D1 PE=1 SV=1
H0Y9T5	2	1	7.5976	10.2101806	m7GpppN-mRNA hydrolase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCP2 PE=1 SV=2
Q08431	2	1	11.3255	38.2255214	Lactadherin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MFGE8 PE=1 SV=3
Q7KZF4	13	7	77.343	1.08260567	Staphylococcal nuclease domain- containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SND1 PE=1 SV=1
P23634	10	4	52.6418	106.70561	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B4 PE=1 SV=2
Q13011	3	1	15.6972	1.38299111	Delta(3_5)-Delta(2_4)-dienoyl-CoA isomerase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECH1 PE=1 SV=2
REVERSE10471	12	2	44.685	1.76176686	Reversed Sequence 10471
Q9P225	25	2	94.2328	13.0505005	Dynein heavy chain 2_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH2 PE=2 SV=3
H7BXY3	3	1	10.5823	268.048659	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX30 PE=1 SV=1
REVERSE35245	4	1	12.2004	1.28499665	Reversed Sequence 35245
P08754	5	1	33.1816	3.4916915	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAI3 PE=1 SV=3
P24539	4	1	22.2731	1.48405321	ATP synthase F(0) complex subunit B1_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5F1 PE=1 SV=2
REVERSE28875	4	1	14.8575	9.05427418	Reversed Sequence 28875
P06748	10	8	78.6654	6.94325401	Nucleophosmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPM1 PE=1 SV=2

P27708	14	4	75.0975	2.55307504	CAD protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAD PE=1 SV=3
Q12797	4	4	23.6652	27.1209709	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASPH PE=1 SV=3
O14979	7	2	36.7792	2.96728837	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPDL PE=1 SV=3
Q2M1P5	6	3	27.4025	17.6174093	Kinesin-like protein KIF7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF7 PE=1 SV=2
P35232	5	2	31.8516	1.35804929	Prohibitin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHB PE=1 SV=1
REVERSE29265	16	1	53.6099	4.50987358	Reversed Sequence 29265
Q16658	10	6	58.2207	2.89510867	Fascin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FSCN1 PE=1 SV=3
A0A0B4J1R6	10	3	63.6769	3.40852237	Transketolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TKT PE=1 SV=1
REVERSE14128	6	1	20.7386	1.20419342	Reversed Sequence 14128
PODMV8	19	4	101.3097	3.90201014	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1
F8VXJ7	2	1	11.362	95.9448639	Protein canopy homolog 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNPY2 PE=1 SV=1
E9PAV3	11	1	74.2934	2.02896846	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha_ muscle-specific form OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NACA PE=1 SV=1
Q13185	4	1	27.604	3.00282056	Chromobox protein homolog 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CBX3 PE=1 SV=4
REVERSE26002	2	1	8.3948	8.8229657	Reversed Sequence 26002
P11177	5	1	30.4347	4.46373816	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDHB PE=1 SV=3
E7ETD6	7	3	20.4274	1.7466317	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPTF PE=1 SV=3

C9JYS6	1	1	5.245	15.0338656	Epidermal growth factor receptor (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EGFR PE=1 SV=1
Q7Z7A1	18	2	66.225	2.6368192	Centriolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNTRL PE=1 SV=2
O43776	4	1	21.3572	1.29730601	Asparagine--tRNA ligase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NARS PE=1 SV=1
P35749	27	4	155.3685	6.45594136	Myosin-11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH11 PE=1 SV=3
P50395	14	2	71.2749	1.48430871	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GDI2 PE=1 SV=2
Q15149	74	2	438.3429	6.34886551	Plectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLEC PE=1 SV=3
REVERSE30499	33	5	110.0693	5.08643526	Reversed Sequence 30499
P50990	15	9	89.6412	1.9028487	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT8 PE=1 SV=4
P08648	4	2	18.0624	23.59459	Integrin alpha-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA5 PE=1 SV=2
I3L2G5	2	1	8.1519	53.4276651	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NLRP1 PE=1 SV=3
REVERSE19410	3	1	10.3668	387.292882	Reversed Sequence 19410
B9A063	4	2	16.6804	8.5736139	Unconventional myosin-VIIb OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO7B PE=1 SV=1
P07951-2	9	2	63.5229	49.1969737	Isoform 2 of Tropomyosin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM2
P01023	11	3	67.7533	11.9103223	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=A2M PE=1 SV=3
REVERSE14001	15	1	48.87	1.8492679	Reversed Sequence 14001
O95831	8	6	48.4417	3.12192157	Apoptosis-inducing factor 1_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AIFM1 PE=1 SV=1
B4DDF4	6	5	41.6517	2.11054902	Calponin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNN2 PE=1 SV=1

O14578	19	2	81.0918	4.16890211	Citron Rho-interacting kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CIT PE=1 SV=2
O75083	6	2	36.7588	1.77890786	WD repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR1 PE=1 SV=4
A0A0G2JS82	9	3	51.431	1.12423873	AP-2 complex subunit alpha-2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2A2 PE=1 SV=1
Q96TA1	7	3	43.294	9.19324826	Niban-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM129B PE=1 SV=3
Q9NSE4	8	5	36.3839	3.66853909	Isoleucine--tRNA ligase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IARS2 PE=1 SV=2
P62701	6	6	42.4597	4.02873735	40S ribosomal protein S4_ X isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS4X PE=1 SV=2
P13637	11	1	56.1052	3.00379672	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP1A3 PE=1 SV=3
H0Y390	43	5	154.817	1.32562477	Microtubule-actin cross-linking factor 1_ isoforms 1/2/3/5 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACF1 PE=1 SV=1
REVERSE7272	6	1	26.097	8.4382169	Reversed Sequence 7272
REVERSE22104	6	1	27.7196	3.50678418	Reversed Sequence 22104
P35606	15	3	75.5404	2.62665881	Coatomer subunit beta' OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPB2 PE=1 SV=2
P20340	9	2	67.4376	1.65674044	Ras-related protein Rab-6A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB6A PE=1 SV=3
P54652	19	5	110.4133	2.85185244	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA2 PE=1 SV=1
REVERSE39695	19	2	61.0008	9.05103499	Reversed Sequence 39695
Q32P51	17	5	63.5603	13.3761886	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1L2 PE=2 SV=2
Q6NSJ2	3	1	12.8897	1.30361823	Pleckstrin homology-like domain family B member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHLDB3 PE=2 SV=3

Q15811	3	1	12.711	5.06060171	Intersectin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITSN1 PE=1 SV=3
A0A0U1RQZ9	2	1	7.4819	53.7000785	Probable global transcription activator SNF2L2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMARCA2 PE=1 SV=1
Q15366	8	4	33.4366	4.79248429	Poly(rC)-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCBP2 PE=1 SV=1
REVERSE24367	1	1	3.9734	101.16605	Reversed Sequence 24367
P36776	13	5	62.2984	2.41730398	Lon protease homolog_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LONP1 PE=1 SV=2
P32119	4	2	28.6161	2.89879019	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5
P26640	17	6	98.5625	1.14911062	Valine--tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAR5 PE=1 SV=4
Q9NYU1	6	2	20.329	2.41774611	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UGGT2 PE=1 SV=4
Q14651	7	1	32.9997	1.08565223	Plastin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLS1 PE=1 SV=2
A0A2R8Y478	1	1	6.093	77.6240387	Tetraspanin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD9 PE=1 SV=1
Q96N66	1	1	6.5717	15.6110521	Lysophospholipid acyltransferase 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MBOAT7 PE=1 SV=2
P56199	8	4	38.5024	228.069636	Integrin alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA1 PE=1 SV=2
Q96K21	3	2	14.6222	2.75893619	Abscission/NoCut checkpoint regulator OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZFYVE19 PE=1 SV=3
P17931	5	2	30.4466	1.1597198	Galectin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS3 PE=1 SV=5
Q8IWZ3	2	2	7.279	3.44530137	Ankyrin repeat and KH domain- containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANKHD1 PE=1 SV=1
REVERSE11692	5	1	14.353	1.80525665	Reversed Sequence 11692
REVERSE35701	4	2	19.1575	74.140314	Reversed Sequence 35701

P10155	2	1	9.4887	3.81952533	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TROVE2 PE=1 SV=2
MOROY2	6	3	36.3971	2.19632599	Alpha-soluble NSF attachment protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAPA PE=1 SV=1
O75116	15	1	56.9287	2.91455022	Rho-associated protein kinase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ROCK2 PE=1 SV=4
A0A0G2JH68	2	1	7.541	6.63639549	Protein diaphanous homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DIAPH1 PE=1 SV=1
K7EK33	1	1	6.9169	4.87334063	DAZ-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DAZAP1 PE=1 SV=2
E7ETU9	3	2	17.1	14.6789781	Procollagen-lysine_2-oxoglutarate 5- dioxygenase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLOD2 PE=1 SV=1
Q14152	13	9	63.9534	2.2233901	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3A PE=1 SV=1
REVERSE17047	6	2	17.3974	1.08457032	Reversed Sequence 17047
Q9NZJ4	30	4	124.8814	7.55065727	Sacsin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SACS PE=1 SV=2
Q13263	14	8	85.2338	3.39413688	Transcription intermediary factor 1-beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM28 PE=1 SV=5
REVERSE22575	4	1	13.7206	2.96845426	Reversed Sequence 22575
REVERSE1169	4	1	16.9582	2.43982815	Reversed Sequence 1169
A6NHL2	3	1	30.0779	3.25409962	Tubulin alpha chain-like 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBAL3 PE=1 SV=2
P10515	7	2	35.141	2.85197747	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLAT PE=1 SV=3
P04181	4	3	23.244	392.068688	Ornithine aminotransferase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OAT PE=1 SV=1

P05141	12	6	52.1805	1.84823849	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC25A5 PE=1 SV=7
REVERSE31109	5	1	17.0073	1.30518871	Reversed Sequence 31109
Q8IUD2	11	2	43.0936	1.10005063	ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERC1 PE=1 SV=1
Q14789	20	5	80.8166	1.48804842	Golgin subfamily B member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLGB1 PE=1 SV=2
O14966	3	1	16.9254	8.66703772	Ras-related protein Rab-7L1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB29 PE=1 SV=1
Q9Y3A6	1	1	5.9715	1.15689046	Transmembrane emp24 domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMED5 PE=1 SV=1
P61158	6	2	36.5539	3.27273666	Actin-related protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTR3 PE=1 SV=3
A0A0S2Z4G6	7	1	46.6972	54.2945485	Tropomyosin 1 (Alpha)_ isoform CRA_o (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM1 PE=1 SV=1
P62249	7	5	32.1816	2.59390407	40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS16 PE=1 SV=2
P12956	19	9	92.6024	4.14108387	X-ray repair cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC6 PE=1 SV=2
REVERSE8493	5	1	18.3846	18.006335	Reversed Sequence 8493
Q8WYK1	8	2	29.0953	2.81507533	Contactin-associated protein-like 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNTNAP5 PE=2 SV=1
H3BRG4	3	2	16.6671	1.03509071	Cytochrome b-c1 complex subunit 2_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRC2 PE=1 SV=1
Q9NY61	2	1	7.7842	5.55646411	Protein AATF OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AATF PE=1 SV=1
A0A1B0GTF3	2	1	10.8808	1.00619065	Heat shock 70 kDa protein 12A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA12A PE=1 SV=1
B01T2	2	1	10.8018	21.0724571	Unconventional myosin-Ig OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1G PE=1 SV=2

P62140	4	3	24.1884	1.32960355	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1CB PE=1 SV=3
A0A1B0GUS7	30	7	115.3686	1.02282046	Protein unc-13 homolog B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNC13B PE=1 SV=1
G3V295	4	2	25.118	1.08017422	Proteasome subunit alpha type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMA6 PE=1 SV=1
Q9Y3F4	8	4	44.414	1.62857352	Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STRAP PE=1 SV=1
P33527	63	50	381.1419	33.4904143	Multidrug resistance-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCC1 PE=1 SV=3
REVERSE29358	8	1	23.6813	3.86433436	Reversed Sequence 29358
A4UGR9	18	4	68.7924	4.500124	Xin actin-binding repeat-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XIRP2 PE=1 SV=2
REVERSE3607	35	5	109.9353	1.0400205	Reversed Sequence 3607
P39880	6	2	27.639	1.77204171	Homeobox protein cut-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CUX1 PE=1 SV=3
H0YDM2	2	1	7.3602	2.42584242	Protein SOGA1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOGA1 PE=1 SV=1
REVERSE36560	3	1	12.1188	21.8345368	Reversed Sequence 36560
O00571	14	6	91.3587	5.33653375	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX3X PE=1 SV=3
P53675	24	4	143.565	1.86589186	Clathrin heavy chain 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLTCL1 PE=1 SV=2
Q12955	27	6	100.2725	6.76738636	Ankyrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANK3 PE=1 SV=3
P63096	8	2	38.979	2.18858859	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAI1 PE=1 SV=2
REVERSE39763	6	1	25.3242	16.1988881	Reversed Sequence 39763

P30040	5	2	28.458	2.5786653	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERP29 PE=1 SV=4
P10316	8	1	60.2963	1.34568968	HLA class I histocompatibility antigen_ A-69 alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HLA-A PE=1 SV=2
Q9HCK8	11	1	41.9878	24.1217704	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD8 PE=1 SV=5
P10620	3	2	19.8543	20.5257275	Microsomal glutathione S-transferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MGST1 PE=1 SV=1
A7E2V4	5	1	22.8194	102.762483	Zinc finger SWIM domain-containing protein 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZSWIM8 PE=1 SV=1
Q9H254	25	2	129.6436	3.4686966	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN4 PE=1 SV=2
P30084	5	3	34.4252	8.15773401	Enoyl-CoA hydratase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECHS1 PE=1 SV=4
REVERSE35127	6	1	26.4343	1.48924213	Reversed Sequence 35127
P21912	12	5	59.2092	3.3420391	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SDHB PE=1 SV=3
REVERSE17761	1	1	4.4239	7.21872554	Reversed Sequence 17761
REVERSE5695	4	1	14.14	953.566132	Reversed Sequence 5695
P00491	6	1	39.4633	3.85081738	Purine nucleoside phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNP PE=1 SV=2
Q70UQ0	4	1	21.257	3.11769049	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IKBIP PE=1 SV=1
P52209	5	4	29.7128	1.93494274	6-phosphogluconate dehydrogenase_ decarboxylating OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGD PE=1 SV=3
P62834	5	3	22.3561	26.9244866	Ras-related protein Rap-1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAP1A PE=1 SV=1

Q9NYU2	19	4	96.4777	1.56304104	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UGGT1 PE=1 SV=3
A0A0C4DGF4	2	1	7.0525	1.72030314	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPM5 PE=4 SV=1
Q5S007	14	4	39.5855	1.36707003	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRK2 PE=1 SV=2
REVERSE38409	36	7	113.966	2.12387582	Reversed Sequence 38409
A0A0U1RQW6	4	1	12.4031	1.4521162	Disco-interacting protein 2 homolog C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DIP2C PE=1 SV=1
Q8TD57	23	2	74.3749	2.13452918	Dynein heavy chain 3_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH3 PE=2 SV=1
O60568	4	2	20.2895	6.00656164	Procollagen-lysine_2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLOD3 PE=1 SV=1
P55786	16	6	93.5943	2.49319014	Puromycin-sensitive aminopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NPEPPS PE=1 SV=2
A0A087WTT1	10	3	72.788	4.04938306	Polyadenylate-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1 PE=1 SV=1
Q8WXX0	18	2	71.0754	4.2879124	Dynein heavy chain 7_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH7 PE=1 SV=2
O95373	10	5	48.774	1.41968682	Importin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO7 PE=1 SV=1
Q92736	27	2	98.3261	2.82375004	Ryanodine receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RYSR2 PE=1 SV=3
Q70UQ0-4	4	1	25.8731	28.8419497	Isoform 4 of Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IKBIP
Q06210	6	5	32.2776	2.84895097	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GFPT1 PE=1 SV=3

Q8NBS9	4	1	23.6846	1.83546218	Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXNDC5 PE=1 SV=2
Q15056	3	2	6.6493	3.76077649	Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4H PE=1 SV=5
P69849	13	9	81.5983	4.55557854	Nodal modulator 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOMO3 PE=3 SV=2
P07686	4	3	26.3893	23.9301465	Beta-hexosaminidase subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HEXB PE=1 SV=3
Q07890	7	3	24.6228	1.38678825	Son of sevenless homolog 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOS2 PE=1 SV=2
E9PBLO	3	1	15.6869	2.95818978	E3 ISG15--protein ligase HERC5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HERC5 PE=1 SV=1
O60282	10	1	43.2352	123.04038	Kinesin heavy chain isoform 5C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF5C PE=1 SV=1
P21399	3	1	14.9737	9.05441406	Cytoplasmic aconitate hydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACO1 PE=1 SV=3
P05091	2	1	9.6015	7.55219661	Aldehyde dehydrogenase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH2 PE=1 SV=2
REVERSE40688	25	3	90.5004	3.06658805	Reversed Sequence 40688
H0Y6IO	9	1	36.9732	1.77603907	Golgin subfamily A member 4 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLGA4 PE=1 SV=1
O14828	4	2	21.0887	1.37441727	Secretory carrier-associated membrane protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCAMP3 PE=1 SV=3
E7EVA0	16	3	90.7979	14.1739147	Microtubule-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP4 PE=1 SV=1
REVERSE19998	3	1	12.8368	1.08361832	Reversed Sequence 19998
C9JIT5	1	1	7.2317	1.46841208	ATP5MF-PTCD1 readthrough OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5MF-PTCD1 PE=4 SV=2

Q15008	6	1	28.3903	1.58374125	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD6 PE=1 SV=1
B7Z9C2	3	3	20.8177	3.28965871	cDNA FLJ58569_ highly similar to Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAP1L1 PE=1 SV=1
K7ERC8	2	1	11.1798	14.7736165	3-ketodihydrosphingosine reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KDSR PE=1 SV=2
A0A087X253	8	2	49.9779	2.58089083	AP complex subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP2B1 PE=1 SV=1
Q13283	10	4	68.7878	1.00025337	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G3BP1 PE=1 SV=1
Q15413	33	5	136.4694	1.00182217	Ryanodine receptor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RYP3 PE=1 SV=3
REVERSE35776	8	2	27.0484	46.3198461	Reversed Sequence 35776
P00367	6	3	30.265	1.08008359	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLUD1 PE=1 SV=2
P35580	32	5	200.763	1.61325257	Myosin-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH10 PE=1 SV=3
Q15417	6	2	36.9926	2.90950282	Calponin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNN3 PE=1 SV=1
P07954	4	3	20.8055	2.63804575	Fumarate hydratase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FH PE=1 SV=3
REVERSE24438	2	1	8.0595	8.16760806	Reversed Sequence 24438
REVERSE24680	2	1	6.8805	3.51145792	Reversed Sequence 24680
P52907	5	1	28.7101	1.69762049	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPZA1 PE=1 SV=3
Q9P2J5	9	4	40.2845	2.16710249	Leucine--tRNA ligase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LARS PE=1 SV=2
Q07954	13	4	60.7174	3.02963291	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRP1 PE=1 SV=2

B9A067	4	2	19.9603	3.8905099	MICOS complex subunit MIC60 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMMT PE=1 SV=2
P34897	11	3	54.5879	3.6317457	Serine hydroxymethyltransferase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SHMT2 PE=1 SV=3
O43432	4	1	22.2586	1.05647967	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G3 PE=1 SV=2
P04040	6	4	31.2582	1.26712271	Catalase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAT PE=1 SV=3
Q9Y263	5	3	19.7356	5.80917935	Phospholipase A-2-activating protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLAA PE=1 SV=2
P35609	18	4	141.9164	1.26170694	Alpha-actinin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTN2 PE=1 SV=1
P02545	4	1	18.1865	4.85956096	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNA PE=1 SV=1
P49756	2	2	7.249	10.4020861	RNA-binding protein 25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM25 PE=1 SV=3
P48449	8	1	45.201	3.49292535	Lanosterol synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LSS PE=1 SV=1
Q13464	6	2	26.66	7.73672468	Rho-associated protein kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ROCK1 PE=1 SV=1
A0A0C4DH48	1	1	4.1335	1.24752542	Nesprin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNE1 PE=1 SV=1
A0A087WYR3	5	2	32.6497	4.93648935	Tumor protein D54 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPD52L2 PE=1 SV=1
P09543	1	1	4.0803	1.957413	2'_3'-cyclic-nucleotide 3'- phosphodiesterase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNP PE=1 SV=2
P50914	5	3	14.3413	2.13665625	60S ribosomal protein L14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL14 PE=1 SV=4
O95786	2	2	6.6929	93.6755758	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX58 PE=1 SV=2

O60318	4	1	15.5199	8.64280584	Germinal-center associated nuclear protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM3AP PE=1 SV=2
O43149	13	4	39.5817	1.56621081	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZZEF1 PE=1 SV=6
REVERSE56452	34	8	137.45	8.18108788	Reversed Sequence 56452
Q13813	22	1	101.5767	3.50801872	Spectrin alpha chain_ non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTAN1 PE=1 SV=3
REVERSE18474	10	3	35.586	4.87083276	Reversed Sequence 18474
Q96QE3	6	2	20.9756	3.72018937	ATPase family AAA domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATAD5 PE=1 SV=4
REVERSE25130	3	1	12.9108	1.65729441	Reversed Sequence 25130
Q9BZ29	8	1	33.391	422.617386	Dedicator of cytokinesis protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOCK9 PE=1 SV=2
REVERSE8755	14	4	42.39	1.34199187	Reversed Sequence 8755
P27487	6	3	34.264	11.2497079	Dipeptidyl peptidase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPP4 PE=1 SV=2
O94925	5	2	28.7986	12.9751565	Glutaminase kidney isoform_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLS PE=1 SV=1
REVERSE3461	1	1	3.391	3.16682501	Reversed Sequence 3461
REVERSE10418	8	2	39.2762	11.547724	Reversed Sequence 10418
Q9Y536	3	1	14.9514	3.0983332	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIAL4A PE=2 SV=1
REVERSE8866	2	2	11.584	21.3934658	Reversed Sequence 8866
Q03252	2	1	7.5145	5.70572263	Lamin-B2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMNB2 PE=1 SV=4
O00231	9	6	54.4769	4.23018253	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD11 PE=1 SV=3

O96008	4	2	27.6619	3.19160997	Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOMM40 PE=1 SV=1
P22392	9	3	51.9	2.55847405	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NME2 PE=1 SV=1
Q13492	6	3	34.1733	12.543308	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PICALM PE=1 SV=2
P07951	10	3	49.4078	77.0926416	Tropomyosin beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM2 PE=1 SV=1
REVERSE12840	3	2	18.7134	48.3498182	Reversed Sequence 12840
Q9NRY4	4	1	13.1325	51.929976	Rho GTPase-activating protein 35 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGAP35 PE=1 SV=3
P37108	2	2	13.9477	4.95124176	Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRP14 PE=1 SV=2
REVERSE215	2	2	5.5299	20.1239167	Reversed Sequence 215
REVERSE34417	4	1	12.931	1.40930369	Reversed Sequence 34417
Q14643	11	2	40.7063	2.27963824	Inositol 1_4_5-trisphosphate receptor type 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITPR1 PE=1 SV=3
Q86UP2	11	1	46.7205	4.0361195	Kinectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KTN1 PE=1 SV=1
REVERSE35987	15	5	58.3979	4.18571062	Reversed Sequence 35987
A0A0A0MS41	3	1	16.522	39.3088545	Sideroflexin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFXN3 PE=1 SV=1
Q92598	8	2	42.5496	2.74349617	Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPH1 PE=1 SV=1
P11717	13	3	53.5498	1.06535369	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2R PE=1 SV=3
REVERSE30701	1	1	4.046	12.5881352	Reversed Sequence 30701
O75578	6	2	20.1192	175.54223	Integrin alpha-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGA10 PE=2 SV=2

P11413	5	4	30.9638	1.7939882	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G6PD PE=1 SV=4
P31930	5	2	20.4226	1.0627041	Cytochrome b-c1 complex subunit 1_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UQCRC1 PE=1 SV=3
REVERSE302	3	1	10.4817	1.00956592	Reversed Sequence 302
P78371	9	4	48.4135	1.68583095	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT2 PE=1 SV=4
P17987	4	2	24.0819	1.12811213	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TCP1 PE=1 SV=1
REVERSE35859	8	4	31.8111	3.33545818	Reversed Sequence 35859
P30153	7	5	44.6427	6.14579651	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP2R1A PE=1 SV=4
K7EKI0	7	1	24.7428	2.90940297	Envoplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EVPL PE=1 SV=1
Q04637	14	4	81.2473	1.56883009	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G1 PE=1 SV=4
P41252	3	2	12.741	1.10223029	Isoleucine--tRNA ligase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IARS PE=1 SV=2
REVERSE25736	15	1	50.7446	2.02833314	Reversed Sequence 25736
P46777	4	2	23.7286	1.78028133	60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL5 PE=1 SV=3
B0YIW6	5	4	26.7429	1.61188609	Archain 1_ isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARCN1 PE=1 SV=1
Q5VT06	19	5	73.3821	2.79401061	Centrosome-associated protein 350 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CEP350 PE=1 SV=1
E9PEM5	4	1	17.9365	2.99137421	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRBA PE=1 SV=1
REVERSE14963	23	1	86.7778	1.01884232	Reversed Sequence 14963

Q9H074	2	1	9.9944	1.48111799	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PAIP1 PE=1 SV=1
O95714	13	1	51.8111	1.62160566	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HERC2 PE=1 SV=2
P17655	5	2	34.7924	3.50111005	Calpain-2 catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPN2 PE=1 SV=6
A0A1X7SC65	1	1	5.0358	1.22414653	Heat shock protein beta-6 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPB6 PE=1 SV=1
Q7Z406	24	3	144.0469	1.76941535	Myosin-14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH14 PE=1 SV=2
O95425	7	2	27.8844	47.6718255	Supervillin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SVIL PE=1 SV=2
REVERSE38643	3	1	13.9907	1.52662374	Reversed Sequence 38643
O75390	7	3	41.6612	1.56933817	Citrate synthase_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CS PE=1 SV=2
REVERSE38286	6	1	24.1337	1.58870934	Reversed Sequence 38286
REVERSE25300	6	1	22.633	4.99265137	Reversed Sequence 25300
P00403	3	1	17.6975	1.14827883	Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MT-CO2 PE=1 SV=1
Q86YA3	9	2	38.0669	4.47873576	Protein ZGRF1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZGRF1 PE=1 SV=3
P59998	7	3	37.9809	40.8151963	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARPC4 PE=1 SV=3
Q8WX93	8	3	36.5977	15.7341126	Palladin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PALLD PE=1 SV=3
I3NI22	2	1	11.8249	2.64205421	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SGSH PE=1 SV=1
Q9Y2K3	9	2	29.3659	5.67879383	Myosin-15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH15 PE=1 SV=5
A0A0U1RRM6	3	2	12.761	1.02264695	Protein enabled homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENAH PE=1 SV=1

Q86VI3	8	1	34.6741	2.48236034	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQGAP3 PE=1 SV=2
P35269	4	1	18.5697	5.18426125	General transcription factor IIF subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GTF2F1 PE=1 SV=2
E7EQ72	2	2	11.5914	4.99149754	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMED2 PE=1 SV=2
P31153	3	1	15.3087	4.78396231	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAT2A PE=1 SV=1
Q96HE7	4	2	20.4385	5.97321898	ERO1-like protein alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERO1A PE=1 SV=2
Q8NG31	2	1	9.1114	1.24798466	Kinetochore scaffold 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KNL1 PE=1 SV=3
A0A087X054	13	6	71.2365	4.71901219	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HYOU1 PE=1 SV=1
Q8IVF4	28	2	113.7613	3.15031525	Dynein heavy chain 10_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH10 PE=1 SV=4
REVERSE18690	3	2	11.3298	1.15180232	Reversed Sequence 18690
REVERSE11656	5	1	17.8397	4.26987785	Reversed Sequence 11656
Q8N9W4	3	1	9.8236	22.5061509	Golgin subfamily A member 6-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLGA6L2 PE=1 SV=3
Q9UQ80	8	3	43.3273	4.62009838	Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PA2G4 PE=1 SV=3
P42224	6	3	25.9326	6.19125334	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STAT1 PE=1 SV=2
D6R9K7	1	1	4.4849	1.41002322	RNA-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM4 PE=1 SV=1
REVERSE38539	8	2	24.825	1.70827855	Reversed Sequence 38539

P42345	4	1	14.1547	2.67250765	Serine/threonine-protein kinase mTOR OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTOR PE=1 SV=1
O95757	12	3	60.5174	2.74389339	Heat shock 70 kDa protein 4L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA4L PE=1 SV=3
F5H365	3	1	18.4341	6.38585624	Protein transport protein SEC23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC23A PE=1 SV=1
REVERSE6226	23	4	71.9723	1.90150452	Reversed Sequence 6226
E7EVV3	2	1	6.254	18.8239521	Mitochondria-eating protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPATA18 PE=1 SV=1
REVERSE22165	3	1	16.7056	1.04794621	Reversed Sequence 22165
A0A024R4E5	12	3	60.0809	1.02528664	High density lipoprotein binding protein (Vigilin)_ isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HDLBP PE=1 SV=1
REVERSE21110	1	1	3.5246	14.2225529	Reversed Sequence 21110
REVERSE8615	34	4	120.096	1.84656323	Reversed Sequence 8615
Q9H9B4	5	2	34.2114	1.62693471	Sideroflexin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFXN1 PE=1 SV=4
Q15746	13	2	54.1468	1.6917066	Myosin light chain kinase_ smooth muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYLK PE=1 SV=4
REVERSE1901	2	1	7.1947	26.6995625	Reversed Sequence 1901
REVERSE5560	2	1	7.8347	9.86635304	Reversed Sequence 5560
P61020	4	2	30.5642	2.23875242	Ras-related protein Rab-5B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB5B PE=1 SV=1
Q9ULT8	6	2	25.1562	70.5706929	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HECTD1 PE=1 SV=3
P49368	9	5	46.4516	1.84808299	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT3 PE=1 SV=4
A6NKB5	9	2	32.4823	1.14921786	Pecanex-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNX2 PE=2 SV=3
J3KNL2	3	1	11.314	9.75919057	Septin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEPT1 PE=1 SV=2

REVERSE41122	4	1	12.4381	4.57118572	Reversed Sequence 41122
P55884	10	5	49.981	2.41758113	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3B PE=1 SV=3
P07384	10	1	50.4153	4.98448351	Calpain-1 catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPN1 PE=1 SV=1
REVERSE38972	7	2	24.5617	7.23272341	Reversed Sequence 38972
Q96JJ7	5	2	29.6227	1.41097691	Protein disulfide-isomerase TMX3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMX3 PE=1 SV=2
Q9UG01	8	1	27.9202	14.8504631	Intraflagellar transport protein 172 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IFT172 PE=1 SV=2
Q9NRC6	8	1	31.392	4.42785974	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN5 PE=1 SV=2
B7ZL14	3	1	9.5942	2.45353178	FNBP1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FNBP1 PE=1 SV=1
REVERSE30325	7	1	25.4114	1.67445448	Reversed Sequence 30325
A0A0A0MSZ9	1	1	4.2618	10.976921	Cleavage stimulation factor subunit 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSTF1 PE=1 SV=1
REVERSE28040	2	1	6.7749	34.2776825	Reversed Sequence 28040
Q9HC77	8	1	29.7429	18.5979255	Centromere protein J OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CENPJ PE=1 SV=2
Q8WXF0	3	1	17.4399	1.79223106	Serine/arginine-rich splicing factor 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF12 PE=2 SV=1
A0A087X2I1	3	1	16.0129	1.62571492	26S proteasome regulatory subunit 10B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMC6 PE=1 SV=1
P46783	2	1	14.5534	3.34167474	40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS10 PE=1 SV=1
Q01082	32	9	133.2546	1.35191621	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN1 PE=1 SV=2

O95202	10	3	52.2343	2.91964822	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LETM1 PE=1 SV=1
P17844	20	9	90.788	10.3720432	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX5 PE=1 SV=1
P02786	28	18	172.9978	32.856145	Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TFRC PE=1 SV=2
REVERSE95	1	1	3.9888	1.25346191	Reversed Sequence 95
A0A087WTU9	8	2	32.9173	39.1218627	Alstrom syndrome protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALMS1 PE=1 SV=1
O94979	2	1	4.9838	24.5458241	Protein transport protein Sec31A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC31A PE=1 SV=3
REVERSE22442	3	1	9.7814	6.23062564	Reversed Sequence 22442
Q6P2Q9	8	3	36.5242	2.64872582	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRPF8 PE=1 SV=2
REVERSE19573	3	1	11.7857	2.22002544	Reversed Sequence 19573
REVERSE445	2	1	7.8223	1.55966849	Reversed Sequence 445
O00232	5	2	29.5398	3.43034154	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD12 PE=1 SV=3
P07942	11	3	62.7748	2.55950207	Laminin subunit beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMB1 PE=1 SV=2
P35916	4	1	15.4393	3.51348381	Vascular endothelial growth factor receptor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLT4 PE=1 SV=3
REVERSE36293	3	1	10.4155	4.19399001	Reversed Sequence 36293
A0A1B0GV93	4	3	25.0773	1.64179016	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B12 PE=1 SV=1
A2RTX5	3	1	15.1522	1.31120771	Probable threonine--tRNA ligase 2_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TARSL2 PE=1 SV=1
Q4VXU2	10	4	56.3484	3.74753537	Polyadenylate-binding protein 1-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PABPC1L PE=2 SV=1

Q96DT5	8	1	27.9985	6.98200513	Dynein heavy chain 11_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH11 PE=1 SV=4
Q9Y2G1	2	1	6.6767	2.96468496	Myelin regulatory factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYRF PE=1 SV=3
H0Y786	28	5	109.5832	1.21054948	Nebulin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NEB PE=1 SV=1
REVERSE40220	11	2	44.5	1.04948772	Reversed Sequence 40220
REVERSE26453	3	1	10.8868	25.5403753	Reversed Sequence 26453
Q5CZC0-2	14	5	60.7965	2.21576128	Isoform 2 of Fibrous sheath-interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FSIP2
REVERSE23814	2	1	6.4496	9.58754714	Reversed Sequence 23814
O00148	17	6	73.498	11.2151274	ATP-dependent RNA helicase DDX39A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39A PE=1 SV=2
REVERSE8224	4	1	14.582	3.90565523	Reversed Sequence 8224
B4DKY1	6	4	25.7671	2.33502285	Cysteine--tRNA ligase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CARS PE=1 SV=1
REVERSE26684	9	1	33.843	2.20110041	Reversed Sequence 26684
REVERSE5705	13	3	53.3351	1.06586934	Reversed Sequence 5705
Q99497	3	1	21.8621	2.38471987	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARK7 PE=1 SV=2
Q8N4C6	16	3	62.3953	1.81408763	Ninein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NIN PE=1 SV=4
P40925	5	1	27.1509	1.88666098	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH1 PE=1 SV=4
Q8IWC1	4	1	16.2409	7.92278558	MAP7 domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP7D3 PE=1 SV=2
O15020	7	1	28.1193	2.09177496	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN2 PE=1 SV=3
REVERSE15222	2	1	6.7858	2.65529234	Reversed Sequence 15222

Q04917	8	1	76.0861	3.35131573	14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAH PE=1 SV=4
P59923	5	2	19.0794	1.00115333	Zinc finger protein 445 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF445 PE=1 SV=1
Q9UPA5	8	3	38.4066	1.1342642	Protein bassoon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BSN PE=1 SV=4
Q8NCM8	21	3	77.9015	1.27863018	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYNC2H1 PE=1 SV=4
REVERSE26900	4	1	14.5133	7.79396179	Reversed Sequence 26900
REVERSE12594	9	1	36.7406	33.7420513	Reversed Sequence 12594
C9JDM3	2	2	15.43	12.5556028	Ran-specific GTPase-activating protein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RANBP1 PE=1 SV=8
A0A2R8YD50	8	3	43.4326	1.35375666	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSD17B4 PE=1 SV=1
A0A087WVY5	6	1	21.754	4.3717215	Cilia- and flagella-associated protein 57 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFAP57 PE=1 SV=1
Q9BUJ2	6	3	35.6595	3.23009191	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPUL1 PE=1 SV=2
Q8IWT6	3	1	9.5653	2.44488701	Volume-regulated anion channel subunit LRRC8A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRC8A PE=1 SV=1
Q709C8	21	2	81.797	18.7971654	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13C PE=1 SV=1
O15083	4	3	14.5975	6.71016753	ERC protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERC2 PE=1 SV=3
Q14568	15	5	79.8004	6.73277618	Heat shock protein HSP 90-alpha A2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AA2P PE=1 SV=2
Q2M215	3	1	16.8247	2.09981976	Keratin_ type I cytoskeletal 24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT24 PE=1 SV=1
REVERSE615	2	1	6.948	7.02617621	Reversed Sequence 615

Q9NZB2	6	2	26.8246	1.8583262	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM120A PE=1 SV=2
Q6IAA8	3	1	19.207	1.53691381	Ragulator complex protein LAMTOR1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMTOR1 PE=1 SV=2
Q4G0P3	10	1	42.6135	146.067619	Hydrocephalus-inducing protein homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HYDIN PE=1 SV=3
Q86UQ4	20	3	74.6721	2.05213156	ATP-binding cassette sub-family A member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCA13 PE=2 SV=3
Q9C091	13	2	55.7345	27.702524	GREB1-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GREB1L PE=1 SV=2
Q8NDH2	8	2	25.8594	227.576632	Coiled-coil domain-containing protein 168 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC168 PE=2 SV=2
P11532	15	3	62.1415	66.2637368	Dystrophin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DMD PE=1 SV=3
E7ESJ3	7	2	28.255	1.72202096	Ankyrin repeat domain-containing protein 26 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANKRD26 PE=1 SV=1
P52597	10	5	56.7251	10.2306106	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPF PE=1 SV=3
P51911	3	1	15.4221	53.4246562	Calponin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNN1 PE=1 SV=2
REVERSE10052	11	2	41.4448	29.8684692	Reversed Sequence 10052
REVERSE26742	13	3	40.4136	1.43324875	Reversed Sequence 26742
Q9UJZ1	5	3	32.0177	3.96152186	Stomatin-like protein 2_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOML2 PE=1 SV=1
REVERSE7101	5	2	18.808	7.01539174	Reversed Sequence 7101
Q96QP1	4	1	18.6135	3.35151953	Alpha-protein kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALPK1 PE=2 SV=3
P53634	3	2	11.3549	6.85818907	Dipeptidyl peptidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSC PE=1 SV=2
REVERSE9709	3	1	10.1763	13.4691549	Reversed Sequence 9709

REVERSE34328	5	1	22.7424	3.34000877	Reversed Sequence 34328
Q8IY37	3	1	14.8547	84.0926734	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX37 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX37 PE=1 SV=1
Q14203	6	2	25.1999	1.01150474	Dynactin subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCTN1 PE=1 SV=3
REVERSE24617	7	2	24.8422	1.39605653	Reversed Sequence 24617
REVERSE13181	3	1	10.7932	2.60554835	Reversed Sequence 13181
Q9BS26	3	2	12.1896	163.836579	Endoplasmic reticulum resident protein 44 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERP44 PE=1 SV=1
P52179	4	1	13.2174	1.19034334	Myomesin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYOM1 PE=1 SV=2
Q16706	5	1	16.0178	5.92462282	Alpha-mannosidase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAN2A1 PE=1 SV=2
Q8N1F7	9	4	52.003	2.91971857	Nuclear pore complex protein Nup93 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP93 PE=1 SV=2
Q13423	10	4	43.3727	1.41223989	NAD(P) transhydrogenase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NNT PE=1 SV=3
P13010	8	4	43.3259	5.46504663	X-ray repair cross-complementing protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRCC5 PE=1 SV=3
Q9P0V3	8	2	31.2474	1.49546463	SH3 domain-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SH3BP4 PE=1 SV=1
Q10471	7	1	32.1065	1.28771374	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GALNT2 PE=1 SV=1
REVERSE1497	2	1	7.5445	10.4207957	Reversed Sequence 1497
P28074	4	4	25.3493	1.8713906	Proteasome subunit beta type-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMB5 PE=1 SV=3
O75417	12	2	39.7998	96.9479827	DNA polymerase theta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLQ PE=1 SV=2

REVERSE25299	3	1	11.0657	4.09375345	Reversed Sequence 25299
P22102	2	1	8.891	2.91825796	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GART PE=1 SV=1
REVERSE9601	6	2	20.6744	10.4018584	Reversed Sequence 9601
Q9P2D7	22	3	86.0151	1.56743732	Dynein heavy chain 1_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH1 PE=1 SV=5
P35221	11	2	67.0049	1.65245674	Catenin alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNNA1 PE=1 SV=1
REVERSE29498	10	1	37.7147	7.67212542	Reversed Sequence 29498
Q13740	2	1	9.2177	716.474324	CD166 antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALCAM PE=1 SV=2
O75947	4	1	24.492	1.45600576	ATP synthase subunit d_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP5H PE=1 SV=3
Q2TAC2	9	1	43.0496	64.93532	Coiled-coil domain-containing protein 57 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC57 PE=1 SV=2
O15144	6	2	40.2744	26.9548128	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARPC2 PE=1 SV=1
O60763	5	3	20.133	1.12343988	General vesicular transport factor p115 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USO1 PE=1 SV=2
O95996	3	1	16.1453	3.88663151	Adenomatous polyposis coli protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APC2 PE=1 SV=1
F8W930	7	1	42.8841	1.38324113	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP2 PE=1 SV=1
A0A2R8Y543	4	1	21.7045	3.28157706	Catenin beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNNA1 PE=1 SV=1
E9PLA9	2	2	11.2184	3.09723777	Caprin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPRIN1 PE=1 SV=1
REVERSE39439	13	1	41.0902	1.34028532	Reversed Sequence 39439

O60488	6	1	24.7186	1.57746641	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL4 PE=1 SV=2
Q9UBG0	8	2	39.4791	1.16578979	C-type mannose receptor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MRC2 PE=1 SV=2
P38606	7	2	34.1932	1.29773987	V-type proton ATPase catalytic subunit A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP6V1A PE=1 SV=2
Q6IS14	2	1	5.9889	1.18602246	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF5AL1 PE=2 SV=2
P38159	5	2	33.6851	13.2900622	RNA-binding motif protein_ X chromosome OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBMX PE=1 SV=3
Q92616	21	6	80.9122	10.688216	eIF-2-alpha kinase activator GCN1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GCN1 PE=1 SV=6
O95153	3	1	11.0726	1.15305785	Peripheral-type benzodiazepine receptor-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSPOAP1 PE=1 SV=2
Q16401	4	2	17.3383	4.06949556	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD5 PE=1 SV=3
Q5T1H1	4	1	12.5677	28.7143734	Protein eyes shut homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EYS PE=1 SV=5
Q99996	35	4	137.3311	6.8330874	A-kinase anchor protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKAP9 PE=1 SV=4
Q5VZ89	7	2	24.5163	1.92315668	DENN domain-containing protein 4C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DENND4C PE=1 SV=3
Q15029	9	6	50.3475	4.7220203	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EFTUD2 PE=1 SV=1
O95292	3	1	19.0049	1.41919623	Vesicle-associated membrane protein- associated protein B/C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VAPB PE=1 SV=3
C9J1V9	2	1	10.8065	3.97637107	EEF1E1-BLOC1S5 readthrough (NMD candidate) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEF1E1-BLOC1S5 PE=4 SV=2

Q16881	4	1	23.3824	3.91245349	Thioredoxin reductase 1_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TXNRD1 PE=1 SV=3
Q7L014	5	2	19.1191	3.99301115	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX46 PE=1 SV=2
Q9HCF6	6	1	21.5336	1.97728974	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPM3 PE=2 SV=4
Q8IXQ6	2	1	6.8335	2.00310147	Poly [ADP-ribose] polymerase 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PARP9 PE=1 SV=2
O43175	9	5	46.0649	13.8086507	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PHGDH PE=1 SV=4
REVERSE28806	2	1	7.1759	71.5942839	Reversed Sequence 28806
REVERSE41601	5	2	14.3123	1.642719	Reversed Sequence 41601
Q7Z417	2	1	8.0523	13.7168818	Nuclear fragile X mental retardation- interacting protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUFIP2 PE=1 SV=1
Q13765	6	1	31.4033	1.57262916	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NACA PE=1 SV=1
Q8TDX9	11	3	41.2013	1.11716053	Polycystic kidney disease protein 1-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKD1L1 PE=1 SV=1
P22626	26	14	141.9833	28.049748	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2
O00370	4	2	13.1676	2.67400685	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=1
Q9UHQ9	3	2	17.1662	45.7618101	NADH-cytochrome b5 reductase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R1 PE=1 SV=1
A2RUR9	8	2	32.655	2.31711415	Coiled-coil domain-containing protein 144A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC144A PE=2 SV=1

H0Y368	3	1	15.2338	1.56667858	Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPM1 PE=1 SV=1
P11279	4	2	21.3927	2.35124223	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMP1 PE=1 SV=3
Q14108	7	2	31.1921	21.4902732	Lysosome membrane protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCARB2 PE=1 SV=2
Q13200	8	2	38.7615	2.16579133	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD2 PE=1 SV=3
Q8WUM4	7	2	34.9192	2.01658898	Programmed cell death 6-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDCD6IP PE=1 SV=1
B4DHE8	5	3	32.2555	7.5555436	cDNA FLJ56904_ highly similar to RNA-binding protein Musashi homolog 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MSI2 PE=1 SV=1
P62263	2	2	6.163	3.44382039	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS14 PE=1 SV=3
O94905	6	1	34.4865	4.54693833	Erlin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ERLIN2 PE=1 SV=1
P15531	15	4	72.2226	6.28839285	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NME1 PE=1 SV=1
REVERSE6005	4	1	13.6689	67.2602823	Reversed Sequence 6005
A0A087WXQ7	2	1	10.9425	7.47752777	POTE ankyrin domain family member C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POTEC PE=4 SV=1
Q15751	10	3	34.2363	1.41305502	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HERC1 PE=1 SV=2
REVERSE3287	3	2	11.2682	4.73703554	Reversed Sequence 3287
Q9UBC5	8	1	37.9882	1.70105383	Unconventional myosin-Ia OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO1A PE=2 SV=1
REVERSE40279	4	1	13.6718	15.2461536	Reversed Sequence 40279

P09936	6	2	43.6345	4.66214476	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UCHL1 PE=1 SV=2
REVERSE41245	18	5	51.1803	8.5305806	Reversed Sequence 41245
G5E9C5	2	2	9.9749	48.0772699	Phosphodiesterase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDE5A PE=1 SV=1
REVERSE18587	6	1	24.4972	12.9300154	Reversed Sequence 18587
Q01968	3	1	10.5105	4.55618772	Inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OCRL PE=1 SV=3
E9PNZ4	10	1	39.4712	9.19857674	Microtubule-actin cross-linking factor 1_ isoforms 1/2/3/5 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MACF1 PE=1 SV=1
P11586	12	3	59.7703	4.07772723	C-1-tetrahydrofolate synthase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTHFD1 PE=1 SV=3
P61163	7	2	41.3314	1.97296877	Alpha-centractin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTR1A PE=1 SV=1
P35613	12	8	77.3243	6.4411965	Basigin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BSG PE=1 SV=2
REVERSE1234	3	2	10.5166	6.2089146	Reversed Sequence 1234
P13647	7	1	32.0036	1.91486133	Keratin_ type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT5 PE=1 SV=3
O00425	6	1	33.54	2.62595779	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGF2BP3 PE=1 SV=2
Q9Y448	2	1	8.951	2.72387008	Small kinetochore-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KNSTRN PE=1 SV=2
Q32P28	3	1	18.6297	7.41876615	Prolyl 3-hydroxylase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P3H1 PE=1 SV=2
Q2M1Z3	3	1	9.5158	23.1479686	Rho GTPase-activating protein 31 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGAP31 PE=1 SV=2
REVERSE11781	8	1	21.379	8.67638687	Reversed Sequence 11781
A0A0A0MRM8	5	1	18.2606	35.9545067	Unconventional myosin-VI OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYO6 PE=1 SV=1

Q96P70	8	4	39.0426	5.95110032	Importin-9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO9 PE=1 SV=3
Q8N1G4	1	1	4.544	1.29306523	Leucine-rich repeat-containing protein 47 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRRRC47 PE=1 SV=1
J3QS41	6	1	18.6139	3.07696271	Probable helicase with zinc finger domain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HELZ PE=1 SV=1
REVERSE17167	2	1	9.7324	2.09004568	Reversed Sequence 17167
H7C003	3	1	18.4736	1.903634	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP1R7 PE=1 SV=1
P51991	11	6	56.6468	16.1099689	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2
A0A087X0T5	1	1	3.9699	49.2309848	Protein N-terminal asparagine amidohydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NTAN1 PE=1 SV=1
Q2LD37	27	2	115.6436	2.53870301	Transmembrane protein KIAA1109 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIAA1109 PE=1 SV=2
P10243	3	1	11.4423	1.03180259	Myb-related protein A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYBL1 PE=1 SV=2
REVERSE1413	20	5	73.1206	1.2005567	Reversed Sequence 1413
REVERSE6246	6	1	26.6147	1.51464615	Reversed Sequence 6246
Q562R1	13	1	89.0572	24.7093516	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTBL2 PE=1 SV=2
Q07021	4	1	24.4198	7.18820618	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1QBP PE=1 SV=1
K7ERF1	2	1	12.1918	3.76468041	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3K PE=1 SV=1
Q5JWF2	6	2	36.344	2.10609224	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GNAS PE=1 SV=2
O00750	7	1	23.0509	2.42178142	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3- kinase C2 domain-containing subunit

					beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIK3C2B PE=1 SV=2
P09960	8	1	44.3034	1.40699472	Leukotriene A-4 hydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LTA4H PE=1 SV=2
Q10472	6	3	33.5673	6.49545464	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GALNT1 PE=1 SV=1
Q8NFW1	9	2	30.9678	2.54737469	Collagen alpha-1(XXII) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL22A1 PE=2 SV=2
C9JPC9	1	1	4.0362	1.05725689	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 42 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP42 PE=1 SV=9
Q8IWJ2	12	2	52.7315	1.98431185	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GCC2 PE=1 SV=4
Q96BY6	9	3	30.3774	5.39913563	Dedicator of cytokinesis protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOCK10 PE=1 SV=3
REVERSE12537	5	2	16.7354	2.8575077	Reversed Sequence 12537
REVERSE9692	21	3	73.3138	1.16092498	Reversed Sequence 9692
P08729	7	1	36.1052	45.7064567	Keratin_type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT7 PE=1 SV=5
F8VUX9	4	1	21.2633	2.54658069	WD repeat-containing protein 90 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR90 PE=1 SV=1
P53396	9	4	44.26	1.08559784	ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACLY PE=1 SV=3
P17813	3	2	15.0758	5.14611981	Endoglin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENG PE=1 SV=2
Q13838	9	3	65.6949	12.1208158	Spliceosome RNA helicase DDX39B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX39B PE=1 SV=1
REVERSE7838	7	1	24.4634	1.44476083	Reversed Sequence 7838
Q9C0C2	7	2	26.2136	99.2992496	182 kDa tankyrase-1-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNKS1BP1 PE=1 SV=4

Q8TDY2	4	1	15.1834	1.68690709	RB1-inducible coiled-coil protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RB1CC1 PE=1 SV=3
P61086	6	1	40.6846	11.2759545	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2K PE=1 SV=3
O00203	4	2	13.4415	4.33497117	AP-3 complex subunit beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AP3B1 PE=1 SV=3
Q9Y3I0	3	2	14.8873	2.38266429	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTCB PE=1 SV=1
P45974	7	3	32.1486	2.5925689	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP5 PE=1 SV=2
Q8IYM2	4	1	13.407	5.69112466	Schlafen family member 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLFN12 PE=2 SV=2
REVERSE8418	8	1	28.8859	8.35528474	Reversed Sequence 8418
E9PEX6	2	1	11.5231	89.8930709	Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLD PE=1 SV=1
REVERSE24993	4	1	17.2717	6.23501179	Reversed Sequence 24993
P31327	3	1	12.1122	4.88815877	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia]_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPS1 PE=1 SV=2
P43034	4	1	19.3856	124.128484	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFAFH1B1 PE=1 SV=2
Q96SI9	4	1	20.5691	1.26045217	Spermatid perinuclear RNA-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STRBP PE=1 SV=1
REVERSE24616	4	2	12.0633	3.22929405	Reversed Sequence 24616
Q7Z7G8	5	1	16.9661	12.0506676	Vacuolar protein sorting-associated protein 13B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13B PE=1 SV=2
REVERSE10421	5	2	18.8653	12.55861	Reversed Sequence 10421
REVERSE5595	3	1	11.4455	2.40047613	Reversed Sequence 5595
P55795	7	1	49.5702	2.51133199	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH2 PE=1 SV=1

P31948	7	4	47.9422	2.2069972	Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STIP1 PE=1 SV=1
P84103	3	2	21.8335	6.64316358	Serine/arginine-rich splicing factor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRSF3 PE=1 SV=1
Q9BUQ8	4	1	14.9632	4.2939455	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX23 PE=1 SV=3
E7EP17	7	1	25.6562	3.78370572	Dynein heavy chain 9_ axonemal OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAH9 PE=1 SV=1
Q16698	2	1	11.8013	1.63509507	2_4-dienoyl-CoA reductase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DECR1 PE=1 SV=1
REVERSE12903	7	3	23.197	1.5071938	Reversed Sequence 12903
REVERSE24187	13	1	49.0525	2.90064226	Reversed Sequence 24187
REVERSE7623	3	2	12.6014	258.010127	Reversed Sequence 7623
P31937	5	1	24.5986	6.78730692	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HIBADH PE=1 SV=2
A0A087WWK8	3	1	10.6349	3.508479	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQSEC1 PE=1 SV=1
Q13576	8	1	29.997	3.68754465	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IQGAP2 PE=1 SV=4
REVERSE787	7	3	22.0218	4.71553838	Reversed Sequence 787
Q7Z460	4	2	13.1866	1.23323618	CLIP-associating protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLASP1 PE=1 SV=1
REVERSE20623	5	1	16.2852	7.2215969	Reversed Sequence 20623
A0AVT1	13	1	58.802	4.30285355	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBA6 PE=1 SV=1
REVERSE4710	6	1	24.8294	6.52824876	Reversed Sequence 4710
REVERSE1842	3	2	8.8603	1.91080259	Reversed Sequence 1842

Q9ULC3	4	1	21.9849	1.21274954	Ras-related protein Rab-23 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAB23 PE=1 SV=1
REVERSE29508	15	2	50.055	1.99908151	Reversed Sequence 29508
P05455	5	2	30.2716	5.6094031	Lupus La protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SSB PE=1 SV=2
A0A1B0GTW7	1	1	3.9363	1.92822583	Leishmanolysin-like peptidase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LMLN2 PE=3 SV=1
O60774	2	1	6.6176	27.6311016	Putative dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FM06P PE=5 SV=1
Q8N3K9	5	1	17.4309	1.91581954	Cardiomyopathy-associated protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CMYA5 PE=1 SV=3
Q3SY69	5	1	21.582	2.22575304	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1L2 PE=1 SV=2
REVERSE29663	4	1	13.8964	4.19810695	Reversed Sequence 29663
P13861	5	3	28.1704	2.58215448	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKAR2A PE=1 SV=2
Q9BXL7	4	2	17.5675	81.3204811	Caspase recruitment domain-containing protein 11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CARD11 PE=1 SV=3
Q9NY74	4	1	16.799	1.2056858	Ewing's tumor-associated antigen 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ETAA1 PE=1 SV=2
P38919	8	3	50.038	9.27765684	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A3 PE=1 SV=4
REVERSE8976	1	1	3.6762	17.6806233	Reversed Sequence 8976
Q02878	3	3	18.773	4.94466309	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL6 PE=1 SV=3
Q9P2D1	19	5	66.3894	4.27533611	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD7 PE=1 SV=3
REVERSE6280	38	6	142.1092	8.42406569	Reversed Sequence 6280

P84085	6	3	30.8278	4.86464713	ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARF5 PE=1 SV=2
REVERSE1953	4	1	14.097	12.1583937	Reversed Sequence 1953
B7ZAR1	2	2	10.038	8.47688617	cDNA_FLJ79275_ highly similar to T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT5 PE=1 SV=1
REVERSE1434	14	1	58.1427	1.378362	Reversed Sequence 1434
Q9BUPO	3	2	16.5994	2.98354402	EF-hand domain-containing protein D1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EFHD1 PE=1 SV=1
A0A087WYT3	2	1	9.1832	6.31648936	Prostaglandin E synthase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTGES3 PE=1 SV=1
Q76N89	4	1	11.6062	1.48647107	E3 ubiquitin-protein ligase HECW1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HECW1 PE=1 SV=3
REVERSE2547	7	1	25.6241	3.24888829	Reversed Sequence 2547
O75923	6	1	25.2131	41.6635475	Dysferlin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DYSF PE=1 SV=1
Q9UDT6	3	2	18.187	2.95144285	CAP-Gly domain-containing linker protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIP2 PE=1 SV=1
O00442	1	1	5.5265	3.20385992	RNA 3'-terminal phosphate cyclase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RTCA PE=1 SV=1
P56192	9	3	55.6539	4.07716118	Methionine--tRNA ligase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MARS PE=1 SV=2
P43243	11	7	69.949	46.9363142	Matrin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MATR3 PE=1 SV=2
REVERSE35195	3	1	9.9523	3.1811709	Reversed Sequence 35195
REVERSE25327	2	1	6.366	5.29596931	Reversed Sequence 25327
REVERSE17731	5	1	15.9785	3.45476789	Reversed Sequence 17731
REVERSE16883	7	2	24.6378	6.09283293	Reversed Sequence 16883
Q9Y265	8	6	40.6091	10.3025524	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RUVBL1 PE=1 SV=1

Q86V48	5	1	17.7884	14.3320267	Leucine zipper protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LUZP1 PE=1 SV=2
REVERSE16594	8	1	27.9019	12.4241054	Reversed Sequence 16594
A0A0A0MSA0	6	1	21.6535	24.981356	Laminin subunit alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMA3 PE=1 SV=1
Q86VP6	10	3	45.6592	1.96272283	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAND1 PE=1 SV=2
A0A0J9YWL9	7	1	35.337	1.69010118	Putative testis-expressed protein 13C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TEX13C PE=5 SV=1
Q3L8U1	4	1	15.8757	4.0447787	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CHD9 PE=1 SV=2
G3V4T5	3	1	15.5303	1.70362696	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF2S1 PE=1 SV=1
B4DJ81	6	1	26.6381	21.7848273	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NDUFS1 PE=1 SV=1
REVERSE3146	10	2	34.2416	8.44440211	Reversed Sequence 3146
Q96A33	2	2	11.8041	3.66307824	Coiled-coil domain-containing protein 47 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC47 PE=1 SV=1
P09525	4	1	20.8053	10.0384207	Annexin A4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANXA4 PE=1 SV=4
P46977	5	2	23.3678	9.09160904	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STT3A PE=1 SV=2
REVERSE21737	15	1	48.4532	1.51666596	Reversed Sequence 21737
P09429	2	1	10.1105	10.8985583	High mobility group protein B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGB1 PE=1 SV=3
Q08211	18	9	107.3956	27.2418624	ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX9 PE=1 SV=4

P25398	2	2	6.1107	4.00971353	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS12 PE=1 SV=3
Q63HN8	28	3	106.6676	7.73338881	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNF213 PE=1 SV=3
P49792	15	3	66.2346	1.53126248	E3 SUMO-protein ligase RanBP2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RANBP2 PE=1 SV=2
REVERSE24258	9	1	43.0493	1.26322887	Reversed Sequence 24258
REVERSE8623	30	1	97.1362	18.4317797	Reversed Sequence 8623
REVERSE10006	3	1	11.1764	6.36264972	Reversed Sequence 10006
D6RAA6	2	1	11.5983	1.93088311	Transmembrane protein 33 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMEM33 PE=1 SV=1
Q86VF2-5	14	1	55.7287	285.075773	Isoform 5 of Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFN1
Q8WXF1	3	3	19.0465	8.68654033	Paraspeckle component 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSPC1 PE=1 SV=1
Q15459	4	1	25.0434	19.8137144	Splicing factor 3A subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3A1 PE=1 SV=1
P32969	5	2	23.2346	5.58637509	60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL9 PE=1 SV=1
Q92538	2	1	10.4033	7.45497275	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GBF1 PE=1 SV=2
REVERSE3668	3	1	12.4423	1.43977378	Reversed Sequence 3668
P35637	6	4	30.618	13.2478053	RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUS PE=1 SV=1
H0Y4Y4	1	1	6.0327	2.53837492	EF-hand domain-containing protein D2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EFHD2 PE=1 SV=1
P55011	9	3	40.2579	12.1631454	Solute carrier family 12 member 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC12A2 PE=1 SV=1

P26639	9	1	46.5222	8.98540306	Threonine--tRNA ligase_ cytoplasmic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TARS PE=1 SV=3
P23526	6	2	28.9349	8.85149604	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHCY PE=1 SV=4
P23246	7	6	45.7319	30.117341	Splicing factor_ proline- and glutamine-rich OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SFPQ PE=1 SV=2
Q3MIP1	2	1	5.9537	1.32996491	Inositol 1_4_5-trisphosphate receptor-interacting protein-like 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITPRIPL2 PE=1 SV=1
P53618	11	1	50.9954	1.85090046	Coatomer subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPB1 PE=1 SV=3
REVERSE7571	13	1	53.1063	8.15789917	Reversed Sequence 7571
REVERSE21091	6	1	20.4789	8.7311663	Reversed Sequence 21091
O43390	15	9	112.754	44.4034709	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPR PE=1 SV=1
Q9UJU6	4	1	24.3686	281.421653	Drebrin-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DBNL PE=1 SV=1
P43246	7	2	35.8683	7.18350214	DNA mismatch repair protein Msh2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MSH2 PE=1 SV=1
Q71U36	14	1	157.9536	20.5254947	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TUBA1A PE=1 SV=1
REVERSE38145	2	2	7.6393	3.27889564	Reversed Sequence 38145
Q15738	3	1	15.7751	10.2052717	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase_ decarboxylating OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NSDHL PE=1 SV=2
P46939	17	2	61.9757	6.0890951	Utrophin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UTRN PE=1 SV=2
D6RAT0	3	1	17.4369	2.6677409	40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS3A PE=1 SV=1
REVERSE28298	5	1	17.8186	2.21805752	Reversed Sequence 28298

P39019	8	2	43.5236	4.2751869	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS19 PE=1 SV=2
A0A024RCR6	3	2	15.515	7.57900173	HLA-B associated transcript 3_ isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BAG6 PE=1 SV=1
REVERSE39658	5	1	16.8244	5.35819568	Reversed Sequence 39658
Q7Z3Z0	5	2	28.4575	3.41074248	Keratin_type I cytoskeletal 25 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT25 PE=1 SV=1
REVERSE30723	3	1	11.107	3.00536977	Reversed Sequence 30723
P62993	3	1	15.4388	13.8089684	Growth factor receptor-bound protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GRB2 PE=1 SV=1
Q9UNM6	5	3	28.5292	8.3190362	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSMD13 PE=1 SV=2
Q96CM8	2	1	7.391	18.1547661	Acyl-CoA synthetase family member 2_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSF2 PE=1 SV=2
REVERSE31424	4	2	14.3899	7.39253096	Reversed Sequence 31424
O00507	7	1	25.8198	6.9013368	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y OS=Homo sapiens OX=9606 GN=USP9Y PE=2 SV=2
E9PPJ0	4	4	24.4298	15.6244094	Splicing factor 3B subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B2 PE=1 SV=1
O94826	3	1	13.3322	3.03918856	Mitochondrial import receptor subunit TOM70 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOMM70 PE=1 SV=1
P12004	8	4	47.5482	15.2107791	Proliferating cell nuclear antigen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNA PE=1 SV=1
Q8IZT6	32	2	126.1269	1.35697731	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ASPM PE=1 SV=2
REVERSE17827	3	1	11.3388	8.76460664	Reversed Sequence 17827
Q9Y2I7	15	3	52.5859	3.79737828	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIKFYVE PE=1 SV=3
REVERSE24169	18	2	69.524	10.4704161	Reversed Sequence 24169

Q7KZ85	1	1	3.6733	2.08101495	Transcription elongation factor SPT6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SUPT6H PE=1 SV=2
P83731	4	2	18.246	1.25133396	60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL24 PE=1 SV=1
H0Y8E6	6	4	34.5533	13.703097	DNA helicase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM2 PE=1 SV=1
REVERSE12681	9	2	28.745	1.01383185	Reversed Sequence 12681
P26232	6	1	26.8898	1.15731183	Catenin alpha-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNNA2 PE=1 SV=5
O15400	4	2	21.9535	2.68344012	Syntaxin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STX7 PE=1 SV=4
Q15393	11	6	44.3672	34.1656442	Splicing factor 3B subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B3 PE=1 SV=4
Q8NF91-2	14	2	46.0989	5.61737045	Isoform 2 of Nesprin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNE1
REVERSE26203	1	1	3.1914	33.1258194	Reversed Sequence 26203
Q6R2W3	6	3	22.1286	7.28246663	SCAN domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZBED9 PE=2 SV=1
REVERSE20961	8	1	30.5944	29.4245422	Reversed Sequence 20961
P48735	4	1	18.6898	4.11871919	Isocitrate dehydrogenase [NADP]_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IDH2 PE=1 SV=2
P12270	21	4	97.6046	11.5711672	Nucleoprotein TPR OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPR PE=1 SV=3
Q92945	11	5	57.0869	21.1406885	Far upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHSRP PE=1 SV=4
REVERSE30983	4	1	14.733	16.2006515	Reversed Sequence 30983
Q9NUQ9	4	1	22.9779	10.0465035	Protein FAM49B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM49B PE=1 SV=1
P45877	2	1	10.841	9.48396938	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPIC PE=1 SV=1

Q13151	5	4	34.0423	40.1581952	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1
P49327	59	42	317.2443	148.07904	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FASN PE=1 SV=3
Q9NQT8	9	2	42.9666	5.87724717	Kinesin-like protein KIF13B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF13B PE=1 SV=2
REVERSE26351	3	1	14.4395	15.1804765	Reversed Sequence 26351
Q02543	3	1	16.9577	2.2652898	60S ribosomal protein L18a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL18A PE=1 SV=2
P52272	27	15	155.8515	123.954516	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPM PE=1 SV=3
Q15772	4	2	13.0062	2.62294055	Striated muscle preferentially expressed protein kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPEG PE=1 SV=4
Q9UKA9	3	2	19.8883	11.0303634	Polypyrimidine tract-binding protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTBP2 PE=1 SV=1
REVERSE18379	11	2	41.1081	2.23066643	Reversed Sequence 18379
Q5H9R7	7	2	30.5318	5.09047343	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPP6R3 PE=1 SV=2
REVERSE5971	2	1	7.0283	1.95361537	Reversed Sequence 5971
Q14195-2	12	1	82.1907	12.8912085	Isoform LCRMP-4 of Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPYSL3
Q9Y230	7	5	42.6794	15.7672814	RuvB-like 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RUVBL2 PE=1 SV=3
P06753-2	9	1	46.4119	1.32411649	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3
REVERSE34826	5	1	18.1308	11.8271062	Reversed Sequence 34826
REVERSE7485	3	1	10.7543	5.20375624	Reversed Sequence 7485
O15018	9	3	27.8691	9.96884229	PDZ domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDZD2 PE=1 SV=4

O75534	4	1	27.6377	3.44125817	Cold shock domain-containing protein E1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSDE1 PE=1 SV=2
REVERSE11157	5	1	18.7921	1.74849238	Reversed Sequence 11157
H0YJ41	2	1	7.0104	3.89514882	BTB/POZ domain-containing protein 7 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BTBD7 PE=1 SV=1
REVERSE13158	5	1	16.5571	8.77288817	Reversed Sequence 13158
REVERSE17205	3	1	9.9762	14.5568384	Reversed Sequence 17205
REVERSE34335	2	1	7.081	2.48680518	Reversed Sequence 34335
REVERSE13508	4	1	13.4262	8.30722621	Reversed Sequence 13508
P07814	8	1	39.5774	1.56131808	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPRS PE=1 SV=5
O14514	5	1	18.0501	3.69408521	Adhesion G protein-coupled receptor B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADGRB1 PE=1 SV=2
P31689	4	1	19.0563	10.531382	DnaJ homolog subfamily A member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DNAJA1 PE=1 SV=2
REVERSE27830	5	1	17.5984	34.1314698	Reversed Sequence 27830
Q9Y617	4	4	23.0993	12.2990924	Phosphoserine aminotransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSAT1 PE=1 SV=2
Q9NS87	4	1	12.7477	8.39224524	Kinesin-like protein KIF15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF15 PE=1 SV=1
Q9UIQ6	12	3	61.2243	7.88034181	Leucyl-cystinyl aminopeptidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LNPEP PE=1 SV=3
A0A1W2PQ51	14	3	92.1322	18.9502795	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX17 PE=1 SV=1
REVERSE11622	27	4	93.2535	2.5903031	Reversed Sequence 11622
Q99729-2	9	2	37.0177	8.19574372	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPAB

P16435	7	2	44.5705	14.1579412	NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POR PE=1 SV=2
REVERSE12530	3	1	11.9849	7.18079185	Reversed Sequence 12530
P30626	6	5	29.5197	29.060122	Sorcin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRI PE=1 SV=1
P13929	8	1	47.8281	12.7731748	Beta-enolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENO3 PE=1 SV=5
P31942	2	2	13.1588	76.4079004	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPH3 PE=1 SV=2
Q8TBY9	2	1	7.5862	4.42861532	Cilia- and flagella-associated protein 251 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WDR66 PE=2 SV=2
O14980	10	7	61.6359	25.288325	Exportin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPO1 PE=1 SV=1
Q9HB71	5	4	21.5139	21.0997356	Calcyclin-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CACYBP PE=1 SV=2
Q5VST9-5	5	2	19.4327	6.64854148	Isoform 4 of Obscurin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OBSCN
P14866	8	7	53.8827	74.6075457	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPL PE=1 SV=2
Q9UHV9	3	1	13.9898	23.360433	Prefoldin subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFDN2 PE=1 SV=1
REVERSE24139	2	2	6.5649	7.57784059	Reversed Sequence 24139
Q6ZTR5	12	2	48.7733	12.3190971	Cilia- and flagella-associated protein 47 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFAP47 PE=2 SV=5
Q1KMD3	7	2	28.7614	13.8517397	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPUL2 PE=1 SV=1
A0A087X1Z3	2	1	13.367	7.44423801	Proteasome activator complex subunit 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSME2 PE=1 SV=1
REVERSE12841	5	1	15.912	8.63113042	Reversed Sequence 12841

H0Y7H1	1	1	3.4059	24.2303754	alpha-1_2-Mannosidase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAN1A2 PE=1 SV=2
REVERSE41480	11	1	33.8454	13.1862734	Reversed Sequence 41480
J3KNG8	2	1	7.3151	6.92233842	Folliculin-interacting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FNIP1 PE=1 SV=1
Q96J17	5	1	19.2164	6.70460328	Spatascin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPG11 PE=1 SV=3
B5MD58	2	1	11.7295	2.85913503	Sterol regulatory element-binding protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SREBF1 PE=1 SV=1
Q96QB1	13	2	51.8294	15.0841987	Rho GTPase-activating protein 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLC1 PE=1 SV=4
Q8TBA6	4	3	16.6597	5.15822238	Golgin subfamily A member 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GOLGA5 PE=1 SV=3
REVERSE3151	4	1	13.4692	1.22258371	Reversed Sequence 3151
Q13393	4	1	18.3187	4.55507719	Phospholipase D1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLD1 PE=1 SV=1
O43592	6	2	32.5594	24.5780787	Exportin-T OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPOT PE=1 SV=2
Q9Y266	6	3	34.995	11.1942856	Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUDC PE=1 SV=1
REVERSE6291	8	1	26.8631	5.23870279	Reversed Sequence 6291
P05783	3	1	13.9069	21.423295	Keratin_type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT18 PE=1 SV=2
Q92688	2	1	13.1404	10.7947877	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANP32B PE=1 SV=1
Q07666	2	1	9.5404	7.58728893	KH domain-containing_ RNA-binding_ signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KHDRBS1 PE=1 SV=1
F8VQX6	2	1	16.0454	70.89947	Methyltransferase-like protein 7A (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=METTL7A PE=1 SV=1

Q8IVL1	4	1	13.4862	19.3339565	Neuron navigator 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAV2 PE=1 SV=3
H0YLR3	2	1	12.0253	13.5827341	U2 small nuclear ribonucleoprotein A' (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPA1 PE=1 SV=1
P61221	5	2	23.5881	12.4242943	ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCE1 PE=1 SV=1
P07910	16	3	95.2898	113.097366	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC PE=1 SV=4
Q99541	3	1	14.3088	8.34917703	Perilipin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLIN2 PE=1 SV=2
Q14008	15	1	64.6508	24.6622148	Cytoskeleton-associated protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKAP5 PE=1 SV=3
P78332	1	1	3.1957	35.3003199	RNA-binding protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBM6 PE=1 SV=5
Q9H0J4	3	1	7.0348	3.93853616	Glutamine-rich protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=QRICH2 PE=1 SV=1
Q8TD84	7	2	27.8337	10.6889718	Down syndrome cell adhesion molecule- like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DSCAML1 PE=1 SV=2
REVERSE13371	2	1	6.8354	27.616491	Reversed Sequence 13371
F8W6I7	9	2	78.3755	61.312474	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPA1 PE=1 SV=2
REVERSE14297	7	2	25.0906	10.1127732	Reversed Sequence 14297
P20020	12	3	59.2849	26.2475763	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B1 PE=1 SV=4
B5ME19	6	1	30.0073	12.7964597	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3CL PE=3 SV=1
Q9UI47	5	1	23.6962	4.27915092	Catenin alpha-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTNNA3 PE=1 SV=2
A8TX70	9	2	31.7465	16.7552493	Collagen alpha-5(VI) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL6A5 PE=1 SV=1

REVERSE18497	5	1	15.0302	5.82114253	Reversed Sequence 18497
Q08380	3	1	13.7175	5.98839752	Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS3BP PE=1 SV=1
Q8N201	5	1	14.6105	9.81972005	Integrator complex subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=INTS1 PE=1 SV=2
P62760	7	4	39.6592	37.0601833	Visinin-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VSNL1 PE=1 SV=2
O43854	3	1	13.1239	19.6688439	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EDIL3 PE=1 SV=1
P07910-2	12	1	102.9524	187.471565	Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPC
P30825	1	1	6.9089	21.6723119	High affinity cationic amino acid transporter 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC7A1 PE=1 SV=1
REVERSE23740	12	2	35.3006	14.2537997	Reversed Sequence 23740
P13533	10	1	37.3047	6.55896575	Myosin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MYH6 PE=1 SV=5
P37198	1	1	6.0585	13.2693629	Nuclear pore glycoprotein p62 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP62 PE=1 SV=3
P49454	26	2	85.8758	6.34691509	Centromere protein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CENPF PE=1 SV=2
P53701	3	1	16.266	3.76730105	Cytochrome c-type heme lyase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HCCS PE=1 SV=1
REVERSE34422	3	1	10.4785	8.11669612	Reversed Sequence 34422
REVERSE20015	4	1	13.9895	13.0400555	Reversed Sequence 20015
REVERSE8808	15	3	48.3304	62.2268492	Reversed Sequence 8808
REVERSE19640	6	1	18.6271	13.9798946	Reversed Sequence 19640
REVERSE40296	2	1	6.4115	11.7463691	Reversed Sequence 40296
Q9BY67	3	2	17.1755	78.0529855	Cell adhesion molecule 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CADM1 PE=1 SV=2
REVERSE14288	6	2	24.6627	79.4759443	Reversed Sequence 14288

P46087	2	1	9.8486	56.9939088	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOP2 PE=1 SV=2
A0A0A0MQZ4	1	1	4.0946	116.600957	Protein phosphatase 1K_mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPM1K PE=1 SV=1
REVERSE9955	6	1	19.8296	7.04550657	Reversed Sequence 9955
P62995	4	1	25.1552	184.189804	Transformer-2 protein homolog beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRA2B PE=1 SV=1
REVERSE26703	10	3	37.0126	13.7543056	Reversed Sequence 26703
REVERSE58451	5	1	18.2851	13.8285968	Reversed Sequence 58451
O75694	6	2	28.8012	31.3714783	Nuclear pore complex protein Nup155 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP155 PE=1 SV=1
P25391	12	2	36.924	22.1974164	Laminin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMA1 PE=1 SV=2
Q5JXB2	4	1	19.7361	34.637273	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBE2NL PE=1 SV=1
P18669	3	1	19.2155	85.7272665	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM1 PE=1 SV=2
REVERSE23552	23	1	78.873	22.3826637	Reversed Sequence 23552
Q9UMZ2	6	2	20.5508	60.0597453	Synergin gamma OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SYNRG PE=1 SV=2
A0A0J9YVP6	3	2	17.6142	15.190585	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PUF60 PE=1 SV=1
P48169	3	1	10.6829	8.08600034	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GABRA4 PE=2 SV=2
REVERSE20624	11	1	36.0914	6.24994325	Reversed Sequence 20624
P21817	23	1	97.7843	3.00468146	Ryanodine receptor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RYP1 PE=1 SV=3
P27694	5	1	23.0586	15.2163795	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPA1 PE=1 SV=2

Q58FF8	23	5	123.7084	72.4782606	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSP90AB2P PE=1 SV=2
Q8TEQ6	8	1	30.5026	70.679474	Gem-associated protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GEMIN5 PE=1 SV=3
Q8WTV0	5	3	23.0519	48.0881968	Scavenger receptor class B member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCARB1 PE=1 SV=1
REVERSE13227	8	2	23.5035	11.0630042	Reversed Sequence 13227
REVERSE27883	4	1	10.5171	8.1462849	Reversed Sequence 27883
REVERSE19443	7	1	22.5068	3.80942092	Reversed Sequence 19443
REVERSE8552	20	1	64.1641	21.4774969	Reversed Sequence 8552
Q6PCE3	1	1	4.8907	53.7072615	Glucose 1_6-bisphosphate synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGM2L1 PE=1 SV=3
O75643	10	4	42.5371	24.1010592	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRNP200 PE=1 SV=2
Q9UP83	1	1	3.9802	12.2218642	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COG5 PE=1 SV=3
P22234	8	2	43.7691	43.2079059	Multifunctional protein ADE2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PAICS PE=1 SV=3
Q5QPL9	5	1	37.2592	32.1974405	RNA-binding protein Raly (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RALY PE=1 SV=1
REVERSE37118	4	1	11.8164	264.302352	Reversed Sequence 37118
REVERSE16863	2	1	6.0826	31.8674311	Reversed Sequence 16863
Q8NC60	2	1	6.8985	16.8522091	Nitric oxide-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NOA1 PE=1 SV=2
Q8IVL6	2	1	6.3952	15.3826998	Prolyl 3-hydroxylase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=P3H3 PE=1 SV=1
Q9NS69	2	2	12.4792	36.9451689	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TOMM22 PE=1 SV=3

Q9UKV8	4	1	15.833	5.39943076	Protein argonaute-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGO2 PE=1 SV=3
Q9P219	3	1	9.3721	65.6166528	Protein Daple OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCDC88C PE=1 SV=3
Q9UHB9	3	1	13.8312	13.066955	Signal recognition particle subunit SRP68 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRP68 PE=1 SV=2
O14929	3	2	15.8504	80.3434333	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HAT1 PE=1 SV=1
REVERSE38658	5	1	18.8231	72.052337	Reversed Sequence 38658
J3KR97	4	3	19.3485	30.0177254	Tubulin-specific chaperone D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBCD PE=1 SV=1
A0A087WX29	4	3	25.2008	32.8244086	TAR DNA-binding protein 43 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TARDBP PE=1 SV=1
Q03001-3	19	1	63.956	19.2687872	Isoform 3 of Dystonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DST
Q5T3Q7	2	1	6.226	39.6674269	HEAT repeat-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HEATR1 PE=1 SV=1
REVERSE34024	6	1	15.7365	58.9196238	Reversed Sequence 34024
P18621	4	1	24.5103	60.1459134	60S ribosomal protein L17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPL17 PE=1 SV=3
H7BZ20	1	1	5.2825	13.4008514	Thymidylate kinase (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DTYMK PE=1 SV=1
O60812	8	1	50.0031	24.5006731	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HNRNPCL1 PE=1 SV=1
A0A024QZ42	2	1	10.2189	21.4622513	HCG1985580_ isoform CRA_c OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PDCD6 PE=1 SV=1
A0A1W2PQ47	5	1	25.8097	312.789686	Squalene synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FDFT1 PE=1 SV=1
K7ENG2	3	2	19.6683	49.8530196	U2 snRNP auxiliary factor large subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=U2AF2 PE=1 SV=1

Q15717	3	2	20.7209	117.766245	ELAV-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELAVL1 PE=1 SV=2
Q13535	6	4	21.9609	22.4556767	Serine/threonine-protein kinase ATR OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATR PE=1 SV=3
O76094	3	2	13.7576	27.7679999	Signal recognition particle subunit SRP72 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRP72 PE=1 SV=3
O60287	5	1	19.2914	62.3529271	Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=URB1 PE=1 SV=4
Q15758	4	1	25.8377	477.955279	Neutral amino acid transporter B(0) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC1A5 PE=1 SV=2
REVERSE28804	7	1	23.3754	39.5836755	Reversed Sequence 28804
Q9NR16	3	1	10.7961	51.4414337	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M160 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD163L1 PE=1 SV=2
REVERSE22535	3	1	9.9399	49.1374559	Reversed Sequence 22535
REVERSE3835	4	2	17.5683	61.6065109	Reversed Sequence 3835
P55265	7	2	29.8827	51.1220298	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADAR PE=1 SV=4
P25205	9	4	41.7028	55.4636781	DNA replication licensing factor MCM3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM3 PE=1 SV=3
Q09161	3	2	14.7433	22.7055375	Nuclear cap-binding protein subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCBP1 PE=1 SV=1
REVERSE18833	9	1	27.3903	223.190661	Reversed Sequence 18833
O15397	7	5	42.6823	70.952183	Importin-8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IPO8 PE=1 SV=2
P13073	3	1	19.2856	46.0305812	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COX4I1 PE=1 SV=1
P55060	8	7	45.693	166.227086	Exportin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSE1L PE=1 SV=3

Q14689	9	1	42.2133	265.726029	Disco-interacting protein 2 homolog A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DIP2A PE=1 SV=2
REVERSE18380	3	1	12.1618	43.6615231	Reversed Sequence 18380
Q9Y6V0	18	1	64.6801	51.2413113	Protein piccolo OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCLO PE=1 SV=5
P62318	4	1	15.3824	211.160848	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPD3 PE=1 SV=1
P00492	5	4	29.7766	124.917548	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HPRT1 PE=1 SV=2
REVERSE11467	4	1	12.2052	30.6742715	Reversed Sequence 11467
P52292	7	3	43.2255	89.9315224	Importin subunit alpha-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KPNA2 PE=1 SV=1
Q8NBX0	5	2	20.3526	12.5519129	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SCCPDH PE=1 SV=1
A0A0A0MRG2	3	2	12.7791	59.3179695	Amyloid-beta A4 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APP PE=1 SV=1
A4D1B5	3	1	10.517	63.0630807	Gamma-secretase-activating protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSAP PE=1 SV=2
P33316	3	1	16.5569	288.779217	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DUT PE=1 SV=4
B4DUC8	2	1	11.9731	93.2152299	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MTAP PE=1 SV=1
E9PGT6	2	1	12.3696	43.6956549	COP9 signalosome complex subunit 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COPS8 PE=1 SV=1
Q15424	3	1	13.99	72.8030836	Scaffold attachment factor B1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAFB PE=1 SV=4
Q15233	6	3	27.5664	191.181753	Non-POU domain-containing octamer- binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NONO PE=1 SV=4

Q9NZN5	5	1	16.2181	27.7907633	Rho guanine nucleotide exchange factor 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ARHGEF12 PE=1 SV=1
REVERSE10207	6	2	21.1369	31.0818006	Reversed Sequence 10207
REVERSE1650	4	1	14.2152	22.4873606	Reversed Sequence 1650
REVERSE7309	11	2	28.5908	65.2909239	Reversed Sequence 7309
P32322	3	2	19.3501	137.41701	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYCR1 PE=1 SV=2
O95613	22	4	78.9708	41.9092407	Pericentrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCNT PE=1 SV=4
P33176	11	2	42.3064	92.4720874	Kinesin-1 heavy chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIF5B PE=1 SV=1
REVERSE7660	3	1	10.3975	89.9223655	Reversed Sequence 7660
A6NFX8	3	1	17.3219	26.0605011	ADP-sugar pyrophosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUDT5 PE=1 SV=1
Q9H7D0	6	1	21.1874	40.498259	Dedicator of cytokinesis protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DOCK5 PE=1 SV=3
REVERSE37142	2	1	6.7432	66.8613363	Reversed Sequence 37142
Q9H2D6	3	1	12.5127	203.370148	TRIO and F-actin-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIOBP PE=1 SV=3
O43143	9	4	42.9156	65.0504889	Pre-mRNA-splicing factor ATP- dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHX15 PE=1 SV=2
P06737	13	4	71.5574	92.2488914	Glycogen phosphorylase_ liver form OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PYGL PE=1 SV=4
H3BMM9	2	1	12.0268	73.5844599	RNA-binding protein with serine-rich domain 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RNPS1 PE=1 SV=1
Q9UBB4	4	1	28.2775	231.567787	Ataxin-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATXN10 PE=1 SV=1
Q15181	3	1	16.6467	120.708923	Inorganic pyrophosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PPA1 PE=1 SV=2

O00170	2	1	10.2102	42.9457569	AH receptor-interacting protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AIP PE=1 SV=2
Q9P2D8	2	1	6.4307	45.0930449	Protein unc-79 homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNC79 PE=2 SV=4
O75533	7	3	35.6635	207.01018	Splicing factor 3B subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SF3B1 PE=1 SV=3
REVERSE7861	6	2	21.8687	38.9954668	Reversed Sequence 7861
REVERSE13781	4	2	12.1786	67.0586532	Reversed Sequence 13781
Q7Z3Z4	9	2	48.6521	371.991457	Piwi-like protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIWIL4 PE=2 SV=2
C9J931	2	1	12.4779	89.9166072	GTP-binding protein Rheb OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHEB PE=1 SV=1
REVERSE2303	5	1	19.9034	102.376522	Reversed Sequence 2303
Q5THJ4	8	1	30.8435	99.2498124	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13D PE=1 SV=2
Q13308	6	1	33.7542	87.1293978	Inactive tyrosine-protein kinase 7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PTK7 PE=1 SV=2
P08574	1	1	5.2395	156.705826	Cytochrome c1_ heme protein_ mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYC1 PE=1 SV=3
Q13616	4	2	15.4927	38.0809173	Cullin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CUL1 PE=1 SV=2
REVERSE26418	5	1	16.8877	627.239402	Reversed Sequence 26418
Q9H9G7	2	1	8.1729	94.1091648	Protein argonaute-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AGO3 PE=1 SV=2
Q92973	4	2	23.2927	136.135982	Transportin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNPO1 PE=1 SV=2
P62854	1	1	5.6927	77.2631456	40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS26 PE=1 SV=3
REVERSE9652	11	2	37.4981	190.724975	Reversed Sequence 9652
Q03001-13	2	1	7.6635	232.188469	Isoform 8 of Dystonin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DST
F5H269	3	1	10.8182	103.208407	DmX-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DMXL1 PE=1 SV=1

Q5SZK8	5	2	13.8425	591.384226	FRAS1-related extracellular matrix protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FREM2 PE=1 SV=2
Q9HAV4	14	6	72.4236	393.854235	Exportin-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPO5 PE=1 SV=1
P33992	8	4	41.5569	258.666547	DNA replication licensing factor MCM5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM5 PE=1 SV=5
G3V3A5	7	2	25.1905	160.76333	Tetratricopeptide repeat protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTC6 PE=1 SV=1
Q02790	8	4	48.3674	220.959057	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FKBP4 PE=1 SV=3
P33993	5	2	27.0323	547.615009	DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM7 PE=1 SV=4
REVERSE14886	6	1	22.4963	529.301053	Reversed Sequence 14886
A6NHR9	5	1	22.9947	64.2864525	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMCHD1 PE=1 SV=2
Q14566	6	2	28.8585	643.101076	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM6 PE=1 SV=1
Q9NRF8	2	1	8.2869	217.44989	CTP synthase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTPS2 PE=1 SV=1
REVERSE24475	20	2	59.7576	114.502367	Reversed Sequence 24475
Q9Y4F3	5	1	28.8924	210.741983	Meiosis regulator and mRNA stability factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MARF1 PE=1 SV=6
Q8TDW7	14	1	50.1895	705.991024	Protocadherin Fat 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAT3 PE=2 SV=3
I3LOU4	1	1	6.3465	8551.70663	LisH domain-containing protein FOPNL (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FOPNL PE=1 SV=1
Q86V81	4	2	20.9306	3875.74339	THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALYREF PE=1 SV=3

F6VRR5	3	1	14.8906	4420.09725	Polymerase delta-interacting protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=POLDIP3 PE=1 SV=1
O95487	1	1	3.294	2120.4753	Protein transport protein Sec24B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEC24B PE=1 SV=2

Table A3. Differentially expressed proteins participate in 212 biological pathways according to the analysis carried out in Reactome. All reported biological pathways have a False Discovery Rate (FDR) ≤ 0.05 .

Term ID	Term description	False Discovery Rate (FDR)
HSA-8953854	Metabolism of RNA	2.06E-17
HSA-422475	Axon guidance	6.48E-16
HSA-392499	Metabolism of proteins	1.67E-15
HSA-72649	Translation initiation complex formation	1.94E-14
HSA-5663205	Infectious disease	1.3E-13
HSA-72702	Ribosomal scanning and start codon recognition	1.43E-13
HSA-6798695	Neutrophil degranulation	1.81E-13
HSA-156827	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	6.76E-13
HSA-72737	Cap-dependent Translation Initiation	2.33E-12
HSA-168254	Influenza Infection	4.29E-12
HSA-72706	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	4.77E-12
HSA-168255	Influenza Life Cycle	5.87E-12
HSA-72766	Translation	7.15E-12
HSA-156842	Eukaryotic Translation Elongation	1.32E-11
HSA-168256	Immune System	2.04E-11
HSA-168249	Innate Immune System	2.14E-11

HSA-72695	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	2.14E-11
HSA-1799339	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	2.99E-11
HSA-72689	Formation of a pool of free 40S subunits	3.29E-10
HSA-975957	Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	3.3E-10
HSA-156902	Peptide chain elongation	3.39E-10
HSA-72163	mRNA Splicing - Major Pathway	4.95E-10
HSA-1643685	Disease	4.99E-10
HSA-9010553	Regulation of expression of SLITs and ROBOs	6.03E-10
HSA-72203	Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	6.05E-10
HSA-975956	Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	7.49E-10
HSA-5653656	Vesicle-mediated transport	1.51E-09
HSA-2408522	Selenoamino acid metabolism	1.64E-09
HSA-376176	Signaling by ROBO receptors	1.64E-09
HSA-192823	Viral mRNA Translation	0.000000002
HSA-1430728	Metabolism	2.45E-09
HSA-2408557	Selenocysteine synthesis	3.53E-09
HSA-72764	Eukaryotic Translation Termination	3.53E-09
HSA-71291	Metabolism of amino acids and derivatives	8.59E-09
HSA-168273	Influenza Viral RNA Transcription and Replication	1.04E-08
HSA-195258	RHO GTPase Effectors	4.48E-08
HSA-1266738	Developmental Biology	5.92E-08
HSA-199991	Membrane Trafficking	6.97E-08
HSA-373760	L1CAM interactions	9.41E-08
HSA-194315	Signaling by Rho GTPases	0.000000126
HSA-446203	Asparagine N-linked glycosylation	0.000000214
HSA-597592	Post-translational protein modification	0.00000039
HSA-1445148	Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane	0.000000422

HSA-6791226	Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	0.00000123
HSA-69275	G2/M Transition	0.00000263
HSA-199977	ER to Golgi Anterograde Transport	0.00000266
HSA-6807878	COPI-mediated anterograde transport	0.0000156
HSA-109582	Hemostasis	0.0000202
HSA-380320	Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes	0.0000374
HSA-1640170	Cell Cycle	0.0000802
HSA-3371497	HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)	0.00011
HSA-70326	Glucose metabolism	0.00011
HSA-71406	Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle	0.00012
HSA-2262752	Cellular responses to stress	0.00015
HSA-5626467	RHO GTPases activate IQGAPs	0.00015
HSA-8852276	The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint	0.00017
HSA-437239	Recycling pathway of L1	0.00024
HSA-70263	Gluconeogenesis	0.0003
HSA-373755	Semaphorin interactions	0.00037
HSA-3371568	Attenuation phase	0.00042
HSA-3371571	HSF1-dependent transactivation	0.00042
HSA-162909	Host Interactions of HIV factors	0.00043
HSA-70171	Glycolysis	0.00044
HSA-3371556	Cellular response to heat stress	0.00051
HSA-3000484	Scavenging by Class F Receptors	0.00052
HSA-380259	Loss of Nlp from mitotic centrosomes	0.00052
HSA-68877	Mitotic Prometaphase	0.00052
HSA-68886	M Phase	0.00057
HSA-5617833	Cilium Assembly	0.00065
HSA-8854518	AURKA Activation by TPX2	0.00066
HSA-8953897	Cellular responses to external stimuli	0.00066

HSA-2682334	EPH-Ephrin signaling	0.00076
HSA-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	0.001
HSA-5620912	Anchoring of the basal body to the plasma membrane	0.0011
HSA-6811434	COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic	0.0011
HSA-109581	Apoptosis	0.0012
HSA-2029482	Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation	0.0012
HSA-389958	Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding	0.0012
HSA-380270	Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes	0.0013
HSA-445095	Interaction between L1 and Ankyrins	0.0013
HSA-5625740	RHO GTPases activate PKNs	0.0014
HSA-5625900	RHO GTPases activate CIT	0.0014
HSA-5627117	RHO GTPases Activate ROCKs	0.0014
HSA-71387	Metabolism of carbohydrates	0.0015
HSA-9020591	Interleukin-12 signaling	0.0015
HSA-177243	Interactions of Rev with host cellular proteins	0.0016
HSA-416572	Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse	0.0016
HSA-450531	Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements	0.0016
HSA-5628897	TP53 Regulates Metabolic Genes	0.0016
HSA-936440	Negative regulators of DDX58/IFIH1 signaling	0.0016
HSA-194138	Signaling by VEGF	0.0017
HSA-77305	Beta oxidation of palmitoyl-CoA to myristoyl-CoA	0.0017
HSA-2565942	Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition	0.0018
HSA-162906	HIV Infection	0.002
HSA-397014	Muscle contraction	0.002
HSA-8856688	Golgi-to-ER retrograde transport	0.002

HSA-77286	mitochondrial fatty acid beta-oxidation of saturated fatty acids	0.0021
HSA-1169408	ISG15 antiviral mechanism	0.0022
HSA-5663220	RHO GTPases Activate Formins	0.0022
HSA-1280218	Adaptive Immune System	0.0025
HSA-77289	Mitochondrial Fatty Acid Beta-Oxidation	0.0025
HSA-3371511	HSF1 activation	0.0026
HSA-8950505	Gene and protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12 stimulation	0.0028
HSA-163560	Triglyceride catabolism	0.0029
HSA-4420097	VEGFA-VEGFR2 Pathway	0.0033
HSA-75035	Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex	0.0033
HSA-77310	Beta oxidation of lauroyl-CoA to decanoyl-CoA-CoA	0.004
HSA-77348	Beta oxidation of octanoyl-CoA to hexanoyl-CoA	0.004
HSA-77350	Beta oxidation of hexanoyl-CoA to butanoyl-CoA	0.004
HSA-5218920	VEGFR2 mediated vascular permeability	0.0043
HSA-111447	Activation of BAD and translocation to mitochondria	0.0048
HSA-3928663	EPHA-mediated growth cone collapse	0.0049
HSA-201681	TCF dependent signaling in response to WNT	0.0051
HSA-69278	Cell Cycle, Mitotic	0.0051
HSA-1428517	The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	0.0052
HSA-5336415	Uptake and function of diphtheria toxin	0.0055
HSA-77346	Beta oxidation of decanoyl-CoA to octanoyl-CoA-CoA	0.0055
HSA-70268	Pyruvate metabolism	0.0062
HSA-2467813	Separation of Sister Chromatids	0.0063
HSA-1852241	Organelle biogenesis and maintenance	0.0067
HSA-190840	Microtubule-dependent trafficking of connexons from Golgi to the plasma membrane	0.0067

HSA-389661	Glyoxylate metabolism and glycine degradation	0.0068
HSA-5610787	Hedgehog 'off' state	0.0068
HSA-449147	Signaling by Interleukins	0.0074
HSA-445355	Smooth Muscle Contraction	0.0076
HSA-450408	AUF1 (hnRNP D0) binds and destabilizes mRNA	0.0091
HSA-390466	Chaperonin-mediated protein folding	0.0094
HSA-5683057	MAPK family signaling cascades	0.0101
HSA-3299685	Detoxification of Reactive Oxygen Species	0.0104
HSA-389977	Post-chaperonin tubulin folding pathway	0.0104
HSA-5627123	RHO GTPases activate PAKs	0.0104
HSA-5578775	Ion homeostasis	0.0105
HSA-9006931	Signaling by Nuclear Receptors	0.0107
HSA-5358351	Signaling by Hedgehog	0.0113
HSA-1236975	Antigen processing-Cross presentation	0.0114
HSA-2132295	MHC class II antigen presentation	0.0114
HSA-162592	Integration of provirus	0.0116
HSA-6811442	Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic	0.0122
HSA-71403	Citric acid cycle (TCA cycle)	0.013
HSA-9006934	Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	0.0137
HSA-5673001	RAF/MAP kinase cascade	0.0141
HSA-389960	Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC	0.0148
HSA-195253	Degradation of beta-catenin by the destruction complex	0.0149
HSA-1236974	ER-Phagosome pathway	0.0158
HSA-2173782	Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	0.0158
HSA-180024	DARPP-32 events	0.0164
HSA-429947	Deadenylation of mRNA	0.0164
HSA-983231	Factors involved in megakaryocyte development and platelet production	0.0164

HSA-195721	Signaling by WNT	0.0165
HSA-3899300	SUMOylation of transcription cofactors	0.0167
HSA-3928662	EPHB-mediated forward signaling	0.0167
HSA-983170	Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC	0.0181
HSA-2980736	Peptide hormone metabolism	0.0192
HSA-264870	Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins	0.0202
HSA-3000170	Syndecan interactions	0.0202
HSA-389957	Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC	0.0202
HSA-1660662	Glycosphingolipid metabolism	0.0212
HSA-983169	Class I MHC mediated antigen processing & presentation	0.0215
HSA-3371453	Regulation of HSF1-mediated heat shock response	0.0224
HSA-77285	Beta oxidation of myristoyl-CoA to lauroyl-CoA	0.0233
HSA-8856828	Clathrin-mediated endocytosis	0.0233
HSA-3270619	IRF3-mediated induction of type I IFN	0.0234
HSA-190828	Gap junction trafficking	0.0244
HSA-162582	Signal Transduction	0.0251
HSA-168274	Export of Viral Ribonucleoproteins from Nucleus	0.0269
HSA-918233	TRAF3-dependent IRF activation pathway	0.0271
HSA-180746	Nuclear import of Rev protein	0.0293
HSA-3000157	Laminin interactions	0.0293
HSA-5689603	UCH proteinases	0.0293
HSA-2500257	Resolution of Sister Chromatid Cohesion	0.0294
HSA-6811436	COPI-independent Golgi-to-ER retrograde traffic	0.0294
HSA-9018519	Estrogen-dependent gene expression	0.0294
HSA-165054	Rev-mediated nuclear export of HIV RNA	0.0307
HSA-4641262	Disassembly of the destruction complex and recruitment of AXIN to the membrane	0.0307
HSA-5339716	Misspliced GSK3beta mutants stabilize beta-catenin	0.0307

HSA-5358747	S33 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.0307
HSA-5358749	S37 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.0307
HSA-5358751	S45 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.0307
HSA-5358752	T41 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.0307
HSA-9604323	Negative regulation of NOTCH4 signaling	0.0307
HSA-421837	Clathrin derived vesicle budding	0.031
HSA-75153	Apoptotic execution phase	0.0321
HSA-69481	G2/M Checkpoints	0.0322
HSA-390522	Striated Muscle Contraction	0.0328
HSA-204174	Regulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) complex	0.0335
HSA-69620	Cell Cycle Checkpoints	0.0338
HSA-5694530	Cargo concentration in the ER	0.0353
HSA-1474244	Extracellular matrix organization	0.0355
HSA-1655829	Regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP (SREBF)	0.0357
HSA-196299	Beta-catenin phosphorylation cascade	0.0374
HSA-2022377	Metabolism of Angiotensinogen to Angiotensins	0.0374
HSA-936837	Ion transport by P-type ATPases	0.0376
HSA-1500931	Cell-Cell communication	0.0384
HSA-3108232	SUMO E3 ligases SUMOylate target proteins	0.0384
HSA-429914	Deadenylation-dependent mRNA decay	0.0398
HSA-9013694	Signaling by NOTCH4	0.0404
HSA-532668	N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle	0.0405
HSA-5663213	RHO GTPases Activate WASPs and WAVES	0.0405
HSA-446353	Cell-extracellular matrix interactions	0.041
HSA-5610780	Degradation of GLI1 by the proteasome	0.0443
HSA-5610783	Degradation of GLI2 by the proteasome	0.0443
HSA-5610785	GLI3 is processed to GLI3R by the proteasome	0.0443
HSA-8957275	Post-translational protein phosphorylation	0.0456

HSA-913531	Interferon Signaling	0.0458
HSA-111465	Apoptotic cleavage of cellular proteins	0.0461
HSA-3000171	Non-integrin membrane-ECM interactions	0.0461
HSA-983189	Kinesins	0.0461
HSA-1482798	Acyl chain remodeling of CL	0.0472
HSA-171319	Telomere Extension By Telomerase	0.0472
HSA-5693548	Sensing of DNA Double Strand Breaks	0.0472
HSA-77288	mitochondrial fatty acid beta-oxidation of unsaturated fatty acids	0.0472
HSA-381771	Synthesis, secretion, and inactivation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1)	0.0499