



BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

TESIS

**“Evaluación del efecto de la proteína E6 del Virus Del
Papiloma Humano sobre la expresión de galectina-9”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
ÁREA MEDICA

PRESENTA:

Q.B.P. Rosalia Vargas González

DIRECTORES DE TESIS:

D.C. Verónica Vallejo Ruiz. (CIBIOR-IMSS)
D.C. Claudia Martínez de la Peña. (CICM-BUAP)

Puebla, Puebla. Febrero, 2025



BUAP

Puebla, Pue. a 27 de febrero 2025

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría de la alumna **Rosalía Vargas González**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


Evaluación del efecto de la proteína E6 del Virus del Papiloma Humano sobre la expresión de galectina-9

A nuestro juicio, la alumna **Rosalía Vargas González** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. Rosa del Carmen Rocha Graña


D.C. Lucía Soto Urzúa



AGRADECIMIENTOS

CONACYT

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por la beca de maestría otorgada durante el desarrollo de este proyecto.

No. De CVU 822835



IMSS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)



DEDICATORIA

A mi hijo Ian Gael, gracias por su alegría, por sus risas, y por enseñarme que lo más importante en la vida es nunca rendirse. Este logro es para ti, porque tú me has dado la fuerza para alcanzarlo.

A mi esposo Daniel, por su amor y apoyo constante. Gracias pololo por ser mi compañero de vida, mi soporte, mi amigo, mi confidente y por estar siempre a mi lado en cada paso de este proyecto. Este logro es de ambos.

A mis padres, Petra y José Luis, por su amor infinito, su apoyo inquebrantable y por enseñarme, con su ejemplo, el verdadero significado del esfuerzo y la dedicación. Gracias mami por creer en mí incluso cuando yo dudaba de mí misma, y por ser mi mayor fuente de fortaleza.

A mi hermana Ana, por ser mi confidente, mi amiga y mi pilar. Gracias por su paciencia, por estar siempre a mi lado en aquellos momentos de duda, donde su comprensión me ha dado la fuerza para seguir adelante.

A mi cuñada Ely, quien no solo ha sido un apoyo durante este proceso, sino una amiga fiel con la que he compartido risas, consejos y experiencias a lo largo de muchos años.

A mi tía Carmen, por ser mi apoyo constante y mi gran aliada en casa. Gracias por su cariño, generosidad y dedicación, su presencia ha sido fundamental para que pudiera avanzar en este proyecto.

A mis amigos de toda la vida Vic, Rubí, Goyi, Isha, Lupita y muchos más, que me apoyaron siempre, con hermosas cartas de recomendación, con mensajes de aliento en todo momento, siempre pendientes de mi camino.

A mí misma, por no rendirme, por perseguir mi sueño con determinación y valentía. Este logro es el reflejo de la paciencia, el coraje y la resiliencia con los que decidí retomar el camino hacia mi meta. Gracias por confiar en ti, por no dejar que el tiempo te detuviera y por recordar siempre que los sueños no tienen fecha de caducidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han apoyado durante este proceso, cuyo acompañamiento ha sido fundamental para la culminación de esta tesis.

Dra. Vero por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Su paciencia infinita y su empatía han sido fundamentales para que pudiera enfrentar los desafíos, ya que más allá de ser mi tutora, se ha convertido en una amiga, brindándome no solo sus valiosos conocimientos, sino su comprensión en los momentos difíciles.

Dra. Claudia gracias por brindarme la oportunidad de conocerla, por estar siempre pendiente aun estando lejos y por apoyarme y guiarme en cada paso de este proceso.

A mi comité revisor. Dra. Sandra Reyes, Dra. Patricia Lozano, Dra. Rosa Rocha, Dra. Lucia Soto; por el apoyo y todas las aportaciones que contribuyeron a mi formación académica y a la realización de esta tesis.

A mis amigas de generación en especial a Janina, Judith y Grisel, gracias por su amistad sincera, por que compartir este camino académico con ustedes ha sido invaluable. Agradezco cada conversación, cada momento de compañerismo que me ayudaron a mantener la motivación en los momentos difíciles. Con su compañía todo esto fue más fácil.

A mis amigas y compañeras de laboratorio. A la Q. Sandra gracias por estar a mi lado, por enseñarme y sobre todo por las largas platicas. A Silvia por su apoyo incondicional, su confianza en mí y sus palabras de aliento. A Ileana por su generosidad al compartir su experiencia y su disposición para guiarme. A Ely y Montse por su alegría y frescura, por permitirme compartir con ellas el día a día en el laboratorio. Y a todas por brindarme su amistad y formar el mejor equipo.

A los químicos, técnicos e investigadores, así como a mis amigos de otros laboratorios del CIBIOR, que me apoyaron personal y experimentalmente durante mi estancia y la realización de esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Generalidades del Cáncer cervicouterino.....	3
1.2. Epidemiología del Cáncer cervicouterino.....	4
1.3. Factores de riesgo.....	5
1.4. Virus del Papiloma Humano.....	6
1.4.1. Genoma Viral de VPH.....	8
1.4.2. Ciclo viral.....	10
1.5. Oncoproteína viral E6.....	14
1.5.1. Dominios de dedos de zinc.....	14
1.5.2. Bolsillo de unión a motivos LXXLL.....	15
1.5.3. Motivo de unión a PDZ.....	16
1.5.4. Secuencias de localización nuclear.....	17
1.6. Efactor de E6 en los queratinocitos infectados.....	17
1.6.1. Inhibición de la apoptosis.....	17
1.6.2. Modulación de la inmunidad innata.....	19
1.6.3. Alteración de microARN.....	20
1.6.4. Inhibición de la supresión tumoral.....	20
1.6.5. Efecto de E6 en la expresión de genes.....	20
1.7. Galectinas.....	21
1.8. Galectina-9.....	23
1.8.1. Estructura molecular de la galectina-9.....	23
1.8.2. Distribución de galectina-9.....	23
1.8.3. Función fisiológica de galectina-9.....	24
1.8.4. Receptores de galectina-9.....	24

1.8.5.	Expresión de galectina-9 en el cancer.....	26
2.	ANTECEDENTES.....	28
3.	JUSTIFICACIÓN.....	32
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
5.	HIPÓTESIS.....	34
6.	OBJETIVOS.....	34
6.1.	Objetivo general.....	34
6.2.	Objetivos específicos.....	34
7.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
7.1.	Linea celular.....	35
7.2.	Plásmidos.....	35
7.2.1.	Vectores de expresión.....	35
7.2.2.	Vectores reporteros.....	36
7.3.	Condiciones de cultivo.....	37
7.4.	Efecto de E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre lo niveles de ARNm del gen <i>LGALS9</i>	39
7.4.1.	Cultivo celular.....	39
7.4.2.	Ensayos de transfección.....	39
7.4.3.	Extracción de ARN total.....	40
7.4.4.	Síntesis de ADNc.....	40
7.4.5.	Cuantificación de ARNm por PCR Tiempo Real (qPCR).....	41
7.5.	Efecto de E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la actividad del promotor del gen <i>LGALS9</i>	42
7.5.1.	Cultivo celular.....	42
7.5.2.	Ensayos de transfección.....	42
7.5.3.	Ensayos de luciferasa.....	43
7.6.	Efecto de E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la expresión de galectina-9.....	44

7.6.1. Cultivo celular.....	44
7.6.2. Ensayos de transfección.....	44
7.6.3. Semi-cuantificación de la proteína galectina-9 por Western Blot.....	45
7.7. Análisis estadístico.....	47
8. RESULTADOS.....	48
8.1. Evaluación del efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y los VPH-84 sobre los niveles de ARNm del gen <i>LGALS9</i>	48
8.2. Evaluación del efecto de E6 del VPH-16 sobre la actividad del promotor del gen <i>LGALS9</i>	49
8.3. Evaluación del efecto de E6 del VPH-84 sobre la actividad del promotor del gen <i>LGALS9</i>	50
8.4. Evaluación de efecto de E6 del VPH-16 sobre la expresión del producto proteico la galectina-9.....	51
8.5. Evaluación de efecto de E6 del VPH-84 sobre la expresión del producto proteico la galectina-9.....	53
8.6. Análisis in silico de secuencias de las E6 VPH-16 y VPH-84.....	55
8.6.1. Obtención y análisis comparativo de las secuencias de las E6 de VPH-16 y VPH-84.....	55
8.6.2. 8.6.2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.....	55
8.6.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.....	56
8.6.4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman las secuencias de localización nuclear de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.....	57
9. DISCUSIÓN.....	58
10. CONCLUSIÓN.....	63
11. PERSPECTIVAS.....	64
12. REFERENCIAS.....	65

ANEXO I Preparación de soluciones para Western Blot.....	77
Buffer de fosfatos 1X (PBS).....	77
Tris base 0.5 M pH 6.8.....	77
Tris base 1.5 M pH 8.0.....	77
SDS 10%.....	77
Persulfato de amonio 10%.....	78
Buffer de carga para proteínas.....	78
Poliacrilamida 30%.....	78
Buffer de corrida Laemmli.....	79
Buffer de transferencia 0.06% pH 8.3 – 8.5.....	79
Solución de lavado para WB TBS 1X y TBS-T.....	79
Solución de Bloqueo al 5%.....	80
Tris HCl 1M pH 6.8.....	80
Buffer stripping.....	80
RIPA.....	80
Gel de poliacrilamida.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomía del aparato reproductor femenino.....	3
Figura 2.	Estimación de la incidencia de CaCu en México GLOBOCAN 2022.....	4
Figura 3.	Evolución de las alteraciones del epitelio cervical en el desarrollo del CaCu.....	5
Figura 4.	Representación esquemática de la estructura del VPH.....	6
Figura 5.	Representación esquemática del genoma del VPH-16.....	8
Figura 6.	Proceso de Infección del VPH en el cuello uterino.....	10
Figura 7.	Ciclo biológico e historia natural de la infección persistente por el VPH.....	13
Figura 8.	Representación en listones de los dominios de dedos de zinc de E6 VPH-16.....	14
Figura 9.	Estructura del modelo de homología de la proteína E6 de VPH-16.....	15
Figura 10.	Diagrama esquemático de E6 de VPH-16.....	16
Figura 11.	Esquema de algunas vías de interacción de la oncoproteína E6 de VPH en los queratinocitos infectados.....	19
Figura 12.	Esquemas de estructuras modulares de las galectinas.....	22
Figura 13.	Receptores de galectina-9.....	26
Figura 14.	Representación esquemática de la Región promotora de <i>LGALS9</i> ..	29
Figura 15.	Modelo de activación del promotor del gen hTERT de la telomerasa por la proteína E6 del VPH-16.	30
Figura 16.	Representación esquemática de vectores de expresión pcDNA3....	36
Figura 17.	Representación esquemática del vector pGL4.72.....	37
Figura 18.	Representación esquemática de las construcciones del promotor completo y el fragmento de 727 pb del gen <i>LGALS9</i>	38
Figura 19.	Efecto de E6 VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de ARNm, del gen <i>LGALS9</i> en la línea celular HaCaT.....	48

Figura 20.	Efecto de E6 de VPH-16 sobre la actividad del promotor del gen <i>LGALS9</i> en la línea celular HaCaT.....	49
Figura 21.	Efecto de E6 VPH-84 sobre la actividad del promotor del gen <i>LGALS9</i> en la línea celular HaCaT.....	50
Figura 22.	Efecto de E6-VPH-16 sobre la actividad del producto proteico galectina-9, en línea celular HaCaT.....	52
Figura 23.	Efecto de E6 VPH- 84 sobre la actividad del producto proteico galectina-9, en la línea celular HaCaT.....	54
Figura 24.	Diferencias entre las proteínas E6 de VPH-16 y VPH-84.....	55
Figura 25.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84.....	56
Figura 26.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.....	56
Figura 27.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman la secuencia de localización nuclear (NLS) de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Proteínas virales y funciones.....	9
Tabla 2.	Galectina-99 y sus receptores en la regulación de la respuesta inmune y la biología tumoral.....	24
Tabla 3.	Condiciones de transfección para evaluar el efecto de E6 sobre los niveles de ARNm del gen <i>LGALS9</i>	39
Tabla 4.	Secuencia de oligonucleótidos y el tamaño del producto de amplificación.....	41
Tabla 5.	Condiciones de transfección para evaluar el efecto de E6 sobre la actividad del promotor del gen <i>LGALS9</i> (2089 pb y 727 pb)	42
Tabla 6	Condiciones de transfección para evaluar el efecto de E6 sobre la expresión de galectina-9.....	45

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) ha sido reconocido a nivel mundial como un problema de salud pública. La infección persistente por los Virus de Papiloma Humano (VPH) se considera el agente etiológico asociado al desarrollo de CaCu. Los VPH que infectan el epitelio anogenital se clasifican en dos grupos de acuerdo con su potencial oncogénico: de bajo riesgo (VPH-BR) y de alto riesgo (VPH-AR). El VPH-16 es el genotipo de mayor prevalencia en el mundo y la principal causa de los cánceres asociados al VPH. El VPH-84 es un genotipo poco estudiado, que se considera de bajo riesgo y que presenta alta prevalencia en mujeres con citología normal. A nivel molecular, la progresión del cáncer se debe al aumento de la expresión de las proteínas virales E6 y E7, que activan el ciclo celular, inhiben la apoptosis y permiten la acumulación de daños en el ADN. Las proteínas E6 de VPH-AR tienen la capacidad de activar la transcripción de genes, tales como *hTERT* que codifica para la subunidad catalítica del complejo de telomerasa. En antecedentes del grupo de trabajo, partiendo de microarreglos de expresión, de células HaCaT transfectadas de manera estable con E6 de distintos genotipos, se encontró modificada la expresión del gen *LGALS9* que codifica para la proteína galectina-9, que es una lectina que contiene dos dominios de unión a carbohidratos no homólogos, que reconocen estructuras que contienen β -galactósidos. La Galectina 9 participa en la apoptosis de células cancerosas, promoción de la adhesión celular e inhibición de la metástasis sugiriendo, en la mayoría de los casos, un efecto protector contra el cáncer. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9*, los niveles de ARNm, y de la proteína galectina-9. Para ello se realizaron transfecciones transitorias en la línea celular HaCaT con plásmidos de expresión que contienen el marco de lectura de la proteína E6 del VPH-16 o del VPH-84. Para evaluar el efecto de las oncoproteínas E6 sobre la actividad del promotor se cotransfectó con plásmidos reporteros que contienen la región promotora del gen *LGALS9*. Las oncoproteínas E6 de los tipos de VPH-16 y VPH-84 incrementaron los niveles de ARNm del gen *LGALS9*, así como la actividad del promotor de dicho gen, este aumento podría ser consecuencia de su interacción con factores de transcripción como c-Myc o Sp1, ya que se ha demostrado que la unión de E6 a estos factores de transcripción puede potenciar su efecto sobre la expresión y sobre

la actividad del promotor de ciertos genes. La región promotora del gen *LGALS9* presenta sitios de unión tanto para Sp1 como para c-Myc. Por otro lado, se observó un aumento en los niveles de la proteína galectina-9 en presencia de E6 del VPH-16 no así en presencia de la E6 del VPH-84, este resultado deberá ser explorado en futuros estudios para determinar esta diferencia en el efecto observado. El presente estudio genera un precedente de cómo las oncoproteínas E6 de diferentes genotipos podrían modificar la expresión del gen *LGALS9* durante las infecciones por VPH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Cáncer cervicouterino

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es una neoplasia maligna que se produce a partir de la alteración de las células del cuello uterino o cérvix. Por lo general, progresa de manera lenta a lo largo del tiempo, manifestándose inicialmente como lesiones precursoras donde las células del cérvix sufren ciertos cambios conocidos como displasia que se convierten en células malignas. El cuello uterino es la porción final, inferior y estrecha del útero que conecta al útero con la vagina. Está formado por el orificio interno, el conducto endocervical, el endocérvix, el ectocérvix y el orificio externo. Recubierto por dos tipos de tejido: el epitelio escamoso, que recubre la vagina y la parte exterior del cuello uterino (ectocérvix), y el epitelio columnar glandular, que recubre el canal cervical y la parte interior del cuello uterino (endocérvix) (Figura 1). A la Unión entre el endocérvix y el ectocérvix se le denomina unión escamo columnar (UEC) [1].



Figura 1. Anatomía del aparato reproductor femenino. Está formado por 3 regiones principales: útero, cuello uterino o cérvix y vagina. El cuello uterino está formado por el orificio interno, el conducto endocervical, el endocérvix, el ectocérvix y el orificio externo. Además, en un recuadro se muestra una vista de cerca de la unión escamocolumnar [1].

La posición de la unión escamocolumnar cambia a lo largo de la vida, generalmente se desplaza hacia el interior del canal endocervical y se ve afectada por diversos factores, como la edad, el estado hormonal, la anticoncepción y los partos vaginales. A esta área también se le denomina zona de transformación, ya que es ahí donde se ha reportado que en la mayoría de los casos comienzan los cambios celulares anormales y el desarrollo del CaCu [2].

1.2. Epidemiología del Cáncer cervicouterino

Las enfermedades neoplásicas y en particular el CaCu han sido reconocidas a nivel mundial como un problema de salud pública. En el 2022, se estimó que más de 348 874 mujeres murieron de CaCu en todo el mundo, y se diagnosticaron más de 662 301 nuevos casos [3]. En países con índice de desarrollo humano medio y bajo (IDH), incluido México, el CaCu es la segunda neoplasia de mayor frecuencia. Sin embargo, a nivel mundial representa la cuarta causa de incidencia y mortalidad por cáncer en la mujer (Figura 2) [4].

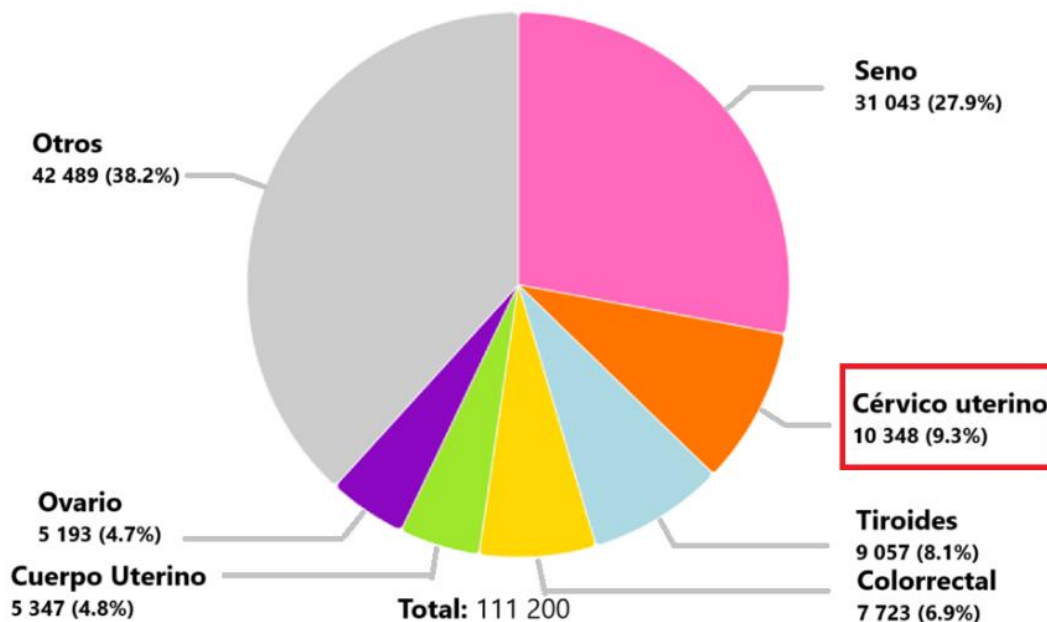


Figura 2. Estimación de Incidencia de CaCu en México GLOBOCAN 2022. Es la segunda neoplasia de mayor frecuencia por cáncer en la mujer reportando 10 348 nuevos casos (9.3%) en el 2022 [3].

1.3. Factores de riesgo

Existen muchos factores asociados al desarrollo de CaCu como son el tener actividad sexual de manera temprana (antes de los 16 años), múltiples parejas sexuales que se asocia con un mayor riesgo de infección por virus del papiloma humano (VPH), múltiples partos, uso prolongado de anticonceptivos orales, tabaquismo y ciertas deficiencias en la dieta. Sin embargo, una gran cantidad de estudios epidemiológicos, moleculares y experimentales realizados en la búsqueda de asociaciones causales ha demostrado que una infección persistente con algunos genotipos del VPH es el agente etiológico del CaCu [5,6,7].

La infección persistente por el VPH favorece el desarrollo de lesiones cervicales, que se clasifican de acuerdo con el Sistema Bethesda en dos etapas denominadas “lesión escamosa intraepitelial” (LEI) de bajo grado LEIBG y de alto grado LEIAG [8]. Existen hallazgos de que la progresión de LEIBG a LEIAG, precede a la formación del CaCu (Figura 3) [9].

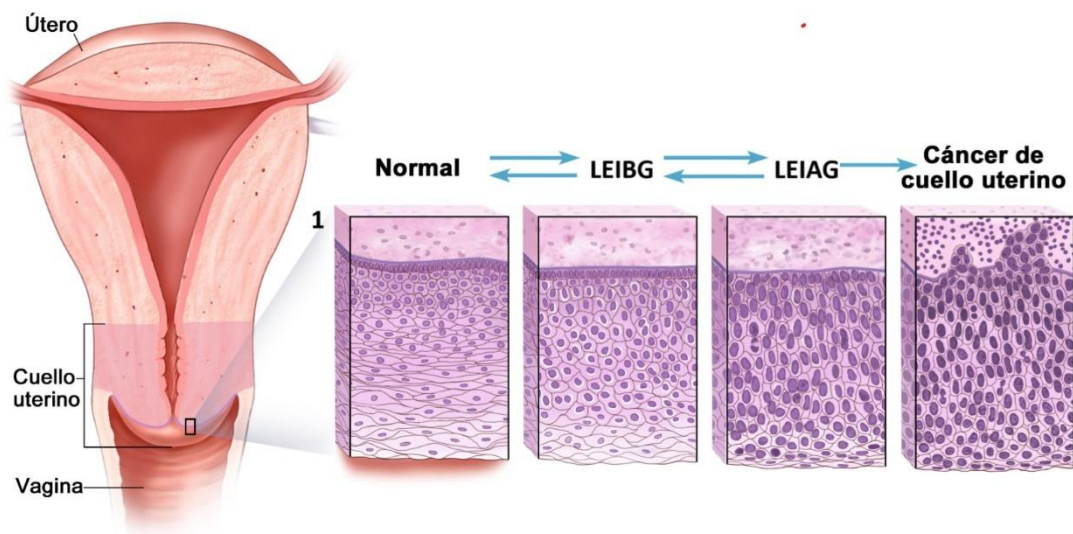


Figura 3. Evolución de las alteraciones del epitelio cervical en el desarrollo de CaCu. Se muestra un epitelio escamoso normal de cérvix y la progresión de lesiones intraepiteliales de bajo grado y alto grado (LEIBG y LEIAG), hasta evolucionar al CaCu. Se muestran los cambios en las diferentes capas del epitelio escamoso, como son las células estromales, células de la lámina basal, células parabasales, células de estrato intermedia, y células de estrato superficial [1].

Conocer la prevalencia de los genotipos de VPH en las diferentes etapas del desarrollo del CaCu es fundamental para evaluar varios aspectos de la salud pública y enfocar la investigación considerando los conocimientos generados. Esto permitirá determinar el riesgo oncogénico de genotipos VPH poco estudiados, desarrollar mejores estrategias de tamizaje, evaluar los programas de prevención y mejorar el diseño de vacunas.

1.4. Virus del Papiloma Humano

Los VPH, son virus no envueltos que tienen una cápside icosaédrica de aproximadamente 55 nm de diámetro. Su genoma es de ADN circular de doble hebra de aproximadamente 8 Kb de tamaño. Infeccionan los epitelios cutáneos y de las mucosas (Figura 4) [10].

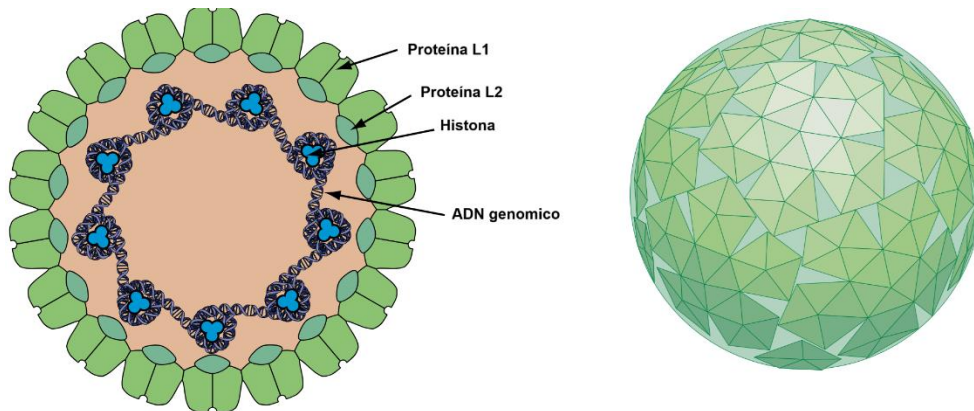


Figura 4. Representación esquemática de la estructura del VPH. Virus no envuelto. La cápside proteica tiene un 95% de proteína L1 y un 5% de proteína L2 y forman los 72 capsómeros pentaméricos. El ADN bicatenario de 8 kb, enrollado circularmente y asociado con proteínas similares a histonas [11]

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, son clasificados taxonómicamente según la identidad de la secuencia del gen que codifica la proteína L1, altamente conservada. Los VPH se clasifican en genotipos y a la fecha se han identificado 207. Actualmente se han definido cinco grupos evolutivos de genotipos de VPH, denominados: alfa, beta, gamma, mu y nu (α , β , γ , μ y ν), con diferencias de más del 60% en la identidad de secuencia del gen L1 [12]. De ellos, el grupo más grande es el grupo α . Este grupo contiene 64 genotipos de VPH que infectan principalmente los epitelios de las mucosas, 40 de estos VPH pueden infectar el tracto anogenital e incluyen los denominados de Alto

Riesgo “AR” (VPH-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -56, -58, -59, -68, -73, -82) que se han clasificado como oncogénicos y que causan cánceres anogenitales y los de Bajo Riesgo “BR” (VPH-6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72, -81, -84) relacionados con verrugas genitales y lesiones no malignas [13]. Los VPH del grupo β , infectan principalmente los epitelios cutáneos y se han identificado y caracterizado más de 50 genotipos [14]. La infección de VPH del grupo β , junto con la irradiación UV, se han relacionado con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, como los carcinomas de células escamosas no melanomas. Los VPH de los tres grupos restantes (γ , μ y ν) normalmente sólo causan enfermedades benignas [15].

Los VPH están asociados con las infecciones de transmisión sexual más prevalentes en todo el mundo. El VPH-AR más prevalente es el VPH-16, y se ha relacionado con aproximadamente el 55% de los tumores de CaCu, el VPH-18 está presente en aproximadamente el 15% de los casos y el resto están vinculados con los demás genotipos de VPH-AR [13].

En un estudio realizado en 822 mujeres mexicanas de 18 a 87 años se determinó la prevalencia y distribución de genotipos de VPH, el VPH-16 fue el tipo más prevalente en todos los grupos de diagnóstico. Los tipos de VPH encontrados con mayor frecuencia en cánceres cervicales fueron los VPH-16, -18, -45, -52, -58 y -39. Las coinfecciones ocurrieron con mayor frecuencia en controles (63%). Los tipos virales más frecuentes en coinfección con VPH-16 en mujeres control fueron VPH-62, -51 y -84 [16].

El VPH-84 presenta alta prevalencia en mujeres con citología normal. Un análisis de similitud de secuencias del gen L1 mostró una relación muy estrecha con genotipos de bajo riesgo como el VPH-61 (89%), VPH-72 (86%) y el VPH-83 (85%) [17]. Así mismo, se ha reportado que la infección con el VPH-84 tiene periodos de infección más cortos que otros genotipos virales, lo que sugiere que se elimina con mayor facilidad teniendo menor probabilidad de asociarse al desarrollo de cáncer; sin embargo, esto no descarta que VPH-84 tenga un papel en la progresión maligna [18].

1.4.1 Genoma viral de VPH

El genoma puede dividirse en tres secciones funcionales, la región temprana (early E) que codifica al menos seis proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6, E7) que tienen funciones reguladoras en la célula epitelial infectada, la región tardía (late L) que codifica las dos proteínas estructurales víricas L1 y L2, que forman la cápside viral, y la Región larga de Control por sus siglas en inglés long control region (LCR) también llamada región reguladora ascendente (Upstream regulatory region URR) (Figura 5). La LCR no codificante, contiene las secuencias reguladoras virales de acción cis que controlan la replicación y la transcripción virales, así como el control postranscripcional a través del elemento regulador tardío (LRE). El genoma está encapsulado en una cubierta icosaédrica que comprende 360 copias de la proteína L1 organizadas en capsómeros pentaméricos que probablemente tienen una copia de L2 en el centro (Tabla 1) [19].

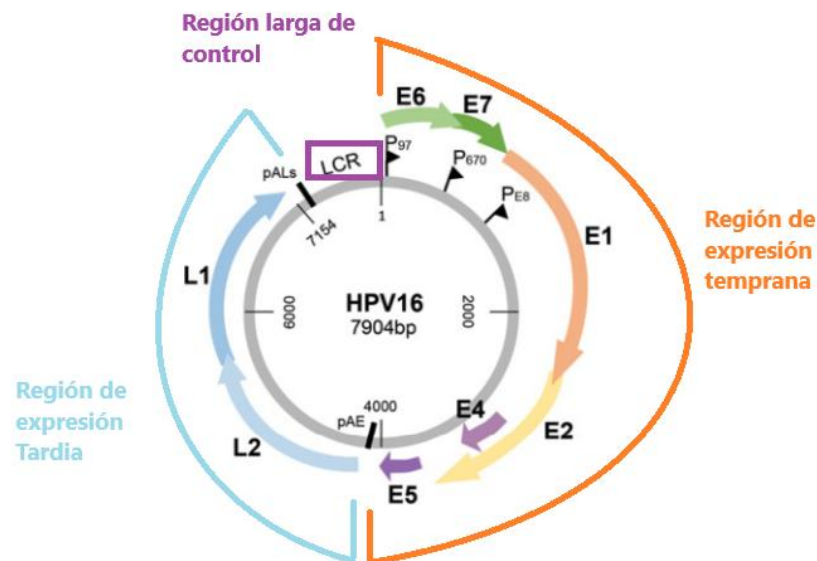


Figura 5. Representación esquemática del genoma del VPH-16. Genoma circular del VPH que contiene las 3 regiones funcionales: una región de expresión temprana (E), una región de expresión tardía (L) y una Región Larga de Control (LCR). Los ORF virales se indican con flechas de colores sobre el genoma. Los promotores se indican con la letra P, así como por números (P97, P670, PE8). Se representan los sitios de poliadenilación temprana y tardía (pAE y pAL), para los genes tempranos y tardíos, respectivamente [20].

Tabla 1. Proteínas virales y funciones [19].

Proteína	Función
E1	Función de Helicasa. Participa en la replicación y transcripción del genoma viral.
E2	Coactivador de la replicación del genoma viral mediante el reclutamiento de E1 al origen de replicación. Regulador transcripcional de la expresión de E6 y E7.
E4	Regulación del ciclo celular. Remodelación de queratinocitos diferenciados, interacción con el citoesqueleto y remodelación de citoqueratinas para permitir la liberación de las partículas virales.
E5	Oncoproteína. Señalización de queratinocitos, interacción con receptores de factores de crecimiento y evasión inmunitaria.
E6	Oncoproteína. Degradación de p53, alteración de la regulación del ciclo celular, resistencia a la apoptosis, inestabilidad cromosómica e inmortalización celular (<i>hTERT</i>).
E7	Oncoproteína. Degradación de pRB (proteína de retinoblastoma), altera la regulación del ciclo celular. Inestabilidad genómica.
L1	Proteína mayor de cápside. Forma los 72 capsómeros pentámeros.
L2	Proteína menor de cápside. Recluta el genoma viral episomal para organizarlo en la cápside.

1.4.2 Ciclo viral

El establecimiento del virus en el tejido requiere de la infección de los queratinocitos basales, el VPH puede infectar a las células de la lámina basal del epitelio cervical por medio de microabrasiones. La proteína de cápside L1 se une a receptores celulares, los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) son considerados el principal receptor para la unión inicial con la membrana celular, lo que produce un cambio conformacional en la cápside viral, que permite la entrada a la célula mediante endocitosis dependiente de clatrina, mediada por receptor (Figura 6) [21].

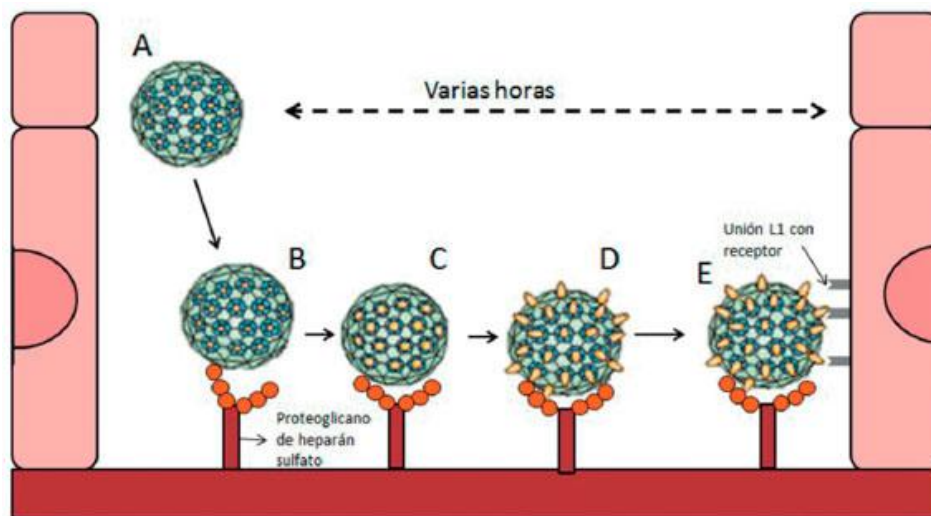


Figura 6. Proceso de infección del VPH en el cuello uterino. A) Entrada del virión a la zona basal del epitelio. B) Unión del virión con los proteoglicanos de heparán sulfato disponibles en la membrana basal. C y D) Cambio conformacional de las proteínas L1 (espículas amarillas) para facilitar su unión al receptor. E) Unión del virión con el queratinocito basal [21].

Después de entrar en la célula es transportado por componentes citoplasmáticos unidos a la membrana y a la red trans-Golgi, posteriormente a través de una vía mediada por la tubulina el genoma viral es transportado al núcleo donde puede ingresar a través de los poros nucleares formados durante la ruptura de la membrana nuclear en el proceso de mitosis de las células basales [22].

Tras la entrada al núcleo en las células en división de la capa basal o ectocérvix se inicia la transcripción temprana de los genes virales. El primer objetivo del virus es llevar a cabo la replicación de su genoma, expresando los factores de replicación/transcripción viral E1 y E2. E2 se une a E1, que a su vez se une como un hexámero de dímeros al origen de replicación viral y recluta la maquinaria de replicación celular. La replicación inicial de un genoma de VPH genera aproximadamente 50-100 copias episomales (no integrado al cromosoma celular) por núcleo [23]. Las proteínas virales se expresan a niveles bajos en las células basales infectadas para evitar la activación de la respuesta inmune local, de este modo, el VPH es capaz de mantener la infección de las células epiteliales durante un periodo de tiempo significativo. La división de una célula epitelial basal infectada puede producir una célula amplificadora del tránsito que es capaz de diferenciarse y pasar a las capas epiteliales superiores. Estas células llevan consigo los genomas virales a medida que se desplazan por las capas celulares a la parte superior del epitelio [24].

El genoma de los VPH posee un promotor temprano que es responsable de la expresión de los genes que codifican las proteínas de las fases tempranas del ciclo de replicación [18]. Entre ellas se encuentran las oncoproteínas virales E6 y E7 que han sido ampliamente estudiadas y se sabe que su expresión es esencial para el ciclo viral normal del VPH. E6 es necesaria para el mantenimiento extracromosomal del genoma viral [25]. La expresión de E7, al principio de la infección, activa la progresión del punto de control de la fase G1 a la S en queratinocitos que normalmente sufrirían una diferenciación terminal. E7 activa el ciclo celular de las células infectadas y el proceso de diferenciación [26]. E7 siempre está presente con E6 en las células infectadas debido a la naturaleza bicistrónica del ARNm codificante E6/E7 en VPH-AR. Por lo tanto, las actividades de cualquiera de las dos proteínas se verán afectadas por la otra y está claro que a menudo actúan de forma cooperativa, para evadir la respuesta inmunológica [27].

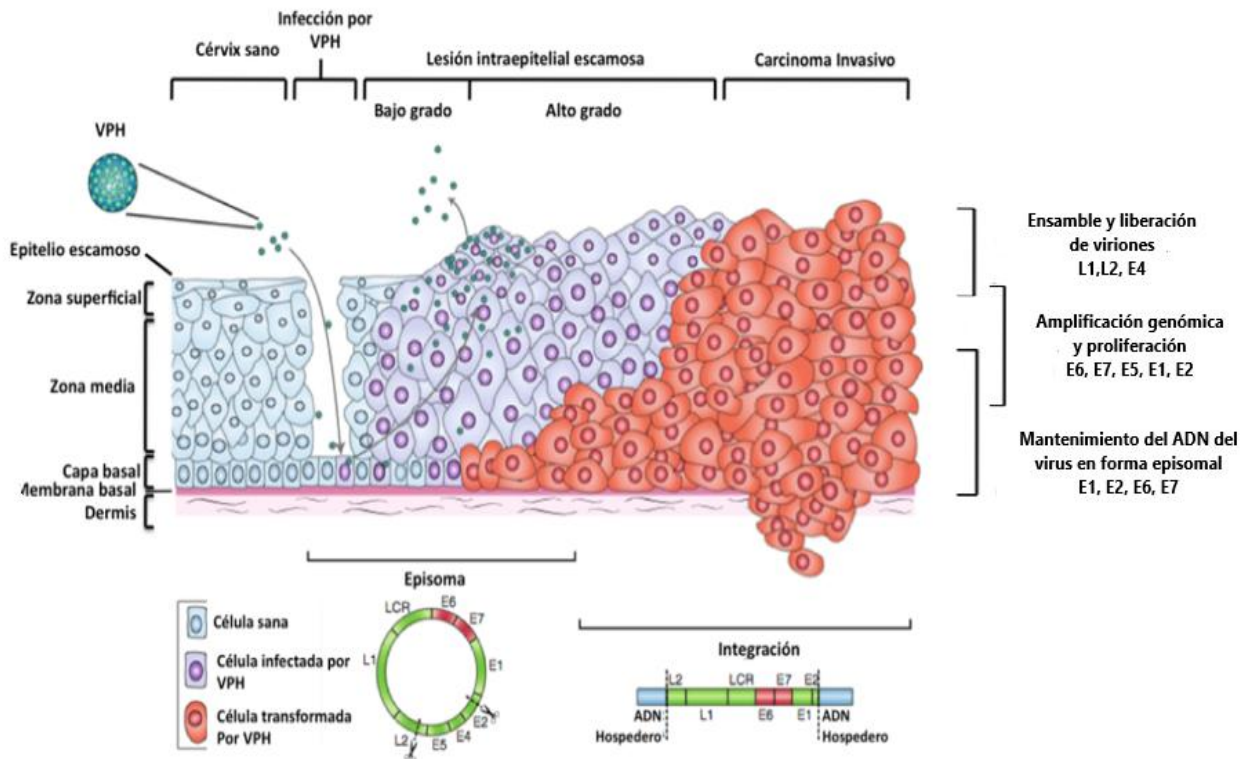
La fase tardía del ciclo de vida viral implica la replicación del ADN viral y, la formación de virión en la célula. Debido a cambios en la señalización celular, se da la activación del principal promotor tardío viral, que está situado en la región del gen E7. Esto da lugar a un aumento de la expresión, no solo de E1 y E2, sino también de E4 y E5 [19]. E4 tiene la función de contribuir a la eficiencia en la replicación del genoma viral al regular el

arresto del ciclo celular en la fase G2 [28]. E5 es una proteína transmembrana residente en el Retículo Endoplásmico (RE) que puede estabilizar el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y estimular la actividad de la proteína quinasa activada por patógenos (MAPK), lo que sugiere que puede controlar las vías de división celular [29].

E1 y E2 crean conjuntamente fábricas de replicación viral que contienen una amplia gama de proteínas de reparación de daños en el ADN y es probable que esto facilite la replicación del genoma viral en la fase tardía [30]. Se ha demostrado que E7 se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores (pRB), afectando la expresión de genes de la fase S por interacción directa con factores de transcripción, contribuyendo a la amplificación del genoma viral en queratinocitos diferenciados [31].

Tras la amplificación del genoma viral y la síntesis de la proteína de la cápside, la formación del virión tiene lugar en el núcleo. L2 se sintetiza antes que L1 y se transporta al núcleo. Las proteínas L1 se auto ensamblan en capsómeros pentaméricos, en el citoplasma y estas estructuras son transportadas al núcleo [32]. Así, los genomas virales se localizan adyacentes a proteínas de la cápside viral listas para el ensamblaje. L2 parece ser necesario para el empaquetamiento eficiente del ADN y el ensamblaje del virión. Los viriones completamente formados se liberan de los queratinocitos muertos que se desprenden de la superficie epitelial. Los viriones libres pueden sobrevivir durante algún tiempo en el entorno y normalmente reinfectan las células en los lugares adyacentes a donde se liberan [33].

En las células infectadas, el genoma del VPH puede permanecer en el estado episomal. La infección por estos virus puede ser persistente y mantenerse en las células basales. Cuando esto ocurre, el genoma viral puede integrarse al genoma de la célula. En las etapas tempranas de la infección la proteína E2 reprime la expresión de los genes E6 y E7, sin embargo, cuando el genoma viral se integra al genoma celular, se interrumpe el marco de lectura del gen E2 lo que provoca la pérdida de la síntesis de su proteína, y por tal motivo, la expresión de las proteínas E6 y E7 se incrementa, favoreciéndose los procesos de immortalización, transformación y desarrollo de CaCu (Figura 7) [34].



Sobreexpresión de la proteína E6 y E7

Figura 7. Ciclo biológico e historia natural de la infección persistente por el VPH. El virus del papiloma humano penetra a las células de la lámina basal a través de microlesiones. Después de la infección viral, los genes tempranos E1, E2, E5, E6 y E7 se expresan y el ADN viral se replica a partir de ADN episomal (núcleos morados). En las células de la zona media y superficial el genoma viral se replica aún más, los genes tardíos L1, L2 y E4 se expresan. L1 y L2 forman la cápside para los nuevos viriones en el núcleo. La liberación de nuevos viriones puede re-infectar el epitelio. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado mantienen la replicación productiva. La progresión de las lesiones a cáncer invasor se asocia con la integración del genoma del VPH al genoma de las células hospedadoras (núcleos rojos). Esto produce la disrupción o pérdida de E2 y aumenta la expresión de los oncogenes E6 y E7 [35].

1.5. Oncoproteína viral E6

La transformación de las células epiteliales infectadas por el VPH depende de la expresión de las proteínas virales E6/E7. En los VPH-AR estos genes se encuentran en el mismo marco de lectura abierto (ORF) y se transcriben como un transcrito bicistrónica único E6/E7 regulado por el promotor temprano. El gen E6, de aproximadamente 450 a 500 pb, codifica una proteína de alrededor de 150 aminoácidos, con un peso molecular de 16 a 18 kDa, el tamaño y la secuencia varía entre genotipos virales [36].

1.5.1. Dominios de dedos de zinc

La proteína E6 contiene cuatro motivos CXXC, que forman dos regiones de unión al zinc. Se ha demostrado que un número de proteínas E6 de los VPH enlazan el zinc a través de la coordinación de residuos de cisteínas. Cada dominio de la proteína E6 consiste en tres láminas beta (S1, S2, S3), dos hélices cortas (H1, H2) y una hélice orientada hacia el extremo C terminal (H3) (Figura 8). Estos patrones se conservan consistentemente en cada proteína E6, y su integridad es crucial para el correcto funcionamiento de esta proteína oncogénica [37].

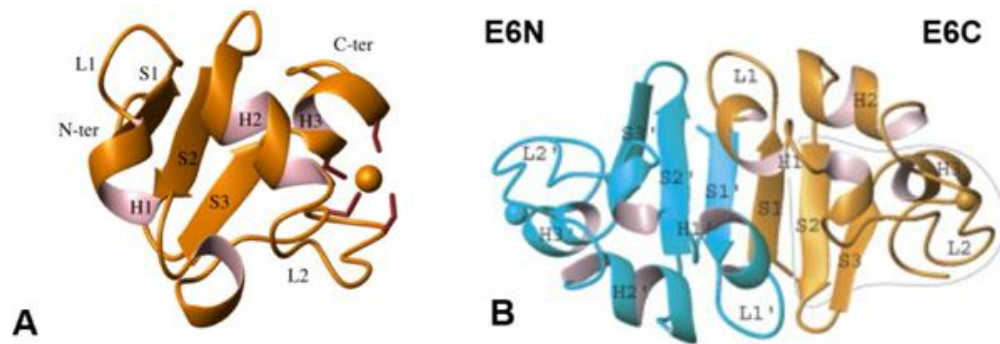


Figura 8. Representación en listones de los dominios de dedos de zinc de E6 VPH-16. A) Se muestra el dominio formado por 3 laminas beta (S1, S2, S3) y 3 hélices cortas (H1, H2, H3). B) Los dos dominios están separados por una corta región conectora de aproximadamente 35 aminoácidos y se enfrentan entre si simétricamente [37].

1.5.2. Bolsillo de unión a motivos LXXLL

Los dos dominios de dedos de zinc, junto con la alfa hélice que los conecta, forman una bolsa hidrófoba que le confiere la capacidad de reconocer el motivo helicoidal LXXLL presente en diferentes proteínas celulares (Figura 9) [38].

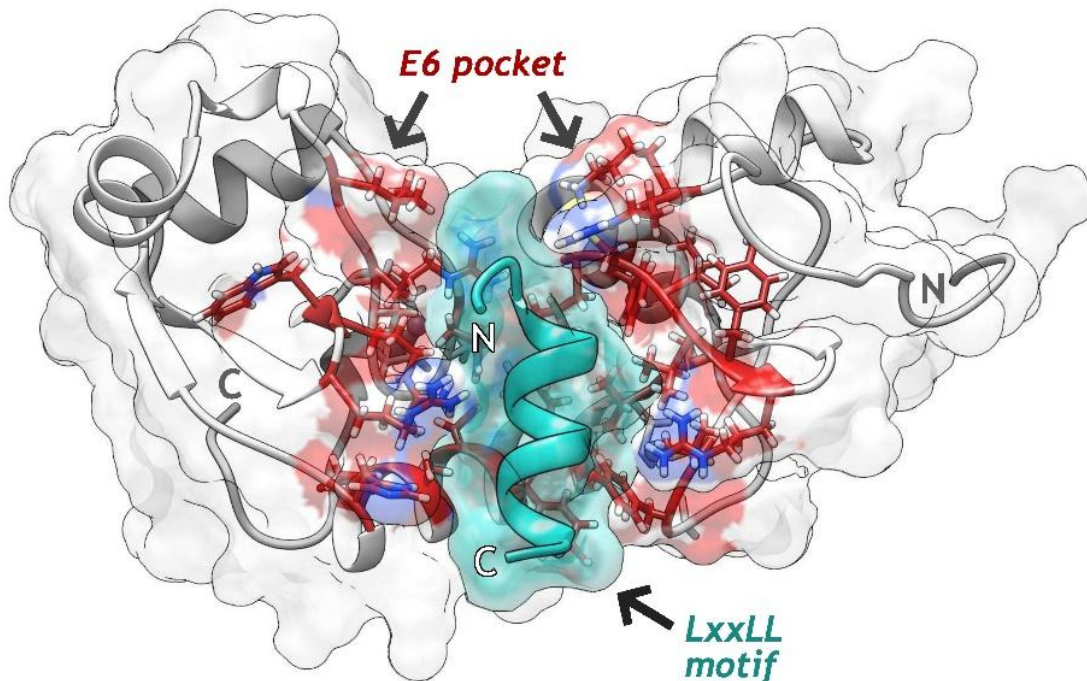


Figura 9. Estructura del modelo de homología de la proteína E6 de VPH-16. Se muestra la interacción de un surco entre dominios que actúa como bolsillo de unión al motivo helicoidal LXXLL (verde) [38].

En el caso de la interacción de E6 con la proteína E6AP ubiquitinaligasa, el bolsillo E6 reconoce el motivo helicoidal LXXLL del dominio HECT de la E6AP, que a su vez recluta a p53 para establecer el complejo de degradación de p53 [39].

Estos motivos LXXLL son hélices anfipáticas ricas en leucina con sustitución limitada de residuos hidrófobos por leucinas y al menos una carga negativa en una posición X. La secuencia de E6AP que interactúa con E6 es ELQEELLGE. La unión a proteínas con un motivo LXXLL es una propiedad conservada de las proteínas E6 de numerosos papilomavirus, ya que E6AP se une a los VPH del género σ de alto y bajo riesgo, al menos algunos VPH del género β y al virus del papiloma bovino tipo 1 [40].

1.5.3. Motivo de unión a PDZ

Todas las proteínas E6 de los VPH-AR tienen un motivo de unión a PDZ (PBM PDZ-Binding motif) de clase I, que se encuentra en su extremo C-terminal. Los dominios PDZ son dominios de interacción proteína-proteína de aproximadamente 90 aminoácidos [41]. La especificidad de la interacción PDZ es un factor importante en el reconocimiento del objetivo E6-PDZ, y diferentes proteínas E6 interactúan preferentemente con diferentes proteínas que contienen el dominio PDZ (Figura 10) [42]. Por ejemplo, E6 VPH-18 se une más fuertemente que E6 VPH-16 a Dlg1 (Disc Large 1) y MAGI-1 (proteína fundamental para el andamiaje celular) [43, 44, 45]. Por el contrario, E6 VPH-16 se une a hScrib más fuertemente que E6 VPH-18 y esto también es dependiente de la secuencia PBM. Estas proteínas están involucradas en la regulación de la polaridad celular epitelial, enfatizando la importancia de esta vía tanto para la replicación viral como para la malignidad [46].

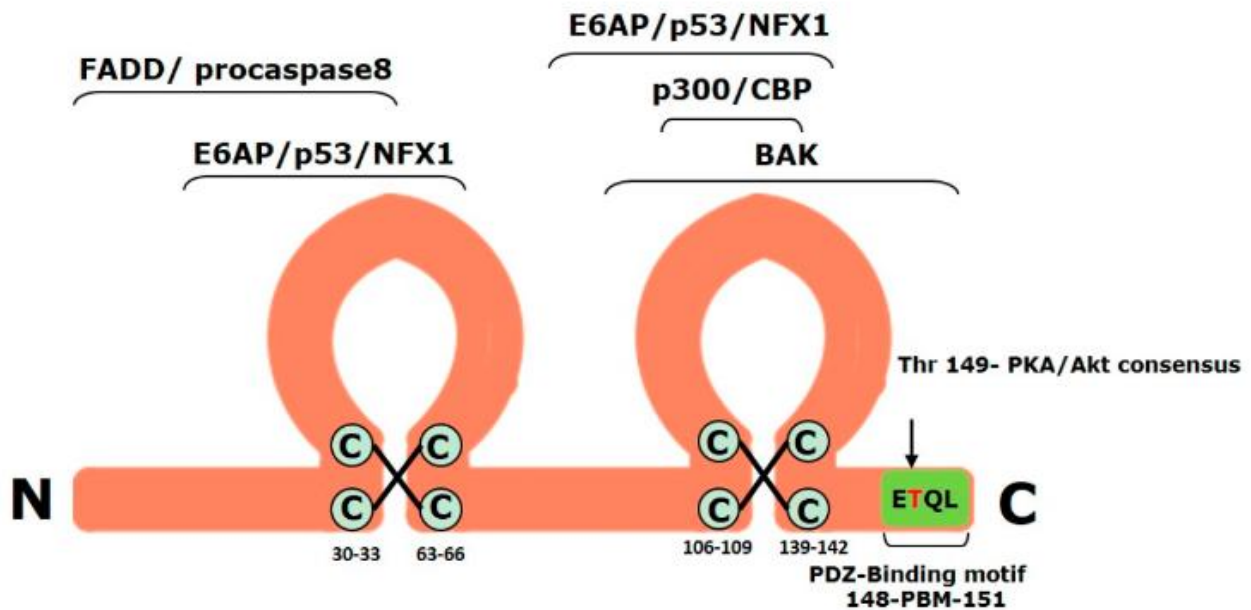


Figura 10. Diagrama esquemático de E6 de VPH-16. Se muestra la posición de los motivos de aminoácidos que son importantes para la integridad y función de la proteína. Se muestran los dos dedos de zinc junto con las regiones que están involucradas en la interacción con algunas de sus proteínas diana celulares. Se muestra el motivo de unión a PDZ (PBM) en el extremo C-terminal y también se indica el sitio de fosforilación de PKA [47].

1.5.4. Secuencias de localización nuclear

En el núcleo, la oncoproteína E6 también puede interactuar con varias proteínas nucleares y coactivadores además de proteínas citoplasmáticas, como son los factores de transcripción p53 y c-Myc, los coactivadores CBP y p300, y el activador transcripcional IRF-3, participando así en el proceso de transformación celular [47].

Se ha descrito que E6 posee 3 señales de localización nuclear (NLS, NLS2 Y NLS3). Estas señales son generalmente secuencias cortas ricas en aminoácidos básicos, como lisina y arginina, que son reconocidas por el complejo de transporte nuclear, así E6 de VPH-16 puede ingresar a los núcleos de las células huésped a través de vías mediadas por Kap $\alpha\beta$ 1, Kap β 1 y Kap β 2. Algunos estudios revelaron que las Kap β s/importinas cumplen una doble función como receptores de importación nuclear y chaperonas citoplasmáticas para dominios básicos expuestos de proteínas básicas como las proteínas ribosómicas y las histonas [48]. La interacción de E6 VPH-16 con Kap β s podría desempeñar un papel dual tanto en la importación de la oncoproteína E6 como en la prevención de su agregación en el citoplasma al proteger su región NLS C-terminal básica [49].

La comparación de las secuencias de las NLS de E6 del VPH-16 con las secuencias correspondientes de otros VPH muestra que está parcialmente conservada con la del VPH-18 y no conservada en los VPH-6 y -11 [49].

1.6. Efectos de E6 en los queratinocitos infectados.

Hasta la fecha no se ha reportado actividad enzimática para E6, sin embargo, todos los dominios de unión antes descritos, le confieren la capacidad de involucrarse efectivamente con un amplio espectro de proteínas, ejerciendo así su influencia sobre múltiples vías celulares [50].

1.6.1. Inhibición de la apoptosis

La ubiquitina ligasa celular E3 también llamada Proteína asociada a E6 (E6-AP) es el objetivo más estudiado de la oncoproteína E6 de los VPH-AR. E6 interactúa a través de los motivos LXXLL con E6-AP, y posteriormente se unen a p53, creando un complejo heterotrimérico E6/E6AP/p53, que transfiere péptidos de ubiquitina que desencadenan la

degradación de p53 al dirigirla a la proteasoma 26S, lo que resulta en la evasión de la apoptosis [51, 52]. El supresor de tumor p53 es un factor de transcripción sitio-específico del ADN y uno de los coordinadores de la señalización celular, éste es un factor clave en la célula, tras un estrés genotóxico o citotóxico [53]. Normalmente p53 se encuentra en bajos niveles y transcripcionalmente inactivo, el daño celular desencadena un incremento en las concentraciones de la proteína p53 y la activación de la vía postraduccional. Una vez activado, p53 inicia las vías para la reparación del ADN, el ciclo celular se detiene y toma la vía de apoptosis basado en el grado del daño sobre ADN. Además de los daños genotóxicos y citotóxicos, p53 es también activada por la síntesis incorrecta del ADN, como la inducida durante la infección por el VPH [54].

Además, al cambiar la actividad de las enzimas modificadoras de p53, E6 previene el arresto del ciclo celular mediado por p53. E6 se une a p300 en varias ubicaciones y evita que p300 transactive p53 y también degrada la enzima hADA3, que puede acetilar la proteína p53. Para reducir la actividad y estabilidad de p53, la mantiene en el citoplasma enmascarando su señal de localización nuclear, evitando así que controle la transcripción génica dentro del núcleo. Además, E6 tiene la capacidad de dirigirse a otras moléculas que desempeñan un papel en la activación de varias vías de muerte como la proteína proapoptótica procaspasa 8 (CASP8), Bak, receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) y la molécula adaptadora FADD (Fas-associated death domain). E6 acelera la degradación de la procaspasa 8 y previene la apoptosis mediada por TNF (Factor de necrosis tumoral) al unirse a TNFR1 e inhibe la vía de muerte desencadenada por Fas/ligando para suprimir la apoptosis (Figura 11) [55, 56, 57, 58]. E6 también activa NF- κ B, que puede desencadenar la transcripción de proteínas que inhiben la apoptosis, como el inhibidor celular de apoptosis 2 (ciAP-2) [59].

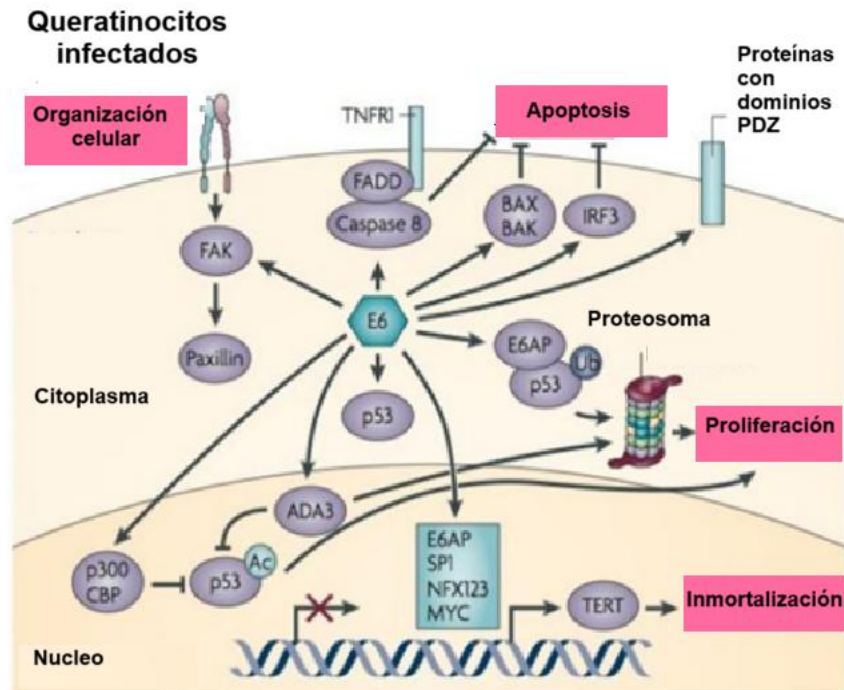


Figura 11. Esquema de algunas vías de interacción de la oncoproteína E6 del VPH en los queratinocitos infectados. La expresión de la oncoproteína E6 favorece el proceso de transformación maligna, a través la interacción con: a) proteínas involucradas en la replicación del ADN (p300/CBP, ADA3) que inhiben la transcripción de genes de respuesta a p53 que promueven la proliferación; b) proteínas involucradas en la organización y diferenciación celular como paxilina, FAK; c) proteínas involucradas en la adhesión celular, polaridad y control de la proliferación que tienen dominios PDZ; d) proteínas que previenen la apoptosis CASP8, FADD, BAK; e) proteínas que participan en la expresión de genes como los factores de transcripción Sp1, c-Myc, NFX123 y promueven la inmortalización [60].

1.6.2. Modulación de la inmunidad innata

E6 reduce la respuesta inmunológica a la infección por VPH al regular negativamente el factor regulador de interferón 3 (IRF-3), que es un factor de transcripción del interferón β (IFN- β) [61]. Además, E6 bloquea la interacción entre el interferón α (IFN- α) y su receptor, lo que lleva a una replicación prolongada del VPH, al suprimir la fosforilación de la tirosina quinasa 2 (TYK2) [62]. Además, la regulación negativa del interferón- κ (IFN- κ) por E6, disminuye el transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) y el receptor tipo Toll-3 (TLR3) [63, 64].

1.6.3. Alteración de microARN

Un mecanismo de regulación epigenética de los microARN consiste en la metilación del ADN de los promotores de genes que influyen en la expresión de estos microARN. E6 es esencial para controlar los microARN vinculados a la regulación del ciclo celular. Por ejemplo, la reducción de miR-34a conduce a la sobreexpresión de p18Ink4c y la entrada en la fase S [65, 66]. Además, E6 reduce la cantidad de miR-23b, un microARN asociado con la migración celular a través del gen activador del plasminógeno de la uroquinasa [67, 68]. Al reducir los niveles de miR-218, E6 regula la expresión de la subunidad beta-3 de la laminina (LAMB3), una proteína necesaria para el crecimiento y el movimiento celular [69].

1.6.4. Inhibición de la supresión tumoral

La proteína supresora tumoral p21 desencadena el arresto del ciclo celular en el punto de control G1/S al actuar como un inhibidor general de los complejos ciclina/quinasa dependiente de ciclina (CDK) y de la replicación del ADN. La proteína p53 controla transcripcionalmente la producción de p21 [70]. Cuando el ADN está dañado, la acumulación de p53 da como resultado mayores cantidades de p21, lo que causa una detención G1 y permite la reparación del ADN antes de la replicación. Por lo tanto, E6 obstaculiza la acumulación de proteína p21 en células con daño en el ADN al degradar a p53 a través de la vía del proteasoma y suprimir la transcripción de p21, lo que permite el crecimiento celular continuo [71].

1.6.5. Efecto de E6 en la expresión de genes

Las proteínas E6 de VPH AR tienen la capacidad de activar la transcripción del gen *hTERT* que codifica para la subunidad catalítica del complejo de telomerasa [72].

Durante el desarrollo temprano del CaCu las modificaciones del ADN que generalmente se observan son la hipometilación del ADN global en regiones repetitivas y la hipermetilación en las regiones de la isla CpG de los promotores de genes supresores de tumores. La oncoproteína E6 modula la expresión de muchas proteínas involucradas en la regulación epigenética, incluidas las metiltransferasas de ADN, las enzimas

modificadoras de histonas y las subunidades de complejos de remodelación de cromatina, lo que influye en el proceso de transcripción de los queratinocitos [72].

Esto lleva a pensar que las E6 de diferentes genotipos de VPH pueden tener efectos diferentes durante el proceso de transformación maligna a través de la regulación de genes implicados en eventos de diferenciación celular [73].

1.7. Galectinas

Las galectinas son una familia de lectinas solubles expresadas en animales, actualmente se han identificado 15 galectinas en mamíferos y 11 se encuentran en humanos. Este grupo de proteínas se caracterizan por tener un dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD por sus siglas en inglés carbohydrate-recognition domains) que se encuentra conservado evolutivamente [74]. El CRD consta de aproximadamente 130 aminoácidos. Está formado por dos láminas β antiparalelas que forman un bolsillo β -sándwich que alberga aminoácidos altamente conservados que son críticos para la unión de azúcares [75]. Se unen específicamente a la galactosa β -enlazada a la N-acetil glucosamina (Gal β 1-4GlcNAc), que es el ligando mínimo requerido para una galectina [76].

Con base en el número y asignación de CRD, las galectinas se clasificaron en 3 grupos: a) Prototipo, que contienen solo un CRD, se sintetizan como monómeros, pero pueden dimerizarse por unión no covalente (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15), b) De tipo repetición en tándem, que son heterodímeros formadas por dos CRD distintos con capacidades individuales de unión de azúcar, están unidos por un péptido conector de 5 a 50 aminoácidos (galectina-4, -6, -8, -9 y -12) y, c) De Tipo quimera, que contiene un solo CRD que está unido a un dominio N-terminal (no lectina), rico en prolina y pueden formar pentámeros (galectina-3) (Figura 12) [77].

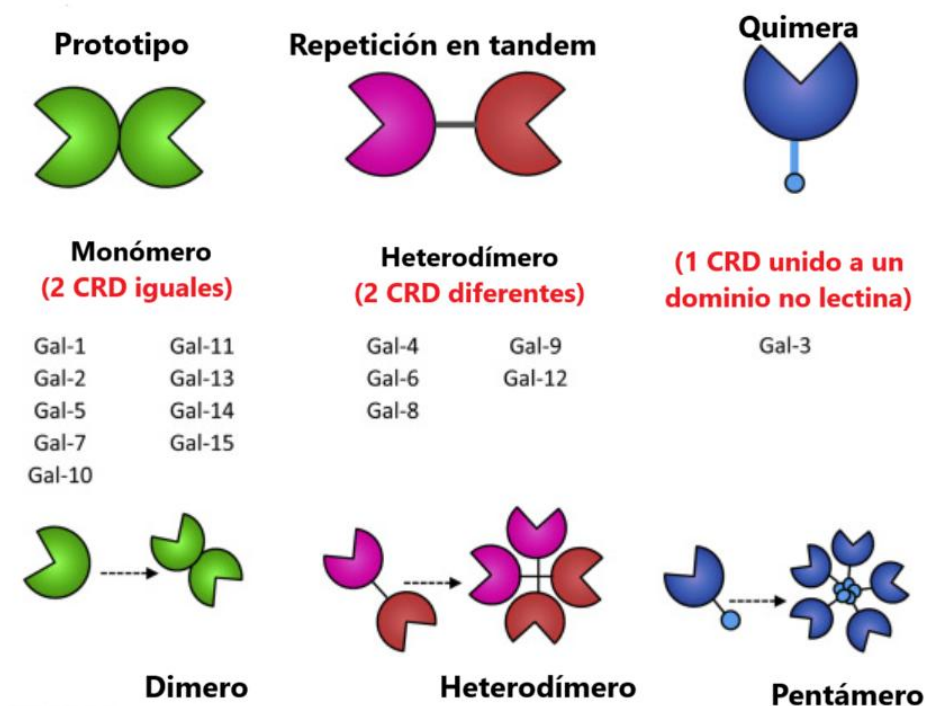


Figura 12. Esquemas de estructuras modulares de las galectinas. Actualmente, existen 15 galectinas identificadas y clasificadas en tres tipos principales: Prototipo, repetición en tándem y tipo quimera. Sus estructuras se muestran en monómero, dímero, heterodímero y pentámero cuando interactúan con glicanos [78].

Pueden unirse a glicoproteínas y glicolípidos presentes en la membrana celular y así ejercer sus funciones. Se sabe que las galectinas existen como multímeros y se entrecruzan entre sí, formando sus características redes de galectina-glicano. Son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol, donde regulan eventos intracelulares al participar en interacciones proteína-proteína. Posteriormente son translocadas a núcleo, donde participan en la estabilización de las interacciones proteína-DNA para promover la transcripción, o pueden ser secretadas a la matriz extracelular. Son secretadas por vía no clásica, es decir se acumulan en polisomas libres en el citosol y se liberan directamente fuera de la célula a través de vesículas o exosomas. En la superficie celular las galectinas se pueden localizar en las balsas lipídicas. Todas estas interacciones le permiten participar en una amplia gama de funciones biológicas como la inflamación, las respuestas inmunes innatas y adaptativas, las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular y la señalización descendente [79].

1.8. Galectina-9

La galectina-9 es una proteína que ha adquirido gran importancia porque se ha visto alterada su expresión en diferentes tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios, ya que sus funciones pueden influir en la progresión de estas condiciones.

1.8.1. Estructura molecular de galectina-9

La galectina-9 es codificada por el gen *LGALS9* ubicado en el cromosoma 17, brazo largo en el locus 11.2 (17q11.2) en humanos. Originalmente fue reconocida como un potente agente quimiotáctico de eosinófilos, se expresa en una gran variedad de tejidos como: el hígado, el intestino delgado, el timo, los pulmones, el bazo, riñones y otros órganos [80]. Pertenece a la subfamilia de repetición en tándem con un PM de 34 – 39 kDa con dos CRD distintos, conservados evolutivamente y unidos por un dominio de enlace, como se señaló anteriormente. Dado que el ARNm puede sufrir un proceso de corte y empalme alternativo, se han identificado tres isoformas de la proteína con longitudes variables en los péptidos de enlace, se ha reportado que dependiendo del tipo celular se pueden expresar una, dos o las tres isoformas [81]. La regulación característica del corte y empalme alternativo da lugar a una amplia gama de funciones biológicas en diferentes tipos de células, desempeñando un papel fundamental en la conformación de fenotipos celulares y procesos fisiológicos [82].

1.8.2. Distribución de galectina-9

En las células humanas, galectina-9 se localiza principalmente en el citosol. Se expresa en casi todos los sistemas orgánicos, y sus niveles de expresión de proteína y ARN varían. La proteína y el ARN codificados por el gen *LGALS9* se han detectado en gran medida en la médula ósea y los tejidos linfoides. A nivel de proteína, galectina-9 se ha detectado en el cerebro, pulmón, tejido endocrino, tracto gastrointestinal, hígado, vesícula biliar, riñón, vejiga urinaria, tejidos masculinos, tejidos femeninos y tejido muscular. A nivel de ARN, se expresa relativamente alto en la sangre [83].

1.8.3. Función fisiológica de galectina-9

Numerosos estudios han demostrado que galectina-9 es un elemento esencial para conservar las funciones fisiológicas normales del cuerpo. Tiene un rol importante en el crecimiento y desarrollo, angiogénesis, estabilidad del sistema nervioso central, homeostasis de células T, mantenimiento de homeostasis hepática, regulación de lisosomas y autofagia, y mantenimiento de la estabilidad intestinal [84]. Galectina-9 es una proteína abundantemente expresada en las células del sistema inmunológico, participando en la regulación de diversas funciones fisiológicas normales como el mantenimiento y regulación de la respuesta inmune [85].

1.8.4. Receptores de galectina-9.

La galectina-9 puede ejercer sus funciones a nivel extracelular e intracelular. Puede interactuar con diversas proteínas de la matriz extracelular y ligandos de la superficie celular (Tabla 2) [86].

Tabla 2. Galectina-9 y sus receptores en la regulación de la respuesta inmune y la biología tumoral [87].

Receptor	Célula diana	Función biológica
Tim-3	Células dendríticas monocitos	Promoción de la maduración
Tim-3	Células T	Agotamiento o apoptosis
Tim-3	Células asesinas naturales	Regulación de la función celular en la interfase materno fetal al comienzo del embarazo
PD-1	Células T	Supresión de la apoptosis de células T inducida por Gal-9/TIM-3

Dectina 1	Macrófagos	Programación de macrófagos y supresión inmunitaria adaptativa
CD206	Macrófagos	Impulsar la angiogénesis y producir quimiocinas para apoyar el crecimiento tumoral
CD40	Células T	Supresión de la proliferación e inducción de la muerte celular.
4-1BB	Células T	Transducción de señales y control de la actividad funcional.
VISTA	Células T	Apoptosis
DR3	Células T reguladoras	Facilitar la actividad de DR3 con respecto a la promoción de la función Tres que limita la enfermedad inflamatoria
CD44	Células T reguladoras	Aumentar la estabilidad y la función celular y reforzar la diferenciación y el mantenimiento celular
TLR-4	Microglia	Alivio de lesiones cerebrales y promoción de la restauración neuronal.

Tim-3 (Proteína 3 que contiene el dominio de inmunoglobulina y mucina de células T) es el receptor de unión a galectina más estudiado, y es el más estrechamente relacionado entre los múltiples receptores de galectina-9. Una gran cantidad de datos sugieren que Tim-3 es un receptor de punto de control inmunológico que promueve la homeostasis

inmunológica regulando la inmunidad innata y adaptativa, y regula negativamente la respuesta de las células T induciendo la apoptosis de las células Th1 (Figura 13) [88].

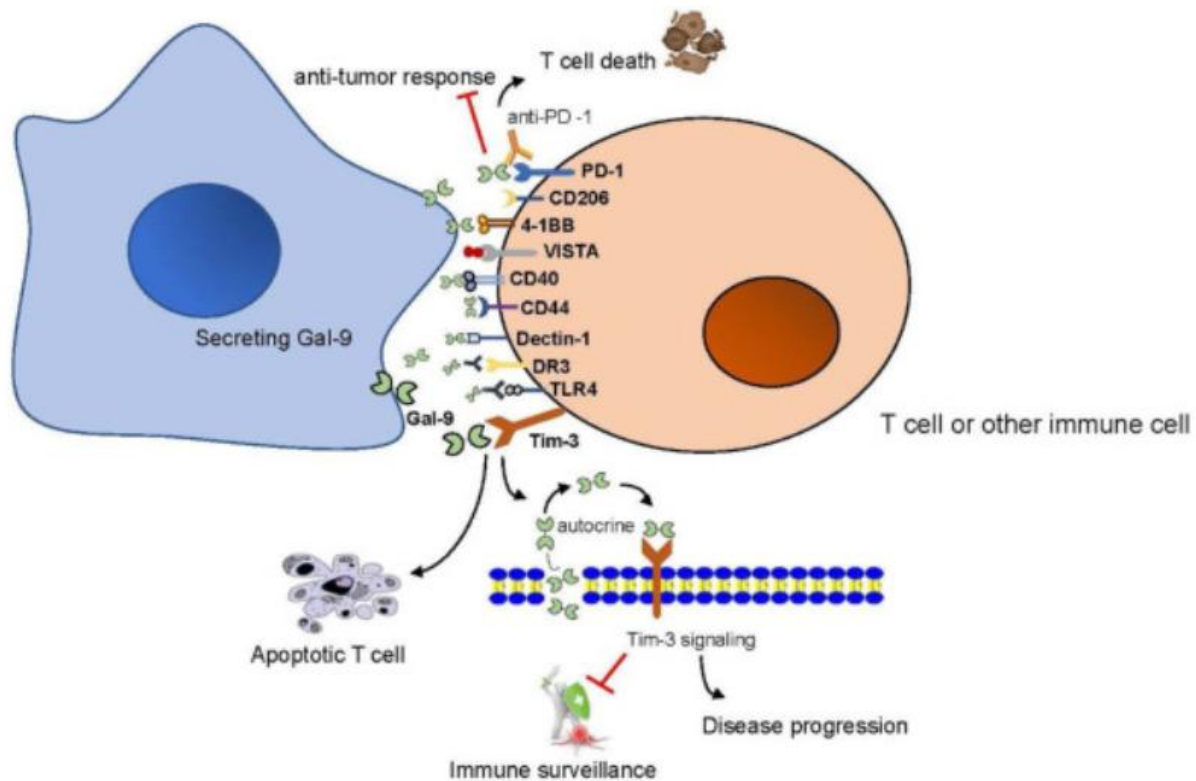


Figura 13. Receptores de galectina-9. Galectina-9 se une a múltiples receptores en la superficie celular. La unión de galectina-9 a Tim-3 induce la apoptosis de células T en condiciones fisiológicas y forma un bucle autocrino con Tim-3 en condiciones patológicas, lo que conduce a una menor vigilancia inmunitaria y promueve la progresión de la enfermedad. La unión de PD-1 a galectina-9 desempeña un papel clave en la inhibición de la respuesta antitumoral y la promoción de la muerte de células T. (PD-1), proteína de muerte celular programada 1; VISTA, supresor de la activación de células T que contiene Ig de dominio V; TLR-4, receptor tipo Toll-4) [87].

1.8.5. Expresión de galectina-9 en el cáncer

Se ha investigado extensamente la expresión de galectina-9 en el cáncer, y los niveles de galectina-9 en las células o tejidos malignos difieren en relación con los tejidos sanos. Hasta el momento, diversos tipos de tumores malignos, como el cáncer de mama, el CaCu asociado al VPH, el carcinoma pancreático, el glioblastoma multiforme, el linfoma

cutáneo de células T, la leucemia linfocítica crónica, las células o el tejido tumoral presentan niveles aumentados de galectina-9 en comparación con los tejidos precancerosos y normales. Por otra parte, en ciertas neoplasias malignas, como el cáncer gástrico, el cáncer de colon, el carcinoma esofágico, el melanoma, el carcinoma hepatocelular, el cáncer de pulmón, el carcinoma de células renales, el carcinoma suprarrenal y las células de cáncer de próstata, se ha observado que la expresión de galectina-9 está regulada a la baja. La variación en el nivel de expresión de galectina-9 en distintos tumores no solo se relaciona con la progresión de los tumores, sino que también con el pronóstico de supervivencia de los pacientes [89].

2. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que una infección persistente por VPH-AR es el agente causal de CaCu. E6 es un importante oncogén de los VPH, que interactúa y posteriormente inactiva numerosas proteínas celulares fundamentales en la regulación de la apoptosis, la transcripción de genes supresores de tumores, el mantenimiento de la organización epitelial y el control de la proliferación celular. Aunque su papel en la progresión maligna sigue siendo explorado.

En nuestro grupo de trabajo Caporal en el 2018, partiendo de los resultados de un ensayo de microarreglos de expresión de clonas de la línea celular HaCaT transfectadas de manera estable con E6 de diferentes genotipos, se identificaron 30 glicogenes que modificaron su expresión. Dentro de los genes alterados se encontró modificada la expresión del gen *LGALS9* en presencia de E6 del VPH-AR, lo que sugiere que E6 podría tener un efecto en la expresión de este gen, que se ha reportado alterado en tumores de cérvix [90].

La galectina-9 es una proteína que ha adquirido gran importancia porque se ha visto alterada su expresión en diferentes tipos de cáncer y asociada a diferentes funciones relacionadas con la progresión de la enfermedad como son: agregación y proliferación celular, adhesión y migración, apoptosis y modulación de la inflamación [91].

Resultados de nuestro grupo de investigación, mostraron que los niveles de ARNm del gen *LGALS9*, aumentan en tejido de CaCu respecto al tejido normal. Es importante mencionar que cuando se analizaron únicamente las muestras con cáncer encontraron que en estadios avanzados disminuye el nivel de ARNm, observando este mismo efecto para la expresión de la proteína. La disminución en su expresión se asoció con un peor pronóstico de sobrevida [92].

Por lo que el grupo de trabajo está interesado en conocer la regulación, o que factores podrían estar modificando la expresión del gen *LGALS9*. Aparicio *et. al.* en el 2019 identificaron mediante análisis bioinformáticos la región promotora del gen con un tamaño de 2089 pb y caracterizaron su actividad. También se realizaron delecciones para identificar el promotor mínimo, encontrando la mayor actividad en el fragmento de 727

descrito la activación de la expresión de dicho gen por la proteína E6 del VPH-16. La unión de E6/E6AP afecta a los represores del promotor *hTERT* (USF1/2) que se unen a los elementos cis del promotor (cajas X1, cajas E y secuencias ricas en GC) y NFX1-91, y recluta a la histona desacetilasa (HDAC) a través de mSin3A. El heterodímero cMYC/Max, Sp1 y las acetiltransferasas de histonas (HAT) se unen al promotor *hTERT* y activan la expresión de *hTERT*. La activación de *hTERT* también aumenta por NFX1-123 con las proteínas de unión a poli(A) citoplasmáticas (PABPC) que cooperan con E6/E6AP (Figura 15) [94].

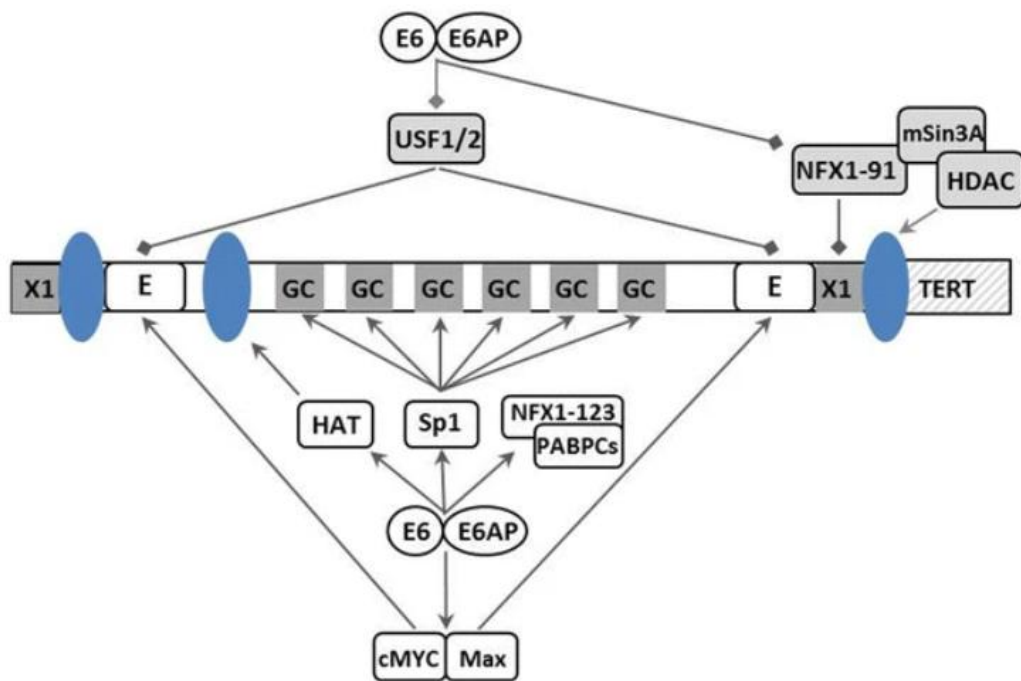


Figura 15. Modelo de activación del promotor del gen *hTERT* de la telomerasa por la proteína E6 del VPH-16. E6/E6AP afecta a los represores del promotor *hTERT*, como son USF1/2 y NFX1-91, y recluta a la HDAC a través de mSin3A. El heterodímero cMYC/Max, Sp1 y las HAT se unen al promotor y activan la expresión de *hTERT*. La activación de *hTERT* también aumenta por NFX1-123 con PABPCs que cooperan con E6/E6AP [94].

Otro estudio en el que se evaluó el efecto de las proteínas E6 de 29 genotipos de VPH sobre la actividad del promotor del gen *hTERT*, encontró que las E6 de los VPH-AR aumentan la actividad del promotor *hTERT*, no así las E6 de los VPH-BR [95].

Cabe resaltar que este comportamiento es exclusivo para este promotor del gen de la telomerasa que participa en la transformación maligna. Se desconoce el efecto que pudiera ejercer en otros promotores.

3. JUSTIFICACIÓN

El CaCu, por su alta incidencia, se considera un problema de salud a nivel mundial, principalmente en países con índice de desarrollo humano medio y bajo, como es México. El agente etiológico del CaCu es la infección persistente con los VPH-AR. E6 es un importante oncogén de los VPH, que participa activamente en el proceso de transformación maligna. La galectina-9 es una proteína que ha adquirido gran importancia porque se han reportado cambios en su nivel de expresión en diferentes tipos de cáncer, y estos cambios se han asociado con funciones relacionadas con la progresión de la enfermedad. Poco se sabe acerca de cómo se regula la expresión de galectina-9. La finalidad de este trabajo de investigación es evaluar el efecto de la proteína E6 sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9*, los niveles de ARNm y de la proteína galectina-9, ya que hay pocos estudios sobre los factores que pudieran estar regulando su expresión durante la transformación maligna. La proteína E6 puede ser un factor crítico que participa en el cambio de expresión de galectina-9, entenderlo mejor puede ofrecer oportunidades para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En CaCu se han reportado cambios en los niveles del ARNm del gen *LGALS9*, así como de su producto proteico, la galectina-9, se ha reportado aumento de dichos niveles en estadios tempranos y una disminución en estadios más avanzados. Estos cambios de expresión se han asociado con el grado de progresión de la enfermedad, supervivencia y respuesta a tratamiento. La galectina-9 participa en diversas funciones celulares como la inducción de la apoptosis de células cancerosas, promoción de la adhesión celular e inhibición de la metástasis, sugiriendo, en la mayoría de los casos, un efecto protector contra el cáncer, sin embargo, a nivel de sistema inmune actúa como punto de control inmunitario inhibiendo la respuesta antitumoral. En resultados preliminares del grupo, muestran que en un modelo “*in vitro*” de transfección estable con E6 de diferentes genotipos, E6 modifica la expresión del gen *LGALS9*. También sabemos que E6 de VPH-16 es capaz de interactuar con factores de transcripción como cMyc/Max y Sp1, aumentando la expresión de genes o bien la actividad del promotor del gen de la telomerasa. Por otro lado, los estudios muestran que las E6 de los genotipos de AR muchas veces son las únicas que ejercen los efectos estudiados, no así las E6 de genotipos de BR. Por lo que evaluar el efecto sobre la expresión de los niveles de ARNm y proteína galectina-9, permitirán profundizar en el conocimiento de los cambios moleculares asociados a las infecciones virales, adicionalmente nos interesa saber si el efecto de la proteína E6 sobre la expresión génica podría ser resultado de cambios en la actividad del promotor de dicho gen.

Derivado de lo anterior surge las siguientes preguntas de investigación:

Preguntas de investigación

- 1) ¿Las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84 modifican los niveles de ARNm del gen *LGALS9* y de su producto proteico?
- 2) ¿El efecto de E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la expresión del gen *LGALS9*, puede ser resultado de su efecto sobre la actividad del promotor de dicho gen?

5. HIPÓTESIS

La oncoproteína E6 del VPH-16 incrementa los niveles de ARNm del gen *LGALS9* y de su producto proteico la galectina-9 y este efecto es resultado del aumento en la actividad del promotor de dicho gen; mientras que la E6 del VPH-84 no ejerce ningún efecto.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84, sobre la expresión del gen *LGALS9* y sobre la actividad de su región promotora.

6.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9*.
- 2) Determinar el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la actividad de promotor del gen *LGALS9*.
- 3) Determinar el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la expresión de galectina-9.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Línea celular

Se utilizó la línea celular HaCaT, que corresponde a queratinocitos inmortalizados de un tejido de piel humana (*Homo sapiens*) de un hombre caucásico de 62 años. Se eligió esta línea celular debido a que es una línea celular no tumoral (negativa a VPH), a su fácil propagación “*in vitro*” y presenta un fenotipo más cercano a los queratinocitos del epitelio cervical (el VPH infecta queratinocitos de cérvix). Además, que en estudios previos se ha identificado la presencia de la proteína galectina-9.

7.2. Plásmidos

7.2.1. Vectores de expresión

➤ Vector pcDNA

El vector pcDNA3 de 5.4 kb está diseñado para la expresión de proteínas de manera estable o transitoria en células de mamíferos. Contiene un promotor de citomegalovirus humano (CMV) que es activo en líneas celulares eucariotas que permite un alto nivel de expresión, así como múltiples sitios de clonación y un gen de resistencia a la ampicilina. Para este trabajo, este vector se ha denominado pcDNA negativo (pcDNA neg) porque no tiene el marco de lectura de E6 (Figura 16A). La construcción resultante de la clonación del marco de lectura de E6 VPH-16 o VPH-84 dentro del vector pcDNA3, se ha nombrado pcDNA-E6 VPH-16 y pcDNA-E6 VPH-84 (Figura 16B). En el laboratorio se cuenta con ambos vectores de expresión [96].

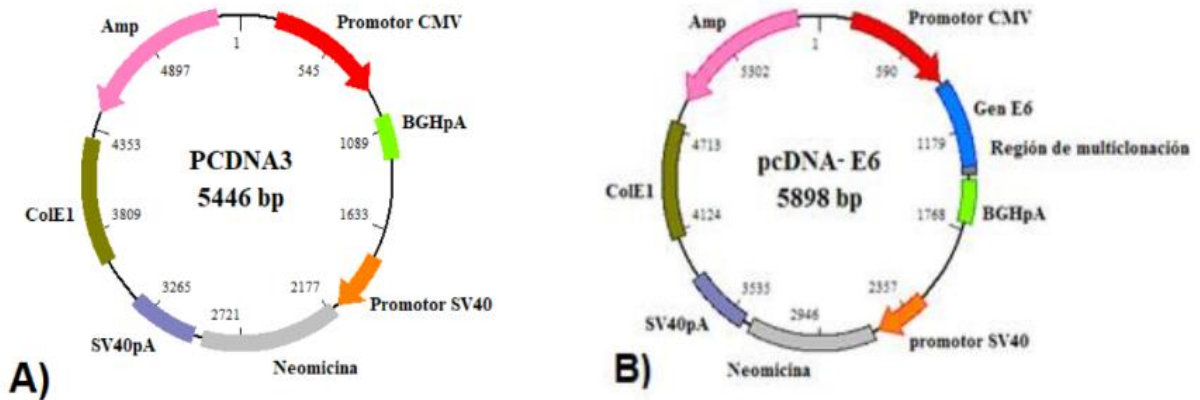


Figura 16. Representación esquemática de vectores de expresión pcDNA3. A) Representación del pcDNA neg. B) Representación del pcDNA que contiene el marco de lectura de E6 (pcDNA-E6 VPH-16 o pcDNA- E6 VPH-84) [96].

7.2.2. Vectores reporteros

➤ Vector pGL4.72 [*hRlucCP*]

Se utilizó el vector pGL4.72 el cual contiene el gen *hRlucCP* de *Renilla reniformis* (codifica para una luciferasa de esponja de mar), el cual carece de promotor pero la región multiclonal actúa como un promotor débil, este plásmido se utilizó como control interno para evaluar si las diferentes condiciones de transfección se llevaron a cabo con la misma eficiencia, además de utilizarse para normalizar los valores de la actividad de luciferasa de luciérnaga que representa la actividad del promotor (Figura 17).

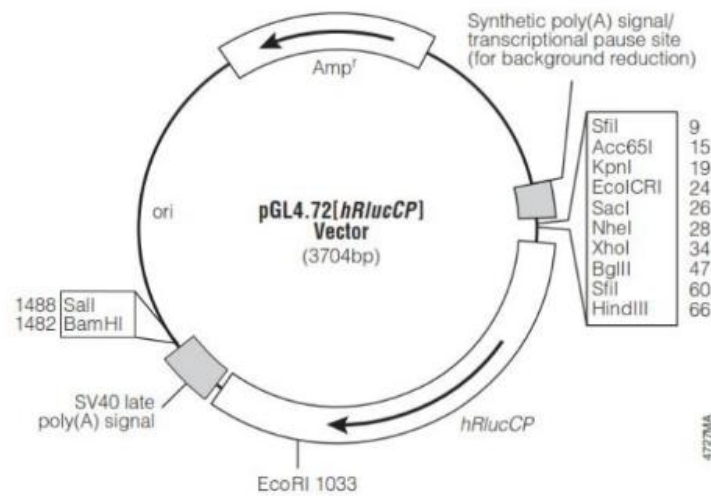


Figura 17. Representación esquemática del vector pGL4.72. Se muestra el gen reportero de la luciferasa de *Renilla*, el gen de resistencia a la ampicilina y un sitio de clonación múltiple.

➤ Vector pGL4.12 [luc2CP]

El vector que utilizó para hacer las clonaciones del promotor del gen *LGALS9* y de sus fragmentos fue el pGL4.12 el cual contiene el gen reportero de luciferasa *luc2CP* de *Photinus pyralis* (codifica para una luciferasa de luciérnaga) (Aparicio, 2019), este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina el cual fue utilizado como marcador de selección de clonas. En la figura 18 se muestran las construcciones del promotor utilizadas en este estudio.

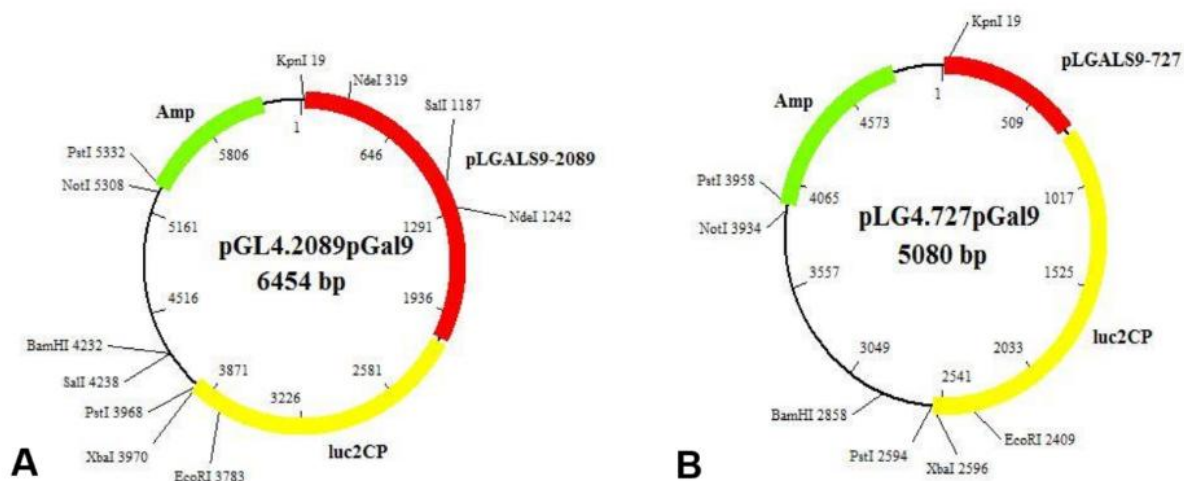


Figura 18. Representación esquemática de las construcciones del promotor completo y el fragmento de 727 pb del gen *LGALS9*. A) Representación de la construcción pGL4.2089pGal9 (fragmento 2089 pb). B) Representación de la construcción pGL4.727pGal9 (fragmento 727 pb). Se muestra en amarillo el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga, en verde el gen de resistencia a la ampicilina y en rojo la región promotora del gen *LGALS9*, 2089 pb y el fragmento de 727 pb respectivamente [93].

7.3. Condiciones de cultivo

El cultivo celular se realizó en monocapa en botellas de cultivo de 25 cm² de superficie (p25), utilizando el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Caisson), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest) y adicionado con 1% antibiótico/antimicótico (Biowest). La incubación se realizó a la temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda.

El mantenimiento de la línea celular se realizó cada tercer día, realizando 3 lavados con PBS 1X estéril para retirar los desechos celulares y agregando 5 mL de DMEM nuevo. Cuando los cultivos llegaron a confluencia (las células alcanzaron una cobertura entre el 70% al 90% del área de cultivo), las células fueron despegadas utilizando 0.5 mL de tripsina-EDTA (SIGMA) para su división, se incubó por 5 min en incubación a 37°C y 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Se re-suspendieron en 1 mL de medio DMEM y se hizo un pase, incubándose a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

7.4. Efecto de E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9*

7.4.1. Cultivo celular

Para los ensayos en los que se evaluó el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y -84 sobre el nivel de ARNm del gen *LGALS9*, fueron sembradas 40,000 células HaCaT por pozo, en placas de cultivo de 24 pozos, sembrando 4 pozos para cada condición (control y experimental), con medio de cultivo DMEM al 5% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico, se incubó por 48 hrs a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

7.4.2. Ensayos de transfección

Transcurrido el tiempo de incubación se verificó que la confluencia estuviera 80%, se les retiró el medio de cultivo, lavando 3 veces cada pozo con 0.2 mL de PBS 1X, después del último lavado se retiró todo el PBS y se agregaron 450 µL de medio de cultivo DMEM sin SFB (Biowest) y sin antibiótico/antimicótico (Biowest).

Los ensayos de transfección transitoria se realizaron utilizando lipofectamina-3000 (Invitrogen) con los plásmidos pcDNAE6-VPH16, pcDNAE6-VPH84, pcDNA-Neg (como control del ensayo) y se realizó una co-transfección en un pozo con pGL4.72 (control de transfección), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las cantidades de plásmidos utilizadas en los ensayos de transfección se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de transfección para evaluar el efecto de E6 sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9*.

Efecto	Control	Experimental
E6 VPH-16	pcDNA Neg [300 ng/ pozo]	pcDNAE6-VPH16 [300 ng/ pozo]
E6 VPH-84	pcDNA Neg [300 ng/ pozo]	pcDNAE6-VPH84 [300 ng/ pozo]

Cada complejo de transfección (Lipofectamina, reactivo P3000 y DNA plasmídico) fue diluido en medio de cultivo DMEM sin SFB y sin antibiótico/antimicótico, después de

prepararlos fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se agregaron volúmenes iguales de la mezcla de transfección a cada pozo por goteo, en movimiento circular y se incubó durante 24 hrs a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Terminado ese periodo de incubación se retiró el medio, sin realizar lavados (ya que las células después de la transfección son más susceptibles a desprenderse) y se agregó 0.5 mL de medio de cultivo DMEM al 5% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico incubando por 24 hrs más para cumplir un periodo de 48 hrs.

7.4.3. Extracción de ARN total

Después de los ensayos de transfección, las células se despegaron con tripsina EDTA 1X (Biowest) incubando durante 5 min a 37°C, estas fueron re-suspendidas en medio DMEM con 5% de SFB y centrifugadas a 1500 rpm, posteriormente fueron lavadas con PBS 1X. Para la extracción de ARN total se utilizó el RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, para eluir el ARN total de la columna se usaron 30 µL de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ARN se determinaron usando el nanofotómetro PEARL (IMPLEN), la concentración se determinó a partir de la lectura a 260 nm y la pureza se determinó obteniendo la relación de 260/280 nm de las muestras, se considera aceptable cuando presentaba un valor ≥ 1.7 . Para determinar la integridad del ARN total se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, donde se observaron las bandas brillantes y sin degradación de los ARN ribosomales (ARNr) 28s y 18s.

7.4.4. Síntesis de ADNc

Una vez verificada la integridad del ARN total, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit RevertAid Minus Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific Inc.). La reacción se hizo en un volumen de 20 µL, utilizando el volumen de ARN necesario para obtener una concentración de 20 ng/ µL, 1µL de primers oligo (dT), 4 µL de buffer de reacción 2X, 1µL de inhibidor de Rnasa RiboLock, 2µL de mezcla de dNTP, 1µL de enzima Transcriptasa Reversa y agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen final. Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc en el termociclador utilizando el protocolo siguiente: 42°C durante 60 minutos y después a 70°C durante 5 minutos.

7.4.5. Cuantificación de ARNm por PCR Tiempo Real (q-PCR)

Para determinar el efecto de E6 VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9* se realizó un análisis de expresión relativa mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). Para ello el volumen final de reacción fue 10 μ L, utilizando 5 μ L de SYBR Green/Rox (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 1 μ L de cada par de oligonucleótidos y 1 μ L de ADNc [20ng]. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado amplificando el gen *LGALS9* (Figura 19). Como control el gen endógeno hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*HPRT*). La secuencia de oligos de ambos genes se muestra en la (Tabla 4). Se utilizó el equipo de qPCR Step One (Applied Biosystems Thermo Scientific Inc.), con las siguientes condiciones de amplificación: 95°C durante 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 61°C durante 10 segundos y 70°C durante 30 segundos.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos y el tamaño del producto de amplificación.

Gen		Oligonucleótidos 5´-3´	Tm	Producto
<i>LGALS9</i>	Sentido	CTG TGC AGC TGT CCT ACA TCA	57 °C	177 pb (Posición 493 a 670)
	Antisentido	GGA TGA CTG TCT GGG TAA TGG	54.9°C	
<i>HPRT</i>	Sentido	CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT	58.8°C	130 pb
	Antisentido	GCA AGA CGT TCA GTC CTG TC	59.7 °C	

La cuantificación de la expresión se realizó con el método $\Delta\Delta C_t$ mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. El método $\Delta\Delta C_t$ se basa en el análisis comparativo de los C_t 's del gen de interés (*LGALS9*) y de los C_t 's de un gen endógeno (*HPRT*).

Para determinar el nivel de expresión, todos los experimentos se realizaron por triplicado con tres diferentes experimentos.

7.5. Efecto de E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la actividad de promotor del gen *LGALS9*

7.5.1. Cultivo celular

Para los ensayos de transfección en los que se evaluará el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y -84 sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9* fueron sembradas 40,000 células HaCaT por pozo, en placas de cultivo de 24 pozos, sembrando 3 pozos para cada condición (control y experimental), con medio de cultivo DMEM al 5% de SFB y 1% de Ab incubando por 48 hrs a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

7.5.2. Ensayos de transfección

Transcurrido el tiempo de incubación se verificó que la confluencia estaba entre el 80%, se les retiró el medio de cultivo, se realizaron 3 lavados con 0.2 mL de PBS 1X, después del último lavado se retiró todo el PBS y se agregaron 450 µL de medio de cultivo DMEM sin SFB y sin Ab.

Se realizaron ensayos de transfección transitoria con los plásmidos pcDNAE6-VPH16, pcDNAE6-VPH84, pcDNA-Neg (como control del ensayo), y una co-transfección con los vectores pGL4.2089pGal9, pGL4.727pGal9 y pGL4.72 (control de eficiencia de transfección) Los ensayos de transfección se realizaron utilizando lipofectamina-3000 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Se utilizaron las siguientes concentraciones de plásmidos (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de transfección para evaluar el efecto de E6 sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9* (2089 pb y 727 pb).

Efecto	Promotor	Control	Experimental
	2089pb	pcDNA Neg [300 ng/ pozo] pGL4.2089pGal9 [300 ng/pozo]	pcDNAE6-VPH16 [300 ng/ pozo]

E6 VPH-16		pGL4.72 [20ng/pozo]	pGL4.2089pGal9 [300 ng/pozo] pGL4.72 [20ng/pozo]
	727 pb	pcDNA Neg [300 ng/ pozo] pGL4.727pGal9 [300 ng/pozo] pGL4.72 [20ng/pozo]	pcDNAE6-VPH16 [300 ng/ pozo] pGL4.727pGal9 [300 ng/pozo] pGL4.72 [20ng/pozo]
E6 VPH-84	2089 pb	pcDNA Neg [300 ng/ pozo] pGL4.2089pGal9 [300 ng/pozo] pGL4.72 [20ng/pozo]	pcDNAE6-VPH84 [300 ng/ pozo] pGL4.2089pGal9 [300 ng/pozo] pGL4.72 [20ng/pozo]
	727 pb	pcDNA Neg [300 ng/ pozo] pGL4.727pGal9 [300 ng/pozo] pGL4.72 [20ng/pozo]	pcDNAE6-VPH84 [300 ng/ pozo] pGL4.727pGal9 [300 ng/pozo] pGL4.72 [20ng/pozo]

Cada complejo de transfección (Lipofectamina, reactivo P3000 y DNA plasmídico) fue diluido en medio de cultivo DMEM sin SFB y sin Ab, después de prepararlos fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se agregaron 50 μ L de la mezcla de transfección a cada pozo por goteo, en movimiento circular y se incubó durante 24 hrs a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Terminado ese periodo de incubación se retiró el medio, sin realizar lavados y se agregó 0.5 ml de medio de cultivo DMEM al 5% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico, incubando por 24 hrs más para cumplir un periodo de 48 hrs.

7.5.3. Ensayos de luciferasa

Para evaluar el efecto de E6 VPH-16 y VPH-84 sobre la actividad del promotor a través de ensayos de luciferasa se utilizó el kit Dual Luciferas Assay System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Transcurrido las 48 horas después de la transfección, se retiró el medio DMEM y se lavaron las células con PBS 1X, se añadieron 100 μ l del buffer de lisis PLB 1X y se incubó durante 45 minutos en agitación constante a temperatura ambiente.

Se recuperó el lisado y se centrifugó durante 30 segundos a máxima velocidad para separar los restos celulares, se tomaron 20 µL del sobrenadante del lisado y se agregaron 60 µL del reactivo LARII para medir la actividad de luciferasa de luciérnaga (*Photinus agrepyralis*) que generó una señal luminiscente estable, la cual corresponde a la actividad del promotor del gen *LGALS9*, una vez cuantificada la luminiscencia la reacción es inactivada con 60 µL del reactivo Stop and Glow, que de manera simultánea contiene el sustrato para la segunda luciferasa (*Renilla reniformis*) y se realizó la medición de la actividad de luciferasa. Las mediciones se realizaron utilizando el luminómetro GloMax20/20 (Promega). La actividad del promotor del gen *LGALS9* en cada lisado se normalizó con respecto a la actividad de luciferasa de *Renilla* (dividiendo la actividad de luciferasa de luciérnaga entre el valor de la luciferasa de *Renilla*). Los resultados se presentaron en número de veces de la actividad del promotor en presencia de E6 VPH-16 y VPH-84, con respecto a la condición control (pCDNA-Neg).

Todos los ensayos de actividad del promotor se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

7.6. Efecto de E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre la expresión de galectina-9

7.6.1. Cultivo celular

Para los ensayos de transfección en los que se evaluó el efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y -84 sobre expresión de galectina-9, fueron sembradas 200,000 células HaCaT por pozo, en placas de cultivo de 6 pozos, sembrando 3 pozos para cada condición (control y experimental), con medio de cultivo DMEM al 5% de SFB y 1% de Ab incubando por 48 hrs a 37°C, 5% de y atmósfera húmeda.

7.6.2. Ensayos de transfección

Transcurrido el tiempo de incubación se verificó que la confluencia estuviera en 80%, se les retira el medio de cultivo, lavando 3 veces cada pozo con PBS 1X, después del último lavado se retiró todo el PBS y se agregó 2.25 mL de medio de cultivo DMEM sin SFB y sin Ab.

Los ensayos de transfección con el plásmido pcDNAE6-VPH16, pcDNAE6-VPH84, pcDNA-Neg se realizaron utilizando lipofectamina-3000 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, las concentraciones de plásmidos utilizadas para este experimento se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de transfección para evaluar el efecto de E6 sobre la expresión de galectina-9.

Efecto	Control	Experimental
E6 VPH-16	pcDNA Neg [1500 ng/ pozo]	pcDNAE6-VPH16 [1500 ng/ pozo]
E6 VPH-84	pcDNA Neg [1500 ng/ pozo]	pcDNAE6-VPH84 [1500 ng/ pozo]

Cada complejo de transfección (Lipofectamina, reactivo P3000 y DNA plasmídico) fue diluido en medio de cultivo DMEM sin SFB y sin antibiótico/antimicótico, después de prepararlos fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se agregaron volúmenes iguales de la mezcla de transfección a cada pozo por goteo, en movimiento circular y se incubó durante 24 hrs a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Terminado ese periodo de incubación se retiró el medio, sin realizar lavados y se agregaron 2.5 mL de medio de cultivo DMEM al 5% de SFB y 1% de Ab, incubando por 24 hrs más para cumplir un periodo de 48 hrs.

7.6.3. Semi-cuantificación de la proteína galectina-9 por Western Blot.

Para evaluar el efecto el efecto de E6 VPH-16 y VPH-84 sobre la expresión de la proteína galectina-9, se llevó a cabo con un Western Blot (WB).

Transcurrido las 48 horas después de la transfección, se retiró el medio DMEM y se recolectó la pastilla celular con 500 µL de tripsina EDTA 1X (Biowest) se incubó durante 5 min a 37°C, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm, se lavaron con 1 mL de PBS 1X, y se volvió a centrifugar a 5000 rpm, 4°C, durante 5 minutos (importante realizar el procedimiento en frío para evitar la acción de las proteasas). Posteriormente se decantó el sobrenadante y re-suspendió el pellet en 100 µL del buffer RIPA (Tris HCl pH 7.4 50

mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5 %, SDS 0.1%, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 2mM) frío, adicionado con 40 μ L/mL de inhibidor de proteasas (Thermo Scientific), se mezcló muy bien en vortex para favorecer la lisis celular y se almacenó a -20°C. A las 24 hrs se realizó la extracción de proteínas totales, en un termoblock se incubó a 37 °C hasta que este líquido (choque térmico favorece la lisis celular). Se realizó sonicación de la muestra en el Sonicador Fisherbrand Q500 con sonda (Fisher scientific) 5 pulsos, 5 segundos cada uno a 100% de amplitud durante 4 ciclos para cada muestra, finalmente se centrifugó a 1400 rpm a 4°C durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se desechó el pellet. La cuantificación se realizó usando el nanofotometro Pearl (IMPLEN), la concentración se determinó a partir de la lectura a UV280 nm (las proteínas muestran un característico espectro de absorción a 280 nm).

Para los ensayos de WB, 20 μ g de proteína fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % SDS-PAGE, la sección concentradora del gel que se preparó al 4% de poliacrilamida. Se corrió a 70 V por 45 min, posteriormente el gel separador se corrió a 120 V por 130 min, al término de la electroforesis la proteína fue transferida a una membrana PVDF de 0.2 μ m (BioRad) en cámara húmeda por 16 horas a 100 mA. La membrana fue bloqueada en una solución de leche reducida en grasa al 5% en TBS-T por 1 hora en agitación. Posteriormente, la membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo policlonal anti-Gal-9 IgG conejo (ab69630, Abcam) en una dilución de 1:400 en una solución de leche baja en grasa al 5% en TBS-T, finalmente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP (70745 Cell signaling), en una dilución de 1:2,000 en una solución de leche baja en grasa al 5% en TBS-T.

Para volver a utilizar la membrana con el anticuerpo control anti- β -actina, se realizó el *stripping* de la membrana, utilizando el siguiente buffer (Tris HCl 1M pH 6.8, SDS 20% y β -mercaptoetanol) incubando durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Para la detección β -actina, la membrana se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo monoclonal anti- β - actina IgG ratón (ab8224, Abcam,) en una dilución de 1:1,000 en una solución de leche baja en grasa al 5% en TBS-T. Posteriormente, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con el

anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP (PI-2000 Fisher scientific) en una dilución de 1:2,000 en una solución de leche baja en grasa al 5% en TBS-T.

La detección de galectina-9 y β -actina fue realizada a través de un ensayo de quimioluminiscencia con el Kit Immobilon Western (Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se incubó por 5 min en la solución del kit y posteriormente se reveló por 6 min en el equipo C-Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences). La densidad de las bandas fue determinada con el software Image Studio 5 Lite (LI-COR Biosciences). La densidad de las bandas de β -actina fue utilizada para normalizar las densidades obtenidas para galectina-9.

Para determinar el nivel de expresión de la proteína galectina-9 se realizó un único experimento por cada genotipo.

7.7. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de E6 de VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de expresión de ARNm y sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9* en línea celular HaCaT y determinar si existió diferencia significativa entre la actividad del promotor completo (2089 pb) y del fragmento del promotor (727 pb) comparando entre la condición control y la condición experimental, así como la diferencia de ARNm, se realizó una prueba t de student considerando un valor de $p < 0.05$ como significativo. Las pruebas estadísticas y los gráficos fueron obtenidos con el programa GraphPad Prism 10 (GraphPad Software).

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación del efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9*.

El efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de expresión del ARNm del gen *LGALS9* fue evaluado en la línea celular HaCaT, transfectadas de manera transitoria con los plásmidos de expresión pcDNAE6-VPH16, pcDNAE6-VPH84 (como condición experimental) y pcDNA-Neg (como control del ensayo). Los resultados mostraron un aumento de 2.2 veces en los niveles de expresión del ARNm del gen *LGALS9* en presencia de E6 VPH-16 (Figura 19 A) y de 4 veces en presencia de E6 VPH-84 (Figura 19 B).

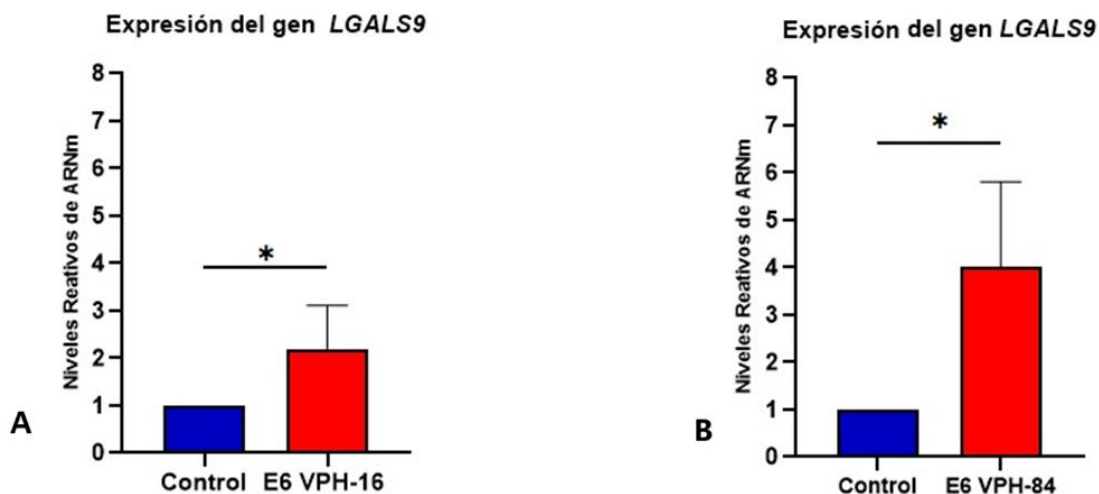


Figura 19. Efecto de E6 VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de ARNm, del gen *LGALS9* en la línea celular HaCaT. La expresión fue analizada mediante PCR tiempo real, los niveles de expresión del gen *LGALS9* fueron normalizados con el gen endógeno HPRT, la expresión relativa fue obtenida empleando el método $\Delta\Delta Ct$. * $p < 0.05$. diferencia significativa. A) Presencia de E6 VPH-16. B) Presencia de E6 VPH-84. Los resultados se obtuvieron al realizar 3 experimentos independientes.

8.2. Evaluación del efecto de E6 de los VPH-16 sobre la actividad de promotor del gen *LGALS9*

Se realizó una co-transfección transitoria en la línea celular HaCaT, con los plásmidos de expresión pcDNAE6-VPH16, (como condición experimental) y pcDNA-Neg (como control del ensayo) y con las construcciones del promotor pGL4.2089pGal9, pGL4.727pGal9 y pGL4.72 (luciferasa de Renilla). Posteriormente las actividades obtenidas en presencia de E6 VPH-16 se normalizaron con respecto a las actividades obtenidas con el plásmido control pcDNA-Neg al que se le dio el valor de 1. En ambas construcciones del promotor se observa un aumento de su actividad en presencia de E6 VPH-16 2.8 veces para el promotor completo de 2089 pb (Figura 20 A) y de 2.3 veces para el promotor del fragmento de 727 pb (Figura 20 B).

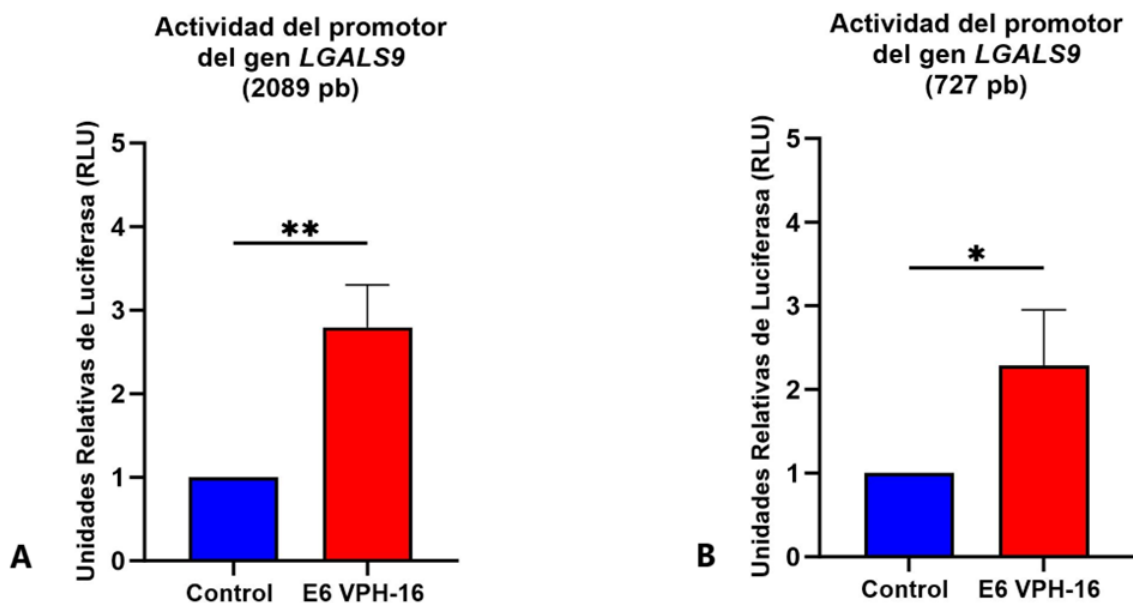


Figura 20. Efecto de E6 VPH-16 sobre la actividad del promotor gen *LGALS9* en la línea celular HaCaT. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La expresión fue analizada mediante ensayos de luciferasa, normalizando las unidades de luciferasa de luciérnaga con las actividades de luciferasa de Renilla. Se realizó una prueba t de student, * $p < 0.05$. ** $p < 0.001$ de diferencia significativa, utilizando el software GraphPad Prism 10. A) Efecto de E6 VPH-16 sobre la actividad del promotor completo (2089). B) Efecto de E6 VPH-16 sobre la actividad del promotor de 727 pb.

8.3. Evaluación del efecto de E6 del VPH-84 sobre la actividad de promotor del gen *LGALS9*

Se realizaron ensayos de transfección en la línea celular HaCaT, con los plásmidos de expresión pcDNAE6-VPH84, (como condición experimental) y pcDNA-Neg (como control del ensayo) y co-transfección con las construcciones del promotor pGL4.2089pGal9, pGL4.727pGal9 y pGL4.72 (luciferasa de Renilla). Posteriormente los valores obtenidos para la condición control (pcDNA-Neg) se les dio el valor de 1, y los resultados en las condiciones experimentales se reportaron en número de veces respecto a la condición control. En ambas construcciones del promotor se observa un aumento en la actividad, en presencia de E6 VPH-84. Para el promotor completo el aumento fue de 3.6 veces (Figura 21 A) y para el fragmento de 727 pb el aumento fue de 5.9 (Figura 21 B).

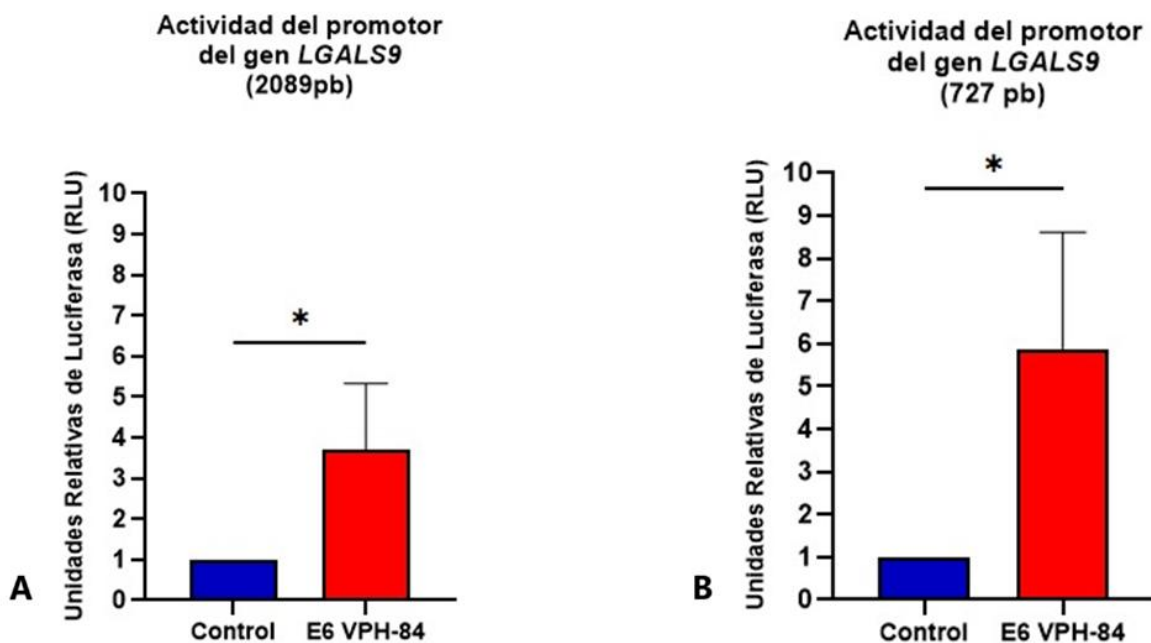


Figura 21. Efecto de E6 VPH-16 sobre la actividad del promotor gen *LGALS9* en la línea celular HaCaT. A) Efecto de E6 VPH-84 sobre la actividad del promotor completo (2089). B) Efecto de E6 VPH-84 sobre la actividad del promotor de 727 pb. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La expresión fue analizada mediante ensayos de luciferasa, normalizando las unidades de luciferasa de luciérnaga con las actividades de luciferasa de Renilla. Se realizó una prueba t de student, * $p < 0.05$ diferencia significativa, utilizando el software GraphPad Prism 10.

8.4. Evaluación del efecto de E6 del VPH-16 sobre la expresión del producto proteico la galectina-9.

El efecto de las proteínas E6 de los VPH-16 sobre los niveles de expresión de la proteína galectina-9, se realizó en la línea celular HaCaT, transfectadas de manera transitoria con los plásmidos de expresión pcDNAE6-VPH16 (como condición experimental) y pcDNA-Neg (como control del ensayo). El efecto fue evaluado mediante ensayo de WB. Para este experimento sólo se realizó un ensayo. La galectina-9 fue reconocida con el anticuerpo policlonal anti-Gal-9 (ab69630 Abcam). Los resultados muestran una banda de aproximadamente 36 kDa correspondiente al peso molecular de galectina-9. Adicionalmente se evaluó la expresión de β -actina, proteína utilizada como control de expresión del ensayo. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar la intensidad de las bandas, y se normalizaron los valores de galectina-9 respecto a los valores de β -actina, para cada condición.

Los resultados mostraron que E6 del VPH-16 incrementa el nivel de expresión de galectina-9, el aumento fue de 4.5 veces respecto a la condición control (Figura 22).

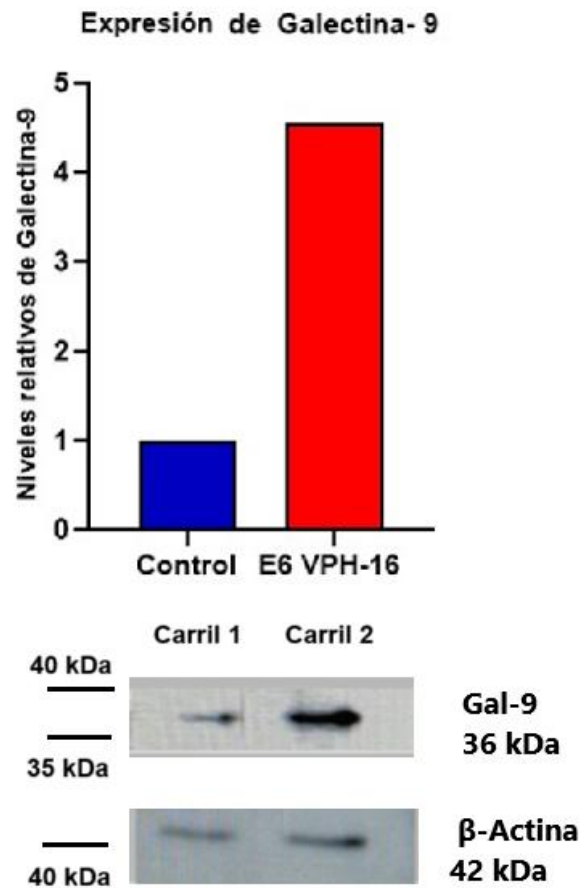


Figura 22. Efecto de E6 VPH-16 sobre la expresión del producto proteico galectina-9, en línea celular HaCaT. Se realizó mediante un ensayo de western blot. Se cargaron 20 µg de proteína: Carril 1 Control y Carril 2 Experimental. Se muestran los resultados del análisis densitométrico de las bandas de Gal-9 normalizadas con respecto a β- actina como control endógeno.

8.5. Evaluación del efecto de E6 del VPH-84 sobre la expresión de la galectina-9.

El efecto de las proteínas E6 de los VPH-84 sobre los niveles de expresión de la proteína galectina-9, se realizó en la línea celular HaCaT, transfectadas de manera transitoria con los plásmidos de expresión pcDNAE6-VPH84 (como condición experimental) y pcDNA-Neg (como control del ensayo). El efecto de la proteína E6 del VPH-16 sobre la expresión la galectina-9 fue evaluada mediante ensayo de WB. Para este experimento sólo se realizó un ensayo. La galectina-9 fue reconocida con el anticuerpo policlonal anti-Gal-9 (ab69630 Abcam). Los resultados muestran una banda de aproximadamente 36 kDa correspondiente al peso molecular de galectina-9. Adicionalmente se evaluó la expresión de β -actina, proteína utilizada como control de expresión del ensayo. Se realizó un análisis densitométrico para cuantificar la intensidad de las bandas, y se normalizaron los valores de galectina-9 respecto a los valores de β -actina, para cada condición.

Los resultados mostraron que E6 de VPH-84 no modifica la expresión de galectina-9 (Figura 23).

Expresión de Galectina-9

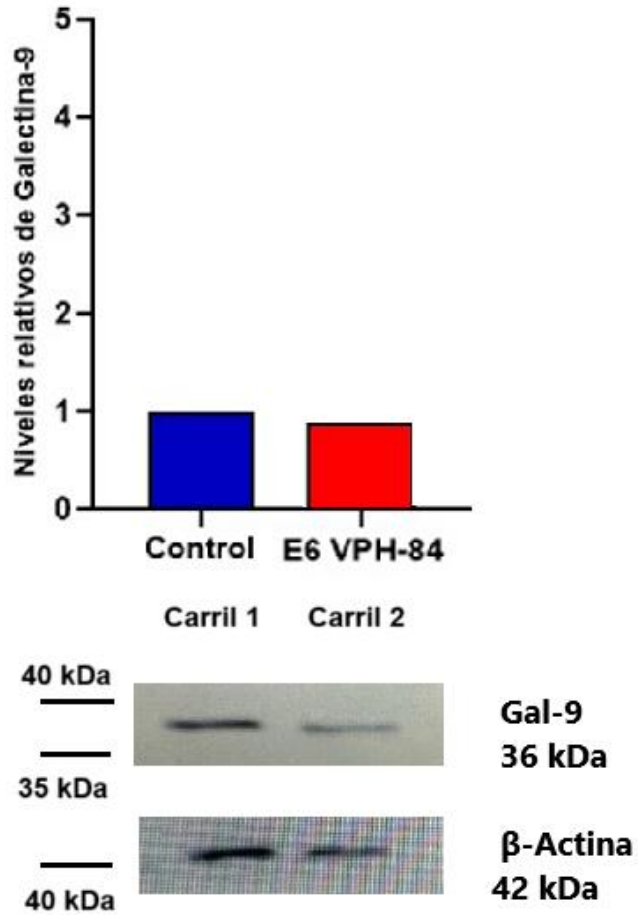


Figura 23. Efecto de E6 VPH-84 sobre la expresión del producto proteico galectina-9, en línea celular HaCaT. Se realizó mediante un ensayo de western blot. Se cargaron 20 μ g de proteína: Carril 1 Control y Carril 2 Experimental. Se muestran los resultados del análisis densitométrico de las bandas de Gal-9 normalizadas con respecto a β -actina como control endógeno.

8.6. Análisis in silico de secuencias de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.

8.6.1. Obtención y comparación de secuencias.

Se obtuvieron las secuencias de las proteínas E6 de ambos genotipos de VPH de la base de datos UniProt: E6 VPH-16 (P03126-VE6_HP16) y E6 VPH-84 (Q99Fx3-Q99Fx3_9PAPI). Estas secuencias fueron comparadas o confirmadas con los datos reportados por UniProt en estructura.

En la comparación de las secuencias se observa que la secuencia de E6 VPH-16 tiene un mayor tamaño en comparación con la E6 VPH-84 (158 aa y 148 aa, respectivamente), por lo que la posición de los motivos CXXC que forman los denominados dedos de zinc son diferente para cada proteína, así como la secuencia de aminoácidos. Solo en la E6 de VPH-16 está presente el motivo de unión a dominios PDZ en el extremo C-terminal (definido por la secuencia ETQL) (Figura 24).

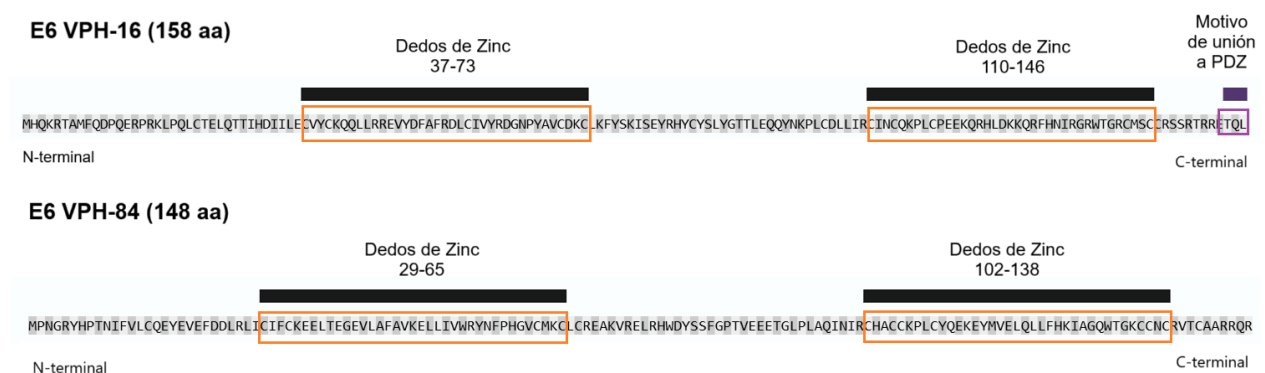


Figura 24. Diferencias entre las proteínas E6 de VPH-16 y VPH-84. Se muestra las diferencias en el tamaño, en la secuencia de aminoácidos, la posición de los dedos de zinc y la presencia o ausencia del motivo de unión a PDZ.

8.6.2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.

Para cada genotipo de VPH se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína E6 en formato FASTA. Posteriormente, dichas secuencias fueron alineadas empleando los

algoritmos Blast y Clustal Omega. Tras un análisis con ambos, se eligió proceder utilizando Clustal Omega. La Figura 25 muestra el alineamiento de ambas secuencias.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|P03126|VE6_HP16      MHQKRTAMFQDPQERERKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLRREVDFAFRDLCIV      60
tr|Q99FX3|VE6_HP84      -----MPNGRYHHTNIFVLCQEQYVEVFDLRLICIFCKEEETEGEVLAFAVKELLV      52
                        :  :  :  :  *  :  :  *  *  *  .  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *
                        :  :  :  :  *  :  :  *  *  *  .  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *

sp|P03126|VE6_HP16      YFDGNFYAVCDKCLKFYISKISFYRHYCYSLYCTILEQQYNKPLCDLLIRGINQKPLCP      120
tr|Q99FX3|VE6_HP84      WRYNFFHGVCMKCLCREAKVRLLRHWDYSSFCPTVEEETGLPLAQINIRCHACKPLCYQ      112
                        :  *  .  *  :  *  *  *  *  *  :  :  *  *  *  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :

sp|P03126|VE6_HP16      EKQRHLDKKQRFHNRGRWTRGRMSSCRSRTRRETQL      158
tr|Q99FX3|VE6_HP84      EKEYMVELQLLFFHKIAGQWTGKQCNCNRVTCARERQR--      148
                        **  :  :  :  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 25. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas E6 de los VPH-16 y VPH-84. Se muestran las secuencias de aminoácidos de la proteína E6 de ambos genotipos. El color rojo señala los sitios con una conservación igual al 100 %, el azul los sitios con una conservación ≥ 50 %, y el amarillo sitios con una similitud ≤ 50 %, es decir, residuos con propiedades fisicoquímicas similares. El algoritmo reporta un 38% de identidad y 60% de similitud.

8.6.3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.

Para cada genotipo de VPH se seleccionó únicamente la secuencia que forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL para cada proteína E6 en formato FASTA. Posteriormente, dichas secuencias fueron alineadas empleando los algoritmos Blast y Clustal Omega. Tras un análisis con ambos, se eligió proceder utilizando Clustal Omega. La Figura 26 muestra el alineamiento de ambas secuencias.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|P03126|VE6_HP16      CVYCKQQLLRREVDFAFRDLCIVYRDGNFYAVCDKCLKFYISKISFYRHYCYSLYCTILE      60
tr|Q99FX3|VE6_HP84      CIFCKEELTEGEVLAFAVKELLVWRYNFFHGVCMKCLCREAKVRLLRHWDYSSFCPTVE      60
                        **  :  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

sp|P03126|VE6_HP16      QQYNKPLCDLLIRGINQKPLCP E EKQRHLDKKQRFHNRGRWTRGRMSC      110
tr|Q99FX3|VE6_HP84      EETGLPLAQINIRCHACKPLCYQ EKEYMVELQLLFFHKIAGQWTGKQCNC      110
                        :  :  .  *  *  :  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 26. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL de las E6 de los VPH-16 y VPH-84. Se muestran las secuencias de aminoácidos que forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL de las proteínas E6 de ambos genotipos. El color rojo señala los sitios con una conservación igual al 100 %, el azul los sitios con una conservación ≥ 50 %, y el amarillo sitios con una similitud ≤ 50 %, es decir, residuos con propiedades fisicoquímicas similares. El algoritmo reporta un 44% de identidad y 65% de similitud.

8.6.4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman las secuencias de localización nuclear de las E6 de los VPH-16 y VPH-84.

Para cada genotipo de VPH se seleccionó únicamente la secuencia de localización nuclear ubicada en el extremo carboxilo terminal, para cada proteína E6 en formato FASTA. Posteriormente, dichas secuencias fueron alineadas empleando los algoritmos Blast y Clustal Omega. Tras un análisis con ambos, se eligió proceder utilizando Clustal Omega. La Figura 27 muestra el alineamiento de ambas secuencias.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

sp|P03126|VE6_HP16      KKQRFHNIIRGRWTGRCSGCRSSRTRPETQL  31
tr|Q99FX3|VE6_HP84    LQLLFHFKIAGQWTGKCCNCRVTCARRQR--  29
      :  **:* *:*:*:*:* .*  .. :*:*

```

Figura 27. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que forman las secuencias de localización nuclear (NLS) de las E6 de los VPH-16 y VPH-84. Se muestran las secuencias de aminoácidos de NLS de ambos genotipos. El color rojo señala los sitios con una conservación igual al 100 %, el azul los sitios con una conservación ≥ 50 %, y el amarillo sitios con una similitud ≤ 50 %, es decir, residuos con propiedades fisicoquímicas similares. El algoritmo reporta un 38% de identidad y 66% de similitud.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la proteína E6 de VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de ARNm, actividad del promotor del gen *LGALS9* y expresión de la proteína galectina-9, cuyos niveles de ARNm y proteína se han reportado elevados en etapas tempranas del CaCu. Para ello se realizaron ensayos de transfección transitorias, en las línea celular HaCaT.

En primer lugar, evaluamos el efecto de las E6 sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9*. Seleccionamos la E6 del VPH-16 porque es un genotipo de alto riesgo, siendo el de mayor prevalencia tanto en mujeres sin lesiones premalignas como en tumores de cérvix [97], Seleccionamos la E6 del VPH-84 porque es un genotipo poco estudiado, que se considera de bajo riesgo y que en un estudio previo mostro alta prevalencia en mujeres con citología normal y en coinfección con VPH-16 [98]. Existen diversos estudios que muestran que las E6 de los diferentes genotipos pueden compartir algunas funciones, sin embargo, el análisis estructural muestra diferencias importantes, que les generan capacidades diferentes para interactuar con proteínas celulares y en consecuencia funciones diferentes [99].

Considerando diversos estudios previos que reportan diferencias en las funciones entre las proteínas E6 de VPH de AR comparado con las de BR, esperábamos observar el efecto sólo en la condición que incluyó a la proteína E6 del VPH-16, sin embargo, observamos que las E6 de ambos genotipos aumentan los niveles de ARNm del gen *LGALS9* (Figura 19).

Estudios “*in vitro*” en queratinocitos han demostrado que la transformación neoplásica de células infectadas con VPH-AR se debe principalmente a la proteína viral E6 que induce la activación del gen de la telomerasa [100], regula la actividad del promotor *hTERT* y participa en la regulación epigenética y postranscripcional de *hTERT* [101]. Se ha propuesto que el complejo de las proteínas E6/E6AP se unen al promotor del gen *hTERT* y lo activan al interactuar con el factor de transcripción c-Myc [102]. También se ha visto que este complejo puede desestabilizar al represor, NFX1-91, en el promotor *hTERT* de una manera dependiente del proteosoma [103]. De igual manera se ha informado del papel colaborativo de c-Myc y el factor de transcripción Sp1, puede activar la expresión

del gen la telomerasa [104]. Esta regulación ocurre directamente en el promotor de *hTERT*, que contiene cajas E para permitir la unión de c-Myc y los sitios ricos en GC para la unión de Sp1 [105].

Como se mencionó anteriormente Aparicio et. al. en el 2019, identificaron sitios de unión a estos factores de transcripción (c-Myc y Sp1) presentes en el promotor del gen *LGALS9* [93].

El factor de transcripción c-Myc ha sido reconocido desde hace mucho tiempo por su papel fundamental en la regulación transcripcional de genes fundamentales para procesos celulares como el ciclo celular, la apoptosis y el metabolismo [106]. Myc se forma normalmente como un heterodímero con MAX (MYC/MAX), el complejo modificador de cromatina que consiste en TIP60, TRRAP, TIP48 y GCN5 reclutado por el heterodímero MYC/Max impulsa la transcripción a través de la unión a la región de ADN de la caja E (CACGTG) dentro del dominio regulador de los genes diana [107].

El factor de transcripción Sp1 es un mediador de vías fisiológicas críticas, como el ciclo celular, la proliferación y la metástasis. Sp1 es uno de los activadores transcripcionales mejor caracterizados. Se une a secuencias ricas en GC que son necesarias para la expresión y regulación de una variedad de genes, interactuando con el ADN a través de tres dedos de zinc de tipo C2H2 ubicados en su dominio C-terminal [108].

Por lo que se evaluó el efecto de E6 de los VPH-16 y -84 sobre la actividad del promotor en la línea celular HaCaT mediante ensayos de transfección transitoria con E6 VPH-16 y -84, co-transfectando con las construcciones antes descritas que tienen el promotor completo de 2089 pb y el fragmento de 727 pb. En ambas construcciones del promotor se observa un aumento de su actividad en presencia de E6 VPH-16, siendo muy similar el aumento en la actividad que fue de 2.8 veces para el promotor completo y de 2.3 veces para el promotor de 727 pb (Figura 20). En el caso del efecto de E6 VPH-84, también se observa un aumento de la actividad del promotor para ambas construcciones, siendo el aumento de 3.6 veces para el promotor completo y de 5.9 para el fragmento de 727 pb (Figura 21). El efecto semejante de la proteína E6 en la actividad del promotor independientemente del tamaño, sugiere que dicho efecto se esté ejerciendo a través de la región que comparten.

Si bien no podemos asegurar que el efecto se esté ejerciendo a través de la interacción de E6 con el factor de transcripción, es probable que la inducción de la transcripción de *LGALS9* por E6 ocurra a través de la interacción con c-Myc y Sp1, que previamente se ha demostrado que se unen y activan al promotor de *hTERT* [109].

Se esperaba no observar efecto con la E6 de VPH-84, como lo reporta Doorslaer y Burk., en el 2012, quienes examinaron la activación del promotor mínimo de *hTERT* al transfectar con 29 E6 de VPH de diferentes genotipos. En donde se observó que las E6 de los genotipos de AR (VPH-16 y -18, -39 y -51) activan al promotor *hTERT* con mayor eficacia, en cambio las E6 de los genotipos de BR (VPH-6 y -11), tienen una capacidad mucho menor o nula para activar *hTERT* [95]. Sin embargo, en ese trabajo no se evaluó a la E6 del VPH-84, que de acuerdo con nuestros resultados pareciera estar ejerciendo un efecto semejante a las E6 de los VPH-AR.

VPH-16 y VPH-84 forman parte del género *Alfapapillomavirus*, pero pertenecen a especies diferentes ($\alpha 9$ y $\alpha 10$, respectivamente), por lo que su distancia filogenética es moderada, sin embargo, pertenecen a grupos de riesgo oncogénico diferentes (alto y bajo riesgo, respectivamente), no obstante, observamos que la oncoproteína E6 de ambos genotipos aumenta la actividad del promotor del gen *LGALS9*, y los niveles de ARNm, sugiriendo aún más que ambas podrían interaccionar con factores de transcripción en común [110].

Al realizar un análisis comparativo de la secuencia de ambas proteínas se observó que la E6 del VPH-16 es una proteína pequeña de 158 residuos y por lo tanto la primera diferencia entre las E6 es el tamaño, 158 aa para la E6 de VPH-16 y de 148 aa para la E6 de VPH-84. Ambas contienen cuatro motivos CXXC que forman 2 dedos de Zinc unidos por un conector helicoidal de 36 aminoácidos, con algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos que forman los dedos de zinc en las 2 proteínas. Sin embargo, la principal y mayor diferencia, es la presencia de un motivo de unión a dominios PDZ en el extremo C-terminal (ETQL) presente únicamente en la E6 VPH-16 (Figura 24). La E6 de VPH se une a E6AP, un complejo que se une a muchas proteínas, dentro de las más estudiadas e importantes se encuentra p53 a la cual se une para inducir su degradación por la vía del proteosoma, recordado que p53 es un supresor de tumores que una vez

activo inicia las vías para reparación del daño al ADN, deteniendo el ciclo celular y tomando la vía de apoptosis basado en el daño al ADN [111]. Ni E6 ni E6AP *per se*, son capaces de unirse a p53 e inducir su degradación por si solas. En cambio, E6 debe unirse primero al dominio de reconocimiento del sustrato N-terminal de E6AP antes de que p53 pueda unirse y ubiquitinarse. Curiosamente, se ha demostrado que tanto las proteínas E6 de AR como las E6 de BR, interactúan con p53, sin embargo, difieren con respecto a los dominios de p53 con los que interactúan [112]. Si bien ambas proteínas E6 pueden unirse al extremo C-terminal de p53, solo las proteínas E6 de AR son capaces de unirse a la región central de p53 lo que induce la degradación de p53 por parte de E6 de VPH-AR [113]. Como se indicó previamente la interacción de E6-E6AP está involucrada en el efecto de E6 en la activación del promotor del gen de la telomerasa (*hTERT*), aumentado así su expresión. Conocer las diferencias en la secuencia de aminoácidos de los dos dominios de dedos de zinc, junto con el alfa hélice que los conecta y forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL de las E6 de los diferentes genotipos, podría ayudarnos a entender la interacción de E6 con diferentes proteínas en las células infectadas y como contribuye en los procesos de transformación maligna.

Al ser el VPH-84 un genotipo poco estudiado, no se tiene información reportada sobre análisis de secuencias en comparación con el VPH-16. Por lo anterior, tuvimos el interés de realizar alineamientos para comparar la identidad y similitud de las secuencias de ambas proteínas E6, así como de las regiones de los dedos de zinc junto con la secuencia conectora que forman el bolsillo de unión a motivos LXXLL y de las secuencias de localización nuclear ubicada en la región carboxilo terminal. Aunque se trata de genotipos que pertenecen al mismo grupo evolutivo, en el alineamiento de las proteínas E6 de los genotipos estudiados, se observó que, el número de aminoácidos conservados es alrededor del 40%, sin embargo, la similitud resultó ser mayor del 60%, es decir que la secuencia tiene gran número de residuos con propiedades fisicoquímicas fuertemente similares (Figura 25). Esa similitud de secuencias podría relacionarse con una función similar de ambos genotipos.

Como último objetivo, se evaluó el efecto de la oncoproteína E6 de VPH-16 y VPH-84 sobre los niveles de galectina-9 mediante ensayos de WB. Los resultados mostraron un

incremento en los niveles de galectina-9 tras la expresión de E6 de VPH-16, mientras que con la E6 de VPH-84 no se observó ningún efecto en los niveles de expresión de esta proteína. Un aumento en los niveles de ARNm y en la actividad del promotor del gen *LGALS9* puede indicar una mayor expresión del gen (aumento en la transcripción), pero no garantiza un aumento en la síntesis de la proteína. La cantidad de proteína generada está sujeta a varios mecanismos adicionales que regulan la traducción y la estabilidad del ARNm como, por ejemplo, modificaciones en el Cap 5', que sirve como protección a exonucleasas y participa en la regulación de la traducción [114]. Otro mecanismo es la colita de poli A (cadena de adeninas) que se añade al extremo 3' del ARNm después de la transcripción en un proceso llamado poliadenilación [115] o la expresión de ciertos microARNs, lo que resultaría en una inhibición de la traducción de galectina-9 o su eliminación prematura [116]. Incluso si el ARNm se traduce de manera eficiente también la proteína podría estar sujeta a modificaciones postranscripcionales que afecten su actividad o estabilidad. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten determinar que está sucediendo, es algo que deberá explorarse en estudios futuros.

10. CONCLUSIÓN

La presente investigación aporta un avance importante sobre el papel de las proteínas E6 en la expresión del gen *LGALS9* y sobre la actividad de su promotor. La expresión de este gen se encuentra alterada en tumores de cérvix, por lo que la expresión de las proteínas E6 durante la infección por VPH podría estar teniendo un efecto sobre dichos cambios de expresión.

La oncoproteína E6 de los tipos de VPH-16 y VPH-84 incrementó los niveles de ARNm, así como de la actividad del promotor del gen *LGALS9*. La región promotora de este gen presenta sitios de unión a los factores de transcripción c-Myc y Sp-1, y se ha demostrado que las proteínas E6 de los VPH-AR interaccionan con dichos factores de transcripción potenciando su efecto en la expresión de algunos genes y en la actividad de algunas regiones promotoras. Por lo que podemos hipotetizar que el efecto observado podría ser resultado de dicha interacción y de la unión a los elementos de respuesta en la región promotora del gen *LGALS9*.

El efecto de las proteínas E6 sobre el nivel de expresión de galectina-9 no fue el mismo. Mientras que con la oncoproteína E6 del VPH-16 se observó un aumento en los niveles de la proteína galectina-9, en el caso de E6 de VPH-84 no se observó ningún cambio, lo que sugiere que un mecanismo postranscripcional podría modular las síntesis de esta proteína.

La modulación en la transcripción del gen *LGALS9* durante la transformación maligna del cérvix no ha sido estudiada, nuestros resultados abren una línea de investigación enfocada al estudio de la regulación de la expresión de genes por las proteínas E6 de diferentes genotipos virales.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar si el heterodímero E6/E6-AP interacciona con los factores de transcripción c-Myc y/o Sp-1 a través de ensayos de co-inmunoprecipitación.
- Evaluar si el heterodímero E6/E6-AP unido al factor de transcripción interaccionan en la región promotora del gen *LGALS9* mediante ensayos de inmunoprecipitación.
- Realizar mutaciones en los sitios de unión a Sp-1 y c-Myc de la región promotora del gen *LGALS9* para verificar su papel en la activación de la actividad del promotor en presencia de E6.
- Realizar la simulación de la interacción de E6/E6-AP con los factores de transcripción Sp-1 y c-Myc, mediante simulaciones de dinámica molecular (MD) o docking molecular.
- Determinar y comparar los perfiles de expresión de microARNs en presencia de E6 de VPH-16 y VPH-84 por medio de RNAseq, ya que algunos microARN podrían inhibir la traducción.

12. REFERENCIAS

1. NCI Visuals Online [Internet]. Cancer.gov. <https://visualsonline.cancer.gov/>
2. Regauer S, Reich O. The origin of Human Papillomavirus (HPV) induced cervical squamous cancer. *Curr Opin Virol.* 2021;51:111–8. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.09>.
3. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory. Who.int. <https://gco.iarc.who.int/en>.
4. OPS/OMS [Internet]. Paho.org. <https://www.paho.org/es>.
5. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chin J Cancer Res* 2020;32(6):720-728. <https://doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05>.
6. Ortiz Serrano R, Uribe Pérez CJ, Díaz Martínez LA, Yuriko Rafael. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Rev Colomb Obstet Ginecol* [Internet]. 2004;55(2):146–60. <http://doi.org/2463-0225>.
7. Baldwin P, Laskey R, Coleman N. Translational approaches to improving cervical screening. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2003;3(3):217–26. <https://doi.org/10.1038/nrc1010>.
8. Moreno Barrios María Carolina. Actualización en el reporte de citología cervicovaginal basado en el Sistema Bethesda 2014. *Rev Obstet Ginecol Venez* [Internet]. 2017Mar;77(1):58-66. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322017000100008&lng=es.
9. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association: Human papillomavirus. *Rev Med Virol* [Internet]. 2015;25 Suppl 1(S1):2–23. <http://doi.org/10.1002/rmv.1822>.
10. Van Doorslaer K, Tan Q, Xirasagar S, Bandaru S, Gopalan V, Mohamoud Y, et al. The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013;4:D571-8. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>
11. Le Mercier Chantal Hulo Patrick Masson (content) P, Edouard de Castro (software). Papillomaviridae ~ ViralZone [Internet]. Expasy.org. <https://viralzone.expasy.org/5>

12. Van Doorslaer K, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, et al. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017:D499–506. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw879>.
13. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2010;117 (2): S5-10. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>
14. Tommasino, M. The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res* [Internet]. 2017 231, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.013>.
15. Van Doorslaer K. Evolution of the papillomaviridae. *J. Virol* [Internet].2013;445/1-2),11–20. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.012>.
16. Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortés-Gutiérrez EI, Salgado-Bernabé ME, Ramos-González NP, Ortega-Cervantes L, et al. Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections: Genotyping and Coinfection With HPV in Mexican Women. *J Med Virol* [Internet]. 2015;87(5):871–84. <https://doi.org/10.1002/jmv.24099>.
17. Terai M, Burk RD. Complete nucleotide sequence and analysis of a novel human Papillomavirus (HPV 84) genome cloned by an overlapping PCR method. *Virology* [Internet]. 2001;279(1):109–15. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0716>.
18. Richardson, H., Kelsall, G., Tellier, P., Voyer, H., Abrahamowicz, M., Ferenczy, A., & Franco, E. L. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2003;12(6),485-490. <https://doi.org/1538-7755>.
19. Graham SV. Human papillomavirus: Gene expression, Regulation and Prospects For novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol* [Internet]. 2010;5(10):1493–506. <http://doi.org/10.2217/fmb.10.107>.
20. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2017;131(17):2201–21. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>.
21. Rincón R Diego F, Morales L Liliana A, Rincón-Orozco Bladimiro. Modernas metodologías de diagnóstico para la detección del Virus del Papiloma Humano y prevención del cáncer de cuello uterino. *Universidad Rev. Ind. Santander. Salud* [Internet]. Septiembre de 2017; 49(3): 478-488. <https://doi.org/10.18273/revsal.v49n3-2017006>.

22. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* [Internet]. 2009;5(2): e1000318. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000318>
23. Oldak M, Smola H, Aumailley M, Rivero F, Pfister H, Smola-Hess S. The Human Papillomavirus type 8 E2 protein suppresses β 4-integrin expression in primary Human keratinocytes. *J Virol* [Internet]. 2004;78(19):10738–46. <http://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10738-10746.2004>.
24. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology* [Internet]. 2011;414(2):153–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.019>.
25. di Filippo Iriarte G, Orjuela Vargas JL, Osorio Zambrano WF, Jiménez Camargo LC. Detección de ARNm de oncoproteínas E6/E7 del Virus del Papiloma Humano en cáncer de cuello uterino. *Acta bioquím clín latinoam* [Internet]. 2018;52(3), 361-372.
26. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. 2013;445(1–2):138–68. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>.
27. Westrich JA, Warren CJ, Pyeon D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. *Virus Res* [Internet]. 2017;231:21–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.023>.
28. Egawa N, Wang Q, Griffin HM, Murakami I, Jackson D, Mahmood R, et al. HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions. *PLoS Pathog* [Internet]. 2017;13(3):e1006282. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006282>
29. Crusius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* [Internet]. 1997;15(12):1437–44. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201312>.
30. Sakakibara N, Chen D, Jang MK, Kang DW, Luecke HF, Wu S-Y, et al. Brd4 is displaced from HPV replication factories as they expand and amplify viral DNA. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013;9(11):e1003777. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003777>
31. Banerjee NS, Wang H-K, Broker TR, Chow LT. Human papillomavirus (HPV) E7 induces prolonged G2 following S phase reentry in differentiated human keratinocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2011;286(17):15473–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197574>.

32. Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(26):23958–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200724200>.
33. Becker KA, Florin L, Sapp C, Sapp M. Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology* [Internet]. 2003;314(1):161–7. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00447-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00447-1)
34. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* [Internet]. 2007;212(4):356–67. <https://doi.org/10.1002/path.2192>
35. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* [Internet]. 2013;382(9895):889–99. [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60022-7](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60022-7).
36. Wallace NA, Galloway DA. Novel functions of the human Papillomavirus E6 oncoproteins. *Annu Rev Virol* [Internet]. 2015;2(1):403–23. <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-05502>.
37. Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckère F, et al. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: Insights in the molecular pathways of human Papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell* [Internet]. 2006;21(5):665–78. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.024>.
38. Ricci-López J, Vidal-Limon A, Zunñiga M, Jimènez VA, Alderete JB, Brizuela CA, et al. Molecular modeling simulation studies reveal new potential inhibitors against HPV E6 protein. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(3):e0213028. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0213028>.
39. Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* [Internet]. 2016;529(7587):541–5. <http://doi.org/10.1038/nature16481>.
40. Shah M, Anwar MA, Park S, Jafri SS, Choi S. In silico mechanistic analysis of IRF3 inactivation and high-risk HPV E6 species-dependent drug response. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(1). <http://doi.org/10.1038/srep13446>.
41. Javier RT. Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene* [Internet]. 2008;27(55):7031–46. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.352>.
42. Pim D, Bergant M, Boon SS, Ganti K, Kranjec C, Massimi P, et al. Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *FEBS J*. 2012;279(19):3530–7. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08709.x>

43. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(21):11612–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11612>.
44. Thomas M, Myers MP, Massimi P, Guarnaccia C, Banks L. Analysis of multiple HPV E6 PDZ interactions defines type-specific PDZ fingerprints that predict oncogenic potential. *PLoS Pathog*. 2016;12(8):e1005766. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005766>
45. Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, Javier R, Banks L. HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene*. 2001;20(39):5431–9. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1204719>.
46. Thomas M, Massimi P, Navarro C, Borg J-P, Banks L. The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene*. 2005;24(41):6222–30. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1208757>.
47. Tomaić V. Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2016;8(10):95. <http://doi.org/10.3390/cancers8100095>.
48. Jäkel S, Mingot J-M, Schwarzmaier P, Hartmann E, Görlich D. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J* [Internet]. 2002;21(3):377–86. <http://doi.org/10.1093/emboj/21.3.377>
49. Le Roux LG, Moroianu J. Nuclear entry of high-risk human Papillomavirus type 16 E6 oncoprotein occurs via several pathways. *J Virol* [Internet]. 2003;77(4):2330–7. <http://doi.org/10.1128/jvi.77.4.2330-2337.2003>.
50. Yim E-K, Park J-S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* [Internet]. 2005;37(6):319. <http://doi.org/10.4143/crt.2005.37.6.319>.
51. Ristriani T, Nominé Y, Masson M, Weiss É, Travé G. Specific recognition of four-way DNA junctions by the C-terminal zinc-binding domain of HPV oncoprotein E6. *J Mol Biol* [Internet]. 2001;305(4):729–39. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4330>.
52. Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* [Internet]. 2016;529(7587):541–5. <http://doi.org/10.1038/nature16481>.

53. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* [Internet]. 2013;445(1–2):115–37. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>
54. Kelley ML, Keiger KE, Lee CJ, Huibregtse JM. The global transcriptional effects of the human Papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *J Virol* [Internet]. 2005;79(6):3737–47. <http://doi.org/10.1128/jvi.79.6.3737-3747.2005>.
55. Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human Papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(24):25729–44. <http://doi.org/10.1074/jbc.m401172200>.
56. Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human Papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(24):21730–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.m200113200>.
57. Filippova M, Johnson MM, Bautista M, Filippov V, Fodor N, Tungteakkhun SS, et al. The large and small isoforms of Human Papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* [Internet]. 2007;81(8):4116–29. <http://doi.org/10.1128/jvi.01924-06>.
58. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* [Internet]. 1999;80(6):1513–7. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-80-6-1513>.
59. James MA, Lee JH, Klingelutz AJ. Human Papillomavirus type 16 E6 activates NF- κ B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol* [Internet]. 2006;80(11):5301–7. <http://doi.org/10.1128/jvi.01942-05>.
60. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010;10(8):550–60. <http://doi.org/10.1038/nrc2886>
61. Shah M, Anwar MA, Park S, Jafri SS, Choi S. In silico mechanistic analysis of IRF3 inactivation and high-risk HPV E6 species-dependent drug response. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(1). <http://doi.org/10.1038/srep13446>
62. Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AHT, Pellegrini S, et al. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs

- Jak-STAT activation by interferon- α . *Oncogene* [Internet]. 1999;18(42):5727–37. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1202960>
63. Rincon -Orozco B, Halec G, Rosenberger S, Muschik D, Nindl I, Bachmann A, et al. Epigenetic Silencing of Interferon - κ in Human Papillomavirus Type 16 –Positive Cells/IFN - κ Regulation in HPV16 -Positive Cells. *Cancer Res* [Internet]. 2009;69(22):8718 -25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0550>
 64. Reiser J, Hurst J, Voges M, Krauss P, Münch P, Iftner T, et al. High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression. *J Virol* [Internet]. 2011;85(21):11372–80. <http://doi.org/10.1128/jvi.05279-11>
 65. Zhu Y, Han Y, Tian T, Su P, Jin G, Chen J, et al. MiR-21-5p, miR-34a, and human telomerase RNA component as surrogate markers for cervical cancer progression. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2018;214(3):374–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2018.01.001>
 66. Wang X, Meyers C, Guo M, Zheng Z-M. Upregulation of p18Ink4c expression by oncogenic HPV E6 via p53-miR-34a pathway. *Int J Cancer* [Internet]. 2011;129(6):1362–72. <http://doi.org/10.1002/ijc.25800>.
 67. Au Yeung CL, Tsang TY, Yau PL, Kwok TT. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene* [Internet]. 2011;30(21):2401–10. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.613>.
 68. Yeung CLA, Tsang TY, You PL, Kwok TT. Human papillomavirus type 16 E6 suppresses microRNA -23b expression in human cervical cancer cells through DNA methylation of the host gene C9orf3. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(7):12158. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14555>.
 69. Martinez I, Gardiner AS, K F Board, Monzon FA, Edwards RP, Khan SA. Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells. *Oncogene* [Internet]. 2008;27(18):2575–82. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210919>.
 70. Al Bitar S, Gali-Muhtasib H. The role of the cyclin dependent kinase inhibitor p21cip1/waf1 in targeting cancer: Molecular mechanisms and novel therapeutics. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019;11(10):1475. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11101475>

71. Yi JAW, Jang MI, Kim SJ, Kim SS, Rhee JE. Degradation of p53 by natural variants of the E6 protein of human papillomavirus type 16. *Oncol Rep* [Internet]. 2013;29(4):1617–22. <http://doi.org/10.3892/or.2013.2281>.
72. Yang J-H, Li X-Y, Wang X, Hou W-J, Qiu X-S, Wang E-H, et al. Long-term persistent infection of HPV 16 E6 up-regulate SP1 and hTERT by inhibiting LKB1 in lung cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(8):e0182775. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0182775>.
73. Subbaiah VK, Kranjec C, Thomas M, Banks L. PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *Biochem J* [Internet]. 2011;439(2):195–205. <http://doi.org/10.1042/bj20110903>.
74. Barondes S-H, Castronovo V, Cooper D-N., Cummings R-D, Drickamer, K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* [Internet]. 1994;76(4):597-598. [http://doi.org/0092-8674\(94\)90498-7](http://doi.org/0092-8674(94)90498-7).
75. Cooper D. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 2002;1572(2–3):209–31. [http://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00310-0](http://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00310-0).
76. Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem* [Internet]. 1993;268(36):27034–8. [http://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)74214-8](http://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)74214-8).
77. van den Brûle F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: A critical review. *Glycoconj J* [Internet]. 2002;19(7–9):537–42. <http://doi.org/10.1023/b:glyc.0000014083.48508.6a>.
78. Wang W-H, Lin C-Y, Chang MR, Urbina AN, Assavalapsakul W, Thitithanyanont A, et al. The role of galectins in virus infection - A systemic literature review. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2020;53(6):925–35. <http://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.09.005>.
79. Brewer C. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin–saccharide-mediated cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2002;12(5):616–23. [http://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00364-0](http://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00364-0)
80. Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel β -galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* [Internet]. 1997;272(9):6078–86. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.9.6078>.

81. Yasinska IM, Sakhnevych SS, Pavlova L, Teo Hansen Selnø A, Teuscher Abeleira AM, Benlaouer O, et al. The Tim-3-galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01594>.
82. Marasco LE, Kornblihtt AR. The physiology of alternative splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2023;24(4):242–54. <http://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z>.
83. The Human Protein Atlas <https://www.proteinatlas.org/>
84. John S, Mishra R. Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. *J Biosci* [Internet]. 2016;41(3):507–34. <http://doi.org/10.1007/s12038-016-9616-y>
85. Chen H-Y, Wu Y-F, Chou F-C, Wu Y-H, Yeh L-T, Lin K-I, et al. Intracellular galectin-9 enhances proximal TCR signaling and potentiates autoimmune diseases. *J Immunol* [Internet]. 2020;204(5):1158–72. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1901114>
86. Heusschen R, Griffioen AW, Thijssen VL. Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2013;1836(1):177–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.04.006>
87. Lv Y, Ma X, Ma Y, Du Y, Feng J. A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). *Genes Dis* [Internet]. 2023;10(6):2366–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.020>
88. Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol* [Internet]. 2009;39(9):2492–501. <http://doi.org/10.1002/eji.200939274>.
89. Yang R, Hung M-C. The role of T-cell immunoglobulin mucin-3 and its ligand galectin-9 in antitumor immunity and cancer immunotherapy. *Sci China Life Sci* [Internet]. 2017;60(10):1058–64. <http://dx.doi.org/10.1007/s11427-017-9176-7>.
90. Hernandez LC. Analisis de la expresión de glicogenes modulados por la oncoproteína E6 del virus del VPH de alto y bajo riesgo. [Puebla, Puebla.]: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018.
91. Heusschen R, Griffioen AW, Thijssen VL. Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* [Internet]. 2013;1836(1):177–85. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.04.006>.
92. Mendieta-Carmona V, Delgado-López G, Reyes-Leyva J, Gutiérrez-Quiroz CT, Vazquez-Zamora VJ, Picazo-Mendoza DA, et al. Galectin-9 expression is correlated

- to cervical squamous cell carcinoma progression and overall survival. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2023;16:891–904. <http://doi.org/10.2147/ott.s433710>
93. Flores JA. Identificación, caracterización y evaluación de la actividad del promotor del gen LGALS9. [Puebla, Puebla.]: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2019.
 94. Pańczyszyn A, Boniewska-Bernacka E, Głąb G. Telomeres and telomerase during human Papillomavirus-induced carcinogenesis. *Mol Diagn Ther* [Internet]. 2018;22(4):421–30. <http://doi.org/10.1007/s40291-018-0336-x>.
 95. Van Doorslaer K, Burk RD. Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk. *Virology* [Internet]. 2012;433(1):216–9. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2012.08.006>.
 96. Nasiri-Aghdam M, Garcia-Chagollan M, Pereira-Suarez AL, Aguilar-Lemarroy A, Jave-Suarez LF. Splicing characterization and isoform switch events in human keratinocytes carrying oncogenes from high-risk HPV-16 and low-risk HPV-84. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(9). <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24098347>.
 97. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002;2(5):342–50. <http://doi.org/10.1038/nrc798>
 98. Flores-Miramontes M. G, Torres-Reyes L. A, Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Piña-Sánchez P, Cortés-Gutiérrez E, Reyes-Leyva J, Jave-Suárez LF Prevalencia de genotipos de VPH en México y en el mundo detectados mediante Linear Array. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* [Internet]. 2015;53(2):S122-S130. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457744942003>
 99. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* [Internet]. 2013;445(1–2):115–37. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>.
 100. Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R, Schlegel R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(44):18780–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0906357106>.
 101. Igawa K, Satoh T, Hirashima M, Yokozeki H. Regulatory mechanisms of galectin-9 and eotaxin-3 synthesis in epidermal keratinocytes: possible involvement of galectin-9 in dermal eosinophilia of Th1-polarized skin inflammation. *Allergy* [Internet]. 2006;61(12):1385–91. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01130.x>.
 102. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse

- transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(14):8211–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1435900100>.
103. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* [Internet]. 2004;18(18):2269–82. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1214704>.
 104. Kyo S. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000;28(3):669–77. <http://doi.org/10.1093/nar/28.3.669>.
 105. Takamura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, et al. Cloning of Human Telomerase Catalytic Subunit (hTERT) Gene Promoter and Identification of Proximal Core Promoter Sequences Essential for Transcriptional Activation in Immortalized and Cancer Cells 1999;59(3):551–7. <http://doi.org/9973199>.
 106. Caforio M, Sorino C, Iacovelli S, Fanciulli M, Locatelli F, Folgiero V. Recent advances in searching c-Myc transcriptional cofactors during tumorigenesis. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2018;37(1). <http://doi.org/10.1186/s13046-018-0912-2>.
 107. Ahmadi SE, Rahimi S, Zarandi B, Chegeni R, Safa M. MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2021;14(1). <http://doi.org/10.1186/s13045-021-01111-4>
 108. Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J* [Internet]. 2015;282(2):224–58. <http://doi.org/10.1111/febs.13148>
 109. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human Papillomavirus type 16 E6 protein: Induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol* [Internet]. 2001;75(12):5559–66. <http://doi.org/10.1128/jvi.75.12.5559-5566.2001>
 110. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* [Internet]. 2004;324(1):17–27. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
 111. Lepik D, Ilves I, Kristjuhan A, Maimets T, Ustav M. P53 protein is a suppressor of Papillomavirus DNA amplificational replication. *J Virol* [Internet]. 1998;72(8):6822–31. <http://doi.org/10.1128/jvi.72.8.6822-6831.1998>.
 112. Wang Z, Fan F, Li Z, Ye F, Wang Q, Gao R, et al. Structural insights into the functional mechanism of the ubiquitin ligase E6AP. *Nat Commun* [Internet]. 2024;15(1):3531. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-47586-w>

113. Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* [Internet]. 2016;529(7587):541–5. <http://dx.doi.org/10.1038/nature16481>.
114. Moulin, M, Cuchalova L. The 5' cap structure in mRNA translation regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, [Internet] 2020;45(10), 826-838. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.05.007>.
115. Parker R, Song H. The enzymes and control of RNA decapping. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2004;77, 1-27. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(04\)77001-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(04)77001-9).
116. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, [Internet]. 2009;136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.

ANEXO

Preparación de soluciones para Western Blot

- **Buffer de fosfatos 1X (PBS)**

Reactivo	Concentración	Peso necesario
Cloruro de sodio NaCl	130 Mm	8.0 g
Cloruro de potasio KCl	3 mM	0.20 g
Fosfato de Sodio Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	1.44 g
Fosfato de Potasio KH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.24 g
H ₂ O bidestilada	Aforar a 1L	

Nota. Almacenar a 4°C.

- **Tris base 0.5 M pH 6.8**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Tris Base	6.05 g
H ₂ O bidestilada	100.0 mL

Nota. Para ajustar pH, es con HCl y agregar gota a gota. Almacenar a 4°C.

- **Tris base 1.5 M pH 8.0**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Tris base	18.15 g
H ₂ O bidestilada	100.0 mL

Nota. Para ajustar pH, es con HCl y agregar gota a gota. Almacenar a 4°C

- **SDS 10%**

Reactivo	Peso o volumen necesario		
SDS	1.0 g	5.0 g	10.0 g
H ₂ O bidestilada	10.0 mL	50.0 mL	50.0 mL

Nota. Se debe calentar a 37 grados el SDS para disolver. Almacenar hasta 6 meses a temperatura ambiente.

- **Persulfato de amonio 10%**

Reactivo	Peso o volumen necesario	
Persulfato de amonio	0.5 g	1.0 g
H ₂ O bidestilada	5.0 mL	10.0 mL

Nota. Se hacen alícuotas de 1mL, debe estar protegido de la luz. Almacenar las alícuotas a -20°C y la alícuota en uso a 4°C.

- **Buffer de carga para proteínas.**

Reactivo	Peso o volumen necesario
	2X
Glicerol	2.0 mL
SDS 10%	2.0 mL
Tris base 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
β – mercaptoetanol	0.5 mL
Azul bromofenol	1 pizca
H ₂ O bidestilada	Hasta 10mL (4.25 mL)

Nota. Se hacen alícuotas de 1mL. Colocar el β – mercaptoetanol en campana de extracción. Almacenar a -20 °C.

- **Poliacrilamida 30 %**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Acrilamida	7.3 g
Bis - acrilamida	0.2 g

Nota. Disolver en 10 mL de H₂O bidestilada y aforar a 25 mL. Utilizar guantes y cubrebocas para preparar (Acrilamida es toxica). Almacenar a 4°C protegida de la luz.

- **Buffer de corrida Laemmli**

Reactivo	Peso o volumen necesario			
	2X	5X	10X	
Tris base	3.0 g	15.0 g	30.0 g	25 mM
Glicina	14.0 g	70.0	140.0 g	192 mM
SDS	1.0 g	5.0 gr	10.0 g	0.1%
H ₂ O bidestilada	1L	1L	1L	

Nota. pH entre 8.3 y 8.6 (no ajustar, pero medirlo). Almacenar 4°C.

- **Buffer de transferencia 0.06% pH 8.3 – 8.5**

Reactivo	Peso o volumen necesario		
Tris base	3.03 g	6.06 g	9.09 g
Glicina	14.40 g	28.8 g	43.2 g
SDS	0.6 g	1.2 g	1.8 g
H ₂ O destilada	1L	2L	3 L
Metanol	200.0 mL	400 mL	600 mL

Nota. El pH no se ajusta. Al agregar el MeOH ajusta entre 8.1 y 8.5, el ideal es 8.3, pero dependerá de la cantidad de Tris, glicina y metanol (SDS no modifica el pH). Almacenar a 4°C.

- **Solución de lavado para WB TBS 1X y TBS-T**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Tris HCl	2.4 g
NaCl	4.8 g
H ₂ O bidestilada	1 L

Nota. Ajustar el pH con HCl pH 7.6. Para preparar el TBS-T añadir 500 µL de Tween 20 para 1L. Almacenar a 4°C.

- **Solución de Bloqueo al 5%**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Leche baja en grasa (preNAN)	2.5 g
TBS-T	50 mL

Nota. Se prepara en tubos cónicos de 50 mL (esterilizados previamente). Almacenar a 20°C.

- **Tris HCl 1M pH 6.8**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Tris HCl PM 121.14 g/mol	3.03 g
H ₂ O bidestilada	Aforar a 25 mL

Nota. Ajustar el pH a 6.8 con HCl. Almacenar a Temperatura ambiente

- **Buffer stripping**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Tris HCl 1M pH 6.8	6.25 mL
SDS 20%	10.0 mL (disolver 2g en 10 mL)
β-mercaptoetanol	700 µL
H ₂ O destilada	Aforar a 100 mL

Nota. Almacenar a Temperatura ambiente.

- **RIPA**

Reactivo	Peso o volumen necesario
Tris HCl, pH 7.4	150 µL
NP-40	200 µL
Deoxicolato de sodio	0.1 g
SDS	0.02 g
Cloruro de Sodio	0.174 g
EDTA	

H ₂ O bidestilada	Adicionar hasta 20 mL
------------------------------	-----------------------

Nota. Almacenar a -20°C

- **Gel de poliacrilamida**

	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
H ₂ O (inyectable)	6.1 mL	3.4 mL
Acrilamida 30%	1.3 mL	4.0 mL
Buffer pH 6.8 0.5M	2.5 mL	2.5 mL
Buffer pH 8.8 1.5M	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.1 mL
APS Persulfato de amonio 10% (APS)	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	10 µL
TOTAL	10.55 mL	11.5 MI

Nota. Volumen necesario para preparar 2 geles.