

Expresión de CD43, piruvato cinasa II y hexocinasa II en carcinoma epidermoide cervicouterino

Expression of CD43, pyruvate kinase II and hexokinase II in cervical epidermoid carcinoma

Luz Eugenia Alcántara-Quintana*✉, Verónica Gallegos-García*, Yolanda Terán-Figueroa*

Alcántara-Quintana, L. E., Gallegos-García, V., & Terán-Figueroa, Y. (2019). Expresión de CD43, piruvato cinasa II y hexocinasa II en carcinoma epidermoide cervicouterino. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 27(77), 56-62.

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte en México. La infección por el virus del papiloma humano es una condición necesaria durante el proceso de carcinogénesis. Una de las características del CaCu es que presenta un metabolismo alterado, las células tienden a captar más eficientemente la glucosa y aumentar la glucólisis. La glucosilación aberrante es un sello distintivo de algunos tipos de cáncer, que refleja cambios, como la expresión alterada de glucosiltransferasas y glucosidasas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue describir el patrón de expresión de las proteínas CD43, piruvato cinasa II, y hexocinasa II en tejido cervical sano, tejido con cáncer cervicouterino y en líneas celulares de CaCu. Hasta el momento se encontró una mayor expresión de las proteínas al compararse con los tejidos sanos. Sin embargo, aun faltarían estudios para demostrar si pueden utilizarse como factor pronóstico para las pacientes con CaCu epidermoide.

Palabras clave: cáncer cervical; metabolismo; expresión de proteínas; CD43; piruvato cinasa II; hexocinasa II.

Keywords: cancer cervical; metabolism; protein expression; CD43; pyruvate kinase II; hexokinase II.

Recibido: 30 de marzo de 2018, aceptado: 8 de febrero de 2019

* Facultad de Enfermería y Nutrición, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Niño Artillero #130, Zona Universitaria, C. P. 78240, San Luis Potosí, México. Correo electrónico: luz.alcantara@uaslp.mx; vguaslp2@hotmail.com; yolandat@uaslp.mx. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2961-9838>; <http://orcid.org/0000-0002-6218-4760>; <http://orcid.org/0000-0002-6118-6393>

✉ Autor para correspondencia

ABSTRACT

Cervical Cancer (CC) is the second cause of death in Mexico. Infection with the Human Papilloma Virus is a necessary condition during the carcinogenesis process. One of the characteristics of CC is that it presents an altered metabolism; cells tend to more efficiently capture glucose and increase glycolysis. Aberrant glycosylation is a hallmark of cancer, which reflects changes, such as the altered expression of glycosyltransferases and glucosidases. Therefore, the objective of the present work was to describe the expression pattern of CD43, pyruvate kinase II, and hexokinase II in healthy cervical tissue, tissue with CC and in CC cell lines. At this point, we find a higher expression of proteins when compared with healthy tissues. However, there would still be a lack of studies to show if they could be used as a prognostic factor for patients with epidermoid CaCu.

INTRODUCCIÓN

Según GLOBOCAN (Bray et al., 2018), el cáncer cervicouterino (CaCu) se encuentra en segundo lugar de incidencia a nivel mundial con 528,000 casos nuevos en 2018; cerca de 85% de los mismos se dan en los países menos desarrollados. La tasa de mortalidad e incidencia de cáncer en América Latina y el Caribe es 0.59 veces mayor que en la Unión Europea (0.43) y que en Estados Unidos (0.35), según Vargas-Hernández (2018). La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es una condición necesaria durante el proceso de carcinogénesis (Bruni et al., 2018).

El VPH es miembro de la familia *Papillomaviridae*, de la cual actualmente se han caracteriza-

do más de 200 de tipo humano, donde el género *Alphapapillomavirus* se asocia a la infección de la mucosa del tracto genital y se divide en dos grupos: los de bajo riesgo, asociados con verrugas genitales benignas, y los de alto riesgo que presentan alto potencial oncogénico (Bernard et al., 2010; Butel, 2011; Santos López, Márquez Domínguez, Reyes Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

Durante el proceso de infección persistente, por parte de VPH de alto riesgo en el epitelio cervical se produce inestabilidad genómica, expresión continua de los oncogenes E6 y E7 que desregulan el control del ciclo celular y la apoptosis, lo que favorece la proliferación celular descontrolada, la inmortalización de células y finalmente la progresión tumoral (Serman, 2002).

Una de las características más importantes de muchos cánceres es que presentan metabolismo alterado, tienden a captar más eficientemente la glucosa, aumenta la glucólisis y esta última está desacoplada del ciclo de Krebs, así como de la fosforilación oxidativa en la mitocondria. La regulación del metabolismo energético es compleja, existen proteínas reguladoras como HIF (una proteína prometastásica), que disminuye el metabolismo oxidativo, mientras que p53 (gen supresor tumoral) promueve la fosforilación oxidativa. Estos datos indican que una de las posibles funciones primarias de los oncogenes activados y de los genes supresores de tumores inactivados es la reprogramación del metabolismo celular (Valle-Mendiola & Soto Cruz, 2014).

La glucosilación es una modificación postraducciona de las proteínas que desempeñan un papel fundamental en la señalización celular, el reconocimiento inmunitario y la interacción célula-célula debido a sus ramificaciones de glucanos que confieren variabilidad estructural y especificidad de unión a los ligandos de lectina. La expresión aberrante de las estructuras de glucanos, así como la aparición de estructuras truncadas, precursores o nuevas estructuras de glucanos, pueden afectar las interacciones ligando-receptor e interferir con la regulación de la adhesión celular, la migración y la proliferación. De hecho, la glucosilación aberrante representa un sello distintivo del cáncer, que refleja cambios específicos del cáncer en las rutas de biosíntesis de glucanos, como la expresión alterada de glucosiltransferasas (hexocinasa II) y glucosidasas.

La mayoría de los estudios se han llevado a cabo para identificar cambios en las estructuras de glucanos en suero (Tuccillo et al., 2014). En la mayoría de los tipos de cáncer la fucosilación y la sialilación se modifican significativamente. Por tanto, las aberraciones en las estructuras de glucanos se pueden usar como dianas para mejorar los biomarcadores de cáncer existentes. La capacidad de distinguir las diferencias en la glucosilación de las proteínas entre los pacientes de cáncer y control enfatiza la glicobiología como un campo prometedor para la identificación potencial de biomarcadores. En el caso de la O-GalNAC consiste en la adición de cadenas de sacáridos a ciertos residuos de serina o treonina de las proteínas. Es una modificación postraducciona bastante común y de gran importancia en la funcionalidad de algunas proteínas como las mucinas.

En el caso de CD43, es una molécula también llamada leucosialina, sialoforina, galactoglucoproteína, sialoglucoproteína leucocitaria, y también se le conoce como una proteína transmembranal I de tipo mucina. La proteína CD43 humana está codificada por un solo gen en el cromosoma 16 (mapa genético locus 16p11.2) y comprende el péptido señal de 19 aminoácidos en el término amino, seguido de una región extracelular altamente glucosilada de 235 aminoácidos, la región transmembranal de 23 aminoácidos, y la región carboxi terminal intracelular de 123 aminoácidos. El dominio extracelular tipo mucina tiene una estructura alargada en forma de varilla que sobresale 45 nm de la superficie celular y es rico en serina y treonina, lo que permite una extensa O-glucosilación.

Sólo una potencial N-glucosilación está ubicada en el sitio cerca del dominio transmembranal en la posición N239. La región intracelular contiene un número de sitios potenciales de fosforilación que pueden mediar la activación de las señales de transducción. Un número creciente de informes indican que hay una asociación entre CD43 y el cáncer. Una razón para la implicación de CD43 en el desarrollo del cáncer es que su señalización induce la activación de β -catenina, NF- κ B, NFAT, y AP-1, que son factores de transcripción pro-sobrevivencia que pueden promover la tumorigénesis cuando están desregulados (Fiume et al., 2013).

Existen estudios sobre la expresión de CD43 en tumor de origen no hematopoyético, tal es el caso de la línea celular de carcinoma de colon (COLO

205), que sustentan su papel en cáncer (Baekström, 1997). También para cáncer de colon se ha propuesto la alteración de los procesos reguladores intracelulares implicados en la actividad de la piruvato cinasa (PK II), que tiene que ver con el mantenimiento del estado de proliferación. Asimismo, se han encontrado bajos los niveles de proteína hexocinasa II (HK-II), glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI) y lactato deshidrogenasa (LDH) en cáncer de colon (Chen-Sung et al., 2018), por lo que estas tres moléculas tienen un papel importante en cáncer, que aún no está bien comprendido.

En este artículo se estudiaron la proteína CD43 (una mucina), la piruvato cinasa (PK II) y la proteína hexocinasa II (HK-II), estas últimas proteínas del metabolismo celular, para conocer si existe un posible patrón asociado o distintivo de expresión para cáncer cervicouterino, mismas moléculas de las cuales se ha encontrado su participación en otros tipos de cáncer, como el de colon.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 36 biopsias en parafina de pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide invasor en estadio clínico T1B1/FIGO1B1 sin tratamiento oncológico previo ni otra patología asociada y 25 muestras de tejido cervical sano (sin procesos inflamatorios e infecciosos de ningún tipo y sin inmunosupresión). Las muestras fueron obtenidas del Servicio de Patología del CMN La Raza, IMSS. Los bloques fueron cortados siguiendo los procedimientos de rutina a 5 µm de espesor.

Cultivos celulares

Se realizaron cultivos celulares de células HeLa (VPH 18), Caski (VPH 16), SiHa (VPH 16) y HaCaT (VPH negativo). Estas se mantuvieron en RPMI (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Gibco) a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂.

Inmunofluorescencia para tejidos sanos y con cáncer

A continuación, se describe brevemente la técnica. Los cortes de tejido fueron desparafinados y rehidratados, posteriormente las preparaciones se lavaron con TBS 1X, pH 7.4, y fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina a 2% (BSA) en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavaron con TBS 1X y se permeabilizaron con TBS-Tritón X-100 al 0.2%, posteriormente se lavaron con TBS 1X y se incubaron

con bloqueador de avidina-biotina por 10 min. Después de lo anterior, se lavaron con TBS 1X para posteriormente incubar con el anticuerpo primario a la dilución recomendada por el fabricante (anti-CD43, Santa Cruz-21774; anti-PK M2 Sigma-Aldrich; anti-HKII, Abcam 227198) a 4 °C en cámara húmeda toda la noche.

Al día siguiente se lavaron con TBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a FITC, Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594, dependiendo del anticuerpo, a la dilución recomendada por el fabricante por 1 a 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad, las preparaciones fueron lavadas con TBS 1X y en su caso fueron incubadas con Alexa Fluor 594 durante 60 min, terminado el tiempo de incubación se lavaron con TBS 1X. Finalmente, se realizó el montaje con DAPI-VectaShield. Las preparaciones se mantuvieron a 4 °C y en oscuridad hasta que fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Leica DM2000.

Las imágenes fueron analizadas en el software Leica Application Suite Advanced Fluorescence 3.1.0 e Image Pro Plus. Brevemente, se seleccionaron cinco secciones al azar de la laminilla, se cuantificó la intensidad de la sección por hscore, en este caso las intensidades se clasificaron como cero (sin tinción), +1 (tinción débil), +2 (tinción evidente) y +3 (tinción muy fuerte). El área de los píxeles fue de 1024 x 1024, finalmente se determinaron las unidades de fluorescencia por cada área cuantificable.

Inmunofluorescencia en líneas celulares

Las líneas celulares se recuperaron de las cajas de cultivo y se sembraron en laminillas de cultivo con medio suplementado y en condiciones de esterilidad. Después de 24 h de incubación se retiró el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS 1X pH 7.4 y se fijaron con paraformaldehído a 4% (PFA 4%) por 20 min a 4 °C en oscuridad; finalizado el tiempo de incubación el sobrenadante fue decantado y se lavó con TBS 1X, pH 7.4. Posteriormente las laminillas fueron procesadas como se describió en la técnica de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos mencionados.

RESULTADOS

Los tejidos con cáncer cervicouterino expresan niveles elevados de CD43, PK II, HKII en comparación con el tejido cervical sano

En el tejido sano se observaron definidos los estratos

basal, intermedio y superficial del epitelio mediante microscopía de luz, sin alteraciones en la maduración normal del epitelio (Hematoxilina Eosina). Al analizar las laminillas para determinar la presencia de CD43, se encontró presente en membrana y en citoplasma de las células del estrato basal; en los estratos intermedio y superficial se localizó preferentemente en la membrana citoplasmática. Se observó tinción positiva para PK II en citoplasma de las células del estrato basal. Las células del estrato medio y superficial mostraron positividad también en el citoplasma. HKII se observó con positividad en citoplasma de las células del estrato basal, del estrato medio y superficial.

Mediante microscopía de luz se observó en los tejidos con carcinoma epidermoide pérdida de la maduración normal de todos los estratos de la mucosa cervical con invasión al estroma (Hematoxilina Eosina). En las células tumorales se encontraron niveles elevados de CD43 con localización citoplasmática. En las células neoplásicas la expresión de PK II y de HKII fue preferentemente citoplasmática y con una mayor expresión (figuras 1 y 2).

Expresión y localización celular de CD43, PK, HKII en las líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino

En el análisis microscópico de todas las líneas celulares se observó la expresión de CD43, localizada

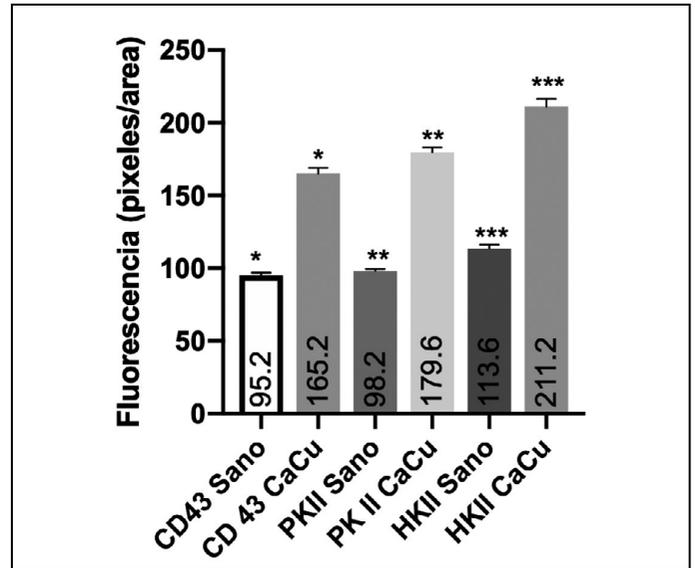


Figura 2. Aumento en la cantidad de proteínas CD43, PKII, HK II en cáncer epidermoide de cervix comparado con tejido cervical sano. Intensidad de fluorescencia después del marcaje. Software Image Pro Plus. *, **, *** $p \leq 0.01$, ANOVA de una vía, GraphPad, PRISM, V. 8. Elaboración propia.

preferentemente en citoplasma y en membrana plasmática de HeLa, Caski y SiHa, mientras que en las células HaCaT la localización fue en membrana y núcleo. Asimismo, se observó un incremento en la expresión de PK II y HK II en células de líneas celulares

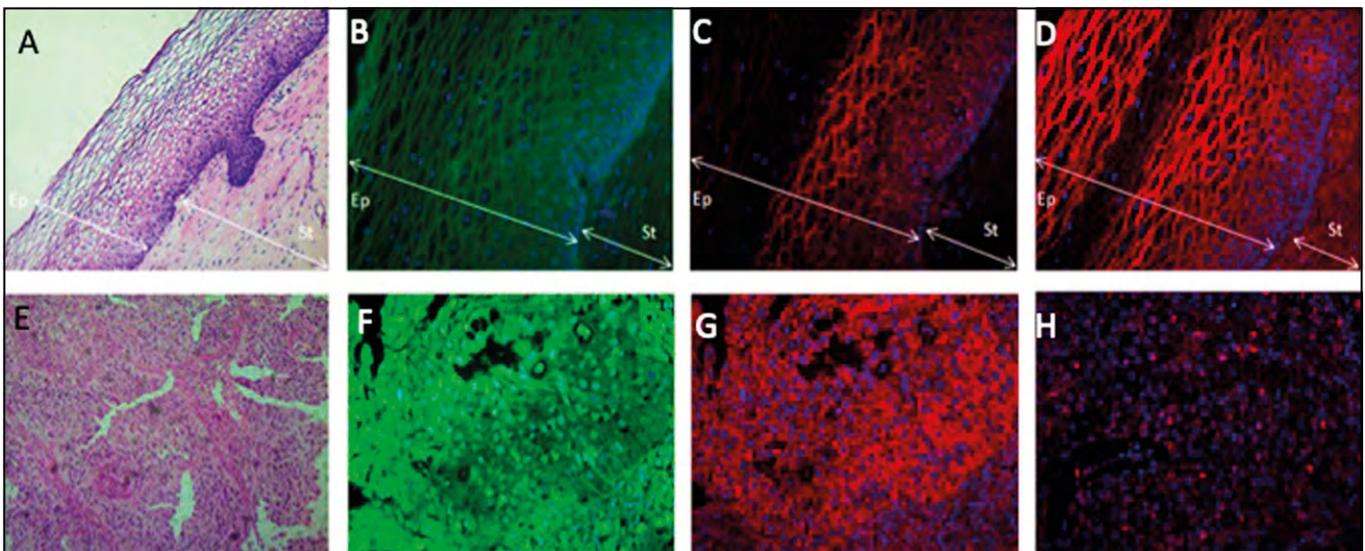


Figura 1. Sobreexpresión de CD43, PKII, HK II en cáncer epidermoide de cervix. A-D. Tejido cervical sano (10 X); A, Hematoxilina-Eosina; B, (CD43, verde); (C-D, PK II, HKII, rojo). E-H Tejido con CaCu (40X); E, Hematoxilina-Eosina; F (CD43, verde); (G-H, PK II, HKII, rojo), Núcleos (azul). Epitelio (Ep); Estroma (St). Elaboración propia.

de CaCu VPH positivas comparadas con las células VPH negativas (figura 3).

DISCUSIÓN

Existen estudios sobre la expresión de CD43 en carcinoma de colon que sustentan su papel en cáncer (Baeckström, 1997). También se ha propuesto la alteración de la piruvato cinasa II y de la hexocinasa II en cáncer. El Dr. Warburg (1956) propuso que las enzimas respiratorias están deterioradas o suprimidas en los tipos de cáncer humano y que la glucólisis se encuentra aumentada para compensar las "mitocondrias defectuosas o suprimidas", para producir una cantidad suficiente de ATP. Recientemente esto lo ha comprobado Senni et al. (2019) en carcinoma de estómago.

Está documentado que la actividad de la piruvato cinasa II y de la hexocinasa II está relacionada con el mantenimiento del estado de proliferación de las células (Chen-Sung et al., 2018). En el caso de CD43 se conoce que induce la activación de

β -catenina, NF- κ B, NFAT, y AP-1, que son factores de transcripción prosobrevivencia que pueden promover la tumorigénesis (Fiume et al., 2012).

Sin embargo, aunque está demostrado que la glucólisis y la glucosilación están alteradas en varios carcinomas, la presencia o ausencia de algunas moléculas no están estudiadas para cáncer cervicouterino. Su estudio hasta ahora se ha centrado en la identificación y descripción de la modificación de los residuos de glucosa. En el presente estudio se observó que las células tumorales en muestras con carcinoma epidermoide de cuello uterino presentan altos niveles de expresión de CD43, PKII, HKII, que difieren en cuanto a su ubicación celular e intensidad en relación con el tejido sano. Las diferencias encontradas sugieren una similitud con lo reportado por Zeng et al. (2016), quienes observaron niveles elevados de modificaciones postraduccionales (enzimas de glucosilación) en la neoplasia cervical, en relación con el cuello uterino sano, causado por la presencia del oncogen E6 del virus del papiloma humano.

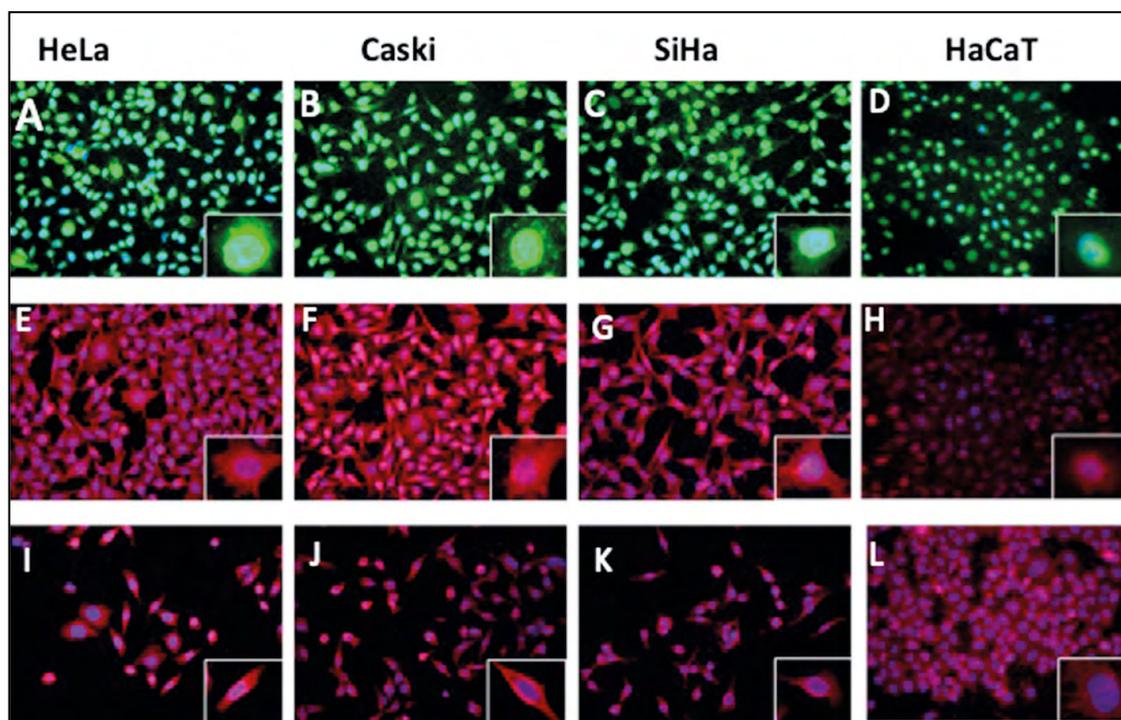


Figura 3. Expresión y localización de CD43, PKII, HKII en líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino y en células control. Imágenes observadas en microscopio de fluorescencia a 40x; A-D (anti CD43), E-H (anti PKII), I-L (anti-HKII). Elaboración propia.

Los autores del presente documento consideran el aumento en la expresión de las tres proteínas y diferente localización en comparación con el tejido sano. En el caso de las líneas celulares derivadas de CaCu está presente la positividad de CD43 con localización celular en citoplasma y membrana plasmática, pero en tejidos sanos solamente se expresa en membrana plasmática. La expresión de PK y HK II está incrementada en las células VPH positivas (HeLa, Caski, SiHa) comparadas con las células VPH negativas (HaCaT), lo que sugiere que en tejido cervical canceroso las enzimas de la glucólisis están incrementadas. Sin embargo, harían falta estudios de funcionalidad mitocondrial para verificar dicha sugerencia.

Por otro lado, los autores del presente documento consideran que también la glucosilación podría encontrarse desregulada por la presencia de CD43 intracitoplasmática. Es sabido que esta proteína, también llamada sialoforina, tiene un dominio extracelular ampliamente glucosilado y su función no se ha determinado, aunque parece ser una molécula antiadhesiva que mediaría la repulsión entre leucocitos y otras células, que en ciertas circunstancias puede funcionar como una molécula de adhesión.

En el caso de los tejidos patológicos la tinción es positiva en el citoplasma, esto se ha observado en leucemia mieloide aguda, en cáncer de colon,

entre otros tipos de cáncer no hematológicos. Sin embargo, para cáncer cervicouterino no existen muchos trabajos que cuantifiquen la expresión de la proteína CD43. Batdorf (2014) realizó una evaluación de la expresión de CD43 en 12 muestras de pacientes con CaCu, donde muestra una tinción nuclear muy débil y lo atribuye a una expresión negativa. Sin embargo, los autores del presente trabajo encontraron la expresión de CD43 en todas las muestras con cáncer y la tinción fue citoplásmica, lo que indica que faltan más estudios para conocer lo que ocurre con CD43, en el caso de cáncer cervicouterino.

CONCLUSIONES

Se localizó una mayor expresión de proteínas que intervienen en la glucólisis (PKII y HK II) y en la glucosilación (CD43) en tejidos con CaCu, mediante la técnica de inmunofluorescencia, al compararse con los tejidos sanos. También se encontró mayor expresión en las líneas celulares de CaCu. Sin embargo, se considera que faltan estudios para demostrar si estas proteínas pudieran utilizarse como biomarcador o factor pronóstico para este tipo de cáncer.

Agradecimientos

Los autores del presente desean agradecer al servicio de Patología del Centro Médico Nacional de la Raza, IMSS, en particular a la Dra. Ángeles Hernández Cueto.

REFERENCIAS

- Baeckström, D. (1997). Post-translational fate of a mucin-like leukocyte sialoglycoprotein (CD43) aberrantly expressed in a colon carcinoma cell line. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11503-11509.
- Batdorf, B., Kroft, S., Hosking, P., Harrington, A., Mackinnon, A., & Olteanu, H. (2014). Evaluation of CD43 expression in non-hematologic malignancies. *American Journal of Clinical Pathology*, 142(suppl-1), A244. doi: 10.1093/ajcp/142.suppl1.244
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., Van Doorslaer, K., Zur Hausen, H., & De Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J.,... de Sanjosé, S. (2018). *ICO/IARC Information Centre on HPV and cancer (HPV Information Centre). Human papillomavirus and related diseases in Jamaica*. Informe resumido. Barcelona: HPV Information Centre. Recuperado el 10 de diciembre de 2018, de www.hpvcentre.net
- Butel, J. S. (2011). Virus que causan cáncer en el ser humano. En G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse, & T. A. Mietzner (Eds.), *Medical Microbiology. Jawetz, Melnick & Adelberg* (26ª ed., pp. 213-219). Nueva York: McGraw-Hill.
- Chen-Sung, L., Li-Tzu, L., Liang-Hung, O., Siao-Cian, P., Chia-I, L., & Yau-Huei, W. (2018). Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells. *Oncology Reports*, 39(1), 316-330.
- Fiume, G., Rossi, A., de Laurentiis, A., Falcone, C., Pisano, A., Vecchio, E.,... Quinto, I. (2013). Eukaryotic initiation Factor 4H is under transcriptional control of p65/NF-κB. *PLoS One*, 8(6), e66087. doi: 10.1371/journal.pone.0066087
- Fiume, G., Vecchio, E., De Laurentis, A., Trimboli, F., Palmieri, C., Pisano, A.,... Quinto, I. (2012). Human immunodeficiency virus-1 Tat activates NF-κB via physical interaction with IκB-α and p65. *Nucleic Acids Research*, 40(8), 3548-3562.
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiza, 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(Supl. 2), S166-S171.
- Senni, N., Savall, M., Cabrerizo-Granados, D., Alves-Guerra, M. C., Sartor, C., Lagoutte, I.,... Bossard, P. (2019). β-catenin-activated hepatocellular carcinomas are addicted to fatty acids. *Gut*, 68(2), 322-334.
- Serman, F. (2002). Cáncer cervicouterino: Epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 67(4), 318-323.
- Tuccillo, F. M., de Laurentiis, A., Palmieri, C., Fiume, G., Bonelli, P., Borrelli, A.,... Scala, G. (2014). Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: Focus on CD43. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/742831
- Valle Mendiola, A., & Soto Cruz, I. (2014). Metabolismo energético y cáncer. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 108-113.
- Vargas Hernández, V. M. (2018). Situation of the gynecological cancer in Latin America and the Caribbean. *Online Journal of Gynecology, Obstetrics and Maternity Care*, 1(1), 180002.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Zeng, Q., Zhao, R. X., Chen, J., Li, Y., Li, X. C., Liu, X. L.,... Xu, Z. X. (2016). GlcNAcylation elevated by HPV E6 mediates viral oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33), 9333-9338.