



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Identificación de proteínas con cambios en la fosforilación de residuos de serina en la progresión del cáncer Cérvico-uterino por infección con VPH”.**

T E S I S

Que presenta

JUAN RAMÓN PADILLA MENDOZA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de tesis

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez

Dr. Israel López Reyes

Ciudad de México

Enero , 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mi estancia doctoral y realización de este proyecto.

Agradezco al CINVESTAV y al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular por brindarme un lugar dentro de sus aulas y laboratorios.

Agradezco principalmente a los Doctores Israel López Reyes y Mario Alberto Rodríguez que estuvieron apoyándome en todo momento en este trabajo, me aceptaron como su estudiante, ser parte de su grupo de trabajo, enseñándome a trabajar en el laboratorio. Gracias por escuchar y aclarar mis dudas, por apoyarme con paciencia y por alentarme, dirigirme en todo momento, además de aceptar mis ocurrencias dentro de nuestras pláticas. Los aprecio y respeto por considerarme parte de su círculo dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco de igual forma a mis asesores, las Doctoras Abigail Betanzos Fernández y Patricia Talamás Rohana, y los Doctores José Luis Rosales Encina, Nicolás Villegas Sepúlveda y Gilberto Javier Cázares Apátiga, por ser parte de mi comité evaluador y por las aportaciones que enriquecieron mi trabajo, además por la atención brindada en todo momento.

Este trabajo va dedicado especialmente a mis padres Juan Daniel Padilla Padilla y María Elena Mendoza de la O. por el gran apoyo brindado y por ser excelentes padres conmigo. Además por enseñarme que para ser alguien hay que luchar con convicción, persistencia, paciencia y dedicando el tiempo que fuese necesario para lograrlo, aunque lo obtenido no fuera lo deseado. Sin ellos no se hubiera logrado todo esto, ni estaría donde ahora estoy.

También esto va dedicado a mis hermanos Cesar Daniel Padilla Mendoza, Thania Padilla Mendoza, Rafael Loarca Mendza, mis cuñados Julio Cesar Melitón, Vanesa García e Isabel Illescas; mis sobrinos Danna Fabiola y Frida Daniela Melitón Padilla e Iker Daniel Padilla García. A mis primos (Hugo, Rosario, Jose Luis, Daniela, Ale, etc) y tíos y familia que ya no están en este mundo que creyeron en mi y que mencionarlos tardaría demasiado. También a mis suegros Román Illescas y Gabriela Gómez y al tío Jaime García siempre apoyando y ayudando en todo lo que está a su alcance.

Quiero dedicar este trabajo con mucho cariño y con especial atención a la familia que empiezo a formar con quien es mi amiga, mi novia, otro motor que me motiva a superarme gracias Lizet Gómez Hernández. Sin ti esto no hubiera sido posible por los grandes sacrificios que fueron para concluir este sueño. Te amo amor. Y también a mis perros Lua y JR

A mis amigos de laboratorio Christian, Mariana, Josué, Rigoberto, Mitzi, Alondra y Arturo, compañeros de trabajo que me brindaron su apoyo tanto en lo laboral como en lo personal, haciendo la convivencia de trabajo muy unida, con ellos trabajé siempre en esta estancia, apoyándonos tanto en lo laboral y personal, siempre trabajando a la par y a quienes considero como amigos por la comunicación y la amistad adquirida.

Agradezco a los grandes amigos que formé en mi estancia, que me ayudaron en mejorar el aprendizaje técnico-experimental y teórico, que ayudaron siempre en las buenas y en las malas y que juntos hicimos una gran hermandad. Te agradezco Susana Munguía Robledo, Jorge Sánchez, Martha Iris Valle, Javier Cazares, Moisés Cabrera, Rafael Jijón, Emilio Ávila, Fátima Murillo, Víctor Hugo Rosales, Cinthia Dionicio, Hugo de la Cruz, Abel Trujillo,

Agradezco al auxiliar del laboratorio Carlos Vázquez Calzada y el técnico Mario Rodríguez Nieves por el apoyo técnico que me brindaron, también en lo personal

pasando grandes charlas entre risas y anécdotas, convirtiéndose en grandes amigos y un poco más. Los admiro, los aprecio y los respeto mucho.

Esto va para los grandes amigos que formé en la maestría, ellos me han apoyado y enseñado que esto no es un camino fácil y cómo esquivar las piedras que se cruzan en el camino: Sonia Trejo, Enrique Ambrocio Ortiz, Ricardo Enrique Rubio, Néstor Alejandro Torres Frayre y Arturo Contis gracias.

Para mis amigos que formaron parte de este proceso y con los que he convivido toda la vida Pedro, Gerardo Blas, Juan (Wilo), José Murillo (Cuco) y a los profesores Jesús Alarcón e Israel Jesús Rodríguez.

Para mis amigos que forme en el futbol les agradezco su amistad y generar una buena relación Chicharo, Gabriel Baldissiera, Martín Hernández, Gary, Elmer Joel, Alexis Aburto.

Para el equipo de mi barrio, con grandes amigos esto va para Alfredo (Areck) Rayón, Luis González (Gordo), Marcos Cerón (Kikos), Salvador González, Héctor Núñez, Pedro y Javi Cerón, Chino, Luis, Tadeo y un sinfín de amigos que he formado, gracias.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>CÁNCER</b> .....	<b>3</b>
FACTORES DE RIESGO .....	4
CÁNCER EN EL MUNDO .....	4
CÁNCER EN MÉXICO.....	7
<b>FOSFORILACIÓN EN CÁNCER</b> .....	<b>8</b>
<b>CÁNCER CÉRVICO-UTERINO</b> .....	<b>10</b>
FACTORES DE RIESGO DEL CACU. ....	11
CLASIFICACIÓN DE LESIONES PRECANCEROSAS .....	11
PREVENCIÓN Y CONTROL DEL CACU.....	13
PRUEBAS DE DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO .....	14
CITOCEPILLOS ENDOCERVICALES .....	14
<b>VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO</b> .....	<b>15</b>

CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE VPH.....	16
TIPOS DE VPH TRANSMITIDOS SEXUALMENTE.....	16
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>17</b>
<b>ANÁLISIS DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS E LIEBG, LIEAG Y CACU .....</b>	<b>17</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>24</b>
<b>DIAGRAMA GENERAL DE EXPERIMENTACIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>26</b>
<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES .....</b>	<b>26</b>
<b>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>27</b>
<b>DIGESTIÓN DE LAS PROTEÍNAS Y ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....</b>	<b>27</b>
<b>ANÁLISIS COMPARATIVO DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN RESIDUOS DE SERINA .....</b>	<b>29</b>
<b>INMUNODETECCIÓN DE FOSFOPROTEÍNAS .....</b>	<b>30</b>
<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN RESIDUOS DE SERINA .....</b>	<b>30</b>

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>MUESTRAS ANALIZADAS</b> .....	<b>31</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN RESIDUOS DE SERINA</b> .....	<b>31</b>
<b>POSIBLE FUNCIÓN DE LAS FOSPROTEÍNAS IDENTIFICADAS</b> .....	<b>49</b>
<b>ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN RESIDUOS DE SERINA EN LAS DIFERENTES MUESTRAS</b> .....	<b>53</b>
<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS FOSFOPROTEÍNAS EN SERINA SELECCIONADAS</b> .....	<b>57</b>
<b>INMUNODETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN HSP27 Y SU FOSFORILACIÓN EN S82</b> .....	<b>59</b>
<b>INTERACTOMA <i>IN SILICO</i> DE HSP27</b> .....	<b>62</b>
<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS FOSFOPROTEÍNAS EN SERINA SUPERPUESTAS ENTRE LOS GRUPOS DE LIEBG Y CACU</b> .....	<b>65</b>
<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS FOSFOPROTEÍNAS EN SERINA EXCLUSIVAS DE CACU68</b>	
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>71</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>89</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>89</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>99</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Número estimado de muertes y nuevos casos de diferentes tipos de cáncer en México en 2018\*.

**Tabla 2** Cánceres más comunes en población mexicana, hombres y mujeres en 2018\*.

**Tabla 3.** Clasificación epidemiológica de los VPH.

**Tabla 4.** Número total de proteínas fosforiladas en serina identificadas por análisis LC-ESI-HDMSE.

**Tabla 5.** Total de proteínas fosforiladas en serina identificadas en el grupo de muestras sanas.

**Tabla 6.** Total de proteínas fosforiladas en serina identificadas en el grupo de muestras LIEBG.

**Tabla 7.** Total de proteínas fosforiladas en serina identificadas en el grupo de muestras CaCu.

**Tabla 8.** Proteínas con fosforilación en residuos de serina en los grupos LIEBG y CaCu, pero no fosforiladas en el grupo de muestras sanas.

**Tabla 9.** Sitios de fosforilación de HSP27 y las cinasas que la fosforilan.

**Tabla 10.** Fosfoproteínas en serina seleccionadas superpuestas entre los grupos de LIEBG y CaCu.

**Tabla 11.** Fosfoproteínas en serina seleccionadas exclusivas del grupo de CaCu.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Factores involucrados en el crecimiento tumoral y progresión al cáncer.

**Figura 2.** Número estimado de nuevos casos de cáncer en el mundo en 2018.

**Figura 3.** Número estimado de muertes por cáncer en 2018 en el mundo.

**Figura 4.** LIEBG. Célula coilocítica sugestiva de infección por VPH.

**Figura 5.** LIEAG. Colposcopia principal y práctica.

**Figura 6.** Genoma del virus del papiloma humano.

**Figura 7.** Relación evolutiva de los virus del papiloma humano y su clasificación.

**Figura 8** Detección por inmunohistoquímica de células positivas para proteínas fosforiladas en muestra sana y en muestras con diagnóstico de LIEBG, LIEAG y CaCu.

**Figura 9.** Detección de proteínas fosforiladas con los anticuerpos anti-fosfoserina.

**Figura 10.** Inmunoproteoma de proteínas fosforiladas en residuos de serina de muestras sanas y con diagnóstico de LIEBG, LIEAG y CaCu.

**Figura 11.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras sanas.

**Figura 12.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con LIEBG.

**Figura 13.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con CaCu.

**Figura 14.** Análisis comparativo de las fosfoproteínas en serina entre todos los grupos mediante el Diagrama de Venn.

**Figura 15.** Análisis comparativo de las fosfoproteínas en serina de los grupos de LIEBG y CaCu y las proteínas no fosforiladas del grupo sano mediante el Diagrama de Venn.

**Figura 16.** Análisis de interacciones proteína-proteína de las fosfoproteínas en serina de los grupos de LIEBG y CaCu y no fosforiladas del grupo sano.

**Figura 17.** Detección de los sitios de fosforilación en HSP27.

**Figura 18.** Detección de los sitios de fosforilación en Clusterina.

**Figura 19.** Detección de los sitios de fosforilación en Beta-Enolasa.

**Figura 20.** Patrón electroforético de proteínas totales de líneas celulares provenientes de CaCu.

**Figura 21.** Inmunodetección con los anticuerpos contra HSP27.

**Figura 22.** Inmunodetección con los anticuerpos contra HSP27 fosforilada en serina 82 (pHSP27 ser 82).

**Figura 24.** Interactoma *in silico* de HSP27.

**Figura 25.** Interacción de HSP27 con cinasas. La búsqueda de las cinasas que interaccionan con HSP27 se realizó mediante Signor 2.0.

**Figura 26.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con LIEBG y CaCu.

**Figura 27.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina exclusivas identificadas en el grupo de muestras con CaCu.

## RESUMEN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es un problema de salud mundial y en México ocupa el segundo lugar de neoplasias más frecuentes en mujeres. El CaCu procede de lesiones pre-cancerígenas que son interpretadas por la clasificación de Bethesda como lesiones Intraepiteliales de bajo grado (LIEBG) y de alto grado (LIEAG). La generación de estas lesiones es atribuida a la persistencia de la infección con el virus del papiloma humano (VPH), principalmente los considerados de alto riesgo. Los múltiples mecanismos que usa el VPH para desarrollar el CaCu no han sido descubiertos en su mayoría. Sin embargo, los mecanismos de crecimiento, inhibición de muerte celular, proliferación e invasividad entre otras, están siempre activos gracias a cinasas que fosforilan a las proteínas efectoras de estos eventos celulares. Mediante estudios de western blot en una y dos dimensiones realizado previamente en nuestro grupo de trabajo se mostró un aumento en el número de proteínas fosforiladas en residuos de serina durante la progresión de la enfermedad. En este trabajo se identificaron por espectrometría de masas las proteínas fosforiladas en residuos de serina en muestras de tejido sano, LIEBG y CaCu para tratar de conocer la relación que tienen en la progresión del CaCu. En nuestros estudios se encontraron 149 y 287 proteínas fosforiladas en residuos de serina en muestras de LIEBG y CaCu, respectivamente, evidenciando que existe una relación significativa entre el número de proteínas con esta modificación posttraduccional y el desarrollo de CaCu. Además, se identificaron 15 fosfoproteínas que están presentes en LIEBG y CaCu y que no tienen esta modificación en el grupo control (sanas). Las fosfoproteínas que aumentaron durante el desarrollo del cáncer se clasificaron en cinco eventos celulares: diferenciación celular, regulación positiva de la adhesión celular, muerte celular programada, regulación de la respuesta a estrés y regulación de la respuesta inmune. Con base en dichas clasificaciones y a partir del papel que desempeñan en otros tipos de cáncer, se eligieron dos fosfoproteínas para analizar su presencia en líneas celulares provenientes de CaCu y para futuras investigaciones acerca de su papel en la progresión del CaCu.

**Palabras clave:** Fosfoproteínas, progresión, VPH, LIEBG, CaCu, bioinformática

## **ABSTRACT**

Cervical cancer (CC) is a global health problem and in Mexico it ranks as second in the most frequent neoplasms in women. CC proceeds from pre-cancerous lesions that are interpreted by the Bethesda's classification as low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade (HSIL). The generation of these lesions is attributed to the persistence of infection with the human papillomavirus (HPV), mainly those considered of high-risk (HR). The multiple mechanisms that HPV uses to develop CC have not been discovered for the most part. However, the mechanisms of growth, inhibition of cell death, proliferation and invasiveness, among others, are always active thanks to kinases that phosphorylate the effector proteins of these cellular events. One and two-dimensional western blot studies previously carried by out in our work group showed an increase in the number of phosphorylated proteins in serine residues during the disease progression. In this work, the phosphorylated proteins in serine residues in healthy tissue samples, LSIL and CC were identified by mass spectrometry to try to discern the relationship they have in the progression of CC. In our studies were found 149 and 287 phosphorylated proteins in serine residues were found in LSIL and CC samples, respectively, showing that there is a significant relationship between the number of proteins with this posttranslational modification and the development of CC. In addition, 15 phosphoproteins were identified in LSIL and CC, but that do not have this modification in the control group (healthy). The phosphoproteins that increased during cancer development were classified into five cellular events: cell differentiation, positive regulation of cell adhesion, programmed cell death, regulation of stress response, and regulation of immune response. Based on these classifications and from the role they play in other types of cancer, two phosphoproteins were chosen to analyze their presence in cell lines from CC and for future research on its role in the progression of CC.

**Keywords:** Phosphoproteins, progression, HPV, LSIL, CC, bioinformatics

# INTRODUCCIÓN

## Cáncer

El cáncer es un amplio grupo de enfermedades diferentes entre sí, que pueden afectar a cualquier parte del organismo y que está caracterizado por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales, con capacidad de invadir los tejidos subyacentes del cuerpo y diseminarse a otros órganos (Ferlay J, 2020). Una de las características principales de las células cancerígenas es la capacidad de mantener la proliferación de manera crónica, a diferencia de las células normales, que controlan las señales de proliferación y diferenciación (Hanahan & Weinberg, 2011). (Hanahan & Weinberg, 2011). Hanahan y Weinberg (2011) postularon 10 factores distintos involucrados en el desarrollo del cáncer (**Figura 1**), los cuales constituyen un principio de organización y juntos proporcionan un marco lógico para la comprensión de las enfermedades neoplásicas (Moses, Garcia-Bloj, Harvey, & Blancafort, 2018).



**Figura 1.** Factores involucrados en el crecimiento tumoral y progresión al cáncer (Tomada y editada de Moses et al., 2018). Los números en los corchetes en la figura indican las referencias citadas por Moses et al. (2018).

De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (Chokchaichamnankit et al., 2019), el cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2020 se atribuyeron a este conjunto de enfermedades 10 millones de defunciones. Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes: Pulmonar, Hepático, Colorrectal, Gástrico y Mamario (Bray et al., 2018).

### **Factores de riesgo**

El cáncer se produce por la transformación de células normales en células tumorales en un proceso que consta de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos (de Martel, Georges, Bray, Ferlay, & Clifford, 2020):

**Carcinógenos físicos**, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes.

**Carcinógenos químicos**, como el amianto, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y el arsénico (contaminante del agua de bebida).

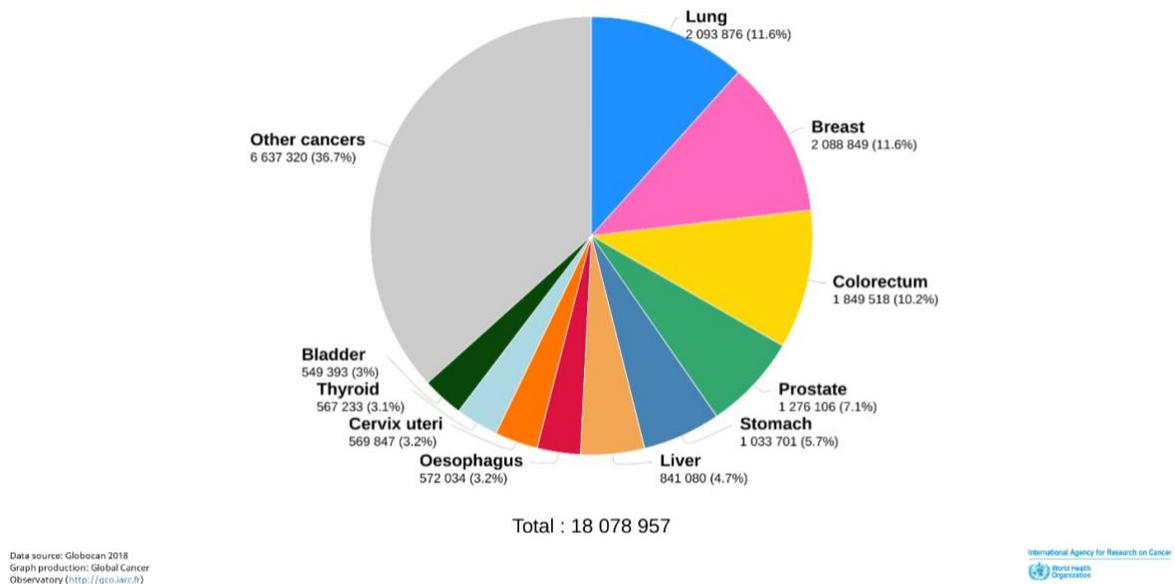
**Carcinógenos biológicos**, como determinados virus, bacterias y parásitos.

### **Cáncer en el mundo**

Actualmente, ambos sexos muestran que el cáncer de pulmón representa el 11.6% (2 093 876), mama 11.6% (2 088 849), colorrectal 10.2% (1 849 518), próstata 7.1% (1 276 106), estómago 5.7% (1 033 701), hígado 4.7% (841 080), esófago 3.2%

(572 034), Cérvico-uterino 3.2% (569 847), tiroides 3.1% (567 233), vejiga 3% (549 393) del total de incidencias respectivamente (**Figura 2**) (Ferlay J, 2020).

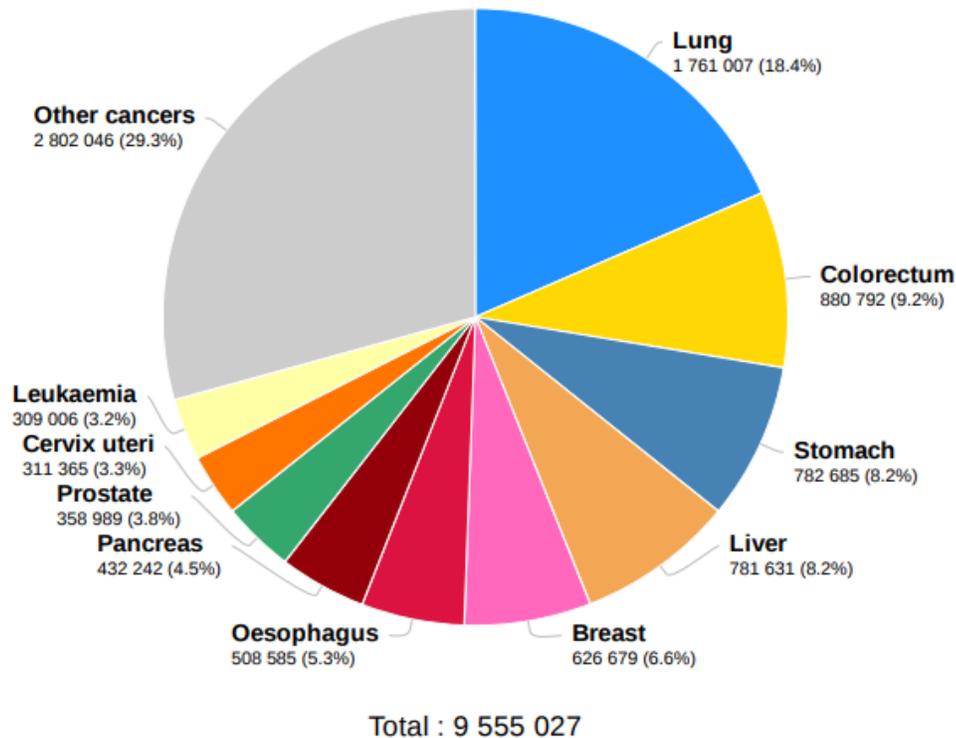
Los cánceres de pulmón, mama y colorrectal son los tres grupos más frecuentes en números de casos y en términos de mortalidad (primero, segundo y tercero, respectivamente). Juntos representan un tercio de la incidencia y mortalidad por cáncer en todo el mundo (Bray et al., 2018).



**Figura 2.** Número estimado de nuevos casos de cáncer en el mundo en 2018. Tomado y editado de [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population\\_populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=15&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0&population\\_group\\_globocan\\_id=.](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population_populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=15&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=)

En 2018, el cáncer de pulmón fue el más mortífero en todo el mundo con 1 761 007 fallecidos (18.4%); seguido por el colorrectal con 880 762 (9.2%), el de estómago con 782 685 (8.2%); el de hígado con 781 631 (8.2%); el de mama con 626 679 (6.6%), el cual ya cuenta con un pronóstico relativamente favorable, especialmente en los países con mayor desarrollo; el de esófago con 508 585 (5.3%), el de

páncreas con 432 242 (4.5%); el de próstata con 358 989 (3.8%); el Cérvico-uterino con 311 365 (3.3%) y leucemia con 309 006 (3.2%) (**Figura 3**) (Bray et al., 2018).



**Figura 3.** Número estimado de muertes por cáncer en 2018 en el mundo. Tomado y editado de [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=15&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0&population\\_group\\_globocan\\_id=](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=15&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=)

Las muertes debidas a cualquier tipo de cáncer han aumentado durante los últimos 6 años y se estima que hasta el 2018 ascendieron a 9.6 millones de personas, además de contabilizarse más de 18 millones de nuevos casos, según indica el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud. Se estima que el número total de personas en todo el mundo que están vivas después de cinco años de haberles diagnosticado cáncer es de 43.8 millones El aumento de la incidencia del cáncer se debe a varios factores, entre ellos el crecimiento y envejecimiento de la población, así como la

prevalencia cambiante de determinadas causas de cáncer vinculadas al desarrollo social y económico (Bray et al., 2018).

### Cáncer en México

La magnitud de los efectos del cáncer en México no es muy diferente al panorama mundial, siendo la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes ("Mexico,"), de acuerdo con cálculos de organismos internacionales, los cánceres de pulmón, colorrectal, próstata, mama, estómago, hígado, páncreas y cervicouterino son de los más recurrentes en la población en general, en ambos sexos (**Tablas 1 y 2**) (Bray et al., 2018). De las 756 234 defunciones registradas debidas al cáncer, el 51.07% fueron de hombres y el 48.9% mujeres. Para los hombres, los cánceres más mortales son de próstata, pulmón, colorrectal, de hígado y gástrico, en ese orden, mientras que para las mujeres son el de seno, cervicouterino, de hígado, colorrectal y de ovario (Bray et al., 2018).

**Tabla 1.** Número estimado de muertes y nuevos casos de diferentes tipos de cáncer en México en 2018\*.

Cáncer	Mortalidad	Incidencia
Pulmón	88 117 (11.7%)	97 583 (6.1%)
Colorrectal	71 750 (9.5%)	142 906 (8.9%)
Próstata	60 713 (8%)	215 434 (13.4%)
Mama	59 442 (7.9%)	227 017 (14.2%)
Estómago	57 948 (7.7%)	74 604 (4.7%)
Hígado	43 304 (5.7%)	45 665 (2.8%)
Páncreas	37 786 (5%)	40 119 (2.5%)
Cérvico uterino	32 439 (4.3%)	64 056 (4%)
Leucemia	30 692 (4.1%)	43 210 (2.7%)
BNS	24 975 (3.3%)	32 990 (2.1%)

\*Tomado y editado de [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=904&populations=904484&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statis=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=904&populations=904484&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statis=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb)

Según dos estudios mexicanos de Gómez-Dantés (2016) y colaboradores (Gómez-Dantés et al., 2016), y Aldaco-Sarvide y colaboradores (2019) (Aldaco-Sarvide et al., 2019), de los registros de las muertes por tumores malignos, esta enfermedad a nivel nacional ha tenido un aumento en los últimos 20 años, a partir de 1990, debido al crecimiento y envejecimiento poblacional. Por otra parte, dos de los tres análisis epidemiológicos encontraron que en los estados del norte se registró un incremento en la mortalidad por cáncer (Aldaco-Sarvide et al., 2019), y uno de estos dos estudios halló también un alza en el número de casos nuevos en la misma región (Moye-Holz, Dreser, van Dijk, Reijneveld, & Hogerzeil, 2020).

En contraste en las entidades periféricas a la Ciudad de México se reportó un descenso en el número de muertes del 30% (Gómez-Dantés et al., 2016).

**Tabla 2** Cánceres más comunes en población mexicana, hombres y mujeres en 2018\*.

Cánceres más comunes en mexicanos	Cánceres más comunes en mexicanas
Próstata	Mamario
Colorrectal	Tiroides
Testicular	Cervicouterino
Pulmonar	Cuerpo uterino
Gástrico	Colorrectal

\* Tomado de Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC).

### **Fosforilación en cáncer.**

Por otro lado, la investigación en cáncer relacionada con cambios por modificaciones postraduccionales (MPT) en proteínas se ha enfocado principalmente en la fosforilación, la cual participa en varios eventos celulares, como ciclo celular, crecimiento celular, proliferación, supervivencia, apoptosis, etc. (Cohen, 2001).

La fosforilación de proteínas es una MPT que regula la expresión de genes a partir de una importación nuclear y de la actividad de unión al ADN de un número significativo de factores de transcripción (Ramazi & Zahiri, 2021). La función de éstos depende de la fosforilación o desfosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina, lo que permite establecer redes de comunicación entre citoplasma y núcleo (Boulikas, 1994). El aminoácido que sufre predominantemente la fosforilación es serina, posteriormente treonina y hasta el último tirosina (Mann et al., 2002). Se sabe que por cada residuo de tirosina que se fosforila, se fosforilan 1800 residuos de serina y 200 de treonina (Mann et al., 2002).

Muchos factores de crecimiento o sus receptores con actividad de tirosina cinasa (receptor de insulina, EGFR, ENFR, entre otros), así como otras proteínas con actividad de serina/treonina o tirosina cinasa (c-Raf-1, c-Mos, c-Abl, c-Src) son codificados por los llamados oncogenes (Boulikas, 1994). Estas proteínas desencadenan cascadas de señalización que van dirigidas a proteínas nucleares ligadas al ciclo celular para la iniciación de la replicación del ADN y el crecimiento celular (Boulikas, 1994). Las mutaciones que conducen a la progresión de las células cancerígenas incluyen cambios en proteínas que potencializan las cascadas de señalización preexistentes (Irish et al., 2004).

Los cambios en la fosforilación en ciertas proteínas, por ejemplo, Anexina 1 (Robinson-Bennett et al., 2008), mTOR (Sophonnithprasert, Mahabusarakam, Nakamura, & Watanapokasin, 2017) y Akt (T. J. Kim et al., 2006), entre otras, pueden estar relacionados con la progresión del cáncer y se ha comprobado que la fosforilación en residuos de tirosina está estrechamente relacionada con la enfermedad (Rush et al., 2005). La alta ganancia de fosforilación en residuos de tirosina se puede deber a la baja abundancia de estos residuos, por lo que es un proceso más estrictamente regulado (Mann et al., 2002).

Un estudio que evidencia la importancia de la fosforilación en la progresión del cáncer se realizó en líneas celulares derivadas de carcinoma de piel escamosa,

donde en un análisis fosfoproteómico cuantitativo, se identificaron 5 839 fosfopéptidos que correspondían a 2 145 proteínas; en el 86.4% de los fosfopéptidos se detectó fosforilación en residuos de serina, mientras que 12.2 % y 1.4 % correspondieron a péptidos fosforilados en treonina y tirosina, respectivamente (Tiwari et al., 2017). Por otra parte, las proteínas sujetas a fosforilación que se identificaron participan en rutas que regulan la proliferación, migración celular y potencial invasivo (Tiwari et al., 2017).

También la fosforilación de proteínas está involucrada en la quimiorresistencia de las células cancerígenas. Por ejemplo, en un trabajo realizado en líneas celulares de cáncer de mama, mediante técnicas fosfoproteómicas se compararon células resistentes a la quimioterapia versus células sensibles (Nascimento et al., 2017). Los resultados obtenidos evidenciaron que existen cambios en los estados de fosforilación en todas las isoformas de la proteína cinasa C (PKC) en las células quimiorresistentes. Además, se encontró que esta quimiorresistencia está asociada a la activación de la cascada de señalización JAK/STAT, principalmente por la fosforilación de JAK2 (Nascimento et al., 2017). De este modo, se sugiere el uso de inhibidores de esta vía de señalización para combatir la quimiorresistencia en cáncer de mama (Nascimento et al., 2017).

### **Cáncer Cérvico-Uterino**

El Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) es una enfermedad en la que participan diferentes factores genéticos y ambientales, teniendo una diseminación con profundidad en el cuello uterino y en zonas circundantes, el CaCu es la principal neoplasia asociada a la infección con el virus del papiloma humano (VPH) (Olusola, Banerjee, Philley, & Dasgupta, 2019). El CaCu es el segundo tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de las regiones menos desarrolladas, donde se estima que en 2018 hubo unos 570 000 nuevos casos (84% de los nuevos casos mundiales) (Arbyn et al., 2020).

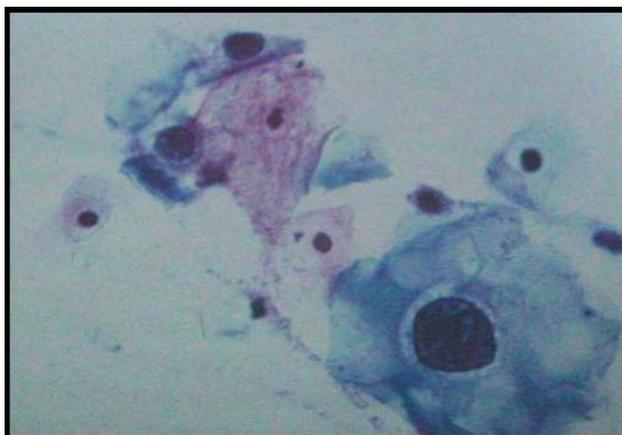
## **Factores de riesgo del CaCu.**

Existen varios factores de riesgo en la aparición del CaCu, los cuales no actúan de la misma manera en los diferentes grupos poblacionales. Entre estos factores, se destaca como el principal factor de riesgo la infección por el virus de papiloma humano (VPH) (de Martel et al., 2020), siendo el agente etiológico del CaCu. Otros factores de riesgo son: la edad al inicio de las primeras relaciones sexuales, la multiparidad, la inmunodepresión, el tabaquismo, la exposición a medicamentos hormonales como Dietilestilbestrol (DES) o Tamoxifeno (Hoover et al., 2011), el consumo prolongado de anticonceptivos orales (píldoras para la regulación de la natalidad) (Moreno et al., 2002), el uso del dispositivo intrauterino, la promiscuidad sexual, el número de compañeros sexuales y la infección por varios agentes transmisores de enfermedades sexuales, como *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, Herpes viral tipo II (HSV-2) y *Chlamydia trachomatis* (Olusola et al., 2019).

## **Clasificación de lesiones precancerosas**

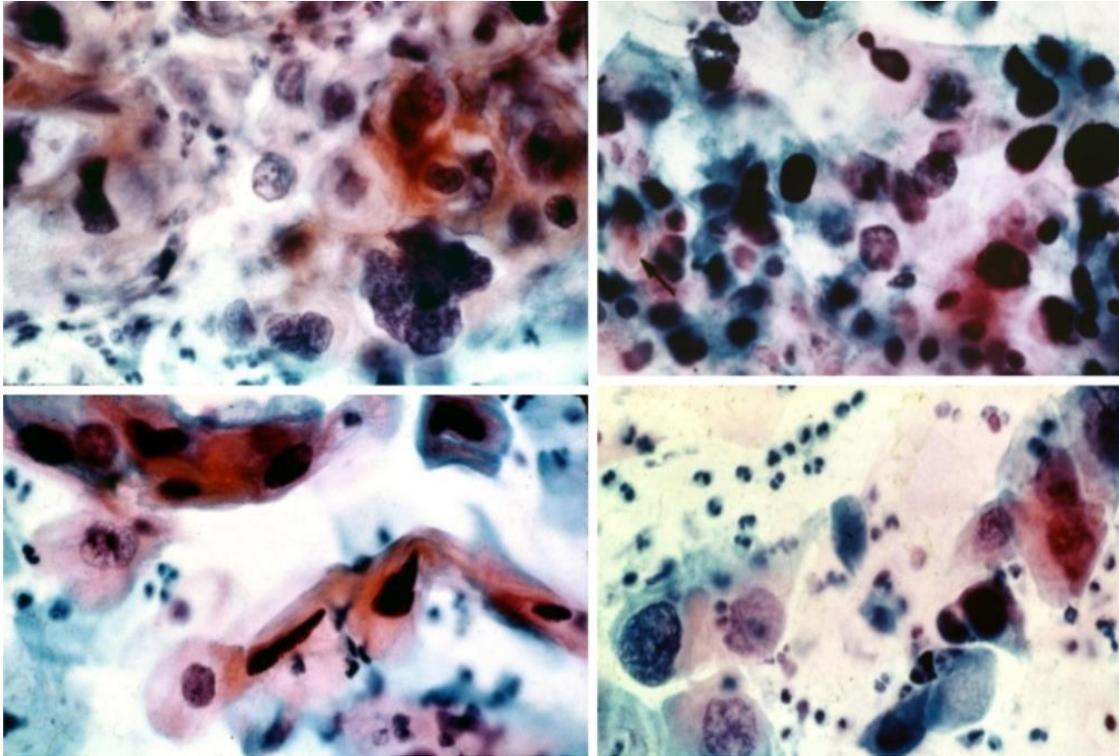
El CaCu es precedido por lesiones precursoras, las cuales son catalogadas de acuerdo con la clasificación Bethesda, que es una nomenclatura creada para incorporar los nuevos conceptos citológicos y unificar la terminología. Estas lesiones precancerosas son clasificadas como Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado (LIEBG, en inglés *LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesions*) y de Alto Grado (LIEAG, en inglés *HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesions*) (Nayar & Wilbur, 2015). Las características de cada tipo, con base en las alteraciones morfológicas en el epitelio endocervical, son las siguientes:

**LIEBG:** lesión leve, es de mínimo riesgo, representa un crecimiento celular anormal. Existe buena maduración en las células del epitelio, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas (**Figura 4**). Las cuatro capas de células indiferenciadas se encuentran en los estratos epiteliales más profundos (tercio inferior). Pueden verse algunos cambios citopáticos como consecuencia de la infección por el VPH en todo el espesor del epitelio (Nayar & Wilbur, 2015).



**Figura 4.** LIEBG. Célula coilocítica sugestiva de infección por VPH (Nayar & Wilbur, 2015).

**LIEAG:** Lesión con cambios celulares que sugieren una displasia moderada o grave, como el carcinoma *in situ*, son anomalías más graves que tienen una probabilidad mayor de que se conviertan en cáncer si no son tratadas. De alto grado significa que hay cambios más marcados en el tamaño y en la forma de las células anormales (precancerosas) y que las células se ven muy diferentes de las células normales. Cuando se examinan en un microscopio, a menudo se encuentra que las LIEAG tienen cambios más extensos que pueden clasificarse como displasia moderada o grave (**Figura 5**). El análisis microscópico de las LIEAG también puede revelar carcinoma *in situ*, en este tipo de lesión, la displasia es severa. La diferenciación y la estratificación del epitelio pueden faltar por completo o existir sólo en el cuarto superficial del mismo, con abundantes figuras mitóticas anormales (**Figura 5**) (Nayar & Wilbur, 2015; Sánchez-Anguiano, Alvarado-Esquivel, Reyes-Romero, & Carrera-Rodríguez, 2006).



**Figura 5.** LIEAG. Colposcopia principal y práctica (Nayar & Wilbur, 2015).

### **Prevención y control del CaCu**

La OMS recomienda como medidas de prevención y control del CaCu, la aplicación primaria de la vacuna a niñas de 9 a 13 años, antes de que inicien su vida sexual, para tratar de evitar la aparición de la enfermedad, esta vacuna actúa contra los subtipos de VPH 16 y 18, fuertemente asociados con el CaCu (Choi & Park, 2016). Otras medidas de prevención son la educación en materia de prácticas sexuales seguras y retrasar el inicio de la vida sexual, promover el uso de preservativos, advertir sobre el consumo de tabaco (un factor de riesgo importante para el CaCu y cualquier otro tipo de cáncer), las mujeres que tengan una vida sexual activa deben someterse a partir de los 25 años a pruebas de detección referentes para visualizar cambios anormales de las células o lesiones precancerosas intraepiteliales, o detectar el cáncer en una etapa inicial (Olusola et al., 2019).

En México se expidió la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, para la Prevención, Detección, Diagnóstico, Tratamiento, Control y Vigilancia

Epidemiológica del Cáncer Cérvico Uterino, para unificar los principios, políticas estrategias y criterios de operación relacionados con el Cáncer Cérvico-Uterino (NOM-014-SSA2-1994).

### **Pruebas de detección y diagnóstico**

Las pruebas de detección o diagnóstico presuncional de manera oportuna son la citología cervical (Papanicolaou) y la visualización directa por Ácido Acético (colposcopia) (NOM- 014-SSA2-1994). Estas pruebas que se realizan en mujeres que no tienen síntomas aparentes y de forma periódica, lo que ayuda a la detección de lesiones intraepiteliales que pueden ser tratadas para no llegar a un cáncer, o etapas iniciales del mismo, donde pudieran ser tratadas para un pronóstico de vida mejor, reduciendo la tasa de mortalidad.

La citología consiste en tomar una muestra de las células que se descaman del cuello uterino en la zona de transformación (tomada con citocepillos vaginales). Este estudio permite un examen microscópico directo de las características de las células del epitelio cervical y del canal endocervical, detectando alteraciones en las células, las cuales indican cambios malignos, como lesiones precursoras antes de que evolucionen a cáncer. Actualmente, los resultados de la citología cervical son reportados de acuerdo con la clasificación de Bethesda, la que también es mencionada en la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, la cual menciona que los resultados citológicos y patológicos con probable daño precancerígeno serán descritos como: Cambios Atípicos en las Células Escamosas del Cuello Uterino (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance "ASCUS"*), LIEBG y LIEAG.

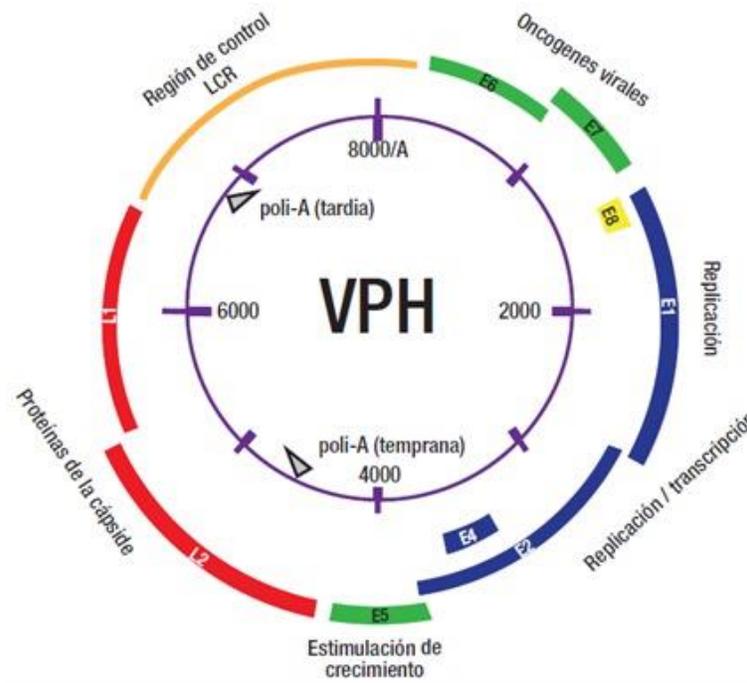
### **Citocepillos endocervicales**

En la mayoría de los estudios donde se analizan muestras de pacientes con LIEBG, LIEAG y CaCu se utilizan métodos invasivos, como son las biopsias, para la toma de muestra. Sin embargo, actualmente se utilizan los citocepillos endocervicales para la toma de la muestra como un método menos invasivo. En las muestras

obtenidas por este método se han podido analizar los cambios en los estados de fosforilación de proteínas en residuos de serina entre los diferentes grados de lesión, para relacionarlos con la progresión de la enfermedad (Padilla-Mendoza, 2017).

## Virus del Papiloma Humano

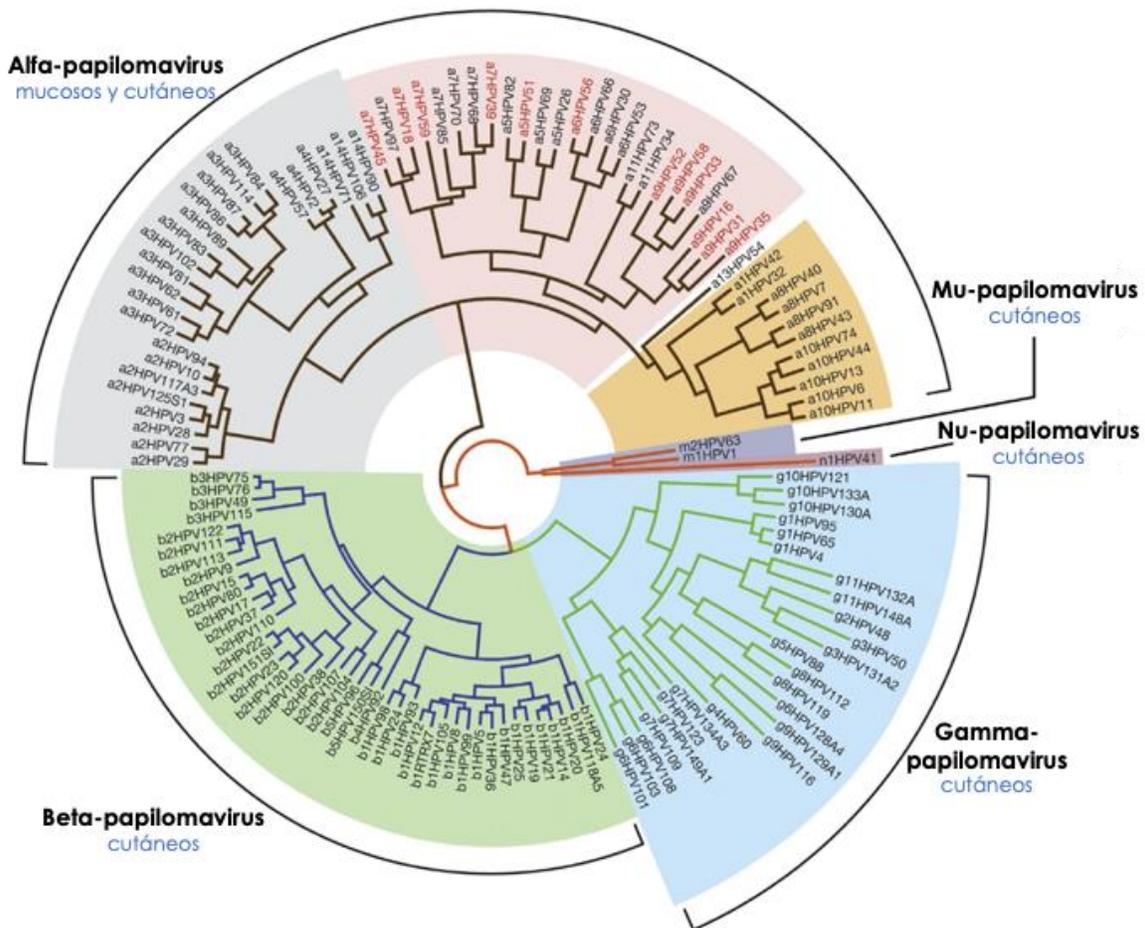
Los virus del papiloma humano (VPH) pertenecen a la familia *Papillomaviridae* (de Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & zur Hausen, 2004), son virus pequeños con un genoma de ADN de doble cadena, teniendo un tamaño de 8 000 pb, en donde se codifican entre 8 y 9 marcos de lectura abiertos (**Figura 6**), transcritos como mensajeros policistrónicos (Doorbar, Egawa, Griffin, Kranjec, & Murakami, 2015). Los llamados “genes tardíos” *L1* y *L2* (L del inglés *Late*) codifican proteínas de la cápside, mientras que los genes “tempranos”, nombrados como *E1* a *E7* (E del inglés *Early*), codifican proteínas involucradas en la replicación y transcripción dentro de las células del hospedero (Brianti, De Flammineis, & Mercuri, 2017).



**Figura 6.** Genoma del virus del papiloma humano. (Tomada de Lelo de Larrea & *et al*, 2011).

## Clasificación de los tipos de VPH

Se han identificado más de 200 tipos de papilomavirus, que se han dividido en cinco géneros, clasificados en relación con la homología que presentan en el gen *L1*, denominados por una letra del alfabeto griego como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\nu$  (**Figura 7**) (Doorbar et al., 2015). Algunos VPHs del género  $\alpha$  tienen un papel bien establecido en cáncer, infectando las mucosas de la zona orofaríngea (Brianti et al., 2017).



**Figura 7.** Relación evolutiva de los virus del papiloma humano y su clasificación. Tomada de Egewa y Doorbar, 2016.

### Tipos de VPH transmitidos sexualmente

Epidemiológicamente, los alfa-papilomavirus que presentan capacidad para infectar las mucosas del aparato genital, se han dividido en 3 grupos: uno de Bajo Riesgo (BR), que está asociado a verrugas anogenitales y LIEBG en las células cervicales; otro llamado Probable Alto Riesgo y por último el de Alto Riesgo (AR), ambos grupos

presentan un alto potencial oncogénico asociado principalmente a displasias de LIEAG y anal, y a carcinoma invasivo (Brianti et al., 2017). Más recientemente, se ha propuesto que los 12 VPHs de BR corresponden a los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108; tres VPHs de probable alto riesgo, que serían los tipos 26, 53 y 66; y 15 VPHs de AR, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 (**Tabla 3**) en donde este último conjunto está altamente relacionado a CaCu (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

**Tabla 3.** Clasificación epidemiológica de los VPH.

<b>TIPOS DE RIESGO</b>	<b>TIPOS DE VPH</b>
<b>ALTO RIESGO</b>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
<b>PROBABLE ALTO RIESGO</b>	26, 53, 66
<b>BAJO RIESGO</b>	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, CP6108

Tomada y modificada de Santos-López, et al., 2015.

## **ANTECEDENTES**

### **Análisis de proteínas fosforiladas e LIEBG, LIEAG y CaCu**

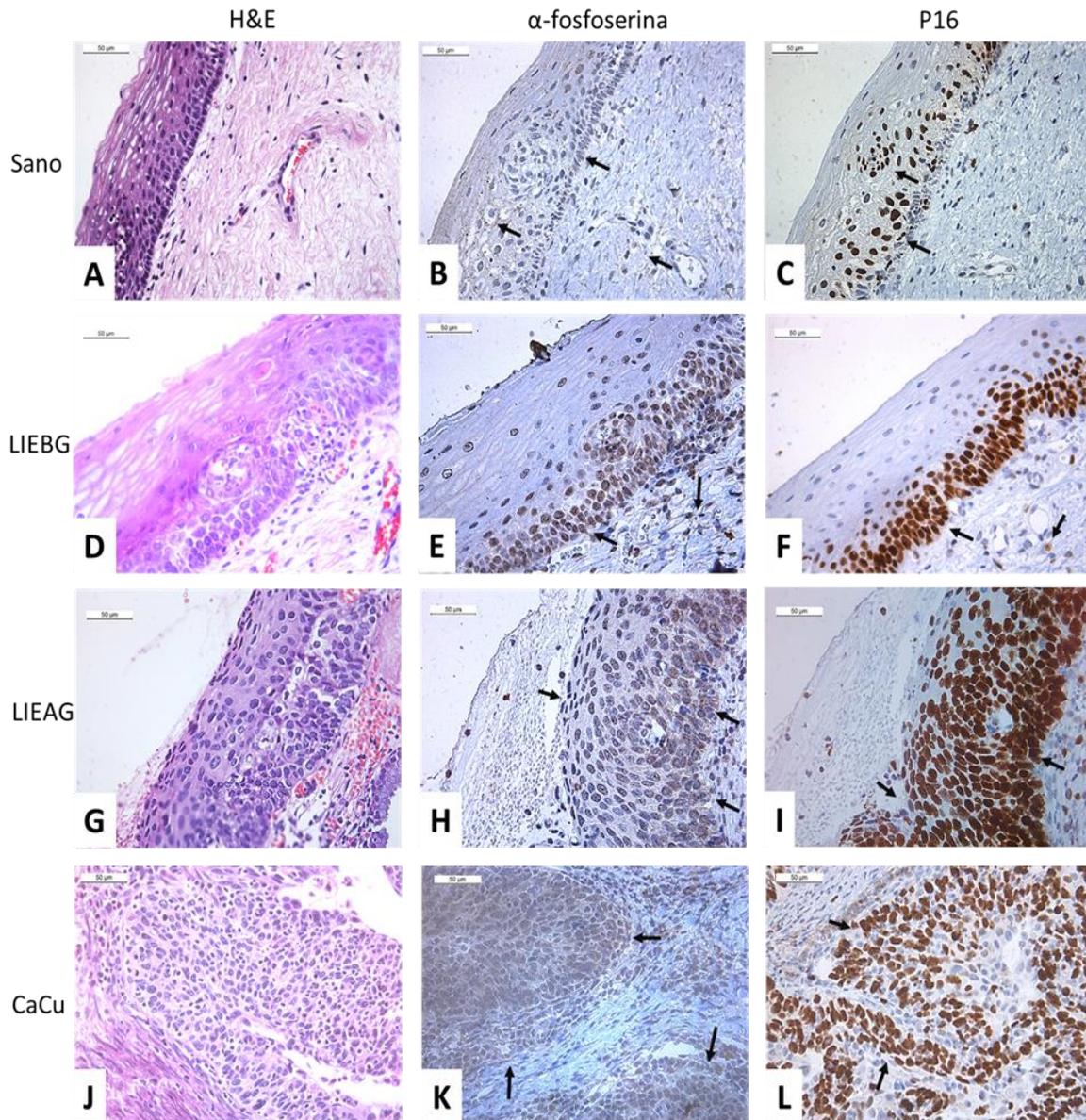
Los estudios relacionados a la expresión diferencial de proteínas fosforiladas en CaCu se han llevado a cabo previamente a través del estudio proteómico, el cual ha sido diseñado con el objeto particular de encontrar biomarcadores de fácil rastreo en las mujeres con esta enfermedad, es por ello que estos estudios se enfocan a fluidos biológicos de fácil obtención a través de estudios clínicos poco invasivos.

Cabe mencionar que la investigación de proteínas fosforiladas en CaCu sólo se ha enfocado a proteínas de vías de señalización que regulan el metabolismo y el crecimiento celular, puesto que se ha investigado la fosforilación diferencial de proteínas tales como Erk, MAPK, mTOR, IP3k, Akt y JNK, donde buena parte de estas proteínas (Erk, mTOR, Akt) se fosforilan específicamente en residuos de serina y que dichas fosforilaciones son llevadas a cabo por estímulos que activan

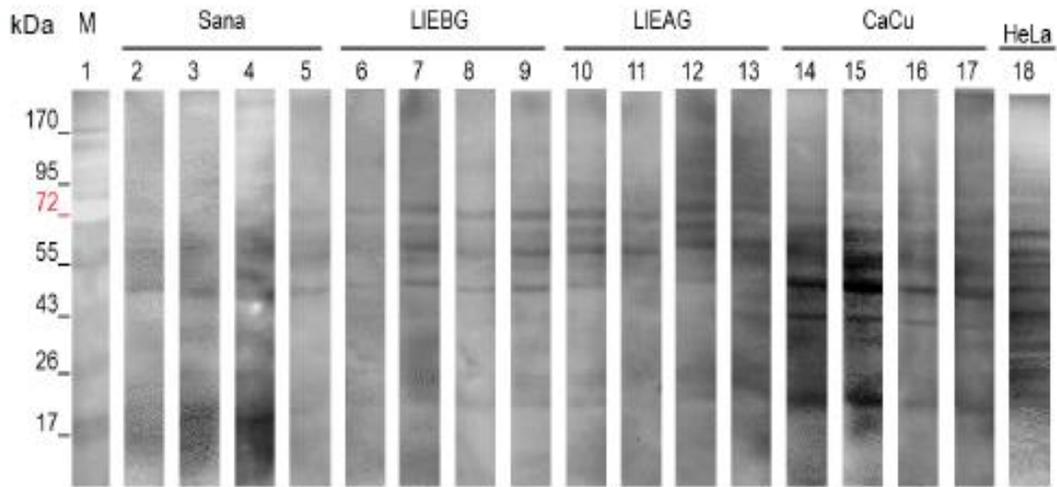
sus cascadas de señalización (Feng et al., 2016; T. J. Kim et al., 2006; Sophonnithiprasert et al., 2017; Yoo, Latifkar, Cerione, & Antonyak, 2017).

Por otra parte, se ha demostrado que los cambios en los estados de fosforilación en tirosina están desregulados en CaCu. En el 2008 se reportó un aumento en la expresión de la isoforma de 32 kDa de la proteína Anexina 1, una proteína que es fosforilada en residuos de tirosina, en muestras de pacientes con LIEAG y CaCu (Robinson-Bennett et al., 2008). El aumento en la expresión de la Anexina 1 generó un aumento en la fosforilación de la misma, desregulando las cascadas de señalización MAPK y Erk (Robinson-Bennett et al., 2008).

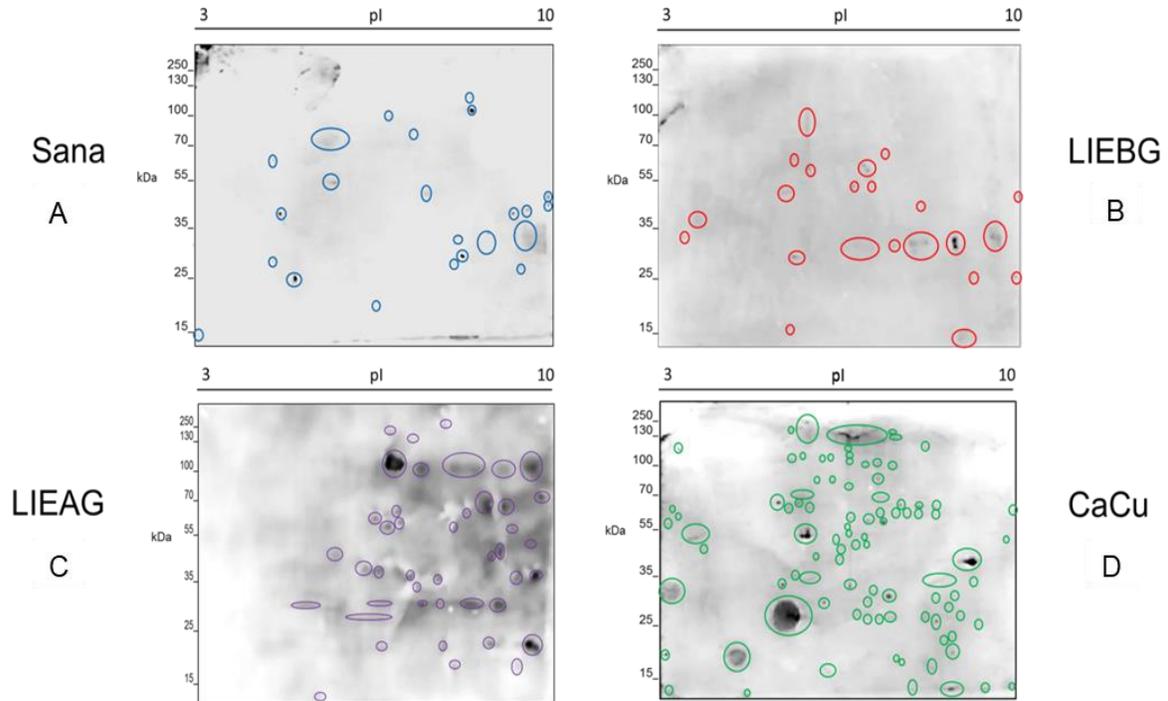
En nuestros estudios previos de maestría (Padilla-Mendoza, 2017), en ensayos de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra residuos de serina fosforilados se observó un aumento de esta MPT que correlaciona con el grado de lesión, ya que encontramos una reacción más intensa y en mayor número de células en muestras de CaCu que en LIEBG, LIEAG y muestras sanas (**Figura 8**). En concordancia, en ensayos de Western blot en geles uni- y bi-dimensionales de muestras tomadas con citocepillos de mujeres sanas y de pacientes con diagnóstico de LIEBG, LIEAG y CaCu, encontramos que el número de proteínas fosforiladas en residuos de serina aumentará conforme al grado de lesión (**Figuras 9 y 10**). En los ensayos de Western blot en geles uni-dimensionales de muestras de mujeres sanas se detectaron cuatro bandas con pesos moleculares aproximados de 72, 55, 45 y 28 kDa, observando un incremento significativo en la intensidad de esas bandas y la aparición de otras conforme aumenta el grado de lesión (**Figura 9**). Estos mismos resultados se obtuvieron en los ensayos de Western blot en geles bidimensionales, donde el número de manchas detectadas por los anticuerpos anti-fosfoserina incrementó de 22 en muestras sanas a 94 en muestras de CaCu (**Figura 10**). Sin embargo, hasta ese momento se desconocía la identidad de las proteínas fosforiladas en serina, así como el efecto de esta MPT en la progresión del CaCu.



**Figura 8** Detección por inmunohistoquímica de células positivas para proteínas fosforiladas en residuos de serina en una muestra sana y en muestras con diagnóstico de LIEBG, LIEAG y CaCu. Se observa la tinción de H&E (A, D, G, J) en muestra sana y las muestras con los diferentes grados de lesión; en B, E, H, K se observa la detección de células positivas para  $\alpha$ -fosfoserina; en C, F, I, L se observa la detección de células positivas para el marcador de proliferación celular p16 (Padilla-Mendoza, 2017).



**Figura 9.** Detección de proteínas fosforiladas con los anticuerpos anti-fosfoserina. Carril 1 M: marcador de peso molecular (kDa), Carriles 2- 5 detección de proteínas fosforiladas en residuos de serina de los extractos proteicos totales de muestras sanas; Carriles 6- 9 detección de proteínas fosforiladas en residuos de serina de los extractos proteicos totales de muestras con LIEBG; Carriles 10-13 detección de proteínas fosforiladas en residuos de serina de los extractos proteicos totales de muestras con LIEAG; Carriles 14-17 detección de proteínas fosforiladas en residuos de serina de los extractos proteicos totales de muestras con CaCu; Carril 18 detección de proteínas fosforiladas en residuos de serina de los extractos proteicos totales de células HeLa (Padilla-Mendoza, 2017).



**Figura 10.** Inmunoproteoma de proteínas fosforiladas en residuos de serina de muestras sanas y con diagnóstico de LIEBG, LIEAG y CaCu. 200  $\mu$ g de proteínas de un *pool* de muestras sanas (A) y de muestras con diagnóstico de LIEBG (B), LIEAG (C) y CaCu (D), fueron analizadas por electroforesis bi-dimensional en tiras de pI 3 a 10 de 7 cm y separadas en un gel de poliacrilamida al 12%, posteriormente electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetectadas con anticuerpos anti-fosfoserina (1:500) y quimioiluminiscencia. Las manchas inmunodetectadas se indican en círculos de color azul (sanas), rojo (LIEBG), morado (LIEAG) y verde (CaCu) (Padilla-Mendoza, 2017).

## **JUSTIFICACIÓN**

La fosforilación en proteínas es una modificación postraducciona que regula varios procesos en la célula, como crecimiento, proliferación y muerte celular, entre otros. En el cáncer, las vías de señalización en las que participa la fosforilación de proteínas se encuentran desreguladas, generando una proliferación exacerbada y una inmortalización celular. La fosforilación en residuos de tirosina ha sido muy estudiada en el desarrollo del CaCu. Por el contrario, la fosforilación de proteínas en serina o treonina no ha sido investigada en esta patología. Por lo tanto, sería importante realizar una investigación sobre los cambios de fosforilación de proteínas en residuos de serina, así como su función en la progresión del CaCu.

## **HIPÓTESIS**

Existe una fosforilación diferencial de proteínas en residuos de serina que participa en la progresión del Cáncer Cérvico-Uterino causado por infección del VPH.

## **OBJETIVOS**

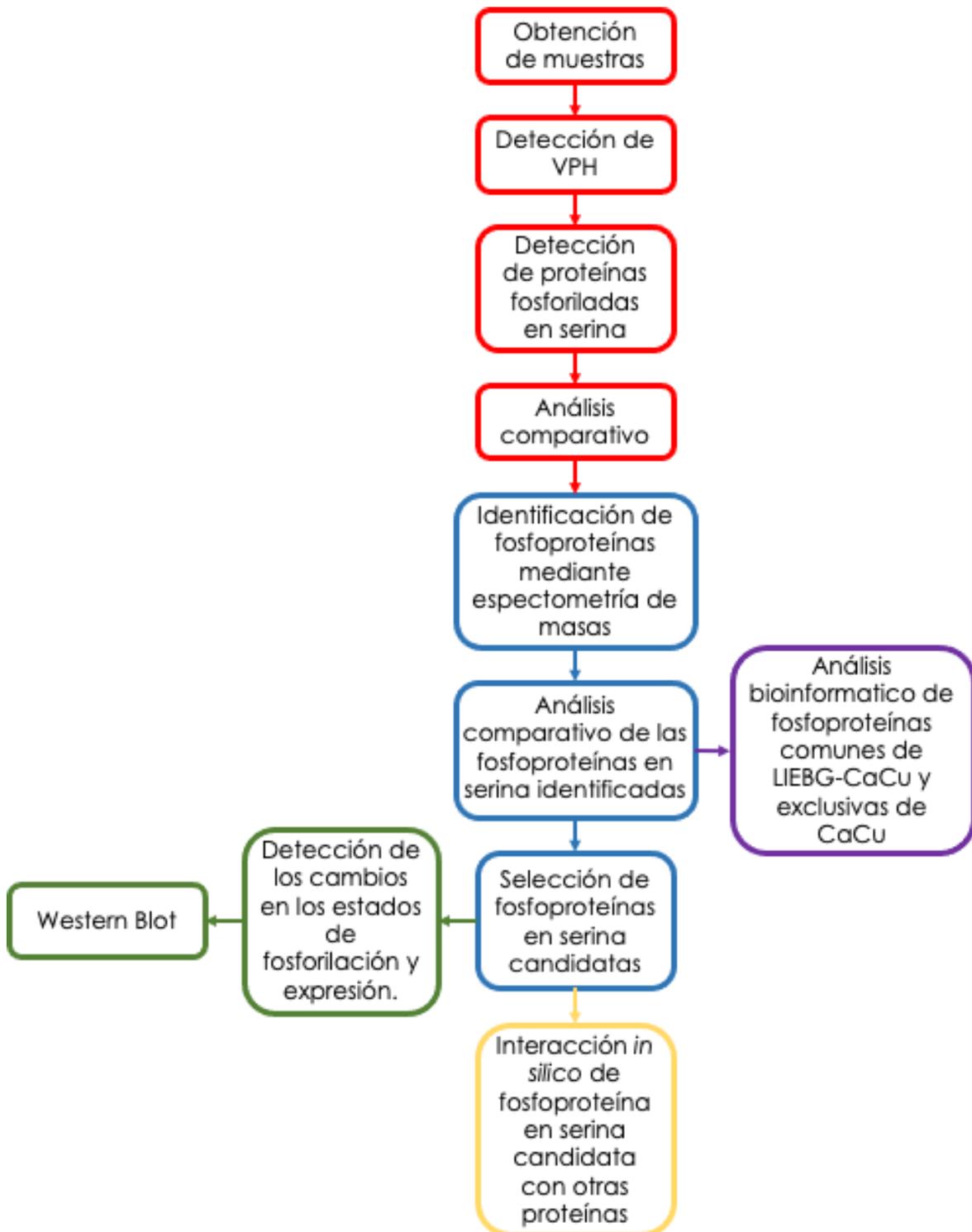
### **Objetivo general**

Identificar proteínas fosforiladas en residuos de serina y su posible participación en la progresión del Cáncer Cérvico-Uterino por infección del VPH.

### **Objetivos particulares**

- Identificar las proteínas con fosforilación en residuos de serina en muestras sanas, con LIEBG y con CaCu.
- Comparar las proteínas fosforiladas en residuos de serina en las diferentes muestras
- Analizar en líneas celulares derivadas de CaCu, los estados de fosforilación en residuos de serina de al menos una o dos de las proteínas identificadas.
- Identificar *in silico* las proteínas que interactúan con una de las fosfoproteínas seleccionadas en el objetivo anterior.
- Analizar bioinformáticamente las fosfoproteínas comunes fosforiladas en residuos de serina entre el grupo de LIEBG y CaCu, y aquellas fosfoproteínas exclusivas de CaCu.

## DIAGRAMA GENERAL DE EXPERIMENTACIÓN



## **METODOLOGÍA**

### **Criterios de inclusión y exclusión**

En este estudio se incluyeron muestras de pacientes entre 25 y 65 años, que asistieron al Hospital Juárez de México (HJM) para un estudio colposcópico rutinario y que el Departamento de Patología del HJM clasificó histopatológicamente como Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado (LIEBG) o Cáncer Cérvicouterino (CaCu), además, se tomaron muestras de mujeres sanas. Las muestras consistieron en raspados vaginales tomados, previo consentimiento informado, con un citocepillo en la región localizada de la lesión. Para ser incluidas en este estudio, las muestras se analizaron mediante la prueba PCR para la detección de infección por VPH, donde las muestras de LIEBG y CaCu debieron ser positivas y negativas para las muestras sanas; así mismo, no tener registro previo de lesiones pre cancerígenas cervicales, siendo este diagnóstico de primera vez para las muestras con lesiones y cáncer, y sin diagnóstico patológico; y no haber sido tratadas previamente estas lesiones.

Los criterios de exclusión para las muestras en el estudio fueron: ser negativas a la infección con VPH mediante la prueba de PCR en caso de las muestras con lesiones y cáncer, y positivas en muestras sanas; también, tener antecedentes de lesiones pre cancerígenas cervicales y haber sido tratadas previamente estas lesiones.

### **Cultivo de líneas celulares**

Las líneas celulares provenientes de cáncer cervical que se utilizaron son: HeLa (adenocarcinoma cervical que presenta VPH 18), SiHa (carcinoma de células epiteliales escamosas que presenta VPH 16) y C33 (carcinoma indiferenciado negativo a VPH), estas células se crecieron en cajas de 25 cm<sup>2</sup> empleando medio de cultivo DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y 1% de penicilina / estreptomicina en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y una temperatura de 37 °C.

## **Extracción de proteínas totales de las muestras**

Para la obtención de las proteínas, las muestras de tejido recuperadas mediante citocepillos y las líneas celulares se lisaron mecánicamente, posteriormente se realizó una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 20%, agregando el mismo volumen que el de la muestra. Posteriormente, se incubó durante 30 min en hielo y se centrifugó a 2 000 X g durante 5 min a 4 °C. Después, se realizaron dos lavados con 500 µl de etanol al 95% y 75%, respectivamente, se centrifugó a 2 000 X g durante 5 min a 4°C. Seguido de esto, la parte acuosa se descartó y la pastilla se dejó secar para ser resuspendida en 200 µl o más (dependiendo del tamaño de la pastilla) del amortiguador de extracción (Urea 8M, Tris 10mM, SDS 0.1% (w/v), NaCl 150 mM, 1,4-Ditiotreitol 10 mM y CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato) 2%) en presencia de inhibidores de proteasas 1X (Sigma-Aldrich, USA) y de fosfatasas 1X (Roche, USA). La concentración de proteínas se cuantificó mediante la técnica de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) y luego se realizaron alícuotas para su almacenamiento a -80°C para su posterior uso. La integridad de las proteínas se verificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %, los cuales se tiñeron con azul de Coomassie G-250, destiñéndolos con una solución de ácido acético 10%, metanol 40%.

## **Digestión de las proteínas y análisis por espectrometría de masas**

Con base en los resultados obtenidos mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-fosfoserina (Padilla-Mendoza, 2017) y con la finalidad de identificar las proteínas con esta MPT, se realizó la mezcla (“pools”) de los extractos proteicos de tres muestras de tejido con diagnóstico de LIEBG, LIEAG y CaCu, las cuales se sometieron a electroforesis, por triplicado, en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %, permitiendo que las proteínas avanzaran aproximadamente 1cm dentro del gel. Los fragmentos de gel resultantes se digirieron con tripsina siguiendo el protocolo previamente descrito (Shevchenko, Tomas, Havlis, Olsen, & Mann, 2006).

Posteriormente, se agregó  $1 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) de *Saccharomyces cerevisiae* (adhesión Uniprot: P00330) (Waters, EE. UU.) a las muestras de péptidos para obtener una concentración final de  $25 \text{ fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (estándar interno). Luego, se inyectaron  $4 \mu\text{L}$  de péptidos digeridos ( $100 \text{ fmol}$  de estándar interno) para cada muestra biológica (en triplicados técnicos) en la precolumna Symmetry C18 Trap V/M (Waters, EE. UU.):  $180 \mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$ , tamaño de poro  $100 \text{ \AA}$ , tamaño de partícula de  $5 \mu\text{m}$ , desalado, usando una fase móvil A ( $0.1\%$  ácido fórmico (FA) en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y una fase móvil B, ( $0.1\%$  FA en acetonitrilo (ACN)) bajo el gradiente isocrático seguido:  $99.9\%$  fase móvil A y  $0.1\%$  de fase B móvil a un flujo de  $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  durante  $3 \text{ min}$ . Enseguida, los péptidos se cargaron y separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters, EE. UU.):  $75 \mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$ , tamaño de poro de  $100 \text{ \AA}$ , tamaño de partícula de  $1.8 \mu\text{m}$ ; utilizando una clase UPLC ACQUITY M (Waters, EE. UU.) con las mismas fases móviles, bajo el gradiente seguido:  $0 \text{ min } 7\% \text{ B}$ ,  $121.49 \text{ min } 40\% \text{ B}$ ,  $123.15 \text{ a } 126.46 \text{ min } 85\% \text{ B}$ , y  $129 \text{ a } 130 \text{ min } 7\% \text{ B}$ , a un flujo de  $400 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$  y  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los datos de espectros se adquirieron en un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización (ESI) y separación de movilidad iónica (IMS) Synapt G2-Si (Waters, EE. UU.) operado en adquisición independiente de datos (DIA) utilizando el modo MS/MS multiplexado de alta definición (HDMSE) (Waters, EE. UU.). La página de sintonía para la fuente de ionización se estableció con los siguientes parámetros:  $2.75 \text{ kV}$  en el capilar del muestreador,  $30 \text{ V}$  en el cono de muestreo,  $30 \text{ V}$  en el desplazamiento de la fuente,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  para la temperatura de la fuente,  $0.5 \text{ Bar}$  para el gas nanoflujo y  $150 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  para el flujo de gas de purga. Se adquirieron dos cromatogramas (cromatogramas de baja y alta energía) en modo positivo en un rango de  $m/z$   $50\text{-}2000$  con un tiempo de escaneo de  $500 \text{ ms}$ . No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, mientras que para los cromatogramas de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en la transferencia utilizando una rampa de energía de colisión de  $19\text{-}55 \text{ V}$ . Synapt G2-Si se calibró con fragmentos de [Glu1]-Fibrinopéptidos, a través del ión precursor  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+} = 785.84261$  fragmentación de  $32 \text{ eV}$  con un resultado inferior a  $1.5 \text{ ppm}$  en todas las mediciones de MS/MS.

## **Análisis comparativo de proteínas fosforiladas en residuos de serina**

Los archivos \*.raw generados que contenían espectros MS y MS/MS fueron desconvolucionados, comparados, identificados (Li et al., 2009), y cuantificados usando el software Progenesis Q1 for Proteomics v4.1 (Geromanos et al., 2011) (Waters, EE. UU.) contra una base de datos de *Homo sapiens* invertido (descargado de Uniprot, 73099 secuencias de proteínas, última modificación el 27 de junio de 2018) más ADH (adhesión [P00330](#)) \*.fasta (Valentine et al., 2011). Los parámetros utilizados para la identificación de las proteínas fueron: tripsina como enzima y se permitió una escisión omitida; carbamidometilo (C) como modificación fija y oxidación (M), amidación (N-term), desamidación (N, Q), oxidación (M) y fosforilo (S, T, Y) como modificaciones variables; tolerancia predeterminada al péptido y al fragmento (distribución normal máxima de 10 ppm y 20 ppm, respectivamente); y tasa de descubrimiento falso  $\leq 4\%$ . Las respuestas promedio de señal de espectrometría de masas (EM) de la proteína de los tres péptidos más intensos (Hi3) se utilizaron para la cuantificación absoluta de acuerdo con el método descrito por Silva et al. (Silva, Gorenstein, Li, Vissers, & Geromanos, 2006). Los resultados generados a partir del software Progenesis se exportaron a archivos \*.csv para el siguiente análisis.

Posteriormente, se analizaron los péptidos identificados por espectrometría de masas para la MPT reconocida. A continuación, se seleccionaron todos los péptidos fosforilados en residuos de serina en cada grupo y se reconocieron las proteínas correspondientes a estos péptidos fosforilados. Además, utilizamos el software Uniprot (<https://www.uniprot.org>) y Phosphosite Plus (<http://phosphosite.org>) para confirmar si los sitios de fosforilación coinciden con los sitios detectados por la espectrometría de masas (EM) y, posteriormente, buscamos la función celular de cada proteína. Después, comparamos las proteínas fosforiladas de serina de todos los grupos para detectar fosfoproteínas que coincidieron o no entre los grupos, principalmente aquellas fosfoproteínas identificadas en LIEBG y CaCu, pero que no están fosforiladas en el grupo de tejido sano.

## **Inmunodetección de fosfoproteínas**

Después de verificar la integridad de las proteínas, se realizó la separación por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. Al término del corrimiento electroforético, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (0.22 micras) a 200 mA durante 30 min y a 300 mA por 1 h, de manera consecutiva. Posteriormente, la electrotransferencia de las proteínas se verificó tiñendo las membranas con rojo de Ponceau 1% (p/v), luego se destiñeron con TBS 1X (NaCl 0.75M, Tris 0.25M) y los sitios de unión inespecífica a las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (BSA 1% en TBS 1X) durante toda la noche con agitación constante a 4 °C. Al término del bloqueo, se realizaron cinco lavados con TBS 1X durante 10 min cada uno. Después de los lavados, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y agitación constante con los anticuerpos primarios de cabra-anti HSP27 (Santa Cruz Biothechnologies, USA) diluido en TBS 1X y leche semidescremada 2% y de ratón-anti pHSP27 Ser82 (Thermoscientific, USA) diluido en TBS 1X y BSA 0.5%, los cuales reconocen a la proteína HSP27 total y fosforilada en el residuo serina 82, respectivamente. Posteriormente, se realizaron cinco lavados con TBS 1X durante 10 min cada uno. Al término de los lavados, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti-ratón o anti-cabra) acoplados a peroxidasa durante 2 h a temperatura ambiente con agitación constante. Al término de la incubación se realizaron cinco lavados con TBS 1X durante 10 min cada uno. Las bandas de reconocimiento antígeno-anticuerpo se revelaron mediante quimioluminiscencia (ECL) utilizando el protocolo recomendado por el fabricante (Amersham, USA) y se visualizaron utilizando el equipo Microchemi (DNR Bio-imaging Systems).

## **Análisis bioinformático de proteínas fosforiladas en residuos de serina**

Se analizaron bioinformáticamente las fosfoproteínas en serina de cada grupo, para identificar la anotación de función, mediante el Sistema de Clasificación PANTHER (<http://pantherdb.org>).

## RESULTADOS

### Muestras analizadas

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron obtenidas del Hospital Juárez de México (HJM) y clasificadas histopatológicamente por el servicio de Patología del mismo hospital. De acuerdo con su diagnóstico patológico, se obtuvieron inicialmente 13 muestras sanas, 30 muestras con LIEBG y 15 muestras con CaCu. Para la identificación de las proteínas fosforiladas en residuos de serina en todos los grupos mediante espectrometría de masas se usaron 10 muestras sanas, 19 muestras con LIEBG y 7 muestras con CaCu. Debido a que la obtención de las muestras de pacientes con LIEAG fue temporalmente nulo al momento de realizar la identificación de proteínas fosforiladas, no fueron incluidos en el análisis.

### Identificación de proteínas fosforiladas en residuos de serina

Basados en los resultados obtenidos en la maestría sobre los cambios en los estados de fosforilación cuando comparamos los grupos por tres técnicas diferentes (Inmunohistoquímica e inmunodetección en 1D y 2D) se decidió realizar la identificación de estas proteínas fosforiladas de todos los grupos. El análisis de identificación de proteínas se realizó mediante LC-ESI-HDMSE (*Liquid Chromatography- Electrospray Ionization- High Definition Mass Spectrometry*) obteniendo en las muestras sanas 2 767 péptidos totales que corresponden a 214 proteínas (**Tabla 4**). A partir de un análisis manual exhaustivo de los péptidos obtenidos, se detectó que 84 de ellos se encontraban fosforilados, de los cuales 42 presentaban esta modificación en residuos de serina y que corresponden a 30 fosfoproteínas (**Tabla 4**). Por parte de las muestras con LIEBG se identificaron 8 303 péptidos correspondientes a 733 proteínas, además se detectaron 512 péptidos fosforilados, donde 243 estaban fosforilados en residuos de serina y pertenecían a 152 proteínas (**Tabla 4**). Por otra parte, en CaCu se detectaron 14 804 péptidos de 987 proteínas, donde se encontraron 933 péptidos fosforilados, 507 de los cuales estaban fosforilados en residuos de serina y que corresponden a 289 fosfoproteínas (**Tabla 4**).

Todas las proteínas fosforiladas en serina analizadas manualmente en cada grupo se encuentran en las **Tablas 5, 6 y 7**.

**Tabla 4.** Número total de proteínas fosforiladas de serina identificadas por análisis LC-ESI-HDMSE.

Grupo	Total de péptidos	Total de proteínas	Total péptidos fosforilados	Péptidos Fosforilados en serina	Proteínas fosforiladas en serina
Control	2,767	214	84	42	30
LIEBG	8,303	733	512	243	152
CaCu	14,804	987	933	507	289

**Tabla 5.** Total de proteínas fosforiladas en serina identificadas en el grupo de muestras Sanas.

NCBI-IP	Fosfoproteínas en serina Sanas
<b>P51587</b>	Proteína susceptible a cáncer de mama tipo 2
<b>Q02224</b>	Proteína E asociada al centrómero
<b>Q96A33</b>	Proteína que contiene el dominio en espiral 47
<b>P01024</b>	C3 del complemento
<b>Q96BY6</b>	Dedicador de proteína de citocinesis 10
<b>Q96M86</b>	Proteína 1 que contiene dominio de cadena pesada de dineína
<b>Q08380</b>	Proteína de unión a galectina-3
<b>P69905</b>	Subunidad alfa de hemoglobina
<b>Q9Y6R7</b>	Proteína de unión a IgGFc
<b>Q03001</b>	Isoforma 2 de distonina
<b>Q8NF91</b>	Isoforma 2 de Nesprina-1
<b>Q86VF2-5</b>	Isoforma 5 de la proteína 1 que contiene el dominio de tipo inmunoglobulina y fibronectina tipo III

<b>P13646</b>	Queratina_ tipo I citoesqueleto 13
<b>Q7Z794</b>	Queratina_ tipo II citoesqueleto 1b
<b>P35908</b>	Queratina_ tipo II citoesqueleto 2 epidérmico
<b>P13647</b>	Queratina_ tipo II citoesqueleto 5
<b>Q8N1N4</b>	Queratina_ tipo II citoesqueleto 78
<b>O60282</b>	Proteína similar a la cinesina (fragmento)
<b>Q96Q89</b>	Proteína similar a la cinesina KIF20B
<b>Q8IWI9</b>	Proteína asociada al gen MAX
<b>H0Y390</b>	Factor de reticulación de microtúbulos-actina 1_ isoformas 1/2/3/5 (fragmento)
<b>Q86W24</b>	Dominios NACHT_ LRR y PYD que contienen proteína 14
<b>P01833</b>	Receptor de inmunoglobulina polimérico
<b>Q6S8J3</b>	Miembro de la familia del dominio ankyrin POTE E
<b>Q15652</b>	Probable proteína de desmetilación de histonas que contiene el dominio JmjC 2C
<b>P52565</b>	Inhibidor 1 de la disociación Rho GDP (fragmento)
<b>Q9NZJ4</b>	Sacsin OS = Homo sapiens
<b>Q8IWY7</b>	Tau-tubulina quinasa 2
<b>Q5TIE3</b>	Proteína 5B1 que contiene el dominio del factor A de von Willebrand (Fragmento)
<b>Q68DK2</b>	Proteína 26 que contiene el dominio FYVE de dedo de zinc

**Tabla 6.** Total de proteínas fosforiladas en serina identificadas en el grupo de muestras con LIEBG.

<b>NCBI-IP</b>	<b>Fosfoproteínas en serina LIEBG</b>
Q15118	[Piruvato deshidrogenasa (de transferencia de acetilo)] cinasa isoenzima 1_ mitocondrial
Q4KWH8	1-fosfatidilinositol 4_5-bisfosfato fosfodiesterasa eta-1

Q9C0C2	Proteína de unión a tanquirasa-1 de 182 kDa
Q99996	Proteína de anclaje a-cinasa 9
Q01518	Proteína 1 asociada a adenilil ciclasa
P01023	Alfa-2-macroglobulina
A8K2U0	Proteína 1 similar a la alfa-2-macroglobulina
P12814	Alfa-actinina-1
Q8N7X0	Androglobina
Q01484	Anquirina 2
Q12955	Anquirina 3
P50995	Anexina A11
P08758	Anexina A5
P04114	Apolipoproteína B-100
Q8WZ64	Arf-GAP con dominio Rho-GAP_ repetición ANK y proteína 2 que contiene dominio PH
H0YH81	Subunidad beta de ATP sintasa (fragmento)
P13929	Beta-enolasa
Q8TDL5	Miembro 1 de la familia B que contiene pliegues de BPI
Q9UBG0	Receptor de manosa tipo C 2
Q8N3K9	Proteína 5 asociada a miocardiopatía
O00311	Proteína quinasa relacionada con el ciclo 7 de división celular
Q7Z7A1	Centriolina
P49454	Proteína Centrómero F
O15078	Proteína centrosomal de 290 kDa
Q00610	Cadena pesada de clatrina 1
O75122	Proteína 2 asociada a CLIP
P10909	Clusterina
P35606	Subunidad beta de coatómero '
A8TX70	Cadena de colágeno alfa-5 (VI)
P01024	Complemento C3

P0C0L5	Complemento C4-B
Q8NEM8	Carboxipeptidasa citosólica 3
Q96BY6	Dedicador de proteína de citocinesis 10
Q5KSL6	Diacilglicerol quinasa kappa
P27487	Dipeptidil peptidasa 4
Q8TDM6	Discos grande homólogo 5
O60673	Subunidad catalítica de ADN polimerasa zeta
O75165	Miembro de subfamilia C homólogo de DnaJ 13
Q9P2D7	Dyneína cadena pesada 1_ axonemal
Q8IVF4	Dyneína cadena pesada 10_ axonemal
Q8TD57	Dyneína cadena pesada 3_ axonemal
Q9C0G6	Dyneína cadena pesada 6_ axonemal
Q8WXX0	Dyneína cadena pesada 7_ axonemal
Q63HN8	E3 ubiquitina-proteína ligasa RNF213
Q5T4S7	E3 ubiquitina-proteína ligasa UBR4
E7EMW7	E3 ubiquitina-proteína ligasa UBR5
P11021	Retículo endoplásmico chaperón BiP
P02675	Cadena beta de fibrinógeno
P02679	Cadena gamma de fibrinógeno
P02751	Fibronectina
B1AHL2	Fibulina-1
O75369	Filamina-B
Q08380	Proteína de unión a galectina-3
P11413	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa
Q13439	Golgin subfamilia A miembro 4
Q14789	Golgin subfamilia B miembro 1
A0A1W2PNH8	GPI etanolamina fosfato transferasa 1
Q8IWJ2	GRIP y proteína 2 que contiene el dominio en espiral
P0DMV8	Proteína 1A de 70 kDa de choque térmico

P04792	Proteína de choque térmico beta-1
Q9Y4B4	Helicasa ARIP4
P69905	Subunidad alfa de hemoglobina
Q93079	Histona H2B tipo 1-H
Q03164	Histona-lisina N-metiltransferasa 2A
Q9Y6R7	Proteína de unión a IgGfc
P01857	Constante pesada de inmunoglobulina gamma 1
P01859	Constante pesada de inmunoglobulina gamma 2
P01860	Constante pesada de inmunoglobulina gamma 3
P01871	Inmunoglobulina pesada constante mu
A0A0B4J2B5	Inmunoglobulina pesada variable 3 / OR16-9 (no funcional) (Fragmento)
P01834	Constante de inmunoglobulina kappa
P01593	Inmunoglobulina kappa variable 1-33
P11215	Integrina alfa-M
Q03001-8	Isoforma 2 de distonina
Q03001-9	Isoforma 4 de distonina
Q99456	Queratina_ tipo I citoesquelético 12
P13646	Queratina_ tipo I citoesquelético 13
P19012	Queratina_ tipo I citoesquelético 15
P08727	Queratina_ tipo I citoesquelético 19
P35900	Queratina_ tipo I citoesquelético 20
P04264	Queratina_ tipo II citoesquelético 1
Q7Z794	Queratina_ tipo II citoesquelético 1b
P35908	Queratina_ tipo II citoesquelético 2 epidérmico
P19013	Queratina_ tipo II citoesquelético 4
P13647	Queratina_ tipo II citoesquelético 5
P02538	Queratina_ tipo II citoesquelético 6A
Q14CN4	Queratina_ tipo II citoesquelético 72

Q8N1N4	Queratina_ tipo II citoesquelético 78
P09960	Leucotrieno A-4 hidrolasa
P50851	Proteína de anclaje de tipo beige y sensible a los lipopolisacáridos
Q8NHM5	Desmetilasa 2B específica de lisina
P14780	Matriz metaloproteínasa-9
P54296	Myomesin-2
Q15746	Cinasa de cadena ligera de miosina_ músculo liso
P35749	Miosina-11
Q9Y5S8	NADPH oxidasa 1
Q9Y2A7	Proteína 1 asociada a Nck
H0Y786	Nebulina (fragmento)
Q96TA1	Proteína 1 similar a Niban
Q8N4C6	Ninein
Q14980	Proteína 1 del aparato mitótico nuclear
Q6UX06	Olfactomedin-4
Q9GZU2	Proteína del gen 3 expresada paternalmente
O60437	Periplakin
P16885	Fosfoinositido fosfolipasa C
Q6P1J6	Fosfolipasa B1_ asociada a membrana (fragmento)
P05154	Inhibidor de la serina proteasa plasmática
P13797	Plastina-3
Q15149	Plectina
Q4VXU2	Tipo de proteína 1 de unión a poliadenilato
P01833	Receptor de inmunoglobulina polimérico
Q6S8J3	Miembro de la familia del dominio ankyrin POTE E
Q13029	Proteína 2 del dedo de zinc del dominio PR
P02545	Prelamina-A / C
Q9HAH7	Probable fibrosina-1
H7BZJ3	Proteína disulfuro-isomerasa A3 (Fragmento)

P30101	Proteína disulfuro-isomerasa A3
A0A087X2A7	Proteína FAM184A
Q9Y6V0	Piccolo de proteína
Q8WVV4	Proteína POF1B
A0A1B0GUS7	Proteína unc-13 homólogo B
Q8TDW7	Protocadherina Grasa 3
Q8TDY2	Proteína 1 en espiral inducible por RB1
D6RA03	Regulación de la proteína 2 de la exocitosis de la membrana sináptica
Q8IUC4	Rhofilina 2
P31350	Subunidad M2 de ribonucleósido-difosfato reductasa
Q9Y265	Helicasa tipo RuvB
Q9NZJ4	Sacsina
O95171	Scielina
Q9GZR1	Proteasa 6 específica de Sentrina
Q13535	Serina / treonina-proteína quinasa ATR
P02768	Albúmina de suero
Q13813	Espectrina cadena alfa_ no eritrocítica 1
P11277	Espectrina cadena beta_ eritrocítica
Q01082	Cadena beta de espectrina_ no eritrocítica 1
Q15772	Proteína quinasa expresada preferentemente en el músculo estriado
Q9Y4G6	Talina-2
P49815	Tuberina
B5MCY1	Proteína 15 que contiene el dominio Tudor
O94832	Id de miosina no convencional
B2RTY4	Miosina-IXa no convencional
Q13459	Miosina-IXb no convencional
Q9HD67	Miosina-X no convencional

P46939	Utrofina
Q7Z7G8	Proteína 13B asociada a la clasificación de proteínas vacuolares
Q5THJ4	Proteína 13D asociada a la clasificación de proteínas vacuolares
Q68DQ2	Proteína de anclaje de A-quinasa muy grande
P02774	Proteína de unión a vitamina D
A3KMH1	Proteína 8 que contiene el dominio del factor A de von Willebrand
Q8WY21	Receptor SorCS1 que contiene el dominio VPS10
Q6ZS81	Proteína 4 que contiene la repetición WD y el dominio FYVE
A4UGR9	Proteína 2 que contiene repetición de unión a actina Xin

**Tabla 7.** Total de proteínas fosforiladas en serina identificadas en el grupo de muestras con CaCu.

NCBI-IP	Fosfoproteínas en serina CaCu
Q00722	1-fosfatidilinositol 4_5-bisfosfato fosfodiesterasa beta-2
Q12802	Proteína de anclaje a-cinasa 13
Q13023	Proteína de anclaje a-cinasa 6
Q99996	Proteína de anclaje a-cinasa 9
P68032	Actina_ músculo cardíaco alfa 1
P60709	Actina_ citoplásmica 1
Q01518	Proteína 1 asociada a adenilil ciclasa
P01011	Alfa-1-anticimotripsina
P01023	Alfa-2-macroglobulina
O43707	Alfa-actinina-4
P06733	Alfa enolasa
P15144	Aminopeptidasa N
P01019	Angiotensinógeno
Q8N283	Proteína que contiene el dominio de repetición de anquirina 35
I6L894	Anquirina-2

Q12955	Anquirina-3
P50995	Anexina A11
P12429	Anexina A3
P04114	Apolipoproteína B-100
P06576	ATP sintasa subunidad beta_ mitocondrial
Q8IZY2	Miembro de la subfamilia A del casete de unión a ATP 7
A0A0D9SF53	ARN helicasa DDX3X dependiente de ATP
Q6PL18	Proteína 2 que contiene el dominio AAA de la familia de ATPasa
Q96QE3	Proteína 5 que contiene el dominio AAA de la familia ATPasa
E9PK91	Factor de transcripción 1 asociado a Bcl-2
P13929	Beta-enolasa
Q86Z14	Beta-klotho
P54132	Proteína del síndrome de Bloom
A0A0G2JJ84	Proteína 2 similar a la butirofilina
P00915	Anhidrasa carbónica 1
Q9UKL3	Proteína 2 asociada a CASP8
Q9BXL7	Proteína 11 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa
P08311	Catepsina G
P11717	Receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes
B7WPN9	ATPasa transportadora de cationes
Q9NXG0	Centleina
Q7Z7A1	Centriolina
Q02224	Proteína E asociada a centrómeros
Q66GS9	Proteína centrosomal de 135 kDa
H0Y2V6	Proteína centrosomal de 170 kDa (fragmento)
O15078	Proteína centrosomal de 290 kDa
Q5VT06	Proteína 350 asociada al centrosoma
P00450	Ceruloplasmina
Q8TDX6	Condroitín sulfato N-acetilgalactosaminiltransferasa 1

O14578	Citron Rho-cinasa que interactúa
P10909	Clusterina
Q92187	CMP-N-acetilneuraminato-poli-alfa-2_8-sialiltransferasa
P35606	Subunidad beta de coatómero '
P23528	Cofilina-1
Q6TFL3	Proteína 171 que contiene el dominio en espiral
E9PFB9	Proteína 18 que contiene el dominio en espiral
Q9Y3X0	Proteína 9 que contiene el dominio en espiral
Q99715	Cadena de colágeno alfa-1 (XII)
P08123	Cadena de colágeno alfa-2 (I)
P12111	Cadena de colágeno alfa-3 (VI)
A8TX70	Cadena de colágeno alfa-5 (VI)
A6NMZ7	Cadena de colágeno alfa-6 (VI)
K4DI93	Cullin 4B_ isoforma CRA_e
Q14004	Cinasa 13 dependiente de ciclina
Q96BY6	Dedicador de proteína de citocinesis 10
Q9H7D0	Dedicador de la proteína de citocinesis 5
Q96HP0	Dedicador de la proteína de citocinesis 6
Q96N67	Dedicador de la proteína de citocinesis 7
Q9UGM3	Suprimida en tumores cerebrales malignos 1 proteína
Q5VZ89	Proteína 4C que contiene el dominio DENN
Q9Y3Z3	Desoxinucleósido trifosfato trifosfohidrolasa SAMHD1
P32926	Desmogleína-3
P15924	Desmoplaquina
Q07864	ADN polimerasa epsilon subunidad catalítica A
P54098	Subunidad gamma-1 de la ADN polimerasa
O60673	Subunidad catalítica de ADN polimerasa zeta
Q02880	ADN topoisomerasa 2-beta
Q2KHR2	Proteína de unión al ADN RFX7

Q9UJU6	Proteína similar a Drebrina
Q9P2D7	Dyneína cadena pesada 1_ axonemal
Q8IVF4	Dyneína cadena pesada 10_ axonemal
Q9UFH2	Dyneína cadena pesada 17_ axonemal
Q8TD57	Dyneína cadena pesada 3_ axonemal
Q9C0G6	Dyneína cadena pesada 6_ axonemal
Q8WXX0	Dyneína cadena pesada 7_ axonemal
Q9NYC9	Dyneína cadena pesada 9_ axonemal
Q96M86	Proteína 1 que contiene dominio de cadena pesada de dineína
P11532	Distrofina
O75592	E3 ubiquitina-proteína ligasa MYCBP2
Q9NS91	E3 ubiquitina-proteína ligasa RAD18
Q63HN8	E3 ubiquitina-proteína ligasa RNF213
Q149N8	E3 ubiquitina-proteína ligasa SHPRH
Q9HCE0	Homólogo de proteína 5 de gránulos ectópicos P
P29692	Factor de alargamiento 1-delta
P13639	Factor de alargamiento 2
Q9UI08	Proteína similar a Ena / VASP
P11021	Retículo endoplásmico chaperón BiP
Q008S8	Secuencia de transformación de células epiteliales 2 similar a un oncogén
Q7L775	Proteína 1 que interactúa con EPM2A
O00418	Cinasa del factor 2 de elongación eucariota
P52907	Subunidad alfa-1 de la proteína que capsula F-actina
P02675	Cadena beta de fibrinógeno
P02679	Cadena gamma de fibrinógeno
Q86WI1	Fibrocistina-L
P02751	Fibronectina
P23142	Fibulina-1

P21333	Filamina-A
O75369	Filamina-B
Q08380	Proteína de unión a galectina-3
P06396	Gelesolina
Q9C0E4	Proteína 2 que interactúa con el receptor de glutamato
Q13439	Golgin subfamilia A miembro 4
Q14789	Golgin subfamilia B miembro 1
Q8IWJ2	GRIP y proteína 2 que contiene el dominio en espiral
Q4V328	Proteína 1 asociada a GRIP1
Q86WZ0	HEAT proteína que contiene repeticiones 4
P04792	Proteína de choque térmico beta-1
Q9NRZ9	Helicasa_ isoforma_ linfoide específica CRA_d
Q14527	Factor de transcripción similar a la helicasa
Q9Y663	Heparán sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferasa 3A1
P22626	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A2 / B1
Q92794	Histona acetiltransferasa KAT6A
Q9BYW2	Histona-lisina N-metiltransferasa SETD2
Q96L73	Histona-lisina N-metiltransferasa_ H3 lisina-36 y H4 lisina-20
O14529	Proteína Homeobox cortada como 2
Q9Y6R7	Proteína de unión a IgG <sub>Fc</sub>
P01880	Delta constante pesada de inmunoglobulina
P01860	Constante pesada de inmunoglobulina gamma 3
P01861	Constante pesada de inmunoglobulina gamma 4
P01619	Inmunoglobulina kappa variable 3-20
P0DOY2	Inmunoglobulina lambda constante 2
Q6P0N6	Isoforma 2 de distonina
H7BZL6	Isoforma 2 de la proteína 2 que interactúa con la vaina fibrosa
Q8NF91-2	Isoforma 2 de Nesprina-1
Q03001-3	Isoforma 3 de distonina

Q53TS8-4	Isoforma 4 de la proteína 6 que contiene el dominio dependiente del calcio C2
Q86VF2	Isoforma 5 de la proteína 1 que contiene el dominio de tipo inmunoglobulina y fibronectina tipo III
Q5VZ66	Janus quinasa y proteína 3 que interactúa con los microtúbulos
Q3ZCT8	Repetición de Kelch y proteína que contiene el dominio BTB 12
P13645	Queratina_ tipo I citoesqueleto 10
P13646	Queratina_ tipo I citoesqueleto 13
P02533	Queratina_ tipo I citoesqueleto 14
P19012	Queratina_ tipo I citoesqueleto 15
P08779	Queratina_ tipo I citoesqueleto 16
P08727	Queratina_ tipo I citoesqueleto 19
Q7Z3Z0	Queratina_ tipo I citoesqueleto 25
P04264	Queratina_ tipo II citoesqueleto 1
Q7Z794	Queratina_ tipo II citoesqueleto 1b
P35908	Queratina_ tipo II citoesqueleto 2 epidérmico
Q01546	Queratina_ tipo II citoesqueleto 2 oral
P12035	Queratina_ tipo II citoesqueleto 3
P19013	Queratina_ tipo II citoesqueleto 4
P02538	Queratina_ tipo II citoesqueleto 6A
P04259	Queratina_ tipo II citoesqueleto 6B
P48668	Queratina_ tipo II citoesqueleto 6C
P08729	Queratina_ tipo II citoesqueleto 7
Q3SY84	Queratina_ tipo II citoesqueleto 71
Q14CN4	Queratina_ tipo II citoesqueleto 72
O95678	Queratina_ tipo II citoesqueleto 75
Q8N1N4	Queratina_ tipo II citoesqueleto 78
Q5XKE5	Queratina_ tipo II citoesqueleto 79
P05787	Queratina_ tipo II citoesqueleto 8

Q9H1H9	Proteína similar a la cinesina KIF13A
A0A1B0GV47	Proteína similar a la cinesina KIF21A (fragmento)
P22079	Lactoperoxidasa
P02788	Lactotransferrina
P25391	Subunidad alfa-1 de laminina
Q16787	Subunidad alfa-3 de laminina
P30740	Inhibidor de elastasa de leucocitos
Q86WA8	Lon proteasa homólogo 2_ peroxisomal
F5H070	Desmetilasa 3A específica de lisina
Q9BY66	Desmetilasa 5D específica de lisina
Q99698	Regulador del tráfico de lisosomas
Q8IY33	Proteína tipo MICAL 2
O15021	Serina / treonina-proteína quinasa 4 asociada a microtúbulos
P12882	Miosina-1
P35580	Miosina-10
Q9UKX3	Miosina-13
Q7Z406	Miosina-14
P11055	Miosina-3
Q9Y623	Miosina-4
A7E2Y1	Miosina-7B
P13535	Miosina-8
H0Y786	Nebulina (fragmento)
Q86VF7	Proteína de anclaje relacionada con la nebulina
P18615	Factor de alargamiento negativo E
Q7Z494	Nefrocistina-3
P12036	Polipéptido pesado de neurofilamento
P07197	Polipéptido medio de neurofilamento
Q96TA1	Proteína 1 similar a Niban
P43490	Nicotinamida fosforribosiltransferasa

C9J066	Nineina
Q8TAT6	Homólogo de la proteína 4 de localización de proteínas nucleares
O75147	Proteína 1 similar a la obscurina
A0A1B0GUH0	Proteína 1 regulada por oxígeno
O95428	Papilina
O15018	Proteína 2 que contiene el dominio PDZ
P30044	Peroxiredoxina-5_ mitocondrial
P42356	Fosfatidilinositol 4-quinasa alfa
P98198	ID de ATPasa transportadora de fosfolípidos
Q13835	Plakofilina-1
P13796	Plastina-2
P13797	Plastina-3
Q9HB21	Miembro 1 de la familia A que contiene el dominio de homología de pleckstrina
Q6IQ23	Pleckstrin homology domain-containing family A member 7 (Fragment)
Q9H7P9	Pleckstrin homology domain-containing family G member 2
Q15149	Plectina
Q53GL7	Polimerasa de poli [ADP-ribosa]
Q6S8J3	Miembro de la familia del dominio anquirinq POTE E
P20742	Proteína de la zona de embarazo
P02545	Prelamina-A / C
Q8IY21	Probable ARN helicasa DDX60 dependiente de ATP
Q07954	Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de densidad prolongada
P20618	Subunidad del proteasoma beta tipo 1
P02760	Proteína AMBP
I3L2J0	Homólogo de proteína capicua
P07237	Proteína disulfuro-isomerasa
Q6P995	Proteína FAM171B

Q13045	Homólogo de proteína no voladora-1
Q5TBA9	Homólogo peludo de proteínas
Q6IE81	Proteína Jade-1
Q92597	Proteína NDRG1
Q86WI3	Proteína NLRC5 (Fragmento)
Q9Y6V0	Piccolo de proteína
Q5JSZ5	Proteína PRRC2B
A0A1B0GUS7	Proteína unc-13 homólogo B
Q8N2C7	Homólogo de proteína unc-80
Q9UM07	Proteína-arginina deiminasa tipo 4
P00734	Protrombina
Q14517	Protocadherina Grasa 1
H7BZ55	Proteína en espiral en espiral de la raicilla ciliar putativa 2
Q96N53	Proteína putativa no caracterizada codificada por LINC00167
Q6WKZ4	Proteína 1 que interactúa con la familia Rab11
O14715	Proteína 1 similar a RANBP2 y que contiene dominio GRIP
Q8IZ41	Proteína que contiene el dominio de mano Ras y EF
Q9UJF2	Proteína activadora de Ras GTPasa nGAP
P10586	Tirosina-proteína fosfatasa de tipo receptor F
O43566	Regulador de la señalización de proteína G 14 (Fragmento)
Q8N264	Proteína activadora de Rho GTPasa 24
Q13464	Proteína quinasa 1 asociada a Rho
Q13206	Helicasa de ARN
Q5TZA2	Boletín raíz
P21817	Receptor de rianodina 1
Q9NZJ4	Sacsina
O95171	Scielina
Q9UQ35	Proteína de matriz repetitiva de serina / arginina 2
Q13535	Serina / treonina-proteína cinasa ATR

P20794	Serina / treonina-proteína cinasa MAK
P30153	Serina / treonina-proteína fosfatasa 2A 65 kDa subunidad reguladora A isoforma alfa
Q9UIV8	Serpina B13
P29508	Serpina B3
P35237	Serpina B6
Q562F6	Shugoshina 2
O43166	Proteína 1 similar a 1 asociada a la proliferación inducida por señales
Q1XH10	Proteína 1 que contiene el dominio SKI / DACH
Q92673	Receptor relacionado con sortilina
P02549	Espectrina cadena alfa_ eritrocítica 1
Q13813	Espectrina cadena alfa_ no eritrocítica 1
Q9H254	Cadena beta de espectrina_ no eritrocítica 4
Q9P2P6	Proteína de transferencia de lípidos relacionada con StAR 9
P38646	Estrés-70 proteína_ mitocondrial
P04179	Superóxido dismutasa [Mn] _ mitocondrial
O95425	Supervilina
Q8IWZ8	SURP y proteína 1 que contiene el dominio del parche G
Q9UMZ2	Sinergia gamma
P61266	Sintaxina-1B
Q8IWY7	Tau-tubulina quinasa 2
G5E9W1	Polimerasa de poli [ADP-ribosa] inducible por TCDD (fragmento)
Q9NYB0	Proteína 1 que interactúa con el factor de unión a repetición telomérica 2
Q96AY4	Proteína repetida tetratricopeptide 28
P63313	Timosina beta-10
Q07157	Proteína de unión estrecha ZO-1
A6H8Y1	Factor de transcripción TFIIIB componente B " homólogo
P29401	Transcetolasa

Q86UB9	Proteína transmembrana 135
Q2LD37	Proteína transmembrana KIAA1109
P40939	Subunidad enzimática trifuncional alfa_ mitocondrial
Q9H8W5	Proteína que contiene motivo tripartito 45
Q9H4B7	Cadena de tubulina beta-1
P18031	No receptor de tirosina-proteína fosfatasa tipo 1
Q9UPU5	Hidrolasa 24 de ubiquitina carboxilo terminal
Q86TW2	Proteína quinasa 1 no caracterizada que contiene el dominio aarF
P69891	Proteína no caracterizada
B2RTY4	Miosina-IXa no convencional
Q5THJ4	Proteína 13D asociada a la clasificación de proteínas vacuolares
Q9P253	Homólogo de la proteína 18 asociada a la clasificación de proteínas vacuolares
P08670	Vimentina
P18206	Vinculina
A3KMH1	Proteína 8 que contiene el dominio del factor A de von Willebrand
O95876	Homólogo de fritz de proteína efectora de polaridad celular plana y que contiene repeticiones WD
A4UGR9	Proteína 2 que contiene repetición de unión a actina Xin
C9J6P4	Proteína antiviral tipo CCCH tipo dedo de zinc 1
P15822	Proteína de dedos de zinc 40
Q86XN6	Proteína de dedos de zinc 761

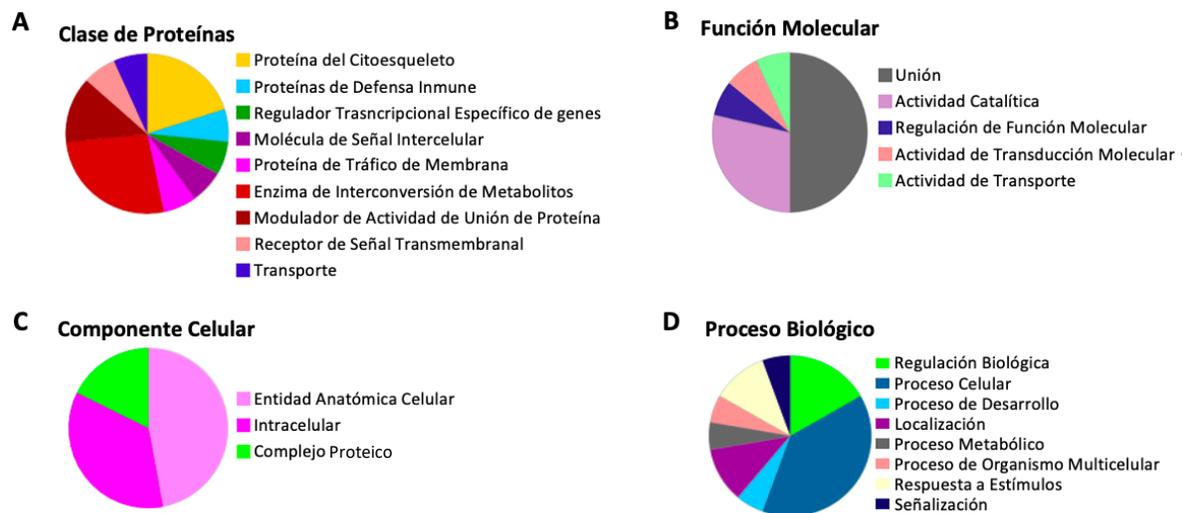
---

### **Posible función de las fosproteínas identificadas**

A partir de la identificación de todas las proteínas fosforiladas en el residuo de serina, se decidió realizar un análisis bioinformático para conocer las características de cada una de ellas. Por este motivo, analizamos la anotación de la función de las mismas, mediante el Sistema de Clasificación PANTHER. Además, se realizó el análisis de ontología genética (GO por sus siglas en inglés *Gene Ontology*),

seleccionando tres aspectos: función molecular, componente celular y proceso biológico.

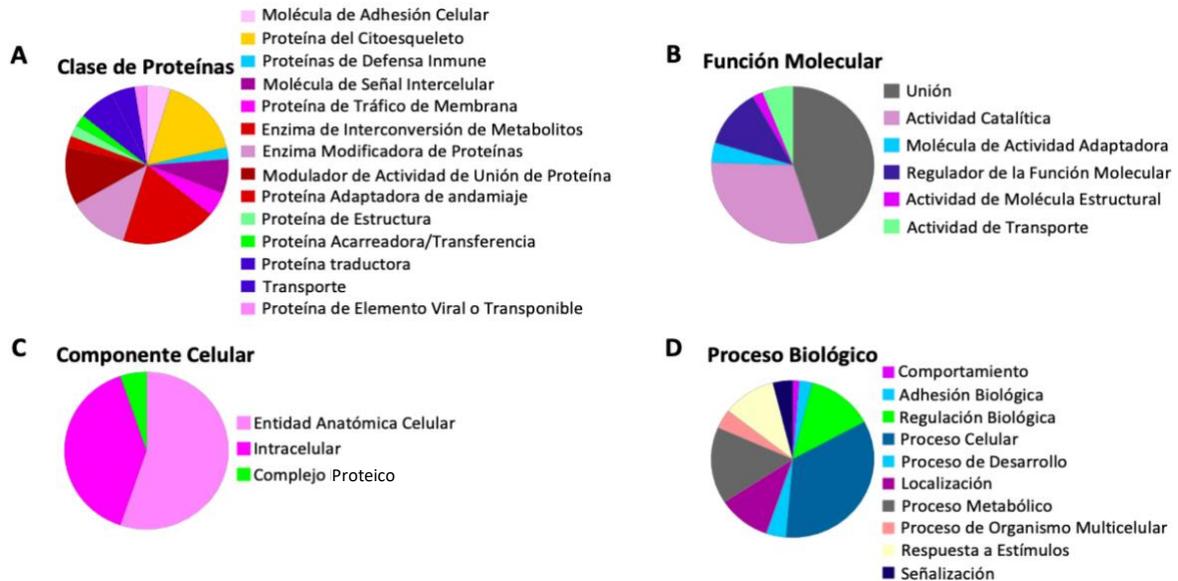
Con base en el sistema de clasificación PANTHER, las 30 fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras sanas se clasificaron en 9 clases (**Figura 11 A**), de éstas, las que contenían el mayor número de fosfoproteínas fueron proteínas del citoesqueleto, enzimas de interconversión de metabolitos y moduladores de actividad de unión de proteínas (**Figura 11 A**). Por otra parte, en el análisis de GO por función molecular, las fosfoproteínas en serina del grupo de muestras sanas están relacionadas principalmente con funciones de unión y actividad catalítica (**Figura 11 B**). El análisis GO por componente celular determinó que las fosfoproteínas en serina de las muestras sanas se encuentran en entidad anatómica celular, intracelular y en complejos proteicos (**Figura 11 C**). Los resultados obtenidos mediante el análisis GO por proceso biológico señalaron que las fosfoproteínas en serina identificadas estaban relacionadas principalmente con procesos celulares, regulación biológica, respuesta a estímulos y localización (**Figura 11 D**).



**Figura 11.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras sanas. (A) Clases de proteínas de acuerdo con el Sistema de Clasificación PANTHER. (B) Análisis de ontología genética (GO) por función

molecular. (C) Análisis GO por componente celular. (D) Análisis GO por proceso biológico.

Posteriormente, realizamos el análisis considerando los mismos criterios en las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con LIEBG (**Figura 12**). Basándonos en el Sistema de Clasificación de PANTHER, las 152 fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con LIEBG fueron clasificadas en 42 clases diferentes (**Figura 12 A**). Las clases de proteínas del citoesqueleto, enzimas de interconversión metabólica, enzimas modificadoras de proteínas y moduladores de actividad de unión de proteína fueron las cuatro clases más abundantes (**Figura 12 A**). El análisis GO por función molecular reveló que las fosfoproteínas en serina de las muestras de LIEBG están relacionadas principalmente en unión, actividad catalítica y reguladores de la función molecular (**Figura 12 B**). El análisis GO por componente celular determinó que las fosfoproteínas en serina de las muestras con LIEBG se encuentran en entidad anatómica celular, intracelular y en complejos proteicos (**Figura 12 C**). Mediante el análisis GO por proceso biológico se observó que las fosfoproteínas en serina identificadas estaban relacionadas principalmente con procesos celulares, regulación biológica, procesos metabólicos y localización (**Figura 12 D**).

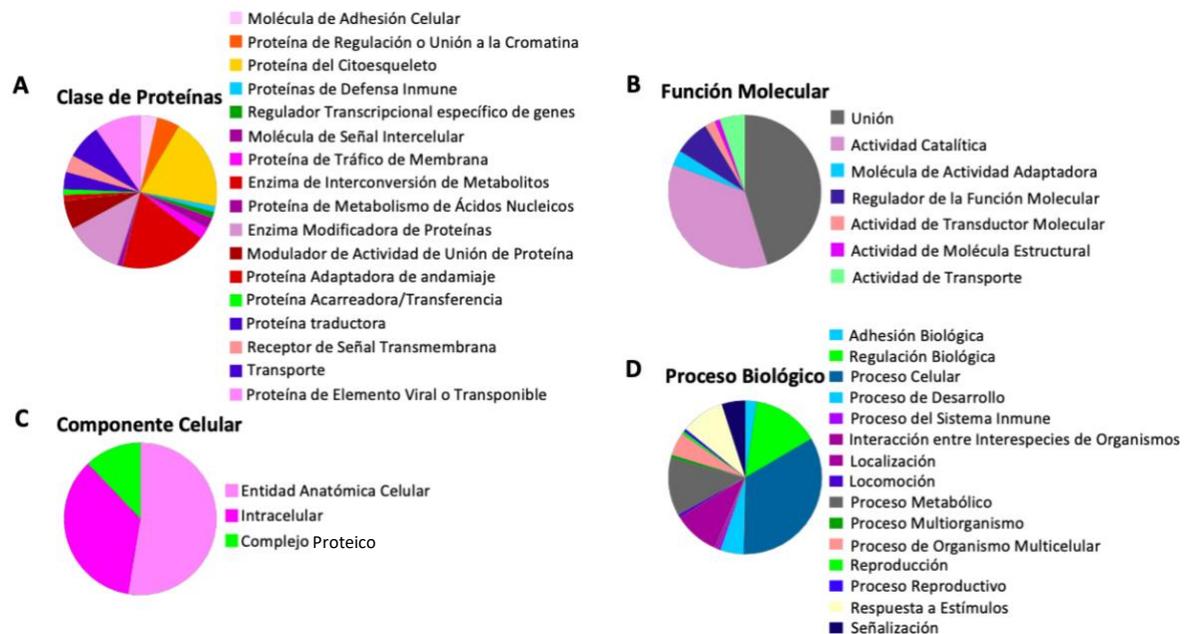


**Figura 12.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con LIEBG. (A) Clases de proteínas de acuerdo con el Sistema de Clasificación PANTHER. (B) Análisis de ontología genética (GO) por función molecular. (C) Análisis GO por componente celular. (D) Análisis GO por proceso biológico.

Finalmente, las 289 fosfoproteínas en serina del grupo de muestras con CaCu fueron clasificadas en 93 clases diferentes, según el sistema de clasificación PANTHER (**Figura 13**). Las clases más abundantes en este grupo fueron proteínas del citoesqueleto, enzimas de interconversión metabólica, modificadores de proteínas y proteínas de elementos virales o transponibles (**Figura 13 A**). Las fosfoproteínas en serina del grupo de muestras con CaCu, analizadas por función molecular mediante GO, están relacionadas principalmente con unión, actividad catalítica, regulador de la función molecular y actividad de transporte (**Figura 13 B**). A partir del análisis GO por componente celular observamos que las fosfoproteínas en serina de las muestras con CaCu fueron encontradas en entidad anatómica celular, intracelular y en complejos proteicos (**Figura 13 C**). Cuando las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con CaCu fueron analizadas por proceso biológico se encontró que éstas estaban relacionadas

principalmente con procesos celulares, regulación biológica, procesos metabólicos, respuesta a estímulos y localización principalmente (**Figura 13 D**).

Este análisis bioinformático realizado para cada grupo nos aportó hacia adonde se polarizan las fosfoproteínas durante el desarrollo del CaCu. De forma general, las fosfoproteínas de los tres grupos se encuentran enfocadas en proteínas de andamiaje y del citoesqueleto, con funciones de unión y actividad catalítica, y con procesos celulares y regulación biológica.

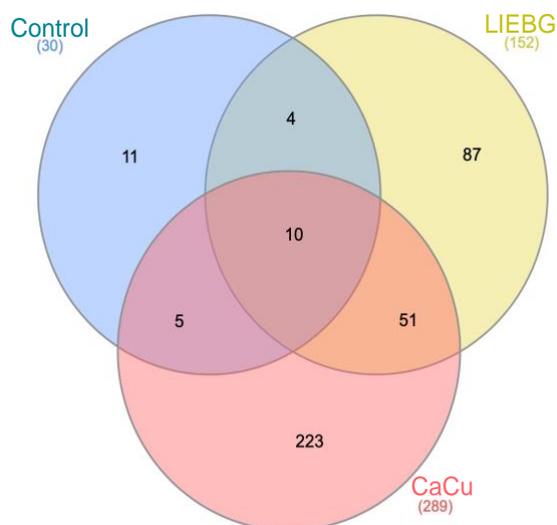


**Figura 13.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con CaCu. (A) Clases de proteínas de acuerdo con el Sistema de Clasificación PANTHER. (B) Análisis de ontología genética (GO) por función molecular. (C), Análisis GO por componente celular. (D) Análisis GO por proceso biológico.

### **Análisis comparativo de las proteínas fosforiladas en residuos de serina en las diferentes muestras**

Después de analizar las posibles funciones de todas las fosfoproteínas en serina identificadas en los diferentes grupos, se decidió comparar la presencia de

fosfoproteínas en serina entre todos los grupos, obteniendo solamente 10 de ellas que se encontraron en todos los grupos (**Figura 14**). Entonces, se realizó un análisis para identificar las proteínas que presentaban fosforilación en residuos de serina en muestras con LIEBG y CaCu pero que en las proteínas de muestras sanas no presentaban esta MPT.

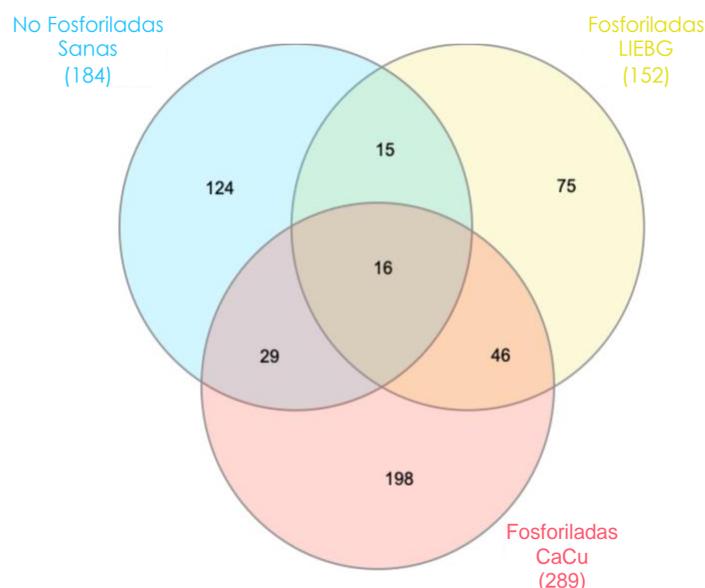


**Figura 14.** Análisis comparativo de las fosfoproteínas en serina entre todos los grupos mediante el Diagrama de Venn.

Los datos obtenidos en este nuevo análisis comparativo mostraron que 16 proteínas se superponían en los tres grupos (proteínas no fosforiladas en el grupo sano, pero fosforiladas en residuos de serina en los grupos con LIEBG y CaCu) (**Figura 15**). Las proteínas con esta característica se enlistan en la **Tabla 8**.

Con la finalidad de obtener una mayor cobertura para analizar las interacciones proteína-proteína mediante la herramienta de STRING y conocer los eventos donde las fosfoproteínas en serina diferenciales participan, se decidió incluir 45 proteínas para dicho análisis. Las proteínas seleccionadas fueron aquellas que no estaban fosforiladas en el grupo control, pero si estaban fosforiladas en serina en el grupo

de CaCu, además se incluyeron las 15 proteínas que se superponían en los tres grupos, pero que no estaban fosforiladas en el grupo de tejido sano (**Figura 16**).

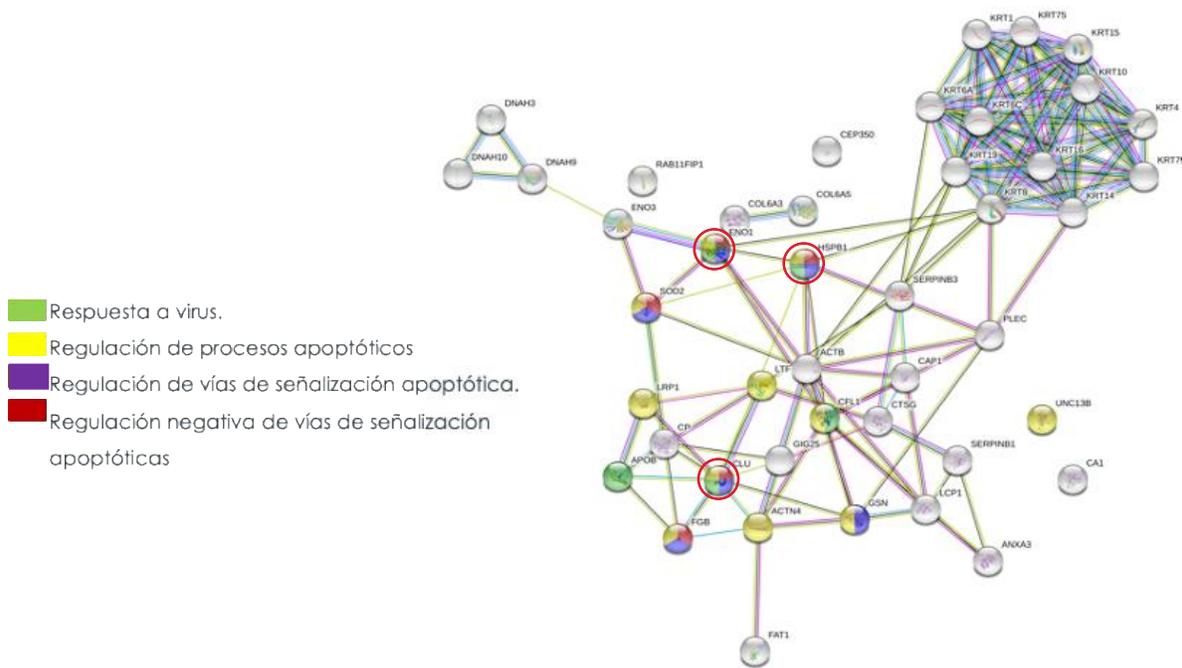


**Figura 15.** Análisis comparativo de las fosfoproteínas en serina de los grupos de LIEBG y CaCu y las proteínas no fosforiladas del grupo sano mediante el Diagrama de Venn.

**Tabla 8.** Proteínas con fosforilación en residuos de serina en los grupos LIEBG y CaCu, pero no fosforiladas en el grupo de muestras sanas.

NCBI-IP	Proteínas no fosforiladas (Sanas) y fosforiladas en serina (LIEBG y CaCu)
Q01518	Proteína 1 asociada a Adenylyl ciclasa
P04114	Apolipoproteína B-100
P13929	Beta-enolasa
P10909	Clusterina
A8TX70	Cadena alfa-5 (VI) de colágeno
Q8IVF4	Cadena pesada de Dineina 10_ axonemal
Q8TD57	Cadena pesada de Dineina 3_ axonemal
P02675	Fibrinógeno cadena beta
P04792	Proteína de Choque Térmico beta-1
P19012	Citoqueratina 15 de tipo I

P08727	Citoqueratina 19 de tipo I
P04264	Citoqueratina 1 de tipo II
P19013	Citoqueratina 4 de tipo II
P02538	Citoqueratina 6A de tipo II
Q15149	Plectina
A0A1B0GUS 7	Proteína homóloga B de unc-13



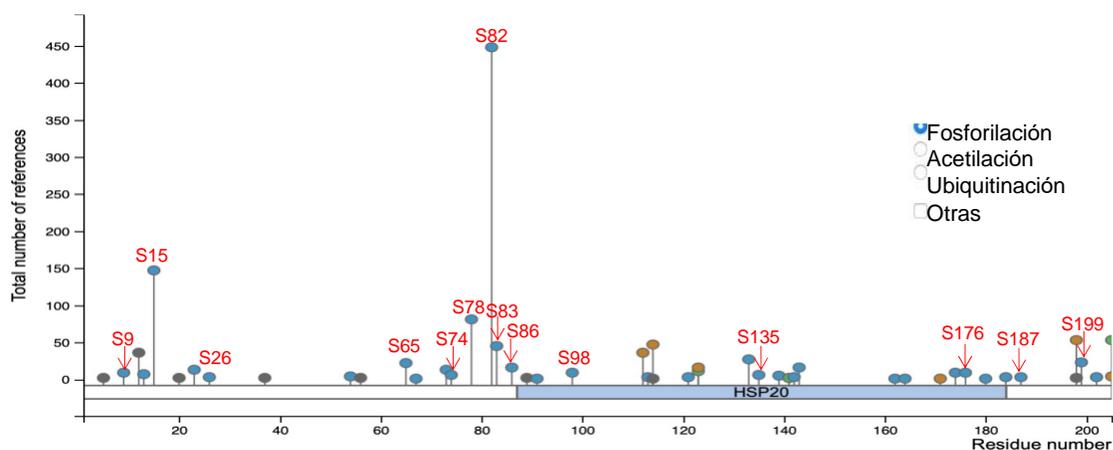
**Figura 16.** Análisis de interacciones proteína-proteína de las fosfoproteínas en serina de los grupos de LIEBG y CaCu y no fosforiladas del grupo sano. Los círculos rojos indican las proteínas candidatas por estar presentes en los 4 eventos evaluados.

De acuerdo con los datos obtenidos a partir del análisis de interacción proteína-proteína, los eventos en los que participan esas proteínas son respuesta a virus, regulación de procesos apoptóticos, regulación de vías de señalización apoptótica y regulación negativa de vías de señalización apoptóticas (**Figura 16**). Interesantemente, los datos mostraron la presencia de tres proteínas que estaban

involucradas en todos los eventos evaluados, HSP27, Clusterina y Beta-Enolasa (**Figura 16**). Estas 3 fosfoproteínas fueron seleccionadas para los análisis posteriores de acuerdo con sus posibles participaciones dentro de la carcinogénesis del CaCu.

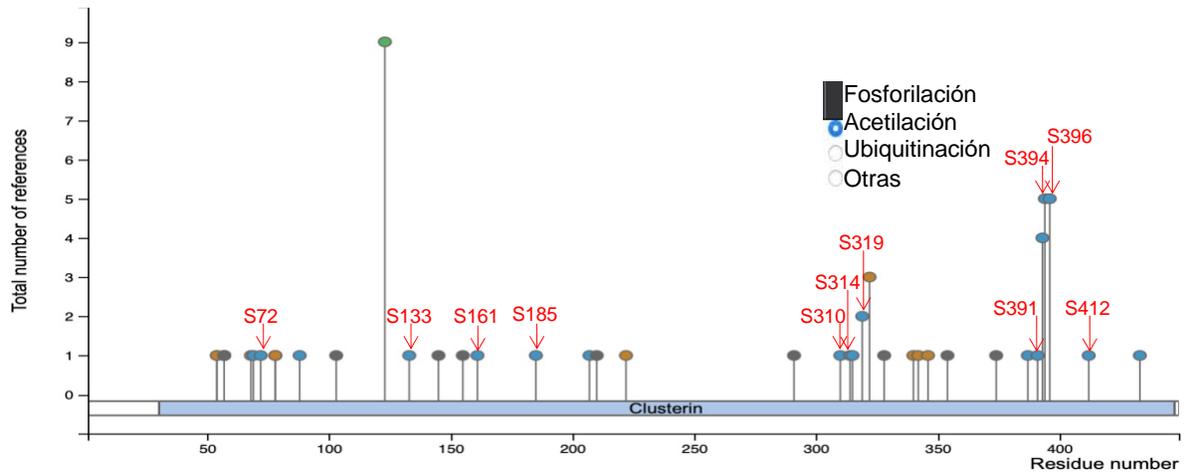
### **Análisis bioinformático de las fosfoproteínas en serina seleccionadas**

Al seleccionar las tres fosfoproteínas candidatas de los análisis anteriores, decidimos realizar un análisis de los fosfositos de cada proteína conocidos o predichos. Las tres fosfoproteínas seleccionadas se analizaron mediante el programa Phosphosite.org (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>). El análisis realizado para HSP27 mostró 32 sitios putativos de fosforilación, 14 de los cuales pertenecen a residuos de serina (**Figura 17**). Cuando comparamos los datos obtenidos por Phosphosite y los obtenidos mediante la identificación por espectrometría de masas, solamente detectamos la fosforilación en serina 82.



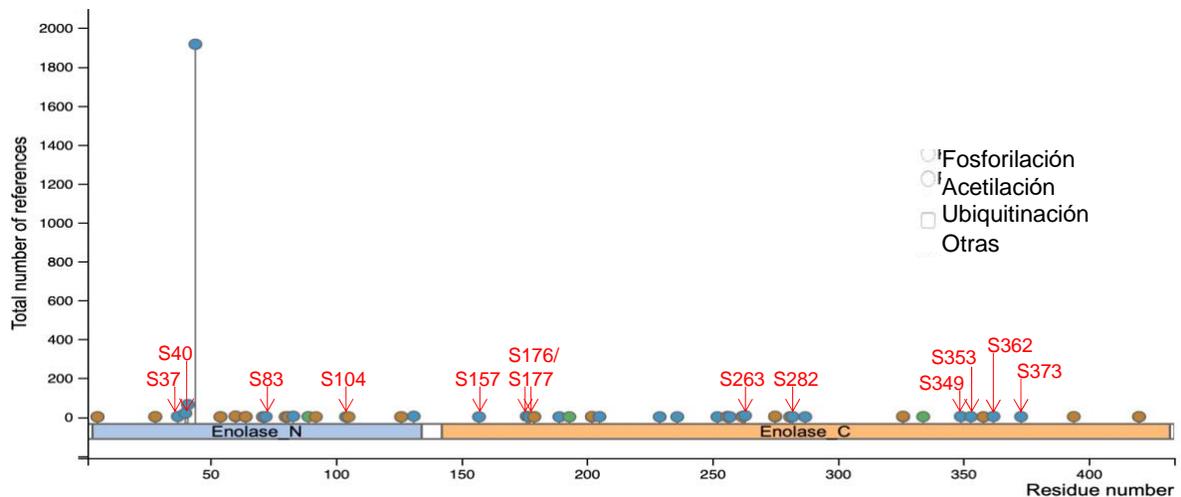
**Figura 17.** Detección de los sitios de fosforilación en HSP27.

Los sitios putativos de fosforilación en Clusterina son 15, donde 11 son residuos de serina (**Figura 18**), nosotros identificamos mediante espectrometría de masas la fosforilación en los residuos serina 161 y 184. Interesantemente, hasta donde hemos revisado, la fosforilación de serina 184 que detectamos por espectrometría de masas no ha sido reportada.



**Figura 18.** Detección de los sitios de fosforilación en Clusterina.

En el mismo análisis para Beta-Enolasa detectamos 21 sitios putativos de fosforilación, de los cuales 13 son fosforilaciones en residuos de serina (**Figura 19**). Nosotros obtuvimos mediante espectrometría de masas la identificación de la fosforilación de los residuos de serina 83, 115 y 353; interesantemente, el residuo serina 115 no está reportado con esta MPT en la plataforma de Phosphosite.



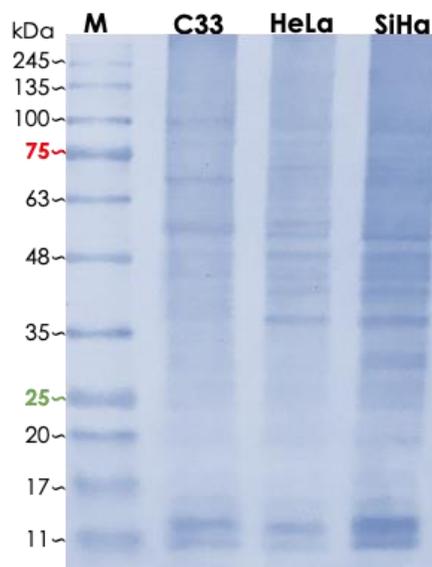
**Figura 19.** Detección de los sitios de fosforilación en Beta-Enolasa.

En resumen, para HSP27 identificamos al fosfositio 82, que es el más predominante de esta proteína; mientras que en clusterina y beta-enolasa detectamos fosfositos ya identificados anteriormente e identificamos fosfositos (S184 para clusterina y S115 para beta-enolasa) que hasta el momento no han sido reportados. Estos sitios podrían participar en el desarrollo del CaCu; sin embargo, es necesario probar experimentalmente esta posibilidad.

### **Inmunodetección de la expresión de HSP27 y su fosforilación en S82**

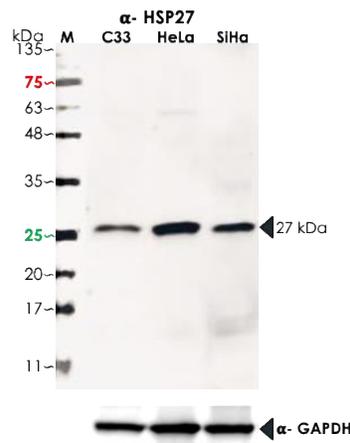
De acuerdo con los datos anteriormente obtenidos mediante el análisis de phosphosite.org, se seleccionó a HSP27 para conocer la expresión proteica así como los estados de fosforilación en S82 en las líneas celulares HeLa (adenocarcinoma cervical que presenta VPH 18), SiHa (carcinoma de células epiteliales escamosas que presenta VPH 16) y C33 (carcinoma indiferenciado negativo a VPH) para la inmunodetección.

Primero se observó la integridad de los extractos proteicos totales de las líneas celulares en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% teñidos con el colorante azul de Coomassie. Este análisis mostró un patrón de bandas con pesos moleculares desde < 11 kDa hasta >245 kDa sin degradación aparente (**Figura 20**).

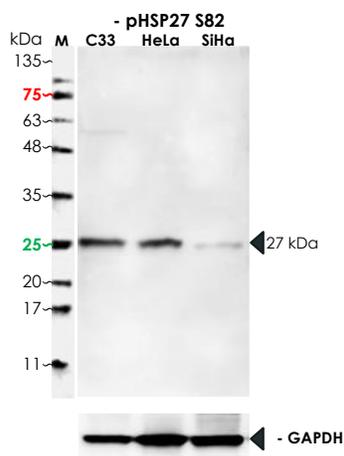


**Figura 20.** Patrón electroforético de proteínas totales de líneas celulares provenientes de CaCu. Los extractos totales de las líneas celulares C33, HeLa y SiHa se separaron mediante SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con azul de Coomassie. M: marcadores de masas moleculares (kDa).

Después de obtener una adecuada integridad de los extractos proteicos de las líneas celulares, se realizó el análisis de inmunodetección de HSP27 total y fosforilada en serina 82, además de la enzima GAPDH, la cual se utilizó como un control interno de carga, la cual mostró una cantidad similar en los diferentes ensayos (**Figuras 21 y 22**),



**Figura 21.** Inmunodetección con los anticuerpos contra HSP27. Los extractos totales de las líneas celulares C33, HeLa y SiHa se sometieron a ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra HSP27. M: marcador de masas moleculares (kDa). En la parte inferior se muestra la inmunodetección de GAPDH, utilizada como control interno de carga.

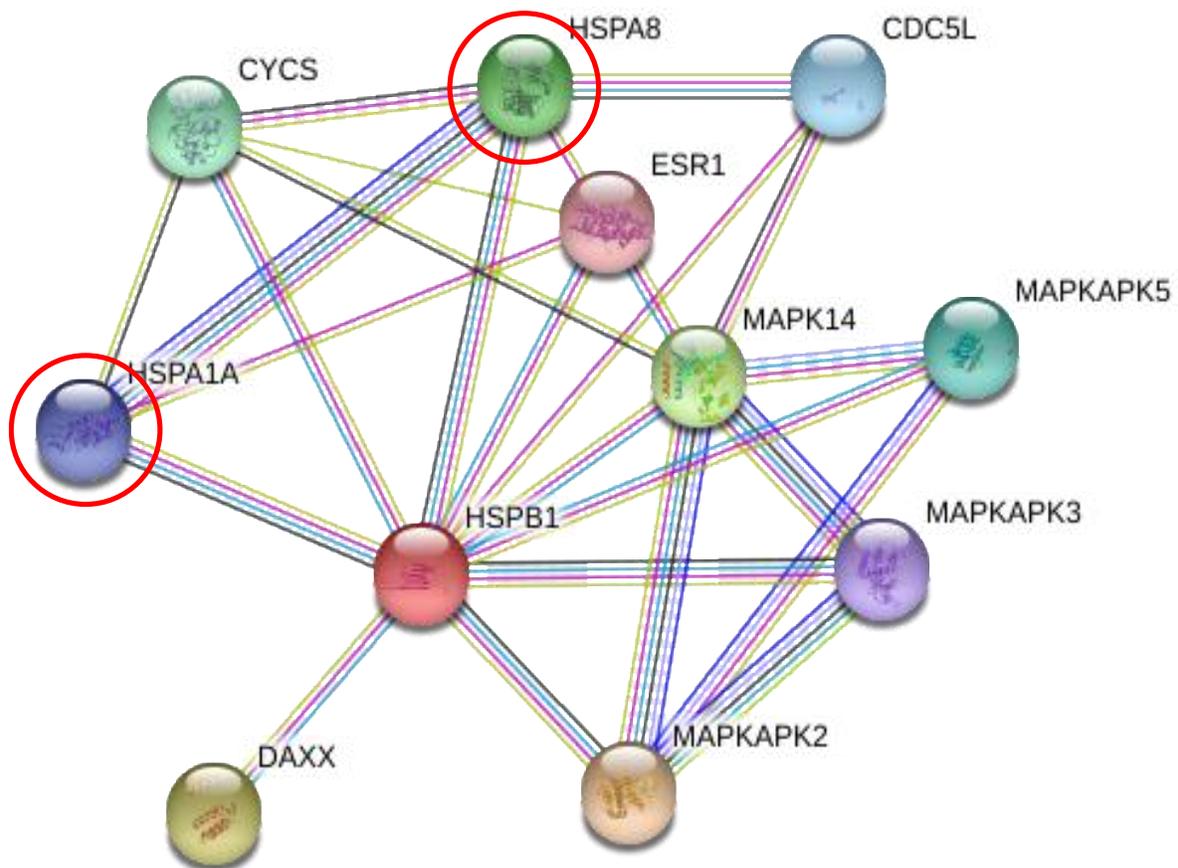


**Figura 22.** Inmunodetección con los anticuerpos contra HSP27 fosforilada en serina 82 (pHSP27 ser 82). Los extractos totales de las líneas celulares C33, HeLa y SiHa se sometieron a ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra HSP27 fosforilada en el residuo de serina 82. M: marcador de masas moleculares (kDa). En la parte inferior se muestra la inmunodetección de GAPDH, utilizada como control interno de carga.

Con base en los resultados de inmunodetección de HSP27 no fosforilada y fosforilada en serina 82 y normalizada con la inmunodetección de GAPDH, se realizó un análisis densitométrico para evaluar la existencia de cambios significativos entre las líneas celulares. Los resultados obtenidos indicaron que había una mayor expresión de HSP27 en células HeLa y en menor medida en células SiHa y en células C33 (**Figura 23**). Por otra parte, en los estados de fosforilación de HSP27 en serina 82 se encontró que existía una mayor fosforilación del residuo serina 82 en células C33 y células HeLa que en células SiHa, donde se observó una inmunodetección bastante débil, que no correspondió al nivel de expresión de la proteína. Estos resultados confirman la fosforilación, aunque en diferente grado, del residuo Ser82 de HSP27 en células provenientes de CaCu, lo que sugiere que la fosforilación de este residuo podría tener un papel en el desarrollo de esta enfermedad, aunque falta verificar si existe la ausencia o menor cantidad de esta MPT en células sanas.

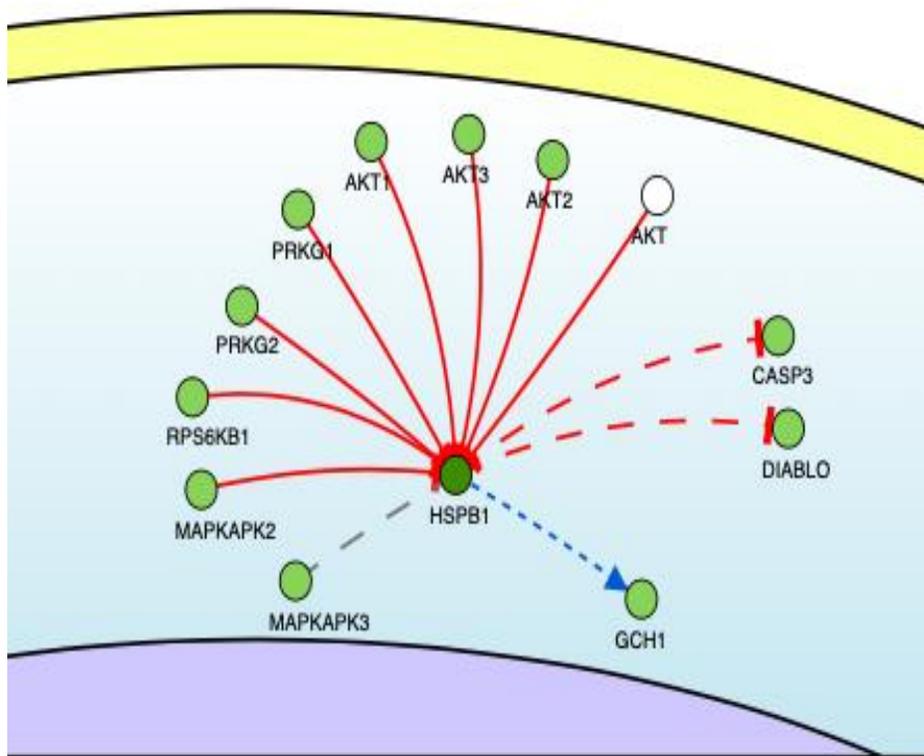
### Interactoma *in silico* de HSP27

HSP27 es una proteína chaperona que ha sido reportada por interactuar con diferentes proteínas, promoviendo diversas funciones para sus proteínas blanco y para ella. Para conocer a las proteínas asociadas a HSP27 se creó en la base de datos STRING 11.5 una red de interacción proteína-proteína con HSP27 (**Figura 24**). Los resultados obtenidos mostraron a 10 proteínas que pueden crear posibles interacciones con HSP27. Posteriormente, buscamos a las 10 proteínas en aquellas que se identificaron por espectrometría de masas, donde solamente dos de esas proteínas estaban presentes en el interactoma: *HSPA8* (Proteína asociada a choque térmico 71KDa) en el grupo de LIEBG y CaCu sin fosforilar; y *HSPA1A* (Proteína 1A de choque térmico de 70 kDa o *HSP72*) en los tres grupos, pero solo en el grupo de LIEBG se identificó fosforilada.



**Figura 24.** Interactoma *in silico* de HSP27. Mediante STRING 11.5 se creó una red de interacciones proteína-proteína con HSP27. Los círculos rojos indican las proteínas presentes en nuestra base de datos obtenida por la identificación mediante espectrometría de masas.

Por otra parte, para conocer las cinasas que fosforilan a HSP27 en actividades normales dentro de la célula, realizamos un análisis mediante la base de datos Signor 2.0 (*The SIGnaling Network Open Resource*). Los resultados obtenidos mostraron 9 cinasas diferentes (**Figura 25**) que pueden interactuar con HSP27 y realizar una fosforilación en cuatro diferentes residuos. Los sitios de fosforilación de HSP27 y las cinasas que lo realizan, así como su efecto se describe en la **Tabla 9**. Interesantemente, todas las fosforilaciones de HSP27, incluidas las del residuo de serina 82, tienen un efecto de inhibición o desconocido (**Tabla 9**).



**Figura 25.** Interacción de HSP27 con cinasas. La búsqueda de las cinasas que interactúan con HSP27 se realizó mediante Signor 2.0. Las líneas rojas muestran

la interacción con HSP27 inhibiendo su función; las líneas rojas segmentadas muestran la interacción de HSP27 inhibiendo proteínas blanco; la línea azul segmentada muestra la interacción de HSP27 para la sobreexpresión de una proteína blanco y la línea gris segmentada muestra una interacción de HSP27 con función poco conocida.

**Tabla 9.** Sitios de fosforilación de HSP27 y las cinasas que la fosforilan.

<b>HSP27</b>				
<b>Residuo</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Modificador</b>	<b>Efecto</b>	<b>Modificación</b>
Ser78	PAYSRALsRQLSSGV	RPS6KB1	Inhibición	Fosforilación
		PRKG1	Inhibición	Fosforilación
		MAPKAPK3	Desconocido	Fosforilación
		MAPKAPK2	Inhibición	Fosforilación
		PRKG2	Inhibición	Fosforilación
Ser82	RALSRQLsSGVSEIR	PRKG2	Inhibición	Fosforilación
		AKT1	Inhibición	Fosforilación
		MAPKAPK2	Inhibición	Fosforilación
		MAPKAPK3	Desconocido	Fosforilación
		PRKG1	Inhibición	Fosforilación
		RPS6KB1	Inhibición	Fosforilación
		AKT2	Inhibición	Fosforilación

		AKT3	Inhibición	Fosforilación
		AKT	Inhibición	Fosforilación
Ser15	FSLLRGP <sub>s</sub> WDPFRDW	MAPKAPK2	Inhibición	Fosforilación
		MAPKAPK3	Desconocido	Fosforilación
		RPS6KB1	Inhibición	Fosforilación
Thr143	RCFTRKY <sub>t</sub> LPPGVDP	PRKG1	Inhibición	Fosforilación
		PRKG2	Inhibición	Fosforilación

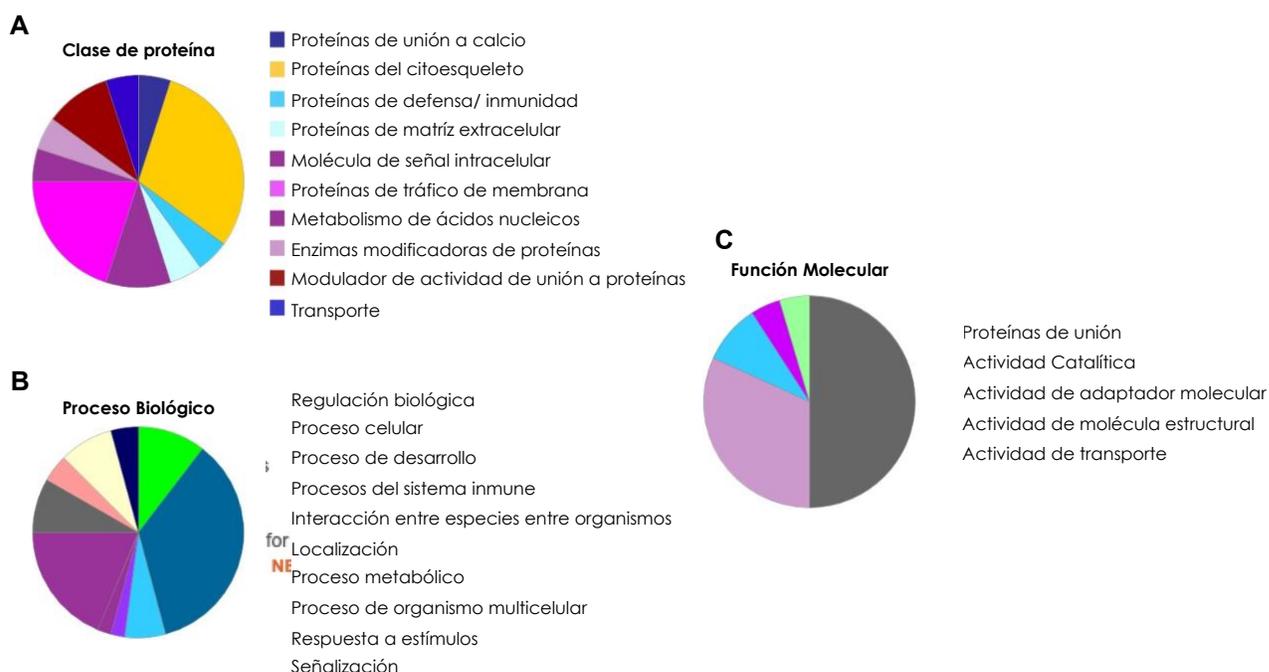
Los datos obtenidos con este análisis bioinformático nos generan una idea de cuales proteínas puede estar interaccionado con HSP27, aunque es necesario realizar experimentos para confirmar varias de estas interacciones o nuevas en condiciones patológicas como CaCu.

### **Análisis bioinformático de las fosfoproteínas en serina superpuestas entre los grupos de LIEBG y CaCu**

Posteriormente, se observó que existían un número interesante de fosfoproteínas que se superponían en los grupos de LIEBG y CaCu, y probablemente pudieran participar en la progresión entre las lesiones pre cancerígenas hasta desarrollar al Cáncer Cérvico-uterino. Por este motivo, con base en los datos obtenidos en el análisis comparativo de la EM de los tres grupos (Proteínas no fosforiladas en el grupo sano entre fosfoproteínas en serina en los grupos con LIEBG y CaCu), se decidió analizar a las fosfoproteínas en serina que se superponían en los grupos de LIEBG y CaCu.

En estos análisis se consideraron las anotaciones funcionales de las 46 fosfoproteínas, mediante el Sistema de Clasificación PANTHER. Además, se realizó el análisis de ontología genética (GO por sus siglas en inglés *Gene Ontology*), seleccionando tres aspectos: función molecular, componente celular y proceso biológico.

Basado en el Sistema de Clasificación de PANTHER, las fosfoproteínas en serina superpuestas entre el grupo de muestras con LIEBG y CaCu fueron clasificadas en 24 clases diferentes (**Figura 26 A**). Las clases de proteínas del citoesqueleto, proteínas de tráfico de membrana, moléculas de señalización intracelular y moduladores de actividad de unión de proteína fueron las cuatro clases más abundantes (**Figura 26 A**). Mediante el análisis GO por proceso biológico se observó que las fosfoproteínas en serina superpuestas entre las muestras de LIEBG y CaCu estaban relacionadas principalmente en procesos celulares, localización, regulación biológica y de respuesta a estímulos (**Figura 26 B**). El análisis GO por función molecular, reveló que las fosfoproteínas en serina superpuestas entre las muestras de LIEBG y CaCu están relacionadas principalmente en unión, actividad catalítica y actividad de adaptador molecular (**Figura 26 C**).



**Figura 26.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina identificadas en el grupo de muestras con LIEBG y CaCu. (A) Clases de proteínas de acuerdo al Sistema de Clasificación PANTHER. (B) Análisis de ontología genética (GO) por proceso biológico. (C) Análisis GO por función molecular.

A partir del análisis realizado, se seleccionaron 11 fosfoproteínas con base en el número de apariciones entre eventos presentes en el análisis de anotación de funciones mediante la Sistema de Clasificación PANTHER. De estas fosfoproteínas seleccionadas, se buscaron los sitios de fosforilación totales, los sitios fosforilados en residuos de serina, diferenciando si estos sitios estaban reportados o si eran nuevos (**Tabla 10**). Interesantemente, en varias de estas proteínas identificamos nuevos fosfositos (**Tabla 10**), los cuales podrían tener un papel en la progresión de la enfermedad, aunque, de nuevo, esto se debe probar experimentalmente.

**Tabla 10.** Fosfoproteínas en serina seleccionadas superpuestas entre los grupos de LIEBG y CaCu.

NCBI-IP	Fosfoproteínas en serina (LIEBG/CaCu)	Fosfositos reportados	Fosfositos en serina reportados	Fosfosito identificado (LIEBG/ CaCu) por EM*
Q99996	Proteína 9 de anclaje a la cinasa-A (AKAP9)	87	58	4(1, 1/ 2)
P50995	Anexina A11	15	4	4(1/ 3)
O60673	DNA polimerasa subunidad catalítica zeta	52	30	5(3 / 2)
Q63HN8	Proteína ubiquitina-ligasa E3 RNF213	57	29	6(1 / 5)
P11021	Chaperona BiP del retículo endoplásmico	49	29	2(1/ 1)
P02751	Fibronectina	38	8	2(2/ 2)
H0Y786	Nebulina	155	47	6(1, 3/ 2)
Q8N4C6	Nineina	43	30	2(1/1)
Q9NZJ4	Sacsina	34	12	2(1/ 1)
O95171	Sciellina	48	26	2(1/ 1)
Q13535	Proteína serina/treonina cinasa ATR	30	16	4(1, 1/ 2)

\*Fuera de los paréntesis se indica el número de fosfositos identificados sumando ambos grupos en cada proteína de nuestro estudio. Los números en el paréntesis indica el número de fosfositos identificado en LIEBG (lado izquierdo) y en CaCu

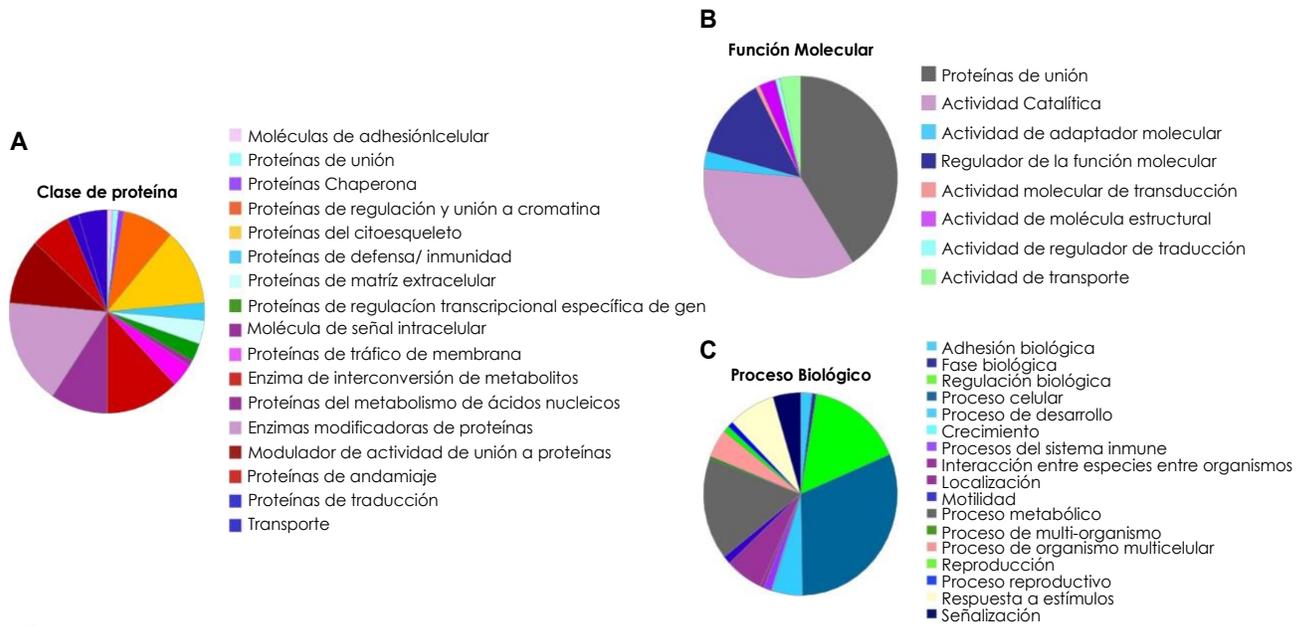
(lado derecho). Los números en negritas entre los paréntesis indican que son fosfositos nuevos no reportados.

### **Análisis bioinformático de las fosfoproteínas en serina exclusivas de CaCu**

Del mismo modo que se analizaron las fosfoproteínas superpuestas entre los grupos de LIEBG y CaCu, se examinaron las fosfoproteínas en serina exclusivas del grupo de CaCu (proteínas no fosforiladas en el grupo sano, pero fosforiladas en serina en CaCu), donde se observó que existía un número interesante de fosfoproteínas exclusivas en el grupo de CaCu, y que probablemente pudieran participar en el desarrollo al Cáncer Cérvico-uterino.

Así, se investigaron las anotaciones funcionales de las 198 fosfoproteínas, mediante el Sistema de Clasificación PANTHER. Además, se realizó el análisis de ontología genética (*GO* por sus siglas en inglés *Gene Ontology*), seleccionando tres aspectos: función molecular, componente celular y proceso biológico.

Con base en el Sistema de Clasificación de PANTHER, las fosfoproteínas en serina exclusivas del grupo de CaCu fueron clasificadas en 51 clases diferentes (**Figura 27 A**). Las clases de enzimas modificadoras de proteínas, moléculas de interconversión de metabolitos, proteínas del citoesqueleto y moduladores de actividad de unión de proteína fueron las cuatro clases más abundantes (**Figura 27 A**). El análisis *GO* por función molecular, reveló que las fosfoproteínas en serina exclusivas del grupo de muestras con CaCu fueron relacionadas principalmente en unión, actividad catalítica y regulador de la función molecular (**Figura 27 B**). Mediante el análisis *GO* por proceso biológico se observó que las fosfoproteínas en serina exclusivas del grupo de muestras con CaCu estaban relacionadas principalmente en procesos celulares, procesos metabólicos, regulación biológica y de respuesta a estímulos (**Figura 27 C**).



47

**Figura 27.** Anotación de función de las fosfoproteínas en serina exclusivas identificadas en el grupo de muestras con CaCu. (A) Clases de proteínas de acuerdo con el Sistema de Clasificación PANTHER. (B) Análisis de ontología genética (GO) por función molecular. (C) Análisis GO por proceso biológico.

Con los datos obtenidos se seleccionaron 10 fosfoproteínas con base en el número de apariciones entre los eventos presentes. De estas fosfoproteínas seleccionadas, se buscaron los sitios de fosforilación totales, el total de sitios fosforilados en residuos de serina y posteriormente, se detectó la localización de los fosfositios identificados de cada proteína, diferenciando si el fosfositio estaba reportado o si era nuevo (**Tabla 11**). Nuevamente, en nuestro análisis por EM encontramos fosfositios no reportados previamente, los que podrían participar en el desarrollo del CaCu.

**Tabla 11.** Fosfoproteínas en serina seleccionadas exclusivas del grupo de CaCu.

NCBI-IP	Fosfoproteínas en serina exclusivas de CaCu	Fosfositios reportados	Fosfositios en serina reportados	Fosfositio identificado por EM*
Q14004	Cinasa dependiente de Ciclina 13	91	75	<b>1(1)</b>
Q9NS91	Proteína ubiquitina-ligasa E3 RAD18	28	23	<b>1(1)</b>
Q9UI08	Proteína tipo-Ena/VASP	31	26	<b>1(1)</b>
Q92794	Acetiltransferasa de histonas KAT6A	46	32	<b>2(2)</b>
Q9BYW2	N-metiltransferasa de lisina SETD2	125	84	<b>3</b>
Q96L73	N-metiltransferasa específica de lisina-36 de la H3 y lisina-20 de la H4	64	43	<b>1(1)</b>
Q9Y4C1	Demetilasa específica de lisina 3A	32	20	<b>2(1/1)</b>
Q6P995	Proteína FAM171B	16	7	<b>1(1)</b>
Q5JSZ5	Proteína PRRC2B	113	90	<b>3</b>
Q9UIV8	Serpina B13	2	0	<b>1(1)</b>

\*El número fuera de los paréntesis indica el número de fosfositios identificados en el grupo de fosfoproteínas exclusivas de CaCu de nuestro estudio. Los números afuera del paréntesis indica el número de fosfositios de los péptidos identificados CaCu. Los números en negritas entre los paréntesis indican que son fosfositios nuevos no reportados, los números simples dentro de los paréntesis indican que son fosfositios ya reportados.

Estos datos obtenidos del análisis bioinformático para las fosfoproteínas exclusivas del grupo de CaCu, dieron indicios de como pueden participar en el desarrollo del CaCu, al tener fosfoproteínas con actividad catalítica y que participan en procesos celulares, como, por ejemplo, en la regulación del ciclo celular.

Por ultimo, se destacaron cuatro fosfoproteínas: SETD2, RAD18, KAT6A y NSD1, que se encontraban en un mayor número de eventos, por lo que se realizó una búsqueda de la participación de estas fosfoproteínas en los diferentes tipos de cáncer.

## DISCUSIÓN

El CaCu es una enfermedad causada por múltiples alteraciones generadas por la infección con el VPH (Arbyn et al., 2020). Estas desregulaciones se llevan a cabo en las células epiteliales del cérvix, principalmente manifestándose por el crecimiento descontrolado, la alteración en el ciclo celular por la inhibición de la proteína pRb y la inmortalización celular dada por la degradación de la proteína p53 (Balasubramaniam, Balakrishnan, Oon, & Kaur, 2019), todos estos procesos son inducidos de forma crónica.

Existen diferentes estudios que evalúan las alteraciones en el ciclo celular para la proliferación descontrolada y la inmortalización celular a niveles crónicos en el CaCu, los cuales son inducidos por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH (Brianti et al., 2017). Dichas alteraciones pueden ser causadas por modificaciones postraduccionales (MPT) en ciertas proteínas, principalmente por la fosforilación (Singh et al., 2017). Esta MPT es esencial para los procesos celulares normales, mientras que la fosforilación anormal es una de las principales causas de alteración de muchas proteínas estructurales, funcionales y reguladoras en condiciones de enfermedad (Ramazi & Zahiri, 2021). La fosforilación se realiza en residuos de serina, treonina y tirosina de las proteínas. Normalmente, los residuos de serina y treonina sufren más fosforilaciones que los residuos de tirosina, la fosforilación en dichos aminoácidos tienen una relación de 1800:200:1 (Ser:Tre:Tir, respectivamente) (Ardito, Giuliani, Perrone, Troiano, & Lo Muzio, 2017). En el cáncer, se ha estudiado más los cambios en los estados de fosforilación en los residuos de tirosina que la fosforilación en los otros dos residuos, aunque también experimentan cambios con mayor predominio (Ciftci et al., 2020). En particular, la fosforilación de proteínas en los residuos de serina conduce a la formación de complejos de señalización multimolecular que regulan diversos procesos biológicos, por ejemplo, procesamiento y reparación del ADN, apoptosis, división celular, proliferación y diferenciación (Yaffe & Elia, 2001); sin embargo, en condiciones patológicas como la tumorigénesis, la fosforilación anormal de la serina puede

resultar en la desregulación de las vías de señalización responsables de la proliferación y la inhibición de la apoptosis (Rogerson et al., 2015).

La identificación de proteínas fosforiladas en serina que participan en la desregulación de las funciones celulares en el cáncer sería de gran ayuda para conocer sus funciones dentro de las células (Yoshida, November 29th, 2017). Con base en lo anterior, decidimos identificar por espectrometría de masas las proteínas fosforiladas en residuos de serina en los grupos de muestras sanas, con LIEBG y CaCu. En este trabajo se investigó la fosforilación en muestras tomadas con citocepillos. En el estudio se analizaron 10 muestras para el grupo de personas sanas, 19 para el grupo de pacientes con LIEBG, y 7 para el grupo de pacientes con CaCu, para una “n” total de 36 pacientes. El criterio utilizado para plantear esta “n” fue con base en lo ya reportado, en donde Rader et al. (Rader et al., 2008) mostraron una “n” de 8 pacientes sanas, 9 pacientes con LIEBG y 6 pacientes con CaCu.

En este trabajo identificamos 30 fosfoproteínas en serina del grupo de muestras sanas, 152 fosfoproteínas en serina del grupo de muestras con LIEBG y 289 fosfoproteínas en serina del grupo de muestras con CaCu, lo que indica una relación entre el aumento de fosforilación en residuos de serina y la progresión del CaCu.

Después de haber identificado a las proteínas fosforiladas en residuos de serina de cada grupo, decidimos observar las anotaciones funcionales de cada grupo como se ha realizado en diferentes estudios fosfoproteómicos (Abe et al., 2020). Estos datos funcionales proporcionan la información de las proteínas y su comportamiento, dependiendo de los grupos de interés. Las fosfoproteínas identificadas en el grupo de pacientes con LIEBG predominantemente estuvieron en las clases de proteínas del citoesqueleto, enzimas de interconversión metabólica, enzimas modificadoras de proteínas y moduladores de actividad de unión de proteína. Por otra parte, las fosfoproteínas identificadas en el grupo de pacientes con CaCu pertenecían a las clases de proteínas del citoesqueleto, enzimas de interconversión metabólica, modificadores de proteínas y proteínas de

elementos virales, principalmente. Interesantemente, en ambos grupos comparten las clases de proteínas del citoesqueleto, enzimas de interconversión metabólica y enzimas modificadoras de proteínas, lo que sugiere que estos eventos pudieran ser importantes para el desarrollo del CaCu.

A este respecto, las proteínas del citoesqueleto son las principales fosfoproteínas en serina en todos los grupos, lo que está relacionado con el estudio realizado por Kalliopi Pappa y colaboradores (Pappa et al., 2017), que mediante proteómica cuantitativa encontraron que el 60% de las proteínas detectadas en diferentes líneas celulares derivadas de CaCu estaban asociadas al citoesqueleto y metabolismo, destacando a la cofilina-1, proteína que también nosotros encontramos por EM en los tres grupos pero, interesantemente, se identificó la forma fosforilada en el grupo de CaCu.

Cofilina-1 es una pequeña proteína de aproximadamente 19 kDa que desempeña un papel clave en la dinámica de la actina durante la división celular, quimiotaxis y migración de células cancerígenas (Chang, Leu, & Lee, 2015; Fife, McCarroll, & Kavallaris, 2014; Vazquez et al., 2016). Cofilina-1 tiene una señal de localización nuclear, enviando la actina al núcleo y actuando en la estructuración de este orgánulo, pero las funciones de ambas proteínas dentro del núcleo siguen sin ser claras (Chang et al., 2015).

Cofilina-1 es fosforilada por diferentes cinasas en 19 residuos diferentes, de los cuales, 7 son residuos de serina. La fosforilación en serina 3 promueve la inhibición de sus funciones principales (Chang et al., 2015); por otra parte, la fosforilación en serina 24 promueve el reconocimiento de la señal de localización nuclear (Borrioni et al., 2013). En otro estudio publicado en el 2020 enfocado en el análisis fosfoproteómico global bioinformático, a partir de un repositorio de datos proteómicos, se recopiló la información de la fosforilación de un conjunto de proteínas, incluyendo a cofilina-1, en cinco tipos de cáncer (Deb, Sengupta, Sambath, & Kumar, 2020). En este estudio cofilina-1 fue reportada con la

hiperfosforilación de treonina 25 y serina 8 (Deb et al., 2020). Interesantemente, nosotros identificamos a cofilina-1 en todos los grupos, pero solo detectamos la fosforilación en serina 8 en el grupo de muestras con CaCu, sugiriendo fuertemente que esta MPT puede participar en el desarrollo de esta neoplasia.

En el análisis comparativo de las proteínas fosforiladas en serina, identificamos 10 fosfoproteínas presentes en los tres grupos de estudio (muestras sanas. LIEBG y CaCu), mientras que en el análisis comparativo entre las proteínas no fosforiladas en el grupo de muestras sanas y las fosfoproteínas en serina de los grupos de LIEBG y CaCu se identificaron 16 proteínas. Nosotros destacamos de estas fosfoproteínas a HSP27 y Clusterina por el papel que desempeñan en diferentes tipos de cáncer.

Clusterina es también conocida como apolipoproteína J (ApoJ), es una proteína altamente glicosilada que está presente en todos los fluidos del organismo humano (Rodríguez-Rivera, Garcia, Molina-Álvarez, González-Martín, & Goicoechea, 2021). Participa en diferentes procesos biológicos dependiendo de su ubicación (Rohne, Prochnow, & Koch-Brandt, 2016). Por ejemplo, desempeña un papel de chaperona extracelular, siendo de las chaperonas más importantes. Por otra parte, desempeña un rol citoprotector en condiciones normarles y fisiopatológicas (Peng et al., 2019).

Existen tres diferentes isoformas para clusterina que se pueden generar en la célula: una pequeña isoforma nuclear (conocida como nClu) con un peso aproximado de ~49 kDa con funciones proapoptóticas; una isoforma de tamaño mediano de aproximadamente ~53 kDa (conocida como psClu) que se localiza en el citoplasma o en la mitocondria de la célula y que tiene funciones antiapoptóticas (Rohne et al., 2016), nosotros identificamos al péptido fosforilado que representa dicha isoforma, mediante espectrometría de masas. Por ultimo, una isoforma de tamaño mas grande con alta glicosilación con un peso aproximado de ~80 kDa (conocida como sClu) que se encuentra secretada entre la matriz extracelular y que se ha descrito que presenta funciones dicotómicas (pro y antiapoptóticas) (Rohne et al., 2016).

A partir del conocimiento relacionado a clusterina, se ha buscado su relación protectora en el cáncer (Peng et al., 2019), ya que puede tener funciones multifacéticas en la carcinogénesis y la invasión tumoral (Makridakis et al., 2010). En este aspecto, se ha estudiado la sobreexpresión de la isoforma sClu en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, en un estudio realizado por Xiu y colaboradores (2015) observaron que la sobreexpresión de sClu en carcinoma hepatocelular, inhibe la apoptosis y potencializa la tumorigénesis, además, promueve la resistencia a quimio- y radioterapia (Xiu, Dong, Li, & Li, 2015). También se ha reportado que la sobreexpresión de sClu en cáncer de páncreas (Jin et al., 2012; Xie et al., 2002), de próstata (Kazuno, Fujimura, Fujime, Miura, & Ueno, 2021; Rizzi & Bettuzzi, 2008), de mama (Q. F. Chen, Chang, Su, Zhao, & Kong, 2021) y de ovario (Hoter & Naim, 2019; Wei et al., 2009) puede ser un predictivo en la progresión tumoral, de mal pronóstico y quimiorresistencia.

En CaCu, se ha estudiado la isoforma de mayor tamaño de clusterina (sClu); y se ha reportado su sobreexpresión en tejido con CaCu, comparado con tejido sano (Park, Yeo, Shin, Mok, & Kim, 2006; Watari et al., 2012). Por otra parte, se ha observado el papel citoprotector de sClu en líneas celulares derivadas de CaCu. En un estudio realizado por Kim y colaboradores (2018) se observó la participación de sClu en la proliferación celular, en la resistencia a tratamiento y un importante rol en la carcinogénesis (M. J. Kim et al., 2018).

Hasta el momento solo se ha estudiado la expresión de las diferentes isoformas de clusterina y su relación con diversos eventos de las diferentes isoformas de clusterina en el cáncer, y a pesar de ello su papel sigue siendo poco claro. Sin embargo, hasta donde sabemos, no se ha evaluado la repercusión de la fosforilación de clusterina en la carcinogénesis. Mediante el programa Phosphosite.org se ha reportado la fosforilación de 15 sitios diferentes en esta proteína, en donde 11 de estos fosfositos se presentan en residuos de serina. Las

investigaciones que han reportado la fosforilación de clusterina, han sido con el objetivo de optimizar el análisis de identificación de proteínas con modificaciones postraduccionales, en este caso la fosforilación, mediante espectrometría de masas (Bian et al., 2014). También ha sido identificada como una proteína fosforilada en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, donde se identificaron tres fosfositos (Treonina 393, Serina 394 y Serina 396), sin embargo, no se ha evaluado las funciones que estas fosforilaciones desempeñan en esta neuropatía (J. Chen, Wang, & Turko, 2012).

Otro ejemplo donde se detectó la fosforilación de clusterina es en un estudio realizado por Mertins y colaboradores (2016), donde generaron un análisis de conexión proteogenómico y fosfoproteómico en tumores de cáncer de mama (Mertins et al., 2016). Ellos innovaron estrategias metodológicas para encontrar un mejor aprovechamiento de los datos proteómicos y fosfoproteómicos generados mediante espectrometría de masas, los datos genómicos generados mediante secuenciación masiva y los datos transcriptómicos generados mediante secuenciación de ácidos ribonucleicos (por sus siglas en inglés *RNAseq*) (Mertins et al., 2016). Este análisis promovió una mejor comprensión de la compilación de todos los datos, sugiriendo a potenciales biomarcadores, incluida la clusterina, como blancos terapéuticos en el cáncer de mama (Mertins et al., 2016). A pesar de obtener todos estos datos, clusterina no fue evaluada para conocer el efecto de la fosforilación en ella.

Nosotros identificamos la fosforilación de clusterina en serina 184, fosfosito que no ha sido reportado hasta el momento. Por lo cual, sería de gran relevancia conocer el efecto de la fosforilación de clusterina en S184 en las funciones fisiopatológicas en el CaCu.

La otra fosfoproteína candidata, HSP27, pertenece a la familia de proteínas chaperonas que actúan en diversos procesos biológicos (Zininga, Ramatsui, & Shonhai, 2018). En general, las proteínas de choque térmico son una clase de

proteínas funcionalmente relacionadas cuya expresión aumenta en condiciones estresantes. Las HSP protegen a las células de lesiones asociadas al estrés, están sobreexpresadas en muchas neoplasias malignas y están implicadas en la proliferación, diferenciación, invasión y metástasis de las células tumorales (Yun, Kim, Lim, & Lee, 2019). Específicamente, la proteína de choque térmico beta-1, mejor conocida como HSP27 (*Heat Shock Protein 27*), actúa como protector del mal plegamiento de las proteínas, también inhibe las cascadas de señalización que activan a la apoptosis cuando las células se exponen a tensiones medioambientales, protegiéndolas de la muerte celular (Katsogiannou, Andrieu, & Rocchi, 2014). Su sobreexpresión está relacionada con la supervivencia celular ante cualquier estrés (Dubrez, Causse, Borges Bonan, Dumétier, & Garrido, 2020). Así, la función de HSP27 está enfocada en la protección celular y su sobreexpresión está relacionada en la progresión de diferentes enfermedades, como el cáncer (Saini & Sharma, 2018). De hecho, la expresión a la alza de HSP27 es usado como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama, hepático, próstata, gástrico y Cérvico-uterino (Acunzo, Andrieu, Baylot, So, & Rocchi, 2014). La fosforilación de HSP27 es llevada a cabo por varios estímulos en los residuos de Serina 15, 78 y 82 principalmente (Katsogiannou et al., 2014). La fosforilación de HSP27 en serina 82, es la más predominante y de las más estudiadas en el cáncer (Zhang et al., 2019); dicha fosforilación fue la que identificamos en nuestro estudio.

En un trabajo realizado por Drexler y colaboradores (2020) (Drexler et al., 2020) vieron el potencial de HSP27 fosforilada y no fosforilada como predictor de supervivencia y resistencia al tratamiento a gemcitabina en adenocarcinoma ductal pancreático. En esta investigación, se demostró que una expresión baja de HSP27 se asocia a un mal pronóstico para los pacientes con esta patología, por lo que la forma no fosforilada puede servir como predicador de supervivencia. Por otra parte, no encontraron una correlación significativa con los cambios en los estados de fosforilación de HSP27 en Ser15, 78 y 82 y el diagnóstico de los pacientes (Drexler et al., 2020).

Otro estudio realizado por Liu y colaboradores (2016) (Liu et al., 2016) en pacientes con fracaso del tratamiento con recaída y metástasis en cáncer de pulmón de células no pequeñas vieron el fenómeno antiapoptótico mediado por células madre cancerosas y el posible desarrollo a la resistencia al tratamiento con cisplatino. Esta propiedad antiapoptótica y resistencia a los medicamentos mostró una sobreexpresión de HSP27 fosforilada en ser82 por la vía de MAPK p38. La hiperfosforilación de HSP27 en Ser82 estuvo estrechamente asociada a un mal pronóstico y supervivencia corta, al ser detectado en pacientes en estadios avanzados con cáncer de pulmón (Liu et al., 2016).

En un estudio realizado en el 2018, con tumores primarios de osteosarcoma se evaluó la efectividad de la Gemcitabina para promover la autofagia citotóxica y así, inducir muerte celular en este tipo de tumores. En este estudio, O´Farrill y colaboradores analizaron diferentes proteínas fosforiladas al inducir la muerte celular por Autofagia, por ejemplo, Akt, mTOR y HSP27. Al inducir la autofagia, la expresión y fosforilación de Akt y mTOR estuvieron a la baja, mientras que HSP27 fosforilado en Ser82 estaba al alza. Sus datos confirman una relación de la hiperfosforilación de HSP27 y la sensibilidad de las células con osteosarcoma para inducir la autofagia. A pesar de estos datos, la fosforilación de HSP27 y la correlación con la autofagia citotóxica no se conoce bien aún (Santiago-O'Farrill et al., 2018).

Por otra parte, el estudio de la HSP27 en CaCu es limitado hasta el momento. Se ha evaluado su expresión en tejido sano, lesiones precancerígenas y CaCu de pacientes brasileñas, donde se ha reportado una sobreexpresión conforme aumenta el grado de lesión, por lo que sugieren usar a HSP27 como biomarcador predictivo de progresión (Dobo et al., 2013). La fosforilación de HSP27 también se ha observado en cultivos celulares de HeLa. En un estudio realizado por Qi y colaboradores (2014) mostraron que la fosforilación de HSP27 en serina 78 y 82 era esencial para la activación de la proteína TRAIL (proteína ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF). Así mismo, la activación de TRAIL desencadena la

activación de la cascada de la proteína Akt mediante ERK (por sus siglas en inglés *Extracellular signal-regulated kinase*) y así la supervivencia celular y la inhibición de la apoptosis (S. Qi et al., 2014).

Interesantemente, otro estudio obtuvo resultados similares al reporte anterior. Este estudio realizado por Qi y colaboradores (2014) realizaron una versión HSP27 mutante no fosforilable en células HeLa, para ver su papel en la inhibición de la apoptosis. Este estudio indujo la apoptosis mediada por TNF- $\alpha$  e inhibiendo a las cinasas MAPKAPK2 y CMPD1 que fosforilan a HSP27. Los resultados indican que la fosforilación de HSP27 puede tener funciones dicotómicas, como antiapoptóticas cuando es fosforilado principalmente por MAPKAPK2 y como proapoptóticas cuando es fosforilado por TAK1, mostrando así sensibilidad a las células para muerte celular (Z. Qi et al., 2014).

Aunque estos datos indican que la fosforilación de HSP27 puede tener un efecto citoprotector en el CaCu, solamente se han realizado estudios en líneas celulares, por lo que interpolar estos datos en tejido de humano puede generar diferencias en su participación en la carcinogénesis del CaCu (Katsogiannou et al., 2014). Por otra parte, como ya se había descrito, nosotros identificamos la fosforilación de HSP27 en serina 82 en muestras de pacientes diagnosticadas con LIEBG y CaCu, pero en las muestras sanas no se detectó esta PTM. Por este motivo, se deberían realizar mayores estudios para conocer las funciones de HSP27 fosforilada, no solamente en serina 82, sino también en serina 15 y 78, para conocer si participan en el desarrollo y progresión del cáncer Cérvico-uterino.

Al evaluar la expresión y la fosforilación de HSP27 en serina 82 en líneas celulares derivadas de CaCu, nuestros datos dan indicio de una mayor expresión de HSP27 en células de HeLa en comparación con células C33 y SiHa. Por otra parte, la fosforilación de HSP27 en serina 82 fue mayor en células de HeLa. Curiosamente, la fosforilación en células C33, que no presentan la infección con VPH, mostro una mayor fosforilación que las células SiHa que contienen al VPH16, donde es el

genotipo más común y mayormente estudiado (Doorbar et al., 2015), por lo que aparentemente la fosforilación de S82 de HSP27 no es debida directamente por la infección por VPH. Hasta donde nos hemos informado, no hay un estudio que indique las diferencias de la expresión y de la fosforilación de HSP27 en estas tres líneas celulares, por lo que realizar más estudios para conocer el papel de HSP27 en estas líneas celulares sería de gran ayuda.

Por otra parte, después de conocer los estados de fosforilación y la expresión de HSP27 en las líneas celulares, decidimos conocer la probable red de interacción que tiene HSP27 *in silico*. Nosotros observamos la interacción con 20 proteínas (incluyendo a 11 diferentes cinasas) con dos diferentes programas. Estas predicciones ayudan a sugerir la posible participación de HSP27 en condiciones normales y patológicas. HSP27 interacciona con diferentes cinasas que promueven la inhibición de sus funciones biológicas (Kostenko & Moens, 2009). Por ejemplo, se ha reportado que HSP27 es el blanco mayormente predominante de MAPKAPK2 (MK2), la cual fosforila principalmente en serina 82 y en condiciones fisiológicamente normales promueve que se disocien los oligómeros grandes de HSP27 en respuesta a estrés (Stokoe, Engel, Campbell, Cohen, & Gaestel, 1992). A pesar de que la interacción de HSP27 con cinasas se centraliza con MK2, MAPKAPK5 (MK5), también regula de manera importante a HSP27, mediando el reordenamiento de la F-actina inducida por cAMP/PKA a través de la fosforilación de Hsp27, induciendo la organización del citoesqueleto y la migración celular (Kostenko, Johannessen, & Moens, 2009)

A pesar de que estas cinasas interaccionan con HSP27 para regularla negativamente, el papel de la fosforilación de HSP27 y con que proteínas y cinasas interacciona, además de las ya reportadas, en condiciones patológicas, como en el cáncer, aun no quedan suficientemente claras. En nuestro estudio no identificamos ninguna cinasa de las ya reportadas que interaccionan con HSP27, interesantemente, las cinasas que si encontramos por EM en nuestro estudio no han sido reportadas, hasta donde nosotros buscamos, para interaccionar con

HSP27, por lo que es posible que éstas pudieran fosforilar a HSP27 y/o a otras proteínas que participan en el desarrollo del CaCu.

El realizar mayores estudios para conocer las redes de interacción que tiene HSP27 cuando esta fosforilada en el CaCu, podría aportar conocimientos de como participa y contribuye en la progresión de la enfermedad.

Por otra parte, nosotros identificamos a dos proteínas que han sido reportadas por interaccionar con HSP27: i) la proteína asociada a choque térmico de 71KDa (HSP71 o HSC70), que fue identificada en LIEBG y CaCu en su forma no fosforilada; y ii) la proteína 1A de choque térmico de 70 kDa (*HSP72*), identificada en los tres grupos, pero solo en el grupo de LIEBG se detectó fosforilada. Interesantemente, la interacción de estas proteínas ha sido reportada en condiciones de estrés generada por infecciones virales, tales como el VPH, donde la oncoproteína E7 del VPH16 incrementa los niveles de estas HSP's, aumentando a su vez la replicación y promoviendo la oncogénesis en CaCu (Bolhassani & Agi, 2019). Aun así, faltan más estudios para tener una mejor comprensión de la interacción de estas HSPs y su participación en la progresión del CaCu.

Así, nuestros estudios sugieren la participación de clusterina y HSP27 en la progresión del CaCu, pero faltan estudios para conocer sus funciones dentro de esta patología.

Por otra parte, identificamos 46 fosfoproteínas que se encontraban en ambos grupos, LIEBG y CaCu. Decidimos en este análisis filtrar las fosfoproteínas a partir de su localización y función. Este análisis condujo a tres fosfoproteínas destacadas: la proteína 9 de anclaje a la cinasa-A (AKAP9), anexina 11 y fibronectina.

Con base en los datos de la plataforma Phosphosite.org (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>) observamos que AKAP9 contiene 87 fosfositos registrados, en donde 58 eran fosfositos en residuos de serina,

nosotros identificamos a AKAP9 con fosforilación en cuatro fosfositos diferentes en el grupo de LIEBG, en donde un fosfosito es nuevo y uno ya reportado previamente, mientras que en el grupo de CaCu los dos fosfositos identificados son nuevos sitios detectados.

AKAP9 contribuye de manera crucial en el control de la señalización en el espacio y tiempo dentro de la célula. Regula la señalización de AMPc a partir de su activación por ligandos extracelulares por los receptores acoplados a la proteína G (*GPCRs*). (Tröger, Moutty, Skroblin, & Klussmann, 2012). La proteína AKAP9 está ampliamente relacionadas a diferentes patologías y en una variedad de cánceres, en donde su sobreexpresión esta asociada con un aumento en el riesgo del desarrollo de cáncer de mama (Frank et al., 2008). A pesar de que ha sido reportada su sobreexpresión, hasta donde nosotros hemos investigado, no existe reporte de la relación de AKAP9 y el impacto de su fosforilación, por lo que sería un blanco interesante para futuras investigaciones.

Fibronectina fue otra de las fosfoproteínas destacadas que se superponían en LIEBG y CaCu. Fibronectina es una glucoproteína ubicada en la matriz extracelular y en condiciones normales participa en diferentes procesos biológicos, como crecimiento celular, diferenciación, migración y adicionalmente en la cicatrización y coagulación (Wang & Hielscher, 2017). En condiciones anormales, la sobreexpresión de fibronectina participa en la generación de enfermedades como en el cáncer, aumentando la activación de vías de señalización que promueven el crecimiento tumoral, la migración e invasión, además, limita la respuesta al tratamiento, generando quimiorresistencia (Eke, Storch, Krause, & Cordes, 2013) en cáncer de mama (Pontiggia et al., 2012) y cáncer de ovario (Kenny et al., 2014; Mitra et al., 2011). Aunque hay reportes de la participación de fibronectina en el cáncer, hasta donde nosotros hemos investigado, no encontramos algún reporte del efecto de la fosforilación de fibronectina en cáncer y en CaCu.

La última fosfoproteína que destacamos fue anexina 11. A partir de los datos de la plataforma Phosphosite.org (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>),

observamos que anexina 11 presenta 15 fosfositios, en donde 4 son en residuos de serina. Nosotros identificamos cuatro fosfositios (1 en el grupo de LIEBG y 3 en CaCu), donde los cuatro no habían sido reportados previamente (S241 en CaCu, S349 en ambos y S377 en CaCu). Anexina 11 es una proteína de unión a fosfolípidos que es regulada por calcio, donde participa en diferentes procesos biológicos, como ciclo celular, exocitosis y apoptosis (Mirzaei, Gidfar, Vu, & Schraufnagel, 2016), y su sobreexpresión está estrechamente relacionado a la regulación del sistema inmune y a enfermedades autoinmunes (Eberhard, Karns, VandenBerg, & Creutz, 2001). Se ha reportado la desregulación de anexina 11 en enfermedades como diabetes y cáncer (Bastian, 1997). Anexina A11 está directamente involucrada en la proliferación celular en el cáncer de ovario y está asociado con la resistencia al tratamiento con cisplatino (Song, Shih le, Chan, & Zhang, 2009). Anexina 11 también juega un papel crítico en la regulación de la proliferación, migración e invasión del cáncer gástrico a través de la vía AKT/GSK-3 $\beta$  y potencialmente se puede utilizar como factor pronóstico y diana terapéutica para pacientes con cáncer gástrico (Hua et al., 2018). Los trabajos anteriores evalúan la expresión de anexina 11 y su participación en diferentes tipos de cáncer, pero no la relación de la fosforilación de esta proteína y su participación en la tumorigénesis. El fosfositio de tirosina 482 en anexina 11 es el más identificado mediante espectrometría de masas (178 reportes diferentes) y se ha detectado en muestras con cáncer de mama, colorectal, hepatocelular, pulmón, gástrico, hígado y leucemia, pero no se ha investigado el efecto de la fosforilación de anexina 11. Además, tampoco se ha analizado su participación en la progresión del CaCu.

Por último, identificamos 198 fosfoproteínas que se encontraban en las fosfoproteínas exclusivas del grupo de CaCu. Decidimos en este análisis filtrar las fosfoproteínas a partir de su localización y función mediante el sistema de PANTHER. Este análisis condujo a que se encontraran fosfoproteínas candidatas que participaban en los varios procesos, por ejemplo, identificamos en “clase de proteínas” a diferentes enzimas modificadoras de proteínas; en la “función molecular” estaban las proteínas con actividad catalítica; y de “proceso biológico” a

las proteínas de regulación y fase biológica, específicamente en el ciclo celular. Dicho análisis guió al menos cuatro fosforproteínas candidatas, estas fueron : Metiltransferasas de la familia de receptores nucleares que contiene dominios SET (NSD) SETD2 y NSD1, la ubiquitin ligasa RAD18 y acetiltransferasa de lisina KAT6A.

La modificación de histonas es un proceso importante en la regulación epigenética que controla la estructura de la cromatina y la transcripción génica (R. Chen, Zhao, Fang, Yang, & Ji, 2020). Las modificaciones posttraduccionales en las histonas son la acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación y ADN ribosilación, siendo el residuo de lisina el que mas modificaciones sufre. La metilación es la modificación de histonas biologicamente más importante (Ramazi & Zahiri, 2021), se asocia con el ajuste fino de varios procesos biológicos que van desde la regulación transcripcional hasta el silenciamiento epigenético y de manera aberrante conduce a diferentes enfermedades que pueden facilitar procesos oncológicos (R. Chen et al., 2020). Las metiltransferasas de lisina (*KMT* por sus siglas en inglés) catalizan la adición del grupo metilo en el residuo de lisina y pueden realizar la mono-, di- o trimetilación en las histonas 3 y 4 en diferentes residuos. En la lisina 36 de la histona 3 (H3K36) puede llevarse en los tres niveles de metilación, la proteína NSD1 cataliza la mono- y dimetilación, mientras que la proteína SETD2 realiza la trimetilación (Tang, Luo, & Lu, 2015).

Ambas metiltransferasas (NSD1 y SETD2) están involucradas en el cáncer, por ejemplo, la expresión aberrante de NSD1 con supuestas microdeleciones, es asociada con pérdida de función en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y pulmón, neuroblastoma, glioblastoma y carcinoma de células renales (Tauchmann & Schwaller, 2021). La mutación, o pérdida funcional de SETD2 produce disfunción en las proteínas del tejido tumoral correspondiente, lo que conduce a la tumorigénesis, progresión, resistencia a la quimioterapia y pronóstico desfavorable (R. Chen et al., 2020) en una serie de cánceres sólidos, incluidos el cáncer renal, el cáncer gastrointestinal, el cáncer de pulmón, el cáncer de páncreas,

el osteosarcoma, etc., por lo que sugiere que SETD2 posiblemente actúe como supresor tumoral (R. Chen et al., 2020).

Nosotros identificamos a NSD1 en el grupo de pacientes diagnosticadas con CaCu. Los peptidos fosforilados identificados se localizan en los residuos S2194 siendo un residuo que no ha sido reportado anteriormente en la base de datos de phosphosite.org. El residuo S2471 es el más identificado mediante espectrometría de masas (32 reportes) y se ha detectado en muestras con cancer de mama, colorectal, hepatocelular, pulmón, gástrico, hígado y leucemia, pero no se ha investigado el efecto de la fosforilación de NSD1 en cáncer.

Por otro lado, también identificamos a SETD2 en el grupo de pacientes diagnosticadas con CaCu, identificando tres fosfositos no reportados previamente S360, S367 y S718. El residuo de S2082 y S2080 son los más reportados (73 y 71 reportes respectivamente) en muestras con cancer de mama, colorectal, hepatocelular, pulmón, gástrico, hígado y leucemia, sin embargo, no se ha investigado la relación de la fosforilación en SETD2 y en el cáncer.

Las funciones de las metiltransferasas en el desarrollo y progresión del CaCu ha sido poco explorada. Un estudio realizado en el 2012, muestra la interacción de la oncoproteína E6 de VPH AR y BR con diferentes metiltransferasas regulando negativamente sus actividades enzimáticas en células HeLa. Las metiltransferasas fueron CARM1 y PRMT1 que catalizan la mono y dimetilación en argininas, y SET7 que monometila a la lisina 4 en la histona 3 (H3K4). En conjunto, la interacción de SET7 y la oncoproteína E6 promueve la metilación de p53 en K372 regulando negativamente la estabilidad de p53 y, por lo tanto, suprime la expresión de genes regulados por p53 (Hsu et al., 2012). Este hallazgo demuestra la modulación de los mecanismos de regulación epigenética por una oncoproteína viral. Sin embargo, hasta donde nosotros hemos investigado, no encontramos algún reporte del efecto de la fosforilación de NSD1 y SETD2 en cáncer y si existe una interacción con las oncoproteínas del VPH en el desarrollo y progresión del CaCu.

Otra modificación común en histonas es la acetilación, que se realiza en residuos de lisina, y que está involucrada en procesos celulares clave, incluyendo transcripción, reparación del daño al ADN, metabolismo, proliferación celular, mitosis, transducción de señales, plegamiento de proteínas y autofagia (Ramazi & Zahiri, 2021). Las acetiltransferasas KAT6 acetilan tanto a la histona H3 como a proteínas no histonas. En este sentido, las acetiltransferasas KAT6 desempeñan un papel clave en la regulación de la transcripción, varios procesos de desarrollo, el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y neurales, la regulación de la diferenciación de las células hematopoyéticas, la progresión del ciclo celular y la mitosis (Wiesel-Motiuk & Assaraf, 2020). La acetilación aberrante de histonas puede conducir a la tumorigénesis y la progresión del cáncer, actualmente está claro que la desregulación de la expresión de las proteínas KAT6 apoya la progresión tumoral (Trisciuglio, Di Martile, & Del Bufalo, 2018).

KAT6A es crucial en varios tipos de cáncer, en los que promueve la proliferación de células tumorales y el crecimiento tumoral (Wiesel-Motiuk & Assaraf, 2020). Además, se ha encontrado desregulado con una expresión aberrante en cáncer de mama, glioblastoma, ovario, meduloblastoma, melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, varios adenocarcinomas y CaCu (Jiang et al., 2020). Por otro lado, KAT6A regula la proliferación de células tumorales, la supervivencia celular y la migración mediante la fosforilación de la vía PI3K/Akt (Trisciuglio et al., 2018).

La participación de KAT6A en el desarrollo y la progresión del CaCu, hasta donde nosotros hemos investigado, no encontramos algún reporte; sin embargo, se necesitan más investigación para conocer su función dentro de esta enfermedad. Nosotros identificamos a KAT6A fosforilado en dos fosfositos S831 y S855, los cuales no han sido reportados hasta el momento en el grupo de pacientes de CaCu. La fosforilación en el fosfositio S1089 es el más reportado hasta el momento (38 reportes) de acuerdo a los datos de phosphosite.org, y ha sido reportada en muestras con cancer de mama, colorectal, hepatocelular, pulmón, gástrico, cérvico-uterino pero sin investigar el efecto de la fosforilación dentro del cáncer.

También identificamos a otra enzima que participa en las modificaciones posttraduccionales de las proteínas, nosotros detectamos en el grupo de pacientes diagnosticadas CaCu a la proteína ligasa de ubiquitina E3 RAD18. Esta proteína pertenece a la familia de enzimas que se unen en una cascada de ubiquitinación de tres enzimas junto con la enzima activadora de ubiquitina E1 y la enzima conjugadora de ubiquitina E2. Las ligasas de ubiquitina E3 desempeñan un papel esencial al catalizar el proceso de ubiquitinación y transferir la proteína de ubiquitina para unir el sitio de lisina de sustratos dirigidos (Yang, Zhao, Chen, & Wang, 2021). Las ligasas de ubiquitina E3 podrían estar involucradas en la regulación de varios procesos biológicos y respuestas celulares a la señal de estrés asociada con el desarrollo del cáncer (Z. Lou & S. Wang, 2014). Las ligasas de ubiquitina E3 están significativamente involucradas en procesos de la progresión del cáncer, como la proliferación, la invasión, la apoptosis, el daño y la reparación del ADN, el metabolismo, la inmunidad y muchos otros aspectos (Yang et al., 2021). Un estudio realizado en 2020, observó que la ligasa de ubiquitina E3 RAD18 se encuentra sobre expresada en tejidos de pacientes con cáncer gástrico proponiendo a RAD18 como un marcador útil de progresión y mal pronóstico, y un potencial blanco para estrategias terapéuticas contra el cáncer gástrico (Baatar et al., 2020). Otro estudio realizado en el 2021, observó que RAD18 promueve un modo de replicación del ADN tolerante al daño y propenso a errores, denominado síntesis de translesión que se activa patológicamente en el cáncer, así, modula la elección de la vía de reparación del ADN en las células neoplásicas (Lou et al., 2021).

En el CaCu, se ha demostrado que las proteínas del VPH desarrollan diferentes estrategias para utilizar el sistema de ubiquitina para sus propios fines. Hasta la fecha se conocen algunas interacciones de los ligasas de ubiquitina E3 y las oncoproteínas E6, E7, E5 y E2, por ejemplo, la interacción de la ligasa culina con la oncoproteína E7 promueve la degradación aberrante de pRb, o la interacción de la oncoproteína E5 con c-Cbl, irrumpiendo la ubiquitinación del receptor del factor de crecimiento epidérmico activado (EGFR) y regulando a la alza la transducción de

señales mediada por EGFR (Zhifeng Lou & Sheng Wang, 2014). Sin embargo, hasta donde nosotros hemos investigado, no encontramos algún reporte sobre la posible participación de RAD18 en el desarrollo y progresión del CaCu.

Por otra parte, nosotros identificamos a RAD18 fosforilado en S348, mientras que el fosfositio S471 es el mayor reportado en serina (56 reportes/ la fosforilación en Tirosina 56 es la mayor reportada con 62 reportes), según los datos de Phosphosite. A pesar de ello, hasta donde nosotros hemos investigado, no encontramos reportes del efecto de la fosforilación de RAD18 en el cáncer y en el CaCu.

Las fosfoproteínas seleccionadas en cada análisis tienen potencial para evaluar su posible participación en la carcinogénesis del CaCu. Una comprensión más profunda de los efectos de la fosforilación en estas fosfoproteínas ayudará, primero a entender los mecanismos moleculares que ocupa el VPH en el desarrollo y progresión del CaCu, y encontrar nuevas estrategias de diagnóstico, de pronóstico y el crecimiento de blancos terapéuticos.

## **CONCLUSIONES**

1. Se encontró una correlación entre el aumento de la fosforilación de proteínas en residuos de serina y la progresión del CaCu
2. Entre las proteínas fosforiladas en residuos de serina, se detectaron principalmente proteínas de andamiaje.
3. Se detectaron 16 proteínas fosforiladas en residuos de serina en LIEBG y CaCu, pero sin esta MPT en muestras sanas. Las fosfoproteínas candidatas, identificadas exclusivamente en LIEBG y CaCu o sólo en CaCu, posiblemente participan en la generación de lesiones precancerígenas y en la progresión a CaCu.

## **PERSPECTIVAS**

Como perspectivas de este trabajo consideramos identificar experimentalmente las interacciones de HSP27 y Clusterina fosforiladas en las diferentes líneas celulares derivadas de CaCu y en las muestras precancerígenas (LIEBG y LIEAG) y CaCu, así como determinar que funciones pueden tener en la progresión del CaCu.

## REFERENCIAS

- Abe, Y., Hirano, H., Shoji, H., Tada, A., Isoyama, J., Kakudo, A., . . . Tomonaga, T. (2020). Comprehensive characterization of the phosphoproteome of gastric cancer from endoscopic biopsy specimens. *Theranostics*, *10*(5), 2115-2129. doi:10.7150/thno.37623
- Acunzo, J., Andrieu, C., Baylot, V., So, A., & Rocchi, P. (2014). Hsp27 as a therapeutic target in cancers. *Curr Drug Targets*, *15*(4), 423-431. doi:10.2174/13894501113146660230
- Aldaco-Sarvide, F., PÉrez-PÉrez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A. A., Cabrera-Galeana, P. A., . . . Cárdenas-Cárdenas, E. (2019). Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gaceta Mexicana de Oncología*.
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., & Bray, F. (2020). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet. Global health*, *8*(2), e191-e203. doi:10.1016/S2214-109X(19)30482-6
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Lo Muzio, L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*, *40*(2), 271-280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036
- Baatar, S., Bai, T., Yokobori, T., Gombodorj, N., Nakazawa, N., Ubukata, Y., . . . Saeki, H. (2020). High RAD18 Expression is Associated with Disease Progression and Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*, *27*(11), 4360-4368. doi:10.1245/s10434-020-08518-2
- Balasubramaniam, S. D., Balakrishnan, V., Oon, C. E., & Kaur, G. (2019). Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)*, *55*(7). doi:10.3390/medicina55070384
- Bastian, B. C. (1997). Annexins in cancer and autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci*, *53*(6), 554-556. doi:10.1007/s000180050071
- Bian, Y., Song, C., Cheng, K., Dong, M., Wang, F., Huang, J., . . . Zou, H. (2014). An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J Proteomics*, *96*, 253-262. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.014
- Bolhassani, A., & Agi, E. (2019). Heat shock proteins in infection. *Clin Chim Acta*, *498*, 90-100. doi:10.1016/j.cca.2019.08.015
- Borroni, E. M., Cancellieri, C., Vacchini, A., Benureau, Y., Lagane, B., Bachelier, F., . . . Locati, M. (2013).  $\beta$ -arrestin-dependent activation of the cofilin pathway is required for the scavenging activity of the atypical chemokine receptor D6. *Sci Signal*, *6*(273), ra30.31-11, S31-33. doi:10.1126/scisignal.2003627
- Boulikas, T. (1994). Control of DNA replication by protein phosphorylation. *Anticancer Res*, *14*(6b), 2465-2472.
- 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 Cancer J Clin*, *68*(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brianti, P., De Flaminio, E., & Mercuri, S. R. (2017). Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol*, *40*(2), 80-85.

- Chang, C. Y., Leu, J. D., & Lee, Y. J. (2015). The actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin signaling pathway and DNA damage responses in cancer. *Int J Mol Sci*, *16*(2), 4095-4120. doi:10.3390/ijms16024095
- Chen, J., Wang, M., & Turko, I. V. (2012). Mass spectrometry quantification of clusterin in the human brain. *Mol Neurodegener*, *7*, 41. doi:10.1186/1750-1326-7-41
- Chen, Q. F., Chang, L., Su, Q., Zhao, Y., & Kong, B. (2021). Clinical importance of serum secreted clusterin in predicting invasive breast cancer and treatment responses. *Bioengineered*, *12*(1), 278-285. doi:10.1080/21655979.2020.1868732
- Chen, R., Zhao, W.-Q., Fang, C., Yang, X., & Ji, M. (2020). Histone methyltransferase SETD2: a potential tumor suppressor in solid cancers. *Journal of Cancer*, *11*(11), 3349-3356. doi:10.7150/jca.38391
- Choi, Y. J., & Park, J. S. (2016). Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *Journal of gynecologic oncology*, *27*(2), e21-e21. doi:10.3802/jgo.2016.27.e21
- Chokchaichamnankit, D., Watcharatanyatip, K., Subhasitanont, P., Weeraphan, C., Keeratchamroen, S., Sritana, N., . . . Srisomsap, C. (2019). Urinary biomarkers for the diagnosis of cervical cancer by quantitative label-free mass spectrometry analysis. *Oncology letters*, *17*(6), 5453-5468. doi:10.3892/ol.2019.10227
- Ciftci, H. I., Can, M., Ellakwa, D. E., Suner, S. C., Ibrahim, M. A., Oral, A., . . . Radwan, M. O. (2020). Anticancer activity of Turkish marine extracts: a purple sponge extract induces apoptosis with multitarget kinase inhibition activity. *Invest New Drugs*, *38*(5), 1326-1333. doi:10.1007/s10637-020-00911-8
- Cohen, P. (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem*, *268*(19), 5001-5010. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02473.x
- de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet. Global health*, *8*(2), e180-e190. doi:10.1016/s2214-109x(19)30488-7
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*(1), 17-27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- Deb, B., Sengupta, P., Sambath, J., & Kumar, P. (2020). Bioinformatics Analysis of Global Proteomic and Phosphoproteomic Data Sets Revealed Activation of NEK2 and AURKA in Cancers. *Biomolecules*, *10*(2). doi:10.3390/biom10020237
- Dobo, C., Stavale, J. N., Lima Fde, O., Ribeiro, D. A., Arias, V., Gomes, T. S., & Oshima, C. T. (2013). HSP27 is commonly expressed in cervical intraepithelial lesions of Brazilian women. *Asian Pac J Cancer Prev*, *14*(9), 5007-5010. doi:10.7314/apjcp.2013.14.9.5007
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, *25 Suppl 1*, 2-23. doi:10.1002/rmv.1822

- Drexler, R., Wagner, K. C., Küchler, M., Feyerabend, B., Kleine, M., & Oldhafer, K. J. (2020). Significance of unphosphorylated and phosphorylated heat shock protein 27 as a prognostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, *146*(5), 1125-1137. doi:10.1007/s00432-020-03175-0
- Dubrez, L., Causse, S., Borges Bonan, N., Dumétier, B., & Garrido, C. (2020). Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. *Oncogene*, *39*(3), 516-529. doi:10.1038/s41388-019-1016-y
- Eberhard, D. A., Karns, L. R., VandenBerg, S. R., & Creutz, C. E. (2001). Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci*, *114*(Pt 17), 3155-3166.
- Eke, I., Storch, K., Krause, M., & Cordes, N. (2013). Cetuximab attenuates its cytotoxic and radiosensitizing potential by inducing fibronectin biosynthesis. *Cancer Res*, *73*(19), 5869-5879. doi:10.1158/0008-5472.Can-13-0344
- Feng, T., Zheng, L., Liu, F., Xu, X., Mao, S., Wang, X., . . . Tang, W. (2016). Growth factor progranulin promotes tumorigenesis of cervical cancer via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Oncotarget*, *7*(36), 58381-58395. doi:10.18632/oncotarget.11126
- Ferlay J, E. M., Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today>
- Fife, C. M., McCarroll, J. A., & Kavallaris, M. (2014). Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British journal of pharmacology*, *171*(24), 5507-5523. doi:10.1111/bph.12704
- Frank, B., Wiestler, M., Kropp, S., Hemminki, K., Spurdle, A. B., Sutter, C., . . . Burwinkel, B. (2008). Association of a Common AKAP9 Variant With Breast Cancer Risk: A Collaborative Analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *100*(6), 437-442. doi:10.1093/jnci/djn037
- Geromanos, S. J., Hughes, C., Golick, D., Ciavarini, S., Gorenstein, M. V., Richardson, K., . . . Langridge, J. I. (2011). Simulating and validating proteomics data and search results. *Proteomics*, *11*(6), 1189-1211. doi:10.1002/pmic.201000576
- Gómez-Dantés, H., Lamadrid-Figueroa, H., Cahuana-Hurtado, L., Silverman-Retana, O., Montero, P., González-Robledo, M. C., . . . Lozano, R. (2016). The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Publica Mex*, *58*(2), 118-131. doi:10.21149/spm.v58i2.7780
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hoover, R. N., Hyer, M., Pfeiffer, R. M., Adam, E., Bond, B., Cheville, A. L., . . . Troisi, R. (2011). Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *N Engl J Med*, *365*(14), 1304-1314. doi:10.1056/NEJMoa1013961
- Hoter, A., & Naim, H. Y. (2019). Heat Shock Proteins and Ovarian Cancer: Important Roles and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*, *11*(9). doi:10.3390/cancers11091389
- Hsu, C. H., Peng, K. L., Jhang, H. C., Lin, C. H., Wu, S. Y., Chiang, C. M., . . . Juan, L. J. (2012). The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for

- modulating specific gene transcription. *Oncogene*, 31(18), 2335-2349. doi:10.1038/onc.2011.415
- Hua, K., Li, Y., Zhao, Q., Fan, L., Tan, B., & Gu, J. (2018). Downregulation of Annexin A11 (ANXA11) Inhibits Cell Proliferation, Invasion, and Migration via the AKT/GSK-3 $\beta$  Pathway in Gastric Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 149-160. doi:10.12659/msm.905372
- Irish, J. M., Hovland, R., Krutzik, P. O., Perez, O. D., Bruserud, O., Gjertsen, B. T., & Nolan, G. P. (2004). Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*, 118(2), 217-228. doi:10.1016/j.cell.2004.06.028
- Jiang, Y., Guo, X., Liu, L., Rode, S., Wang, R., Liu, H., & Yang, Z. Q. (2020). Metagenomic characterization of lysine acetyltransferases in human cancer and their association with clinicopathologic features. *Cancer Sci*, 111(5), 1829-1839. doi:10.1111/cas.14385
- Jin, J., Kim, J. M., Hur, Y. S., Cho, W. P., Lee, K. Y., Ahn, S. I., . . . Park, I. S. (2012). Clinical significance of clusterin expression in pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg Oncol*, 10, 146. doi:10.1186/1477-7819-10-146
- Katsogiannou, M., Andrieu, C., & Rocchi, P. (2014). Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front Genet*, 5, 346. doi:10.3389/fgene.2014.00346
- Kazuno, S., Fujimura, T., Fujime, M., Miura, Y., & Ueno, T. (2021). O-glycosylated clusterin as a sensitive marker for diagnosing early stages of prostate cancer. *Prostate*, 81(3), 170-181. doi:10.1002/pros.24094
- Kenny, H. A., Chiang, C. Y., White, E. A., Schryver, E. M., Habis, M., Romero, I. L., . . . Lengyel, E. (2014). Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J Clin Invest*, 124(10), 4614-4628. doi:10.1172/jci74778
- Kim, M. J., Choi, M. Y., Lee, D. H., Roh, G. S., Kim, H. J., Kang, S. S., . . . Choi, W. S. (2018). O-linked N-acetylglucosamine transferase enhances secretory clusterin expression via liver X receptors and sterol response element binding protein regulation in cervical cancer. *Oncotarget*, 9(4), 4625-4636. doi:10.18632/oncotarget.23588
- Kim, T. J., Lee, J. W., Song, S. Y., Choi, J. J., Choi, C. H., Kim, B. G., . . . Bae, D. S. (2006). Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Br J Cancer*, 94(11), 1678-1682. doi:10.1038/sj.bjc.6603180
- Kostenko, S., Johannessen, M., & Moens, U. (2009). PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cell Signal*, 21(5), 712-718. doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.009
- Kostenko, S., & Moens, U. (2009). Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci*, 66(20), 3289-3307. doi:10.1007/s00018-009-0086-3
- Li, G. Z., Vissers, J. P., Silva, J. C., Golick, D., Gorenstein, M. V., & Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*, 9(6), 1696-1719. doi:10.1002/pmic.200800564

- Liu, C. L., Chen, S. F., Wu, M. Z., Jao, S. W., Lin, Y. S., Yang, C. Y., . . . Nieh, S. (2016). The molecular and clinical verification of therapeutic resistance via the p38 MAPK-Hsp27 axis in lung cancer. *Oncotarget*, 7(12), 14279-14290. doi:10.18632/oncotarget.7306
- Lou, J., Yang, Y., Gu, Q., Price, B. A., Qiu, Y., Fedoriw, Y., . . . Wu, D. (2021). Rad18 mediates specific mutational signatures and shapes the genomic landscape of carcinogen-induced tumors in vivo. *NAR Cancer*, 3(1), zcaa037. doi:10.1093/narcan/zcaa037
- Lou, Z., & Wang, S. (2014). E3 ubiquitin ligases and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Journal of International Medical Research*, 42(2), 247-260. doi:10.1177/0300060513506655
- Lou, Z., & Wang, S. (2014). E3 ubiquitin ligases and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *J Int Med Res*, 42(2), 247-260. doi:10.1177/0300060513506655
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Makridakis, M., Roubelakis, M. G., Bitsika, V., Dimuccio, V., Samiotaki, M., Kossida, S., . . . Vlahou, A. (2010). Analysis of secreted proteins for the study of bladder cancer cell aggressiveness. *J Proteome Res*, 9(6), 3243-3259. doi:10.1021/pr100189d
- Mann, M., Ong, S. E., Gronborg, M., Steen, H., Jensen, O. N., & Pandey, A. (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol*, 20(6), 261-268.
- Mertins, P., Mani, D. R., Ruggles, K. V., Gillette, M. A., Clauser, K. R., Wang, P., . . . Carr, S. A. (2016). Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*, 534(7605), 55-62. doi:10.1038/nature18003
- Mexico. Retrieved from <https://relief.unboundmedicine.com/relief/view/cdc-yellow-book/204088/all/Mexico>
- Mirsaiedi, M., Gidfar, S., Vu, A., & Schraufnagel, D. (2016). Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *J Transl Med*, 14, 89. doi:10.1186/s12967-016-0843-7
- Mitra, A. K., Sawada, K., Tiwari, P., Mui, K., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*, 30(13), 1566-1576. doi:10.1038/onc.2010.532
- Moreno, V., Bosch, F. X., Muñoz, N., Meijer, C. J., Shah, K. V., Walboomers, J. M., . . . Franceschi, S. (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 359(9312), 1085-1092. doi:10.1016/s0140-6736(02)08150-3
- Moses, C., Garcia-Bloj, B., Harvey, A. R., & Blancafort, P. (2018). Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *Eur J Cancer*, 93, 10-18. doi:10.1016/j.ejca.2018.01.002
- Moye-Holz, D., Dreser, A., van Dijk, J. P., Reijneveld, S. A., & Hogerzeil, H. V. (2020). Access to cancer medication in public hospitals in a middle-income country: The view of stakeholder. *Res Social Adm Pharm*, 16(9), 1255-1263. doi:10.1016/j.sapharm.2019.11.015

- Nascimento, A. S., Peres, L. L., Fari, A. V. S., Milani, R., Silva, R. A., da Costa Fernandes, C. J., . . . Zambuzzi, W. F. (2017). Phosphoproteome profiling reveals critical role of JAK-STAT signaling in maintaining chemoresistance in breast cancer. *Oncotarget*, *8*(70), 114756-114768. doi:10.18632/oncotarget.21801
- Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2015). The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol*, *123*(5), 271-281. doi:10.1002/cncy.21521
- Olusola, P., Banerjee, H. N., Phillely, J. V., & Dasgupta, S. (2019). Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. *Cells*, *8*(6). doi:10.3390/cells8060622
- Pappa, K. I., Lygirou, V., Kontostathi, G., Zoidakis, J., Makridakis, M., Vougas, K., . . . Anagnostou, N. P. (2017). Proteomic Analysis of Normal and Cancer Cervical Cell Lines Reveals Deregulation of Cytoskeleton-associated Proteins. *Cancer Genomics Proteomics*, *14*(4), 253-266. doi:10.21873/cgp.20036
- Park, D. C., Yeo, S. G., Shin, E. Y., Mok, S. C., & Kim, D. H. (2006). Clusterin confers paclitaxel resistance in cervical cancer. *Gynecol Oncol*, *103*(3), 996-1000. doi:10.1016/j.ygyno.2006.06.037
- Peng, M., Deng, J., Zhou, S., Tao, T., Su, Q., Yang, X., & Yang, X. (2019). The role of Clusterin in cancer metastasis. *Cancer management and research*, *11*, 2405-2414. doi:10.2147/CMAR.S196273
- Pontiggia, O., Sampayo, R., Raffo, D., Motter, A., Xu, R., Bissell, M. J., . . . Simian, M. (2012). The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through  $\beta$ 1 integrin. *Breast Cancer Res Treat*, *133*(2), 459-471. doi:10.1007/s10549-011-1766-x
- Qi, S., Xin, Y., Qi, Z., Xu, Y., Diao, Y., Lan, L., . . . Yin, Z. (2014). HSP27 phosphorylation modulates TRAIL-induced activation of Src-Akt/ERK signaling through interaction with  $\beta$ -arrestin2. *Cell Signal*, *26*(3), 594-602. doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.033
- Qi, Z., Shen, L., Zhou, H., Jiang, Y., Lan, L., Luo, L., & Yin, Z. (2014). Phosphorylation of heat shock protein 27 antagonizes TNF- $\alpha$  induced HeLa cell apoptosis via regulating TAK1 ubiquitination and activation of p38 and ERK signaling. *Cell Signal*, *26*(7), 1616-1625. doi:10.1016/j.cellsig.2014.03.015
- Rader, J. S., Malone, J. P., Gross, J., Gilmore, P., Brooks, R. A., Nguyen, L., . . . Townsend, R. R. (2008). A unified sample preparation protocol for proteomic and genomic profiling of cervical swabs to identify biomarkers for cervical cancer screening. *Proteomics Clin Appl*, *2*(12), 1658-1669. doi:10.1002/prca.200780146
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, *2021*. doi:10.1093/database/baab012
- Rizzi, F., & Bettuzzi, S. (2008). Targeting Clusterin in prostate cancer. *J Physiol Pharmacol*, *59 Suppl 9*, 265-274.
- Robinson-Bennett, B. L., Deford, J., Diaz-Arrastia, C., Levine, L., Wang, H. Q., Hannigan, E. V., & Papaconstantinou, J. (2008). Implications of tyrosine

- phosphoproteomics in cervical carcinogenesis. *J Carcinog*, 7, 2. doi:10.1186/1477-3163-7-2
- Rodríguez-Rivera, C., Garcia, M. M., Molina-Álvarez, M., González-Martín, C., & Goicoechea, C. (2021). Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 134, 111174. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111174>
- Rogerson, D. T., Sachdeva, A., Wang, K., Haq, T., Kazlauskaitė, A., Hancock, S. M., . . . Chin, J. W. (2015). Efficient genetic encoding of phosphoserine and its nonhydrolyzable analog. *Nat Chem Biol*, 11(7), 496-503. doi:10.1038/nchembio.1823
- Rohne, P., Prochnow, H., & Koch-Brandt, C. (2016). The CLU-files: disentanglement of a mystery. *Biomol Concepts*, 7(1), 1-15. doi:10.1515/bmc-2015-0026
- Rush, J., Moritz, A., Lee, K. A., Guo, A., Goss, V. L., Spek, E. J., . . . Comb, M. J. (2005). Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol*, 23(1), 94-101. doi:10.1038/nbt1046
- Saini, J., & Sharma, P. K. (2018). Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. *Curr Drug Targets*, 19(13), 1478-1490. doi:10.2174/1389450118666170823121248
- Sánchez-Anguiano, L. F., Alvarado-Esquivel, C., Reyes-Romero, M. A., & Carrera-Rodríguez, M. (2006). Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC infectious diseases*, 6, 27-27. doi:10.1186/1471-2334-6-27
- Santiago-O'Farrill, J. M., Kleinerman, E. S., Hollomon, M. G., Livingston, A., Wang, W. L., Tsai, J. W., & Gordon, N. B. (2018). Phosphorylated heat shock protein 27 as a potential biomarker to predict the role of chemotherapy-induced autophagy in osteosarcoma response to therapy. *Oncotarget*, 9(2), 1602-1616. doi:10.18632/oncotarget.20308
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), S166-S171. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457744942008>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1(6), 2856-2860. doi:10.1038/nprot.2006.468
- Silva, J. C., Gorenstein, M. V., Li, G. Z., Vissers, J. P., & Geromanos, S. J. (2006). Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics*, 5(1), 144-156. doi:10.1074/mcp.M500230-MCP200
- Singh, V., Ram, M., Kumar, R., Prasad, R., Roy, B. K., & Singh, K. K. (2017). Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J*, 36(1), 1-6. doi:10.1007/s10930-017-9696-z
- Song, J., Shih le, M., Chan, D. W., & Zhang, Z. (2009). Suppression of annexin A11 in ovarian cancer: implications in chemoresistance. *Neoplasia*, 11(6), 605-614, 601 p following 614. doi:10.1593/neo.09286
- Sophonithprasert, T., Mahabusarakam, W., Nakamura, Y., & Watanapokasin, R. (2017). Goniotalamin induces mitochondria-mediated apoptosis associated

- with endoplasmic reticulum stress-induced activation of JNK in HeLa cells. *Oncology letters*, 13(1), 119-128. doi:10.3892/ol.2016.5381
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., & Gaestel, M. (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett*, 313(3), 307-313. doi:10.1016/0014-5793(92)81216-9
- Tang, M., Luo, H., & Lu, J. (2015). Chapter 12 - Genetically altered cancer epigenome. In S. Huang, M. D. Litt, & C. A. Blakey (Eds.), *Epigenetic Gene Expression and Regulation* (pp. 265-289). Oxford: Academic Press.
- Tauchmann, S., & Schwaller, J. (2021). NSD1: A Lysine Methyltransferase between Developmental Disorders and Cancer. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(9), 877. doi:10.3390/life11090877
- Tiwari, R., Sahu, I., Soni, B. L., Sathe, G. J., Datta, K. K., Thapa, P., . . . Vaidya, M. M. (2017). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling pathways regulated by site-specific phosphorylation of Keratin-8 in skin squamous cell carcinoma derived cell line. *Proteomics*, 17(7). doi:10.1002/pmic.201600254
- Trisciuglio, D., Di Martile, M., & Del Bufalo, D. (2018). Emerging Role of Histone Acetyltransferase in Stem Cells and Cancer. *Stem Cells Int*, 2018, 8908751. doi:10.1155/2018/8908751
- Tröger, J., Moutty, M. C., Skroblin, P., & Klussmann, E. (2012). A-kinase anchoring proteins as potential drug targets. *British journal of pharmacology*, 166(2), 420-433. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01796.x
- Valentine, S. J., Ewing, M. A., Dilger, J. M., Glover, M. S., Geromanos, S., Hughes, C., & Clemmer, D. E. (2011). Using ion mobility data to improve peptide identification: intrinsic amino acid size parameters. *J Proteome Res*, 10(5), 2318-2329. doi:10.1021/pr1011312
- Vazquez, A., Kamphorst, J. J., Markert, E. K., Schug, Z. T., Tardito, S., & Gottlieb, E. (2016). Cancer metabolism at a glance. *J Cell Sci*, 129(18), 3367-3373. doi:10.1242/jcs.181016
- Wang, J. P., & Hielscher, A. (2017). Fibronectin: How Its Aberrant Expression in Tumors May Improve Therapeutic Targeting. *J Cancer*, 8(4), 674-682. doi:10.7150/jca.16901
- Watari, H., Kinoshita, R., Han, Y., Wang, L., Hosaka, M., Taguchi, H., . . . Sakuragi, N. (2012). Prognostic significance of clusterin expression in advanced-stage cervical cancer treated with curative intended radiotherapy. *Int J Gynecol Cancer*, 22(3), 465-470. doi:10.1097/IGC.0b013e31821a03d9
- Wei, L., Xue, T., Wang, J., Chen, B., Lei, Y., Huang, Y., . . . Xin, X. (2009). Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer. *Int J Cancer*, 125(4), 791-806. doi:10.1002/ijc.24316
- Wiesel-Motiuk, N., & Assaraf, Y. G. (2020). The key roles of the lysine acetyltransferases KAT6A and KAT6B in physiology and pathology. *Drug Resistance Updates*, 53, 100729. doi:<https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100729>
- Xie, M. J., Motoo, Y., Su, S. B., Mouri, H., Ohtsubo, K., Matsubara, F., & Sawabu, N. (2002). Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 25(3), 234-238. doi:10.1097/00006676-200210000-00004

- Xiu, P., Dong, X.-F., Li, X.-P., & Li, J. (2015). Clusterin: Review of research progress and looking ahead to direction in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 21(27), 8262-8270. doi:10.3748/wjg.v21.i27.8262
- Yaffe, M. B., & Elia, A. E. (2001). Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2), 131-138. doi:10.1016/s0955-0674(00)00189-7
- Yang, Q., Zhao, J., Chen, D., & Wang, Y. (2021). E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Molecular Biomedicine*, 2(1), 23. doi:10.1186/s43556-021-00043-2
- Yoo, S. M., Latifkar, A., Cerione, R. A., & Antonyak, M. A. (2017). Cool-associated Tyrosine-phosphorylated Protein 1 Is Required for the Anchorage-independent Growth of Cervical Carcinoma Cells by Binding Paxillin and Promoting AKT Activation. *J Biol Chem*, 292(9), 3947-3957. doi:10.1074/jbc.M116.769190
- Yoshida, K. A. a. K. (November 29th, 2017). Biological Consequences of Priming Phosphorylation in Cancer Development. *IntechOpen*. Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/protein-phosphorylation/biological-consequences-of-priming-phosphorylation-in-cancer-development>
- Yun, C. W., Kim, H. J., Lim, J. H., & Lee, S. H. (2019). Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. *Cells*, 9(1). doi:10.3390/cells9010060
- Zhang, B., Xie, F., Aziz, A. U. R., Shao, S., Li, W., Deng, S., . . . Liu, B. (2019). Heat Shock Protein 27 Phosphorylation Regulates Tumor Cell Migration under Shear Stress. *Biomolecules*, 9(2). doi:10.3390/biom9020050
- Zininga, T., Ramatsui, L., & Shonhai, A. (2018). Heat Shock Proteins as Immunomodulants. *Molecules*, 23(11). doi:10.3390/molecules23112846

## Research Article

# Protein Phosphorylation in Serine Residues Correlates with Progression from Precancerous Lesions to Cervical Cancer in Mexican Patients

Juan Ramón Padilla-Mendoza <sup>1</sup>, Arturo Contis-Montes de Oca <sup>2,3</sup>,  
 Mario Alberto Rodríguez <sup>1</sup>, Mavil López-Casamichana,<sup>4</sup> Jeni Bolaños,<sup>1</sup>  
 Laura Itzel Quintas-Granados <sup>5</sup>, Octavio Daniel Reyes-Hernández,<sup>6</sup>  
 Fabiola Fragozo-Sandoval,<sup>7</sup> Aldo Arturo Reséndiz-Albor,<sup>3</sup>  
 Claudia Vanessa Arellano-Gutiérrez,<sup>8</sup> and Israel López-Reyes <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), Ciudad de México 07360, Mexico

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), Plantel Cuauhtepc, Ciudad de México 07160, Mexico

<sup>3</sup>Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional (ESM-IPN), Ciudad de México 11340, Mexico

<sup>4</sup>Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), Plantel del Valle, Ciudad de México 03100, Mexico

<sup>5</sup>Unidad de Estudios Superiores de Tultitlán, Universidad Mexiquense del Bicentenario, Estado de México 54910, Mexico

<sup>6</sup>Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental (UMIEZ), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México 09230, Mexico

<sup>7</sup>Clínica de Displasias y Anatomía Patológica, Hospital Juárez de México, Ciudad de México 07760, Mexico

<sup>8</sup>Laboratorio de Bioquímica Farmacológica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), Ciudad de México 11340, Mexico

Correspondence should be addressed to Israel López-Reyes; [israel.lopez.reyes@uacm.edu.mx](mailto:israel.lopez.reyes@uacm.edu.mx)

Received 14 January 2020; Accepted 12 March 2020; Published 3 April 2020

Academic Editor: Yujiang Fang

Copyright © 2020 Juan Ramón Padilla-Mendoza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Protein phosphorylation is a posttranslational modification that is essential for normal cellular processes; however, abnormal phosphorylation is one of the prime causes for alteration of many structural, functional, and regulatory proteins in disease conditions. In cancer, changes in the states of protein phosphorylation in tyrosine residues have been more studied than phosphorylation in threonine or serine residues, which also undergo alterations with greater predominance. In general, serine phosphorylation leads to the formation of multimolecular signaling complexes that regulate diverse biological processes, but in pathological conditions such as tumorigenesis, anomalous phosphorylation may result in the deregulation of some signaling pathways. Cervical cancer (CC), the main neoplasm associated with human papillomavirus (HPV) infection, is the fourth most frequent cancer worldwide. Persistent infection of the cervix with high-risk human papillomaviruses produces precancerous lesions starting with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), progressing to high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) until CC is generated. Here, we compared the proteomic profile of phosphorylated proteins in serine residues from healthy, LSIL, HSIL, and CC samples. Our data show an increase in the number of phosphorylated proteins in serine residues as the grade of injury rises. These results provide a support for future studies focused on phosphorylated proteins and their possible correlation with the progression of cervical lesions.

## 1. Introduction

Protein phosphorylation is a posttranslational modification (PTM) carried out on tyrosine, threonine, and serine residues [1, 2], which regulates protein functions and signaling pathways that orchestrate a variety of cellular processes, such as cell growth, differentiation, and apoptosis [3–6]. This PTM is essential for normal cellular processes, while abnormal phosphorylation is one of the prime causes for alteration of many structural, functional, and regulatory proteins in disease conditions [5, 7, 8]. In cancer, changes in the states of protein phosphorylation in tyrosine residues have been more studied than phosphorylation in the other two residues, although they also undergo changes with greater predominance [2]. Particularly, the protein phosphorylation in serine residues leads to the formation of multimolecular signaling complexes that regulate diverse biological processes, for example, DNA processing and repair, apoptosis, cell division, proliferation, and differentiation; nevertheless, in pathological conditions such as tumorigenesis, abnormal serine phosphorylation may result in the deregulation of signaling pathways responsible of proliferation and apoptosis inhibition [9–11].

The identification of serine phosphorylated proteins that participate in deregulate cellular functions in cancer would be of great help to know their functions within the cells [2]. The use of western blot assays with antibodies against serine phosphorylation may allow the detection of phosphorylated proteins [12, 13], which can be identified by mass spectrometry (MS). Afterwards, antibodies against these phosphorylated proteins could be used to evaluate the changes in concentration and in phosphorylation states of them during cancer development [14–16]. Thus, the detection of these changes could be useful for therapeutic, diagnostic, and/or prognostic applications [17, 18].

Cervical cancer (CC), the main neoplasm associated with human papillomavirus (HPV) infection [19], is the fourth most frequent cancer worldwide; in 2018, it affected 570,000 women and caused more than 311,000 deaths [20]. In Mexico, CC is the third most common cancer in women with 7689 new cases reported in 2018 [21]. Persistent infection of the cervix with high-risk human papillomaviruses (HPV-HR) produces precancerous lesions starting with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), progressing to high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) until CC is generated [22, 23]. A previous study [24] showed the relevance of protein phosphorylation in tyrosine residues within the carcinogenesis progression of CC and suggested to perform new studies on the implication of phosphoproteins in threonine and serine residues on this cancer.

Here, we compared the proteomic profile of protein phosphorylation in serine residues from healthy (control), LSIL, HSIL, and CC samples obtained using cervical cytobrushes. Our data show an increase in the number of phosphorylated proteins in serine residues as the grade of injury rises. We focused in HSP27, Clusterin, KRT8, and KRT19 proteins, and we proposed that their phosphorylation in serine residues could be related in the progression to CC. Results provide a support for future studies centered on these

proteins and their possible correlation with the progression of cervical lesions in patients infected with HPV-HR.

## 2. Material and Methods

**2.1. Samples.** Cervical cytobrushes and biopsies from women diagnosed pathologically with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), cervical cancer (CC), and healthy patients (Control) were provided from Hospital Juárez de México (Mexico City, México) and Clínica Integral de la Mujer (Mexico City, México). The present study followed the Declaration of Helsinki for the medical protocol and ethics, and the institutional committee of research and ethics approved the study (registration no. HMJ 2231/13-B). Expert colposcopists performed all examinations according to the terminology of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) [25]. Samples of a total of 50 patients with an age range between 23 and 56 years (13 healthy patients, 23 LSIL patients, 4 HSIL patients, and 10 CC patients) were evaluated.

**2.2. Immunohistochemistry.** Biopsy specimens from the cervix with LSIL, HSIL, CC, and healthy women were collected in a formalin-fixed buffer and stored at 4°C until further processing. Then, samples were embedded in paraffin, and tissue sections (5 µm) were deparaffinized and rehydrated by passage through xylene and graded ethanol solutions. Slides were treated with 3% hydrogen peroxidase containing 0.03 sodium azide in TBS (Tris buffer solution) during 5 min followed by microwave antigen retrieval at 100°C for 10 min in DAKO target retrieval solution in a H2800 Microwave processor. Next, serial sections were incubated in 0.05% albumin in TBS for 30 min at room temperature to block nonspecific protein binding. Afterwards, monoclonal anti-phosphoserine antibody (Sigma Aldrich, USA), or anti-P16 antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA), were applied to sections at 1:50 dilution for 60 min at 4°C. Mouse IgG Ready-To-Use was used as a negative control. DAKO EnVision+System-HRP labelled polymer anti-mouse was used as the detection system and colorized by DAB (DAKO Corporation, USA). Samples were counterstained with Mayer's modified hematoxylin (Poly Scientific, USA) before mounting and viewed under an optical microscope (Olympus BX51). Images were recorded with a DP70 digital camera (Olympus Optical Co. Ltd., Japan).

**2.3. Protein Extracts.** Tissue samples gotten from cytobrushes were placed in isotonic saline solution, in the presence of protease and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, USA). Then, they were sonicated at 100 W of tension, and proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) at ratio 1:1 for 15 min on ice. Samples were centrifuged at 14,000 g for 5 min at 4°C and washed with 95% ethanol, followed by 75% ethanol; pellets were resuspended in extraction buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, and 100 mM NaCl); and protein concentration was quantified by the Lowry method with bovine serum albumin (Sigma Aldrich, USA) as a reference standard [26].

**2.4. Western Blot.** Proteins were separated by 12% SDS-PAGE and transferred onto 0.22  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane (Bio-Rad, USA) for 30 min at 0.4 Amp in a semidry transfer cell (Bio-Rad, USA). Afterwards, membranes were blocked with 3% of bovine serum albumin (Sigma Aldrich, USA) in TBS pH 7.4 at room temperature for 2 h. Then, membranes were incubated overnight at 4°C with the monoclonal antiphosphoserine antibody (1:1000, Sigma Aldrich, USA) and, after washing four times with TBS (10 min each), for another 4 h with a goat anti-IgG mouse conjugated to HRP (1:1000; Thermo Scientific, USA) at room temperature. Membranes were washed four times with TBS 1x (10 min each) and revealed with ECL Plus (GE Healthcare, USA). Images were acquired using a UVP transilluminator system (MyECL Imager, Thermo Scientific, USA). As a loading control, same membranes were incubated with a mouse monoclonal antibody against GAPDH (1:3000, Abcam, USA). Then, for semiquantitative analysis, the GAPDH and some phosphoproteins bands that showed an apparent increase during tumorigenesis progression were evaluated by densitometry using the ImageJ software (NIH, USA). All experiments were performed by duplicate. The relative expression in healthy tissues of these phosphoproteins was arbitrary taken as the unit. The differences of relative expression in cervical lesions were determined by Student's *t*-test, considering *p* values < 0.05 as statistically significant.

**2.5. Two-Dimensional Electrophoresis (2DE).** For 2DE, 1 mg of protein extract each group was cleaned using the 2D-Clean Up Kit (GE Healthcare, USA) following the manufacturer's instructions. Protein pellets were resuspended with 125  $\mu\text{L}$  of Ready-Prep Rehydration buffer (Bio-Rad, USA) containing 8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% (*w/v*) Bio-Lyte 3-10 ampholytes, and bromophenol blue traces and supplemented with a protease and phosphatase inhibitor (Sigma Aldrich, USA). Then, samples were loaded onto 7 cm IPG strips (Bio-Rad, USA) pH 3-10 (linear gradient) and maintained for 16 h at 25°C for rehydration. After, isoelectric focusing was performed at 500 V (hold) for 1 h, 1000 V (linear) for 0.5 h, 4000 V (gradient) for 1 h and 4,000 V (gradient) to complete 18,000 V/h, and 500 V (Hold), using the PROTEAN<sup>®</sup> i12™ IEF system (Bio-Rad, USA). Afterwards, strips were treated for 15 min at room temperature in equilibration buffer containing 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol (*v/v*), 2% SDS (*w/v*), 0.002% bromophenol blue, and 64 mM DTT. Then, strips were incubated for 15 min in the same solution containing 135 mM iodoacetamide. After reduction/alkylation procedure, IPG strips were loaded onto the 12% SDS-PAGE and electrophoresed at 100 V for 1.5 h. Gels were submitted to western blot as described above. Images were recorded using the Imager Scanner instrument (Amersham Biosciences, USA). Experiments were run by duplicate to obtain the technical and biological replicates.

**2.6. Identification Phosphorylated Protein by Mass Spectrometry Analysis.** Protein extract (30  $\mu\text{g}$ ) for each condition (in biological triplicates) was subjected to 12% SDS-PAGE allowed to advance for about 1 cm within the gel; the resulting gel fragments were digested with trypsin accord-

ing to Shevchenko et al. [27]. Afterwards, 1  $\mu\text{L}$  of 1 pmol- $\mu\text{L}^{-1}$  of alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) of *Saccharomyces cerevisiae* (Uniprot accession: P00330) (Waters, USA) was added to all peptide samples to obtain a final concentration of 25 fmol- $\mu\text{L}^{-1}$  (internal standard). Then, 4  $\mu\text{L}$  of digested peptides (100 fmol of internal standard) for each biological sample was injected (in technical triplicates) into Symmetry C18 Trap V/M precolumn (Waters, USA): 180  $\mu\text{m}$   $\times$  20 mm, 100 Å pore size, 5  $\mu\text{m}$  particle size, desalted using as a mobile phase A, 0.1% formic acid (FA) in H<sub>2</sub>O and mobile phase B, and 0.1% FA in acetonitrile (ACN) under the followed isocratic gradient: 99.9% mobile phase A and 0.1% of mobile phase B at a flow of 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  during 3 min. Then, peptides were loaded and separated on a HSS T3 C18 column (Waters, USA): 75  $\mu\text{m}$   $\times$  150 mm, 100 Å pore size, 1.8  $\mu\text{m}$  particle size; using an UPLC ACQUITY M-Class (Waters, USA) with the same mobile phases under the followed gradient: 0 min 7% B, 121.49 min 40% B, 123.15 to 126.46 min 85% B, and 129 to 130 min 7% B, at a flow of 400 nL- $\text{min}^{-1}$  and 45°C. The spectra data were acquired in a mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) and ion mobility separation (IMS) Synapt G2-Si (Waters, USA) operated in data-independent acquisition (DIA) using High-Definition-Multiplexed MS/MS (HDMS<sup>E</sup>) mode (Waters, USA). The tune page for the ionization source was set with the following parameters: 2.75 kV in the sampler capilar, 30 V in the sampling cone, 30 V in the source offset, 70°C for the source temperature, 0.5 Bar for the nanoflow gas, and 150 L- $\text{hr}^{-1}$  for the purge gas flow. Two chromatograms were acquired (low- and high-energy chromatograms) in positive mode in a range of *m/z* 50-2000 with a scan time of 500 ms. No collision energy was applied to obtain the low-energy chromatogram, while for the high-energy chromatograms, the precursor ions were fragmented in the transfer using a collision energy ramp of 19-55 V. 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 less than 1.5 ppm across all MS/MS measurements.

**2.7. Comparative Analysis of Phosphorylated Proteins in Serine Residues.** Generated \*.raw files containing MS and MS/MS spectra were deconvoluted, compared, identified [28], and quantified using Progenesis Q1 for Proteomics v4.1 software [29] (Waters, USA) against a reversed *Homo sapiens* (downloaded from Uniprot, 73099 protein sequences, last modification 27th June 2018) plus ADH (accession P00330) \*.fasta database [30]. The parameters used for the protein identification were trypsin as an enzyme and one missed cleavage allowed; carbamidomethyl (C) as a fixed modification and oxidation (M), amidation (N-term), deamidation (N, Q), oxidation (M), and phosphoryl (S, T, Y) as variable modifications; default peptide and fragment tolerance (maximum normal distribution of 10 ppm and 20 ppm, respectively); and false discovery rate  $\leq$  4%. The average MS signal responses of the three most intense peptides protein (Hi3) were used for the absolute quantitation according with the method described by Silva et al. [31]. Results generated from the Progenesis software were exported to \*.csv files in order to the next analysis.



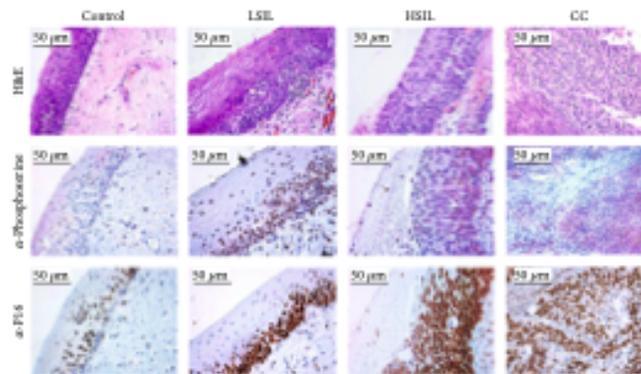


FIGURE 1: Immunohistochemical analysis of antiphosphoserine in cervical cancer and precancerous lesion tissues ( $\times 50$ ). Positive staining of endothelial cells in healthy biopsy specimen, LSIL biopsy specimen, HSIL biopsy specimen, and CC biopsy specimen. Antiphosphoserine immunostaining. P16 immunostaining.

Identified peptides by mass spectrometry were analysed for the recognized PTM. Next, we selected all serine phosphorylated peptides from each group and proteins corresponding to these phosphorylated peptides were recognized. Besides, we use the Uniprot and Phosphosite Plus software (<http://phosphosite.org>) to confirm whether phosphorylation sites match against sites detected by MS and posteriorly, we search the cellular function of each protein. Subsequently, we compared the serine phosphorylated proteins of all the groups to detect phosphoproteins that coincided or not among the groups, mainly those phosphoproteins identified in LSIL, HSIL, and CC but that are not phosphorylated in the control group.

### 3. Results

**3.1. Serine Phosphoproteins in Biopsies from Patients with Cervical Intraepithelial Lesions.** To corroborate the different grades of cervical lesions, we performed the histological evaluation by hematoxylin and eosin (H&E) stain. The control group showed the normal epithelial stratification (Figure 1), whereas in LSIL samples, we observe atypical morphological changes in the cell and an epithelial thickening, and they also presented cytopathic alterations in lower layers; however, mature and differentiated cells can be observed (Figure 1). HSIL specimens exhibited a larger number of abnormal mitotic figures and a greater loss of cell stratification; in addition, few cell differentiation and marked nuclear abnormalities were observed (Figure 1). Tissue with CC showed loss of cell polarity and stratification, nuclei with increased size, and koilocytes that diffuse to the muscle tissue (Figure 1).

When we performed immunohistochemistry using an antiphosphoserine antibody, we observed positive cells in all groups, but with considerable differences; in healthy tissues, a basal expression was detected, and the staining was mainly in the basal layer (Figure 1). Interestingly, the number of positive cells increased in correlation with the grade of cervical lesion, where in CC tissues, the immunoreaction was

more evident when loss of cell stratification occurred (Figure 1). In addition, we analysed immunostaining with anti-P16, which is a biomarker for the detection of CC with HPV infection [32]. Results confirmed the presence of HPV in the analysed samples (except in healthy samples), as well as an increase in the number of positive cells that correlated with the different degrees of cervical lesions (Figure 1). Moreover, we confirmed the presence of HPV in those samples by PCR using MY09/11 primers [33] (data not shown). Thus, probably the phosphorylation of serine residues is probably promoted by infection with HPV [34].

**3.2. Identification of Phosphorylated Proteins from Patients with Different Injury Grade.** To determine the profile of serine phosphorylated proteins in the different cervical lesions, protein extracts of samples obtained with cytobrushes were evaluated by western blot using the antiphosphoserine antibody. Eight bands with molecular weights from  $\sim 21$  to  $\sim 72$  kDa were detected in the healthy group, whereas in LSIL, HSIL, and CC, we observed ten bands, but the recognition of most of these serine phosphoproteins was stronger in CC (Figure 2(a)). Comparing the bands detected in the different samples, three of them were found in all groups; other three bands were shared in LSIL, HSIL, and CC groups, but absent in the healthy tissues; three common bands were detected in HSIL and CC; and one band was shared between LSIL and CC group (Figure 2(b)). On the other hand, two bands in the healthy tissue and one in each precancerous lesion were exclusives of these samples (Figure 2(b)). This comparative analysis among groups contribute to the knowledge of the distribution of the serine phosphoproteins in each sample; however, the bands shared between HSIL and CC may be of great interest, since they could have an important role in the progression of cervical cancer.

As mentioned before, there are some bands shared by all samples ( $\sim 72$ ,  $\sim 55$ , and  $\sim 45$  kDa); however, they apparently increased their serine phosphorylation in agreement with the injury grade. To confirm this assumption, we analysed their relative expression by densitometry, using GAPDH as



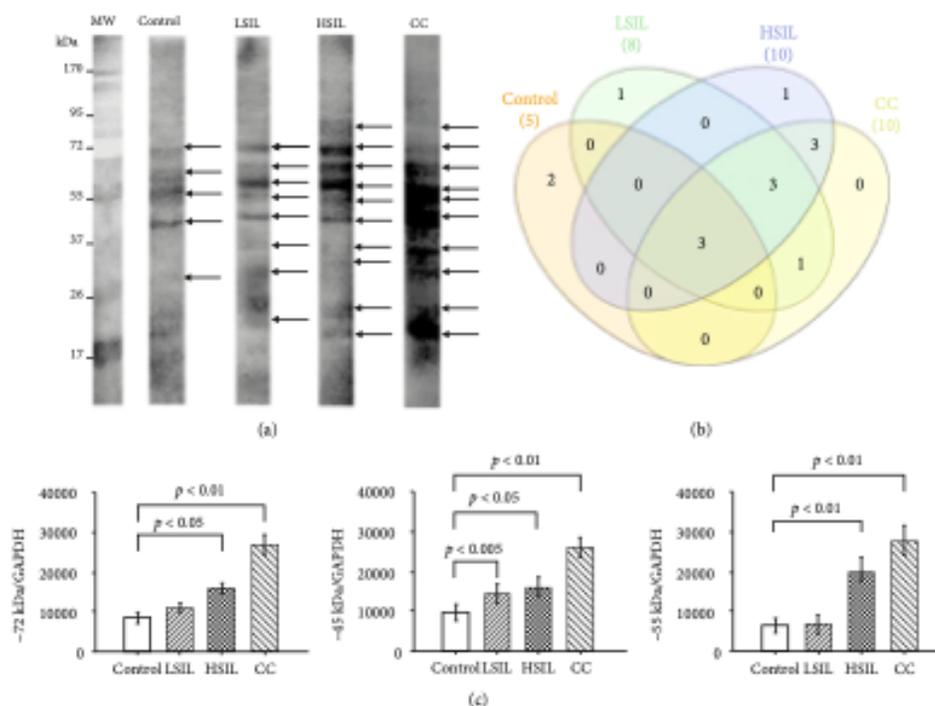


FIGURE 2: Expression of phosphoserine in different groups by western blotting. (a) Sample lysates were subjected to SDS-PAGE followed by western analysis with antiphosphoserine in the control (healthy), LSIL, HSIL, and CC samples. (b) Total number of bands detected that are present in all groups. (c) Densitometric analysis of -72, -55, and -45 kDa bands in all groups, the relative expression in cervical lesions were determined by Student's *t*-test, considering *p* values  $< 0.05$  as statistically significant.

a loading normalizer and taken the data from the healthy tissues as the arbitrary unit. Statistics confirmed that these bands significantly augmented in HSIL and CC compared with healthy samples (Figure 2(c)).

Then, to evaluate with more detail the profile of serine phosphorylation, we performed a comparative analysis by 2D electrophoresis and western blot. Results showed a significant increase in the number of detected spots in HSIL and CC compared with the control group and LSIL (Figure 3). The antiphosphoserine antibody detected 22 spots in the control group, 23 in LSIL, 43 in HSIL, and 94 CC group (Figure 3). In addition, some spots showed a very strong recognition in HSIL and CC (Figure 3).

Thus, results obtained by immunohistochemistry and immunoblotting in 1D and 2D showed an increase in protein phosphorylation in serine residues in precancerous lesions and a greater phosphorylation when these lesions progress to CC.

**3.3. Identification of Phosphorylated Proteins by Mass Spectrometry.** The above results showed similar number of serine phosphoproteins between control and LSIL and a considerable increase in CC. Thus, we decided to identify the serine phosphorylated peptides in the control and CC tissues by LC-ESI-HDMS<sup>E</sup> analysis. In the healthy

group, 2767 peptides corresponding to 214 proteins were identified, and from a thorough and manual analysis of the peptides, we detected 84 phosphorylated peptides, of which 42 were phosphorylated in serine residues representing to 30 phosphoproteins. In CC, we detected 14,804 peptides from 989 proteins; we also found 987 phosphopeptides, of which 507 were phosphorylated in serine residues and related to 289 phosphoproteins. In summary, LC-ESI-HDMS<sup>E</sup> data showed an increase in the expressed proteins in CC and confirmed a significant augment in the number of serine phosphorylated proteins in this cancer (Table 1).

Next, we investigated the cellular roles of the serine phosphorylated proteins of each group. The serine phosphoproteins detected in the control group participate in 13 different cellular functions, where the main ones were of structural (30%) and regulatory (20%) (Figure 4(a)). In the CC group, the serine phosphoproteins take part in 22 different cellular functions, mainly in regulatory (18%), adhesion (13%), of structural (12%), and of transport (10%) (Figure 4(c)), and finally, the serine phosphoproteins of both groups were compared, and we found 45 proteins (Supplementary Table 1), including HSPB1 (also known HSP27), Clusterin, and citokeratins 8 and 19 (KRT8, KRT19), that only contain serine phosphorylated residues in the CC samples (see Supplementary Table 1).

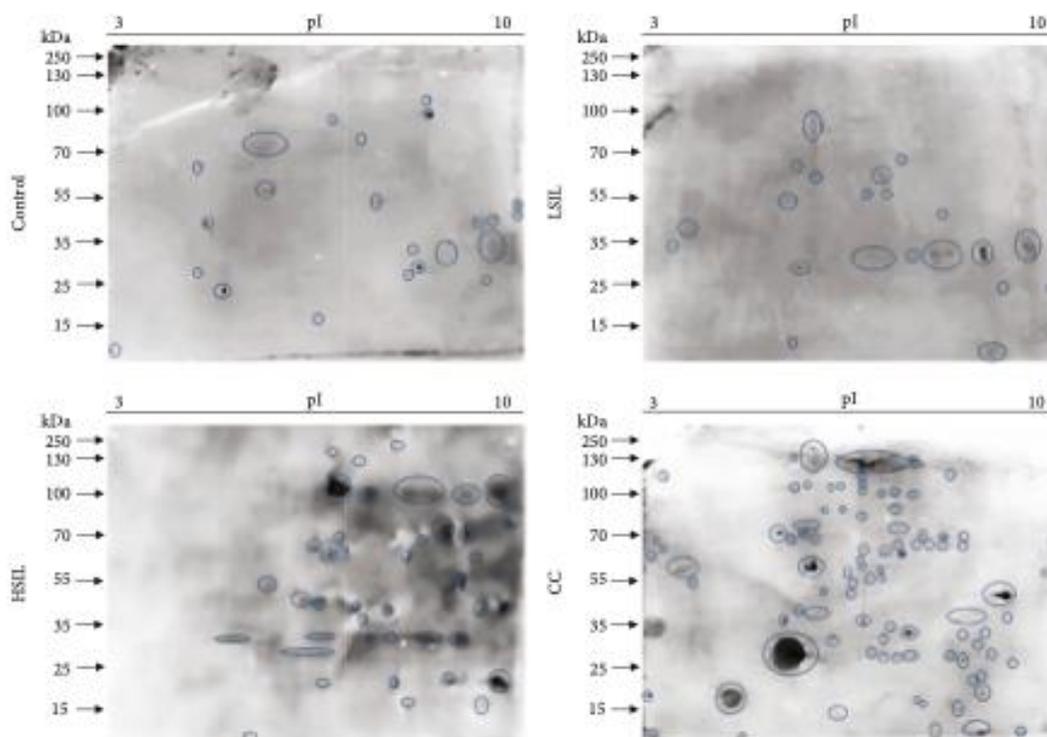


FIGURE 3: Expression of phosphoserine by combination 2DE gels and western blotting. Immunodetection of phosphoserine spots in the control, LSIL, HSIL, and CC groups.

TABLE 1: Total number of serine phosphorylated proteins identified by LC-ESI-HDMSE analysis.

Group	Total peptides	Total proteins	Total phosphopeptides	Serine phosphopeptides	Serine phosphoproteins
Control	2767	214	84	42	30
CC	14,804	987	933	507	289

#### 4. Discussion

Here, we show a possible correlation between the increase in phosphorylation of protein in serine residues and the injury degree of cervical lesions in samples obtained with cytobrushes. Unlike the obtention of biopsies, which is an invasive and long-time-consuming procedure, the use of cytobrush is a noninvasive technique that can be coupled to the Pap Test. In these samples, we observed that the number of serine-phosphorylated proteins increased depending to the lesion grade. We also noticed an augment in the phosphorylation of the shared bands detected by the antibody against phosphoserine (72, 55, and 45 kDa) whose densitometry was highest in tissues that evolve to cancer. Moreover, immunoblotting in 2D electrophoresis corroborated the augment of serine-phosphorylated spots, mainly in HSIL and CC. With these data, we decided to identify by mass spectrometry the serine-phosphorylated proteins in the control

and CC groups. We obtained 30 and 289 serine phosphorylated proteins in the healthy and CC group, respectively. Interestingly, in the comparison of serine phosphorylated proteins between control and CC group, we found 45 proteins expressed in both groups, but only serine phosphorylated in the cancerous lesion, of which we highlight HSPB1 (also known HSP27), Clusterin, KRT8, and KRT19.

Heat-shock protein 27 (HSP27 or HSPB1) plays an important role in several types of cancer, because it acts as an antioxidant and as an apoptosis inhibitor, protecting cells from cell death [35]. Overexpression of HSP27 has been associated with poor prognosis in gastric, liver, prostate, breast, osteosarcoma, and cervical cancer [35, 36]. Various stimuli lead to the phosphorylation of HSP27 at serine residues at position 15, 78, and 82, and phosphorylated HSP27 (p-HSP27) is often associated with changes on its oligomerization and biological functions [37]. Accumulated evidence suggested that HSP27 plays an important role in

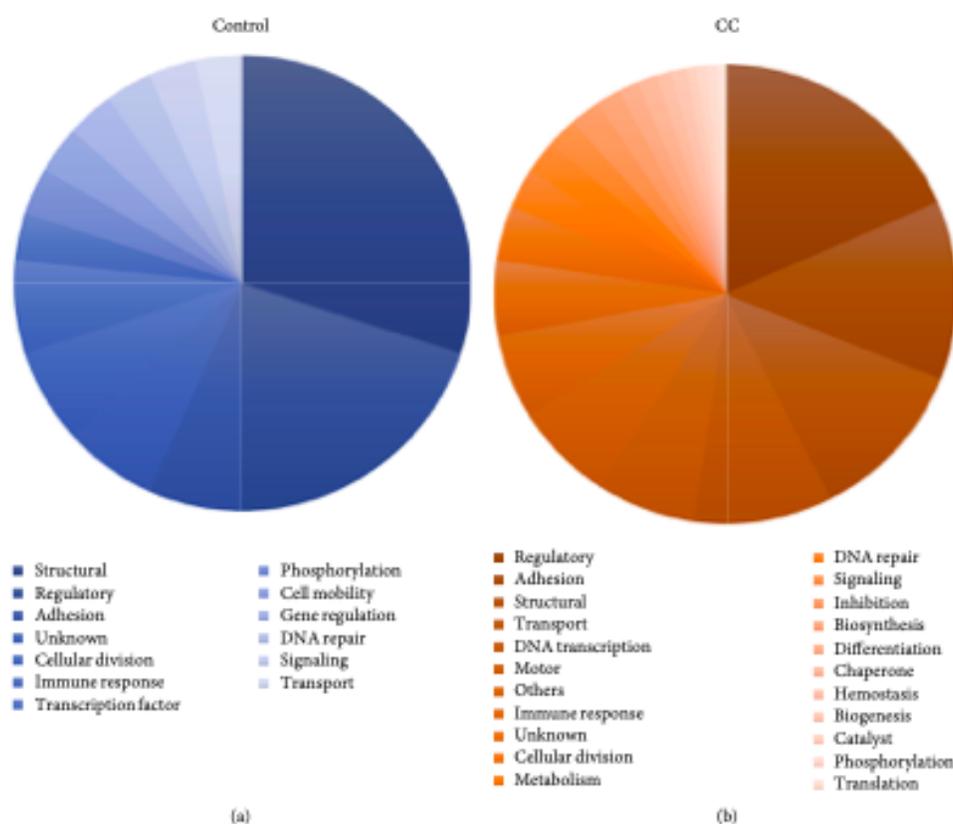


FIGURE 4: Functional annotation of serine phosphorylated proteins identified in different groups. (a) Cellular roles of serine phosphoproteins in the control group. (b) Cellular roles of serine phosphoproteins in the CC group.

radiotherapy- and chemotherapy-induced apoptosis [38]. Santiago-O'Farrill et al. [39] evaluated p-HSP27 and its correlation with autophagy-induced chemotherapy on osteosarcoma cells lines; according with their results, authors suggested that p-HSP27 could be a beneficial predictive biomarker for combination therapies for osteosarcoma patients. Other studies on pancreatic cancer mention that a higher expression of p-HSP27 correlates with a better survival to treatment with chemotherapy; therefore, it has been proposed to evaluate the expression of p-HSP27 to predict the prognosis of this cancer [40–42]. However, other authors reported that the high expression of p-HSP27 helps in the resistance to the treatment with gemcitabine; thus, they propose to use p-HSP27 as a biomarker to predict the response of patients with pancreatic cancer to treatment with this drug [43]. Studies in cervical cancer have only evaluated changes in the expression of nonphosphorylated HSP27; nevertheless, in HeLa cells, it has been reported that phosphorylated HSP27 is involved in the apoptosis induced by TNF- $\alpha$  mediating its interaction with TAK1 and regulating the posttranslational modifications of TAK1 [44]. In another study [45], it was observed that suppression of p-HSP27 potentiated the TRAIL-induced apoptosis and attenuated TRAIL-triggered

activation of Akt and ERK survival pathways by suppressing the phosphorylation of Src. In addition, a physical binding between  $\beta$ -arrestin2 and Src was detected; thus, authors speculated that  $\beta$ -arrestin2 could recruit the formation of complex of p-HSP27/ $\beta$ -arrestin2/Src in response to TRAIL, resulting in the activation of survival signaling. Therefore, our results accumulate evidence about a probable participation of p-HSP27 in the progression of CC.

On the other hand, the functions of Clusterin in cells are partially known, and an involvement of this protein in apoptosis through complexing with Ku70 autoantigen (nCLU, proapoptotic) [46] or interfering with Bax activation (sCLU, antiapoptotic) has been suggested [47]. In cancer, the overexpression of sCLU mediates in part the activation of the PI3K/Akt pathway and increased the per se phosphorylation of Akt, with the consequent Akt-induced phosphorylation of Bad, thus, inhibiting TNF $\alpha$ -induced apoptosis [48]; otherwise, in prostate cancer, proapoptotic nCLU decreased, while antiapoptotic sCLU increased [49, 50]. In addition, an augment in the Clusterin expression has been demonstrated in breast [51], ovarian [52], colorectal [53], and pancreatic [54] cancer and that Clusterin plays an important role in the cell survival in response to chemotherapy in these cancer

types [55–57]. In HeLa cells, a study from Kim et al. [58] showed that the upregulation of LXR O-GlcNAcylation enhances the sCLU expression through an increased expression of SREBP-1, which induces drug resistance in cervical cancer cells. On the other hand, Lee et al. [59] examined the proapoptotic effect of PACAP in cervical cancer cells and propose that PACAP interferes with CLU-mediated cancer cell survival. Nonetheless, so far, studies have not been done on Clusterin phosphorylation and the role it plays on CC, so future studies on Clusterin phosphorylation would be of great importance to determine the roles of this phosphoprotein in cervical tumorigenesis.

Phosphorylation is considered a major regulator of keratins; this posttranslational modification modulates their reorganization under stress and intrinsic properties, such as solubility, other PTM, and structural conformations [60]. Keratin 8 (KRT8) has been studied as biomarker in cancer [61]; this cytokeratin is phosphorylated in serine 23, 73, and 431 [62]. Phosphorylated KRT8 in serine 431 plays an important role in human pancreatic and gastric cancer cells, because it induces keratin reorganization and consequently enhanced migration of tumor cells [63]. Arentz et al. [64] observed in colon cancer that phosphorylated KRT8 promotes tumor cell survival and progression. On the other hand, Tiwari et al. [65] analysed the importance of the phosphorylation of KRT8 in serine residues 73 and 431 in skin squamous cell carcinomas (skin-SCC). The analysis showed that a significant proportion of total phosphoproteome is associated with the migratory, proliferative, and invasive potential of these cells. However, the participation of phosphorylated KRT8 in progression in CC is unknown, so it is necessary to perform future research to determine its role.

Keratin 19 (KRT19) pairs with KRT7 in simple epithelia and with KRT8/18 in stratified squamous epithelial cells [66]. A previous study showed high expression levels of KRT7 and KRT19 in Cervical Intraepithelial Neoplasm grade 3 (CIN3) and squamous cell carcinoma (SCC), supporting the idea that KRT19 may promote E7 oncoprotein production, contributing carcinogenic events [67]. The phosphorylation of KRT19 has not been fully studied, and the phosphorylation of KRT19 in serine residues 35 plays a role in keratin filament assembly [68]; besides, the phosphorylation of KRT19 in the tyrosine residue 391 has been reported [69]. Although the importance of the possible phosphorylation of KRT19 in serine residues has not been sought, the phosphorylation in serine residue 14 has found hyperphosphorylated in breast, colon, ovarian cancer, lung adenocarcinoma, and uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC) [70]. Our results identified the phosphorylation of KTR19 in serine residues; despite this, more extensive research is needed to determine the probable role that phosphorylated KRT19 plays in the progression of cervical cancer. In addition, the serine phosphorylated KRT8 and KRT19 could interact between them and to participate on the deregulation of several cellular functions leading to cellular growth.

In addition to serine phosphorylation of KRT8, KRT19, Clusterin, and HSP27, it has been suggested that phosphorylation in serine of other proteins identified in this work, such as Apolipoprotein B100, Serpin B3, Cofilin 1, and Lactotrans-

ferrin, is involved in different biological processes such as signaling, cell migration, and apoptosis. Phosphorylation of Serpin B3 was reported in cervical mucus using Pro-Q Diamond, a phosphor-specific stain [71], but it has not been determined if the phosphorylation of this protease inhibitor plays a role in cervical cancer, although due to its decreased expression, serpin B3 is considered a biomarker in cervical cancer [72]. Phosphorylation in serine residues of Cofilin 1 participates in its function regulation; phosphorylation of serine 3 inactivates this protein, and phosphoserine 24 may prevent the recognition of its nuclear localization signal [73]. This protein is upregulated in the presence of the enterovirus 71 in rhabdomyosarcoma [74], and the hyperphosphorylation of serine 7 was detected in various types of cancer [70], suggesting that Cofilin 1 has a role in cancer development. Interestingly, we found the phosphorylation of serine 7 in Cofilin 1 of CC.

On the other hand, we detected serine phosphorylation in several actin-associated proteins, such as Adenylyl cyclase-associated protein 1, Alpha-actinin-4, Alpha-enolase, Annexin A3, Beta-enolase, Carbonic anhydrase 1, Centrosome-associated protein 350, Ceruloplasmin, Dynein heavy chain 10, 9, 3\_ axonemal, Fibrinogen beta chain, Gelsolin, Plastin-2, Plectin, Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1, Protein unc-13 homolog B, Protocadherin Fat 1, Rab11 family-interacting protein 1, and mitochondrial superoxide dismutase (Mn), that probably contribute to the dynamics of the cytoskeleton for cell migration, cell proliferation, and cell cycle.

## 5. Conclusions

Overall, in this study, we showed a correlation between the increment of phosphorylated proteins in serine residues and progression of CC. We discussed the possible participation of several serine phosphoproteins in cervical tumorigenesis. These results provide a support for future studies focused on these phosphoproteins and their possible correlation with the progression of cervical lesions in patients infected with HPV-HR.

## Data Availability

All data generated of analysis during this study are included in this published article.

## Ethical Approval

Informed consent was obtained from the patient for publication of this paper, and this study was approved by the committee of Bioethics at the Juarez Hospital of Mexico (Hospital Juárez de México). Number: HJM 2231/13-B.

## Disclosure

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Conflicts of Interest

The authors have declared no conflict of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by SEP-CONACyT México grant CB-2012/176983 (López-Reyes I and López-Casamichana Mavil). Padilla-Mendoza, JR. (705048) received a Doctoral scholarship from CONACyT. Contis-Montes de Oca A. (25121) received a Postdoctoral scholarship from CONACyT project. We thank Juárez Hospital of Mexico (Hospital Juárez de México) and Sierra-Martínez Mónica for all facilities with the patient recruitment and Ugarte Briones Carlos for pathological characterization of all biological samples. We thank also Bárcenas I. Jaime from Clínica Integral de la Mujer (Ciudad de México, México). We would like to thank the Genomics, Proteomics and Metabolomics Unit (Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica), LaNSE, Cinvestav-Zacatenco, M. D. Ríos Castro Emmanuel, and I.B. Ramírez Reyes Lorena for the mass spectrometry identification of our samples and advice for the analysis, and Toyos Sánchez Gustavo Félix for processing the samples for later identification by MS.

## Supplementary Materials

Supplementary Table 1: list of proteins on common of serine phosphoproteins of the CC group compared to nonphosphorylated proteins of the control group. (*Supplementary Materials*)

## References

- [1] T. Hunter, "THE CROONIAN LECTURE 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 353, no. 1368, pp. 583–605, 1998.
- [2] M. Mann, S. E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O. N. Jensen, and A. Pandey, "Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome," *Trends in Biotechnology*, vol. 20, no. 6, pp. 261–268, 2002.
- [3] P. Cohen, "The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture," *European Journal of Biochemistry*, vol. 268, no. 19, pp. 5001–5010, 2001.
- [4] S. J. Humphrey, D. E. James, and M. Mann, "Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation," *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, vol. 26, no. 12, pp. 676–687, 2015.
- [5] V. Singh, M. Ram, R. Kumar, R. Prasad, B. K. Roy, and K. K. Singh, "Phosphorylation: implications in cancer," *The Protein Journal*, vol. 36, no. 1, pp. 1–6, 2017.
- [6] J. E. Skeen, P. T. Bhaskar, C. C. Chen et al., "Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner," *Cancer Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 269–280, 2006.
- [7] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [8] J. M. Irish, R. Hovland, P. O. Krutzik et al., "Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells," *Cell*, vol. 118, no. 2, pp. 217–228, 2004.
- [9] D. T. Rogerson, A. Sachdeva, K. Wang et al., "Efficient genetic encoding of phosphoserine and its nonhydrolyzable analog," *Nature Chemical Biology*, vol. 11, no. 7, pp. 496–503, 2015.
- [10] M. B. Yaffe and A. E. Elia, "Phosphoserine/threonine-binding domains," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, no. 2, pp. 131–138, 2001.
- [11] K. Aoki and K. Yoshida, "Biological consequences of priming phosphorylation in cancer development," in *Protein Phosphorylation*, IntechOpen, 2017.
- [12] M. Gronborg, T. Z. Kristiansen, A. Stensballe et al., "A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 1, no. 7, pp. 517–527, 2002.
- [13] J. W. Mandell, "Phosphorylation state-specific antibodies: applications in investigative and diagnostic pathology," *The American Journal of Pathology*, vol. 163, no. 5, pp. 1687–1698, 2003.
- [14] J. S. Rader, J. P. Malone, J. Gross et al., "A unified sample preparation protocol for proteomic and genomic profiling of cervical swabs to identify biomarkers for cervical cancer screening," *Proteomics Clinical Applications*, vol. 2, no. 12, pp. 1658–1669, 2008.
- [15] J. Rush, A. Moritz, K. A. Lee et al., "Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells," *Nature Biotechnology*, vol. 23, no. 1, pp. 94–101, 2005.
- [16] E. K. Yim and J. S. Park, "Role of proteomics in translational research in cervical cancer," *Expert Review of Proteomics*, vol. 3, no. 1, pp. 21–36, 2006.
- [17] S. Doll, F. Gnad, and M. Mann, "The case for proteomics and phospho-proteomics in personalized cancer medicine," *Proteomics Clinical Applications*, vol. 13, no. 2, article e1800113, 2019.
- [18] H. Li and Y. Guan, "Machine learning empowers phosphoproteome prediction in cancers," *Bioinformatics*, vol. 36, no. 3, pp. 859–864, 2019.
- [19] P. J. Snijders, R. D. Steenbergen, D. A. Heideman, and C. J. Meijer, "HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications," *The Journal of Pathology*, vol. 208, no. 2, pp. 152–164, 2006.
- [20] V. Granados-García, Y. N. Flores, R. Perez, S. E. Rudolph, E. Lazcano-Ponce, and J. Salmeron, "Cost of the cervical cancer screening program at the Mexican Social Security Institute," *Salud Pública de México*, vol. 56, no. 5, pp. 502–510, 2014.
- [21] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018.
- [22] A. Carrillo-García, S. Ponce-de-León-Rosales, D. Cantu-de-León et al., "Impact of human papillomavirus coinfections on the risk of high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer," *Gynecologic Oncology*, vol. 134, no. 3, pp. 534–539, 2014.
- [23] K. Matsumoto, A. Oki, R. Furuta et al., "Predicting the progression of cervical precursor lesions by human

- papillomavirus genotyping: a prospective cohort study," *International Journal of Cancer*, vol. 128, no. 12, pp. 2898–2910, 2011.
- [24] B. L. Robinson-Bennett, J. Deford, C. Diaz-Arrastia et al., "Implications of tyrosine phosphoproteomics in cervical carcinogenesis," *Journal of Carcinogenesis*, vol. 7, no. 1, p. 2, 2008.
- [25] J. L. Benedet, H. Bender, Jones H 3rd, H. Y. Ngan, and S. Pecorelli, "FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers," *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, vol. 70, no. 2, pp. 209–262, 2000.
- [26] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [27] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, and M. Mann, "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 6, pp. 2856–2860, 2006.
- [28] G. Z. Li, J. P. Viissers, J. C. Silva, D. Golick, M. V. Gorenstein, and S. J. Geromanos, "Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures," *Proteomics*, vol. 9, no. 6, pp. 1696–1719, 2009.
- [29] S. J. Geromanos, C. Hughes, D. Golick et al., "Simulating and validating proteomics data and search results," *Proteomics*, vol. 11, no. 6, pp. 1189–1211, 2011.
- [30] S. J. Valentine, M. A. Ewing, J. M. Dülger et al., "Using ion mobility data to improve peptide identification: intrinsic amino acid size parameters," *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 5, pp. 2318–2329, 2011.
- [31] J. C. Silva, M. V. Gorenstein, G. Z. Li, J. P. Viissers, and S. J. Geromanos, "Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 5, no. 1, pp. 144–156, 2006.
- [32] K. Kanthiya, J. Khunnarong, S. Tangjitgamol, N. Puripat, and S. Tanvanich, "Expression of the p16 and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions and cancer," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, vol. 17, no. 7, pp. 3201–3206, 2016.
- [33] M. Camargo, S. Soto-De Leon, R. Sanchez et al., "Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets," *Journal of Virological Methods*, vol. 178, no. 1–2, pp. 68–74, 2011.
- [34] T. Charoonwatana, S. Boonlikit, and M. Yanaranop, "Progression of precancerous cervical lesion predicted by p16 protein immunohistochemistry in Rajavithi Hospital," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, vol. 20, no. 6, pp. 1809–1815, 2019.
- [35] D. R. Ciocca and S. K. Calderwood, "Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications," *Cell Stress & Chaperones*, vol. 10, no. 2, pp. 86–103, 2005.
- [36] C. Dobo, J. N. Stavale, O. Lima Fde et al., "HSP27 is commonly expressed in cervical intraepithelial lesions of Brazilian women," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, vol. 14, no. 9, pp. 5007–5010, 2013.
- [37] J. M. Bruay, C. Paul, A. Fromentin et al., "Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo," *Oncogene*, vol. 19, no. 42, pp. 4855–4863, 2000.
- [38] A. Leja-Szpak, J. Jaworek, J. Szklarczyk, S. J. Konturek, and W. W. Pawlik, "Melatonin stimulates HSP27 phosphorylation in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1)," *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, vol. 58, Suppl 3, pp. 177–188, 2007.
- [39] J. M. Santiago-O'Farrill, E. S. Kleinerman, M. G. Hollomon et al., "Phosphorylated heat shock protein 27 as a potential biomarker to predict the role of chemotherapy-induced autophagy in osteosarcoma response to therapy," *Oncotarget*, vol. 9, no. 2, pp. 1602–1616, 2018.
- [40] M. Nakashima, S. Adachi, I. Yasuda et al., "Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells," *Cancer Letters*, vol. 313, no. 2, pp. 218–225, 2011.
- [41] M. Okuno, S. Adachi, O. Kozawa, M. Shimizu, and I. Yasuda, "The clinical significance of phosphorylated heat shock protein 27 (HSPB1) in pancreatic cancer," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 1, p. 137, 2016.
- [42] M. Okuno, I. Yasuda, S. Adachi et al., "The significance of phosphorylated heat shock protein 27 on the prognosis of pancreatic cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 12, pp. 14291–14299, 2016.
- [43] K. Taba, Y. Kuramitsu, S. Ryozaawa et al., "Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells," *Anticancer Research*, vol. 30, no. 7, pp. 2539–2543, 2010.
- [44] Z. Qi, L. Shen, H. Zhou et al., "Phosphorylation of heat shock protein 27 antagonizes TNF- $\alpha$  induced HeLa cell apoptosis via regulating TAK1 ubiquitination and activation of p38 and ERK signaling," *Cellular Signalling*, vol. 26, no. 7, pp. 1616–1625, 2014.
- [45] S. Qi, Y. Xin, Z. Qi et al., "HSP27 phosphorylation modulates TRAIL-induced activation of Src-Akt/ERK signaling through interaction with  $\beta$ -arrestin2," *Cellular Signalling*, vol. 26, no. 3, pp. 594–602, 2014.
- [46] K. S. Leskov, D. Y. Klokov, J. Li, T. J. Kinsella, and D. A. Boothman, "Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 13, pp. 11590–11600, 2003.
- [47] H. Zhang, J. K. Kim, C. A. Edwards, Z. Xu, R. Taichman, and C. Y. Wang, "Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax," *Nature Cell Biology*, vol. 7, no. 9, pp. 909–915, 2005.
- [48] H. Ammar and J. L. Closset, "Clusterin activates survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 19, pp. 12851–12861, 2008.
- [49] H. E. Rauhala, K. P. Porkka, O. R. Saramaki, T. I. Tammela, and T. Visakorpi, "Clusterin is epigenetically regulated in prostate cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 123, no. 7, pp. 1601–1609, 2008.
- [50] S. Astancolle, G. Guidetti, C. Pinna, A. Corti, and S. Bettuzzi, "Increased levels of clusterin (SGP-2) mRNA and protein accompany rat ventral prostate involution following finasteride treatment," *The Journal of Endocrinology*, vol. 167, no. 2, pp. 197–204, 2000.
- [51] S. Kruger, V. Ola, D. Fischer, A. C. Feller, and M. Friedrich, "Prognostic significance of clusterin immunoreactivity in breast cancer," *Neoplasma*, vol. 54, no. 1, pp. 46–50, 2007.
- [52] D. Xie, S. H. Lau, J. S. Sham et al., "Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma," *Cancer*, vol. 103, no. 2, pp. 277–283, 2005.

- [53] D. Kevans, J. Foley, M. Tenniswood et al., "High clusterin expression correlates with a poor outcome in stage II colorectal cancers," *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, vol. 18, no. 2, pp. 393-399, 2009.
- [54] D. Xie, J. S. Sham, W. F. Zeng et al., "Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 11, no. 21, pp. 3285-3289, 2005.
- [55] R. D. Sowers, B. A. Hadaschik, A. I. So et al., "Clusterin knockdown using the antisense oligonucleotide OGX-011 resensitizes docetaxel-refractory prostate cancer PC-3 cells to chemotherapy," *BJU International*, vol. 102, no. 3, pp. 389-397, 2008.
- [56] S. Chia, S. Dent, S. Ellard et al., "Phase II trial of OGX-011 in combination with docetaxel in metastatic breast cancer," *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 15, no. 2, pp. 708-713, 2009.
- [57] L. Wei, T. Xue, J. Wang et al., "Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 125, no. 4, pp. 791-806, 2009.
- [58] M. J. Kim, M. Y. Choi, D. H. Lee et al., "O-linked N-acetylglucosamine transferase enhances secretory clusterin expression via liver X receptors and sterol response element binding protein regulation in cervical cancer," *Oncotarget*, vol. 9, no. 4, pp. 4625-4636, 2018.
- [59] J. H. Lee, J. Y. Lee, S. B. Rho et al., "PACAP inhibits tumor growth and interferes with clusterin in cervical carcinomas," *FEBS Letters*, vol. 588, no. 24, pp. 4730-4739, 2014.
- [60] M. B. Omary, N. O. Ku, G. Z. Tao, D. M. Toivola, and J. Liao, "Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 31, no. 7, pp. 383-394, 2006.
- [61] V. Karantza, "Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers," *Oncogene*, vol. 30, no. 2, pp. 127-138, 2011.
- [62] N. O. Ku and M. B. Omary, "A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8," *The Journal of Cell Biology*, vol. 174, no. 1, pp. 115-125, 2006.
- [63] T. Busch, M. Armacki, T. Eiseler et al., "Keratin 8 phosphorylation regulates keratin reorganization and migration of epithelial tumor cells," *Journal of Cell Science*, vol. 125, Part 9, pp. 2148-2159, 2012.
- [64] G. Arentz, T. Chataway, M. R. Condina, T. J. Price, P. Hoffmann, and J. E. Hardingham, "Increased phosphokeratin 8 isoforms in colorectal tumors associated with EGFR pathway activation and reduced apoptosis," *ISRN Molecular Biology*, vol. 2012, Article ID 706545, 8 pages, 2012.
- [65] R. Tiwari, I. Sahu, B. Soni et al., "Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling pathways regulated by site-specific phosphorylation of keratin-8 in skin squamous cell carcinoma derived cell line," *Proteomics*, vol. 17, no. 7, 2017.
- [66] P. G. Chu and L. M. Weiss, "Keratin expression in human tissues and neoplasms," *Histopathology*, vol. 40, no. 5, pp. 403-439, 2002.
- [67] H. Lee, H. Lee, and Y. K. Cho, "Cytokeratin7 and cytokeratin19 expression in high grade cervical intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma and their possible association in cervical carcinogenesis," *Diagnostic Pathology*, vol. 12, no. 1, p. 18, 2017.
- [68] X. Zhou, J. Liao, L. Hu, L. Feng, and M. B. Omary, "Characterization of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 19 and its role in filament organization," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 18, pp. 12861-12866, 1999.
- [69] Q. Zhou, N. T. Snider, J. Liao et al., "Characterization of in vivo keratin 19 phosphorylation on tyrosine-391," *PLoS One*, vol. 5, no. 10, pp. e13538-e13538, 2010.
- [70] B. Deb, P. Sengupta, J. Sambath, and P. Kumar, "Bioinformatics analysis of global proteomic and phosphoproteomic data sets revealed activation of NEK2 and AURKA in cancers," *Biomolecules*, vol. 10, no. 2, p. 237, 2020.
- [71] G. Panicker, Y. Ye, D. Wang, and E. R. Unger, "Characterization of the human cervical mucous proteome," *Clinical Proteomics*, vol. 6, no. 1-2, pp. 18-28, 2010.
- [72] D. Chokchaichamnankit, K. Watcharatanyatip, P. Subhasitanont et al., "Urinary biomarkers for the diagnosis of cervical cancer by quantitative label-free mass spectrometry analysis," *Oncology Letters*, vol. 17, no. 6, pp. 5453-5468, 2019.
- [73] K. Nakano, M. Kanai-Azuma, Y. Kanai et al., "Cofilin phosphorylation and actin polymerization by NRK/NESK, a member of the germinal center kinase family," *Experimental Cell Research*, vol. 287, no. 2, pp. 219-227, 2003.
- [74] W. F. Leong and V. T. K. Chow, "Transcriptomic and proteomic analyses of rhabdomyosarcoma cells reveal differential cellular gene expression in response to enterovirus 71 infection," *Cellular Microbiology*, vol. 8, no. 4, pp. 565-580, 2006.