

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO



Evaluación *in vitro* de la interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y el receptor CD36

TESIS:

para obtener el grado de Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Adriana Gutiérrez Estrada

Directora de tesis:

D. C. Nidia Gary Pazos Salazar

Asesor de tesis:

D. C. Joaquín Manzo Merino

NOVIEMBRE 2024

Agradecimientos

Del mismo modo que la física y la química se centran en las moléculas y los átomos, las ciencias biológicas tienen que penetrar en estas unidades para explicar los fenómenos del mundo vivo.
Hugo de Vries

A mi persona, le agradezco por creer en mis conocimientos, mis habilidades, por tomar la decisión de enfrentarse a un mundo diferente y lleno de preguntas. Te agradezco infinitamente por persistir todos los días fallidos, por levantarte todos esos días que no sabías si estabas haciendo las cosas de manera correcta, por seguir adelante a pesar de todas las dificultades, te agradezco por el poco o mucho conocimiento que sumamos a nuestra persona, gracias por cumplir con el objetivo que es tratar de explicar desde tu perspectiva un poco de lo maravilloso que es el ser humano y el mundo que lo rodea.

A mi mamá, le doy las gracias por su comprensión y paciencia, por su amor infinito, por encaminarme y enseñarme que siempre debo tener una meta, por demostrarme que nunca es tarde para superarse, por su sustento, gracias infinitas por acompañarme en toda mi vida académica.

A mi papá, le doy las gracias por todas sus pláticas y enseñanzas de vida, por su gran amor, por demostrarme que uno siempre se puede levantar después de infinitas caídas, por enseñarme que todo siempre tiene una solución, por mostrarme que la paciencia puede ser mi gran amiga, gracias también por acompañarme en toda mi vida académica.

A mis abuelos Martha y Ángel, gracias por su amor y cariño infinito, gracias por demostrarme que el trabajo no significa nada si no tienes un porque, que el amor a la familia es lo principal. Gracias por ser unos abuelos presentes desde el inicio.

A David, eres la persona que más me acompaño en este proceso y te agradezco por toda tu paciencia, por todos tus ánimos, pero sobre todo por acompañarme y entenderme en los días no tan buenos, por tus consejos, por brindarme tu conocimiento desde la primera vez que te pregunte por un resultado en clase, simplemente por tu compañía incondicional.

A mis asesores de tesis les agradezco la oportunidad de acercarme a un mundo diferente, gracias por encaminarme y guiarme, gracias infinitas por explicarme todo lo que no entendía, gracias por su paciencia y por ayudarme en el último escalón de mi formación por el momento, simplemente gracias.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	3
3.	INTRODUCCIÓN	5
4.	MARCO TEÓRICO	7
4.1	Virus del Papiloma Humano (VPH)	7
4.2	Estructura	7
4.3	Mecanismo de infección	8
4.4	Función de las proteínas virales	9
4.5	Cuadro clínico	10
4.6	VPH y su relación con cáncer	10
4.7	Proteínas oncogénicas	11
4.7.1	Proteína oncogénica E6	11
4.7.2	Proteína oncogénica E7	12
4.8	Cáncer	13
4.9	CD36	13
5.	MARCO DE REFERENCIA	16
6.	PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	19
7.	JUSTIFICACIÓN	19
8.	OBJETIVOS	19
8.1	Objetivo general	19
8.2	Objetivos específicos	19
9.	HIPÓTESIS	19
10.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	20
11.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	21
11.1	Identificación de las secuencias codificantes de E6 y E7 de VPH16	21
11.2	Producción de proteína fusión	22
11.3	Obtención de la proteína presa CD36.	23
11.4	Identificación de CD36	24
11.5	Pull-Down	24
11.6	Revelado de la interacción E6-CD36 por Western Blot	25
12.	RESULTADOS	26

12.1	Confirmación por PCR de las secuencias codificantes para las oncoproteínas E6 y E7 de VPH.....	26
12.2	Evidencia de la producción de proteínas de fusión GST-E6 y GST-E7.....	26
12.3	Cuantificación de proteínas totales	27
12.4	CD36 a partir de diferentes tipos celulares	28
12.5	Interacción in vitro a partir de diferentes tipos celulares	29
13.	DISCUSIÓN.....	32
14.	CONCLUSIONES	38
15.	BIBLIOGRAFÍA.....	39
16.	ANEXOS	45

Lista de figuras

Figura 1. Estructura genómica de VPH.	7
Figura 2. Mecanismo de infección por VPH.	8
Figura 3. Infección del epitelio por VPH.	11
Figura 4. Estructura primaria de la oncoproteína E6 del VPH.....	11
Figura 5. Estructura primaria de la oncoproteína E7 del VPH.	12
Figura 6. Funciones de CD36.	15
Figura 7. Esquema general de trabajo.....	21
Figura 8. Producción de proteína fusión (GST, GST-E6 y GST-E7).	22
Figura 9. Identificación de las secuencias codificantes de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16.	26
Figura 10. Purificación e identificación de las proteínas de fusión GST-E6, GST-E7 del VPH16, así como la proteína GST a partir del sistema de expresión con pGEX-6p-1- E. coli.	27
Figura 11. Curva estándar para la cuantificación de proteína total.....	27
Figura 12. Línea celular MCF-7.....	28
Figura 13. Hígado.....	28
Figura 14. Resultados obtenidos de la electrotransferencia.	29
Figura 15. Resultados obtenidos por Western Blot.....	30
Figura 16. Resultados obtenidos de la electrotransferencia.....	30
Figura 17. Resultado obtenido del revelado por Western Blot..	31

Lista de tablas

Tabla 1. Función de las proteínas de VPH	9
Tabla 2. Absorbancias y concentraciones para los puntos de la curva estándar	27
Tabla 3. Absorbancias obtenidas a partir de diferentes tipos celulares	28
Tabla 4. Comparación de secuencia de CD36.	35

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APS: Persulfato de amonio

ARN: Ácido ribonucleico.

CPT1: Carnitin palmitoil transferasa 1

E6AP: Ubiquitina-proteína ligasa.

ECM: Matriz extracelular.

ER: Receptor de estrógenos

FABPs: Proteínas que unen ácidos grasos.

FAO: Oxidación de ácidos grasos

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

LCR: La región control o no codificante del genoma de VPH.

ox-HDL: HDL oxidada.

ox-LDL: LDL oxidada.

p53: Proteína supresora de tumores.

pRb: Proteína del retinoblastoma.

Scr: Proteína tirosina-cinasa.

TME: Transición epitelio mesénquima.

TSP: Trombospondina.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

W-B: Western Blot

1. RESUMEN

Una infección crónica y persistente por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el principal requisito para el desarrollo de cáncer cervicouterino y otros tipos de cáncer, además que la condición más importante para adquirir el fenotipo maligno es la presencia de los tipos de VPH de alto riesgo, dentro de los que destacan el VPH16 y VPH18 por ser los principales responsables de causar distintos tipos de cáncer como vaginal, de pene, rectal, cuello uterino, orofaríngeo, de células escamosas, entre otros.

Asimismo, para el desarrollo del cáncer es necesario la acción de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo, debido a que tienden a tener una estructura que solo se presenta en estos tipos, lo cual hace que en conjunto puedan crear un ambiente favorable para la immortalización celular. En este sentido inducen a la célula a llevar a cabo procesos que ayudan a la replicación del virus, a la transformación, a la pérdida de polaridad, adhesión y estructura celular, lo que se reconoce como iniciación y progresión del cáncer.

Si bien es necesario la presencia de los oncogenes E6/E7, también existen otros elementos que ayudan a la progresión de un cáncer *in situ* a un cáncer invasivo, tal es el caso de la reprogramación metabólica. Existe evidencia de que la alteración del metabolismo lipídico facilita la progresión maligna del tumor, ya que los lípidos juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer, de tal manera que promueven vías de señalización que facilitan la proliferación y que impiden la apoptosis celular.

La importancia de la reprogramación metabólica lleva a considerar al receptor CD36, el cual se encarga de la absorción de lípidos en la membrana celular y participa en diferentes procesos asociados al cáncer mediante su interacción con distintos ligandos de naturaleza lipídica y proteica, de manera que la posible interacción con la proteína oncogénica E6 del VPH contribuiría a la reprogramación metabólica, transición epitelio mesénquima y metástasis del cáncer.

Para determinar la interacción entre el receptor CD36 y E6, Alcántara (2020) realizó un docking ciego para identificar los posibles sitios de unión entre la oncoproteína E6 del VPH16 y CD36, donde tres modelos presentaron una alta estabilidad y en el cual el segundo modelo representó la interacción de mayor fuerza entre la oncoproteína E6 con el motivo LxxLL de la

proteína CD36, con un valor de $\Delta G_{\text{bind}} = -60.5 \pm 2.4$ kcal/mol. Esto representó un punto importante para determinar la interacción de manera *in vitro*.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la posible interacción entre CD36 y E6 de VPH16 en condiciones *in vitro*. Para ello se aplicó el ensayo de pull-down, donde se empleó como proteína cebo a la proteína de fusión GST-E6 para capturar a CD36 como proteína presa, la interacción se reveló mediante Western blot con Ac anti-CD36, los resultados permitieron identificar una banda de aproximadamente 50 kDa correspondiente a CD36 en presencia de GST-E6 indicando que este complejo se forma *in vitro*.

2. ABSTRACT

A chronic and persistent infection by Human Papillomavirus (HPV) is a major cause for cervical cancer development. Moreover, the most important condition for acquiring the malignant phenotype is the presence of high-risk HPV types, among which HPV16 and HPV18 stand out as the main culprits for causing various types of cancer such as cervical, vaginal, penile, rectal, oropharyngeal, squamous cell, among others.

For cancer development, the presence of the E6 and E7 oncoproteins in high-risk HPV is necessary, as they tend to have a structure that is only present in these types, enabling them to collectively create a favorable environment for cellular immortalization. In this sense, they induce the cell to undergo processes that aid in virus replication, transformation, loss of polarity, adhesion, and cellular structure, which are recognized as cancer initiation and progression.

While the presence of the E6/E7 oncogenes is necessary, there are also other elements that aid in the progression from *in situ* to invasive cancer, such as metabolic reprogramming. There is evidence that alteration of lipid metabolism facilitates malignant progression of the tumor, as lipids play a crucial role in its development, promoting signaling pathways that facilitate proliferation and prevent cellular apoptosis.

The importance of metabolic reprogramming leads to consideration of the CD36 receptor, which is responsible for lipid absorption in the cell membrane and interacts with various lipidic and ligands, potentially contributing to metabolic reprogramming, epithelial-mesenchymal transition, and cancer metastasis through its possible interaction with the oncogenic E6 protein.

To determine the interaction between the CD36 receptor and E6, Alcántara (2020) performed a blind docking analysis to identify potential binding sites between the HPV16 E6 oncoprotein and CD36. Three models showed high stability, with the second model representing the strongest interaction between E6 and the LxxLL motif of the CD36 protein, with a ΔG_{bind} value of -60.5 ± 2.4 kcal/mol. This represented a key point for determining the *interaction in vitro*.

The present study aimed to evaluate the possible interaction between CD36 and HPV16 E6 under *in vitro* conditions. A pull-down assay was performed using the GST-E6 fusion protein as bait to capture CD36 as prey. The interaction was revealed through Western blot using an anti-CD36 antibody, where the results showed a band of approximately 50 kDa corresponding to CD36 in the presence of GST-E6, indicating that this complex forms *in vitro*.

3. INTRODUCCIÓN

El VPH es un ente biológico de interés por su capacidad de desarrollar cáncer, proceso que se estima tarda alrededor de 10 a 20 años. En México el cáncer cervicouterino es el segundo cáncer más común en mujeres, después del cáncer de mama, ya que se estima que la prevalencia de los VPH tipo 16 y 18 es de un 65% en la población (Secretaría de Salud, 2023).

El cáncer se considera una enfermedad de células anormales que proliferan e invaden al cuerpo, su progresión depende entre otras cosas de la reprogramación metabólica, sin embargo, el metabolismo de células cancerosas está sujeto a factores tanto intrínsecos como extrínsecos (Bartman *et al*, 2023). Un factor importante es el efecto Warburg el cual plantea la degradación de la glucosa a través de la fermentación, puesto que en las células neoplásicas existen alteraciones por consecuencia del estado proliferativo y la hipoxia a la que se está sometida (Alonso *et al*, 2016).

Dentro de los factores extrínsecos, el VPH juega un papel importante en la transformación celular y en la reconfiguración de vías metabólicas que favorecen la proliferación (Alcántara, 2020). Las proteínas E1, E2, E5, E6 y E7 son capaces de activar múltiples vías que impactan en el metabolismo celular, si bien estas múltiples interacciones pueden contribuir al efecto Warburg tras aumentar la captación de glucosa y por ende favorecer la vía glucolítica (Ganti *et al*, 2016).

Las células cancerosas además de adquirir una mayor demanda en glucosa y aminoácidos también experimentan una reprogramación metabólica de lípidos que les permite aumentar las reservas de energía, formar intermediarios de señalización y producir material de origen para la biogénesis de membranas celulares, esto no solo ayuda a la supervivencia sino también a la rápida proliferación celular e inclusive en la metástasis. El metabolismo lipídico dentro de un contexto como lo es el cáncer podría ofrecer nuevos biomarcadores pronósticos y objetivos terapéuticos para un tratamiento (Fu *et al*, 2020).

El metabolismo lipídico representa un papel crucial en la infección y replicación de los virus, ya que virus como el VIH y VHC, manipulan la biosíntesis de lípidos para la reestructuración de las membranas celulares que resultan en la formación de complejos para la replicación viral (Waris *et al*, 2012; Hollenbaugh *et al*, 2011). Esto favorece un entorno no solo

conveniente para su replicación si no también pueden influir en la inmunidad del huésped, puesto que estos pueden actuar como señales que modulan respuestas inmunitarias (Olzmann *et al*, 2019). Si bien CD36 es un receptor que capta lípidos y favorece la β -oxidación conllevó a considerar su interacción con la oncoproteínas E6 del VPH16, ya que existe evidencia de un motivo LxxLL presente en CD36 (Alcántara, 2020), lo cual se busca comprobar de manera *in vitro* y sumar con evidencia que también el VPH contribuye a los virus que manipulan el metabolismo lipídico. Entender estas interacciones entre los virus y el metabolismo de lípidos puede abrir nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias antivirales.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El Virus del Papiloma Humano es un virus que se transmite por vía sexual y está asociado al desarrollo de diversos tipos de cáncer; los VPH se clasifican en cinco géneros: alfa (α), beta (β), gamma (γ), mu (μ) y nu (ν), el grupo de interés es el α papiloma, el cual contiene miembros que infectan los epitelios de la mucosa y que se dividen en tipos de bajo riesgo (6 y 11) y alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66), según su capacidad para causar cáncer (Tomaic, 2016).

4.2 Estructura

La estructura del VPH se caracteriza por ser un virus no envuelto, con una cápside de estructura icosaédrica, la cápside se encuentra formada por 72 capsómeros constituidos por las proteínas estructurales L1-L2, su tamaño oscila entre 50-60 nm de diámetro y su genoma es de ADN de doble cadena, en la figura 1 se describe la conformación de este.

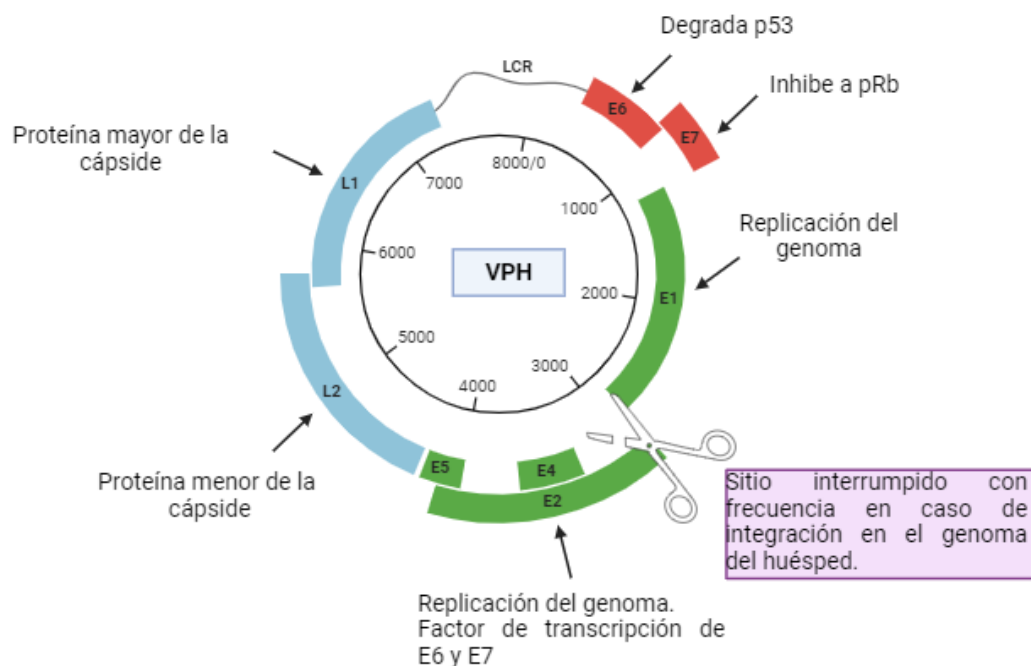


Figura 1. Estructura genómica de VPH. El genoma del VPH es de ADN bicatenario circular de aproximadamente 8000 pb, el cual contiene una región control (LCR), una región temprana (E) y una región tardía (L) que codifica para las proteínas encargadas de la replicación y ensamble de viriones. Adaptado de Lee et al, 2016. Creado en BioRender.

4.3 Mecanismo de infección

El Virus del Papiloma Humano comienza su infección tras la existencia de micro lesiones en el epitelio escamoso estratificado, esto posibilita la exposición de los queratinocitos de las capas basales (Zheng *et al*, 2006); permitiendo así la unión entre el receptor de las células, con la proteína de la cápside viral L1 (Rivera *et al*, 2006). El receptor celular se asocia normalmente con heparán sulfato, después de la unión, se produce su internalización por endocitosis, posteriormente las partículas virales se fusionan con endosomas tempranos hasta convertirse en endosomas tardíos donde experimentan degradación debido al pH, originando capsómeros, monómeros y la liberación del genoma viral, con la posibilidad de que sean transportados al núcleo a través de túbulos endosomales, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participan en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones (Rivera *et al*, 2006; Bugnon *et al*, 2019) en la figura 2 se muestra gráficamente el proceso.

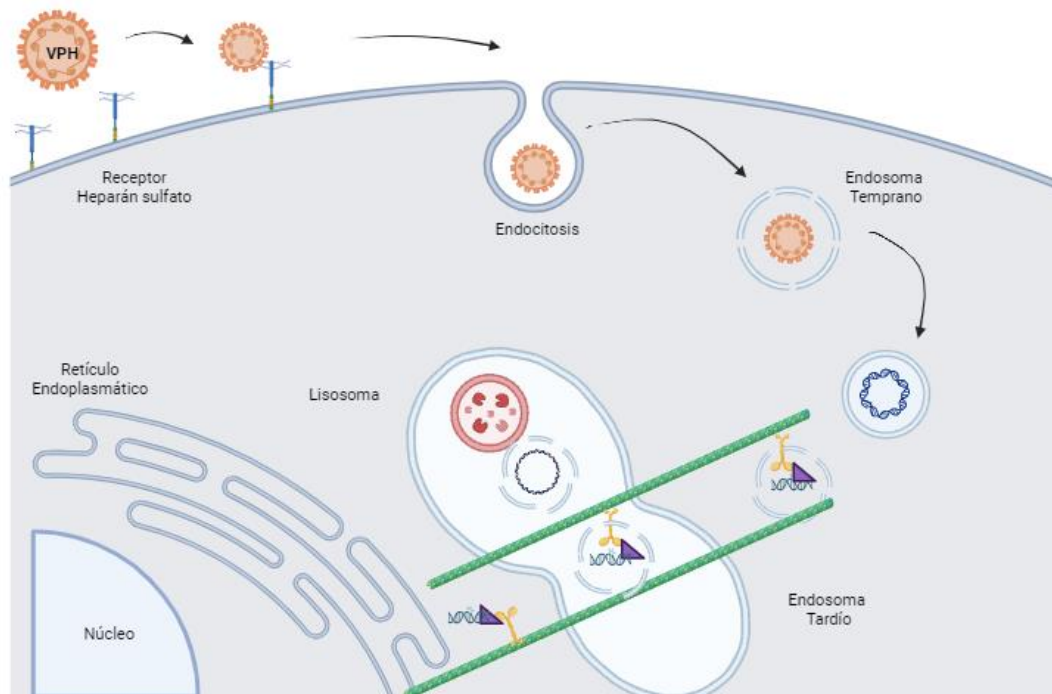


Figura 2. Mecanismo de infección por VPH. La infección por VPH comienza con la unión de la proteína L1 a heparán sulfato, el cual media su internalización por medio de endocitosis. El virus emplea la red de microtúbulos lo que les permite alcanzar el retículo endoplasmático. Posterior a la liberación del genoma, este es transportado al núcleo donde inicia la expresión de genes virales. Adaptado de Bugnon et al, 2019. Creado en BioRender.

Al obtener acceso a la capa basal, el ADN viral puede permanecer en forma circular libre fuera de los cromosomas del hospedero, a esto se le denomina forma episomal (De la Fuente-Villarreal *et al*, 2010) en la cual mantiene una replicación viral baja; aproximadamente de 30-50 copias por célula infectada (Rivera *et al*, 2006). Se postula que durante esta etapa se aseguraría que el ADN viral se distribuya difusamente por las células basales proliferantes y que al mantener un número reducido de copias se impediría la activación de la respuesta inmune, sin embargo, la expresión génica viral y la replicación proceden de una manera estrictamente regulada por la diferenciación de queratinocitos (Zheng *et al*, 2006).

Cuando las células basales están infectadas y sufren división, la célula hija pierde el contacto con la membrana basal y migra a los estratos parabasal y espinoso, la replicación viral se estimula (Sanabria, 2009), de manera que inicia la expresión génica viral durante las etapas de diferenciación de las células infectadas. La expresión de los genes tempranos dado por seis proteínas reguladoras virales no estructurales (E1, E2, E5, E6 y E7) sucede en queratinocitos indiferenciados o moderadamente diferenciados y las dos proteínas estructurales de la cápside viral (L1 y L2) de la región tardía del genoma, ocurre en queratinocitos sometidos a diferenciación terminal. En cuanto a la proteína E4, esta solo se expresa en los queratinocitos terminalmente diferenciados (Zheng *et al*, 2006), cuya función se limita a la liberación del virus.

4.4 Función de las proteínas virales

En la tabla 1, se describen las diversas funciones de las proteínas que conforman al Virus del Papiloma Humano.

Tabla 1. Función de las proteínas de VPH

Proteína	Función
E1	Proteína multimérica con actividad ATPasa y helicasa, capaz de reconocer sitios específicos en el ADN viral (ori), forma un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas y ADN polimerasa (Rivera <i>et al</i> , 2006)
E2	Proteína dimérica que forma complejo con proteína E1, regulan la replicación viral. Regula el promotor P97 (VPH16) o P105 (VPH18), encargados de la transcripción de las proteínas E6 y E7. Activa la síntesis de la proteína p53 (Rivera <i>et al</i> , 2006).
E4	Ayuda a la liberación del virus tras asociarse con el colapso del filamento de citoqueratina (Lee <i>et al</i> , 2016).
E5	Ligada a transformación celular y desregulación de receptores de factores de crecimiento (De la Fuente-Villarreal, 2010).

E6	Es una oncoproteína, degrada el supresor tumoral p53 (Lee <i>et al</i> , 2016)
E7	Es una oncoproteína, se une e inhibe al supresor tumoral pRb (Lee <i>et al</i> , 2016)
L1	Codifica la proteína estructural mayor que forma la cápside (Zheng <i>et al</i> , 2006).
L2	Codifica la proteína estructural menor que forma la cápside (Zheng <i>et al</i> , 2006).

4.5 Cuadro clínico

La presencia de VPH generalmente no causa síntomas, de manera que una infección por los genotipos de bajo riesgo (6 y 11) pueden causar anomalías citológicas típicas de infecciones transitorias, sin embargo, la infección persistente y no aclarada con VPH de alto riesgo (16 y 18) pueden causar neoplasias intraepiteliales con el transcurso del tiempo, sin la existencia de signos (American Cancer Society, n.d.).

4.6 VPH y su relación con cáncer

La adquisición de VPH se debe al contacto directo con piel o mucosas donde existen lesiones que permiten el acceso a la capa basal, como se mencionó anteriormente, las células basales comienzan su diferenciación, lo que indica una infección activa, sin embargo, en aquellas células basales que resguardan la forma episomal, se vuelven infecciones latentes, de manera que permanece indetectable, lo cual destaca la importancia de VPH16 y 18 en su inducción hacia el cáncer (Domínguez *et al*, 2018).

La forma episomal es de vital importancia, ya que facilita su integración al genoma de la célula huésped, lo cual se asocia con el aumento en los niveles de transcripción de los genes E6 y E7. En el proceso de integración, la linearización del genoma circular es una etapa necesaria que involucra el rompimiento de la doble cadena viral principalmente en la región E1/E2. La proteína E2 del VPH16 controla negativamente la transcripción de los genes virales E6 y E7. En presencia de la proteína E2 existe una represión continua de la transcripción de los oncogenes E6 y E7, por lo tanto, la ausencia del represor E2 permite el libre acceso de factores de transcripción que se agrupan en el promotor viral y regulan positivamente la transcripción de las oncoproteínas. La sobreexpresión de E6 y E7 a partir de secuencias integradas confieren a las células infectadas ventajas selectivas de crecimiento que se relaciona con la progresión de la enfermedad (López *et al*, 2006), como se observa en la figura 3.

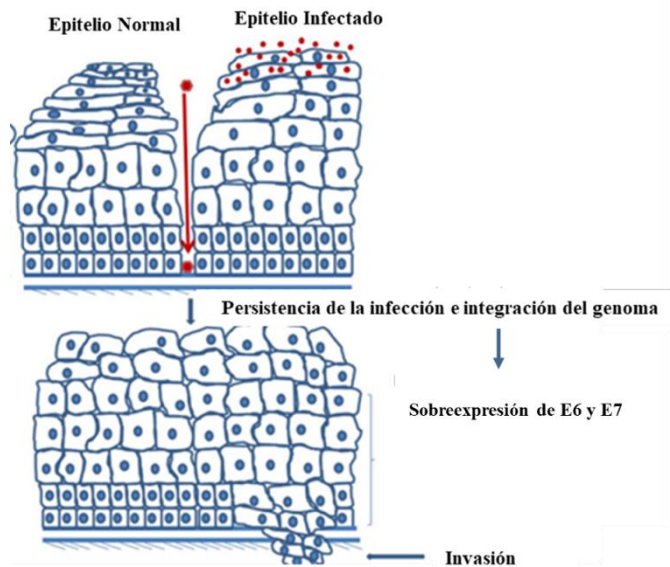


Figura 3. Infección del epitelio por VPH. El virus accede a la capa basal mediante microlesiones donde la actividad génica está sincronizada con el proceso de diferenciación epitelial, proceso que genera nuevas partículas virales gracias a la acción de sus proteínas (panel superior). Asimismo, se evidencia la importancia de E6 y E7 en la persistencia de la infección, lo cual contribuye a la invasión (panel inferior). Adaptado de Ganti *et al*, 2015.

4.7 Proteínas oncogénicas

4.7.1 Proteína oncogénica E6

La proteína E6 en su estructura primaria como se observa en la figura 4. se conforma por 151 aa., en condiciones fisiológicas se mantiene como monómero con cuatro motivos CXXC que enlazan Zn en dos dominios y tiene un peso molecular de 16 a 18 kDa, (Rivera *et al*, 2006).

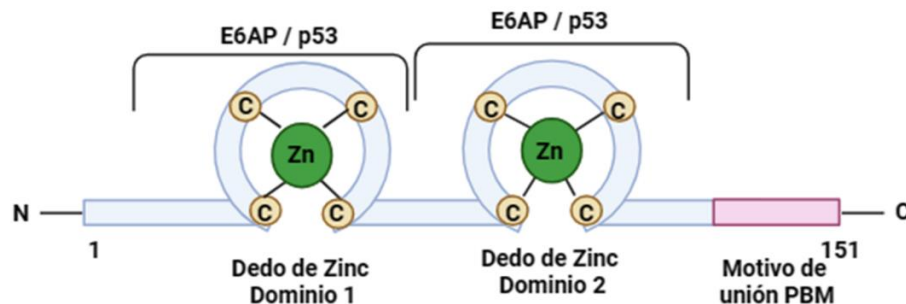


Figura 4. Estructura primaria de la oncoproteína E6 del VPH. La estructura primaria de la proteína E6 está compuesta por dos dominios de dedos de Zinc, donde se representa su interacción con E6AP, lo cual permite mediar su unión a p53. Además, se observa un C-terminal que contiene el motivo de unión a dominios PDZ (PBM), a proteínas como hDlg, hScrib, MAG-1, MUPP1 etc. Adaptado de Chitsike *et al*, 2021. Creado en BioRender.

La mayoría de las actividades de E6 están mediadas por interacciones proteína-proteína, donde participan diferentes dominios, por ejemplo, se destaca la interacción de la proteína E6 que se une al motivo de unión LxxLL el cual está presente en la proteína E6AP, conduce a un cambio conformacional de E6, esto permite su unión a la molécula p53. La proteína p53 que se considera una proteína supresora de tumores en condiciones basales, permite detener el ciclo

celular en fase G1, (Sanabria, 2009; Rivera *et al*, 2006; Yeo-Teh *et al*, 2018; Alcántara, 2020), esta interacción culmina en la degradación proteolítica de p53 y por lo tanto en la inhibición de su actividad transcripcional.

La oncoproteína E6 también contiene un motivo de unión a dominios PDZ (PBM) en su extremo carboxilo, el cual solo se presenta únicamente en los VPH de alto riesgo (Ganti, *et al*, 2015; Hoppe-Seyler *et al*, 2017). El motivo PBM media la unión de E6 con un gran número de proteínas celulares que contengan dominios PDZ, llevándolas a su degradación proteolítica. Entre las proteínas que contienen estos dominios se encuentran proteínas supresoras de tumores como Dlg, Scribble y MAGI-1, al existir su degradación se altera la polaridad celular (Hopper-Seyler *et al*, 2017; Massimi *et al*, 2004).

4.7.2 Proteína oncogénica E7

La proteína E7 en su estructura primaria como se observa en la figura 5 corresponde a una proteína de 94 a 100 aa. aproximadamente, tiene un peso molecular de 11 kDa, es ligante de Zinc y su principal unión es con la proteína del retinoblastoma (pRb).

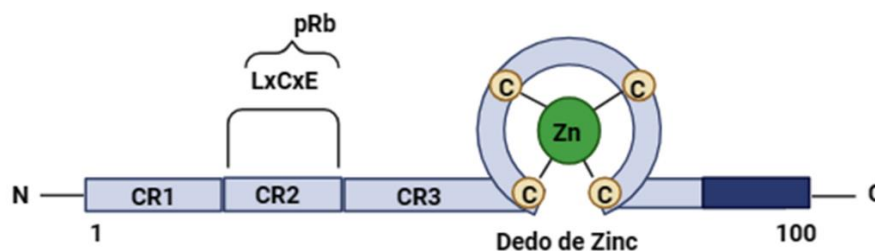


Figura 5. Estructura primaria de la oncoproteína E7 del VPH. La estructura primaria de la proteína E7, está compuesta por 100 a.a y tres regiones denominadas regiones conservadas, CR1, CR2 y CR3. Además, se ilustra un dedo de Zinc y el dominio LxCxE importante por su unión a pRb. Adaptado de Tomaic, 2016. Creado en BioRender

La proteína pRb, también proteína supresora de tumor interacciona con el factor de transcripción E2F en la fase G1 del ciclo celular, inhibiendo la expresión de genes relacionados a la replicación del ADN y proliferación celular. La unión de E7 con pRb impide que éste mantenga controlado a E2F, el cual queda libre e induce la replicación celular continua. Otras funciones descritas para la proteína E7 corresponden a la unión con la histona deacetilasa, lo que favorece la acción transformante celular (Rivera *et al*, 2006; Yeo-Teh *et al*, 2018).

Asimismo, la proteína E7 se puede dividir en tres dominios: región conservada 1 (CR1), región conservada 2 (CR2) la cual contiene el motivo LXCXE requerido para la unión de alta afinidad a pRb y otras proteínas de bolsillo, y por último la región conservada 3 (CR3). El potencial de E7 radica en su capacidad para promover cambios transcripcionales en una infección temprana, por lo que E7 es la principal oncoproteína transformadora (Tomaić, 2016).

4.8 **Cáncer**

El cáncer es una enfermedad en la que las células del cuerpo sufren una serie de cambios, que se resumen en eventos prometastásicos, como lo son la transición epitelio mesénquima, evasión de genes supresores, reprogramación del metabolismo, evasión de la respuesta inmune y promoción de interacciones con componentes del estroma. Estas células y sus descendientes proliferan a lo largo de los años, produciendo una población de células que pueden permanecer en el tejido en el que se originó (cáncer *in Situ*) o puede comenzar a invadir los tejidos cercanos (cáncer invasivo) (National Institute of Health [NIH], 2005; Hanahan *et al*, 2011).

4.9 **CD36**

El receptor CD36 es una glicoproteína de 88 kDa aproximadamente, que se sitúa en la membrana de plaquetas, eritrocitos inmaduros, adipocitos, miocitos, ciertas células epiteliales especializadas y células endoteliales microvasculares. Tiene una gran diversidad funcional considerando que puede llevar a cabo uniones con diferentes tipos de ligandos, relacionados con lípidos y con proteínas. CD36 promueve la absorción de moléculas lipídicas, incluidos ácidos grasos de cadena larga, lipoproteínas oxidadas (ox-LDL), fosfolípidos aniónicos y fosfolípidos oxidados. Su interacción se ha demostrado por inducir señalización aguas abajo tirosina cinasa (Scr) y por vías involucradas en la regulación metabólica, como inflamación y angiogénesis por mencionar algunas (Chen *et al*, 2022; Pepino *et al*, 2014).

CD36 tiene dos dominios intracelulares cortos en ambos extremos, dos segmentos transmembrana y un dominio extracelular grande con una secuencia hidrofóbica donde se unen los ligandos lipídicos (Pepino, *et al*, 2014).

De acuerdo con Wang y colaboradores (2019), como se observa en la figura 6. CD36 regula el metabolismo mediante la inducción de la β -oxidación a través de la vía quinasa hepática B1 (LKB1)-AMPK, LKB1 intracitoplasmática fosforila y activa AMPK lo que activa

a carnitina palmitoil transferasa I (CPTI), aumentando así el metabolismo y la absorción de ácidos grasos, lo que promueve la metástasis. Otro evento promotor de metástasis como anteriormente se mencionó es la transición epitelio-mesénquima, pues el papel de CD36 también conduce a esta transición mediante la vía de señalización Wnt y TGF- β promoviendo la producción de matriz (Wang *et al*, 2019).

El alto requerimiento de energía que necesita el cáncer conlleva a la desviación de procesos metabólicos, dado que las células tumorales necesitan de nutrientes y oxígeno para su rápida proliferación y desarrollo. La función de CD36 en procesos cancerosos tiene por objetivo la regulación del metabolismo y la regulación positiva de la oxidación de ácidos grasos, con el fin de promover un ambiente protumoral y un potencial metastásico en los diferentes cánceres (Chen *et al*, 2022).

La β -oxidación de lípidos es el mecanismo energéticamente más eficiente para obtener más moles de ATP por molécula metabolizada. Por tanto, las células metastásicas positivas a CD36 podrían aprovechar esta característica para obtener la gran cantidad de energía que es requerida para las células tumorales para anclarse y sobrevivir en lugares distantes al tumor primario. Los eventos pro-metastásicos comunes de la mayoría de los tumores sólidos podrían incluir la transición reversible de las células tumorales de un estado epitelial a un estado mesenquimal, así como sus interacciones con los componentes del estroma (Pascual *et al*, 2017).

El VPH a través de su oncoproteína E6, podría manipular las vías metabólicas para su beneficio propio, modulando así la actividad de CD36 para facilitar la captación de lípidos necesarios para la replicación viral y la transformación celular de tal manera que el VPH aproveche esta ventaja para exacerbar alteraciones metabólicas del cáncer y promover tanto infección como desarrollo tumoral (Pepino *et al*, 2014; Giovanelli *et al*, 2019).

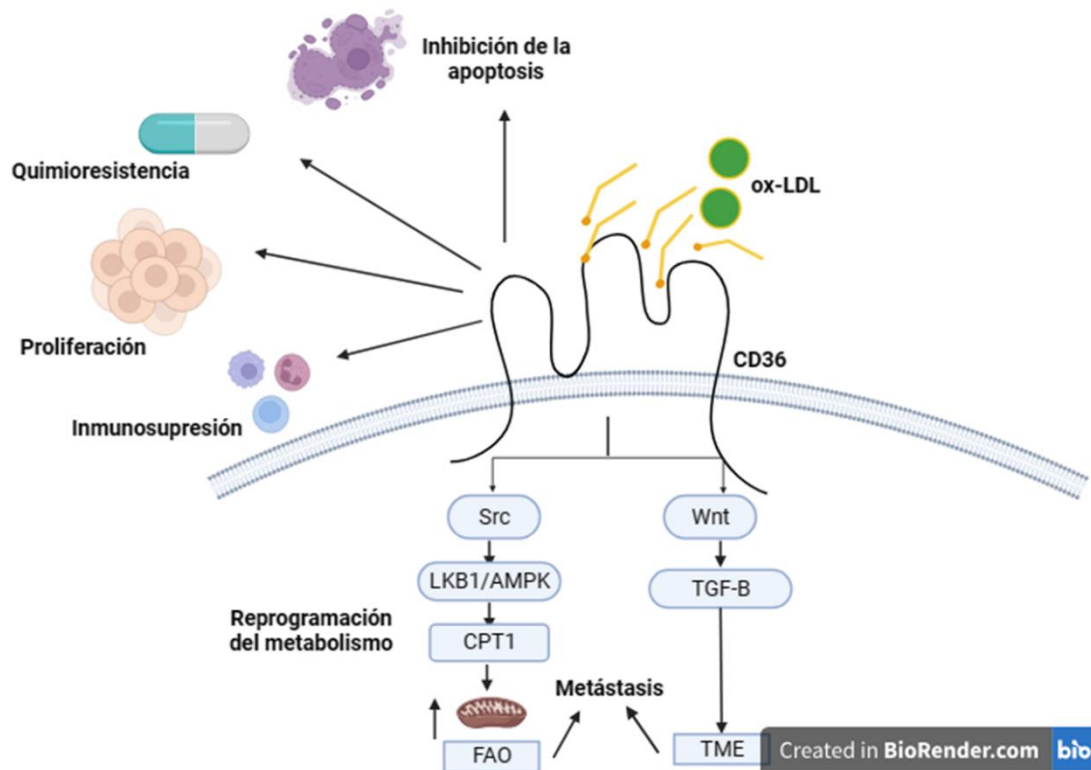


Figura 6. Funciones de CD36. Regula las quinasas de la familia Src, promoviendo la oxidación de ácidos grasos (FAO), factores que contribuyen a la formación de metástasis tumorales. Además, CD36 activa las vías de señalización Wnt/TGF- β , facilitando la metástasis mediante el proceso de transición epitelial mesenquimal (TME). Esta molécula también participa en la absorción de varios lípidos, como el ox-LDL, los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) y el colesterol, lo que promueve la quimiorresistencia, proliferación, inmunosupresión e inhibición de la apoptosis. Adaptado de Wang et al, 2019. Creado en BioRender.

5. MARCO DE REFERENCIA

Pascual y colaboradores (2017) estudiaron la importancia de la condición metabólica para el desarrollo de cáncer, puesto que los requerimientos de energía para sostener la división y proliferación pueden ser sostenidos por ácidos grasos. CD36 al ser un transportador de ácidos grasos, media su ingreso hacia el interior de la célula, pues es de vital importancia para regular el metabolismo. Pascual y colaboradores demostraron que CD36 no solo regula funciones biológicas (homeostasis lipídica) si no también patológicas (metástasis), contribuyendo a la tumorigénesis y al desarrollo de múltiples tipos de cáncer (Pascual *et al*, 2017).

Deng y colaboradores (2019) analizaron la expresión de CD36 en casos de cáncer cervical que mostraban una mayor expresión del receptor, lo cual se correlacionaba con mayores probabilidades de formar metástasis en ganglios linfáticos, además contribuyeron al estudio de su expresión y patología, inhibiendo la expresión del receptor en diversas líneas celulares de cáncer cervical, obteniendo por resultado la inhibición de la migración y proliferación, donde se infiere que CD36 está involucrado en la proliferación y en la inhibición de la apoptosis (Deng *et al*, 2019).

Wang y colaboradores (2019) demostraron que una dieta rica en grasa incrementaba el volumen y peso del tumor, y que la inhibición de CD36 previene este efecto, mismo que se basa en el metabolismo lipídico. En consecuencia, la sobreexpresión de CD36 en tumores facilita la β -oxidación no solo para suplementar de energía, sino también en la TME para mejorar la migración de las células tumorales (Wang *et al*, 2019)

Abumrad y colaboradores (1993) mencionan que CD36 presenta una expresión ubicua, así como en diversas especies, destacando su importancia en los procesos de regulación del metabolismo de lípidos. Adicionalmente, se ha reportado que alteraciones en el metabolismo lipídico están asociadas a CD36 ya que contribuye a procesos patológicos como el cáncer (Abumrad *et al*, 1993)

Liang y colaboradores (2018) reportaron que CD36 tiene un papel pro-tumorigénico, por ejemplo, en cáncer hepatocelular, la activación del receptor mejora la absorción de ácidos grasos libres, lo que mejora la TME. Dichos autores buscan contribuir al rol de CD36 en cáncer de mamá, particularmente en aquellos que son positivos a receptores de estrógenos α (ER- α).

Esto conlleva a estudiar líneas celulares de cáncer de mama, en cuyo caso la línea celular MCF-7 mostró mayores niveles de expresión del receptor, en comparación con la línea MDA-MB-231 (Liang *et al*, 2018).

Por otra parte, Gyamfi y colaboradores (2021) demostraron que la presencia de CD36 en tejidos de cáncer de mama influyendo en el comportamiento del cáncer, ya que resulta en una reprogramación metabólica, con un cambio hacia la oxidación de ácidos grasos. Así como también el aumento de la expresión de CD36 se produce con un aumento de la expresión de FABP4. La absorción de ácidos grasos por parte de los adipocitos de las células cancerosas activa vías de señalización que impulsan la progresión tumoral. La expresión de CD36 se examinó mediante qRT-PCR y western blot en líneas celulares de cáncer de mama con diferentes características moleculares. Para examinar la función molecular de CD36 en la interacción adipocito-célula, células de cáncer de mama, se establecieron líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-468, donde se asoció que el aumento de la expresión de CD36 y la expresión de factores de transcripción de TME aumentó en las células de co-cultivo (MCF-7 y MDA-MB-468) que expresaban CD36, por lo que dirigirse a CD36 puede tener un potencial terapéutico, que se llevará al microambiente tumoral (Gyamfi *et al*, 2021).

De acuerdo con Alcántara (tesis de Maestría 2022), la oncoproteína E6 de los VPH de alto riesgo debe sus acciones a la capacidad de interactuar con dominios PDZ o bien con motivos LxxLL en diversas proteínas celulares. El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de CD36 indica la presencia de un motivo parecido a LxxLL, el cual sería clave en la interacción con la oncoproteína E6 del VPH, sugiriendo que esta proteína oncogénica podría modular la función de CD36. Sin embargo, aún no se ha comprobado dicha capacidad de unión *in vitro* (Alcántara, 2020).

Según Harper y colaboradores (2011) el pull down es un método *in vitro* usado desde 1990 para detectar o confirmar interacciones entre múltiples proteínas. El método consiste en inmovilizar la proteína marcada (cebo) en un ligando de afinidad específico a la etiqueta, creando un soporte de afinidad para capturar y purificar otras proteínas que interactúan con el cebo. El pull-down de GST es una captura por afinidad a glutatión, donde en una solución se tienen más proteínas que se encuentran interactuando con las proteínas de fusión o recombinantes GST, donde la recolección de las proteínas fusión y proteínas asociadas, se

resuelvan en un SDS-PAGE y se sometan a una autoradiografía; esto con el fin de identificar interacciones novedosas o bien interacciones conocidas (Harper *et al*, 2011).

Este trabajo se centra en la interacción *in vitro* entre E6 de VPH16 y CD36, lo cual indicaría que el VPH regula el metabolismo al alterar a CD36. Su interacción podría reprogramar el metabolismo lipídico celular aumentando la captación y almacenamiento de ácidos grasos, proporcionando así de mayor energía y recursos que son necesarios para su replicación viral. Además, habría una mayor promoción de la oncogénesis, dado que CD36 lo han relacionado con favorecer la inflamación crónica y esteatosis que promueven un ambiente protumoral (Pascual, 2017). La interacción con E6 facilitaría la diseminación de células cancerosas, puesto que favorecería la persistencia y progresión de la infección, debido a la afección de la respuesta inmune por parte del huésped.

6. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) afecta a dos personas de cada cinco, sin embargo, existen casos persistentes que pueden evolucionar hacia cáncer debido a la expresión de proteínas virales oncogénicas E6/E7, quienes manipulan a las células huésped, contribuyendo a procesos cruciales para el cáncer. En este proceso de transformación las células cancerosas dependen de la síntesis de ácidos grasos para su progresión, lo que sugiere una posible relación entre proteínas oncogénicas con receptores celulares como CD36 dado que presenta un motivo LxxLL.

7. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas virales E6 y E7 en los VPH de alto riesgo desempeñan un papel crucial en el desarrollo del cáncer, siendo E6 una diana terapéutica potencial en las fases avanzadas de la enfermedad. Se conoce que E6 interacciona con diversos blancos celulares que presentan motivos LxxLL, lo que altera procesos en la célula, por ello se postula la participación del receptor CD36, ya que investigaciones *in silico* previas indican una potencial interacción. Este estudio busca confirmar esta interacción de manera *in vitro* para proponer a CD36 como un elemento relevante en la carcinogénesis inducida por VPH.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Determinar la interacción entre la oncoproteína E6 de VPH16 con el receptor metabólico CD36.

8.2 Objetivos específicos

1. Identificar las secuencias codificantes de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 en los plásmidos de expresión de proteínas GST a partir de colonias transformadas *Escherichia coli*.
2. Expresar, purificar e identificar las proteínas recombinantes GST-E6, GST-E7 del VPH16, así como la proteína GST a partir del sistema de expresión con pGEX.
3. Obtener el receptor CD36 a partir de diferentes tipos celulares.
4. Evaluar la interacción entre la oncoproteína E6 de VPH16 con el receptor CD36

9. HIPÓTESIS

La oncoproteína E6 del VPH16 interacciona *in vitro* con el receptor celular CD36.

10.DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

- a) **Tipo de estudio:** Cualitativo, descriptivo
- b) **Universo del estudio:** Solución de proteínas derivadas de un modelo celular
- c) **Tamaño de muestra:** N/A
- d) **Sede y lugar del estudio:** Laboratorio de Infectología Molecular, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos, Instituto Nacional de Cancerología
- e) **Criterios de selección:** N/A
- f) **Recursos humanos:** *p. QFB* Adriana Gutiérrez Estrada
- g) **Recursos financieros:** Provistos mediante proyectos Institucionales, proyecto VIEP 152
- h) **Diseño estadístico:** Estadística descriptiva

11.MATERIALES Y METODOLOGÍA

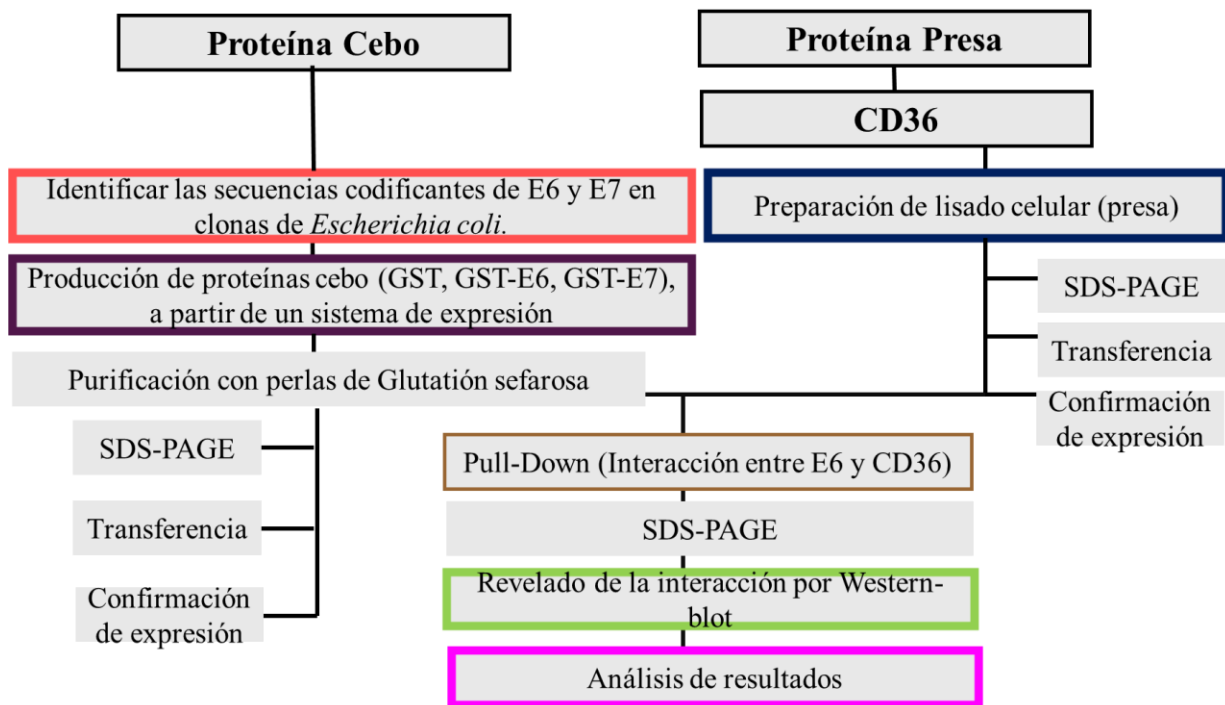


Figura 7. Esquema general de trabajo.

11.1 Identificaci6n de las secuencias codificantes de E6 y E7 de VPH16

Se demuestra el esquema de trabajo, figura 7 el cual comienza con las colonias de *Escherichia coli* transformadas por separado con el plásmido de expresi6n pGex-6P-1 codificantes de las proteínas E6, E7 y vaci6 se denominaron como GST-E6, GST-E7 y GST respectivamente, las cuales se hicieron crecer en caldo soya tripticasa complementado con ampicilina a 50 ug/mL (CST-Amp), 24 horas despu6s las colonias se analizaron mediante PCR, con el fin de comprobar la identidad de la secuencia codificante de las proteínas E6, E7 y negativo del VPH respectivamente.

11.2 Producción de proteína fusión

La producción de proteínas de fusión se utilizó para mejorar la expresión, purificación y funcionalidad de proteínas recombinantes. La metodología llevada a cabo ayudó a la unión de la proteína de presa (CD36) con la proteína cebo (GST-E6, GST-E7) denominada así por su etiqueta inserta, además permitió la producción eficiente de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* un sistema de uso común como se observa en la figura 8.

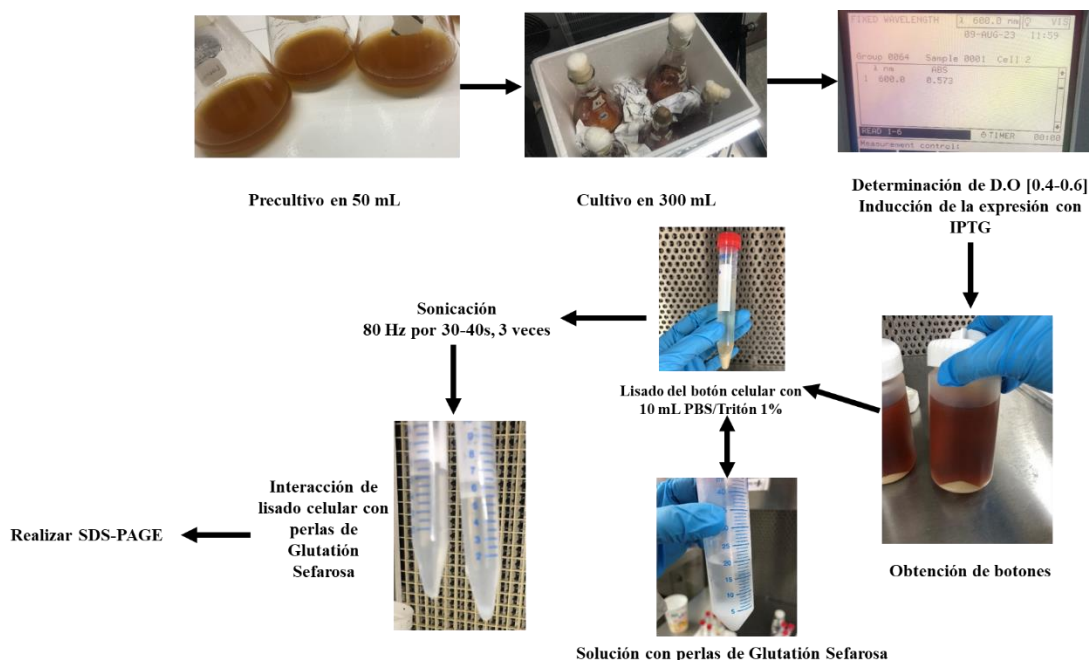


Figura 8. Producción de proteína fusión (GST, GST-E6 y GST-E7). Se esquematiza la expresión y purificación de las oncoproteínas E6 y E7 fusionadas con GST, expresadas en *Escherichia coli*, se representa su purificación mediante la conjugación con perlas de glutatión sefarosa. Las perlas son lavadas para eliminar proteínas no unidas.

La figura 8 permite visualizar la esquematización de la producción de proteínas de fusión; las cepas GST, GST-E6 y GST-E7 se inocularon por separado en 50 mL de CST-Amp como pre-cultivo a 37°C/18h/200 rpm, posteriormente 25 mL del volumen se resembraron en 300 mL de CST-Amp nuevo, y se incubó por 3 horas hasta alcanzar una D.O_{600nm} promedio de 0.4 a 0.6 y en ese momento se colocaron 300 µL de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido) (16758-10G) 1mM, para inducir la expresión de cada proteína recombinante, incubándose 3 horas más, al término, se obtuvieron los botones celulares y se lisaron con 10 mL de PBS/Tritón 1%, más 3 procesos de sonicación de 80Hz por 30-40

segundos; finalmente la solución se centrifugó y se descartó el producto insoluble obteniendo así el lisado celular que contenía las proteínas de fusión GST (proteína cebo).

En paralelo, se preparó una solución con perlas de glutatión sefarosa (G410-5 mL), de los cuales se tomaron 1 mL de la solución para poner a interaccionar con 1 mL del lisado celular de cada clona, que incluía las proteínas de fusión GST, esta interacción se promovió durante toda la noche a 4°C en agitación constante, al término se descartó el sobrenadante y las perlas se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS/Tritón 1% para finalmente pasar a congelación a -20°C para su conservación. Para la SDS-PAGE, se tomaron 50 µL de las perlas, se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS y se colocaron 20 µL de buffer de corrida, se realizó la electroforesis posteriormente una transferencia y finalmente cada proteína de fusión se visualizó con una tinción con rojo de Ponceau.

11.3 Obtención de la proteína presa CD36.

Se trabajó con dos fuentes de proteína; línea celular MCF-7 e hígado de rata.

Para la línea MCF7 (adenocarcinoma de mama) se empleó la monocapa de una botella T-25 con al menos 80% de confluencia, las células se desprendieron con tripsina y se recuperaron en medio DMEM con antibióticos y 10% de SFB, se centrifugaron por 10 min/4000 rpm, el botón se lavó con 1 mL de PBS, al botón se le agregó 300 µL buffer de lisis NP-40. Se aplicaron aspersiones y dispersiones sucesivas con jeringa hasta lisar completamente, finalmente el sobrenadante se recuperó por centrifugación a 4°C/13000 rpm por 5 min y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford, el lisado se conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

Para el caso de hígado, se empleó una rata macho Wistar de un mes alimentado con dieta LabDiet5001 el órgano se extrajo del animal con la técnica de fijación por perfusión intracardiaca, cuya extracción fue realizada por veterinarios del Bioterio Claude Bernard, se cortaron trozos con un peso promedio de 0.250 g, que se conservaron a -80°C hasta su uso; cada trozo se procesó con 300 µL de buffer de lisis (NP-40) y se maceró con un pistilo, se adicionaron 700 µL más del mismo buffer, el tejido se manejó con aspersiones y dispersiones sucesivas con jeringas de 10 y 5 mL, el lisado se centrifugó a 12500 rpm por 10 min y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método de Bradford, este lisado también se conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

La concentración de proteínas en ambas muestras se determinó utilizando una solución stock de albúmina de 1 mg/mL como estándar

11.4 Identificación de CD36

Después de la obtención del lisado, se realizó su identificación a través de un SDS-PAGE, donde se colocaron 5 uL, 10 uL, 15 uL y 20 uL del lisado, en las siguientes condiciones, gel concentrador a un voltaje de 50 v, 10 mA durante 30 min y el gel separador a 100 v, 20 mA durante 2 horas; para realizar la transferencia de proteínas, una membrana de nitrocelulosa de 0.2 uM, se activó con metanol durante 15 segundos, posteriormente se colocó en agua durante 2 min y finalmente se sumergió en buffer de transferencia por 5 min. Se procedió a realizar el sándwich en el cual se aseguró que el gel estuviera en el ánodo y la membrana del cátodo, se cerró el cassette y se colocó en la cámara, se usó un voltaje de 100 volts a 350 mA, durante una hora, terminado el tiempo la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para observar las bandas, se cortó para conservar los carriles de interés y se lavó hasta quedar completamente blanca, se bloqueó con BSA al 2.5% durante 1 hora, después la membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti-CD36 (NBP2-54790) en una dilución 1:250 por 2h/4°C, finalmente se procedió a incubar con el anticuerpo secundario correspondiente (goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005) acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), en una dilución 1:10000. La señal se reveló mediante auto-radiografía en cuarto oscuro.

11.5 Pull-Down

Para promover la interacción entre las proteínas E6 y E7 con CD36, se mezclaron 50 µL de las perlas GST-E6, GST-E7 y GST (proteínas cebo) para mezclarse con 100 µL de lisado MCF-7 (presa) con confluencia de un 80% y concentración de 0.73 ug/mL (donada por la Dra. Paola Maycotte, CIBIOR) y en el caso del lisado de hígado de rata (presa) se mezclaron con 200 uL cuya concentración fue de 4.88 µg/mL. Se incubaron en agitación constante durante toda la noche a 4 °C, posteriormente se removió el lisado celular, se realizaron 3 lavados con PBS/NP-40, con el fin de quitar aquellas interacciones inespecíficas. Se adicionaron 15 µL de buffer de corrida, finalmente las muestras se calentaron y se resolvieron en un SDS-PAGE.

11.6 Revelado de la interacción E6-CD36 por Western Blot

Una vez lavadas las diferentes muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), las condiciones de electroforesis, transferencia y Western-Blot fueron iguales a las previamente descritas para identificar CD36 en células MCF-7 e hígado.

12.RESULTADOS

12.1 Confirmación por PCR de las secuencias codificantes para las oncoproteínas E6 y E7 de VPH

Las colonias GST-E6, GST-E7 y GST evaluadas por PCR resultaron positivas para E6 y E7 con amplicones de 456 pb y 293 pb respectivamente, GST resultó negativa, lo cual confirmó las secuencias de las proteínas de interés presentes en dichas colonias, como control de la ausencia de contaminación se incluyó agua (Fig. 9 A y B). Después de identificar las secuencias, fue posible producir las proteínas de fusión.

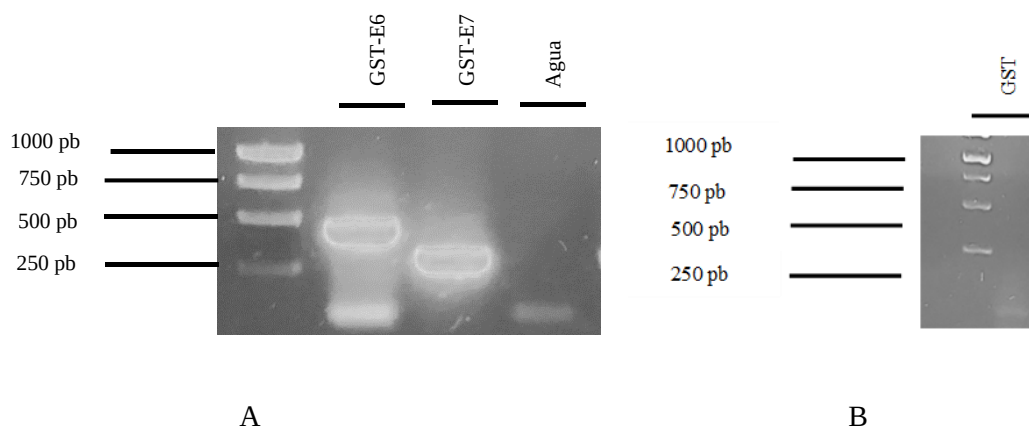


Figura 9. Identificación de las secuencias codificantes de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16. A. PCR de *Escherichia coli* transformadas con los plásmidos codificantes de proteínas virales. B. PCR de colonia con plásmido vacío

12.2 Evidencia de la producción de proteínas de fusión GST-E6 y GST-E7.

Las proteínas de fusión GST-E6, GST-E7 y GST se recuperaron a partir del sistema de expresión de pGEX-6p-1-*E. coli* en CST-Amp inducido con IPTG y se purificaron con perlas de glutatión sepharosa. En la figura 10 se muestra la membrana de nitrocelulosa, teñida con rojo de ponceau donde se pueden visualizar las proteínas de fusión purificadas de cada sistema, en el segundo carril se puede observar la presencia de una banda que pertenece a la proteína GST con un tamaño de 26 kDa, en el tercer carril no se produjo la proteína recombinante GST-E6; sin embargo, se repitió y se puede observar la presencia de GST-E6 en el carril 5, con un tamaño de 43 kDa y finalmente GST-E7 con un tamaño de 37 kDa en el carril cuatro. Las proteínas de fusión GST-E6 y GST-E7 del VPH16 pueden utilizarse para evaluar su interacción con el receptor CD36.

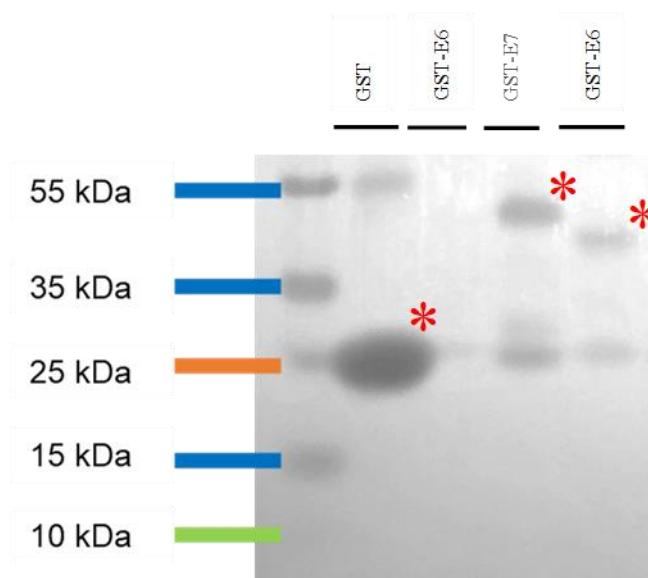


Figura 10. Purificación e identificación de las proteínas de fusión GST-E6, GST-E7 del VPH16, así como la proteína GST a partir del sistema de expresión con pGEX-6p-1- *E. coli*.

12.3 Cuantificación de proteínas totales

Los lisados obtenidos de células MCF-7 y de hígado, se compararon con el estándar de albúmina de 1 mg/ mL que se observa en la figura 11 y tabla 2; se aplicó la ecuación de la recta para obtener la concentración correspondiente a los lisados.

Tabla 2. Absorbancias y concentraciones para los puntos de la curva estándar

[μg/mL]	Absorbancia
1	0.029
2.5	0.08
5	0.196
10	0.272
20	0.386
40	0.536
60	0.691
80	0.812
100	0.956

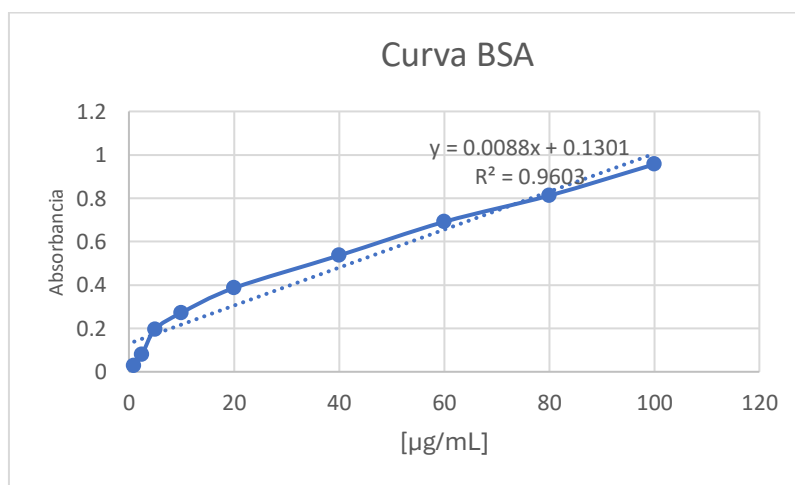


Figura 11. Curva estándar para la cuantificación de proteína total

Se demuestra que existe una correlación positiva, esto quiere decir que a medida que las concentraciones aumentan, las absorbancias también, es decir las variables se relacionan entre sí. Las concentraciones obtenidas se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Absorbancias obtenidas a partir de diferentes tipos celulares

Muestras	Absorbancia	[$\mu\text{g/mL}$]
MCF-7	0.013	0.73
Hígado	0.188	4.88

12.4 CD36 a partir de diferentes tipos celulares

12.4.1. Línea celular MCF-7

Para la línea MCF7 (adenocarcinoma de mama) se empleó la monocapa de una botella T-25 con al menos 80% de confluencia, como se observa en la figura 12.

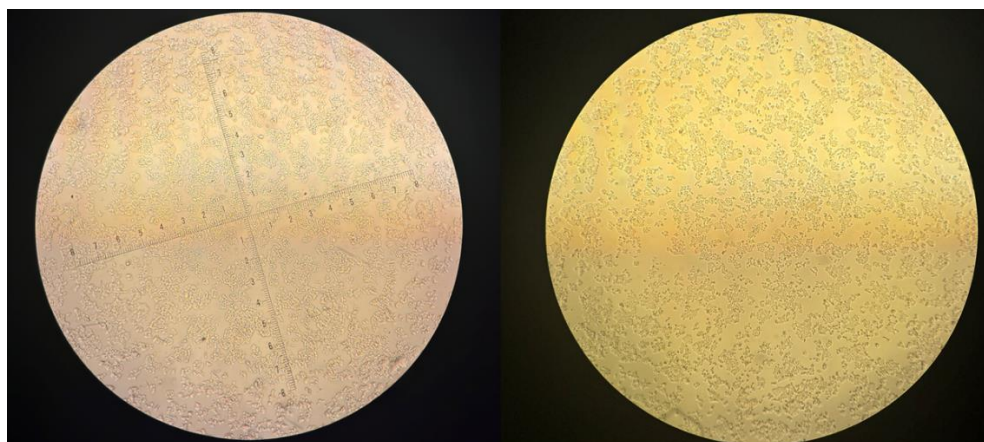


Figura 12. Línea celular MCF-7. Se observa una confluencia del 80%, con morfología óptima y ausencia de debritis celulares. Las células MCF-7 tienen una morfología poligonal de células aplanadas con dimensiones irregulares, donde estas tienden a formar grandes agregados, mostrando una apariencia característica de adoquín.

12.4.2. Hígado

Para la obtención de otra fuente de CD36 se procedió a escoger hígado, macho Wistar, de un mes y alimentado con dieta LabDiet5001.

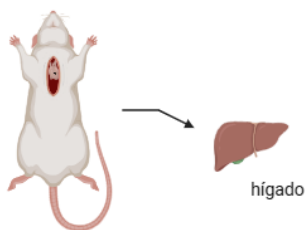


Figura 13. Hígado. Tejido característico por tener una estructura blanca. Debido a su alta actividad metabólica existe abundancia de lípidos y ácidos grasos que facilita su lisis. Creado en BioRender.

12.5 Interacción *in vitro* a partir de diferentes tipos celulares

En primer lugar, las muestras provenientes de la homogenización de células MCF-7 se sometieron a proceso de interacción *in vitro* (pull-down). Una vez terminada dicha interacción, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron por electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau, como se muestra en la figura 14.

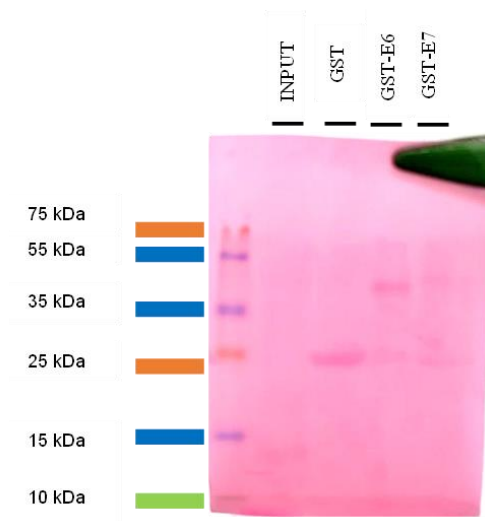


Figura 14. Resultados obtenidos de la electrotransferencia. Se observa el pull-down de las muestras cargadas provenientes a la interacción con células MCF-7. Se muestra la membrana con las proteínas transferidas y teñidas con rojo de Ponceau.

Como se muestra en la figura 14, el carril 1 muestra el marcador de peso molecular (PM), carril 2 muestra el extracto proteico de MCF-7, carril 3 muestra el pull-down del control, negativo para VPH (GST), carril 4 muestra el pull-down con GST-E6 y carril 5 muestra el pull-down con GST-E7. Como se observa la figura solo cuenta con la presencia de las 3 bandas correspondientes a las proteínas de fusión GST, GST-E6 y GST-E7, por lo que, se procedió a realizar un W-B contra CD36 para visualizar la interacción y su presencia en el INPUT.

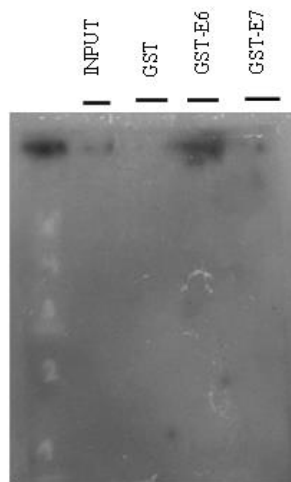


Figura 15. Resultados obtenidos por Western Blot. Se muestra el revelado de la membrana de la parte superior por W-B y se denota las concentraciones obtenidas.

La membrana revelada no mostró señal de la incubación a una concentración 1:200 con el anticuerpo para CD36 en células MCF-7, carril 1; tampoco se demuestra la presencia del receptor en el carril 3 con E6.

Dado que no se observó la presencia del receptor, se prosiguió a obtener CD36 de otra fuente celular, hígado.

Las muestras provenientes de la homogenización de células hígado se sometieron a proceso de interacción *in vitro* (pull-down). Una vez terminada dicha interacción, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y electrotransferencia con tinción de rojo de Ponceau, figura 16.

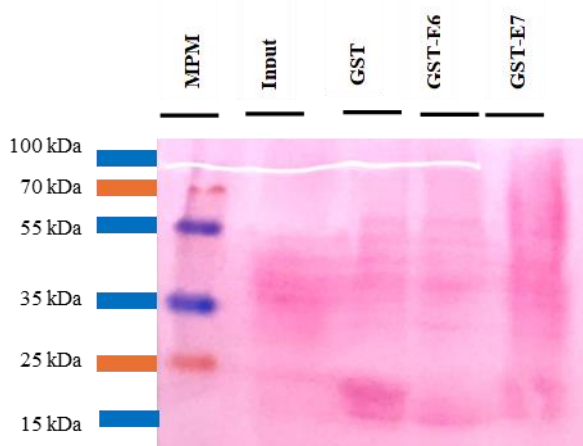


Figura 16. Resultados obtenidos de la electrotransferencia. Se observa el pull-down de las muestras cargadas provenientes a la interacción con hígado. Se muestra la membrana con las proteínas transferidas y teñidas con rojo de Ponceau.

En comparación con la figura 14 y 15, se muestra una señal en la figura 17 a una concentración 1:250 para CD36 en muestras correspondientes a la interacción con hígado, con un peso molecular aproximado de 52 kDa, el cual se logró visualizar en los carriles 1 y 3. Esto demostró la presencia de CD36 en el tejido, carril 1; así como también se visualiza una señal en el carril 3, el cual precede del pull-down con GST-E6, lo cual demuestra su interacción *in vitro* con E6 del VPH-16.

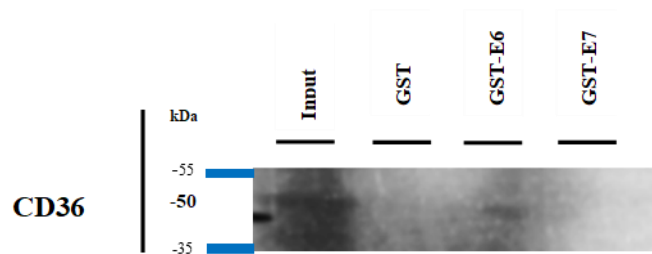


Figura 17. Resultado obtenido del revelado por Western.Blot. Se muestra el revelado de la membrana superior, donde se observa la presencia de CD36.

13.DISCUSIÓN

La infección por VPH continúa siendo un problema de salud pública a pesar de la introducción de la vacuna contra este virus. Una infección persistente por este virus representa el primer paso en el desarrollo del cáncer, donde las oncoproteínas E6 y E7 ejercen un sin número de acciones sobre proteínas celulares para regular procesos que permitan el establecimiento del cáncer. Este fenómeno se asocia con interacciones proteína-proteína debido a la ausencia de propiedades enzimáticas por parte de E6 y E7. Es por ello que las acciones que ejercen estas oncoproteínas radica sobre todo en este tipo de interacciones. Dentro de las interacciones de la oncoproteína E6 más importantes, se encuentra E6AP y p53, lo cual promueve la ubiquitinación de p53 para su posterior degradación vía proteosoma, estableciendo así un control sobre la muerte celular (Mantovani *et al*, 2001). Por esta razón, comprobar la interacción de la proteína viral E6 del VHP16 con otras proteínas celulares con motivos LxxLL, permitirá establecer nuevo conocimiento, así como identificar potenciales blancos terapéuticos.

Bajo estos antecedentes, es importante considerar si ciertos receptores que posean motivos LxxLL podrían estar interactuando con la proteína oncogénica E6 del VPH y así contribuir a la producción de energía e incluso a otros procesos como la metástasis. De tal manera que se propone a un receptor metabólico denominado CD36, destacado por contener un motivo LxxLL (Álcantara, 2020) y por su función al regular la homeostasis energética y la respuesta inmune en un contexto fisiológico, ya que en un ambiente patológico como el cáncer se asocia a metástasis, pues facilita la captación de lípidos alimentando así las necesidades energéticas de las células tumorales. Su interacción con la proteína oncogénica E6 del virus podría aumentar la producción de energía en células infectadas e incluso promover metástasis (Pascual et al, 2017).

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la interacción entre E6 del VPH16 y CD36, ya que el receptor se considera un factor potencial de mal pronóstico en pacientes con cáncer. Sin embargo, la regulación que pudiese ejercer el VPH sobre CD36 ha sido poco explorada. En este sentido, el análisis *in silico* previamente realizado por Alcántara (2020) indica que existe una potencial interacción entre CD36 y E6, y aquí demostramos que en efecto CD36 se une a E6 de VPH16, no obstante con demostrar la interacción *in vitro* solo se comprueba la unión de ambas, mas no la implicación que esto tiene en la enfermedad aunque es necesario considerar

que puede favorecer un mal pronóstico tras suceder la interacción de ambas proteínas y que esto represente un mecanismo mediante el cual el VPH, a través de E6, está regulando la acción metabólica de las células.

Demostrar la interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y la proteína celular CD36 a través de un método *in vitro* como el pull-down, fue adecuado para examinar la interacción entre ambas proteínas (Rao *et al*, 2014), ya que a través del uso de proteínas quiméricas compuestas de glutatión-S-transferasa (GST) enlazadas a la proteína de interés proporcionó la ventaja de que la porción GST de la proteína de fusión no interfiriera con la accesibilidad de la proteína fusionada, debido a que existe una región de enlace larga y flexible que permite que cada mitad de la fusión se comporte como un dominio separado (Vikis *et al*, n.d; Greenfield *et al*, 2020), además el uso de una etiqueta de afinidad permitió aumentar la expresión, solubilidad y purificación de la oncoproteínas E6, puesto que la purificación sin etiquetas proporcionan generalmente insolubilidades, malos plegamientos que hubieran requerido de pasos adicionales para obtener un buen rendimiento de la proteína además de ser sabido que los anticuerpos que reconocen a E6 del VPH son poco eficientes.

Ahora bien, en la expresión de proteína de fusión, si bien E6 tiene un tamaño correspondiente a 43 kDa y E7 a 37 kDa, se puede observar que GST-E7 tiene un peso molecular mayor al esperado. Se ha demostrado que en SDS-PAGE, E7 del VPH16 suele migrar con un tamaño molecular entre 18-20 kDa en lugar de su peso molecular previsto de 11 kDa, esta migración aberrante esta mediada por el dominio de homología CR1 amino terminal y puede ser causado por el alto contenido de residuos ácidos (Armstrong *et al*, 1993).

Por otra parte, la principal herramienta para considerar la interacción de E6 con CD36 fue por medio del análisis *in silico*, el cual permitió calcular para el complejo CD36/E6, un valor de energía libre de unión de $\Delta G_{\text{bind}} = -60.5 \pm 2.4$ kcal/mol indicando una muy fuerte interacción entre la oncoproteína E6 del VPH16 y el motivo LxxLL presente en el receptor CD36. En esta simulación realizada por Alcántara (2020) también se demostró que el pocket de la oncoproteína E6 mostraba varios residuos de arginina que podrían ser responsables de ayudar a estabilizar la interacción con la proteína CD36, esto se correlaciona con investigaciones anteriores (Zainer *et al*, 2013; Rietz *et al*, 2016) y por lo cual se buscó comprobar su interacción en esta investigación.

En este trabajo, para la selección del modelo, en primer lugar se optó por la línea celular adenocarcinoma de mama (MCF-7) ya que tiene por característica ser positivas a receptores de estrógeno (ER) y receptores de progesterona (PR), lo cual es un factor importante que ayuda a la alta expresión de p53 y CD36, factor que vuelve a las células MCF-7 un modelo ideal para estudiar la biología del cáncer (Guardiola, 1998). Tomando en cuenta lo anterior a pesar de ser un modelo ideal para estudiar al cáncer, MCF-7 tiene una alta expresión de p53, lo cual pudo ser un factor importante que considerar para visualizar la interacción con CD36, ya que p53 es uno de los blancos de interacción de E6 del VPH, sin embargo, el modelo se escogió por la presencia de CD36 comparado con otras líneas celulares de cáncer de mama (Liang *et al*, 2016; Gyamfi *et al*, 2021), además de la disponibilidad del modelo. Por otro lado, la disponibilidad proteica según Zhang *et al*, 2019, se estima que la cantidad de proteína que da una célula es de 1×10^{-7} mg y es necesaria una productividad de 1×10^9 por día para alcanzar 1 mg de proteína total, hecho que no se correlaciona con la cantidad de proteína total alcanzada, lo cual es un factor importante, al no visualizar la presencia del receptor (fig. 15).

Por ende, se decidió utilizar otra fuente de proteína CD36 para estudiar la interacción *in vitro* entre E6 y CD36 seleccionando el hígado de rata. Por disponibilidad se escogió el modelo de rata macho Wistar, de un mes de edad y alimentado con dieta LabDiet5001. En primera instancia la alimentación fue importante para establecer una buena nutrición y garantizar una dieta equilibrada de proteínas, grasas y fibra en el roedor, lo cual garantizó la viabilidad de las proteínas.

En segundo lugar, el receptor CD36 de acuerdo con la bibliografía, se encuentra en varios vertebrados además del humano, ya que Holmes (2012) proporcionó un estudio que predice la estructura del gen y las secuencias de los aminoácidos para varios vertebrados como se observa en la tabla 4. Este estudio destaca la relevancia de CD36 en procesos fisiológicos fundamentales a lo largo de diversas especies.

Tabla 4. Comparación de secuencia de CD36. Tomado de Holmes, 2012

CD36 Gene	Species	RefSeq ID Ensembl/NCBI	GenBank ID	UNIPROT ID	Amino acids	Chromosome location	Coding Exons (strand)	Gene Size bps
Human	<i>Homo sapiens</i>	NM_001001547	BC008406	P16671	472	7:80,275,645-80,303,732	12 (+ve)	72,231
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	XP_519573	na	na	472	7:81,142,402-81,169,764	12 (+ve)	#27,363
Orangutan	<i>Pongo abelii</i>	XP_002818343	na	na	472	7:95,750,733-95,779,630	12 (-ve)	#28,898
Gibbon	<i>Nomascus leucogenys</i>	XP_003252221	na	na	472	*GL397261:11,570,433-11,598,114	12 (+ve)	#27,682
Rhesus	<i>Macaca mulatta</i>	NP_001028085	na	na	472	3:136,626,102-136,653,066	12 (+ve)	#27,682
Mouse	<i>Mus musculus</i>	NM_001159555.1	BC010262	Q08857	472	5:17,291,543-17,334,712	12 (-ve)	43,170
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_113749	L19658	Q07969	472	4:13,472,534-13,522,334	12 (+ve)	49,801

Se sugiere que FAT es el homólogo en rata de CD36 en humano (Aguilera *et al*, 2010) ya que la secuencia proteica primaria parece estar altamente conservada, sin embargo, la glicosilación específica de cada tejido podría conferir y explicar la diferencia de la masa de la proteína y el peso molecular en humano (Aguilera *et al*, 2010).

En el segundo revelado el cual muestra el pull-down con hígado se puede observar una banda con baja concentración de proteína, lo cual indica que hay poca expresión de CD36 en el tejido y lo cual también se relaciona con la obtención de proteína total, ahora bien, se consideró a CD36 de hígado debido a que existe una fuerte regulación hepática por parte del receptor, ya que se asocia con la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, y aumento de la esteatosis, en entidades patológicas, sin embargo, también participa de manera importante en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria de manera fisiológica (Aguilera *et al*, 2010: Holmes, 2012).

Si bien el tamaño de CD36 en humano es de 70-88 kDa, en rata se identificó con un tamaño de 52 kDa. La detección de CD36 fue mediante el anticuerpo NBP2-54790 monoclonal de conejo, el cual se desarrolló contra un péptido sintético hecho de una porción interna de la proteína CD36 humana (UniProt:P16671-1) entre los aminoácidos 100-150 (CD36 Novus Biologicals) (1283D) - BSA Free, 2018) y secuencia de rata (UniProt: Q07969) (Holmes, 2012; Abumrad *et al*, 1993; Madeira *et al*, 2024) (ANEXO 2).

Ahora bien, usando el mismo alineamiento, de acuerdo con Holmes, 2012, determinó que las secuencias de CD36 en humano y rata coinciden en 86%. En el alineamiento se puede identificar sitios LxxLL conservados en ambas secuencias (ANEXO 3), así como una serie de leucinas (Madeira *et al*, 2024).

En el Anexo 3 se muestra en azul que se conservan los residuos citoplasmáticos, los residuos transmembrana se visualizan en rosa, también se conservan los enlaces disulfuro (Cys243- Cys311, Cys272-Cys333, Cys313-322), así como los potenciales N-glicosilaciones en ambas secuencias (N79, N102, N134, N205, N220, N235 N247, N321 y N417) y en la secuencia de humano (N163) (Holmes, 2012), las letras en rojo son los residuos que son diferentes a la secuencia de humano, así como también se visualiza de manera importante en verde y amarillo los motivos parecidos a LxxLL, importantes para su interacción con E6.

Como se sabe la oncoproteína E6 se dirige a una gran cantidad de proteínas del huésped, de las cuales se destaca su afinidad por motivos ácidos LxxLL que están presentes en proteínas como p53 y E6AP. Su afinidad a estos motivos se debe a que E6 contiene dos dominios de zinc unidos por una hélice conectora, que forman un bolsillo hidrofóbico capaz de capturar motivos helicoidales LxxLL, ya que rodeando a la cavidad hidrofóbica se encuentran varios grupos laterales de arginina, que favorecen una superficie poco profunda y cargada positivamente, lo que ayuda a unir a las moléculas ácidas del motivo LxxLL. Por otro lado, en E6 existen residuos que funcionan como lectores que discriminan las variaciones del motivo LxxLL pero también, puede suceder que algunos residuos lectores toleren variaciones en la diferentes posiciones, esto permite que E6 capture diferentes proteínas del huésped que presenten variaciones del motivo LxxLL (Zanier *et al*, 2013), punto relevante que ayuda a su interacción con CD36 al presentar varios motivos parecidos a LxxLL.

Asimismo, el uso de condiciones desnaturalizantes proporcionó de un ambiente favorable para la obtención de la estructura primaria de las proteínas de fusión GST, GST-E6 y GST-E7, así como también de la proteína presa o de interés CD36. A pesar de que el receptor CD36 presenta 3 enlaces disulfuro en las posiciones 243-311, 272-333 y 313-32, al usar agentes reductores se condiciona a la obtención de la estructura primaria, por lo que el motivo de interés LxxLL queda expuesto para su interacción, de manera que también quedan expuestos los residuos de arginina presentes en la oncoproteína E6 que estabilizan el complejo.

De acuerdo con la secuencia primaria de CD36 en la posición 175-179 se encuentra el motivo LxxLL, el cual es clave para su interacción con E6, sin embargo, en demás posiciones se encuentran motivos parecidos como LxL, LxxL, LxxxL y LxxxLL que también podrían jugar un papel importante para establecer su interacción. Si bien en la posición 440 existe otro LxxLL,

este se encuentra en la secuencia transmembranal, lo que probablemente imposibilitaría su reconocimiento por E6. Sin embargo, cabe destacar que E6 se posiciona en endosomas y está asociado al reciclaje de receptores (Ganti *et al*, 2016), por lo que no se descarta la posibilidad de que este otro motivo LxxLL sea reconocido por E6 y se promueva un rápido reciclaje de CD36 para favorecer el metabolismo de lípidos. Este escenario queda parcialmente explicado por Alcántara (2020) al demostrar que las líneas celulares positivas a VPH son capaces de internalizar mayores cantidades de ácidos grasos en comparación con líneas celulares negativas al VPH.

Al suceder esta interacción, la señal que se precisa es menor a la esperada, sin embargo, es posible que esta interacción se vea disminuida por los diversos blancos que tiene E6 como lo es p53, Dlg, scribble, Mag-1, entre otros distractores de la interacción de interés. En otro sentido también las condiciones experimentales realizadas no reflejan con precisión un entorno fisiológico real, como en una célula, por lo que puede afectar la relevancia biológica, además las proteínas al no tener una conformación nativa afectan su capacidad de interacción, por lo que también se ve disminuida, también es posible que éstas requieran de cofactores que no están presentes en el sistema *in vitro*, es importante mencionar que el pull-down es un método cualitativo y no proporciona una cuantificación precisa de la interacción proteína-proteína, limitando la capacidad de medir la fuerza o la dinámica de la interacción, por ello es preciso mencionar que los resultados deben ser validados con otros métodos complementarios. Sin embargo, los resultados dejan de manifiesto la capacidad de E6 de formar complejos con CD36 y resulta necesario continuar con las investigaciones que descifren la relevancia de esta interacción para el entorno biológico del virus, así como en su papel en el cáncer.

14.CONCLUSIONES

1. El sistema de expresión pGEX-6p-1-*E. coli* fue exitoso para la expresión y purificación de las proteínas de fusión denominadas GST, GST-E6 y GST-E7.
2. Se comprobó que CD36 se expresa en hígado, de un modelo de rata Wistar, mediante el uso del anticuerpo monoclonal de conejo NBP2-54790.
3. Se confirmó la interacción entre E6 del VPH-16 y CD36 de manera *in vitro*.

15.BIBLIOGRAFÍA

- Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E., & Grimaldi, P. A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *TJBC*, 268(24), 17665–17668. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7688729/>
- Aguilera, A.A & Soto, I. (2010). Receptor FAT/CD36 y síndrome metabólico. *RIICS*. Universidad de Veracruz, 5, 9-14 pp. https://www.researchgate.net/publication/322138157_Receptor_FATCD_36_y_Sindrome_Metabolico/citation/download
- Alcántara, K. M. (2020). Efecto de la oncoproteína e6 del virus del papiloma humano tipo 16 sobre el receptor cd36 en cáncer de cabeza y cuello [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Nacional de México]. Repositorio de Tesis UNAM. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000805589
- Alonso, A., Pérez, M., Vidal, Z & Vidal, A. (2016). Papel de la reprogramación metabólica en la carcinogénesis. *Correo científico Medico*, 20(2), 292-304 pp. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000200007
- American Cancer Society. (n.d.). El VPH y las pruebas del VPH. www.cancer.org. <https://www.cancer.org/es/cancer/prevencion-del-riesgo/vph/vph-y-pruebas-para-vph.html>
- Armstrong DJ, Roman A. El comportamiento electroforético anómalo de la proteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 se debe al alto contenido de residuos de aminoácidos ácidos. *Biochem Biophys Res Commun.*; 192(3):1380-7. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1569. PMID: 8389548.
- Bartman, C., Faubert, B., Rabinowitz, J. D., & DeBerardinis, R. J. (2023). Metabolic pathway analysis using stable isotopes in patients with cancer. *NRC*, 23(12), 863–878. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00632-z>
- Bugnon Valdano, M., Pim, D., & Banks, L. (2019). Choosing the right path: membrane trafficking and infectious entry of small DNA tumor viruses. *Curr Opin Cell Bio.*, 59, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.03.013>

- Chen, Y., Zhang, J., Cui, W., & Silverstein, R. L. (2022). CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *J Exp Med*, 219(6). <https://doi.org/10.1084/jem.20211314>
- Chitsike, L., & Duerksen-Hughes, P. J. (2021). PPI Modulators of E6 as potential targeted therapeutics for cervical cancer: progress and challenges in targeting E6. *Molecules*, 26(10), 3004. <https://doi.org/10.3390/molecules26103004>
- De la Fuente-Villarreal, D., Guzmán-López, S., Barboza-Quintana, O. & González-Ramírez, R.A. (2010). Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Med Univer*, 12(49), 231-238. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-universitaria-304-articulo-biologia-del-virus-del-papiloma-X1665579610901659>
- Deng, M., Cai, X., Long, L., Xie, L., Ma, H., Zhou, Y., Liu, S., & Zeng, C. (2019). CD36 promotes the epithelial–mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- β . *J Transl Med*, 17(1), 352-362. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2098-6>
- Domínguez, S.R., Trujillo, T. et al (2018). Infección por el virus del papiloma humano en adolescentes y adultas jóvenes. *Rev Cubana Obstet Ginecol*, 44(1), 1-23. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2018000100017
- Fu, Y., Zou, T., Shen, X., Nelson, P. J., Li, J., Wu, C., Yang, J., Zheng, Y., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L., & Dong, Q. (2020). Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *Med Comm*, 2(1), 27–59. <https://doi.org/10.1002/mco2.27>
- Ganti K, Broniarczyk J, Manoubi W, Massimi P, Mittal S, Pim D, Szalmas A, Thatte J, Thomas M, Tomaić V, Banks L. (2015) El motivo de unión al virus del papiloma humano E6 PDZ: del ciclo de vida a la malignidad. *Virus*, 7(7):3530-3551. <https://doi.org/10.3390/v7072785>
- Ganti, K., Massimi, P., Manzo-Merino, J., Tomaić, V., Pim, D., Playford, M. L., Roberts, S., Kranjec, C., Doorbar, J. & Banks, L. (2016). Interaction of the Human Papillomavirus E6 oncoprotein with sorting nexin 27 modulates endocytic cargo transport pathways. *PLOS Pathogens*, 12(9), e1005854. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005854>
- Giovanelli, P., Di Donato, M., Galasso, G., Di Zazzo, E., Medici, N., Bilancio, A. & Migilaccio, G. C. (2019). Breast cancer stem cells: The role of sex steroid receptors. *WJSC*, 11, 594-603

pp.

- https://www.researchgate.net/publication/336071829_Breast_cancer_stem_cells_The_role_of_sex_steroid_receptors/citation/download
- Greenfield, E. A., DeCaprio, J., & Brahmandam, M. (2020). Preparing GST-, His-, or MBP-Fusion Proteins from Bacteria. *Cold Spring Harbor Protocols*, (9), pdb.prot100024. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100024>
- Guardiola, A. M. (1998). Marcadores de pronóstico en el carcinoma de mama. *Biopat*. <https://www.biopat.es/1998/02/09/marcadores-de-pronostico-en-el-carcinoma-de-mama/>
- Gyamfi, J., Yeo, J. H., Kwon, D., Min, B. S., Cha, Y. J., Koo, J. S., Jeong, J., Lee, J., & Choi, J. (2021). Interaction between CD36 and FABP4 modulates adipocyte-induced fatty acid import and metabolism in breast cancer. *Npj Breast Cancer*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00324-7>
- Hanahan, D., & Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of cancer: the next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harper, S. & Speicher D. W. (2011). Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol*, 259-280, 681. doi:10.1007/978-1-60761-913-0_14
- Hollenbaugh, J. A., Montero, C., Schader, S. M., Kleinhenz, A. L., & Munger, J. (2011). Metabolic profiles of human immunodeficiency virus infected CD4+ T cells. *JBC*, 286(44), 42606-42616.
- Holmes, R. S. (2012). Comparative Studies of Vertebrate Platelet Glycoprotein 4 (CD36). *Biomolecules*, 2(3), 389–414. <https://doi.org/10.3390/biom2030389>
- Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J. A., Herrmann, A. L., & Hoppe-Seyler, F. (2018). The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol*, 26(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.007>
- Lee, S.-J., Yang, A., Wu, T.C., & Hung, C.-F. (2016). Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *J Gynecol Oncol*, 27(5). <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e51>
- Liang, Y., Han, H., Liu, L., Duan, Y., Yang, X., Ma, C., Zhu, Y., Han, J., Li, X., & Chen, Y. (2018). CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells. *Oncogenesis*, 7(12), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0107-x>

- López, J., & Aristizábal, F. A. (2006). Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 35(1), 5–32. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182006000100001
- Madeira F, Madhusoodanan N, Lee J, *et al* (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework. *Nucleic Acids Research*. 52(W1):W521-W525. DOI: 10.1093/nar/gkae241. PMID: 38597606; PMCID: PMC11223882.
- Mantovani, F., & Banks, L. (2001). The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, 20(54), 7874–7887. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204869>
- Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., & Banks, L. (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, 23(49), 8033–8039. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207977>
- National Institute of Health [NIH]. (2007). Entendiendo el cáncer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- Novus Biologicals (2018). CD36 Antibody (1283D) - BSA Free. https://www.novusbio.com/products/cd36-antibody-1283d_nbp2-54790#datasheet
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *NRMCB*, 20(3), 137-155.
- Papillomavirus E6 Oncoprotein with Sorting Nexin 27 Modulates Endocytic Cargo Transport Pathways. *PLOS Pathogens*, 12(9), e1005854. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005854>
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C. S.-O., Berenguer, A., Prats, N., Toll, A., Hueto, J. A., Bescós, C., Di Croce, L., & Benitah, S. A. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*, 541(7635), 41–45. <https://doi.org/10.1038/nature20791>
- Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D., & Abumrad, N. A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr*, 34(1), 281–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161220>

- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-Protein interaction detection: methods and analysis. *IJP*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/147648>
- Rietz, A., Petrov, D. P., Bartolowits, M., DeSmet, M., Davisson, V. J., & Androphy, E. J. (2016). Molecular Probing of the HPV-16 E6 Protein Alpha Helix Binding Groove with Small Molecule Inhibitors. *PLOS ONE*, 11(2), e0149845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149845>
- Rivera, R., Delgado, J., Painel, V., Barrero, B. & Larraín A. et al. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por Virus Papiloma Humano en el epitelio cervical. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 71(2), 135-140. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262006000200011
- Sanabria, J.G. (2009). Virus del papiloma Humano. *Universidad de Ciencias Médicas*, 13(4), 168-187. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1561-31942009000400019
- Secretaria de Salud. (2023). Evaluación clínica y económica de los esquemas de vacunación contra el VPH para la prevención del cáncer de cuello uterino en México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/845228/ETES_vacuna_vs_VPH_260723_V5.pdf
- Tomaić, V. (2016). Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites. *Cancers*, 8(10), 95. <https://doi.org/10.3390/cancers8100095>
- Vikis, H. G., & Guan, K.-L. (n.d.). Glutathione-S-Transferase–Fusion based assays for studying protein–protein interactions. *Protein-Protein interactions*, 175–186. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:175>
- Wang J & Li Y. (2019). CD36 en el cáncer: vías y funciones de señalización. *Teranósticos*, 9(17), 4893-4908. <https://www.thno.org/v09p4893.htm>
- Wang, J., & Li, Y. (2019). CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. *Theranostics*, 9(17), 4893–4908. <https://doi.org/10.7150/thno.36037>
- Waris, G., & Siddiqui, A. (2012). "Hepatitis C virus uses proteomics and lipidomics analyses to alter cellular lipids to enhance its replication and survival". *Journal of Virology*, 86(14), 7472-7485.

- Yeo-Teh, N.S.L., Ito, Y. & Jha, S. (2018). High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *Int J Mol Sci*, 19(6), 1706. <https://doi.org/10.3390/ijms19061706>
- Zanier, K., Charbonnier, S., Sidi, A. O. M. O., McEwen, A. G., Ferrario, M. G., Poussin, P., Cura, V., Brimer, N., Babah, K. O., Ansari, T., Muller, I., Stote, R. H., Cavarelli, J., Pol, S. V., & Travé, G. (2013). Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *SNY*, 339(6120), 694–698. <https://doi.org/10.1126/science.1229934>
- Zhang & Zhebin. (2019). Total protein mass o protein concetration in MCF-7. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/post/Total-protein-mass-or-protein-concentrations-in-MCF-7/5c6c4021f0fb621441479c6d/citation/download>
- Zheng, Z. M., & Baker, C.C. (2006). Papillomavirus Genome Structure, Expression and post-transcriptional regulation Estructura del genoma del virus del papiloma, expresión y regulación post-transcripcional. *Front Biosc*, 11, 2286-2302. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1472295/>

16.ANEXOS

1.

Preparación de geles acrilamida al 12%

GEL SEPARADOR	
Acrilamida 40% / N'-biscrilamida	2.4 mL
Resolving buffer	3.5 mL
Agua	5.5 mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	80 µL
N,N,N,N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	8 µL
Total	8 mL

GEL CONCENTRADOR	
Acrilamida 40% / N'-biscrilamida	0.30 mL
Stocking buffer	0.75 mL
Agua	1.92 mL
Persulfato de amonio (APS) 10 %	30 µL
N,N,N,N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	3 µL
Total	3 mL

APS 10%

Persulfato de amonio 0.1 g

H₂O destilada y fría 1 mL

APS a temperatura ambiente se degrada.

Buffer de corrida 1x

Tris base 3.03 g

Glicina 14.42 g

SDS 1.0 g

H₂O destilada aforar a 1L

Solución de tinción Azul Brillante de Coomassie R-250

Azul de Coomassie R-250 0.05 g

Metanol 50 mL

Ácido acético

H₂O destilada aforar a 100 mL

Buffer de transferencia

Tris-base 3.03 g

Glicina 14.42 g

SDS 1.0 g

Metanol 25%

H₂O destilada aforar a 1L

Buffer de lisis

Tris-base 20 mM

NaCl 200 mM

Nonidet-P40 0.5%

EDTA 1 mM

Rojo de Ponceau

Ponceau S 0.1g

Ácido acético 5 mL

H₂O destilada aforar a 100 mL

TBS-T 1x

Tris base 2.42 g

NaCl 8.0 g

Tween-20 1.0%

Albúmina 2.5%

Albúmina 2.5 g

H₂O destilada aforar a 100 Ml

2. Blast de reconocimiento epítipo de CD36 en secuencia rata (UniProt: Q07969) y secuencia de humano (UniProt: P16671-1)

P16671-1	MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVVL EEGTIAFKNWVKTGTE	60
Q07969	MGCDRNCGLITGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIEKTIKREVV EEGTIAFKNWVKTGTT	60
	*****:*****:*****:*****:*****:*****	
P16671-1	VYRQFWIFDVQNPQEVMNSSNIQVKQRGPYTYRVRF LAKENV TQDAEDNTVSFLQPNGA	120
Q07969	VYRQFWIFDVQNP EEVAKNSSIKVKQRGPYTYRVRY LAKENITQDPKDSTVSFVQPNGA	120
	*****:***:*****:*****:***:***:*****:*****	
P16671-1	IFEPSLSVGT EADNFTVLNLAVAAASHIYQ NQFVQMILNSLINKSKSSMFQVRTLRELLW	180
Q07969	IFEPSLSVGTENDNFTVLNLAVAAAPIHYT NSFVQGVLSLIKSKSSMFQTRSLKELLW	180
	***** ***** *** *:***:*****:*****:***:***:*****	
P16671-1	GYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFY PYNNTADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYGKRNL SYWE	240
Q07969	GYKDPFLSLVPYPISTTVGVFY PYNNTVDGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYGKRNL SYWE	240
	** :*****:***:*****:*****:*****:*****:*****	
P16671-1	SHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLP SKAF	300
Q07969	SYCDMINGTDAASFPPFVEKSQTLRFFSSDICRSIYAVFESEVNLKGIPVYRFVLP ANAF	300
	*:*****:***:*****:*****:*****:*****:***	
P16671-1	ASPVENPDNYCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLP HFLYASPDVSEP IDGL	360
Q07969	ASPLQNPDNHCFCTEKVISNNCTSYGVLDIGKCKEGKPVYISLP HFLHASPDVSEPIEGL	360
	::*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:***	
P16671-1	NPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQVNLLVKPSEKIQVLKNLKRNYIVPILWLN ETG	420
Q07969	NPNEDEHRTYLDVEPITGFTLQFAKRLQVNILVKPARKIEALKNLKRNYIVPILWLN ETG	420
	****:*****:*****:*****:*****:***:***** *****	
P16671-1	TIGDEKANMFRSQVTGKINLLGLIEMILLSVGVMFVAFMISYCACRSKTIK	472
Q07969	TIGDEKAEMFRNQVTGKIKLLGLVEMVLLGVGVMFVAFMISYCACRSKNGK	472
	*****:***:*****:*****:***:*** ***** ***** *	

3. Blast secuencia humano y secuencia rata.

```

P16671-1  MGCDRNCGLIAGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIQKTIKKQVLEEGTIAFKNWVKTGTE  60
Q07969     MGCDRNCGLITGAVIGAVLAVFGGILMPVGDLLIEKTIKREVVLEEGTIAFKNWVKTGTT  60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

P16671-1  VYRQFWIFDVQNPQEVMNSSNIQVKQRGPTYTYRVRLAKENVTDQDAEDNTVSFLQPNGA  120
Q07969     VYRQFWIFDVQNP EEVAKNSSKIKVKQRGPTYTYRVRYLAKENITQDPKDSVTSFVQPNGA  120
*****:***:***:*****:*****:***:***:*****:*****

P16671-1  IFEPSLSVGTEADNFTV LNLAVAAASHIYQNQFVQMI LNSL INKSKSSMFQVRT LRELLW  180
Q07969     IFEPSLSVGTEADNFTV LNLAVAAAPHIYTNSFVQGV LNSL I KSKSSMFQTRSLKELLW  180
***** ***** *** *:***:*****:*****:***:*****

P16671-1  GYRDPF LSLVPYPVTTTGLFYYPYNNADGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWE  240
Q07969     GYKDPF LSLVPYP ISTTVGVFYYPYNNVDGVYKVFNGKDNISKVAIIDTYKGKRNLSYWE  240
*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

P16671-1  SHCDMINGTDAASFPPFVEKSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLPKAF  300
Q07969     SYCDMINGTDAASFPPFVEKSQTLRFFSSDICRSIYAVFES EVNLKGIPVYRFVLPANAF  300
*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

P16671-1  ASPVENPDNYCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYIS LPHFL YASPDVSEPIDGL  360
Q07969     ASPLQNPDNHCFCTEKVISNNCTSYGVLDIGKCKEGRPVYIS LPHFL HASPDVSEPIEGL  360
***:***:*****:***:*****:*****:*****:*****:*****

P16671-1  NPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKR LQVNL VKPSEKIQV LKNL KRNIVIP LWN NETG  420
Q06979     NPNEDEHRTYLDVEPITGFTLQFAKR LQVNI VKPARKIEA LKNL KRPYIVPI LWN NETG  420
****:*****:*****:*****:*****:***:***:***** *****

P16671-1  TIGDEKANMFRSQVTGKIN LLGLIEMILLSVGVMFVAFMISYCACRSKTIK  472
Q07969     TIGDEKAEMFRNQVTGKIK LLGLVEMVLLGVGVVMFVAFMISYCACRSKNGK  472
*****:***:*****:*****:***:***:*****:*****:*****

```