



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE CDKN3
EN EL CICLO CELULAR EN LÍNEAS CELULARES
DERIVADAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

ERIKA ANABEL ALVARADO SILVA

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. EIRA VALERIA BARRÓN PALMA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Cáncer: características y mecanismo.....	3
1.2 El cáncer en el mundo y en México.....	5
1.3 Cáncer cervicouterino.....	6
1.3.1 Virus de Papiloma Humano.....	7
1.4 Ciclo celular.....	9
1.4.1 Fases del ciclo celular.....	10
1.4.2 Regulación del ciclo celular.....	10
1.5 CDKN3.....	11
2. Antecedentes.....	14
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivo general.....	16
5.1 Objetivos específicos.....	16
6. Materiales y métodos.....	17
6.1 Cultivo celular.....	17
6.2 Sincronización de cultivos celulares por deprivación de suero.....	17
6.3 Transfección con siRNAs.....	17
6.4 Extracción de RNA.....	18
6.5 PCR cuantitativa en Tiempo Real (qRT-PCR).....	18
6.6 Purificación y cuantificación de proteínas.....	19
6.7 Western blot.....	20
7. Resultados.....	21
7.1 qRT-PCR.....	21
7.2 Estandarización de geles de poliacrilamida y condiciones para Western blot.....	21
7.3 Western blot en líneas celulares.....	23
7.4 Biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino.....	24
7.5 Identificación de la banda de 55 kDa.....	26

8. Discusión.....	30
9. Conclusiones.....	34
10. Perspectivas.....	34
11. Referencias.....	35
12. Anexo 1.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Propiedades del cáncer.....	3
Figura 2. Progresión del cáncer cervicouterino causado por el VPH.....	9
Figura 3. Regulación del ciclo celular.....	11
Figura 4. Participación dual de KAP en el ciclo celular.....	12
Figura 5. Estandarización en la concentración de geles de poliacrilamida.....	22
Figura 6. Expresión de CDKN3 y las proteínas blanco fosforiladas y no fosforiladas en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y control.....	24
Figura 7. Expresión de CDKN3 y sus blancos en biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino.....	25
Figura 8. Determinación de la proteína observada en todos los ensayos realizados.....	27

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y TABLAS

	Página
Gráfica 1. Expresión relativa del RNA mensajero de <i>CDKN3</i> en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y control.....	21
Tabla 1. Resultados emitidos por el IBT tras la identificación de las dos bandas enviadas.....	29

ABREVIATURAS

- ATP:** Adenosín Trifosfato (Adenosine Triphosphate)
- CaCu:** Cáncer cervicouterino
- CDK:** Cinasa dependiente de ciclina
- CDKN3:** Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 3
- CTL:** Linfocito T citotóxico (Cytolytic T Lymphocyte)
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- GLUT1:** Transportador de glucosa 1 (Glucose transporter 1)
- IGF1/2:** Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo 1/2 (Insulin-like Growth Factor)
- INEGI:** Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- NK:** Célula Asesina Natural (Natural Killer)
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- Rb:** Proteína Retinoblastoma
- RNA:** Ácido ribonucleico
- siRNA:** RNA pequeño de interferencia (small interfering RNA)
- TGF- β :** Factor de Crecimiento Transformante Beta (Transforming Growth Factor Beta)
- VPH:** Virus de Papiloma Humano

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de todo el mundo. Es una enfermedad multifactorial en la que el factor etiológico más importante es la presencia del Virus de Papiloma Humano (VPH), que se encuentra presente en el 99.7% de los casos reportados. El VPH se caracteriza por codificar a las oncoproteínas E6 y E7, encargadas de iniciar el proceso neoplásico alterando el ciclo celular, llevando a la proliferación celular y con ello a la formación del tumor.

Se ha reportado que *CDKN3* se encuentra sobreexpresado en CaCu y que su alta expresión está asociada a una baja supervivencia en pacientes con CaCu. El gen *CDKN3* codifica para la proteína fosfatasa KAP, proteína con una función dual dentro del ciclo celular: por una parte, desfosforila a CDK2 controlando la transición G1/S deteniendo el ciclo celular, y, por otro lado, desfosforila a CDK1 promoviendo la Mitosis celular. Al encontrarse KAP sobreexpresado en CaCu, se cree que éste desfosforila a CDK1 para promover la mitosis celular. Por ello, el objetivo del presente estudio fue investigar la interacción de la proteína CDKN3 con sus posibles blancos CDK1 y CDK2 en las líneas celulares SiHa y CaSki derivadas de CaCu, así como en biopsias de pacientes con CaCu.

Se evaluó el nivel del RNA mensajero de *CDKN3* en líneas celulares derivadas de CaCu (SiHa y CaSki) con y sin transfectar con siRNAs específicos contra *CDKN3* para comprobar la inhibición. Se realizaron western blots para evaluar la expresión de la proteína codificada por *CDKN3*, y la expresión de las proteínas CDK1 y CDK2 fosforiladas y no fosforiladas.

En las líneas celulares SiHa y CaSki se observa una disminución en la presencia de la proteína CDK1 no fosforilada cuando CDKN3 es inhibido en ambas líneas celulares, lo cual podría explicar el avance del ciclo celular en CaCu. Mientras que la expresión de la proteína CDK2 no fosforilada incrementa cuando se inhibe CDKN3, favoreciendo el arresto del ciclo celular.

Además, en los Western blots realizados con las proteínas derivadas de las biopsias de pacientes con CaCu se observó una banda con un peso mayor (55 kDa) al esperado (34 kDa) en todos los ensayos realizados, por lo que surgió la hipótesis de que la banda correspondía a la proteína CDKN3 unida a sus blancos CDK1 o CDK2. Para comprobar la hipótesis, la banda fue enviada para su identificación al

Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM). Los resultados emitidos por el IBT no mostraron homología con las proteínas esperadas (CDK1 y CDK2).

En conclusión, la proteína codificada por el gen *CDKN3* se encuentra expresado en las líneas celulares derivadas de CaCu, así como en biopsias de pacientes con CaCu y los datos sugieren que podría estar desfosforilando a CDK1, promoviendo la mitosis celular.

EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE CDKN3 EN EL CICLO CELULAR EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer: características y mecanismos

El cáncer es conocido como un conjunto de enfermedades ocasionadas por cambios en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular, además de la capacidad de migración e invasión en tejidos¹. Todo esto ocurre como resultado de la acumulación de mutaciones somáticas en la progenie de una célula normal, llevando a la proliferación selectiva e incontrolada de las células mutadas².

Todos los tipos de cáncer se caracterizan por presentar seis propiedades específicas (Figura 1): el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, capacidad de la inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y la activación de invasión y metástasis. Además de la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune³.

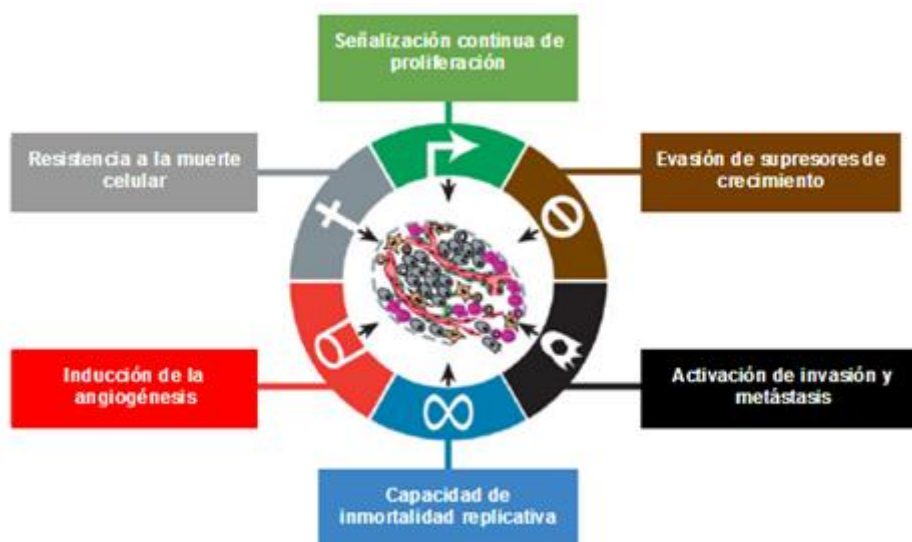


Figura 1. Propiedades del cáncer: Señalización continua de proliferación, evasión de supresores de crecimiento, activación de invasión y metástasis, capacidad de inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte celular. (Tomado de Hanahan y Weinberg, 2011).

Las células cancerosas mantienen activa la señalización de proliferación de distintas maneras, ya sea por la estimulación proliferativa autocrina o paracrina de las células adyacentes; por la sobreexpresión de receptores de membrana o

alteraciones estructurales de éstos, así como la activación constitutiva de genes promotores de la proliferación como B-Raf⁴.

Por otra parte, docenas de supresores tumorales que operan en varias vías de señalización para limitar el crecimiento y la proliferación celular, se encuentran inactivados en las células cancerosas. Los dos supresores tumorales que se encuentran alterados principalmente son las proteínas Retinoblastoma (Rb) y p53, quienes determinan la proliferación celular, la senescencia y la apoptosis celular⁵.

Además de inactivar a los supresores de crecimiento, las células cancerosas son capaces de evitar o limitar la muerte celular, principalmente por la pérdida de supresores tumorales como p53. Alternativamente, las células cancerígenas pueden aumentar la expresión de proteínas reguladoras anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL; o de las proteínas relacionadas con la señalización de supervivencia como IGF1/2, además pueden disminuir los factores pro-apoptóticos, tales como Bax, Bim y Puma³.

Una vez que las células cancerosas comienzan a proliferar descontroladamente para iniciar la neoplasia, requieren de ciertos mecanismos para su supervivencia ya que, al igual que las células sanas, requieren de nutrientes y oxígeno, así como eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono, mecanismos que son realizados mediante la angiogénesis, es decir, la neovascularización. En adultos sanos este proceso se mantiene quiescente, sin embargo, durante el proceso neoplásico, la angiogénesis es activada, permitiendo el mantenimiento y ampliación del crecimiento neoplásico⁶.

Este crecimiento neoplásico lleva a las células cancerígenas a invadir otros tejidos hasta llegar a metástasis, este proceso está relacionado, entre otros, con la mutación o pérdida de E-Cadherina, molécula clave de adhesión de célula a célula, que ayuda a ensamblar las células epiteliales y así mantengan esta unión de manera estable. Cuando se pierde esta molécula, disminuye la estabilidad de unión entre las células, favoreciendo la migración celular llevando a la invasión de otros tejidos y a su vez a metástasis⁷.

La capacidad replicativa de las células cancerígenas conlleva a un ajuste en el metabolismo energético para poder abastecer toda la energía requerida para continuar con su replicación y proliferación continua. Las células sanas bajo condiciones aerobias, oxidan la glucosa a piruvato mediante la glucólisis en el citoplasma y después a dióxido de carbono en las mitocondrias; en condiciones

anaerobias, se favorece la glucólisis y se envía relativamente poco piruvato a las mitocondrias que consumen oxígeno. En el caso de las células cancerígenas, aun con la presencia de oxígeno, reprograman su metabolismo energético para la obtención de energía vía glucólisis. Al obtener una menor cantidad de ATP por esta vía, incrementan el número de transportadores de glucosa, principalmente GLUT1, para compensar la producción de energía^{8,9}.

Otra de las habilidades que desarrollan las células cancerosas para llevar a cabo el proceso neoplásico es evitar la detección del sistema inmunológico. Con base en estudios realizados, se sugiere que existen clonas de células cancerosas altamente inmunogénicas que son detectadas y eliminadas de manera constante en huéspedes inmunocompetentes, dejando únicamente a las clonas de células cancerosas débilmente inmunogénicas, las cuales pueden posteriormente crecer y generar un tumor sólido¹⁰. Estas células son capaces de evadir al sistema inmunológico a través de la inactivación de los compuestos enviados para eliminarlas, inhibiendo a los CTL y NK mediante la segregación de TGF- β u otros factores inmunosupresores¹¹.

1.2 El cáncer en el mundo y en México

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. En el 2015 causó 8.8 millones de defunciones, registradas principalmente en países de ingresos medios y bajos, y se prevé que el número de casos aumente cerca del 70% en los próximos 20 años. Las infecciones con virus oncogénicos, entre ellas las causadas por virus de hepatitis o por Virus de Papiloma Humano (VPH), ocasionan el 25% de los casos de cáncer¹².

La OMS identifica que entre esta enfermedad crónico-degenerativa los tumores malignos más comunes en los hombres son los de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado, mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago, según cifras del 2015¹².

De acuerdo con las estadísticas de mortalidad del INEGI, en México en 2013, del total de defunciones de la población mayor de 20 años, el 13.6% fue a causa de algún tumor y de éstas, el 93.6% corresponde a tumores malignos. Y por sexo, del total de defunciones por cáncer, 48.8% ocurren en varones y 51.2%, en mujeres. Del total de tumores malignos en la población, los de órganos digestivos fueron la

primera causa de mortalidad en el 2013, seguido por los tumores de órganos respiratorios e intratorácicos, en tercer lugar se ubican los tumores del sistema reproductor masculino. En el caso de las mujeres el cáncer de mama aparece como segunda causa de mortalidad, lo cual confirma que las muertes por tumores malignos muestran un comportamiento diferenciado por sexo¹³.

En México, el CaCu es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres desde el 2006¹⁴. De acuerdo con la OMS, la frecuencia de casos nuevos de CaCu en el 2008 fue del 10186, lo cual representa una tasa estandarizada a nivel mundial de 19.2 x 100 mil mujeres; esto implica un riesgo acumulado de 1.94 x 100 mujeres. La tasa de mortalidad en México disminuyó aproximadamente 2.5% por año en la década de los noventa y aproximadamente 5% por año en la última década, con un estimado en el 2008 de 9.7 x 100 mil mujeres (5061 defunciones), el cual se considera todavía excesivamente alto¹⁵.

1.3 Cáncer cervicouterino

De acuerdo con la OMS, el CaCu es el segundo tipo de cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial, con un estimado de 445,000 casos nuevos cada año, de 270,000 muertes resultantes por esta enfermedad, el 85% se registran en países en vías de desarrollo¹⁶.

Se ha observado que el factor etiológico más importante para el desarrollo de CaCu es la presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH), pues está presente en el 99.7% de los casos de CaCu en todo el mundo. La infección por VPH procede por integración de su genoma en el del huésped, llevando a la desregulación de procesos celulares; tales como el aumento en la síntesis de DNA, proliferación celular y respuesta celular alterada al crecimiento y factores de diferenciación que finalmente conducen al desarrollo de cáncer¹⁶.

Sin embargo, la mayoría de las infecciones por VPH no llevan al desarrollo del tumor, es decir, que a pesar de que el VPH es un factor obligado para el desarrollo de cáncer, ésta es una enfermedad multifactorial en la cual, se asocian otros factores como los hormonales, el tipo de alimentación la alta paridad, el uso prolongado de anticonceptivos orales y el tabaquismo activo y pasivo el entorno en el que se desarrolle la persona, el estatus socioeconómico. Además, por estar relacionado un agente infeccioso, el comienzo de la actividad sexual a una edad

temprana y con un mayor número de parejas sexuales, incrementa el riesgo de desarrollar CaCu. Una vez que ocurre la infección del VPH, varios factores de riesgo adicionales se asocian con un mayor riesgo de desarrollo de CaCu como se menciona anteriormente^{17, 18,19}.

Una de las principales estrategias de prevención de CaCu es la vacuna contra la infección de VPH en mujeres adolescentes antes del primer contacto sexual. La OMS recomienda ofrecer estas vacunas a mujeres entre los 9 y 13 años, ya que la eficacia de la vacuna es mayor cuando no hay una infección de VPH previa a su colocación²⁰.

Gracias a la vacuna contra el VPH y al estudio del papanicolaou, ha reducido la incidencia de CaCu, sin embargo, el número de casos reportados por esta enfermedad sigue siendo elevado en la actualidad²¹.

1.3.1 Virus de Papiloma humano

El VPH es un virus perteneciente a la familia *Papillomaviridae*. Es un virus pequeño compuesto por una cápside que les permite sobrevivir durante largos periodos de tiempo. Sólo se reproduce en células vivas, se replica dentro del núcleo y transforma a la célula huésped, dando lugar a una proliferación neoplásica causando cáncer²². Se han descrito más de 120 tipos virales de VPH; los que son capaces de infectar las mucosas se dividen en genotipos de alto y bajo riesgo de acuerdo a si su infección puede o no conducir al desarrollo de cáncer. Los de alto riesgo son clasificados como potencialmente oncogénicos ya que se encuentran en el 99% de los casos de CaCu²³. El VPH 16 se encuentra en aproximadamente el 60% de todos los CaCu, mientras que el VPH 18 está involucrado en un 10-20%²⁴ y el resto de los casos presentan VPH 31 y 45, mientras que la mínima cantidad (1%) de los casos de CaCu es negativo a VPH²⁵.

El VPH es un virus circular de DNA de doble cadena compuesto por 6 genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos genes tardíos (L1 y L2)²⁶. La proteína L1 es el elemento estructural primario, mientras que la proteína L2 interviene en la entrada del virus a las células, la localización de los componentes virales en el núcleo, la unión al DNA y la estabilidad de la cápside²⁷. E6 y E7 son oncoproteínas con funciones tales como la señalización transmembranal, la transformación de líneas celulares y la regulación del ciclo celular. Estas oncoproteínas interactúan con

p53 y Rb, respectivamente. E6 degrada a la proteína supresora tumoral p53 vía ubiquitinación, perturbando el control de la progresión del ciclo celular y con ello incrementando el crecimiento celular. Mientras que E7 se une a la proteína Rb en el “pocket domain”, región sumamente importante para llevar a cabo su función como supresor tumoral; cuando E7 se une a esta región, Rb pierde su función, llevando a la activación de E2F y como consecuencia a la síntesis de factores de transcripción para la expresión de enzimas que participan en la replicación, llevando a la replicación y división celular²⁸.

El VPH afecta principalmente a las células epiteliales de piel y mucosa, pero generalmente penetran la capa basal, su ciclo de desarrollo es lento y produce una amplia gama de lesiones proliferativas tanto en mucosa como en epitelio²⁶. Se cree que el VPH accede a las células basales a través de micro abrasiones en el epitelio cervical, como se observa en la figura 2, después de la infección, los genes tempranos del VPH comienzan a expresarse y el DNA se replica en forma de DNA episomal. En las capas más altas del epitelio (la zona media y la zona superficial) el genoma viral se replica, y los genes tardíos L1 y L2, y E4 se expresan. L1 y L2 encapsulan el genoma viral para formar viriones en el núcleo. La progresión de las lesiones a cáncer invasivo está asociado con la integración del genoma del VPH dentro de los cromosomas del organismo infectado, además de la pérdida de E2, y la subsecuente sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7²⁹.

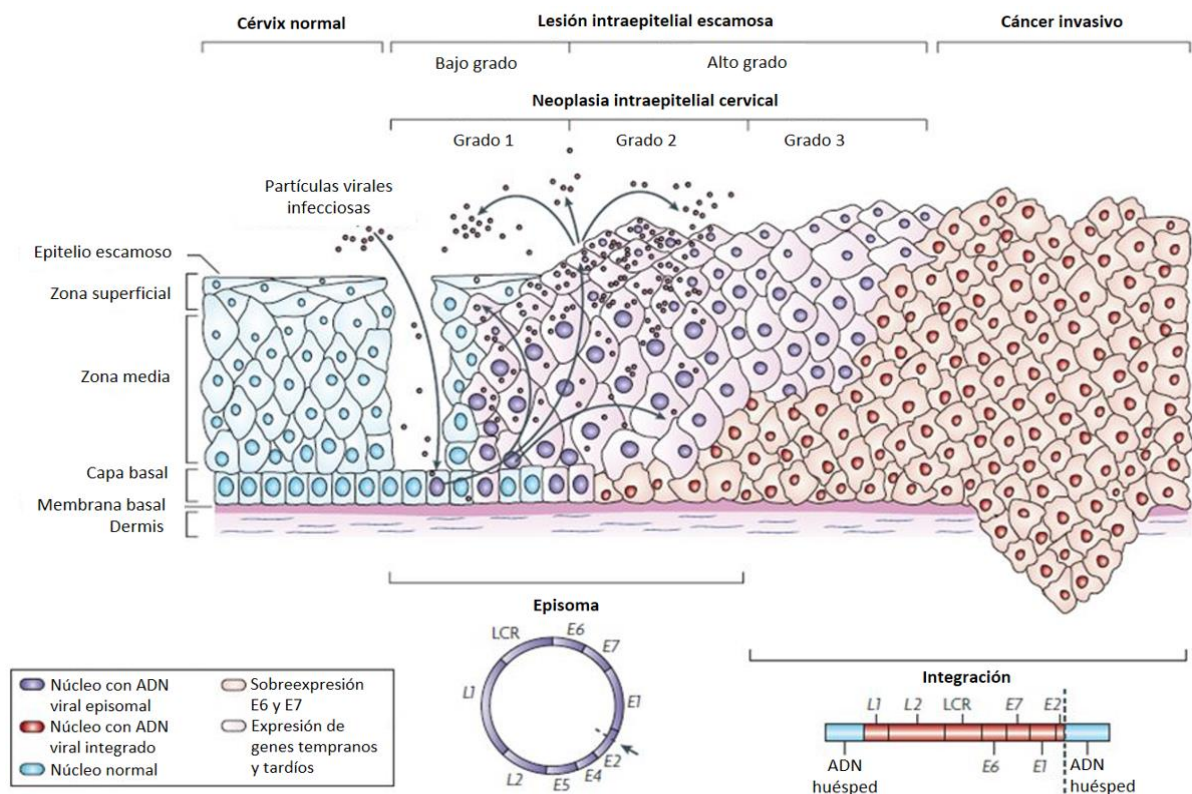


Figura 2. Progresión del cáncer cervicouterino causado por el VPH. El VPH accede mediante micro abrasiones a la capa basal del epitelio cervical, donde comienza a replicarse e invadir las capas más altas del epitelio (Tomado de Woodman *et al.*, 2007).

1.4 Ciclo celular

El ciclo celular se define como el conjunto de eventos responsables de la duplicación celular, un mecanismo de conservación mediante el cual las células eucariotas se replican a sí mismas, transmitiendo el material genético a la siguiente generación través de la replicación del DNA^{30, 31}.

Para mantener un equilibrio entre el número de células de un organismo, es necesario lograr un acoplamiento entre el ciclo celular y la muerte celular programada, a través de señales y factores compartidos entre ambos³¹.

El ciclo celular ocurre en cuatro etapas esenciales: crecimiento, duplicación del material genético, segregación cromosómica y división celular.

1.4.1 Fases del ciclo celular

La transmisión de información genética de una generación de células a otra requiere de la replicación del genoma durante la fase de síntesis o **fase S**, y la segregación de las dos nuevas células hijas durante la mitosis o **fase M**. Las fases S y M son eventos cruciales que permiten la duplicación correcta de la célula sin acumular anomalías genéticas. Entre las fases S y M, hay dos etapas que las separan: **G1** separa M de S, y **G2** está entre S y M. Cuando la célula comienza a diferenciarse, sale de la fase G1 del ciclo celular para entrar en un estado inactivo denominado **G0**³². Las células que se encuentran en esta última etapa no crecen ni proliferan en el cuerpo humano³³.

El tiempo y el orden de las fases del ciclo celular se controlan mediante puntos de control ("checkpoints"), que se encuentran en la transición G1/S, en la fase S y durante la transición de las fases G2/M. Los checkpoints son un sistema de control que regulan que la proliferación celular sólo se lleve a cabo en presencia de señales estimulantes, tales como los factores de crecimiento. También contribuyen a la integridad con la que la información genética será transmitida a la siguiente generación. Los checkpoints también son activados por daño en el DNA y por cromosomas mal alineados en el huso mitótico. En este caso, el arresto del crecimiento causado por los checkpoints permite que la célula repare el daño. Después de repararlo, el ciclo celular se reanuda. En caso de no poder repararlo, la célula se elimina por apoptosis³².

1.4.2 Regulación del ciclo celular

La progresión de las cuatro fases del ciclo celular en eucariontes es mediada por la activación e inactivación de las cinasas dependientes de ciclina (CDK). Las CDKs pertenecen a la familia de proteínas serina/treonina cinasas, su actividad depende de la presencia de subunidades activadoras llamadas ciclinas. La abundancia de las ciclinas específicas aumenta durante la fase del ciclo celular en la que sean requeridas y disminuye en las fases en las que no son necesarias³³.

La actividad de los complejos CDK también está regulada por otros mecanismos. Su activación requiere la asociación con la ciclina correspondiente y la fosforilación mediante la cinasa activadora de CDK (Figura 3). Además, la actividad

de CDK se suprime por fosforilación en residuos conservados de treonina y tirosina. La desfosforilación de estos residuos y consiguiente activación de CDK están mediados por la familia de fosfatasas Cdc25. Otro mecanismo que regula la actividad de CDK está mediado por las subunidades inhibitoras de CDKs^{33, 34}.

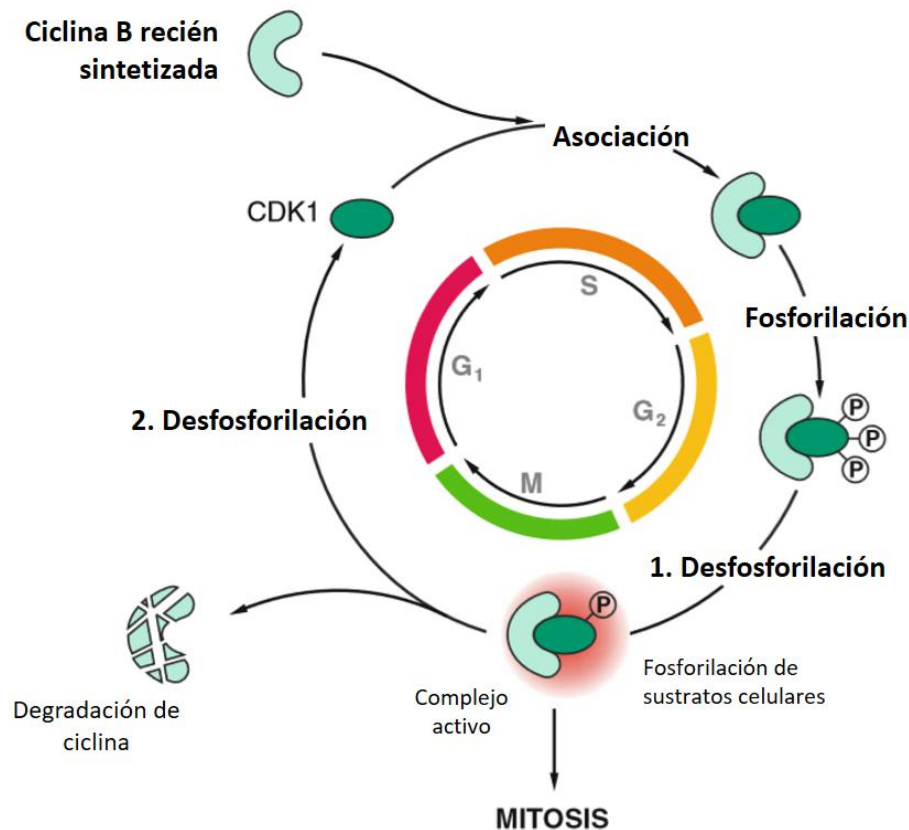


Figura 3. Regulación del ciclo celular. Las ciclinas interactúan con las CDKs. Se fosforilan y desfosforilan a durante la progresión del ciclo celular, cuando ocurre una segunda desfosforilación, las CDK entran en una nueva ronda de ciclos celulares, mientras que las ciclinas se degradan y se sintetizan nuevamente cuando es necesario. En la figura se ejemplifica la regulación de CDK1 durante el ciclo celular. (Modificado de C. Behl C. y Ziegler C., 2014).

1.5 CDKN3

El gen inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 3 (*CDKN3*) codifica para la proteína fosfatasa “KAP”, un miembro de la familia de proteínas inhibitoras de fosfatasa. La proteína KAP muestra una actividad fosfatasa hacia sustratos que contienen residuos ya sean de fosfotirosina o fosfoserina. Ya que la proteína KAP no es significativamente similar a las fosfatasas que tienen el núcleo catalítico modificado, representa una clasificación de dualidad específica. La habilidad de

KAP para unirse a múltiples CDKs sugiere que ésta juega un rol en la regulación del ciclo celular³⁵.

Se sabe que la proteína KAP puede participar en el ciclo celular presentando una función dual³⁶ (Figura 4), ya puede interactuar con CDK2 y con CDC2 (también conocido como CDK1), mostrando preferencia por ésta última proteína³⁵. Al desfosforilar a CDK2 en Treonina 160, se inhibe la progresión del ciclo celular impidiendo que la célula salga de la fase G1²⁸. Por otra parte, si KAP se une a la proteína CDK1, se forma el complejo M-CDK, controlando así la transición G2 / M³⁷.

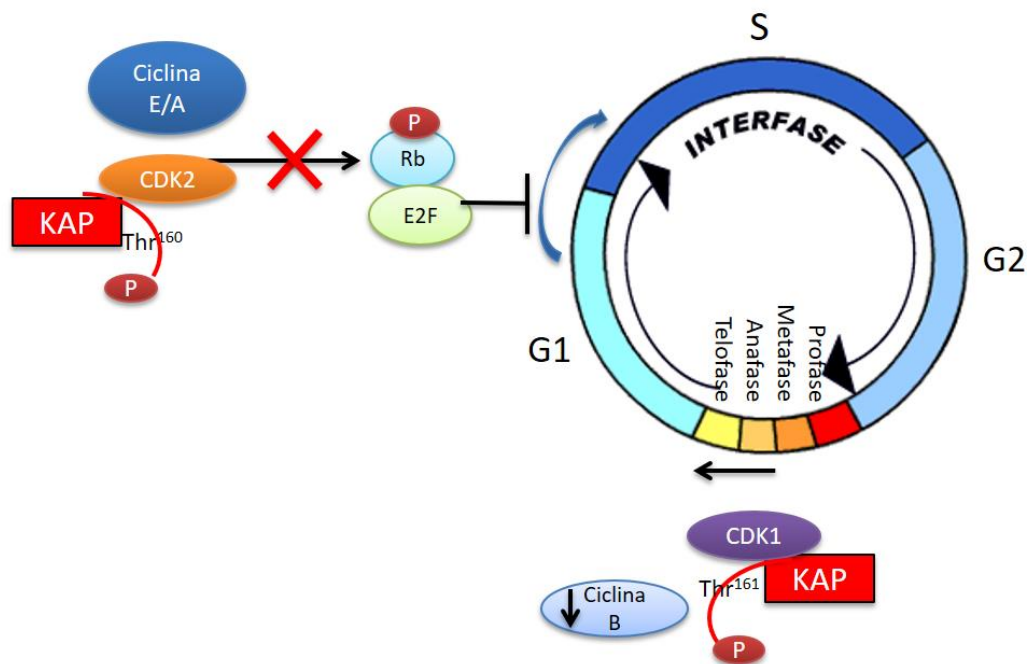


Figura 4. Participación dual de KAP en el ciclo celular. KAP puede desfosforilar a CDK2 en Treonina 160, regulando la transición G1/S del ciclo celular. Por otra parte, puede promover la transición de Metafase/Anafase mediante la desfosforilación de CDK1 en Treonina 161. (Modificado de Berumen *et al.*, 2016)

La proteína CDK1 activa promueve en las células la entrada a mitosis, mientras que la salida depende de la inhibición de la actividad de CDK1, ya sea por la degradación de la ciclina mitótica (ciclina B) por el complejo promotor de la anafase (APC/C), la acumulación de inhibidores de proteína CDK1 o la desfosforilación de proteínas fosforiladas por CDK1. La proteína KAP, podría ser

esencial en estos procesos. Ya que, como se mencionó anteriormente, interactúa directamente con CDK1 inhibiendo su actividad mediante la desfosforilación de Treonina 161, lo cual conlleva al desacoplamiento del complejo CDK1-Ciclina B, disminuyendo la actividad de CDK1 y a la vez la liberación de ciclina B, para posteriormente ser ubiquitinizada por el complejo promotor de la anafase (Cdc20/APC) y degradada en el proteosoma. Además, KAP desfosforila muchas proteínas fosforiladas por CDK1³⁸.

2. ANTECEDENTES

CDKN3 ha sido reportado de manera contradictoria en cuestión a su función en la carcinogénesis. Por un lado, se ha observado que el silenciamiento *in vitro* de *CDKN3* promueve la apoptosis celular, induce el arresto del ciclo celular en la fase G1 e inhibe la migración en líneas celulares de cáncer de mama³⁹.

Así mismo, en adenocarcinoma de pulmón, la sobreexpresión de *CDKN3* se relaciona con una baja sobrevida; además, los niveles de la proteína y el mRNA están más elevados en la fase de mitótica del ciclo celular⁴⁰. Por otra parte, al inhibir *CDKN3* en dos líneas celulares de cáncer de ovario, se observa una disminución en la proliferación y la invasión celular, además de un aumento en la apoptosis celular⁴¹.

En líneas celulares derivadas de CaCu, la inhibición parcial de *CDKN3* disminuye radicalmente la proliferación celular *in vitro*. Además, la sobreexpresión de *CDKN3* está asociada con una baja sobrevida en las pacientes con CaCu⁴².

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es una enfermedad que afecta a muchas mujeres actualmente, a pesar de que se ha reducido la incidencia en algunos países desarrollados por la aplicación de la vacuna contra VPH, es necesaria la implementación de marcadores de diagnóstico temprano, así como de pronóstico y sobrevida.

Los resultados obtenidos previamente, indican claramente que el gen *CDKN3* puede proponerse como un marcador de pronóstico y sobrevida en CaCu^{42, 43}. Por lo que es importante comprender el mecanismo de acción de *CDKN3* dentro del ciclo celular y con base en ello, proponer tratamientos alternativos a las pacientes, ya sea a través de nuevos esquemas terapéuticos o mediante la generación de drogas específicas. Sin embargo, aún faltan ensayos para lograrlo, por lo que los beneficios hacia la sociedad serán reflejados a mediano plazo.

4. HIPÓTESIS

En el cáncer cervicouterino, la proteína fosfatasa KAP, codificada por el gen *CDKN3*, participa en el ciclo celular desfosforilando principalmente a su proteína blanco CDK1, cuya desfosforilación promueve la mitosis celular.

5. OBJETIVO GENERAL

Conocer la relación existente entre la proteína codificada por el gen *CDKN3* con sus posibles blancos CDK1 y CDK2 en las líneas celulares SiHa y CaSki derivadas de cáncer cervicouterino, así como en biopsias de cáncer cervicouterino.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inhibir la expresión del gen *CDKN3* en las líneas celulares SiHa y CaSki derivadas de CaCu por medio de siRNAs específicos.
2. Evaluar la inhibición de *CDKN3* mediante qRT-PCR en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y observar los cambios de expresión a nivel de RNA de los genes blanco CDK1 y CDK2.
3. Evaluar la expresión de la proteína codificada por *CDKN3*, así como la expresión de las proteínas blanco CDK1 y CDK2 activas e inactivas por medio de Western blot en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y control.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

Se cultivaron las líneas celulares CaSki (ATCC: CRL-1550) y SiHa (ATCC: HTB-35) positivas para el virus de papiloma humano 16 en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB; Gibco) al 10% y solución de antibióticos Penicilina Estreptomina (Gibco) al 1%. Se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% y Humedad Relativa (HR) al 80%.

6.2 Sincronización de cultivos celulares por privación de suero

Se sembraron 2×10^5 células de las líneas celulares CaSki y SiHa en placas de 12 pozos, se dejaron incubando por 24 horas en las condiciones mencionadas previamente. Posteriormente, las células fueron lavadas con Phosphate Buffered Saline 1x (PBS) e inmediatamente se agregó medio de cultivo suplementado con SFB 0.2% y antibiótico al 1%, y se dejaron incubando durante 72 horas.

6.3 Transfección con siRNAs

Se sembraron 2×10^5 células en cada uno de los pozos de una placa de 12 pozos y se dejaron incubando entre 24 y 48 horas hasta obtener 60-80% de confluencia. Se sincronizaron las células mediante la técnica de privación de suero como se indicó anteriormente. Para llevar a cabo la inhibición de la expresión de CDKN3 se utilizó un mix de tres siRNAs específicos contra el RNA mensajero de CDKN3 (sc-43877, Santa Cruz Biotechnology) y un mix de siRNAs aleatorios cuya secuencia no es específica para ningún RNA mensajero y se utilizó como control de transfección (control siRNA-A, sc-37007), y reactivo de transfección (sc-29528, Santa Cruz Biotechnology). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se prepararon los medios para la transfección, ajustando la concentración del siRNA a 80 nm para la transfección de las células SiHa y a 100 nm para las transfección de las células CaSki. Se adicionó la solución con siRNAs (contra CDKN3 y control) y medio transfectante que no contiene suero ni antibióticos, posteriormente, se

incubaron las células durante 7 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, se añadieron 500 µl de medio de cultivo DMEM suplementado con SFB 20% y antibiótico 2%, y se dejaron incubando durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS 1x y se agregó medio de cultivo SFB 10% y antibiótico 1% y se dejaron incubando durante 48 horas para la extracción de RNA y 96 horas para extraer las proteínas.

6.4 Extracción de RNA

Se colectaron las células SiHa y CaSki transfectadas y control con 500 ul de PBS en tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 7500 rpm por 3 minutos para formar el pellet de células y descartar el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 500 ul de TRIzol y se homogenizó. Se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, en seguida se agregaron 200 ul de cloroformo, se mezcló con vórtex y se dejó incubando durante 3 minutos a temperatura ambiente, mezclándolo cada minuto. Terminando la incubación, se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 g a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se agregó 500 ul de isopropanol, se mezcló por inmersión y se dejó incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet formado se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Se centrifugó durante 5 minutos a 7 500 g a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado. Una vez desechado el sobrenadante, el dejó secando el pellet y después se resuspendió en 30 ul de agua DEPC. El RNA fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

6.5 PCR cuantitativa en Tiempo Real (qRT-PCR)

La transcripción reversa del RNA total extraído de las células SiHa y CaSki transfectadas y control, se realizó utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems), en un volumen total de 20 µL. La mezcla incluía 2 µg de RNA, 2 µL de 10x Buffer RT, 0.8 µL de dNTP 100 mM, 2 µL de Primers RT aleatorios 10x, 1 µL de enzima MultiScribe™ transcriptasa reversa (5 U/µL) y 1 µL de inhibidor de RNasa (2 U/µL). Las reacciones se incubaron a 37° C durante 120 min. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

La expresión de los genes *CDKN3*, *CDK1* y *CDK2*, se cuantificó en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y control mediante PCR tiempo real (qRT-PCR) utilizando sondas TaqMan (*CDKN3*:Hs00193192_m1, *CDK1*: Hs0093777_m1, *CDK2*:Hs01548894_m1; Applied biosystems). La sonda para el gen *GAPDH* se usó como control interno (Las sondas TaqMan utilizadas en los ensayos de expresión fueron las siguientes: *CDKN3*, Hs00193192_m1; *GAPDH*, Hs02758991_g1; Applied Biosystems). Los experimentos se realizaron por duplicado en un volumen final de 20 μ L, la mezcla incluía 2 μ L de cDNA, 10 μ L de Master Mix TaqMan Universal PCR 2x (Applied Biosystems), 1 μ L TaqMan Gene Expression Assay y 7 μ L de agua libre de RNasas. El programa de ciclaje se estableció de la siguiente manera: un paso de activación inicial de PCR a 50°C durante 2 minutos seguido de 95°C durante 10 minutos, luego 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y finalmente 60°C durante 1 minuto. La medición de la expresión de los genes *CDKN3*, *CDK1* y *CDK2* de las líneas celulares transfectadas y no transfectadas se normalizó con la intensidad del gen de referencia interna (*GAPDH*) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

6.6 Purificación y cuantificación de proteínas

Se cosecharon las células CaSki y SiHa transfectadas y control agregando 80 μ l de tripsina, se colectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 7500 rpm durante 3 minutos, se lavaron con 400 μ l de PBS 1x y se centrifugaron a 7500 rpm durante 3 minutos. Se eliminó el PBS 1x y posteriormente se agregó 50-100 μ l de buffer de extracción y lisis RIPA, previamente preparado con EDTA 0.5 M y un coctel de proteasas y fosfatasas (Thermo Scientific), dependiendo del tamaño del pellet y se homogenizó evitando la formación de burbujas. Se sonicó 5 veces por periodos de 5 segundos al 20% de amplitud (mínimo 15%, máximo 30%) dejando 1 minuto entre cada periodo. Finalmente, se almacenaron las proteínas en un tubo eppendorf a -80°C.

Para las biopsias de pacientes con CaCu se utilizaron proteínas de un banco existente dentro del laboratorio de Medicina Genómica del Hospital General de México. Para la extracción de proteínas se utilizó con el kit comercial 2-D Clean-Up (80648451, GE Healthcare). Se agregó 1.5 mL del buffer de lisis, se homogenizó durante un minuto y se retiró el sobrenadante. Posteriormente, se lavó el pellet 3 veces con PBS 1X con inhibidor de proteasas, se desechó el sobrenadante y se

trituro la muestra con un mortero. Finalmente, se agreg6 buffer de muestra y se almacenaron las prote6nas en un tubo eppendorf a -80°C.

Una vez que las prote6nas fueron purificadas, se cuantificaron en espectrofot6metro, preparando una curva con concentraciones conocidas de BCA (Thermo Scientific) ley6ndola a una lectura de 562 nm. Se utiliz6 la ecuaci6n de la recta obtenida en la curva est6ndar para determinar la concentraci6n de las prote6nas extra6das.

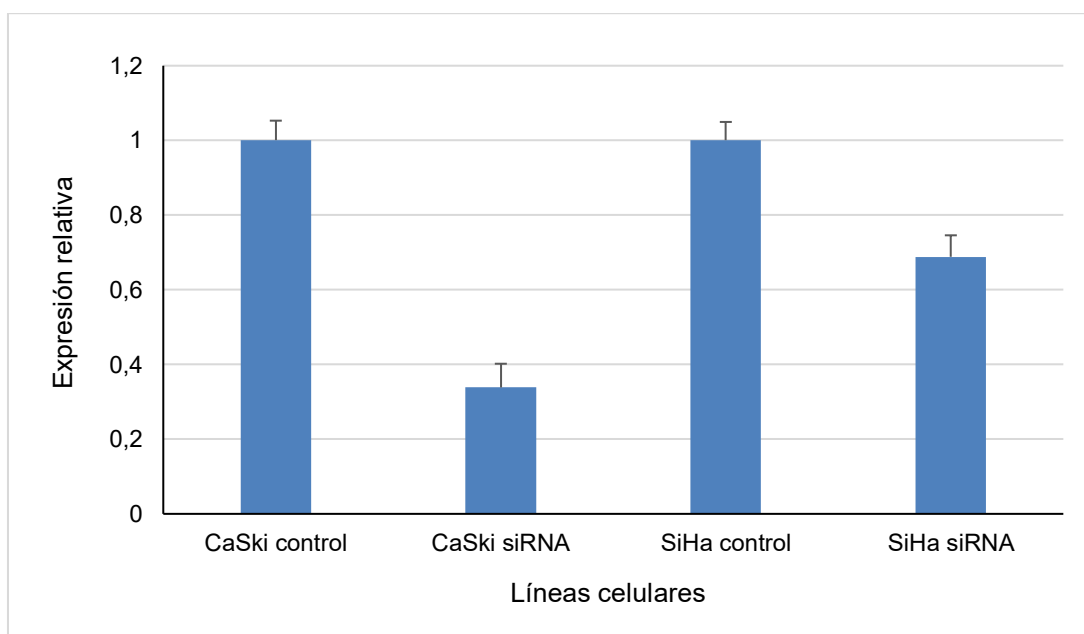
6.7 Western blot

Se realizaron Western blots para evidenciar las prote6nas CDKN3 (sc-475, Santa Cruz Biotechnology), CDK1 fosforilado (ab138389, Abcam) y no fosforilado (ab8040, Abcam), CDK2 fosforilado (ab194868, Abcam) y no fosforilado (ab32147, Abcam), y se utiliz6 Tubulina (ab126165, Abcam) como control. Las prote6nas totales se prepararon en geles de poliacrilamida al 12% con las prote6nas extra6das de las c6lulas CaSki y SiHa transfectadas y control, ajust6ndolas a una concentraci6n de 25 µg totales en un volumen de 5 µl. Un gel se tiñ6 con azul de comassie para observar el estado de las prote6nas y los otros se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloque6 con Tris-Buffered Saline Tween 20 al 0.1% (TBST 0.1%) con leche al 5% durante 2 horas, una vez bloqueada se dej6 incubando con el anticuerpo primario toda la noche (las diluciones de los anticuerpos fueron las siguientes: Tubulina 1:3000, CDKN3 1:1000, CDK2 1:2000, CDK2P 1:2000, CDK1 1:1000, CDK1P 1:1000). Posteriormente, se lav6 la membrana con TBST 0.1% por una hora en agitaci6n constante, cambiando la soluci6n cada 10 minutos. Posteriormente, se incub6 con el anticuerpo secundario, Anti rabbit (sc-2317, Santa Cruz Biotechnology) o Anti mouse (sc-358917, Santa Cruz Biotechnology), (con las siguientes diluciones Anti rabbit 1:10000, Anti mouse 1:2000) durante una hora en agitaci6n constante y se lav6 por una hora cambiando la soluci6n cada 10 minutos. Por 6ltimo, se expusieron las membranas con el reactivo Super Signal Peroxidase (Thermo Scientific) hasta observar quimioluminiscencia de la prote6na buscada; se expuso una placa fotogr6fica durante el tiempo necesario para capturar las bandas; y finalmente se revel6 y fij6 la placa.

7. RESULTADOS

7.1 qRT-PCR

Se realizó PCR en tiempo real para cuantificar el RNA mensajero del gen *CDKN3* en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y control. En la gráfica 1 se observa una clara disminución en la expresión de *CDKN3* en ambas líneas celulares, siendo mayor en CaSki. Lo cual corrobora que *CDKN3* fue inhibido en las líneas celulares exploradas.



Gráfica 1. Expresión relativa del RNA mensajero de *CDKN3* en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y control.

7.2 Estandarización de geles de poliacrilamida y condiciones para Western blot

Se corrieron las proteínas en geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones para determinar la más adecuada para realizar los ensayos de Western blot contra las proteínas buscadas que tienen un peso molecular de 34 kDa. Para ello se utilizaron proteínas de las líneas celulares HeLa, CaLo y CaSki sin transfectar y proteínas de tumores previamente extraídas. Los primeros geles fueron preparados a una concentración del 8% de poliacrilamida (Figura 5A), sin embargo, las proteínas corrían muy rápido y se difuminaban conforme avanzaba la corrida,

dejando muy abajo la banda de 34 kDa, por lo que se aumentó la concentración de poliacrilamida en los geles.

Se continuó con geles preparados al 10% de poliacrilamida (Figura 5B). A pesar de que las proteínas corrían mejor, no se veían tan bien definidas las bandas de proteínas al desteñir los geles, por lo que se decidió preparar geles a una concentración más elevada.

Finalmente se prepararon geles a una concentración de 12% de poliacrilamida (Figura 5C). Las proteínas mostraron un mejor comportamiento durante la corrida, además de mostrar un patrón de bandas más definido en cada carril. Además, el peso molecular de 34 kDa se encontraba en la parte central de los geles, lo cual sería favorable durante la realización de los experimentos posteriores.

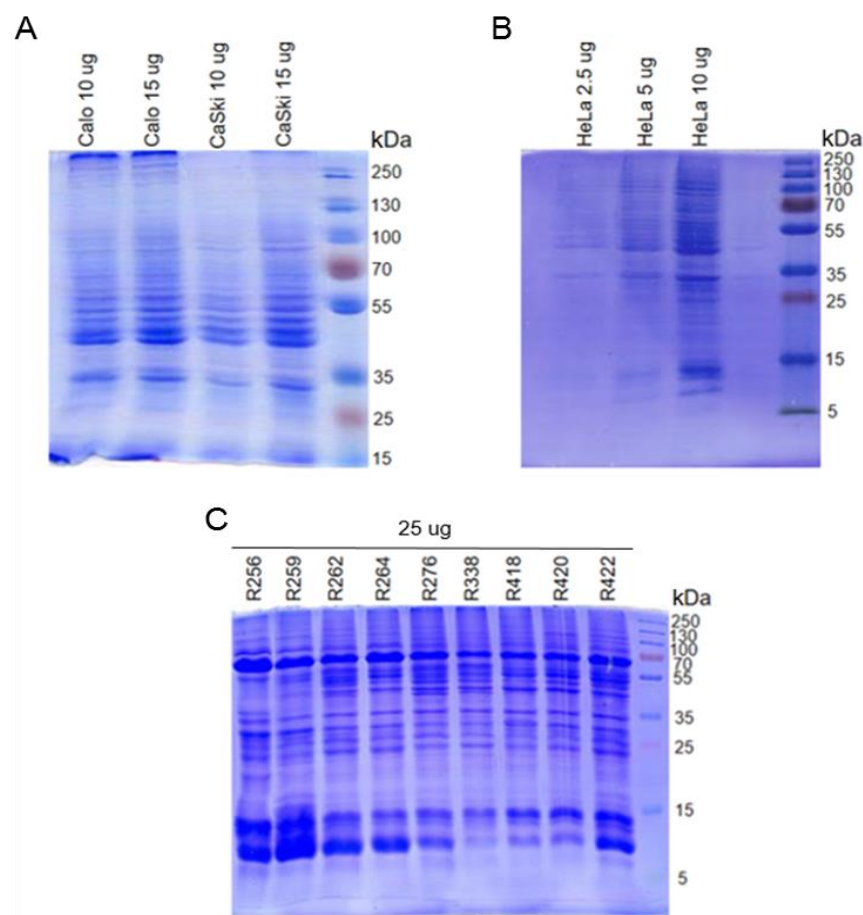


Figura 5. Estandarización en la concentración de geles de poliacrilamida. A) Gel de poliacrilamida al 8%. B) Gel de poliacrilamida al 10%. C) Gel de poliacrilamida al 12%.

Durante el proceso de estandarización de concentración de poliacrilamida de los geles, también se estandarizó la concentración de proteína (microgramos / μg). Se determinó que la concentración de proteínas idónea para realizar los

experimentos sería de 25 µg/µl, ya que a esta concentración de proteínas se logra una muy buena definición de las bandas (Figura 5).

7.3 Western blot en líneas celulares

Se realizaron Western blots de las proteínas CDKN3, CDK1 fosforilada (CDK1 P) y no fosforilada (CDK1), CDK2 fosforilada (CDK2 P) y no fosforilada (CDK2) tanto en líneas celulares control, como en líneas celulares transfectadas con siRNAs específicos contra CDKN3 (ver materiales y métodos). La proteína codificada por *CDKN3* está presente en las líneas celulares SiHa y CaSki, aunque la expresión es más evidente en las células SiHa (Figura 6).

En la línea celular SiHa se observa una disminución en la expresión de la proteína CDKN3 cuando se transfectan las células con siRNAs específicos respecto a las células control (SiHa ctrl; figura 6), lo cual coincide con lo observado en el qRT-PCR. En el caso de CaSki, dado que la expresión de proteína es menor, es menos evidente la disminución de la expresión de CDKN3 (Figura 6), pero desde la evaluación del mRNA mensajero se corroboró la inhibición.

Una vez corroborada la inhibición de la proteína codificada por *CDKN3* en las líneas celulares transfectadas con siRNA, se evaluó la expresión de las proteínas blanco fosforiladas y no fosforiladas (CDK1 y CDK2). Con respecto a la proteína CDK1, en la figura 6 se observa que la banda presente en ambas líneas celulares corresponde a la proteína no fosforilada (CDK1), y que la expresión de esta proteína disminuye drásticamente cuando se abate la expresión de *CDKN3*, en el caso de la proteína fosforilada (CDK1 P) se observa un ligero incremento en ambas líneas celulares transfectadas con siRNA-*CDKN3*, lo cual sugiere que la proteína codificada por *CDKN3* puede desfosforilar a CDK1 en las líneas celulares SiHa y CaSki derivadas de CaCu.

En el caso de la proteína CDK2, se observa un incremento en la expresión de la proteína no fosforilada (CDK2) cuando las líneas celulares fueron tratadas con siRNAs específicos contra *CDKN3*, siendo mayor el cambio, en las células CaSki. Con respecto a la proteína CDK2 fosforilada (CDK2 P), se observa una ligera disminución la expresión cuando se transfectan las células con los siRNAs específicos (Figura 6). Dado que la proteína codificada por *CDKN3* es una fosfatasa, se esperaría que desfosforile a sus blancos, por lo que se esperaría que la

expresión de CDK2P fuera mayor en las líneas celulares transfectadas y no que disminuyera, como se observa en la figura 6. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que en este caso la proteína CDKN3 no está actuando como fosfatasa de CDK2.

En todos los ensayos se realizó de manera simultánea el Western blot de la proteína Tubulina como control de carga y se demuestra que la expresión es la misma (misma cantidad de proteína) en todas las muestras, por lo que los cambios en la expresión en las otras proteínas analizadas son realmente debidos a los cambios biológicos (Figura 6).

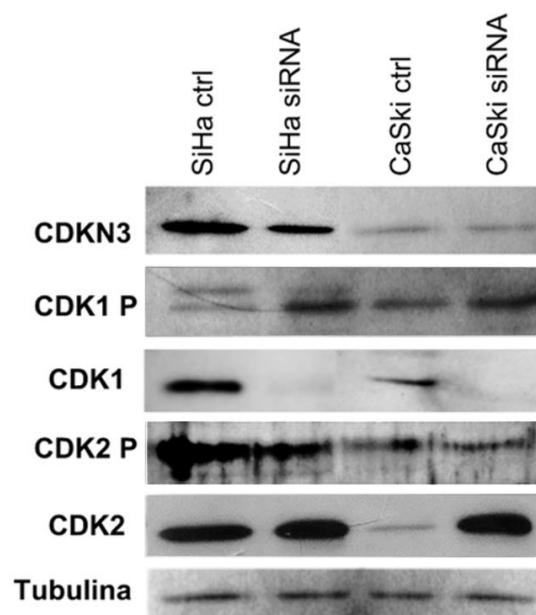


Figura 6. Expresión de CDKN3 y las proteínas blanco fosforiladas y no fosforiladas en las líneas celulares SiHa y CaSki transfectadas y control.

7.4 Biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino.

Se detectaron las proteínas CDKN3, CDK1 y CDK2 (fosforiladas y no fosforiladas) en 18 biopsias de CaCu mediante Western blot. Al explorar la calidad y concentración de las proteínas de las biopsias, se seleccionaron 9 para realizar los ensayos (Resultados no mostrados).

El peso esperado de las proteínas CDKN3, CDK1 y CDK2 fosforiladas y no fosforiladas corresponde a 34 kDa; la banda correspondiente de cada una de las proteínas es la que se encuentra señalada con la flecha azul en la figura 7. Como se puede observar, la proteína CDKN3 se encuentra expresada en todas las muestras de tumores analizadas en el presente estudio.

La proteína CDK1 fosforilada (CDK1 P) se identificó en tres de las 9 biopsias de CaCu analizadas, contrario a lo observado con la proteína CDK1 no fosforilada, que se encontró expresada todas las muestras exploradas. Estos resultados sugieren que en biopsias de CaCu la forma no fosforilada está preferentemente expresada; por tanto, se estará promoviendo el ciclo celular.

La proteína CDK2 fosforilada (CDK2 P) no se encuentra expresada en ninguna de las muestras exploradas y la proteína CDK2 no fosforilada (CDK2) se expresa en 7 de las muestras exploradas (Figura 7).

En todos los ensayos se observa una banda de aproximadamente 55 kDa, que es incluso más intensa que la correspondiente al peso molecular esperado (banda marcada con flecha roja; figura 7). Al analizar los Western blots, surgió la hipótesis de que tal banda podría corresponder a la proteína CDKN3 unido por enlaces covalentes a sus blancos CDK1 y CDK2, lo cual podría explicar que esté presente en todos los ensayos realizados y el incremento del peso molecular, para comprobar tal hipótesis, se mandó a identificar la banda.

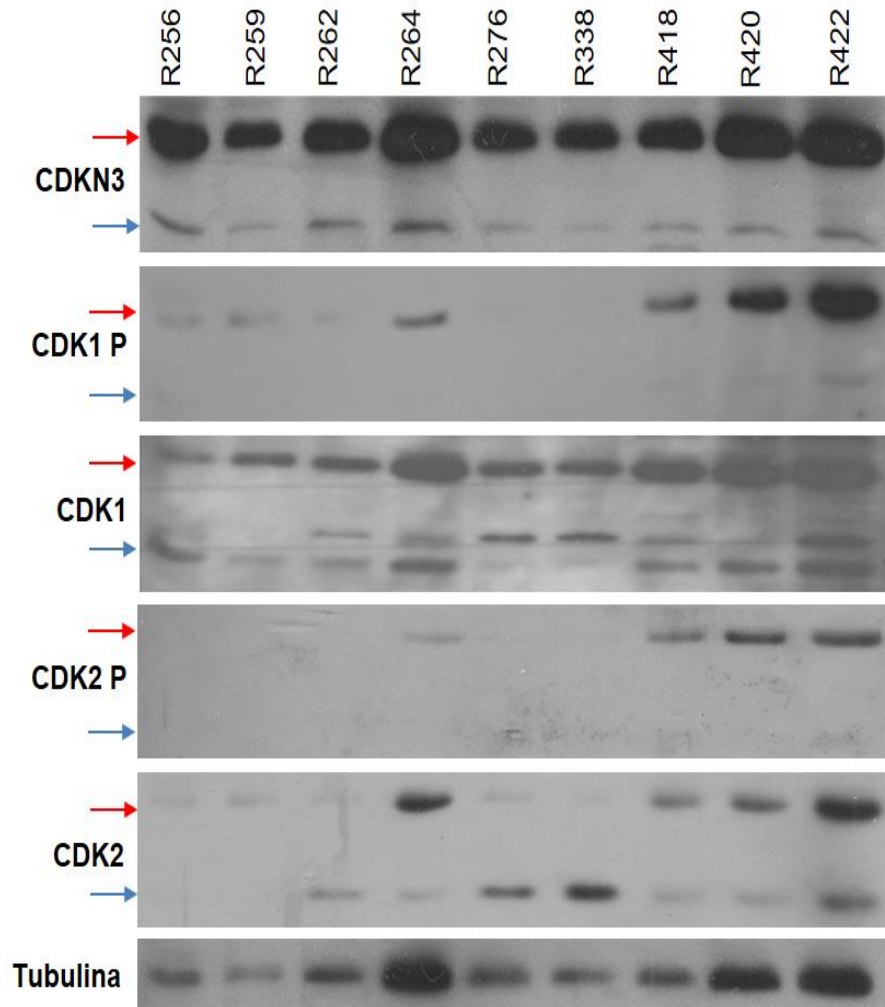


Figura 7. Expresión de CDKN3 y sus blancos en biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino. Con flecha azul se señala la banda correspondiente al peso molecular esperado de cada proteína (34 kDa). En todos los ensayos se observa una banda más grande de aproximadamente 55 kDa (flecha roja).

7.5 Identificación de la banda de 55 kDa

Para identificar cuál es la proteína correspondiente a la banda observada en los Western blots (banda marcada con flecha roja; figura 7), se seleccionó una muestra representativa con alta concentración de proteína (biopsia R422, figura 7) se corrió la muestra en un gel de poliacrilamida al 8% para separar de manera más eficiente las bandas y posteriormente poder aislar y cortar la banda del gel para mandarla a purificar (Figura 8A). Se realizó Western blot contra CDKN3 (Figura 8B) para comprobar que la banda que se manda a identificar, corresponde a la banda

que se observa en los Western blots anteriores (Figura 7); claramente se observa la banda de 55 kDa (que se manda a identificar) y la banda de CDKN3 de 34 kDa.

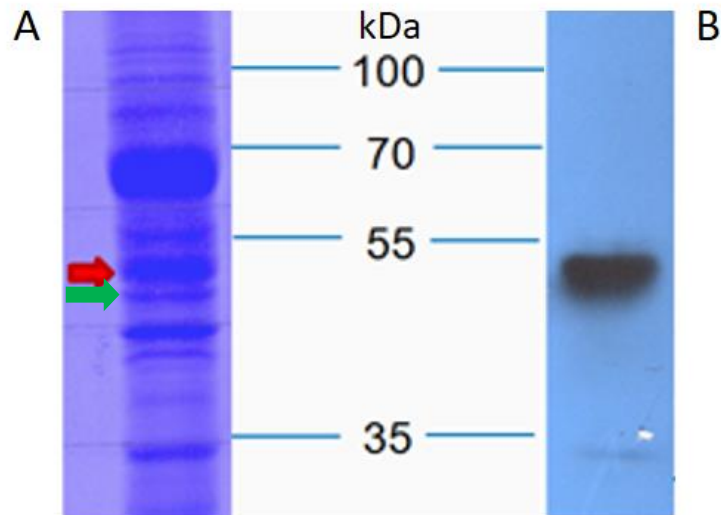


Figura 8. Determinación de la proteína observada en todos los ensayos realizados. A) Gel de poliacrilamida al 8%, señalando con una flecha roja la banda extra de 55 kDa observada en los Western blots previos; con una flecha verde se señala una banda más ligera y cercana a la observada en los ensayos. B) Western blot contra CDKN3 en una biopsia de cáncer cervicouterino.

Una vez que se corroboró que la banda en el gel de poliacrilamida al 8% es la banda de interés, se corrió nuevamente una muestra de proteína (biopsia R422) en gel de poliacrilamida al 8%. El gel fue teñido con azul de Coomassie y con un bisturí estéril se cortó la banda correspondiente a la proteína observada en los Western blots, estas bandas colocadas en tubo estéril de 1.5 mL y mantenidas a -20°C hasta su análisis. Dado que se observan dos bandas muy juntas en el gel de poliacrilamida (bandas marcadas con flechas roja y verde; figura 8A) se decidió cortar también esa banda señalada con la flecha verde (Figura 8A) para descartar que esa fuera la banda de interés. Ambas bandas de proteínas fueron enviadas para su identificación al Instituto de Biotecnología de la UNAM. En el Anexo 1 se presentan los resultados originales emitidos por el IBT, así como un resumen del procesamiento de las muestras.

En la Tabla 1 se presentan los resultados emitidos por el IBT tras el envío de las bandas de proteínas a identificar. Como se observa, el porcentaje de homología más elevado de la banda más ligera (banda marcada con flecha verde en la figura

8A) fue del 40%, empatando en este porcentaje con la Alfa enolasa. Mientras que en la banda más pesada (banda marcada con flecha roja en la figura 8A), la homología más elevada fue del 22%, emparejada con la región C de la cadena de Ig gamma. Los demás porcentajes de homología son más bajos y poco relacionados con CDKN3 o con CaCu.

Los resultados de la identificación sugieren que las bandas de 55 kDa observadas en los Western blots contra CDKN3, CDK1 y CDK2, sólo corresponden a una inespecificidad por parte de los anticuerpos empleados.

Los resultados de la identificación demuestran que lo observado en los Western blot sólo corresponden a una inespecificidad por parte de los anticuerpos empleados.

Tabla 1. Identificación de banda de 55kDa por espectrometría de masas.

Proteína identificada	Peso molecular ^a	Banda 1 Flecha roja ^b	Banda 2 Flecha verde ^c	Homología (%)
Alpha-enolase	47 kDa		*	40
LOC645339 protein	6 kDa		*	25
Ig gamma-1 chain C region	36 kDa	*		22
Keratin, type I cytoskeletal 17	48 kDa		*	19
Gag protein	15 kDa		*	15
Tubulin beta chain	50 kDa	*		11
Keratin, type II cytoskeletal 7	51 kDa	*		11
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	16 kDa		*	10
Isoform 2 of protein disulfide-isomerase A6	54 kDa		*	9.3
Ig gamma-2 chain C region	36 kDa	*		7.4
Isoform 2 of Glutaminyl-peptide cyclotransferase	35 kDa		*	7.1
Isoform 2 of Tubulin alpha-18 chain	37 kDa	*		4.5
Envelope glycoprotein gp160	53 kDa		*	2.4
Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 8	57 kDa	*		2.3
Isoform 2 of A-kinase anchor protein 9	453 kDa		*	0.31

a. Peso molecular de la proteína homóloga identificada.

b. Banda 1 corresponde a la banda más pesada (señalada previamente en los resultados con una flecha roja).

c. Banda 2 corresponde a la banda más ligera (señalada previamente en los resultados con una flecha verde).

8. DISCUSIÓN

La progresión del ciclo celular es monitoreada por checkpoints que determinan si el ciclo continúa a la siguiente fase o es arrestado, dependiendo de la presencia de DNA dañado, de replicación defectuosa o aberraciones mitóticas. Cuando suceden dichas aberraciones en el DNA, se desencadena la expresión de señales anti-proliferativas, como la inhibición de *cdk*⁴⁴. En condiciones normales, el ciclo celular se regula por tres importantes checkpoints: G1/S, G2/M y M. El checkpoint G1/S es conocido como punto de restricción ya que éste determina si la célula comienza a replicar el DNA y así dar paso a la división celular. Una vez completado éste punto, la célula termina todo el ciclo celular⁴⁵, por lo tanto, el punto de restricción es crucial para la proliferación celular, siendo esta transición G1/S la más frecuentemente mutada en cáncer⁴⁶.

La progresión del ciclo celular es controlada por la activación o inactivación de las proteínas involucradas, estos cambios en la actividad se generan por las modificaciones post-traduccionales. Una de las más importantes y bien caracterizadas es la fosforilación reversible, la cual modula la actividad de numerosas proteínas reguladoras del ciclo celular^{47, 48}, como las CDKs, que son proteínas serin/treonin cinasas que se activan a través de su unión con ciclinas específicas, formando complejos activos en las diferentes fases del ciclo celular, los cuales son desactivados por medio de su degradación proteolítica⁴⁹. Por lo tanto, la regulación del ciclo celular está determinada por el estado de fosforilación de las CDKs, por lo que una aberración en la regulación de éstas conlleva a la proliferación celular⁵⁰.

La desregulación de la señal proliferativa es un aspecto clave para el desarrollo del cáncer, y su progresión es favorecida por factores como la mutación de algunos genes, principalmente de aquellos que están involucrados en la regulación del ciclo celular⁵¹, como las ciclinas, las CDK y los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKN). Un inhibidor de CDK es el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 3 (CDKN3). El gen humano *CDKN3* se localiza en el cromosoma 14q22⁵² y codifica para la proteína KAP (o Cdi1) perteneciente al grupo de las CDC14, proteína tirosin fosfatasa con especificidad dual³⁵. *CDKN3* presenta una función doble dentro del ciclo celular, por un lado desfosforila e inactiva a

CDK2, inhibiendo así la progresión de la fase G1/S; y por otro lado, interactúa con CDK1, desfosforilando en Thr161 promoviendo la mitosis celular⁵³. CDKN3 se une a CDK1 y CDK2, desfosforilando en Thr, su sitio de activación. Esta desfosforilación reduce las actividades de unión de sustrato y ATP de las CDK. Por lo tanto, CDKN3 es un regulador negativo de CDK1 y CDK2^{54, 55,56}.

En los ensayos realizados se observa que la proteína CDK1 se encuentra desfosforilada tanto en las biopsias de pacientes con CaCu como en las dos líneas celulares analizadas cuando CDKN3 está presente. Ello sugiere que CDKN3 está desfosforilando principalmente a su proteína blanco CDK1, promoviendo la transición G2/M, ya que las células continúan dividiéndose. CDK1 es la principal cinasa requerida para llevar a cabo la mitosis, fosforilando un número significativo de sustratos citoplasmáticos y nucleares debido a la formación de un complejo con la ciclina A y la ciclina B⁵⁷. CDK1 tiene sitios de fosforilación que son tanto inhibitorios como estimulatorios. La fosforilación de CDK1 en Treonina 161 es necesaria para la activación cinasa de CDK1, la fosforilación en Tirosina 15 y Treonina 14 previenen la actividad cinasa. Al ser fosforilada CDK1, se forma el complejo cdk-ciclina y éste entra al núcleo para protegerlo de alguna actividad mitótica prematura. Cuando la célula está lista para dividirse, CDK1 es desfosforilado en Tirosina 15 y Treonina 14, activando la CDK1 cinasa promoviendo la división celular⁵⁰. Al inhibir CDKN3 se observa una disminución en la expresión de la proteína CDK1 no fosforilada y un incremento en la expresión de la proteína CDK1 fosforilada, lo que sugiere que en las líneas celulares SiHa y CaSki derivadas de CaCu, CDKN3 es la fosfatasa que interactúa con CDK1, por lo que su presencia promueve la desfosforilación y con ello la progresión del ciclo celular, promoviendo la salida de mitosis.

Las CDKs guían el ciclo celular, sus funciones oscilan siendo activadas y desactivadas a lo largo de éste. Una disminución en la actividad CDK1-Ciclina B es requerida para la salida mitótica. Así, la disminución de la actividad CDK puede ser tan importante como el incremento de la actividad CDK en la regulación coordinada del ciclo celular. Consistente con éste punto, el knockdown de *CDKN3* lleva a una falla mitótica. Sin embargo, una explicación alternativa de la sobreexpresión de *CDKN3* en cáncer humano es que éste es importante para el paso seguro del ciclo celular y sus niveles elevados son atribuidos a la alta actividad mitótica en células cancerígenas⁴⁰.

Yang y colaboradores en el 2015, realizaron un estudio de cáncer colorrectal, utilizando la línea celular SW480, línea en la que se encuentra mayormente sobreexpresado *CDKN3* con respecto a las demás líneas celulares investigadas. De igual manera que en el presente estudio, inhibieron *CDKN3* mediante siRNAs. Observaron que los genes asociados a la replicación del DNA, *POLD1* y *FEN1*, disminuyeron ante la transfección, al igual que los genes *CDKN1* y *PCNA*. Además, observaron que las células tratadas eran arrestadas en la fase G1/S del ciclo celular. Esto demuestra que *CDKN3* juega un rol estimulador/ promotor de la proliferación celular, asociado con la progresión del ciclo celular y la prevención de la apoptosis⁵⁸. A pesar de tratarse de diferente tipo de cáncer y de líneas celulares distintas, probablemente el comportamiento de *CDKN3* sea el mismo tanto en cáncer colorrectal como en cervicouterino, pues de acuerdo con Barrón 2015, la inhibición de *CDKN3* exhibe resultados similares en cuanto a la disminución de la proliferación en líneas celulares de cáncer cervicouterino⁴².

Para determinar si hay variaciones en la expresión de *CDKN3* durante el ciclo celular Fan, 2015 arrestaron células HeLa en la fase G0, S y M. Observaron que tanto la expresión de la proteína KAP como su RNA mensajero se encuentran más elevados en la fase M con respecto a las otras fases analizadas, lo cual indica que su alta expresión está correlacionada con genes involucrados en la mitosis^{40, 43}.

En cáncer de próstata, se ha observado que *CDKN3* juega un rol importante en la proliferación celular, y que al silenciarlo con el uso de siRNAs inhibe la invasión celular, induce el arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular y promueve apoptosis celular *in vitro*⁵⁹. Lo que demuestra que la expresión de *CDKN3* está positivamente correlacionada con el ciclo celular y la replicación del DNA. Tras realizar la inhibición de *CDKN3* en líneas celulares de cáncer de próstata mediante siRNAs, Yu y colaboradores en 2017 observaron que los niveles de CDK2 tanto de RNA mensajero como de proteína disminuyen, lo cual coincide con lo observado en las líneas celulares analizadas en el presente estudio, lo que indicaría que *CDKN3* se encuentra desfosforilando a ambos blancos.

En el caso de las biopsias, se observó la presencia de una segunda banda, que presenta un peso molecular mayor (55 kDa) al correspondiente de la proteína (34 kDa). La hipótesis sugerida fue que la banda observada correspondía a un dímero formado por *CDKN3* junto con sus blancos (CDK1 y CDK2), lo que explicaría el aumento en el peso molecular de la banda, y su detección con todos los

anticuerpos. Para comprobar la hipótesis, se realizó la identificación de la proteína correspondiente a esa banda utilizando espectrometría de masas (IBT). Sin embargo, la hipótesis quedó descartada tras observar los resultados de la identificación, pues la homología más elevada fue del 40%, y corresponde a la Alfa-enolasa, enzima involucrada en la glucólisis, que además es un marcador de diagnóstico para distintos tipos de cáncer. A pesar de que está parcialmente relacionada con el cáncer, no hay relación alguna con *CDKN3* ni con alguno de sus blancos, por lo tanto lo que se observó en los western blot realizados, no fue más que una inespecificidad por parte de los anticuerpos empleados.

Los resultados observados en el presente trabajo, coinciden parcialmente con lo obtenido por Fan y colaboradores en el 2015, quienes observaron la expresión de *CDKN3* en líneas celulares de pulmón haciendo uso de dos anticuerpos monoclonales distintos. El anti ratón (BD cat No. 610334) detecta a *CDKN3* en el peso molecular de 34 kDa, al emplear dicho anticuerpo obtuvieron una banda única con dicho peso molecular. Por otra parte, el anticuerpo 2H10 (Abcam) detecta a *CDKN3* en un peso molecular de 27 kDa, sin embargo, observaron la banda correspondiente a tal peso molecular más una banda inespecífica de 23 kDa⁴⁰. Al igual que lo observado en el presente estudio, la banda inespecífica es más intensa que la banda correspondiente al peso molecular conocido de la proteína. Cabe mencionar que Fan y colaboradores no indagaron más en la banda inespecífica observada en sus experimentos, sin embargo, ambos resultados señalan que los anticuerpos monoclonales de *CDKN3* no sólo detectan a la proteína esperada, sino que también localiza a una proteína diferente con un peso molecular cercano.

9. CONCLUSIONES

1. La proteína CDKN3 se expresa en las líneas celulares SiHa y CaSki.
2. La proteína CDKN3 está expresada en las biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino exploradas.
3. La proteína CDK1 no fosforilada se encuentra expresada en las biopsias de pacientes con CaCu y en las líneas celulares SiHa y CaSki.
4. CDKN3 podría ser la fosfatasa encargada de desfosforilar a CDK1 en las líneas celulares SiHa y CaSki.

10. PERSPECTIVAS

1. Realizar ensayos de citometría de flujo para comprobar que *CDKN3* participa en la fase M del ciclo celular y que está interactuando CDKN3 con CDK1.
2. Realizar transfecciones en líneas celulares derivadas de CaCu positivas a otro tipo viral al de las líneas celulares CaSki y SiHa.

11. REFERENCIAS

1. Cooper G. M. The cell: molecular approach. *Sinauer Associates Inc* 2000; 2da Edición. Capítulo 13 de Etiology of cancer: cancer genetics.
2. Merlo M., Pepper W., Reid J. y Maley C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* 2006; **6**: 924-935
3. Hanahan D. y Weinberg R. A. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144** (5):646-674.
4. Wertz I. E. y Dixit V. M. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell death and differentiation* 2010; **17**:14-24.
5. Sherr C. J. y McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2002; **2**:103-112.
6. Hanahan D. y Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**: 353-364.
7. Berx G. y van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**: a003129
8. DeBerardinis R. J., Lum J. J., Hatzivassiliou G. y Thompson C. B. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008; **7**: 11-20.
9. Hsu P. P. y Sabatini D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008; **134**: 703-707.
10. Smyth M. J., Dunn G. P. y Schreiber R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Immunol* 2006; **90**: 1-50.
11. Yang L., Pang Y. y Moses H. L. TGF-Beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; **31**: 220-227.
12. Organización Mundial de la Salud [OMS]. 2015. Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 3 de marzo de 2017 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
13. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. 2016. Estadísticas a propósito del... Día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Recuperado el 25 de mayo del 2017 en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf

14. Secretaría de salud. El cáncer de cuello uterino. Hoja de datos. 2016
Recuperado el 3 de marzo del 2017 en:
<http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/127042/HojadatosCancerdeCuelloUterino2016.pdf>
15. Hernández-Hernández D. M. y Apresa-García T. Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seg Soc.* 2015; **53** Supl 2:S154-61.
16. Jaudan A, Sharma S, Malek SNA, Dixit A. Induction of apoptosis by pinostrobin in human cervical cancer cells: Possible mechanism of action. *PLoS ONE* 2018; **13**(2): e0191523.
17. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Cervical Cancer Prevention (PDQ®): Health Professional Version. 2018 Feb 1. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65997/>.
18. Gariglio P., Gutiérrez J., Cortés E. y Vázquez J. The role of retinoid deficiency and estrogens as cofactors in cervical cancer. *Elsevier* 2009; **40**: 449-465.
19. Organista-Nava J., Gómez-Gómez Y. y Gariglio P. Embryonic stem cell-specific signature in cervical cancer. *Tumour Biol* 2013; **35**(35): 1727-1738.
20. Okunade K. S., Sunmonu O., Osanyin G. E. y Oluwole A. A. Knowledge and Acceptability of Human Papillomavirus Vaccination among Women Attending the Gynaecological Outpatient Clinics of a University Teaching Hospital in Lagos, Nigeria. *J Trop Med* 2017; **2017**: 8586459.
21. Machida H., Blake E. E., Eckhardt S. E., Takiuchi T., Grubbs B. H. *et al.* Trends in single women with malignancy of the uterine cervix in United States. *J Gynecol Oncol* 2017; **29**(2): e24.
22. Estrada P. G. A., Márquez F. M., González H. E., Nápoles P. M. M. y Ramón J. R. Infección por el virus del papiloma humano en cavidad bucal. *MEDISAN* 2015; **19** (3): 300-306.
23. Zaldívar L. L. G., Martín M. F., Sosa F. C. F., Ávila M, J., Lloret R. M., *et al.* Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2012; **77**(4): 315-321.
24. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; **348**:518-27.

25. Hebner C. y Laimins A. Human Papilloma Viruses: Basics mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virology* 2006; **16**:83-97.
26. Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basics studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:342-350.
27. Martinic M. y von Herrath MG. Novel strategies to eliminate persistent viral infections. *Trend Immunol* 2008; **29**:116-124.
28. Eun-Kyoung Y. y Jong-Sup P. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated Cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005; **37**(6): 319-324.
29. Woodman C. B. J., Collins S.I. y Young L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007; **1**:11-22.
30. MacLachlan T.K., Sang N. y Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1995; **5**(2):127-56.
31. King K.L. y Cidlowski J. A. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* 1995; **58**(2):175-80.
32. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia* 2000; **2**(4):291-299.
33. Vermeulen K., Van Bockstaele D. R y Berneman Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; **36**(3): 131-149.
34. Behl C. y Ziegler C. Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease. *Briefs in Molecular Medicine* 2014, DOI: 10.1007/978-3-642-45179-9_2.
35. Hannon G.J., Casso D. y Beach D. KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1731-1735.
36. Li T., Xue H. y Guo Y. CDKN3 is an independent prognostic factor and promotes ovarian carcinoma cell proliferation in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2014; **31**(4):1825–1831.
37. Gong D. y Ferrell J.E. The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Mol Biol Cell* 2010; **21**: 3149–61.
38. Berumen J., Barrón V. y Salazar T. CDKN3 como marcador de sobrevida y blanco terapéutico en cáncer de cérvix. *Mensaje bioquímico* 2016; **Vol XL**: 231-256.

39. Deng M., Wang J., Chen Y., Zhang L., Xie G. et al. Silencing cyclin-dependent kinase inhibitor 3 inhibits the migration of breast cancer cell lines. *Mol Med Rep* 2016; **14**(2): 1523-1530.
40. Fan C., Chen L., Huang Q., Shen T., Welsh E. A. et al. Overexpression of major CDKN3 transcripts is associated with poor survival in lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2015; **113**(12): 1735-1743.
41. Zhang L. P., Li W. J., Zhu Y. F., Huang S. Y., Shen L. y Gao Y. L. CDKN3 knockdown reduces cell proliferation, invasion and promotes apoptosis in human ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**(5): 4535-4544.
42. Barrón E.V., Roman-Besaure E., Sánchez-Sandoval A. L., Espinosa A. M., Guardado-Estrada M., et al. CDKN3 mRNA as a biomarker for survival and therapeutic target in cervical cancer. *PLoS ONE* 2015; **10**(9): e0137397.
43. Espinosa A. M., Alfaro A., Roman-Besaure E., Guardado-Estrada M., Palma Í., Serralde C. et al. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. *PLoS ONE* 2013; **8**(2): e55975.
44. Bueno M. J. y Malumbres M. MiRNAs and the cell cycle. *Elsevier* 2011; **1**(1812): 592-601.
45. Planas-Silva M.D. y Weinberg R.A. The restriction point and control of cell proliferation. *Current Opinion in Cell Biology* 1997; **9**(6):768–72.
46. Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell proliferation* 2000; **33**(5):261–74.
47. Dephoure N., Zhou C., Villén J., Beausoleil S.A., Bakalarski C.E, et al., A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natls Acad Sci* 2008; **105**(31):10762-10767.
48. Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* 2010; **3**(104):ra3.
49. Li X., Gong X., Chen J., Zhang J., Sun J y Guo M. miR-340 inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing CDK6, cyclin-D1 and cyclin-D2. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **460**:670-677.
50. Schafer K. A. The cell cycle: a review. *Vet Patol* 1998; **35**(6): 461-478.
51. Ho A. y Dowdy S.F. Regulation of G (1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**: 47-52.

52. Demetrick D. J., Matsumoto S., Hannon G. J., Okamoto K., Xiong Y. et al. Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet. Cell Genet* 1995; **69**: 190–192
53. Chen Q., Chen K., Guo G., Li F., Chen C. et al. A critical role of CDKN3 in Bcr-Abl-mediated tumorigenesis. *PLoS ONE* 2014; **9**(10):e111611.
54. Poon R.Y. y Hunter T. Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* 1995; **270**(5233):90-3.
55. Brown N.R., Noble M.E., Lawrie A.M., Morris M.C., Tunnah P., et al. Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem* 1999; **274**(13):8746-8756.
56. Song H., Hanlon N., Brown N.R., Noble M.E., Johnson L.N., Barford D. Phosphoprotein-protein interactions revealed by the crystal structure of kinase-associated phosphatase in complex with phosphoCDK2. *Mol Cell* 2001; **7**(3):615-626.
57. Malumbres M. y Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci* 2005; **30**: 630–641
58. Yang C. y Sun J. J. Mechanistic studies of cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) in colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; **16**(3): 965-970.
59. Yu C., Cao H., He X., Sun P., Feng Y., et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) plays a critical role in prostate cancer via regulating cell cycle and DNA replication signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.112>

12. Anexo 1

Resultados originales emitidos por el IBT.

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (15) Including 0 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	
						BioSample 1	BioSample 2
Probability Legend: over 95% 80% to 94% 50% to 79% 20% to 49% 0% to 19%							
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 ... sp P01857 IG...		36 kDa	★ 22%	
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 sp P06733 EN...		47 kDa		40%
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE... sp Q04695 K1...		48 kDa		19%
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2 sp P07437 TB...		50 kDa	11%	
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 ... sp P01859 IG...		36 kDa	★ 7.4%	
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Keratin, type II cytoskeletal 7 OS=Homo sapiens GN=KRT7 PE=... sp P08729 K2...		51 kDa	11%	
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Isoform 2 of Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens ... sp Q15084-2 ...		54 kDa		9.3%
8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens G...sp P05787-2 ...		57 kDa	2.3%	
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Isoform 2 of Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUB... sp P68363-2 ...		37 kDa	4.5%	
10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 (Frag... tr H0YHU8 H0...		16 kDa		10%
11	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Isoform 2 of A-kinase anchor protein 9 OS=Homo sapiens GN=... sp Q99996-2 ...		453 kDa		0.31%
12	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Envelope glycoprotein gp160 (Fragment) OS=Human immunod... tr D6PV58 D6...		53 kDa		2.4%
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Isoform 2 of Glutaminyl-peptide cyclotransferase OS=Homo sa... sp Q16769-2 ...		35 kDa		7.1%
14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ Gag protein (Fragment) OS=Human immunodeficiency virus 1 ... tr A9PYF8 A9...		15 kDa		15%
15	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	☆ LOC645339 protein OS=Homo sapiens GN=LOC645339 PE=2 SV... tr Q4G1D0 Q4...		6 kDa		25%

METODOLOGÍA

Optimización del espectrómetro de masas (calibración externa)

El ajuste de los parámetros para asegurar que el instrumento funcione dentro de las especificaciones, fue realizado con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 (Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution). Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se utiliza para extender la calibración de masas a menores valores de m/z (73.14 Da). Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con variación de exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

Procesamiento químico de las muestras

Las muestras fueron reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digeridas "in gel" con Trypsin (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En la digestión de la muestra se utilizó una solución que contiene bicarbonato de amonio 50mM (pH 8.2) con incubación de 18 horas a temperatura de 37°C.

Análisis espectrométrico

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba ACCELA (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-85% de solvente B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) con un tiempo de corrida de 180 minutos utilizando una columna capilar RP-C18 hecha en casa (0.75 μm de diámetro interno y 20cm de largo). El flujo del sistema fue de 300 nanolitros/minuto.

El escaneo total de iones (Full Scan) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $\text{RP}=\text{m}/\text{FWHM}$) de 60,000. Para la fragmentación de los péptidos se aplicaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation) con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $\text{RP}=\text{m}/\text{FWHM}$) de 15,000. Son utilizados estos dos tipos de fragmentaciones ya que en combinación proporcionan mayor información del péptido. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas (se fragmentaron iones con carga z^{2+} , z^{3+} y z^{4+}) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue

utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 90 segundos.

Búsqueda en PDB e identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato .raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos de proteínas *Homo sapiens* descargado de uniprot. Se utilizó un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo) además de la base de datos invertida (Decoy database) como herramienta del programa de validación "Percolator". La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando comparados los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron establecidas modificaciones constantes (carbamidometilación de cisteínas (C) y variables como oxidación de metioninas (M) y deaminación de asparagina (N) y glutamina (Q).

Resumen de los parámetros de búsqueda:

Motor de búsqueda: Sequest HT

Base de datos: *Homo sapiens*

Modificación constante: Carbamidomethyl (Cisteínas)

Modificaciones variables: Oxidation (M) y Deamidated (N y Q)

Enzima proteolítica: Tripsina

Número máximo de "Missed cleavages": 2

Precursor mass tolerance: 20 ppm

Fragment mass tolerance: 0.6 Da