



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL INTERFERÓN ALFA SOBRE
LA EXPRESIÓN DEL GEN *LGALS9* EN QUERATINOCITOS

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. ELIZABETH BALDERAS RAMOS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LORENA MILFLORES FLORES

CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERÓNICA VALLEJO RUIZ

Enero 2026



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 14 de enero de 2026

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL
INTERFERÓN ALFA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN LGALS9 EN QUERATINOCITOS”**

Que presenta la estudiante **Elizabeth Balderas Ramos** con número de matrícula **223470506**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **“Estructura y Funcionamiento de los seres vivos”**, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dra. Dalia Molina Romero

Tutor Externo: Dr. Julio Roberto Reyes Leyva

Revisor: Dra. Laura Patricia Martínez Morales



Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Carta de No Plagio

A 17 de diciembre de 2025

A quien corresponda

Yo, Biol. Elizabeth Balderas Ramos, con matrícula 223470506, alumna de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, autora de esta tesis que lleva por título:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL INTERFERÓN ALFA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN LGALS9 EN QUERATINOCITOS”

Declaro que el presente trabajo de investigación es de mi autoría y original, siendo el resultado de trabajo hecho personalmente, el cual no he copiado de otro trabajo de investigación.

También declaro que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el presente trabajo de investigación.

Atentamente

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'E' and 'B' intertwined, enclosed within a circular loop.

Biol. Elizabeth Balderas Ramos

Agradecimientos

A la Secretaria De Ciencia, Humanidades,
Tecnología E Innovación, por la beca otorgada.
No. De beca 4313199

**Ciencia y
Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación



A la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme
cursar mis estudios de maestría.



Facultad de Ciencias Biológicas
BUAP

Al laboratorio de Biología Molecular ubicado en el Centro de
Investigación Biomédica de Oriente del IMSS por el apoyo
brindado para la realización del trabajo de investigación.



Agradecimientos

A mi directora de tesis la Dra. Lore por confiar en mi para la realización del proyecto de tesis y acompañarme en todo el camino.

A la Dra. Vero por el gran apoyo en la realización del trabajo en el laboratorio y por siempre alentarme, corregirme y compartirme su gran sabiduría.

A la Dra. Dalia por siempre estar pendiente y mandarme sus correcciones y por sus aportaciones a mi trabajo de investigación.

Al Dr. Julio por aportar sus conocimientos al trabajo de investigación y por todas las asesorías.

A las químicas Sandra Alor y Sandra Solis por ayudarme a cuidar el cultivo celular mientras estaba en clases.

Quiero agradecer también a las personas que me han acompañado a lo largo de estos años de estudio de la maestría.

En primer lugar, a mi esposo: Jaime muchas gracias por apoyarme, brindarme cariño y comprensión durante este tiempo, gracias por desvelarte conmigo, quedarte en los momentos que quería flaquear y siempre ser mi más grande fan y echarme porras, porque nunca dejas que me venga abajo. Te amo infinitamente.

A mis padres Isabel y Alfredo, por siempre estar pendientes de mí, por alentarme a continuar cada día y por todo su apoyo incondicional. Los amo.

A mis hermanas Zuri y Mari, por estar siempre al pendiente y por darme lo mas hermoso de la vida, mis sobrinos Abraham, Carlos y Marianne, que eran mi escape cuando me sentía derrotada. Los amo

A mis amigas Cony, Clau, Lay y Liz por brindarme su apoyo durante todo el proceso, por escucharme. Muchas gracias por su amistad.

A las amistades nuevas que conocí en el proceso; Natalia, Andrés y Lizardo, por hacer las clases más amenas y tener con quien quejarse del posgrado.

A Rosi y Chivis que conocí en el laboratorio y se convirtieron en tesoros muy grandes, me brindaron apoyo en momentos difíciles, ayudándome en todo y echarme porras. Las quiero mucho. A Montse por ser la instructora en el laboratorio cuando fui recibida.

A mis gatos Kit, Dobby, Ivy y Bagheraa por siempre estar a mi lado o encima de mí, cuando estudiaba o hacia tarea.

Muchas gracias a todas y cada una de estas personas, si ellas no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Galectinas	2
1.1.1 Galectina 9	4
1.1.2 Gen <i>LGALS9</i>	6
1.1.3 Región promotora del gen <i>LGALS9</i>	7
1.2 Interferón	9
1.2.1 Vía de señalización de interferones tipo I (IFN- α)	10
2. Antecedentes	12
2.1 Galectinas y cáncer	12
2.1.1 Gal-9 y cáncer	13
2.1.2 Gal-9 y otras enfermedades	16
2.1.3 Regulación de la expresión del gen <i>LGALS9</i>	17
2.2 Interferón y cáncer	18
2.2.1 Interferones y Gal-9	20
3. Justificación	22
4. Pregunta de investigación	23
5. Hipótesis	24
6. Objetivos	25
6.1 Objetivo General	25
6.2 Objetivos específicos	25
7. Material y métodos	26
7.1 Identificación de los sitios de respuesta a IFN en el fragmento del promotor de 727 pb del gen <i>LGALS9</i>	26
7.2 Cultivos celulares	26
7.3 Efecto del IFN- α sobre la expresión del gen <i>LGALS9</i>	27
7.4 PCR tiempo real	28
7.5 Efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del gen <i>LGALS9</i>	30
7.6 Transfección	34
7.7 Efecto del IFN- α sobre la expresión de la proteína Gal-9	35
7.8 Efecto del IFN- α sobre la secreción de la proteína Gal-9	36
al medio extracelular	36
7.9 Análisis estadístico	37

8.	<i>Resultados</i>	38
8.1	Identificación de los sitios de respuesta a IFN	38
8.2	Cuantificación de la expresión del gen LGALS9 inducido por IFN- α mediante PCR en tiempo real	39
8.3	Efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del gen LGALS9	41
8.4	Efecto del IFN- α en la expresión de Gal-9	42
8.5	Efecto del IFN- α sobre la secreción de Gal-9 en el medio extracelular	44
9.	<i>Discusión</i>	46
10.	<i>Conclusión</i>	52
11.	<i>Perspectivas</i>	53
12.	<i>Referencias</i>	54
13.	<i>Anexos</i>	67

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de las Galectinas. Las galectinas se dividen según su estructura molecular en tres grupos.....	2
Figura 2. Las interacciones funcionales de las galectinas con los glicoconjugados de la superficie celular y extracelulares favorecen la adhesión y la señalización celular.....	3
Figura 3. Estructura de Gal-9. Presenta dos dominios de reconocimiento a carbohidratos no homólogos. Un DRC N-terminal de 148 aminoácidos y un DRC C-terminal de 149 aminoácidos unidos por un polipéptido llamado dominio enlazador.....	4
Figura 4. Gal-9 tiene funciones inmunomoduladoras.....	5
Figura 5. Representación esquemática del gen <i>LGALS9</i> , en color amarillo se representa la región promotora, en color verde intenso las regiones codificantes (exones) y regiones no codificantes (intrones) en color verde claro.....	6
Figura 6. Representación esquemática de la región promotora del gen <i>LGALS9</i> , representando los sitios de unión a factores de transcripción, como TFIID, TBP conocidos por activación de cajas TATA, así como: AP1, Sp1 NF-kB, C-Myb, que actúan como activadores de la transcripción.....	8
Figura 7. Vía de señalización de los IFN tipo I. Los IFNs de tipo I se unen a su receptor heterodimérico compuesto por dos cadenas, IFNAR1 e IFNAR2..	11
Figura 8. Representación esquemática del vector pGL4.12, vector reportero de luciferasa [luc2CP] , se muestra la región de clonación múltiple para que el usuario clone un promotor.....	31
Figura 9 Representación esquemática del vector pGL4.727pGal9, vector obtenido por la clonación de un fragmento del promotor <i>LGALS9</i> 727 pb.....	32

Figura 10. Representación esquemática del vector pGL4.72 es un plásmido reportero que contiene el marco de lectura para la luciferasa Renilla (hRlucCP). Usado como control interno.	33
Figura 11. Región promotora de 727 pb del gen <i>LGALS9</i> . En la región de -565 a +162 pb se muestran Localización de los sitios IRE en color morado, en color verde se resalta el sitio ISRE y en color rojo se marca el inicio de la transcripción,	38
Figura 12. Efecto del IFN- α sobre el nivel de expresión del gen <i>LGALS9</i> . El tiempo de incubación con IFN- α fue de 3 horas a una concentración de 2 U/ μ l. Se muestra la cuantificación relativa determinada por PCR tiempo real, usando como control el gen endógeno <i>HPRT</i> . Para determinar si existía un cambio significativo se realizó una t-Student * p= 0.0456	39
Figura 13. Efecto del IFN- α sobre el nivel de expresión del gen <i>LGALS9</i> . El tiempo de incubación Inducido con IFN- α durante fue de 3 horas a una concentración de 20 U/ μ l. Se muestra la cuantificación relativa determinada mediante PCR tiempo real, usando como control el gen endógeno <i>HPRT</i> . Para determinar si existía un cambio significativo las diferencias significativas se realizó una t-Student * p=0.0373	40
Figura 14. Efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del fragmento de 727 pb del gen <i>LGALS9</i> . El tiempo de incubación fue de 3 h a una concentración de IFN- α de 2 U/ μ l. Paradeterminar si existía un cambio significativo se realizó una t-Student. * p=0.0423.	41
Figura 15. Efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del fragmento de 727 pb del gen <i>LGALS9</i> . El tiempo de incubación fue de 3 h a una concentración de IFN- α de 20 U/ μ l. La actividad del promotor se evaluó mediante los ensayos de luciferasa. Para determinar si existía un efecto significativo se realizó una t-Student * p=0.0423.	42
Figura 16. Efecto del IFN- α sobre la expresión de la proteína Gal-9 en células HaCaT. El tiempo de incubación fue de 3 horas a una concentración de IFN- α de 2 U/ μ l y 20 U/ μ l. La determinación del nivel de expresión de Gal-9 se realizó mediante ensayos de	

Western blot (panel izquierdo) empleando la proteína β -actina para normalizar. Se realizó la prueba de ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni, $p=0.6599$ 43

Figura 17. Efecto del IFN- α sobre la expresión de la proteína Gal-9 en células HaCaT. El tiempo de incubación fue de 6 horas a una concentración de IFN- α de 20 U/ μ l. La determinación del nivel de expresión de Gal-9 se realizó mediante un ensayo de Western blot empleando la proteína β -actina para normalizar. 44

Figura 18. Efecto del IFN- α sobre la secreción de Gal-9 al medio extracelular en células HaCaT. La concentración del IFN- α fue de 20 U/ μ l . a) Tiempo de incubación con IFN- α fue de 3 horas; b) Tiempo de incubación con IFN- α fue de 6 horas. La concentración de Gal-9 fue determinada por la técnica de ELISA. Se realizó la prueba de t-Student, no significativo (ns) $p= 0.5447$, ns $p= 0.4634$ 45

Índice de tablas

Tabla 1 Expresión alterada de Gal-9 en diferentes tipos de cáncer. 13

Tabla 2 Reactivos utilizados para la síntesis de ADNc 28

Tabla 3 Reactivos para PCR tiempo real..... 29

Tabla 4 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la PCR en tiempo real y el tamaño del producto de amplificación 29

Resumen

La galectina-9 (Gal-9) es una lectina que reconoce β -galactósidos, esta proteína se ha considerado como un biomarcador en diferentes tipos de cáncer, como son el cáncer de mama, de colon, cervicouterino, entre otros; debido a que se ha reportado una expresión alterada asociada a funciones clave durante la transformación maligna, tales como: la agregación, la adhesión celular y la evasión de la respuesta inmune. Gal-9 es codificada por el gen *LGALS9*, el cual puede ser regulado por estímulos inmunomoduladores como los interferones tipo I. Se ha reportado que el interferón alfa (IFN- α) aumenta la expresión de Gal-9 en diferentes líneas celulares. En este trabajo se evaluó el efecto del IFN- α sobre la actividad de la región promotora del gen *LGALS9*, su expresión a nivel de ARNm y proteína, así como su secreción al medio de cultivo en queratinocitos humanos (línea celular HaCaT). Los ensayos de luciferasa demostraron que el IFN- α incrementa significativamente la actividad del promotor. Asimismo, los resultados de PCR en tiempo real revelaron un aumento en los niveles de ARNm del gen *LGALS9* tras la estimulación con IFN- α , confirmando una regulación positiva a nivel transcripcional. Sin embargo, los análisis de Western blot y ELISA no mostraron variaciones en la cantidad de proteína Gal-9 intracelular ni en su secreción. En conjunto, estos hallazgos amplían la comprensión del papel del IFN- α como regulador de genes inmunomoduladores y aportan bases para el estudio de la interacción entre interferones y galectinas en procesos inmunomoduladores.

1. Introducción

1.1 Galectinas

Las galectinas son lectinas que presentan alta afinidad por glicoconjugados que contienen β -galactósidos, esta interacción la ejercen a través de sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRC) altamente conservados (Bänfer y Javob, 2020) de aproximadamente 130 aminoácidos, compuestos por dos hojas- β antiparalelas y una β -sándwich. La estructura β -sándwich del DRC está compuesta por once cadenas β ($\beta 1$ a $\beta 11$) que corren de manera antiparalela, seis de ellas ($\beta 1$, $\beta 10$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$) definen la cara de unión del azúcar (cara S) del DRC y las cinco restantes ($\beta 11$, $\beta 2$, $\beta 7$, $\beta 8$, $\beta 9$) definen la cara F opuesta (Dings *et al.*, 2018). Se han identificado 16 galectinas en vertebrados y se clasifican en tres familias de acuerdo con su estructura molecular: galectinas prototipo, con un solo DRC (galectina 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14 y 15); galectina de repetición en tándem, con dos DRC unidos por un péptido enlazador de longitud variable (galectinas 4, 6, 8, 9 y 12); y el tipo quimera, con un DRC fusionado a un extremo amino terminal largo y flexible con un único representante, la galectina-3 (Gal-3) (Tong y Stowel, 2023) (Figura1).

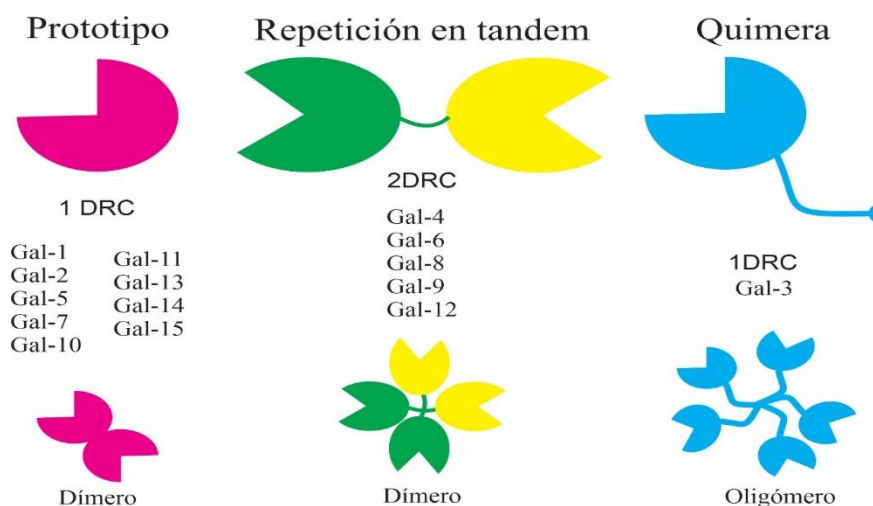


Figura 1. Clasificación de las Galectinas. Las galectinas se dividen según su estructura molecular en tres grupos: prototipo Gal 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14 y 15; quimérica con su único representante Gal-3; y repetición en tándem Gal 4, 6, 8, 9 y 1. La dimerización y oligomerización de las galectinas aumenta la valencia de unión, lo cual es importante para su función. Modificado de Wang et al., 2018.

Las galectinas se sintetizan en el citoplasma y pueden estar presentes en diferentes regiones celulares (intra y extracelular) (Figura 2), estas proteínas carecen de la secuencia peptídica señal necesaria para su secreción a través de la ruta clásica retículo endoplásmico- aparato de Golgi (RE-Golgi). Sin embargo, se ha reportado que las galectinas se podrían secretar a través de translocación directa de membrana, secreción exosomal, melanosomas, microvesículas, muerte por trampa extracelular de eosinófilos y autofagia secretora (Gossink *et al.*, 2025). Las galectinas se expresan en diferentes tejidos y tipos celulares, y pueden tener diferentes localizaciones, cumpliendo roles fisiológicos al interactuar con glicoconjugados específicos, es decir, estructuras de carbohidratos unidas a proteínas, péptidos y lípidos. De esta manera, las galectinas descifran la información codificada por la maquinaria de glicosilación y traducen esta información en funciones celulares como en la inflamación, las

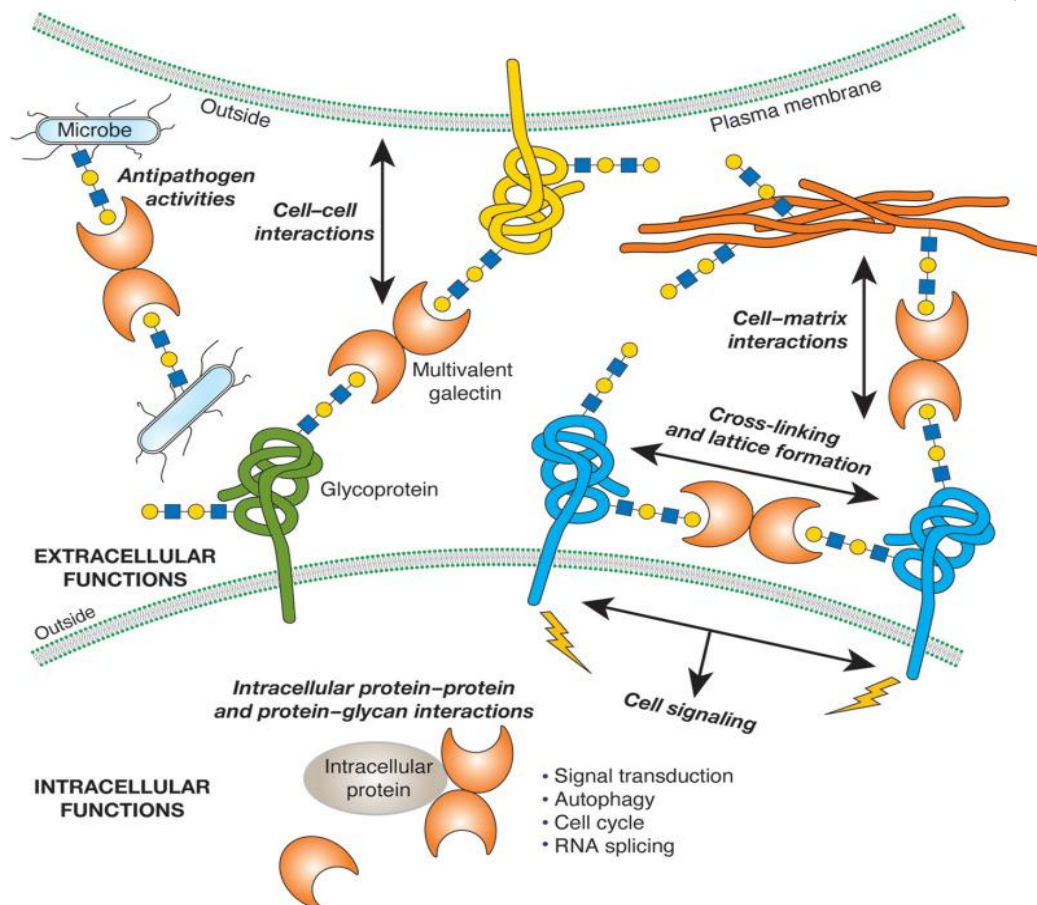


Figura 4. Las interacciones funcionales de las galectinas con los glicoconjugados de la superficie celular y extracelulares favorecen la adhesión y la señalización celular. Las interacciones de las galectinas con proteínas intracelulares pueden contribuir a la regulación de las vías intracelulares (Cummins *et al.*, 2022).

respuestas inmunitarias, la migración celular, la autofagia y la señalización (Tong y Stowel., 2023). Además, las galectinas también participan en interacciones directas proteína-proteína, influyendo así en la señalización celular, la progresión del ciclo celular, la apoptosis e incluso el empalme de pre-ARNm (Thijssen *et al.*, 2015) (Figura 2).

Muchas galectinas se expresan de forma constitutiva en una amplia gama de tejidos, sin embargo, cada galectina puede exhibir patrones de expresión tisular únicos y algunos procesos como la diferenciación tisular y la inflamación, pueden potenciar la expresión de las galectinas (Tong y Stowel., 2023).

1.1.1 Galectina 9

Galectina 9 (Gal-9) pertenece al grupo de repetición en tándem y fue aislada de riñón embrionario de ratón en 1997 e identificada por Wada y Kanwar (Wada & Kanwar., 1997). Está formada por un DRC N-terminal de 148 aminoácidos y un

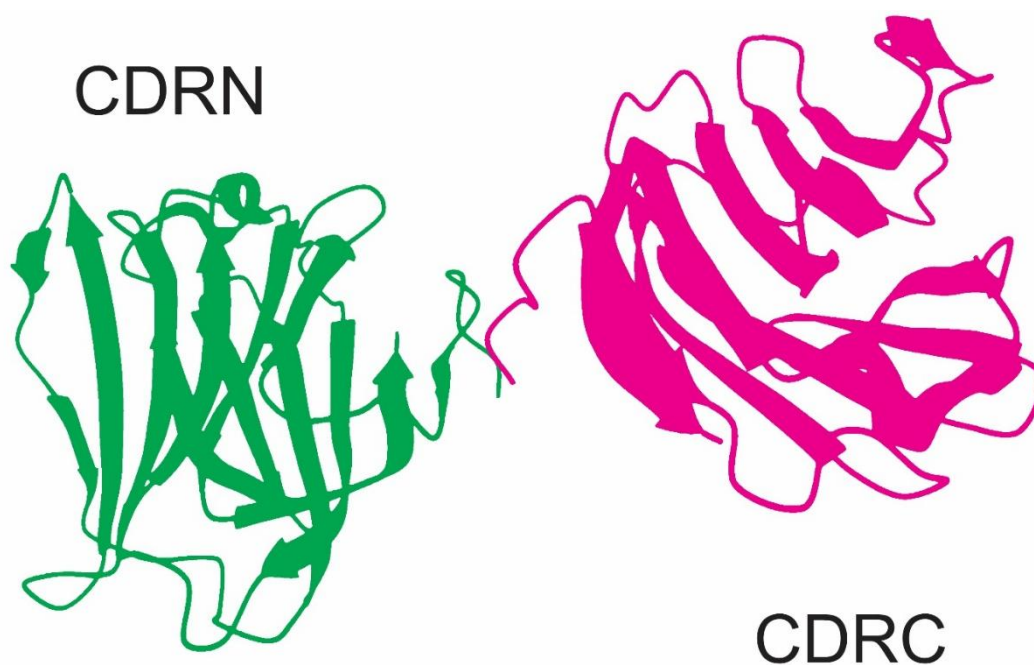


Figura 7. Estructura de Gal-9, Presenta dos dominios de reconocimiento a carbohidratos no homólogos. Un DRC N-terminal de 148 aminoácidos y un DRC C-terminal de 149 aminoácidos unidos por un polipéptido llamado dominio enlazador. Contienen residuos de aminoácidos plegados de forma compacta en una estructura tipo sándwich de láminas β de cinco y seis cadenas, reconocen estructuras básicas de N-acetil-lactosamina y diferentes oligosacáridos que contienen β-galactósidos (Nagae *et al.*, 2008).

DRC C-terminal de 149 aminoácidos unidos por un polipéptido llamado dominio enlazador, con un peso aproximado de 39.5 KDa (John y Mishra., 2016) (Figura 3). Los DRC permiten que Gal-9 se enlace transversalmente con receptores glicosilados, lo que lleva a la formación de redes multivalentes de galectina-glicano (Gossink *et al.*, 2025). Gal-9 humana, se expresa en una amplia variedad de tipos de células, incluidas las células endoteliales, las células epiteliales intestinales, los fibroblastos y prácticamente todas las células inmunes (Heusschen, Griffioen, Thijssen., 2013, Holderried *et al.*, 2019).

La Gal-9 participa en diversas funciones biológicas entre las cuales se incluyen la agregación celular, la adhesión la modulación de la inflamación, teniendo un efecto sobre las células del sistema inmune como Th1, Th2 y Th17 (Matsumoto *et al.* 1998) (Figura 4), además de inducir apoptosis y regular negativamente la proliferación de células cancerígenas (Heusschen, Griffioen, Thijssen., 2013).

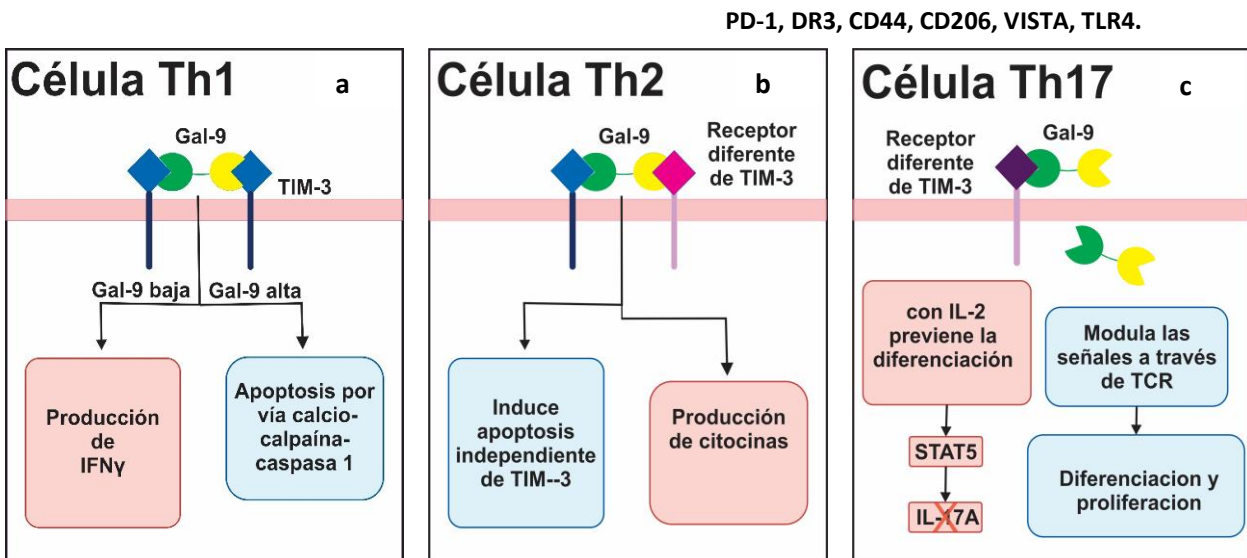


Figura 10. Gal-9 tiene funciones inmunomoduladores. a) Gal-9 se une a TIM-3 en las células (Th1), Dosis altas de Gal-9 provocan la muerte de las células T a través de la vía calcio-calpaína-caspasa 1, mientras que dosis bajas de Gal-9 estimulan la producción de IFN γ . b) Gal-9 podría ser capaz de inducir apoptosis a través de otro receptor que no sea TIM-3 en células Th2. Además, induce producción de citocinas como son IL-4, IL-6 e IL-10 que ayudan a la diferenciación de células Th2. c) Gal-9 se asocia con interleucina-2 (IL-2) para prevenir la diferenciación de células Th17 a través de STAT5 inhibiendo la producción de IL-17. Gal-9 modula las señales de TCR para mejorar la diferenciación y proliferación de Th17. Modificada de Gossink *et al.*, 2025.

Gal-9 puede activar vías de señalización en varios tipos de células a través de múltiples receptores. Estos receptores incluyen: molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas-3-Grabbing Non-integrina (DC-SIGN), inmunoglobulina de células T y proteína mucina 3 (TIM-3), Dectin-1, receptor de muerte 3 (DR3), proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), 4-1BB, CD40, CD44, CD206, proteína disulfuro isomerasa (PDI), TLR4 y supresor de la activación de células T que contiene Ig de dominio V (VISTA) (Gossink *et al.*, 2025).

Uno de sus ligandos más estudiados es el receptor TIM-3, expresado en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados, células NK, células dendríticas y macrófagos (Anderson *et al.*, 2016). La unión de Gal-9 a TIM-3 desencadena señales inhibitorias que conducen a la apoptosis o disfunción de linfocitos T efectoras, promoviendo un estado de agotamiento inmunitario característico de infecciones crónicas y microambientes tumorales (Zhu *et al.*, 2005; Monney *et al.*, 2002).

1.1.2 Gen *LGALS9*

El gen *LGALS9*, codifica a la Gal-9, está localizado en el cromosoma 17q11.2 comprende de la región 27631148 a 27649560 pb, con un tamaño aproximado de 18412 pb (*Universal Protein* [UniProt]; Moar & Tandon., 2021) y contiene 11 exones (Chiariotti *et al.*, 2002) (Figura 5). Se han reportado variantes de ARNm resultantes del proceso de empalme alternativo que dan lugar a diferentes isoformas de Gal-9; Gal-9 larga (Gal-9L), Gal-9 mediana (Gal-9M) (eliminación del exón 5), Gal-9

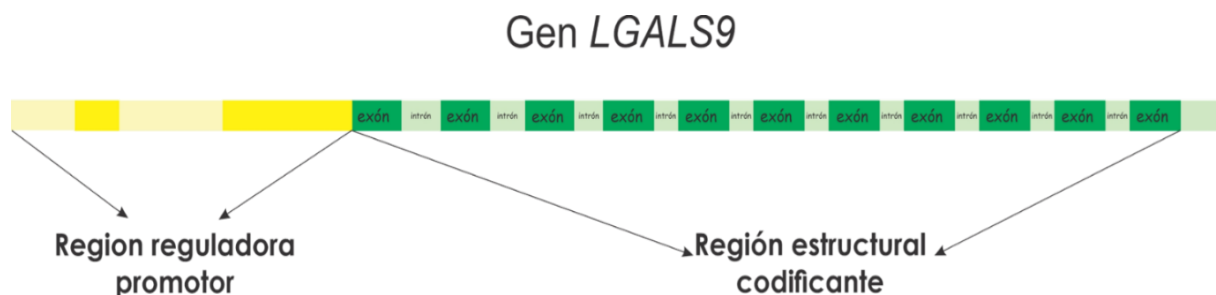


Figura 12. Representación esquemática del gen *LGALS9*, en color amarillo se representa la región promotora, en color verde intenso las regiones codificantes (exones) y regiones no codificantes (intrones) en color verde claro. Modificado de Heusschen, Griffioen, Thijssen., 2013.

pequeña (Gal-9S) (eliminación del exón 5 y 6) (Chabot *et al.*, 2002; Gieseke *et al.*, 2013; Rio-Aige *et al.*, 2022). En humanos se han descrito dos genes adicionales parecidos a *LGALS9*: *LGALS9B* y *LGALS9C* (Leffler *et al.*, 2002), localizados en el cromosoma 17p11.2 cercano a *LGALS9*, los cuales no codifican proteínas (Heusschen, Griffioen, Thijssen., 2013).

1.1.3 Región promotora del gen *LGALS9*

En un estudio realizado por el grupo de trabajo se identificó, caracterizó y evaluó la actividad del promotor del gen *LGALS9*. El promotor identificado presenta características de un promotor clásico, es regulado por cajas TATA, las cuales son reconocidas por proteínas de unión a cajas TATA (TBP, por sus siglas en inglés de *TATA binding protein*), identificadas en las posiciones -1836, -677, -536, -464, -436, -416, -327 y +6; y se encontraron tres sitios Inr (Iniciador) en las posiciones -1861, -1372 y -46, así como otros elementos de respuesta tales como: AP1, Sp1 NF-kB, C-Myb, que actúan como activadores de la transcripción (Figura 6).

La actividad de la región promotora fue caracterizada mediante ensayos de luciferasa para lo cual se clonó el promotor de 2089 pb y versiones más cortas del promotor (1479 pb, 727 pb y 222 pb). El resultado de los ensayos de luciferasa mostró mayor actividad en el fragmento de 727 pb en comparación con los fragmentos de 2089, 1479 y 222 pb (Aparicio., 2019).

Analizando la secuencia del promotor se encontraron elementos de respuesta a interferón alfa, (IFN- α) como al factor génico estimulado por interferón 3 (ISGF-3) en las posiciones -1616, -657, -417, -108 y -57 (Figura 6).

El grupo de investigación interesado en comprender la regulación del gen *LGALS9*, analizó mediante un modelado *in silico*, el fragmento de la región promotora de 727 pb, encontrando, a través del programa LASAGNA-Search 2.0 que el promotor posee un sitio ISRE (Elemento regulador estimulado por interferones) localizado en la posición de -42 a -33 pb. Además, se encontraron sitios IRE (Elemento Regulador del Interferón), que son reconocidos por los factores de transcripción IRF1/3/5/7/8/9 y que podrían estar involucrados en la activación de la transcripción del gen *LGALS9* como respuesta a los interferones (Vega., 2021). Es importante mencionar que los sitios IRE son secuencias más cortas que no son reconocidas por ISGF3, complejo que se une a los sitios ISRE, los sitios IRE presentan actividad mediante la unión a factores de transcripción IRF que no forman el complejo ISGF3 (Michalska *et al.*, 2018; Antonczyk *et al.*, 2019).

1.2 Interferón

Los interferones (IFNs) son una familia de proteínas que activan ciertas vías de señalización, se agrupan de acuerdo con su origen celular y sus agentes inductores.

Su nombre se debe a su capacidad de “interferir” con la replicación viral. Son producidas por distintos tipos celulares, aunque los IFNs se identificaron originalmente como potentes factores antivirales, también se reconoció que regulan las respuestas inmunitarias. Después de unirse a su receptor específico, los IFNs activan la vía de transducción de señalización JAK-STAT que activa a su vez una amplia gama de genes que son conocidos por su papel no sólo en la respuesta antiviral sino también en procesos de inmunomodulación y control de la proliferación. La inhibición del ciclo viral o de la proliferación de células por el IFN está asociada con cambios fisiológicos, algunos de los cuales dependen de la actividad de proteínas específicas que son inducibles por IFNs (De Andrea *et al.* 2002). Los IFNs participan en una amplia gama de procesos fisiológicos (Biron, 1999), traducción de RNAm (Williams., 2001), estabilidad de proteínas y RNA (Silverman, 1997; Nyman *et al.*, 2000) presentación del antígeno (Taniguchi *et al.*, 2001), tráfico nuclear (Enninga *et al.*, 2002), diferenciación, división celular y apoptosis (Kissil & Kimchi., 1998). Se han clasificado

principalmente en tres clases: tipo I, que incluyen principalmente a los IFN- α , β y κ , tipo II, cuyo miembro más representativo es el IFN- γ y tipo III que incluye al IFN- λ (Pestka, Krause & Walter., 2004).

1.2.1 Vía de señalización de interferones tipo I (IFN- α)

Los IFN del tipo I, son reconocidos por un receptor heterodimérico compuesto por las subunidades 1 y 2 del receptor de IFN- α (IFNAR, por sus siglas en inglés de Interferon Alpha Receptor). Tras la interacción con el ligando, ocurre la fosforilación del receptor mediada por Janus quinasa (JAK) que conduce al reclutamiento y activación del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT1 y STAT2) citoplasmáticos; una vez fosforiladas STAT1 y STAT2 se asocian con el factor regulador de interferón 9 (IRF9, por sus siglas en inglés de Interferon Regulatory Factor 9) presente en el citoplasma para formar un complejo heterotrimérico llamado factor 3 estimulado por IFN (ISGF3, por sus siglas en inglés de Interferon Stimulated Gene Factor 3), el cual es transportado al núcleo, donde reconoce el elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE, por sus siglas en inglés de IFN-Stimulated Response Element) para activar los genes que presentan esta secuencia (Michalska *et al.*, 2018) (Figura 7). De forma similar, el IRF1 puede regular la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) en respuesta a IFN-I e IFN-II mediante la unión directa al ISRE o elemento sensible a IRF (IRE). La activación parcialmente superpuesta y diferencial de los complejos de factores de transcripción y la regulación de la expresión génica diana está dada por IFN-I (Michalska *et al.*, 2018).

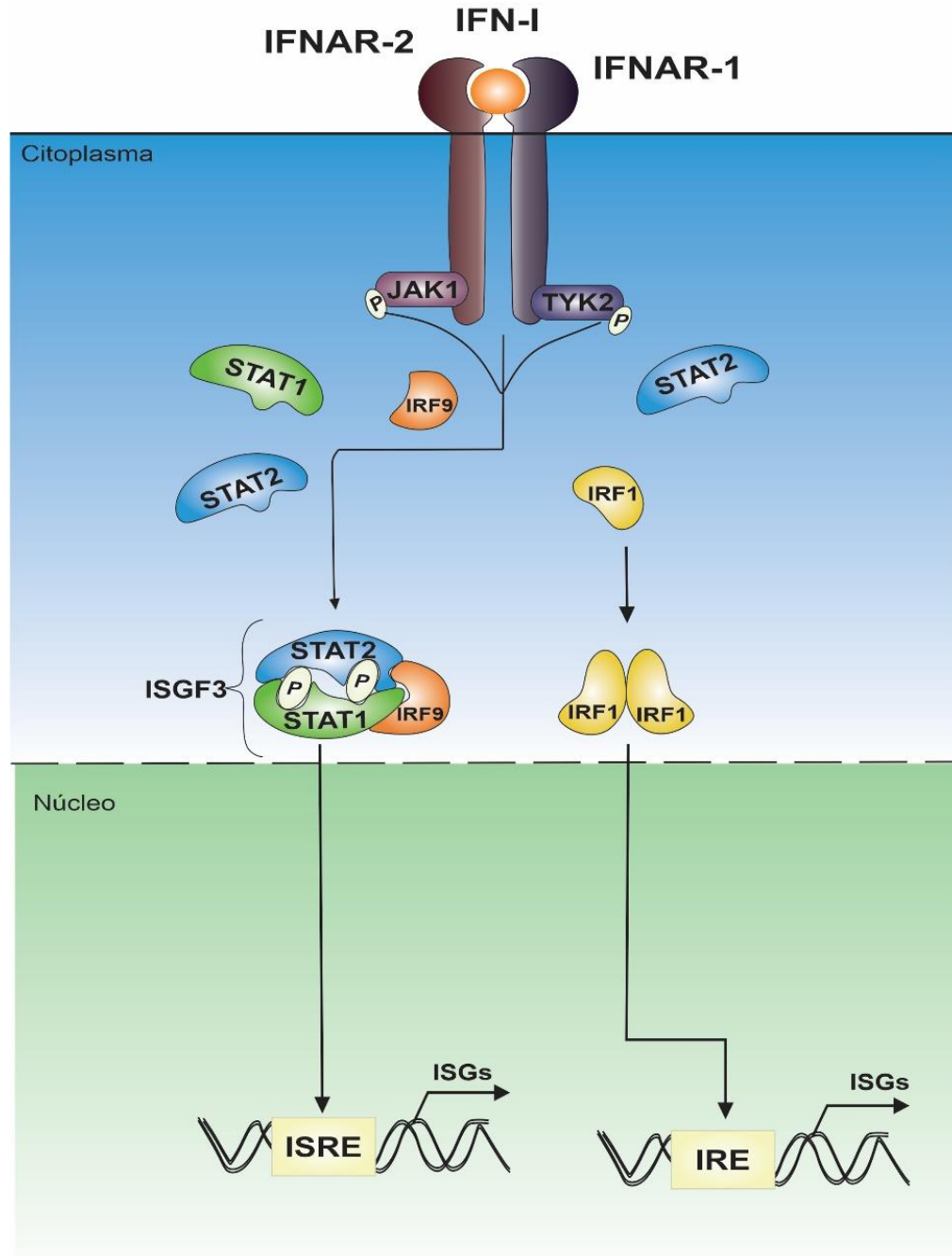


Figura 16. Vía de señalización de los IFN tipo I. Los IFNs de tipo I se unen a su receptor heterodimérico compuesto por dos cadenas, IFNAR1 e IFNAR2, que señalan a través del reclutamiento de las quinasas activadas TYK2 y JAK1, la activación de estas JAKs provoca la fosforilación de tirosina de STAT1 y STAT2, y posteriormente la unión de IRF9 formando el complejo llamado ISGF3 (*IFN stimulated gene factor 3*), después se transloca al núcleo y se une a elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) en los promotores de ISGs. Los IRF forman complejos que se translocan al núcleo y encuentran sitios denominados IRE presentes en los ISGs. Imagen modificada de Michalska *et al.*, 2018.

2. Antecedentes

2.1 Galectinas y cáncer

Las galectinas son una familia de lectinas animales que pueden participar en varios aspectos del cáncer, incluyendo la carcinogénesis, el crecimiento tumoral, la migración celular, la angiogénesis, la invasión y la metástasis (Mansour *et al.*, 2022). Se ha documentado que el cambio de expresión de las galectinas-1, -3 y -9 están mayormente implicado o relacionado con la progresión del cáncer (Mariño *et al.*, 2023).

La expresión de Gal-1 se ha visto incrementada en la mayoría de los tumores y se ha propuesto como un biomarcador de mal pronóstico en cáncer de colon, pulmón, próstata, adenocarcinoma de mama y melanoma (Thijssen *et al.*, 2015).

Gal-3 presenta altos niveles de expresión en cáncer de tiroides, en tumores del sistema digestivo y sistema urinario, así como en cáncer de ovario (Mansour *et al.*, 2022, Ko *et al.*, 2023, Fuselier *et al.*, 2023).

En cáncer de mama se ha reportado que la Gal-3 participa en la evasión de la vigilancia inmunitaria y elimina las células T activadas, en cáncer de próstata, altos niveles favorecen la transformación maligna y la progresión de la enfermedad (Ebrahim *et al.*, 2014, Mansour *et al.*, 2022).

Para la Gal-7 se ha documentado un cambio de expresión en cáncer de mama y se relaciona con la progresión del cáncer y con una alta probabilidad de desarrollar metástasis (Demers *et al.*, 2010).

La Gal-4 ha sido caso de estudio en los últimos años, aunque siguen siendo relativamente pocos los reportes en comparación con otras galectinas, sin embargo, se ha visto que el incremento de expresión de Gal-4 puede aumentar el riesgo de metástasis en tracto intestinal, también se ha encontrado expresada en cáncer de pulmón y de páncreas (Ebrahim *et al.*, 2014).

Las funciones de otras galectinas incluidas galectina-2, -10, -12, -13, -14 y 16, no han sido descritas de manera extensiva en el cáncer (Nehmé y Pierre, *et al.*, 2023).

2.1.1 Gal-9 y cáncer

Los cambios de expresión de Gal-9 han sido estudiados en diversos tipos de cáncer, tal y como se muestra en la Tabla 1 donde se resumen algunos trabajos que se han realizado con respecto a la expresión de Gal-9 en cáncer.

Tabla 1 Expresión alterada de Gal-9 en muestras de tejido de diferentes tipos de cáncer.

Tipo de cáncer	Origen	Nivel de expresión	Proteína/ RNA	Pronóstico	Localización	Referencia
Mama	Muestra de tejido	Disminución de la expresión	Proteína	Metástasis	Citoplasma	Irie <i>et al.</i> , 2005
Piel	Muestra de tejido	Disminución de la expresión	Proteína	Metástasis	Citoplasma, membrana	Kageshita <i>et al.</i> , 2002
Cervical	Muestra de tejido	Disminución de la expresión	Proteína	Menor probabilidad de supervivencia	Citoplasma	Liang <i>et al.</i> , 2008
Linfoma	Muestra de tejido	Aumento de la expresión	Proteína/RNA	Mayor probabilidad de supervivencia	No especificado	Zhang <i>et al.</i> , 2014

Gal-9 se ha analizado en cáncer de ovario y su alta expresión se correlacionó con la metástasis a los ganglios linfáticos, lo que sugiere un papel importante de la Gal-9

en la progresión de la enfermedad (Mansour *et al.*, 2022). Por otro lado, en tumores de pacientes con cáncer cervicouterino se encontró un mayor nivel de expresión del gen *LGALS9*, así como de su producto proteico en estadios clínicos tempranos, asimismo se encontró que los mayores niveles de expresión se relacionaron con una mejor supervivencia global. Adicionalmente, se analizaron vías que estaban relacionadas con los niveles de expresión de Gal-9 y se encontró que los tumores con mayor expresión de *LGALS9* estaban enriquecidos en vías inmunes como la del IFN- α y del complemento (Mendieta-Carmona *et al.*, 2023).

Diversos tipos de cáncer muestran niveles elevados de Gal-9 secretada en el suero o microambiente tumoral. En carcinoma hepatocelular, por ejemplo, la sobreexpresión y liberación de Gal-9 por las células tumorales se correlaciona con un pronóstico desfavorable y con una reducción en la infiltración de linfocitos CD8⁺ (Fujita *et al.*, 2021). En cáncer de mama triple negativo, se ha descrito que la Gal-9 secretada participa en la remodelación del microambiente tumoral al favorecer la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2, promotor del crecimiento tumoral (Lereverend *et al.*, 2025). En melanoma y carcinoma gástrico, altos niveles de Gal-9 soluble en suero se asocian con un incremento en la evasión inmunitaria y con metástasis avanzadas (Lai *et al.*, 2023). Sin embargo, algunos reportes sugieren un papel dual: en ciertos contextos, Gal-9 secretada puede potenciar la inmunidad antitumoral mediante la activación de células NK y la promoción de apoptosis en células malignas (Fujita *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2024).

Reyes-Vallejo *et al.*, (2022) analizó los niveles séricos de Gal-9 en mujeres con lesiones intraepiteliales cervicales y cáncer cervical. Los resultados indicaron que la concentración de Gal-9 en suero fue significativamente más alta en pacientes con cáncer cervical en comparación con mujeres con epitelio cervical normal o con lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado (Reyes-Vallejo *et al.*, 2022). Además, se observó un aumento progresivo de los niveles de Gal-9 conforme avanzaba el estadio clínico de la enfermedad, siendo más elevados en el estadio IV (Reyes-Vallejo *et al.*, 2022).

En el cáncer cervicouterino, se ha observado una sobreexpresión tanto de Gal-9 como de TIM-3 en el microambiente tumoral, lo cual sugiere una participación relevante en la progresión de la enfermedad. Diversos estudios han demostrado que la activación de esta vía se asocia con una reducción de la actividad citotóxica de las células T y una disminución en la producción de IFN- γ , facilitando así la persistencia del virus del papiloma humano (VPH) y el desarrollo tumoral (Sakuishi et al., 2011; Dardalhon et al., 2010).

En líneas tumorales de HeLa y SiHa, derivadas de cáncer cervicouterino, se observaron niveles reducidos de expresión del gen *LGALS9*, mientras que la modulación epigenética restauró parcialmente su expresión, lo que sugiere que la expresión de Gal-9 puede ser regulada por mecanismos epigenéticos (Zhang et al., 2019).

En modelos de cáncer de mama, estudios en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 demostraron que la sobreexpresión de *LGALS9* reduce la capacidad migratoria e invasiva de las células, promoviendo un fenotipo menos agresivo. Por el contrario, la disminución de su expresión se relacionó con mayor potencial metastásico (Lereverend et al., 2025). En líneas 4T1 de carcinoma mamario murino, se observó que los altos niveles de Gal-9 se asocian con una reducción en la formación de metástasis pulmonares, lo que respalda su papel como supresor tumoral (Lereverend et al., 2025).

En el contexto inmunológico, se ha descrito la expresión inducible de Gal-9 en líneas Jurkat (células T humanas) y THP-1 (monocitos humanos). En las células Jurkat, la modulación genética de *LGALS9* alteró la respuesta de señalización intracelular asociada a receptores inmunitarios, mientras que en THP-1 se observó que el incremento de Gal-9 se correlaciona con un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación y de respuesta inflamatoria (Yang et al., 2022).

De manera similar, en líneas NK-92 (células asesinas naturales), la inducción de Gal-9 se asoció con un aumento de la liberación de citocinas proinflamatorias y con una actividad citotóxica potenciada, lo que indica que esta lectina también cumple

funciones inmunoefectoras relevantes (Carreca *et al.*, 2022). En modelos hepáticos como las líneas Huh7 modificadas con reportes genéticos de *LGALS9*, se ha demostrado que una mayor expresión de Gal-9 se asocia con una respuesta celular más eficiente frente al estrés endosomal y una mayor viabilidad bajo condiciones de estrés oxidativo (Munson *et al.*, 2021; Estupiñán *et al.*, 2025).

2.1.2 Gal-9 y otras enfermedades

La Gal-9 ha sido ampliamente vinculada con diversas enfermedades autoinmunes, en las que cumple un papel regulador en la activación y supresión de linfocitos T, así como en la modulación de la respuesta inflamatoria. En el lupus eritematoso sistémico, estudios recientes han reportado niveles séricos elevados de Gal-9 correlacionados con la actividad clínica de la enfermedad y con la presencia de autoanticuerpos anti-DNA, sugiriendo su participación como marcador de daño tisular y de activación inmunológica (Wang *et al.*, 2023). De igual forma, en pacientes con artritis reumatoide, se ha detectado un aumento significativo de Gal-9 tanto en el suero como en el líquido sinovial, asociado con la infiltración de linfocitos T y macrófagos en las articulaciones inflamadas, lo que respalda su papel en la amplificación de la respuesta inmune local (Nishihara *et al.*, 2022). En esclerosis múltiple, la Gal-9 ha mostrado efectos duales, pudiendo limitar la expansión de linfocitos Th17 proinflamatorios y al mismo tiempo promover la apoptosis de células T autorreactivas, lo que sugiere que su función depende del estadio de la enfermedad y del entorno inflamatorio (Mou *et al.*, 2022). Estos hallazgos en conjunto posicionan a la Gal-9 como un modulador clave en los mecanismos de tolerancia inmunológica y autoinmunidad.

Además de su implicación en patologías autoinmunes, la Gal-9 ha sido identificada como un importante mediador en enfermedades metabólicas y cardiovasculares crónicas. En diabetes mellitus tipo 2, se ha reportado un incremento en los niveles séricos de Gal-9 y en su expresión en tejido adiposo, correlacionado con resistencia a la insulina y disfunción metabólica, aunque también se ha propuesto un papel protector mediante la modulación de la inflamación inducida por macrófagos (Li *et al.*, 2022). En modelos de aterosclerosis,

se ha observado que Gal-9 se expresa en células endoteliales y macrófagos de las placas ateromatosas, donde parece contribuir a la regulación del reclutamiento de linfocitos y a la estabilización de la placa, reduciendo el riesgo de ruptura (Arikawa *et al.*, 2021). Asimismo, en fibrosis hepática y renal, la expresión elevada de Gal-9 se asocia con la activación de células estrelladas y miofibroblastos, promoviendo procesos de remodelación tisular que, en etapas tempranas, podrían tener un efecto antifibrótico dependiente del contexto (Seki *et al.*, 2023).

2.1.3 Regulación de la expresión del gen *LGALS9*

Profundizar en el conocimiento de los factores que podrían estar participando en los cambios de expresión del gen *LGALS9* es de gran importancia, considerando que los cambios en su expresión se asocian con el desarrollo de enfermedades incluyendo el cáncer. Para el caso del cáncer cervicouterino se sabe que el agente etiológico es el virus del papiloma humano (VPH), estos virus expresan proteínas que tienen un papel en la transformación maligna. Nuestro grupo de investigación se interesó en conocer el efecto de la proteína E6, de varios genotipos de VPH sobre la expresión de genes en la línea celular HaCaT. Lo anterior se realizó a partir de resultados de microarreglos de expresión de genes realizados por el grupo de la Dra. Aguilar Lemarroy.

Los análisis mostraron un aumento en la expresión del gen *LGALS9* en la línea celular transfectada con E6 de VPH-16 y VPH-84, y una disminución de la expresión de Gal-9 en presencia de VPH-18 y VPH-62 (Caporal., 2019). Lo que sugiere que durante la infección viral se puede ver afectada la expresión del gen que codifica para la Gal-9.

Algunos estudios recientes han sugerido que la regulación del gen *LGALS9* puede estar vinculada a procesos epigenéticos, se encontró que la DNA metiltransferasa 3 alfa (DNMT3A) es regulada negativamente y se asoció con la disminución en la metilación de la región promotora del gen *LGALS9* en células HeLa, promoviendo la expresión de Gal-9, estos resultados se asociaron con diagnóstico positivo a VPH-18 en muestras de pacientes con cáncer de cuello uterino (Zhang *et al.*, 2019).

Otro estudio mostró que la metilación de la histona 3 en la lisina 9 (H3K9) y la metilación del ADN son marcadores epigenéticos correlacionados con el silenciamiento génico. DNMT3A media cambios epigenéticos del gen *LGALS9* al unirse directamente a sus regiones promotoras *in vitro* y la expresión de SUV39H1 regula el nivel de H3K9me3 en la región promotora de DNMT3A lo que se correlaciona con el nivel de expresión Gal-9 en cáncer cervicouterino (Zhang *et al.*, 2020).

Un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en las líneas celulares HaCaT, SiHa y HeLa en las que se caracterizó el nivel de expresión del gen *LGALS9* y del producto proteico, y su relación con la metilación del promotor y la acetilación de las lisinas 9 y 14 de la histona 3, se encontró que la línea celular HaCaT (no tumoral) presentaba mayores niveles de expresión del gen *LGALS9* con respecto a las líneas celulares de cáncer cervicouterino, y estos niveles de expresión se relacionaron con la acetilación de la lisina 9 de la histona 3 adyacente a la región promotora de dicho gen lo que influye directamente en su expresión génica (Armenta-Castro *et al.*, 2020).

En tumores de cáncer cervicouterino con mayor nivel de expresión del gen *LGALS9* se identificaron vías enriquecidas, dentro de éstas se encontró la del INF- α . Sugiriendo no sólo una relación entre el nivel de expresión de la Gal-9 con la respuesta inmune en estos tumores, sino también un posible mecanismo de regulación transcripcional (Mendieta-Carmona *et al.*, 2023).

2.2 Interferón y cáncer

El desarrollo del cáncer está determinado por el equilibrio entre la proliferación y las interacciones entre poblaciones heterogéneas de células en el microambiente tumoral (MET). Estas interacciones son controladas por señalizaciones especializadas guiadas por citocinas (Sufiyan *et al.*, 2024). Entre estas citocinas, los IFNs desempeñan funciones inmunoestimulantes en las células inmunitarias del MET. Las oncoproteínas expresadas en las células cancerosas son liberadas después de la muerte celular, éstas son presentadas a las células T por las células

presentadoras de antígenos (APC), como las CD (Células Dendríticas) y los macrófagos, que provocan la activación de las células T efectoras. Las células T efectoras activadas se infiltran en los tejidos tumorales, donde reconocen y destruyen las células cancerosas con los mismos antígenos tumorales, lo que resulta en la liberación de más antígenos. Este proceso cíclico se define como el ciclo de inmunidad contra el cáncer (Zhu *et al.*, 2019). Los estudios actuales sugieren que los IFN regulan cada paso del ciclo de inmunidad contra el cáncer, lo que contribuye a una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales los IFN regulan la inmunidad contra el cáncer (Zhang *et al.*, 2021).

Los IFN pueden afectar la proliferación celular en células tumorales tanto al prolongar como al bloquear el ciclo celular (Balkwill, Watling, Taylor, 1978). Los IFN de tipo I pueden afectar el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración, la apoptosis y otras funciones de las células tumorales a través de efectos citotóxicos, citostáticos y antiangiogénicos (Zhou *et al.*, 2020). Tanto el IFN- α como el IFN- β regulan las vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas (Thyrell *et al.*, 2002). Mecánicamente, el IFN- α y el IFN- β inducen la transcripción del gen TP53, inhiben la proliferación e inducen la apoptosis de las células cancerosas (Takaoka *et al.*, 2003). Además, también inducen directamente la producción de factores proapoptóticos, como TRAIL y FASC (Kayagaki *et al.*, 1999) y potencian sus efectos proapoptóticos en varios tipos de células malignas.

Los IFNs pueden promover la presentación de antígenos en cáncer, se ha descrito que el IFN- α e IFN- β eran esenciales para la presentación del antígeno específico del tumor de las células dendríticas (CD), ya que la falta de IFNAR1 en las CD daba lugar a defectos de presentación cruzada de antígenos a las células T CD8, además, las CD tratadas con IFN- α 2b o IFN- α 5 mostraron una mayor adhesión a las células endoteliales linfáticas cultivadas, lo que indica que el IFN- α favorece la adhesión y transmigración de las CD (Zhang *et al.*, 2021). Además, se demostró que el IFN- α era esencial para que las CD estimularan la proliferación de células T vírgenes basándose en la observación de que la falta de IFNAR1 en las CD o el bloqueo del IFN- α con

anticuerpos neutralizantes perjudicaba la capacidad de las CD de la médula ósea para estimular el cebado de las células T (Montoya *et al.*, 2002).

El IFN- α es capaz de aumentar la expresión superficial de antígenos asociados a tumores en células de cáncer de mama y cáncer de colon. Además, los IFNs pueden promover la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I en las células cancerosas, lo que contribuye a la presentación y reconocimiento de péptidos de antígeno tumoral por parte de las células T. También se ha reportado que el IFN tipo I promueve la expresión del marcador de activación CD69 y contribuye a aumentar la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ contra las células leucémicas (Zhang *et al.*, 2021).

2.2.1 Interferones y Gal-9

Para los IFNs de tipo II, Imaizumi *et al.*, (2002), demostraron que la Gal-9 se expresa en el endotelio de lesiones inflamatorias humanas, mediando en las células endoteliales las respuestas inmunitarias inducidas por IFN- γ .

Se conoce también que el IFN- γ induce la expresión de Gal-9 en fibroblastos y media la adhesión de eosinófilos a las células (Asakura *et al.*, 2002).

En otros estudios se demostró que el IFN- γ induce un aumento de la expresión de Gal-9 en pólipos nasales. Encontrando que la expresión de Gal-9 y la infiltración de eosinófilos en pólipos nasales está correlacionada, y que activa las vías de señalización las cuales están implicadas en el aumento de Gal-9 en respuesta a IFN- γ (Park *et al.*, 2011).

Los IFN de tipo I desempeñan un papel fundamental en la destrucción de las células cancerosas a través de su efecto sobre las células asesinas naturales (Natural Killer, NK) (Zhang *et al.*, 2021).

Se ha documentado que interferones de tipo I y tipo II están implicados en la expresión incrementada de Gal-9. Por ejemplo: un estudio donde se incubaron células dendríticas con IFN- α durante 3 horas, mostró que la expresión de Gal-9 se

incrementó significativamente (van den Hoogen *et al.*, 2018). En células NK la Gal-9 mostró un incremento de expresión inducida por IFN- α durante 4 horas (Carreca *et al.*, 2021). De manera similar IFN- β se evaluó en células de melanoma, donde se obtuvo una actividad antiviral y una respuesta a la apoptosis por IFN- β y en el que se vio incrementada la expresión de Gal-9 (Leaman *et al.*, 2003).

Englobando los antecedentes presentados podemos mencionar que la Gal-9 es una proteína que juega un papel inmunomodulador en diferentes tipos de cáncer, y que su cambio de expresión se ha relacionado con la transformación maligna. Los cambios de expresión de Gal-9 en diferentes tipos de cáncer resalta la importancia de profundizar en los mecanismos de su regulación en diferentes tipos celulares. Investigaciones recientes han demostrado que el IFN- α puede inducir la expresión de Gal-9 en distintos tipos celulares (Liu *et al.*, 2018). Estos hallazgos sugieren que la interacción entre ambas moléculas podría desempeñar un papel clave en la respuesta del organismo frente a procesos infecciosos, autoinmunes o incluso tumorales. Por tanto, evaluar la relación funcional entre el IFN- α y la Gal-9 no solo permite ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de control inmunológico, sino también identificar posibles rutas terapéuticas o biomarcadores de relevancia clínica.

3. Justificación

Diversos estudios han reportado alteraciones en los niveles de expresión de la Gal-9 en distintos tipos de cáncer. En el caso particular del cáncer cervicouterino, se ha observado que los tumores con una mayor expresión tanto de la proteína Gal-9 como de su gen codificante *LGALS9* se asocian con estadios clínicos tempranos y con una mejor supervivencia global de las pacientes. Además, los altos niveles de expresión de *LGALS9* en estos tumores se han correlacionado con la activación de la vía del IFN- α .

El IFN- α es una citocina con un papel ampliamente documentado en la respuesta inmunológica frente al cáncer, participando en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis, la presentación de antígenos y la activación de diversas células inmunes, además de sus funciones antivirales. Por otro lado, la Gal-9 es una lectina con reconocida capacidad inmunomoduladora, involucrada en procesos como la adhesión celular, la apoptosis, la diferenciación y la modulación de respuestas inmunes mediadas por linfocitos T.

Dado que ambos componentes el IFN- α y la Gal-9 participan en la regulación de la respuesta inmune y se han relacionado con el microambiente tumoral, resulta relevante analizar si existe una relación entre ellos a nivel transcripcional. Determinar si el IFN- α puede inducir cambios en la expresión del gen *LGALS9* que permitirá comprender mejor los mecanismos moleculares que subyacen a su regulación.

Por lo tanto, este estudio busca contribuir al entendimiento de la regulación del gen *LGALS9* mediada por IFN- α en queratinocitos, lo cual podría aportar información valiosa sobre los mecanismos de regulación de la expresión génica en el contexto del cáncer y ofrecer bases para futuras investigaciones orientadas al diseño de estrategias terapéuticas con potencial inmunomodulador.

4. Pregunta de investigación

¿Qué efecto tiene el IFN- α sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9*, y la expresión de ARNm y la proteína Galectina-9 en queratinocitos?

5. Hipótesis

El IFN- α incrementa la actividad del promotor del gen *LGALS9*, así como la expresión del ARNm y la proteína Galectina-9 en queratinocitos.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del IFN- α sobre la expresión del gen *LGALS9* en queratinocitos.

6.2 Objetivos específicos

Cuantificar el efecto del IFN- α sobre el nivel de ARNm del gen *LGALS9* en queratinocitos.

Determinar el efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9* en queratinocitos.

Evaluar el efecto del IFN- α sobre el nivel de expresión de Gal-9 en queratinocitos.

7. Material y métodos

7.1 Identificación de los sitios de respuesta a IFN en el fragmento del promotor de 727 pb del gen LGALS9

Con la finalidad de identificar elementos de respuesta a IFN en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9*, se realizó una búsqueda mediante herramientas bioinformáticas EPD (Eukaryotic Promoter Database) en el sitio web <https://epd.epfl.ch//index.php> de la secuencia de la región del promotor de 727 pb del gen *LGALS9*, posteriormente en el programa Patch1.0 (Public 1.0 Pattern Search for Transcription Factor Binding Sites) en el sitio web <http://gene-regulation.com/pub/programs.html>, se identificaron los sitios de respuesta a factores de transcripción para IFNs.

7.2 Cultivos celulares

La línea celular HaCaT, que son queratinocitos inmortalizados de piel de humano (donados por Dra. Adriana Aguilar Lemarroy del banco de células del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS), se cultivó utilizando medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 10µg/ml. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera de CO₂ al 5% y una temperatura de 37°C. Cuando el cultivo celular alcanzó la confluencia, las células fueron subcultivadas realizando tres lavados con PBS 1X y posteriormente se añadieron 300µL de tripsina-EDTA y se incubó durante 5 min a 37°C. Posteriormente las células se resuspendieron en 1.5 mL de DMEM.

7.3 Efecto del IFN- α sobre la expresión del gen LGALS9

Para evaluar el efecto del IFN- α sobre la expresión del gen *LGALS9* se realizaron ensayos de RT-qPCR. Para ello se sembraron 80,000 células por pozo, en placas de 24 pozos (Corning) a las 24 h se incubaron con IFN- α (Recombinant human interferón Alpha A, IF007, MILLIPORE) durante 3 horas, utilizando dos concentraciones (2 U/ μ l y 20 U/ μ l) (van den Hoogen et al., 2018). Al término de la incubación, las células fueron tripsinizadas y recuperadas por centrifugación a 3000 RPM durante 5 min.

Para extraer el ARN total se utilizó el mini kit RNeasy Protect (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN extraído se verificó por electroforesis de agarosa al 1% visualizando los ARNr 28s y 18s se corrió a 70 V por 45 min. La concentración se determinó en un nanofotómetro PEARL (IMPLEN) a partir de la lectura a 260 nm y la pureza se determinó obteniendo la relación de 260/280 nm, considerando una adecuada pureza de la muestra cuando presentaba un valor cercano a 2.0.

Previo al ensayo de PCR cuantitativa se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc), empleando las condiciones de reacción que se muestran en la tabla 2, utilizando el kit Revert Aid H Minus First Strand cDNA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Se utilizaron 20 ng de ARN para la reacción, que fue previamente determinado y validado junto con el gen endógeno hipoxantina-guanina 43 fosforibosiltransferasa (*HPRT*) (Armenta-Castro., 2020). Se incubó a 42°C por 60 min, posteriormente se incubó a 70°C por 5 min, esta reacción se llevó a cabo usando un termociclador.

Tabla 2 Reactivos utilizados para la síntesis de ADNc

Reactivo	Volumen (μl)
ARN 20 ng	Lo que corresponda
Oligo dT	1
Buffer de reacción 2X	4
RT (transcriptasa reversa)	1
Inhibidor de nucleasas	1
dNTPs	2
H ₂ O	Hasta 20

7.4 PCR tiempo real

Para evaluar el efecto del IFN- α sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9* se realizó una PCR en tiempo real, las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 μ l, agregando los reactivos de la tabla 3. La reacción se llevó a cabo en el Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Científica, Inc.).

Las reacciones se hicieron por duplicado. Las condiciones de amplificación fueron; 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 s, 61 °C por 30 s y 70 °C por 30 s. Las secuencias y el tamaño de los productos de amplificación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3 Reactivos para PCR tiempo real

Reactivo	Volumen (μl)
2X SYBR Green/Rox quantitative PCR (qPCR) Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.)	5
Cebador sentido (HPRT o Gal-9)	1
Cebador antisentido (HPRT o Gal-9)	1
cDNA de 20 ng	1
H ₂ O	Hasta vol 10

Tabla 4 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la PCR en tiempo real y el tamaño del producto amplificación

Oligo		Secuencia	Tm	Producto
LGALS9	Sentido	GCAGACAAAAACCTCCCG	57.0°C	254 pb
	Antisentido	CCCAGAGCACAGGTTGATG	54.9°C	
HPRT	Sentido	CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT	58.8°C	147 pb
	Antisentido	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC	59.7°C	

La expresión relativa del gen *LGALS9* se cuantificó aplicando el método $\Delta\Delta Ct$. Que considera el ciclo (Ct) en el que la fluorescencia emitida por la sonda alcanzó un umbral predeterminado. Se calculó la diferencia entre el Ct del gen *LGALS9* (gen de interés) y el Ct del gen de *HPRT* (gen de referencia) para cada condición: $\Delta Ct = Ct (\text{gen } LGALS9) - Ct (\text{gen } HPRT)$. Se calculó la diferencia entre el ΔCt de cada muestra de interés y el ΔCt de la muestra de referencia: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{gen } LGALS9) - \Delta Ct (\text{gen } HPRT)$. Se calculó la expresión relativa del gen de interés utilizando la fórmula: $\text{Expresión relativa} = 2^{(-\Delta\Delta Ct \text{ del gen } HPRT)}$.

Para determinar el nivel de expresión, se realizaron 3 experimentos independientes cada uno por duplicado.

7.5 Efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9*

Para evaluar la actividad del promotor se realizó un ensayo de luciferasa, en este ensayo se cuantifica la actividad de una enzima que cataliza una reacción química que produce luz, lo que permite detectar y cuantificar la actividad de un promotor. Para el ensayo se utilizaron plásmidos que contienen el marco de lectura de un gen de la luciferasa y el fragmento del promotor del gen *LGALS9*. Para nuestros ensayos se utilizaron dos vectores, el vector pGL4.12 (Promega) (Figura 8), el cual contiene el gen reportero luc2CP que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis* (luciérnaga), tiene un sitio de clonación múltiple, en la cual se clonó el fragmento de 727 pb del promotor del gen *LGALS9* de en 727 pb (pGL4.727pGal9) (Figura 9), adicionalmente el plásmido contiene un gen de resistencia a la ampicilina y tiene un sitio de origen de replicación que permite ser replicado en bacterias.

Se utilizó, el vector pGL4.72 que contiene el marco de lectura del gen de luciferasa de *Renilla reniformis* (Renilla), es un vector que expresa en niveles bajos el gen de la luciferasa. Contiene un gen de resistencia a la ampicilina y tiene un sitio de origen de replicación que le permite replicarse en bacterias (figura 10). Este vector se utilizó como control interno para normalizar la expresión de la luciferasa de luciérnaga.

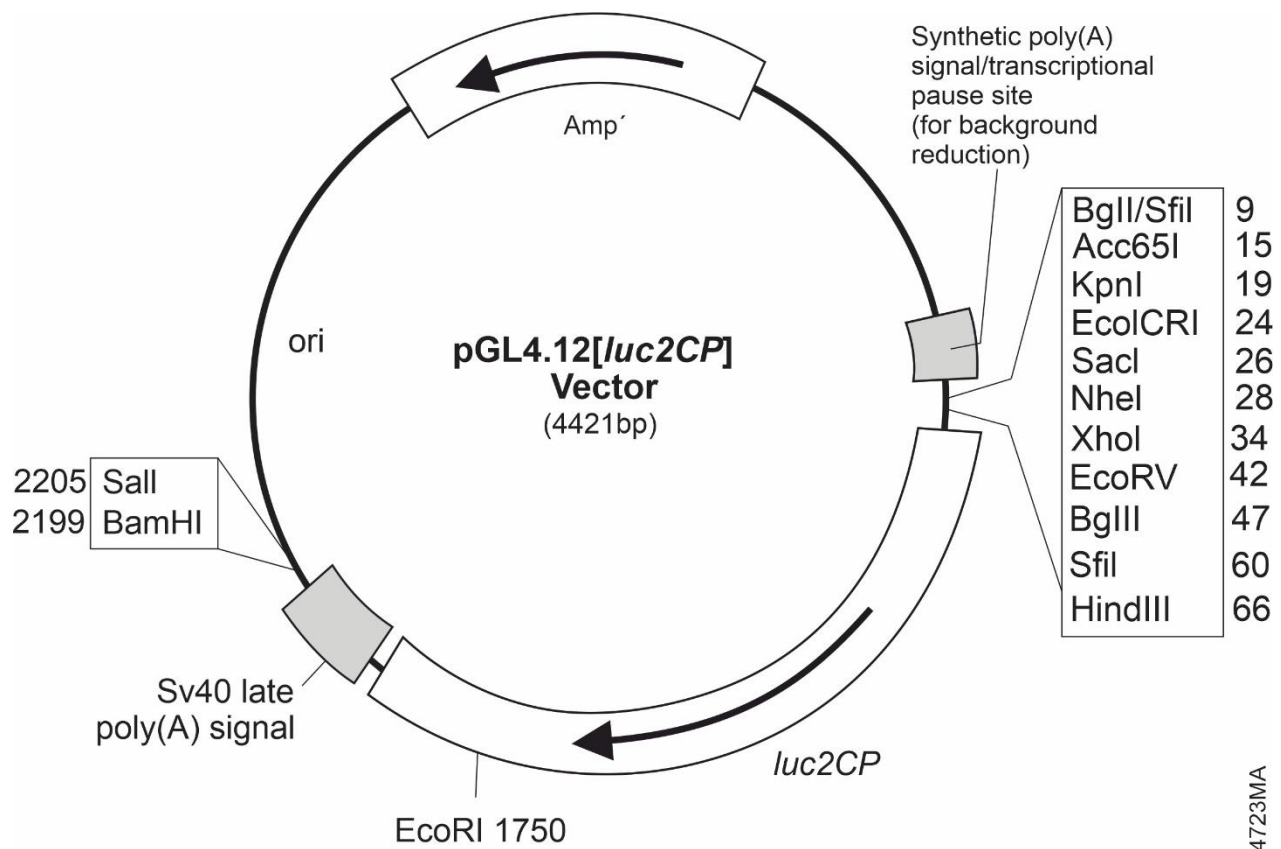


Figura 19. Representación esquemática del vector pGL4.12, vector reportero de luciferasa [luc2CP] , se muestra la región de clonación múltiple para que el usuario clone un promotor.

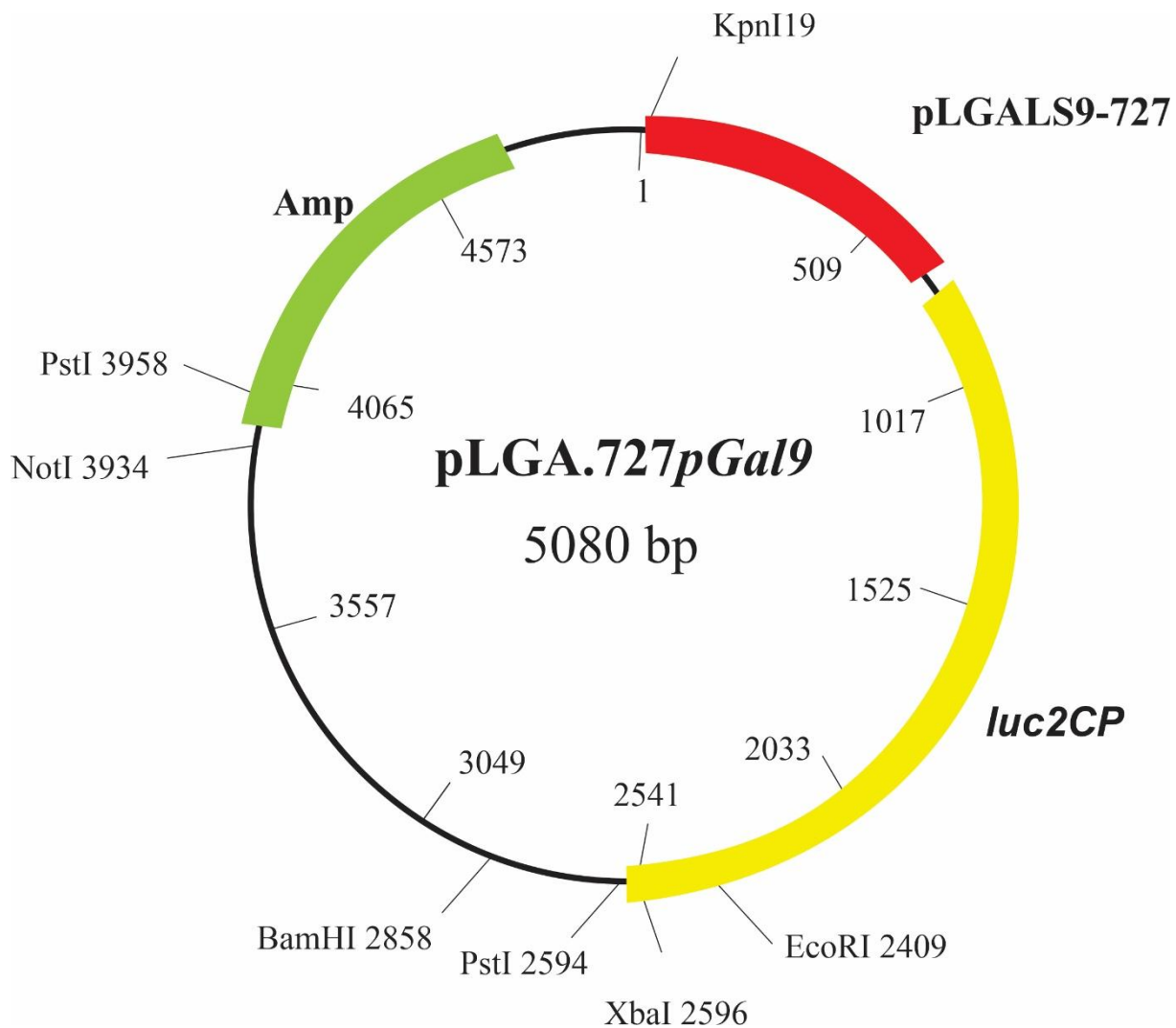


Figura 20. Representación esquemática del vector pGL4.727pGal9, vector obtenido por la clonación de un fragmento del promotor *LGALS9* 727 pb.

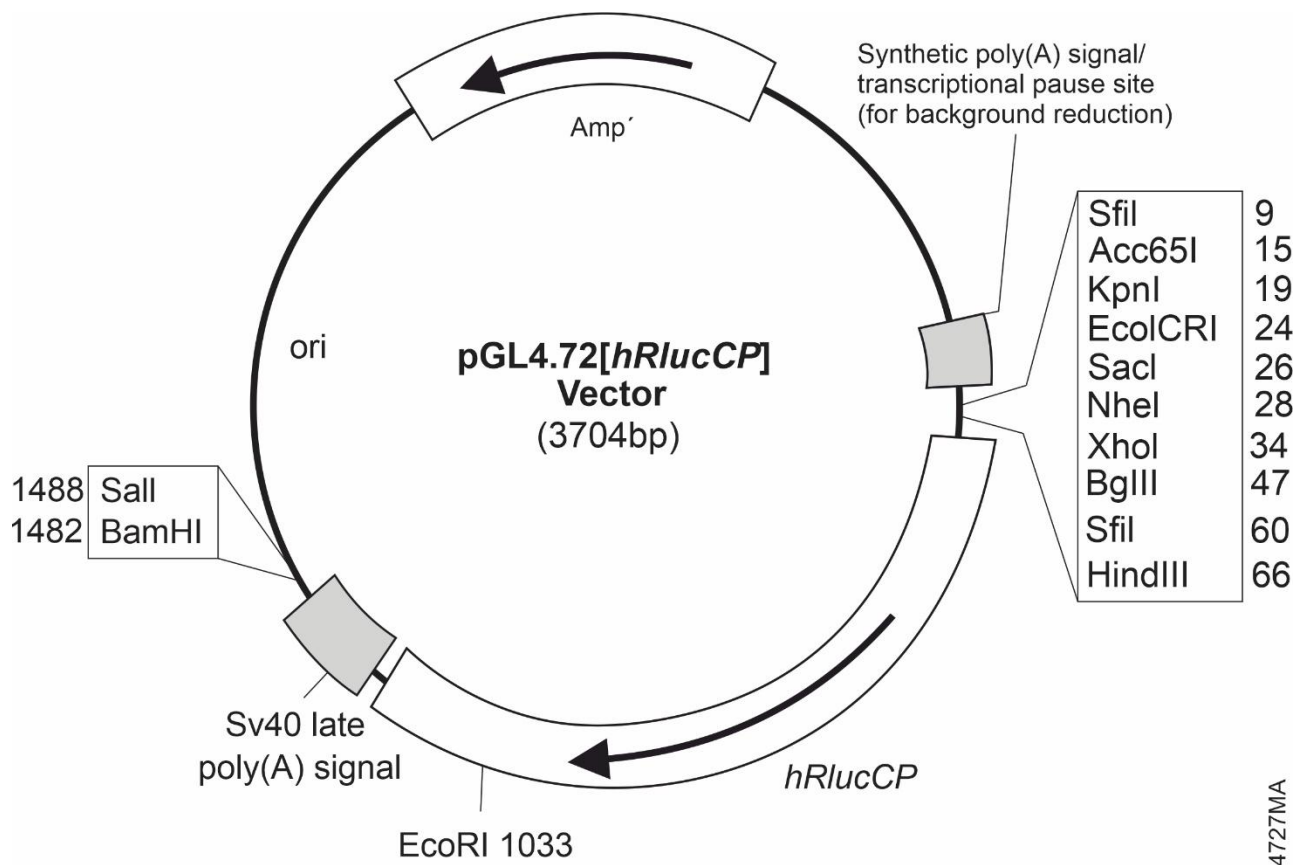


Figura 21. Representación esquemática del vector pGL4.72 es un plásmido reportero que contiene el marco de lectura para la luciferasa Renilla (*hRLucCP*). Usado como control interno para normalizar los datos.

7.6 Transfección

Las células HaCaT se cultivaron hasta el 80% de confluencia, en botellas T25, para los ensayos de transfección se sembraron 80,000 células por pozo, en placas de 24 pozos, con medio de cultivo DMEM al 5% SFB con antibiótico y se incubaron por 48 horas a 37°C con 5% de CO₂. Para la preparación de los complejos de transfección se utilizó el reactivo Lipofectamina 3000 de Invitrogen, se co-transfectaron; los vectores pGL4.72 y pGL4.727pGal9. Se utilizaron las concentraciones de 600 ng de ADN para pGL4.727pGal9, y 20 ng para pGL4.72. Cada complejo de transfección se diluyó en DMEM sin SFB y sin antibiótico, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 50 µl por pozo de la mezcla de transfección por goteo y se incubó durante 24 horas a 37°C con 5% CO₂. Terminada la incubación se realizaron lavados con buffer PBS, agregando DMEM al 10% de SFB y antibiótico, se incubó por 3 horas bajo inducción de IFN- α (2 U/µl y 20 U/µl). Transcurridas las 3 horas, se realizaron lavados con buffer PBS, se agregaron a cada pozo 100 µl del buffer de lisis PLB1x, incubando en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, se tomaron 20 µl del lisado y se le agregaron 70µl de reactivo LARII para medir la actividad de la luciferasa (*Photinus pyralis*), la cual corresponde a la actividad del promotor del gen *LGALS9*, una vez cuantificada la luminiscencia la reacción se inactivó con 70 µl de reactivo Stop & Glow y se midió la actividad de la segunda luciferasa (*Renilla reniformis*), usando el luminómetro GloMax20/20 de Promega.

Para determinar la actividad del promotor fue necesario normalizar los datos. Para la normalización de los datos, se dividió la actividad de la luciferasa de luciérnaga (actividad del promotor) entre la actividad de la luciferasa de Renilla (control de transfección).

Se utilizó la formula:

$$\text{Actividad relativa} = (\text{Actividad de luciferasa de luciérnaga}) / (\text{Actividad de luciferasa de Renilla})$$

7.7 Efecto del IFN- α sobre la expresión de la proteína Gal-9

Para evaluar el efecto del IFN- α sobre la expresión de la proteína Gal-9. Se sembraron 200,000 células HaCaT por pozo en placas de 6 pozos, después de 48 horas los cultivos celulares fueron incubados con IFN- α (20 U/ μ l) durante 3 horas y 6 horas, al término de la incubación las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 5,000 RPM, a 4°C durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se les agregaron 100 μ l de buffer RIPA (Tris HCl pH 7.4 50 mM, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 2 mM) con inhibidor de proteasas (78430, Thermo Scientific, Waltham, MA, US). Para la lisis celular, se realizó una sonicación (5 pulsos, 5 seg c/u a 100% de amplitud, durante 4 ciclos), posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se pasó a tubos de 0.6 mL. Las proteínas extraídas se cuantificaron utilizando el equipo nanodrop. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE a 70 V por 30 min, y posteriormente a 100 V por 130 min, se utilizaron 20 μ g de proteína por pozo. Al término de la electroforesis la proteína se transfirió a una membrana fluoruro de polivinilideno (PVDF) en cámara húmeda por 16 hrs a 100 mA. La membrana se bloqueó con leche baja en grasa al 5% en TBS-T (Tris HCl pH 7.6 50 mM, cloruro de sodio 150mM, Tween 20) por 1 hora. Posteriormente la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación con anticuerpo primario anti-galectina-9 (ab69630, Abcam) Dil 1:400, se retiró el anticuerpo y se realizaron 10 lavados de 5 min con TBS-T 1X, posteriormente se incubó 1 hora con anticuerpo secundario anti-IgG rabbit HRP linked (ab6721, Abcam) Dilución 1:200, se retiró el anticuerpo y se realizaron 10 lavados de 5 min con TBS-T 1X. La detección se realizó empleando el kit de luminiscencia que se describe más adelante, una vez detectada la señal, se procedió a desnudar la membrana, esto para retirar el anticuerpo anti-Gal-9. Para ello se incubó con el buffer stripping (Tris HCl 1M pH 6.8, SDS 20%, β -mercaptoetanol), durante 1 hora en agitación se realizaron dos lavados de 10 min con TBS 1X y dos lavados de 10 min con TBS-T 1X para posteriormente realizar la detección de la proteína utilizada como control de carga (β -actina) ya que su expresión es generalmente constante y estable en la mayoría de las células y condiciones experimentales.

La membrana se bloqueó durante 1 hora con 5 % de leche baja en grasa en TBS-T 1X. Se utilizó β -actina como control de carga, utilizando anti- β -actina (ab8224, Abcam) Dilución 1:1000 por 1 hora en agitación, se retiró el anticuerpo y se realizaron 10 lavados de 5 min con TBS-T 1X, se le colocó el anticuerpo secundario anti-IgG mouse acoplado a HRP (PI-2000) Dilución 1:2000 incubando durante 1 hora en agitación, se retiró el anticuerpo y se realizaron 10 lavados de 5 min con TBS-T 1X, posteriormente se realizó la detección de la proteína.

La detección de Gal-9 y β -actina fue realizada con el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (WBKLS0500, Millipore Corporation, Billerica, MA); la membrana se incubó por 5 minutos en la solución del kit, posteriormente la membrana se colocó en el equipo C-Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US) y se reveló a los 6 minutos. La densidad de las bandas fue procesada por el software ImageJ (Rasband, WS, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda). La β -actina fue utilizada para normalizar las densidades obtenidas para Gal-9.

Utilizando la fórmula:

$$\text{Intensidad relativa} = \frac{(\text{intensidad de la proteína de interés})}{(\text{intensidad de la proteína de carga})}$$

7.8 Efecto del IFN- α sobre la secreción de la proteína Gal-9 al medio extracelular

Para determinar si la proteína Gal-9 estaba siendo secretada al medio extracelular y si esta secreción se modificaba por el efecto del IFN- α . se realizaron ensayos de ELISA. La concentración de Gal-9 en el medio de cultivo celular se cuantificó empleando el kit Quantikine Gal-9 (cat. no. DGAI90; R&D Systems, Inc) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello se tomó el medio de cultivo de los ensayos control e incubados con IFN- α (20 U/ μ l) durante 3 y 6 hrs. No se realizó dilución del medio de cultivo y se analizó por duplicado cada condición. Las

placas se leyeron en un lector de microplacas BioTek Synergy-4 (Agilent Technologies, Inc.) A 450 nm y se restó la absorbancia a 570 nm. Se calculó el promedio de la absorbancia de cada duplicado y la concentración se determinó extrapolando los resultados con una curva de concentración proporcionada en el kit.

7.9 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron hechos usando el programa GraphPad Prism 8. Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones experimentales, se realizaron pruebas t-student. Para todos los análisis estadísticos con un valor de $p < 0.05$ fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

8. Resultados

8.1 Identificación de los sitios de respuesta a IFN

Para profundizar en la caracterización de la región promotora, se realizó la búsqueda de los elementos de respuesta a interferón ISRE e IRE en la secuencia de la región promotora de 727 pb de -565 a +162 pb a través del programa Patch1.0. Se identificaron nueve secuencias correspondientes a sitios IRE en las posiciones: -521, -498, -313, -196, -183, -133, + 11, +44, +130 pb, y un sitio ISRE en la posición -42 a -33 pb (figura 11).

FP022909 LGALS9_1 :+U EU:NC; range -565 to 162.

TCTACATAATTATGTTTTTACATGAATAATATAAATTTAAACAGGAGAAATACTTTTTGA
AGAGTCTGAGAAATCTTCATAAAGTTCAGGCGGCCACGAATTAGCTGTGTGACCTGGGGCA
TGCCCCTTAGACTCTGAGCCTCAGCTTCTCTGTATGTAAAATGGGTTGAAGCCGCCCTTC
CCCACAAGCACCCCTGTGCACAGGCAATGCCAGCCCCATTATTTTCTGGACTCCGTGGCC
AAGCATGCTTAGGACACAGCCACATACTTCTGGGCAGTGTCATCTGGCAACTTGCTGT
CATGTCAGTGTGGTCAAGCATTGTAGACCTCTATGAACCAAATATGCTTCAGGCTTGGGT
TGAGCACAGGAGAGGGAGGAGGGAAAGGTCAGTGGGGCTGGGAGTGCCTACTTCCCTCTG
TGAGTGTCACCCCAGTCCACCCAGTACCATAACCTTTCTCTCTCTGGACCCACTTCCTTTT
GCTGCCGGCTCCTCCCCATTGAATAACAGCCAAGTTGCTTTGGTTTCTATTTC TTTGTTA
AGTCGTTCCCTCTACAAAGGACTTCCTAGTGGGTGTGAAAGGCAGCGGTGGCCACAGAGG
CGGCGGAGAGATGGCCTTCAGCGGTTCCAGGCTCCCTACCTGAGTCCAGTGAGTTCCAG
GGCTATGGGCACAGGGCTGCCTCAGCCAGAGGGACACAGCTCTGGGGCTCTGAGGAAGCA
ACTCCTGG

Figura 23. Región promotora del gen *LGALS9*. La figura muestra la secuencia nucleotídica de la región de -565 a +162 pb (727 pb) que se identifica como la región promotora del gen *LGALS9*. Se resalta la localización de los sitios IRE en color morado, el sitio ISRE en color verde y el sitio de inicio de la transcripción en color rojo.

8.2 Cuantificación de la expresión del gen *LGALS9* inducido por IFN- α mediante PCR en tiempo real

Los niveles de expresión del gen *LGALS9* se determinaron mediante PCR tiempo real en la línea celular HaCaT, en la figura 12 se muestran los niveles de expresión del gen *LGALS9* en la condición control y en presencia de 2 U/ μ l de IFN- α . En la figura 13, se muestran los niveles de expresión del gen *LGALS9* en las condiciones control y en la incubada con 20 U/ μ l de IFN- α . En la gráfica se muestran los resultados de 3 ensayos diferentes, cada uno realizado por duplicado, para el análisis estadístico se consideró una $p < 0.05$. Los resultados muestran un aumento en la expresión de *LGALS9* en presencia del IFN- α en ambas concentraciones, siendo mayor el incremento en la concentración de 20 U/ μ l. Se realizó una t-Student para determinar diferencias significativas. * $p=0.0423$.

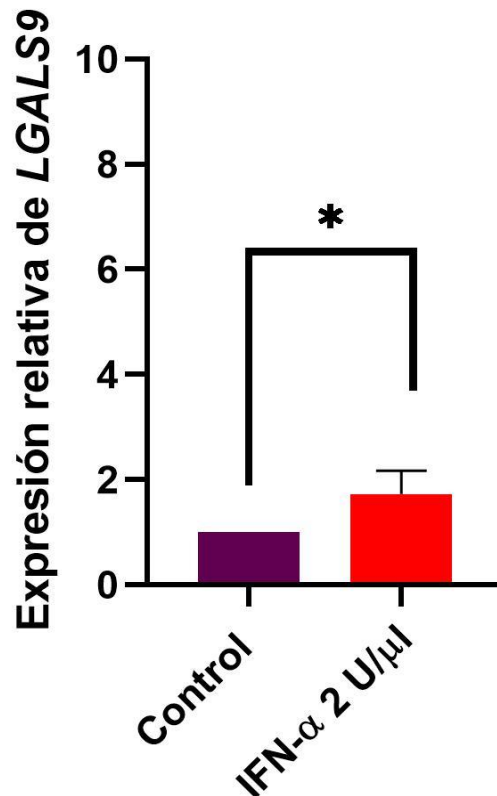


Figura 24. Efecto del IFN- α sobre el nivel de expresión del gen *LGALS9*. El tiempo de incubación con IFN- α fue de 3 horas a una concentración de 2 U/ μ l. Se muestra la cuantificación relativa determinada por PCR tiempo real, como control se utilizó el gen endógeno *HPRT*. Para determinar si existía un cambio significativo se realizó una t-Student * $p=0.0456$

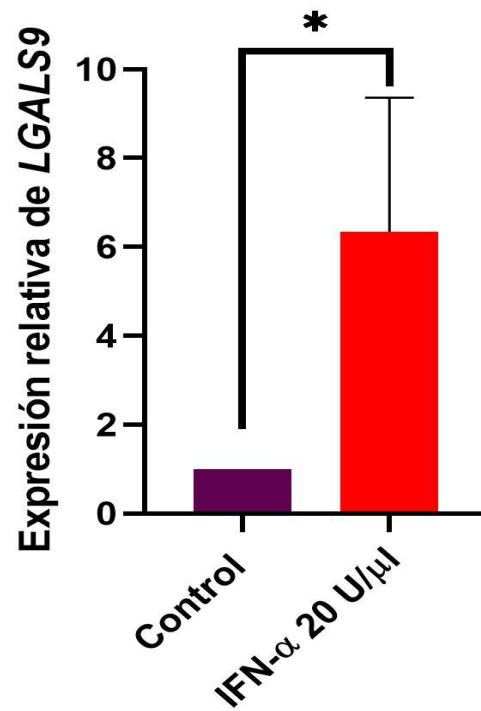


Figura 25. Efecto del IFN- α sobre el nivel de expresión del gen *LGALS9*. El tiempo de incubación Inducido con IFN- α durante fue de 3 horas a una concentración de 20 U/ μ l. Se muestra la cuantificación relativa determinada mediante PCR tiempo real, usando como control el gen endógeno *HPRT*. Para determinar si existía un cambio significativo las diferencias significativas se realizó una t-Student * $p=0.0373$

8.3 Efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del gen LGALS9

La actividad del fragmento de 727 pb del promotor del gen *LGALS9* sobre el gen reportero de Luciferasa se analizó en presencia de 2 y 20 U/ μ l de IFN- α , los resultados se muestran en las figuras 14 y 15, respectivamente. Las gráficas de actividad luciferasa muestran los resultados de tres ensayos independientes, cada uno realizado por triplicado. El tratamiento con IFN- α indujo un aumento en la actividad luciferasa regulada por el promotor del gen *LGALS9*, siendo mayor a la concentración de 20 U/ μ l. Lo que indica que el IFN- α si tiene un efecto activador sobre el promotor del gen *LGALS9*. Estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de ARNm

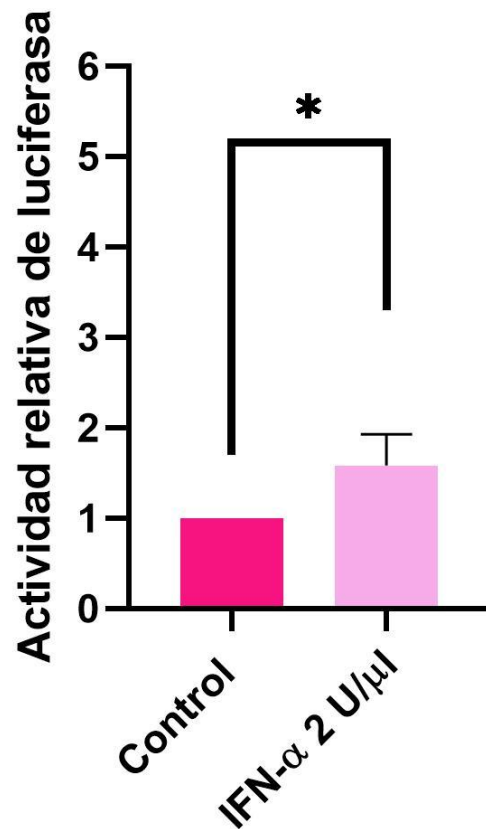


Figura 26. Actividad del promotor *LGALS9* sobre el gen reportero de Luciferasa. Se muestra los niveles de actividad luciferasa en las condiciones control y los cambios inducidos a las 3 h de tratamiento con IFN- α a una concentración de 2 U/ μ l. Se realizó una t-Student para determinar diferencias significativas. * $p=0.0423$.

de *LGALS9*, observados en los experimentos anteriores (figuras 12 y 13) pueden ser resultado de un efecto del IFN- α sobre la actividad del promotor del gen *LGALS9*.

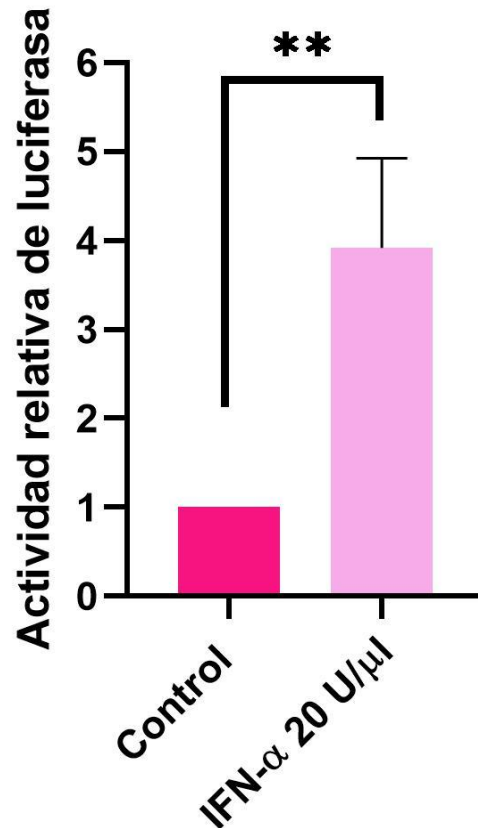


Figura 27. Nivel de expresión de la actividad del promotor de 727 pb del gen *LGALS9*. Inducida por 3 h a una concentración de IFN- α de 20 U/ μ l. Evaluada por un ensayo de luciferasa. Se realizó una t-Student para determinar diferencias significativas. * $p=0.0423$.

8.4 Efecto del IFN- α en la expresión de Gal-9

Para evaluar la expresión de Gal-9 se realizaron ensayos de *Western Blot*. Se realizaron tres ensayos independientes empleando dos concentraciones de IFN- α : 2 U/ μ l y 20 U/ μ l, durante un periodo de incubación de 3 horas. En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos a la concentración de 2 U/ μ l y 20 U/ μ l de IFN- α . No se observaron cambios significativos inducidos por el IFN- α sobre los niveles proteicos de Gal-9.

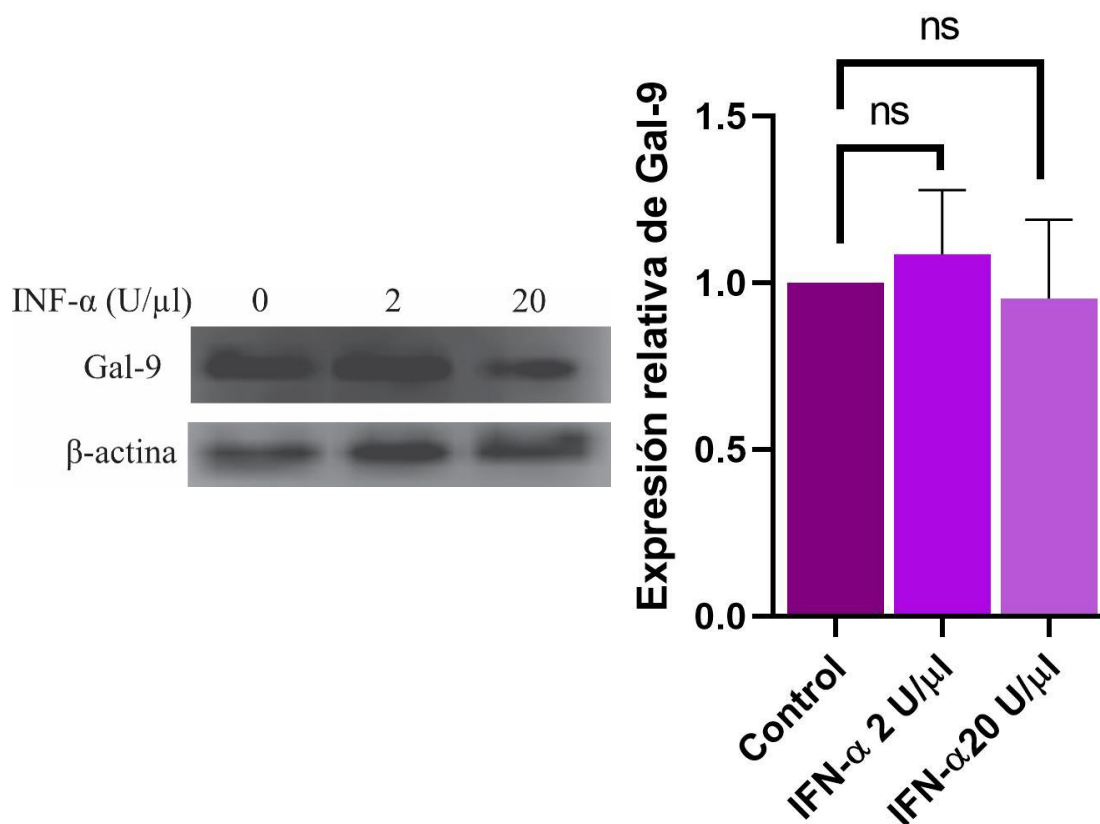


Figura 30. Identificación de galectina-9 en células HaCaT tratadas con IFN- α . Extractos proteicos obtenidos de células HaCaT tratadas durante 3 horas con 2 y 20 U/ μ l de IFN- α se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfirieron por Western blot, y las bandas correspondientes a galectina-9 y β -actina se detectaron con anticuerpos específicos (panel izquierdo). Los cambios en la densidad óptica de las bandas correspondientes a Gal-9 inducidos por el tratamiento con IFN- α se muestran en el panel derecho y se reportan como expresión relativa de Gal-9, los resultados fueron normalizados con respecto a la expresión de β -actina. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni. $p=0.6599$.

Al no observarse un efecto del IFN- α sobre los niveles proteicos de Gal-9, se realizó un nuevo ensayo con una incubación de IFN- α por 6 horas, este ensayo se realizó a la concentración de 20 U/ μ l, los resultados mostraron que no existe efecto del IFN- α sobre los niveles proteicos de Gal-9 (figura 17).

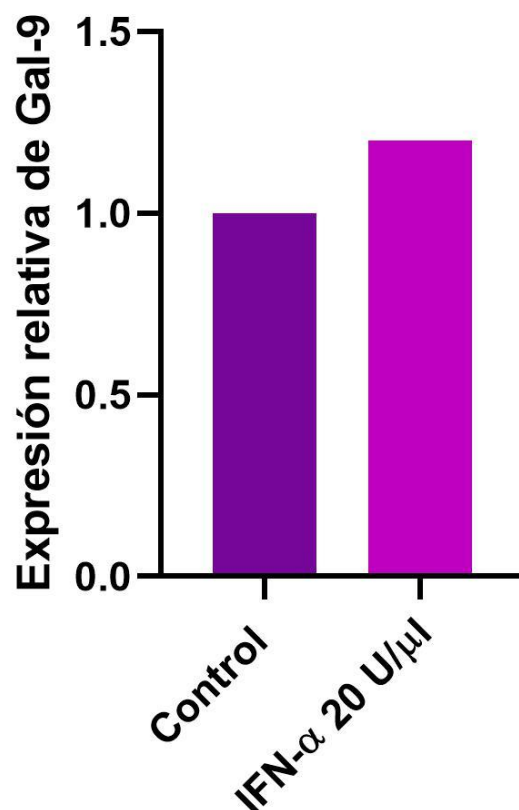


Figura 31. Efecto de inducción de IFN- α a 6 horas, sobre el nivel de expresión de Gal-9 en las células HaCaT. Se muestran los resultados del análisis Gal-9 normalizadas con respecto a β -actina. Ensayo de WB que muestra la detección de Gal-9 inducida a una concentración de IFN- α de 20 U/ μ l.

8.5 Efecto del IFN- α sobre la secreción de Gal-9 en el medio extracelular

Para determinar si la razón de que no se observara un cambio en el nivel proteico de Gal-9 por efecto del IFN- α , se debía a que la proteína estaba siendo secretada al medio de cultivo, se realizó un ensayo de ELISA en el que se cuantificó la concentración de Gal-9 en el medio. La concentración de Gal-9 en el medio de cultivo entre la condición control y la condición incubada con IFN- α fue semejante. En la figura 18a se muestra la concentración de Gal-9 en la condición control a las

3 horas de incubación con 20 U/μl de IFN-α. En la figura 18b se muestra la concentración de galectina-9 en la condición control y a las 6 h de incubación con IFN-α a 20 U/μl.

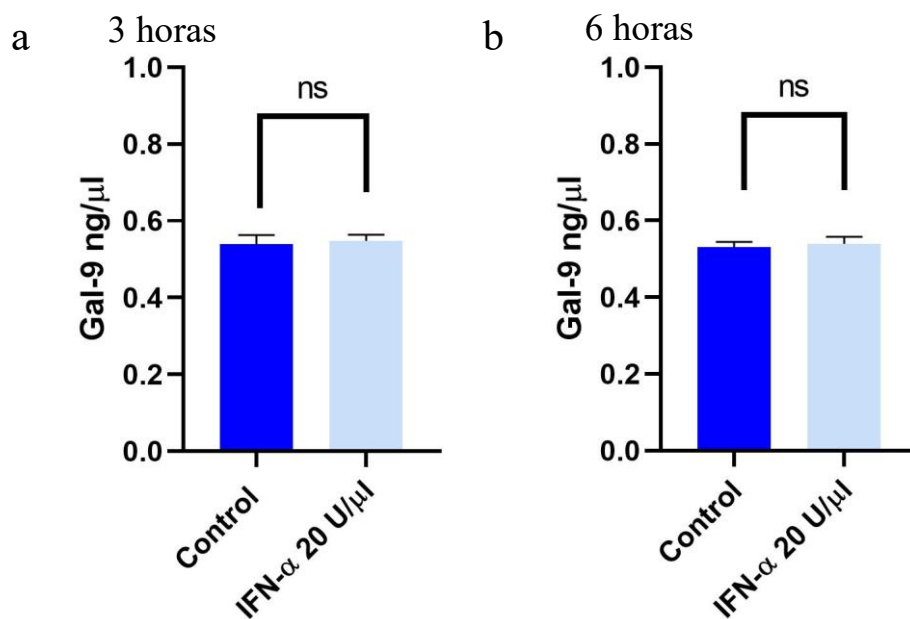


Figura 33. Concentración de Gal-9 inducida por 20 U/μl de IFN-α en el medio extracelular, evaluada por un ensayo de ELISA. a) inducción de IFN-α a 3 horas; b) inducción de IFN-α a 6 horas. Se realizó t-Student, no significativo (ns) $p=0.5447$, ns $p=0.4634$.

9. Discusión

El gen *LGALS9* codifica para la proteína Gal-9, se sabe que Gal-9 desempeña un papel multifacético en la biología del cáncer. Como se reportó en células de cáncer de mama, la Gal-9 citoplasmática induce la agregación de células cancerosas (estabilizando las uniones de adhesión célula-célula) e inhibe la invasión celular, el desprendimiento de las células tumorales y la unión al endotelio vascular (Irie *et al.*, 2005, Yamauchi *et al.*, 2006). En cáncer cervicouterino los tumores con niveles de expresión más altos de Gal-9 se relacionaron con estadios clínicos tempranos y mejor sobrevida, además de que los tumores con altos niveles de expresión del gen *LGALS9* se relacionaron con la vía del IFN- α , (Mendieta-Carmona *et al.*, 2023). El estudio de la regulación de la expresión de este gen es relevante, considerando los efectos pro o anticancerígenos de Gal-9.

La evaluación del efecto del IFN- α sobre la expresión del gen *LGALS9* en células epiteliales no tumorales (HaCaT) permite comprender sus efectos en un contexto no canceroso, que puede estar influido tanto por las alteraciones genómicas o por la fisiología celular alterada de una célula no tumoral.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la exposición de células HaCaT a concentraciones de 2 U/ μ l y 20 U/ μ l de IFN- α con incubación de 3 horas, incrementó significativamente la expresión de ARNm de *LGALS9*, así como la actividad promotora del fragmento de 727 pb de dicho gen, sin observarse un cambio en los niveles proteicos ni en la secreción extracelular de Gal-9. Estos hallazgos sugieren que la regulación de *LGALS9* por IFN- α se ejerce principalmente a nivel transcripcional, mientras que la traducción o secreción de la proteína podría depender de mecanismos post-transcripcionales o del tiempo de exposición al interferón. Tal es el caso del gen *ADAR1* (Adenosine Deaminase Acting on RNA 1) es un gen fuertemente estimulado por IFN- α cuya expresión genera la isoforma p150, un editor de ARN de doble cadena que participa de manera central en la modulación post-transcripcional de la respuesta antiviral. Tras su inducción por la vía JAK-STAT, *ADAR1* p150 cataliza la conversión de adenosina a inosina en

diversos transcritos virales y celulares, alterando su estabilidad, estructura y capacidad de traducción. De manera notable, *ADAR1* ejerce además un mecanismo de autorregulación post-transcripcional mediante la edición de su propio ARNm, afectando su procesamiento y la eficiencia de síntesis proteica (Liddicoat et al., 2015).

La detección de sitios ISRE e IRE en la región promotora del gen *LGALS9* respalda la hipótesis de que el IFN- α puede inducir su transcripción a través de la vía JAK-STAT, mediante la formación del complejo ISGF3 que reconoce los elementos de respuesta estimulados por interferones (Michalska et al., 2018). La presencia de estos elementos, un sitio ISRE (TTTCTATTTC) en la posición -42 a -33 pb y sitios IRE (GAGA, GAAA) en las posiciones -521, -498, -313, -196, -183, -133, + 11, +44, +130 pb como lo demuestra nuestro análisis bioinformático de los sitios regulatorios en el fragmento de 727 pb (figura 11) podrían estar participando en el incremento de la actividad del promotor observado en los ensayos de luciferasa, lo cual sugiere una interacción directa entre los factores de transcripción activados por IFN- α y la región promotora del gen (Aparicio, 2019; Vega, 2021). De manera que el IFN- α estimula la transcripción del gen *LGALS9* por medio de la activación de la vía de señalización, ya que las células HaCaT cuentan con receptores IFNAR1 y 2 que tras la interacción con el ligando (IFN- α) fosforilan el receptor mediado por JAK que activa a STAT1 y STAT2 que se asocian con IRF9 para formar un complejo ISGF3 el cual es transportado al núcleo, donde reconoce el elemento de respuesta ISRE (Michalska et al., 2018). Sin embargo, esto debe de ser explorado en futuras investigaciones.

Se ha reportado que genes como CXCL10; contiene en su promotor tanto un sitio ISRE como un sitio GAS, activados respectivamente por IFN- α/β y IFN- γ (Ohmori, Y., & Hamilton, T. A. 1997). El gen OAS1 contiene múltiples sitios ISRE en su promotor, sitios reconocidos por el complejo ISGF3 que se activa en presencia de IFN- α y aumentan su expresión (Kwon, H., et al. 1997).

El aumento de la expresión del gen *LGALS9* inducido por IFN- α en células HaCaT, concuerda con lo reportado en otros tipos celulares, donde la exposición a interferones

tipo I o II promueve la transcripción de genes asociados con la respuesta inmune (Carreca *et al.*, 2022; van den Hoogen *et al.*, 2018). Así como en algunos genes que reportan un aumento en su expresión en presencia de IFN- α como son CXCL10, OAS1, TIM-3, TNF-RII, (Ohmori, Y., & Hamilton, T. A. 1997, Kwon, H., et al. 1997, Carreca *et al.*, 2022; van den Hoogen *et al.*, 2018).

Sin embargo, el hecho de que no se observara una variación en los niveles proteicos o en la secreción de Gal-9 en células HaCaT sugiere que la inducción transcripcional no necesariamente se traduce en una producción inmediata de la proteína, posiblemente debido a la necesidad de una exposición más prolongada o a la participación de mecanismos de control postranscripcional y la estabilidad del ARNm. Aunque IFN- α suele inducir un amplio repertorio de genes estimulados por interferón (ISGs), también es capaz de reprimir la expresión de ciertos transcritos mediante mecanismos de degradación selectiva de ARNm (Türeci *et al.*, 2003). Se ha descrito que la señalización por IFN- α activa rutas dependientes de RNasas inducibles por interferón en las familias OAS/RNasa L e IFIT, así como editores de ARN como *ADAR1* que pueden alterar la estabilidad del ARNm. IFN- α puede modificar la disponibilidad de proteínas de unión a ARN (RBPs), como HuR o TTP, que regulan la estabilidad del ARNm de *LGALS9* mediante unión a elementos AU-rich (AREs) (Türeci *et al.*, 2003).

En un estudio donde se evaluó la expresión de Gal-9 inducida por IFN- γ en fibroblastos y queratinocitos (humanos normales), se observó que una incubación de 24 hrs con IFN- γ aumenta la expresión de Gal-9 en fibroblastos y se ve un efecto contrario en queratinocitos, donde a mayor dosis de IFN- γ la Gal-9 disminuye su expresión (Igawa *et al.*, 2006), lo anterior sugiere que los mecanismos de regulación de la expresión de Gal-9 puede variar dependiendo del tipo celular.

Diversos estudios han demostrado que la expresión de Gal-9 puede estar modulada por factores epigenéticos, como la metilación de ADN y la modificación de histonas (Zhang *et al.*, 2020; Armenta-Castro *et al.*, 2020). En este contexto, la activación de la vía del IFN- α podría interactuar con estos mecanismos epigenéticos

para modular la accesibilidad del promotor de *LGALS9*, favoreciendo su transcripción, pero sin necesariamente incrementar la síntesis proteica. Esto puede explicar la discrepancia observada entre el aumento del ARNm y la ausencia de cambios detectables en la proteína Gal-9 en las condiciones experimentales de 3 y 6 horas.

El IFN- α ha sido descrito como un mediador esencial de la inmunovigilancia tumoral, al promover la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs) que participan en la apoptosis, la presentación antigénica y la modulación de la respuesta inmune (Zhang *et al.*, 2021).

En el presente estudio, la inducción de *LGALS9* por IFN- α en queratinocitos sugiere que este gen forma parte de los ISGs modulados por esta citocina, desempeñando un papel relevante en la regulación de la respuesta inmune epitelial. No obstante, la ausencia de un incremento proteico inmediato sugiere que Gal-9 podría requerir señales adicionales para su traducción o liberación, como la participación de IFN- γ u otras citocinas sinérgicas como IL-1 β , TNF- α (Asakura *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2011), o bien podría ser importante evaluar su expresión en tiempos más prolongados y/o empleando diferentes concentraciones.

El análisis integral de los resultados indica que el IFN- α induce la transcripción de *LGALS9* en células HaCaT a través de la activación de elementos ISRE e IRE en su región promotora, mediada por el complejo ISGF3. Sin embargo, la expresión proteica de Gal-9 no se ve afectada en el periodo corto de exposición empleado, lo que sugiere que la regulación de este gen podría implicar una respuesta bifásica: una fase temprana de activación transcripcional y una fase tardía de traducción y secreción. Estos resultados coinciden con reportes previos donde la inducción de genes como XCL10, OAS1 requiere periodos de exposición superiores a 12 horas para reflejarse a nivel proteico, en células HUVEC incubadas con IFN- γ se produjo un aumento de la proteína Gal-9 a las 12 y 24 horas de inducción (Biron, 1999; De Andrea *et al.*, 2002, Imaizumi *et al.*, 2002).

El IFN- α incrementa los niveles de ARNm del gen *LGALS9* en queratinocitos, lo que concuerda con el estudio de van den Hoogen *et al.*, 2018, donde se evaluó el efecto

del IFN- α sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9* en CD con una inducción de 3 horas. Por otro lado, hay estudios que reportan que el IFN- γ (interferón de tipo II) estimula la expresión de Gal-9 en células endoteliales, fibroblastos dérmicos, astrocitos, células del sistema inmune (Igawa *et al.*, 2006, Gieseke *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2018, Alam *et al.*, 2011; John & Mishra, 2016). En células HUVEC que fueron estimuladas con 10 ng/mL de IFN- γ durante 4, 8 y 16 horas, la expresión de Gal-9 aumentó significativamente a partir de las 8 horas (Alam *et al.*, 2011). Así mismo, la expresión de Gal-9 en células HepG2 y Hep3B fue evaluado a diferentes concentraciones 0.1, 1, 10 y 100 ng/mL y en tiempos progresivos 0, 12, 24 y 36 horas. Los niveles de ARNm y de proteína se regularon positivamente de manera dependiente de la concentración y del tiempo después 6 horas con tratamiento con IFN- γ humano recombinante, ya que el aumento de la dosis resultó en una duplicación de los niveles de ARNm de Gal-9 conforme aumentaba la concentración (Chen *et al.*, 2018).

Un estudio previo, reportó que el IFN- α aumentó la expresión de Gal-9 en células NK. En este estudio también se observó que el IFN- α incrementó la secreción de Gal-9 al medio de cultivo a un tiempo de incubación de 4 y 24 horas, donde el incremento de Gal-9 es similar con respecto al tiempo de incubación (Carreca *et al.*, 2022). Considerando que la Gal-9 podría estar siendo secretada al medio de cultivo, determinamos su concentración, sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles proteicos entre la condición control y la experimental, lo que sugiere que el IFN- α en las condiciones evaluadas no tiene un efecto sobre la secreción de Gal-9. Podríamos sugerir que este resultado es dependiente del tipo celular empleado.

En conjunto, los resultados respaldan la hipótesis de que el IFN- α actúa como un modulador de la expresión de *LGALS9* en queratinocitos, principalmente a nivel transcripcional. La identificación de sitios de unión a ISGF3 en la región promotora y el aumento en la actividad promotora tras la exposición a IFN- α confirman su papel en la regulación de este gen. No obstante, la ausencia de cambios detectables en los niveles proteicos o en la secreción extracelular de Gal-9 sugiere

que la respuesta completa podría depender de condiciones celulares adicionales o de una estimulación más prolongada. Estos hallazgos aportan información relevante para comprender la relación entre los interferones tipo I y la regulación de genes inmunomoduladores en células epiteliales humanas.

10. Conclusión

En conclusión, los resultados obtenidos nos indican que el IFN- α regula positivamente la transcripción del gen *LGALS9* mostrando un aumento en la expresión de ARNm y la actividad del promotor de 727 pb analizado en queratinocitos humanos. Además, el análisis bioinformático resalta que en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* se encuentran elementos de respuesta a IFN, lo que indicaría que el efecto observado podría ser resultado de la activación de alguno de estos elementos.

Sin embargo, los niveles proteicos de la Gal-9 no mostraron cambios significativos, lo que sugiere que existen mecanismos post-transcripcionales que regulan a la Gal-9, que no fueron abordados en este estudio.

En síntesis, este estudio demuestra la capacidad del IFN- α para inducir la expresión del gen *LGALS9* aportando evidencia relevante sobre la relación funcional entre las vías de señalización inducidas por IFN- α y la expresión de genes inmunomoduladores como el gen *LGALS9*.

11. Perspectivas

Futuros estudios deberán centrarse en el análisis de la respuesta a IFN- α , considerando periodos de exposición más prolongados y distintas dosis, con el fin de determinar si el aumento se relaciona con una síntesis proteica retardada. Por otro lado, sería importante determinar si el IFN- α genera modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN o la acetilación de histonas, que pueden estar participando en la expresión del gen *LGALS9* en presencia de IFN- α . Otra línea prometedora es la comparación del efecto de diferentes interferones (tipo I, II y III) sobre la expresión y secreción de Gal-9, así como su impacto funcional en modelos de infección viral y de cáncer. Finalmente, la identificación de los factores de transcripción específicos que median la activación del promotor de *LGALS9* podría abrir nuevas estrategias terapéuticas para modular la respuesta inmunitaria en enfermedades inflamatorias o neoplásicas.

12. Referencias

1. Abu Sufiyan Chhipa, Valentina Boscaro, Margherita Gallicchio, Snehal Patel, (2024). The curious case of type I interferon signaling in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Volume 1879, Issue 6, 189204, ISSN 0304-419X, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189204>.
2. Alam, S., Li, H., Margariti, A., Martin, D., Zampetaki, A., Habi, O., Cockerill, G., Hu, Y., Xu, Q., & Zeng, L. (2011). Galectin-9 protein expression in endothelial cells is positively regulated by histone deacetylase 3. *The Journal of biological chemistry*, 286(51), 44211–44217
3. Aparicio F., J. (2019). Identificación, caracterización y evaluación de la actividad del promotor del gen *LGALS9*. (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
4. Anderson, A. C., Joller, N., & Kuchroo, V. K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*, 44(5), 989–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
5. Arikawa, T., Watanabe, K., & Yamauchi, A. (2021). Galectin-9 expression in vascular endothelial cells regulates T-cell infiltration and plaque stability in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 117(13), 2735–2747. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab104>
6. Armenta-Castro, Tania Reyes-Vallejo, Daniel Máximo-Sánchez, Irma Herrera-Camacho, Gustavo López-López, Sandra Reyes-Carmona⁵, Ileana Conde-Rodríguez, Ivonne Ramírez-Díaz, Adriana Aguilar-Lemarroy, Luis Felipe Jave-Suarez, Lorena Milflores-Flores, Gerardo Santos-Lopez, Julio Reyes-Leyva and Verónica Vallejo-Ruiz. (2020). Epigenetic regulation of *LGALS9* expression in cervical cancer cell lines. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
7. Asakura, H., Kashio, Y., Nakamura, K., Seki, M., Dai, S., Shirato, Y., Abedin, M. J., Yoshida, N., Nishi, N., Imaizumi, T., Saita, N., Toyama, Y., Takashima, H., Nakamura, T., Ohkawa, M., & Hirashima, M. (2002). Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN γ -induced galectin-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(10), 5912–5918. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5912>

8. Badis, G., Berger, M. F., Philippakis, A. A., Talukder, S., Gehrke, A. R., Jaeger, S. A., Chan, E. T., Metzler, G., Vedenko, A., Chen, X., Kuznetsov, H., Wang, C. F., Coburn, D., Newburger, D. E., Morris, Q., Hughes, T. R., & Bulyk, M. L. (2009). Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5935), 1720–1723. <https://doi.org/10.1126/science.1162327>
9. Balkwill F, Watling D, Taylor-Papadimitriou J. (1978). Inhibición del crecimiento de células mamarias humanas por interferón linfoblastoide. *Int J Cancer* 22(3):258–65. doi:10.1002/ijc.2910220307
10. Biron, C. A. (1999). Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. *Current Opinion in Microbiology*, 2(4), 374–381
11. Bozorgmehr, N., Mashhour, S., Perez Rosero, E., Xu, L., Shahbaz, S., Sligl, W., Osman, M., Kutsogiannis, D. J., MacIntyre, E., O'Neil, C. R., & Elahi, S. (2021). Galectin-1119, a Player in Cytokine Release Syndrome and a Surrogate Diagnostic Biomarker in SARSCoV-2 Infection. *mBio*, 12(3),
12. Brewer F.C. (2002). Propiedades de unión y reticulación de las galectinas. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1572:255-262. doi: 10.1016/S0304-4165(02)00312-4.
13. Caporal Hernández Liliana. (2018). Análisis de la expresión de glicogenes modulados por la oncoproteína e6 del virus de vph de alto y bajo riesgo. (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
14. Carreca, A.P.; Gaetani, M.; Busà, R.; Francipane, M.G.; Gulotta, M.R.; Perricone, U.; Iannolo, G.; Russelli, G.; Carcione, C.; Conaldi, P.G.; et al (2022). Galectin-9 and Interferon-Gamma Are Released by Natural Killer Cells upon Activation with Interferon-Alpha and Orchestrate the Suppression of Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*, 14, 1538. <https://doi.org/10.3390/v14071538>
15. Chabot, S., Kashio, Y., Seki, M., Shirato, Y., Nakamura, K., Nishi, N., Nakamura, T., Matsumoto, R., Hirashima, M. (2002). Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology*. 12, 111-118
16. Chiariotti, L., Salvatore, P., Frunzio, R., & Bruni, C. B. (2002). Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconjugate Journal*, 19(7–9), 441–449. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014073.23096.3a>

17. Cummings RD, Liu FT, Rabinovich GA, et al. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. 2022. Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579987/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.36
18. Dardalhon, V., Anderson, A. C., Karman, J., Apetoh, L., Chandwaskar, R., Lee, D. H., & Kuchroo, V. K. (2010). Tim-3/galectin-9 pathway: Regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b⁺Ly-6G⁺ myeloid cells. *The Journal of Immunology*, 185(3), 1383–1392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903275>
19. De Andrea, M., Ravera, R., Gioia, D., Gariglio, M., & Landolfo, S. (2002). The interferon system: an overview. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 6 Suppl A, A41-6; discussion A55-8.
20. Demers, M., Rose, A. A., Grosset, A. A., Biron-Pain, K., Gaboury, L., Siegel, P. M., & St-Pierre, Y. (2010). Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *The American journal of pathology*, 176(6), 3023–3031. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090876>
21. Dings, R. P. M., Miller, M. C., Griffin, R. J., & Mayo, K. H. (2018). Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 905. <https://doi.org/10.3390/ijms19030905>
22. Ebrahim, A. H., Alalawi, Z., Mirandola, L., Rakhshanda, R., Dahlbeck, S., Nguyen, D., Chiriva-Internati, M. (2014). Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Annals of translational medicine*, 2(9), 88. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.12
23. Enninga, J., Levy, D. E., Blobel, G., & Fontoura, B. M. A. (2002). Role of nucleoporin induction in releasing an mRNA nuclear export block. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5559), 1523–1525. <https://doi.org/10.1126/science.1067861>
24. Estupiñán, M. A., Tom Baladi, Samantha Roudi, Michael J. Munson, Jeremy Bost, Oskar Gustafsson, Daniel Velásquez-Ramírez, Deepak Kumar Bhatt, Daniel Hagey, Dennis Hekman, Shalini Andersson, Samir EL Andaloussi, and Anders Dahlén. (2025). Design and screening of novel endosomal escape compounds using mCherry-GAL9 reporter cell lines. *Nano Today*, 55, 102652.

25. Fu, H.; Liu, Y.; Xu, L.; Liu, W.; Fu, Q.; Liu, H. Zhang, W.; Xu, J. (2015). Galectin-9 predicts postoperative recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Tumor Biol.*, 36, 5791-5799
26. Fujita, K., Iwama, H., Oura, K., Tadokoro, T., Samukawa, E., Sakamoto, T., Nomura, T., Tani, J., Morishita, A., Yoneyama, H., & Masaki, T. (2021). Cancer cell-derived Galectin-9 in hepatocellular carcinoma suppresses antitumor immunity via interaction with TIM-3. *Oncology Reports*, 45(1), 64–72. <https://doi.org/10.3892/or.2020.785>
27. Fuselier, C., Dumoulin, A., Paré, A., Nehmé, R., Ajarrag, S., Granger Joly de Boissel, P., Chatenet, D., Doucet, N., & St-Pierre, Y. (2023). Placental Galectins in Cancer: Why We Should Pay More Attention. *Cells*, 12(3), 437. <https://doi.org/10.3390/cells12030437>
28. Gibbert K., Schlaak JF, Yang D., Dittmer U. (2013). Subtipos de IFN- α : distintas actividades biológicas en la terapia antiviral. *Hno. J. Farmacol.*; 1048–1058. doi: 10.1111/bph.12010.
29. González SAG, Nava A. (2014). Galectinas. *El residente*; 9(1): 9-14.
30. Heusschen, R., Griffioen, A. W., & Thijssen, V. L. (2013). Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1836(1), 177–185
31. Heusschen, R., Schulkens, I.A., van Beijnum, J, Griffioen, A.W., Thijssen, V.L. (2014). Endothelial LGALS9 splice variant expression in endothelial cell biology and angiogenesis. *BiochimBiophys Acta*.1842, 284-292
32. Igawa, K., Satoh, T., Hirashima, M., & Yokozeki, H. (2006). 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: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 61(12), 1385–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01130.x>
33. Imaizumi, T., Kumagai, M., Sasaki, N., Kurotaki, H., Mori, F., Seki, M., Nishi, N., Fujimoto, K., Tanji, K., Shibata, T., Tamo, W., Matsumiya, T., Yoshida, H., Cui, X. F., Takanashi, S., Hanada, K., Okumura, K., Yagihashi, S., Wakabayashi, K., Nakamura, T., Satoh, K. (2002). Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of leukocyte biology*, 72(3), 486–491

34. Irie, A., Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Liu, D., Shirato, Y., Seki, M., Nishi, N., Nakamura, T., Yokomise, H., Hirashima, M. (2005). Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 11, 2962-2968
35. Jiang, J., Jin, M.S., Kong, F., Cao, D., Ma, H.X., Jia, Z., Wang, Y.P., Suo, J., Cao, X. (2013). Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PloS One.*, 8, e81799-e81807
36. John, S., & Mishra, R. (2016). Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. *Journal of Biosciences*, 41(3), 507–534.
37. Kageshita, T., Kashio, Y., Yamauchi, A., Seki, M., Abedin, M.J., Nishi, N., Shoji, H., Nakamura, T., Ono, T., Hirashima, M. (2002). Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer.* 99, 809-816
38. Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura., K, Type., YH. (1999). I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med.* 189(9):1451–1460. doi:10.1084/jem.189.9.1451.
39. Kissil, J. L., & Kimchi, A. (1998). Death-associated proteins: from gene identification to the analysis of their apoptotic and tumour suppressive functions. *Molecular Medicine Today*, 4(6), 268–274
40. Ko, F. C. F., Yan, S., Lee, K. W., Lam, S. K., & Ho, J. C. M. (2023). Chimera and Tandem-Repeat Type Galectins: The New Targets for Cancer Immunotherapy. *Biomolecules*, 13(6), 902. <https://doi.org/10.3390/biom13060902>
41. Kwon, H., Kim, H. S., Kim, D. W., Kang, D., & Rho, H. M. (1997). Structure and organization of the human 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene family. *Genomics*, 41(3), 411–419. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4678>
42. Lahm, H., Andre, S., Hoeflich, A., Fischer, J. R., Sordat, B., Kaltner, H., ... Gabius, H. J. (2001). Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127(6), 375–386. <https://doi.org/10.1007/s004320000207>

43. Lai, J., Wang, Y., & Chen, R. (2023). High serum Galectin-9 levels are associated with metastasis and poor survival in gastric and melanoma patients. *BMC Cancer*, 23(1), 712. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11138-7>
44. Lambert, M., Jambon, S., Depauw, S., & David-Cordonnier, M. H. (2018). F Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. *Molecules (Basilea, Suiza)*, 23(6), 1479. <https://doi.org/10.3390/molecules23061479>
45. Leaman, D. W., Chawla-Sarkar, M., Jacobs, B., Vyas, K., Sun, Y., Ozdemir, A., Yi, T., Williams, B. R., & Borden, E. C. (2003). Novel growth and death related interferonstimulated genes (ISGs) in melanoma: greater potency of IFN-beta compared with IFNalpha2. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 23(12), 745–756. <https://doi.org/10.1089/107999003772084860>
46. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., & Poirier, F. (2002). Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal*, 19(7–9), 433–440.
47. Lerévérénd, C., Kotaich, N., Cartier, L., De Boni, M., Lahire, S., Fichel, C., Thiebault, C., Brabencova, E., Maquin, C., Barbosa, E., Corsois, L., Hotton, J., Guendouzen, S., Guilbert, P., Lepagnol-Bestel, A. M., Cahen-Doidy, L., Lehmann-Che, J., Devy, J., Bensussan, A., Le Jan, S., ... Potteaux, S. (2025). Enhanced expression of galectin-9 in triple negative breast cancer cells following radiotherapy: Implications for targeted therapy. *International journal of cancer*, 156(1), 229–242. <https://doi.org/10.1002/ijc.35107>
48. Li, J., Zhang, X., & Lin, Q. (2022). Galectin-9 modulates macrophage polarization and insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 376. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03583-8>
49. Liang, M., Ueno, M., Oomizu, S., Arikawa, T., Shinonaga, R., Zhang, S., Yamauchi, A., Hirashima, M. (2008). Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 134, 899-907.
50. Liu, F.T., & Rabinovich, G. A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 5(1), 29–41. <https://doi.org/10.1038/nrc1527>

51. Liu, Z., Han, H., He, X., Li, S., Wu, C., Yu, C., Wang, S. (2016). Expression of the galectin-9-Tim-3 pathway in glioma tissues is associated with the clinical manifestations of glioma. *Oncol Lett.* 11, 1829-1834
52. Liu, F. T., & Stowell, S. R. (2023). The role of galectins in immunity and infection. *Nature reviews. Immunology*, 23(8), 479–494. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00829-7>
53. Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual review of genomics and human genetics*, 7, 29–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623>
54. Masamichi Nagae, Nozomu Nishi, Sachiko Nakamura-Tsuruta, Jun Hirabayashi, Soichi Wakatsuki, Ryuichi Kato. (2008). Structural Analysis of the Human Galectin-9 N-terminal Carbohydrate Recognition Domain Reveals Unexpected Properties that Differ from the Mouse Orthologue. *Journal of Molecular Biology*. Volume 375, Issue 1. Pages 119-135, ISSN 0022-2836 <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.060>.
55. Matsumoto, R., Matsumoto, H., Seki, M., Hata, M., Asano, Y., Kanegasaki, S., Stevens, R. L., & Hirashima, M. (1998). Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*, 273(27), 16976–16984. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16976>
56. Matys, V., Kel-Margoulis, O. V., Fricke, E., Liebich, I., Land, S., Barre-Dirrie, A., Reuter, I., Chekmenev, D., Krull, M., Hornischer, K., Voss, N., Stegmaier, P., LewickiPotapov, B., Saxel, H., Kel, A. E., & Wingender, E. (2006). TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D108–D110. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj143>
57. Mendieta-Carmona, V., Delgado-López, G., Reyes-Leyva, J., Gutiérrez-Quiroz, CT., Vazquez-Zamora, VJ., Picazo-Mendoza, DA., Montiel-Jarquín, AJ., Martínez-Morales, LP., Vallejo-Ruiz, V. (2023). Galectin-9 Expression is Correlated to Cervical Squamous Cell Carcinoma Progression and Overall Survival. *Onco Target Ther.*; 16: 891-904. <https://doi.org/10.2147/OTT.S433710>
58. Michalska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J., & Bluysen, H. (2018). A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression 126 and Controls Type I and Type II IFN Responses. *Frontiers in immunology*, 9, 1135

59. Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P., Tough, D.F. (2002). Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood*. 99(9):3263–3271. doi:10.1182/blood.v99.9.3263.
60. Monney, L., Sabatos, C. A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., & Kuchroo, V. K. (2002). Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 415(6871), 536–541. <https://doi.org/10.1038/415536a>
61. Morishita, A., Nomura, K., Tani, J., Fujita, K., Iwama, H., Takuma, K., Nakahara, M., Tadokoro, T., Oura, K., Chiyo, T., Fujihara, S., Niki, T., Hirashima, M., Nishiyama, A., Himoto, T., & Masaki, T. (2021). Galectin 9 suppresses the tumor growth of colon cancer in vitro and in vivo. *Oncology reports*, 45(6), 105. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8056>
62. Moritoki, M., Kadowaki, T., Niki, T., Nakano, D., Soma, G., Mori, H., Kobara, H., Masaki, T., Kohno, M., & Hirashima, M. (2013). Galectin-9 ameliorates clinical severity of MRL/lpr lupus-prone mice by inducing plasma cell apoptosis Independently of Tim-3. *PloS One*, 8(4), e60807.
63. Mou, N., He, Y., Liu, L., & Zhang, H. (2022). Regulatory role of Galectin-9 in T-cell differentiation and inflammation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 367, 577888. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2022.577888>
64. Munson, M. J., O'Driscoll, G., Silva, A. M., Lázaro-Ibáñez, E., Gallud, A., Wilson, J. T., Collén, A., Esbjörner, E. K., & Sabirsh, A. (2021). A high-throughput Galectin-9 imaging assay for quantifying nanoparticle uptake, endosomal escape and functional RNA delivery. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01728-8>
65. Nehmé, R., & St-Pierre, Y. (2023). Targeting intracellular galectins for cancer treatment. *Frontiers in immunology*, 14, 1269391. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1269391>
66. Nishihara, M., Iijima, H., & Seki, M. (2022). Elevated Galectin-9 levels correlate with disease activity and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 41(9), 2651–2660. <https://doi.org/10.1007/s10067-022-06201-x>
67. Nobumoto, A., Nagahara, K., Oomizu, S., Katoh, S., Nishi, N., Takeshita, K., Niki, T., Tominaga, A., Yamauchi, A., & Hirashima, M. (2008). Galectin-9 suppresses tumor

- metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. *Glycobiology*, 18(9), 735–744
68. Nyman, T. A., Matikainen, S., Sareneva, T., Julkunen, I., & Kalkkinen, N. (2000). Proteome analysis reveals ubiquitin-conjugating enzymes to be a new family of interferon- α -regulated genes. *European Journal of Biochemistry*, 267(13), 4011–4019. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01433.x>
 69. Ohmori, Y., & Hamilton, T. A. (1997). Interferon-stimulated response element and NF κ B regulate interferon gamma-induced IP-10 gene expression in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 20414–20420. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.20414>
 70. Ortiz, O.J., Alarcón, RLC., Jiménez, LMA., Garzón, BVH., Calleja, MI., Barrera, SHA. (2015). Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology Journal*.; 12 (29): 1-14.
 71. Park, WS., Jung, W K., Park, S K., Heo, K W., Kang, M S., Choi, Y H., Kim, GY., Park, S G., Seo, S K., Yea, S S., Liu, K H., Shim, E B., Kim, D J., Her, M., & Choi, I W. (2011). Expression of galectin-9 by IFN- γ stimulated human nasal polyp fibroblasts through MAPK, PI3K, and JAK/STAT signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(2), 259–264.
 72. Pestka, S., Krause, C D., & Walter, M R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202(1), 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
 73. Punt, S., Thijssen, V.L., Vrolijk, J., De Kroon, C.D., Gorter, A., & Jordanova, E.S. (2015). Galectin-1,-3 and-9 expression and clinical significance in squamous cervical cancer. *PloS one*, 10(6).
 74. Rabinovich, G A., Liu, F T., Hirashima, M., & Anderson, A. (2007). An Emerging Role for Galectins in Tuning the Immune Response: Lessons from Experimental Models of Inflammatory Disease, Autoimmunity and Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2-3), 143–158.
 75. Reyes-Vallejo, T., Conde-Rodríguez, I., Serna-Villalobos, J., Ramírez-Díaz, I., Pérez-Villalobos, G., Delgado-López, G., Vazquez-Zamora, V. J., Gutiérrez-Quiroz, C. T.,

- Ávila-Jiménez, L., García-Carrancá, A., Martínez-Acosta, L., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2022). Serum Levels of Galectin-9 are Increased in Cervical Cancer Patients and are Higher in Advanced Clinical Stages. *OncoTargets and therapy*, 15, 1211–1220. <https://doi.org/10.2147/OTT.S378933>
76. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2011). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 2045–2057. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>
77. Seki, R., Yamashita, T., & Ito, M. (2023). Galectin-9 regulates fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in hepatic and renal fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1173942. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1173942>
78. Schilling, E. M., Scherer, M., & Stamminger, T. (2021). Intrinsic Immune Mechanisms Restricting Human Cytomegalovirus Replication. *Viruses*, 13(2), 179.
79. Silverman R. (1997) Dependent RNase L: a regulated endoribonuclease in the interferon system. In: D'Alessio GRJ, editor. *Ribonucleases: Structure and Functions*. 1997. pp. 515–551.
80. Steelman, A. J., Smith, R., 3rd, Welsh, C. J., & Li, J. (2013). Galectin-9 protein is upregulated in astrocytes by tumor necrosis factor and promotes encephalitogenic T-cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 288(33), 23776–23787.
81. Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., et al. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 424(6948):516–523. doi:10.1038/nature01850.
82. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology*, 19, 623– 655. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>
83. Tipping, P. G., Kitching, A. R., Huang, X. R., Mutch, D. A., & Holdsworth, S. R. (1997). Immune modulation with interleukin-4 and interleukin-10 prevents crescent formation and glomerular injury in experimental glomerulonephritis. *European journal of immunology*, 27(2), 530–537

84. Thyrell, L., Erickson, S., Zhivotovsky, B., Pokrovskaja, K., Sangfelt, O., Castro, J., Einhorn, S., Grandér, D. (2002). Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene*. 21(8):1251–1262. doi:10.1038/sj.onc.1205179
85. Thijssen, V. L., Heusschen, R., Caers, J., & Griffioen, A. W. (2015). Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et biophysica acta*, 1855(2), 235–247.
86. Toscano, MA., Ilarregui, JM., Bianco, GA., et al. 2007. Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev* ; 18: 57–71
87. Türeci, Ö., Schmitt, H., Fadle, N., Pfreundschuh, M., & Sahin, U. (2003). Galectin-9 expression defines a novel subset of macrophages with immunoregulatory properties induced by interferon signaling. *Journal of Immunology*, 171(11), 5930–5939.
88. van den Hoogen, L. L., van Roon, J., Mertens, J. S., Wienke, J., Lopes, A. P., de Jager, W., Rossato, M., Pandit, A., Wichers, C., van Wijk, F., Fritsch-Stork, R., & Radstake, T. (2018). Galectin-9 is an easy to measure biomarker for the interferon signature in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*, 77(12), 1810– 1814.
89. Vega del Real María José. (2021). Modelado in silico de la interacción entre los factores de transcripción IRFs y NF-κB con sus elementos de respuesta localizados en el promotor del gen LGALS9. (Tesis de maestría) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
90. Wada, J., Ota, K., Kumar, A., Wallner, E. I., & Kanwar, Y. S. (1997). Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *The Journal of clinical investigation*, 99(10), 2452–2461. doi:10.1172/JCI119429
91. Wang, X., Zhao, L., & Chen, Y. (2023). Serum Galectin-9 levels correlate with disease activity and autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 247, 109211. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2023.109211>
92. Williams B. R. (2001). Signal integration via PKR. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2001(89), re2. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.89.re2>

93. Yamauchi, A., Kontani, K., Kihara, M., Nishi, N., Yokomise, H., Hirashima, M. (2006). Galectin-9, a Novel Prognostic Factor with Antimetastatic Potential in Breast Cancer. *Breast J*, 12, s196-s200.
94. Yang, Y., Linlin Sun, Ching-Fei Li, Yu-HanWang, WeiyaXia, BoningLiu, Yu-YiChu, Laura Bover, LongVien, and Mien-Chie Hung. (2022). Generation and characterization of anti-Galectin-9 antibodies in Jurkat cell models. *Frontiers in Immunology*, 13, 9006662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.9006662>
95. Yoshida, H., Imaizumi, T., Kumagai, M., Kimura, K., Satoh, C., Hanada, N., Fujimoto, K., Nishi, N., Tanji, K., Matsumiya, T., Mori, F., Cui, X. F., Tamo, W., Shibata, T., Takanashi, S., Okumura, K., Nakamura, T., Wakabayashi, K., Hirashima, M., Sato, Y., Satoh, K. (2001). Interleukin-1beta stimulates galectin-9 expression in human astrocytes. *Neuroreport*, 12(17), 3755– 3758.
96. Zhang, Z.Y., Dong, J.H., Chen, Y.W., Wang, X.Q., Li, C.H., Wang, J., Wang, G.Q., Li, H.L., Wang, X.D. (2012). Galectin9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 13, 2503- 2509
97. Zhang, X., Wang, S., Zhu, Y., Zhang, M., Zhao, Y., Yan, Z., ... Li, X. (2021). Double-edged effects of interferons in the regulation of the cancer-immunity cycle. *OncolImmunología*, 10(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1929005>
98. Zhang, L., Tian, S., Pei, M., Zhao, M., Wang, L., Jiang, Y., Yang, T., Zhao, J., Song, L., & Yang, X. (2019). Crosstalk between histone modification and DNA methylation orchestrates the epigenetic regulation of the costimulatory factors, Tim-3 and galectin-9, in cervical cancer. *Oncology reports*, 42(6), 2655–2669. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7388>
99. Zhou L, Zhang Y, Wang Y et al. (2020) Un papel dual de los interferones tipo I en la inmunidad antitumoral. *Adv Biosyst* 4:e1900237
100. Zhu, Y., An, X., Zhang, X., Qiao, Y., Zheng, T., Li, X. (2019). STING: a master regulator in the cancer-immunity cycle. *Mol Cancer*. 18(1):152. doi:10.1186/s12943-019-1087-y.
101. Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., ... & Kuchroo, V. K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9

negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology*, 6(12), 1245–1252.
<https://doi.org/10.1038/ni1271>

13. Anexos

Este trabajo se presentó en el congreso:

