BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“EFECTO DEL INF-γ SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL GEN *LGALS9* EN QUERATINOCITOS”

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIÓLOGIA

PRESENTA:
LAURA MONTSERRAT GARCÍA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERÓNICA VALLEJO RUIZ
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. LORENA MILFLORES FLORES

NOVIEMBRE, 2024

Índice

1. Introducción ***12***

1.1. Galectinas **12**
1.1.1. Localización celular 14
1.1.2. Funciones generales de galectinas 14

1.2. Galectina-9 ..... **16**
1.2.1. Estructura de la galectina-9 17
1.2.2. Funciones de galectina-9 18
1.2.3. Cambios de expresión de galectina-9 en cáncer 20
1.2.4. Gen de galectina-9 (*LGALS9*) 23

2. Antecedentes ***25***

2.1. Región promotora del gen *LGALS9* **25**

2.2. Cambios de expresión de galectina-9 ..... **26**

2.3. Regulación de la expresión de galectina-9 ..... **28**

2.4. Interferón Gamma (IFN- γ) **31**
2.4.1. Funciones del IFN- γ 32
2.4.2. Vía de señalización del IFN-γ 35
2.4.3. Factores reguladores del interferón (IRF) 39
2.4.4. Regulación transcripcional de ISG 40

3. Justificación ***45***

4. Planteamiento del problema ***45***

5. Hipótesis ***46***

6. Objetivos ***46***

6.1. Objetivo general **46**

6.2. Objetivo especifico **46**

7. Materiales y métodos ***47***

7.1. Niveles de expresión de ARN mensajero **47**
7.1.1. Cultivo celular 47
7.1.2. Inducción con IFN-γ 47
7.1.3. Extracción de ARN total 48
7.1.4. Síntesis de ADNc 48
7.1.5. PCR Tiempo Real (RT-PCR) 49

7.2. Evaluación de la actividad del promotor mediante ensayos de luciferasa **50**
7.2.1. Transfección 50
7.2.2. Ensayo de luciferasa 52

7.3. Análisis estadísticos **53**

8. Resultados ***54***

8.1. Efecto de INF-γ sobre los niveles de ARNm de gen *LGALS9* en queratinocitos ... 54
8.2. Actividad de promotor ... 55
9. Discusión ... 58
10. Conclusión ... 64
11. Bibliografía ... 65

Lista de figuras

Figura 1	Localización de galectina-9 en una célula epitelial.
Figura 2	Estructura de la galectina-9.
Figura 3	Estructura de las variantes de ARNm del gen *LGALS9* que se generan por corte y empalme alternativo.
Figura 4	Representación esquemática de la vía de señalización canónica del IFN-γ.
Figura 5	Vía de señalización de los IFN tipo I y tipo II.
Figura 6	Cooperación de componentes ISGF3 y GAF fosforilados y no fosforilados de IRF1 en la regulación de la transcripción basal e inducida por IFN.
Figura 7	Plásmidos usados en las transfecciones para los ensayos de luciferasa
Figura 8	Gráfica que muestra el cambio de nivel de expresión del gen *LGALS9*.
Figura 9	Gráfica que muestra el cambio de nivel de expresión del gen *LGALS9*.
Figura 10	Gráfica que muestra la actividad del promotor de 727 pb del gen *LGALS9*.
Figura 11	Representación gráfica de los sitios encontrados con TRANSFAC.

Lista de tablas

Tabla 1	Clasificación de las galectinas respecto a su estructura y su distribución celular y tisular.
Tabla 2	Expresión y rol de la galectina-9 en diferentes tipos de cáncer.
Tabla 3	Estructura de las variantes de ARNm del gen *LGALS9* que se generan por corte y empalme alternativo.
Tabla 4	Representación esquemática de la vía de señalización canónica del IFN-γ.

Lista de abreviaturas

Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

Ácido Ribonucleico (ARN)

Ácido Ribonucleico Mensajero (ARNm)

Adenocarcinoma (AC)

ADN complementario (ADNc)

Carcinoma de células escamosas (CCE)

Células asesinas naturales (NK)

Células del estroma endometrial (ESCs)

Células estromales mesenquimales multipotentes (MSC)

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Células T asesinas naturales (NKT)

Células T auxiliares 1 (TH1)

Células T auxiliares 17 (Th17)

Células T reguladoras (Treg)

Complejo de histocompatibilidad mayor (MHCI)

Complejo de histocompatibilidad mayor (MHCII)

Dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC)

Dominio de unión al ADN (DBD)

Dominios regulatorios positivos (PRD-I)

Elemento de respuesta a estímulos de interferón (ISRE)

Elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE)

Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Eukaryotic Promoter Database (EPD)

Factor 3 del gen estimulado por IFN (ISGF3)

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)

Factor de respuesta de IFN (IRF)

Factor de transcripción II D (TFIID)

Factor nuclear-κB (NF-kB)

Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)

Genes estimulados por interferón (ISGs)

Glicoesfingolípido de Forssman (FGL)

Hidroxilo (–OH)

Histona deacetilasa 3 (HDAC3)

Inhibidores de señalización inducida por citoquinas (CIS)

Inmunoglobulina de células T mucina-3 (TIM-3)

Inmunoglobulina E (IgE)

Inr (Iniciador)

Interferón alfa (IFN-α)

Interferón beta (IFN-β)

Interferón gama (IFN- γ)

Interferones (IFN)

Interferones tipo II (IFN-II)

Interleucina 12 (IL-12)

Interleucina-17A (IL-17A)

Janus cinasas (JAK1)

Janus cinasas (JAK2)

Janus Quinasa-Transductor de Señales y Activador de la Transcripción (JAK-STAT)

Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL)

Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL)

Ligando de la muerte programada 1(PD-L1)

Ligando de la muerte programada 1(PD-L2)

Linfocitos T citotóxicos (CD8+)

Linfocitos T cooperadores (CD4+)

Matriz extracelular (MEC)

Medio de crecimiento Dulbecco Eagle modificado (DMEM)

Metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9)

Molécula de adhesión intercelular (I-CAM)

Óxido nítrico (NO)

Patch 1.0 (Public 1.0 Pattern Search for Transcription Factor Binding Sites)

Potenciador del homólogo 2 de zeste (EZH2)

Proteína 1 de la muerte programada (PD-1)

Proteína 1 homologa de muesca de locus neurogénico (Notch1)

Proteína 2 expresada en derivados del corazón y de la cresta neural (HAND2)

Proteína activadora 1 (AP-1)

Proteína de unión a guanilato (GBP)

Proteína de unión a TATA (TBP)

Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

Proteína forkhead box O1 (FOXO1)

Proteína inactivadora de ribosomas 1 (RIP1)

Proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)

Proteína tirosina quinasa 2 (Pyk2)

Quinasas reguladas por el extracelular 1/2 (ERK1/2)

Receptor 1 de Interferón Gamma (IFNGR1)

Receptor 2 de Interferón Gamma (IFNGR2)

Receptor de Ashwell-Morell (AMR)

Receptor de glucagón (GCGR)

Receptor de tipo Tool (TLR)

Suero Fetal Bovino (SFB)

Supresor de la Señalización de Citoquinas 1 (SOCS1)

Transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT)

Transportador de glucosa 2 (GLUT-2)

Trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3)

Virus del papiloma humano (VPH)

β1,4-N acetilglucosamina (LacNAc)

Resumen

La galectina-9 es un miembro de las galectinas de repetición en tándem, desempeña diferentes funciones que varían dependiendo del tipo celular, de su localización y de su concentración, tales como: regulación del sistema inmunológico, inflamación, adhesión celular y migración, cáncer y enfermedades autoinmunes. Existen algunos estudios que reportan que el interferón gamma (INF-γ) es capaz de inducir la expresión del gen *LGALS9*, en diferentes tipos celulares como las células endoteliales y los fibroblastos, sin embargo, no se sabe si estos cambios de expresión del gen *LGALS9* son resultado del efecto sobre la actividad del promotor.

En un estudio en el que se realizó un análisis *in silico* para evaluar la interacción de ciertos factores de transcripción con elementos de respuesta de la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* se identificaron sitios de interacción de factores de transcripción y entre ellos los factores reguladores del interferón (IRF) que regulan la transcripción de los genes de interferón (IFN) y la expresión génica inducida por IFN. En el presente trabajo se evaluó el efecto del INF-γ sobre el nivel de expresión del gen *LGALS9* en queratinocitos. Los resultados mostraron que el INF-γ aumenta los niveles de expresión del ARNm del gen *LGALS9* en la línea celular HaCaT, tanto a la concentración de 10 ng/mL como en la de 100 ng/mL; el INF-γ también mostró un aumento de la actividad del promotor de 727 pb del gen *LGALS9* comparado con el vector que no presenta la región promotora.

Los resultados muestran que el INF-γ incrementó la expresión del gen *LGALS9*, este aumento puede ser resultado de un efecto sobre la actividad del promotor a través la unión de factores de transcripción inducidos por esta citocina.

1. Introducción

1.1. Galectinas

El termino lectina se define actualmente como un grupo de proteínas oligoméricas naturales con secuencias similares, que son capaces de reconocer, distinguir y unirse reversiblemente a los carbohidratos libres y unidos, además de permitir la identificación de nuevas glicoproteínas y sus características (Abrantes *et al*., 2021).

El descubrimiento del receptor de Ashwell-Morell (AMR) también conocido como receptor de la asialoglicoproteína hepática, dio parteaguas a que muchos investigadores comenzaran la identificación de otros receptores. Éste es el primer receptor celular que se identificó y se aisló, correspondiendo también a la primera lectina que fue detectada en mamíferos (Grewal, 2010).
En el año 1976 se aisló una lectina del músculo del pollo y de extractos del corazón que reconocía β-galactósidos; actualmente es denominada galectina-1. Al inicio, estas proteínas estaban denominadas como lectinas de tipo S para denotar su dependencia del sulfhidrilo para unirse a moléculas de azúcar. Para el año 1994, se sistematizó la nomenclatura de las galectinas asignando un número a los miembros de esta familia conforme se fueron descubriendo (Varki, 2015).

Las galectinas son lectinas que tienen una característica muy importante, la afinidad por β-galactósidos (Chabot *et al*., 2002). Se encuentran clasificadas por el número y disposición de su dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC), este dominio tiene la capacidad de reconocer

específicamente β1,4-N acetilglucosamina (LacNAc), que está presente en diferentes glicoproteínas de la superficie de casi todas las células (Liu & Stowell, 2023).

Actualmente se han identificado 16 galectinas en vertebrados, de las cuales 12 se expresan en humanos (Kaminker & Timoshenko, 2021; Liu & Stowell, 2023). En la "

Tabla 1" se muestra la clasificación de las galectinas respecto a su estructura y distribución (Morishita *et al*., 2021).

Tabla 1. Clasificación de las galectinas respecto a su estructura y su distribución celular y tisular.

Tipo	***Subtipo***	***DRC***	***Animal***	***Distribución***
Prototipo	1	Un dominio DRC	Humano, ratón, rata, vaca, oveja, cerdo	Ubicua, fibroblastos, neuronas
	2		Humano, ratón, rata, vaca, oveja, cerdo	Estómago, intestino delgado
	5		Rata	Células rojas de la sangre
	7		Humano, ratón, rata, vaca, cerdo	Epitelio escamoso estratificado
	10		Humano	Eosinófilos, basófilos
	11		Oveja, cabra	Estómago, placenta
	13		Humano, cerdo	Placenta
	14		Humano, oveja	Eosinófilo, placenta
	15		Oveja, cabra	Estómago, placenta
	16		Humano	Placenta
Quimera	3	Contiene una región N-terminal no lectina conectada a un DRC	Humano, ratón, rata, vaca, oveja, cerdo	Ubicua, macrófago, epitelio
Tándem	4	Dos DRC unidos por un péptido flexible	Humano, ratón, rata, vaca, oveja, cerdo	Tracto gastrointestinal
	6		Ratón	Tracto gastrointestinal

	8	Humano, ratón, rata, vaca, oveja, cerdo	Ubicua
	9	Humano, ratón, rata, vaca, cerdo	Células inmunes, pulmón, tracto gastrointestinal
	12	Humano, ratón, rata, vaca, oveja, cerdo	Tejido adiposo

Nota: tabla modificada de Nio-Kobayashi, 2017.

1.1.1. Localización celular

Las galectinas se localizan en el citoplasma y en condiciones específicas también se pueden localizar en el núcleo. No tienen una secuencia señal, pero se ha propuesto que varias galectinas son secretadas por las células mediante mecanismos independientes a la vía secretora clásica (a través del complejo Retículo Endoplasmático - Golgi), tales como: el uso de vías de translocación directa a través de la membrana plasmática y a través de vesículas como exosomas o lisosomas. Por ello, las galectinas pertenecen a un grupo de proteínas que no contienen una secuencia señal pero que pueden ser secretadas y funcionar fuera de las células (Hughes, 2001; Yang *et al*., 2008; Lv *et al*., 2023). En la **Figura 1** se presenta un ejemplo de la localización de una galectina.

1.1.2. Funciones generales de galectinas

Cuando las galectinas se encuentra en el espacio extracelular, pueden unirse a varios glicoconjugados incluyendo a aquellos que están ubicados tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular. Las galectinas regulan diversos procesos dentro de la célula, (Yang *et al*., 2008) como la intervención en el corte y empalme del pre-ARNm, la regulación de la expresión

génica y de la muerte/crecimiento celular, así como en la detección de daños en las vesículas intracelulares (Caballero *et al*., 2020).

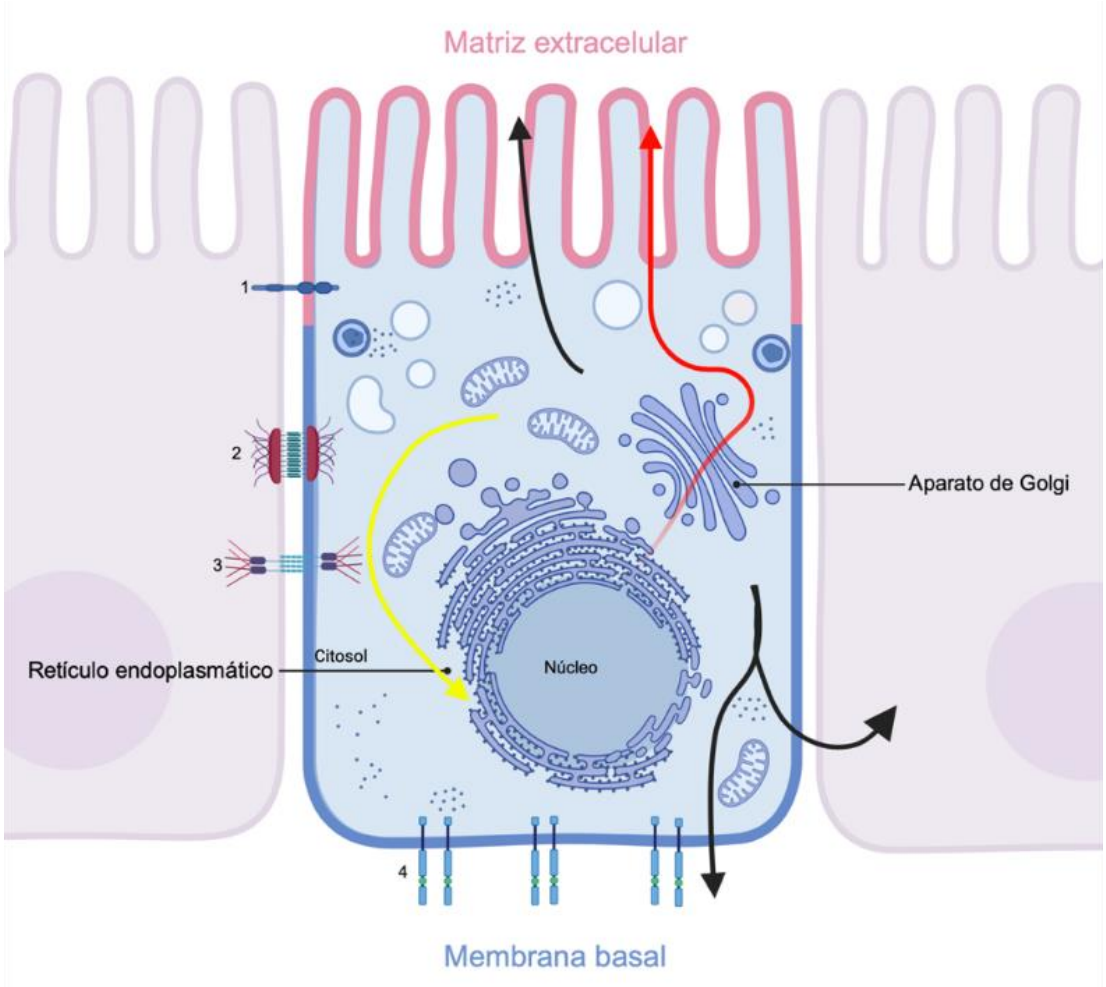


Figura 1: Localización de galectina-9 en una célula epitelial. Se muestra una célula epitelial con polaridad mantenida por adherencias a la matriz mediadas por integrinas (4) y por adherencias celulares como uniones estrechas (1), uniones desmosómicas (2) y uniones adherentes (3). La secreción de galectina citoplasmática desde los dominios apicales o basolaterales se produce por vías (flechas negras) que son independientes de la vía secretora clásica que involucra el retículo endoplásmico y los compartimentos de Golgi (flecha roja). También se muestra la importación de galectina al núcleo (flecha amarilla). *Nota. Adaptado de "Galectins as modulators of cell adhesión" (p. 669), por R.* Hughes, 2001, *Biochimie, 83(7).*

De igual manera, las galectinas tienen algunas funciones inmunosupresoras e inmunorreguladoras que dependen del tipo celular y del receptor al que se unen (Rio *et al*., 2022). En diversos estudios se ha demostrado que las galectinas participan en varios procesos, por ejemplo: en el desarrollo del cerebro, la homeostasis de las células T, la regulación del ciclo celular, en la diferenciación celular y la respuesta inmune, entre otros (Yuan *et al*., 2020; Ramos-Martínez *et al*., 2022).

Los cambios en el nivel de expresión de las galectinas se han asociado con diversas enfermedades, incluido el cáncer (Thijssen *et al*., 2015). En este contexto, desempeñan funciones reguladoras asociadas con la progresión tumoral y la metástasis, tales como: la proliferación celular, la evasión inmune, la agregación y adhesión celular, la transformación, la migración, la invasión y la supervivencia (Ramos-Martínez *et al*., 2022).

El presente trabajo se enfoca en el estudio de la galectina-9, de la cual profundizaremos a continuación.

1.2. Galectina-9

La galectina-9 se expresa en diferentes tipos celulares, entre ellas, células de órganos linfáticos, monocitos y células endoteliales de diferentes tejidos implicados en el sistema inmunológico, como el bazo, el timo y los linfocitos de sangre periférica, y en tejidos de origen endodérmico (hígado, intestino, estómago y pulmón (Heusschen *et al*., 2013; Holderried *et al*., 2019) La galectina-9 al igual que los demás miembros de las galectinas, se secreta por la vía no clásica;

acumulándose en polisomas libres que se encuentran en el citosol y después es liberada fuera de la célula a través de vesículas o exosomas (Moar & Tandon, 2021).

1.2.1. Estructura de la galectina-9

La galectina-9 es un miembro de las galectinas de repetición en tándem, con un tamaño de 355 aminoácidos, que cuenta con dos DRC no idénticos enlazados por una cadena polipeptídica de 14 a 56 aminoácidos de longitud, llamada dominio conector (Shete *et al*., 2022). La longitud del dominio conector puede variar entre 14, 26 y 56 aminoácidos (John & Mishra, 2016).

Los DRC forman estructuras β-sándwich compuesta por hojas β de seis hebras (S1-S6) y cinco hebras (F1-F5). El S4-S6 en N-DRC y el S3-S6 en C-DRC forman los sitios de unión a galactósidos (**Figura 2**). Existen aminoácidos altamente conservados, por ejemplo: la arginina 65 y 87 (R) y el ácido glutámico 85 (E) participan en el reconocimiento de carbohidratos, la histidina 60 (H) y la asparagina 62 (N) facilitan la alineación del DRC con el epítopo de glicano. Del mismo modo, el triptófano 81 (W) forma interacciones con el anillo de galactosa que facilita la formación de enlaces H con cuatro grupos hidroxilo (–OH) de residuos de β-galactósido (Nagae *et al*., 2006; John & Mishra, 2016; Moar & Tandon, 2021).

La región conectora de galectina-9 es susceptible a la acción de proteasas extracelulares como las metaloproteinasas de la matriz 9 (MMP-9), y la elastasa, etc., dando lugar a una disociación de los DRC y alterando la función de la proteína (John & Mishra, 2016).

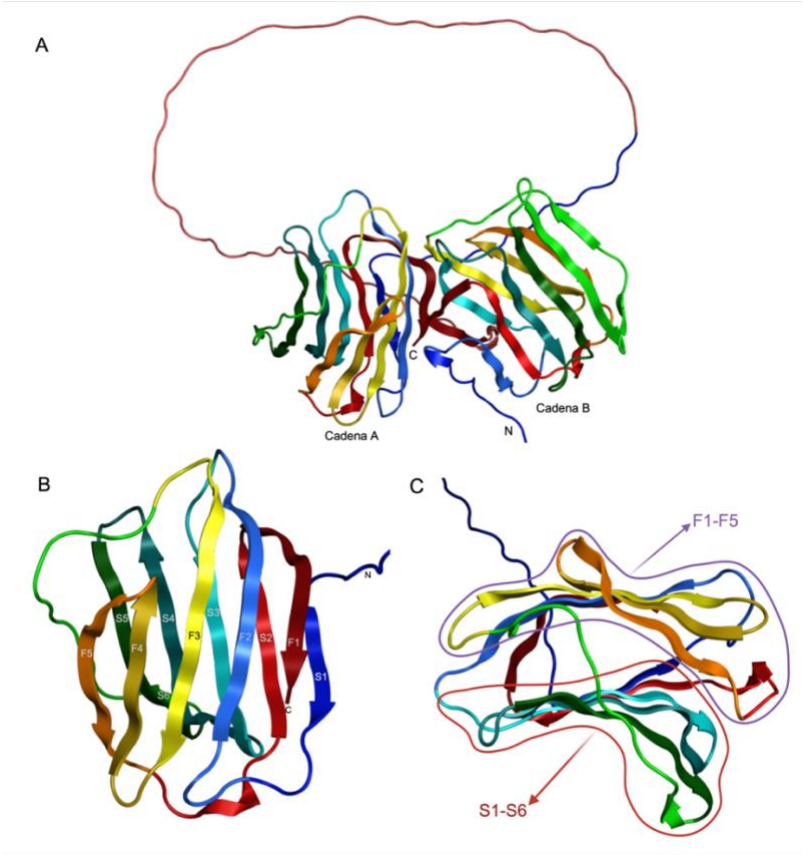


Figura 2: Estructura de la galectina-9. (A) Representación en un modelo de cinta de la estructura completa (355 aminoácidos) de galectina-9, con dos monómeros (cadena A y cadena B) y en color naranja el péptido de unión entre ambos monómeros. (B) Se muestran la cadena A formada por láminas β láminas de cinco hebras (F1-F5) y seis hebras (S1-S6) diferenciadas cada una por colores. (C) Vista de otro ángulo de la cadena A en donde se observa la estructura de β-sándwich con las hojas β de cinco hebras *(*F1-F5) y de seis hebras *(*S1-S6). Elaboración propia con la herramienta SWISS-MOL, editada con ChineraX.

1.2.2. Funciones de galectina-9

La galectina-9 funciona como una proteína pleiotrópica, ya que, sus diferentes funciones varían dependiendo del tipo celular, de su localización y de su concentración.

La galectina-9 citoplasmática participa en varias funciones celulares, por ejemplo: la agregación celular y la apoptosis, por otro lado, no existe información extensa sobre las funciones nucleares

de galectina-9, sin embargo, puede estar participando en el proceso de *splicing* de ARNm (del inglés *RNA splicing* o corte y empalme). Su localización nuclear se ha reportado en monocitos, células hepáticas, placentarias, endoteliales de colon y melanoma (Moar & Tandon, 2021).

Galectina-9 puede ser secretada al espacio extracelular y reconocer β-galactósidos de varios receptores de la superficie celular y de la matriz extracelular (MEC) (Corrêa *et al*., 2021). Hasta la fecha, se han reportado algunos de sus receptores incluyendo, el transportador de glucosa 2 (GLUT-2), la proteína disulfuro isomerasa (PDI), glicoesfingolípido de Forssman (FGL), inmunoglobulina de células T y dominio de mucina-3 (TIM-3), inmunoglobulina E (IgE) y el receptor de glucagón (GCGR) (John & Mishra, 2016). Cabe recalcar que, cuando la galectina-9 se localiza fuera de la célula, participa en la quimioatracción, la adhesión celular, la migración, la endocitosis de receptores, la agrupación en balsas lipídicas, el reciclaje de lípidos, etc (Moar & Tandon, 2021).

Se ha propuesto que galectina-9 pueden influir directamente en la inmunidad tanto innata como adaptativa mediante la unión a los receptores mencionados anteriormente, así pues, cuando galectina-9 interactúa con TIM-3 induce la apoptosis de linfocitos T citotóxicos (CD8+), y, además estimula la producción de interleucina (IL) 12 para iniciar respuestas inmunes adaptativas. Adicionalmente, galectina-9 tiene un efecto sobre las células T activadas que depende de la concentración a la que se encuentre. En concentraciones altas, galectina-9 induce la apoptosis de linfocitos T cooperadores (CD4+) y de linfocitos T citotóxicos (CD8+), pero en concentraciones bajas, aumenta la producción de citocinas por parte de las células T activadas. En concentraciones altas, la galectina-9 bivalente puede oligomerizarse y, por lo tanto, puede agregar más proteínas

de señalización o inducir la unión con más ligandos, lo cual es importante para la señalización apoptótica (Lv *et al*., 2023).

También, galectina-9 se ha propuesto como un inhibidor del sistema inmunológico ya que promueve la diferenciación de las células T reguladoras (Treg) y reduce las células T auxiliares 17 (TH17, linfocito T *helper 17*) y células T auxiliares 1 (TH1, linfocito T *helper 1*), lo que resulta en la supresión de la inmunidad excesiva e inflamación (Lv *et al*., 2023). Por otro lado, galectina-9 induce la apoptosis de timocitos y también la muerte en las células Th1 mediante la interacción con la molécula de superficie celular específica de Th1, que es TIM-3 (Yang *et al*., 2008).

Se ha reportado que la galectina-9 se puede encontrar en suero, y el aumento en la concentración se ha visto relacionado en trastornos metabólicos, insuficiencia cardíaca y muchos tipos de cáncer, lo que sugiere que pueden utilizarse como biomarcadores para el pronóstico y diagnóstico de varios trastornos fisiológicos (Moar & Tandon, 2021).

1.2.3. Cambios de expresión de galectina-9 en cáncer

Se ha demostrado que la galectina-9 promueve e inhibe la actividad tumoral en tumores malignos. La expresión de galectina-9 en tumores además de estar relacionada con la adhesión o metástasis de células tumorales, juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune mediante la interacción con diferentes receptores, las células presentadoras de antígenos o las células tumorales (Chou *et al*., 2018; Lv *et al*., 2023).

Se ha reportado en varios estudios que, en algunas neoplasias malignas los niveles de galectina-9 en células o tejidos tumorales son diferentes en comparación con los controles normales. Se pudo observar una alta expresión de galectina-9 en cáncer de mama, el carcinoma de cuello uterino asociado al virus del papiloma humano (VPH), el carcinoma de páncreas, el glioblastoma multiforme, el linfoma cutáneo de células T62, la leucemia linfocítica crónica (Lv *et al*., 2023).

Del lado contrario, en cáncer gástrico, cáncer de colon, carcinoma de esófago, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, carcinoma suprarrenal y células cancerosas de próstata, se han reportado una disminución en la expresión de galectina-9 con respecto a tejido normal (Lv *et al*., 2023) (

Tabla 2).

Galectina-9 presenta una alta expresión en los nevos melanocíticos, pero está regulada negativamente en las células de melanoma, especialmente en las lesiones metastásicas (Troncoso *et al*., 2012). En este estudio se demostró que la expresión de ARNm de galectina-9 en la línea celular de melanoma humano MM-BP (línea celular pleomórfica pequeña con formación de colonias *in vitro*) era mayor con respecto a la MM-RU (línea celular pleomórfica sin formación de colonias); por lo tanto, se sugiere que la galectina-9 desempeña un papel en la formación de nidos de células melanocíticas. Estos hallazgos sugirieron que la galectina-9 participa en la agregación celular (Kageshita *et al*., 2002).

Tabla 2. Expresión y rol de la galectina-9 en diferentes tipos de cáncer.

Tipo de cáncer	***Expresión de galectina-9***	***Actividad***	***Posible mecanismo***	***Pronóstico***

Cáncer gástico	Regulado a la baja	Supresor de tumor	Inducir la apoptosis de las células tumorales	Favorable
Cáncer colorrectal	Regulado a la baja	Supresor de tumor	Inducir la apoptosis de las células tumorales e inhibir la proliferación, reducir la vigilancia inmune del escape del tumor e inducir la autofagia	Favorable
Cáncer de pulmón	Regulado a la baja	Supresor de tumor	Suprimir la adhesión e invasión de células tumorales y activar las células asesinas naturales	Favorable
Carcinoma hepatocelular	Regulado a la baja	Supresor de tumor	Inducir la apoptosis de las células tumorales e inhibir la respuesta inmune antitumoral al inducir la senescencia de las células T en las células de Kupffer y otras células presentadoras de antígeno	Favorable
Carcinoma de esófago	Regulado a la baja	Supresor de tumor	Inducir la apoptosis de las células tumorales	Favorable
Melanoma	Regulado a la baja	Supresor de tumor	Inducir la apoptosis de las células tumorales	Favorable
Cáncer de mama	Regulado al alta	Promotor de tumor	Inhibir la vigilancia inmune a través de la vía Tim-3-Gal-9 e inducir la agregación de células tumorales para reducir la metástasis	Favorable
Glioma	Regulado al alta	Promotor de tumor	Inmunosupresión tumoral o escape inmunológico a través del sistema vía Tim-3-Gal-9	Desfavorable
Carcinoma de páncreas	Regulado al alta	Promotor de tumor	Reprogramación de macrófagos y ejercicio de efectos inmunosupresores	Desfavorable
Carcinoma de cuello uterino	Regulado al alta	Promotor de tumor	Escape inmune del tumor mediante la activación de la vía Tim-3-Gal-9	Desfavorable
Linfoma	Regulado al alta	Promotor de tumor	Reducir la infiltración de células T CD8+	Desfavorable
Leucemia	Regulado al alta	Promotor de tumor	Escape inmunológico a través de la vía Tim-3-Gal-9	Desfavorable

Nota. Tomada de "A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9)" (p. 2370), por Y. Lv, 2022, Genes & Diseases (2023) 10.

1.2.4. Gen de galectina-9 (*LGALS9*)

Galectina-9 es codificada por el gen *LGALS9* que se ubica en el brazo largo en el locus 11.2 (17q11.2) del cromosoma 17; comprende de la región 27631148 a 27649560 pb, con un tamaño de 18412 pb (*Universal Protein* [UniProt]; Moar & Tandon, 2021). El marco de lectura del gen *LGALS9* está constituido por 11 exones, sin embargo, el proceso de *splicing* alternativo da como resultado tres variantes que presentan eliminación de los exones 5, 6, y 10 (y combinaciones) del transcrito de ARNm de longitud completa (FL) (**Figura 3**).

Las tres variantes de ARNm son: galectina-9 de longitud completa (gal-9FL o gal-9L), galectina-9 con una eliminación del exón 5 (gal-9Δ5 o gal-9M, ecalectina) y galectina-9 con deleciones de los exones 5 y 6 (Gal-9Δ5/6 o Gal-9S) (Chabot *et al*., 2002;Gieseke *et al*., 2013; Rio-Aige *et al*.,2022). Adicionalmente, se ha reportado que existen otras variantes de esta galectina-9 que carecen del exón 10, entre las que se incluyen: gal-9Δ10, gal-9Δ-5/10 y gal-9Δ-5/6/10 (Heusschen *et al*., 2013).

Estas variantes con deleción del exón 10 tiene un truncamiento de la DRC C-terminal lo que hace que parezcan una galectina prototipo, porque, al ser eliminado el exón 10 se cambia el marco de traducción que hace que se coloque un codón de paro antes de traducir el segundo dominio de DRC (John & Mishra, 2016).

Por otro lado, cuando se excluye el exón 5 o el exón 5 y 6, la longitud del péptido de unión varía entre los dos DRC influyendo en la libertad de rotación de ambos dominios. Entonces, esto repercute probablemente en diferentes especificidades y/o afinidades por los glicoconjugados (Heusschen *et al*., 2013).

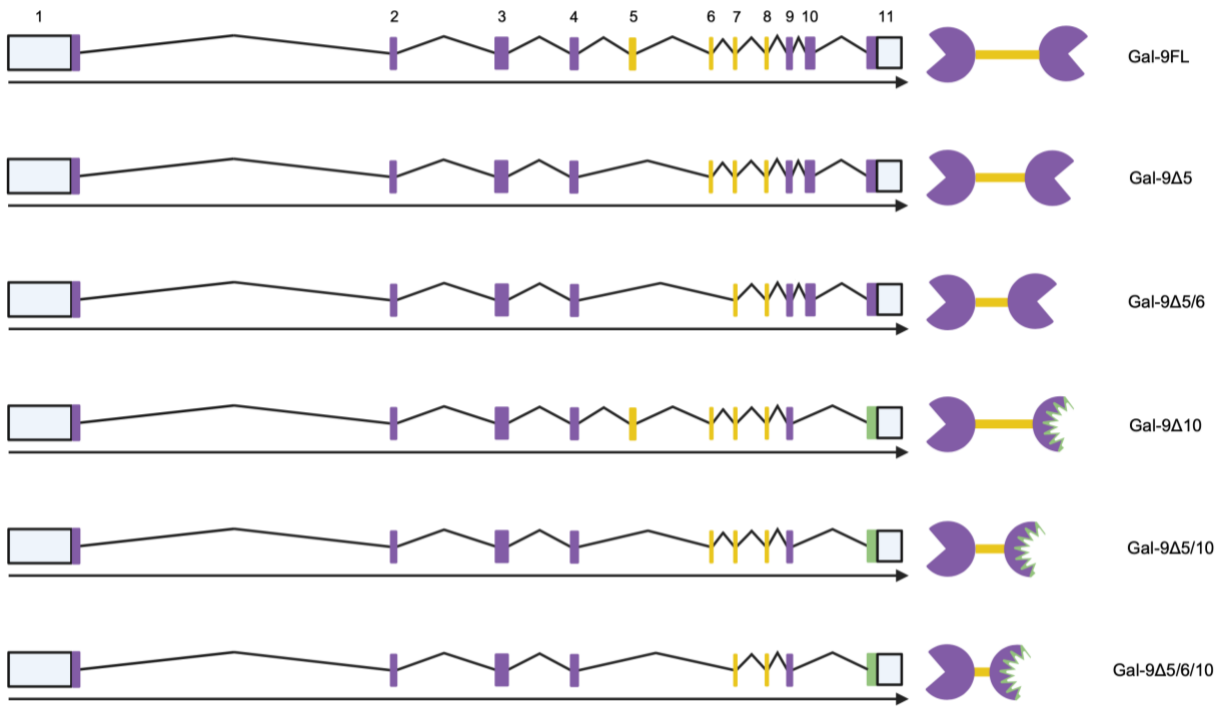


Figura 3: Estructura de las variantes de ARNm del gen *LGALS9* que se generan por corte y empalme alternativo. Los rectángulos representan exones (en blanco se muestra la región no traducida, en morado la región codificante para los DRC, en amarillo la región codificante del péptido de unión; y en verde el desplazamiento de marco en la región codificante). Hasta el momento se han identificado 6 variantes de empalme que varían en la exclusión de los exones 5, 6 y 10. Como resultado, la longitud del péptido de unión y la DRC C-terminal varían entre las variantes del ARNm. Gal-9FL: galectina-9 de longitud completa. *Nota. Adaptado de "Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades" (p. 179), por R.* Heusschen, *2013, Biochimica et Biophysica Acta 1836 (2013) 177–185.*

2. Antecedentes

2.1. Región promotora del gen *LGALS9*

En un trabajo del grupo de investigación se identificó, caracterizó y evaluó la actividad del promotor del gen *LGALS9*. Mediante el programa Eukaryotic Promoter Database (EPD), se identificaron dos posibles regiones promotoras del gen *LGALS9*, la primera entre las posiciones 27623260 del gen KSR-1 y 27649392 pb del gen *LGALS9*; la segunda región entre las posiciones 27630224 y 27630824 pb dentro del gen *LGALS9* (Aparicio, 2019).

A través del programa Patch 1.0 (Public 1.0 Pattern Search for Transcription Factor Binding Sites) se identificaron sitios potenciales de unión a factores de transcripción del fragmento de 2089 pb. Se encontraron ocho cajas TATA en las posiciones -1836, -677, -536, -464, -436, -416, -327 y +6, que son reconocidas por el factor de transcripción II D (TFIID) y la proteína de unión a TATA (TBP); y en las posiciones -1861, -1372 y -46 se encontraron tres sitios Inr (Iniciador). Adicionalmente, se hallaron sitios de unión para Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4, que son una familia de factores de transcripción que están implicados en una amplia variedad de procesos biológicos esenciales y se han demostrado que son importantes en el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis y la carcinogénesis (Vizcaíno *et al*., 2015). También se hallaron sitios de unión para AP2, AP1 y GATA-1, que actúan como activadores de la transcripción (Aparicio, 2019), además de NF-κB y C-Myb.

Después se amplificó un fragmento de 2089 pb encontrando la posible región promotora de 600 pb que se localiza en las posiciones 27630224 y 27630824 pb dentro del gen *LGALS9* y a su vez comprende de la posición +162 a la -426 en el fragmento de 2089 pb y se diseñaron versiones más cortas del promotor, posteriormente se evaluó la actividad de cuatro fragmentos de la región promotora (2089 pb, 1479 pb, 727 pb y 222 pb), se observó la mayor actividad en el fragmento de 727 pb en comparación con los fragmentos de 2089, 1479 y 222 pb (Aparicio, 2019).

2.2. Cambios de expresión de galectina-9

El cambio en el nivel de expresión de galectina-9 modifica procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación, la adhesión, la comunicación y la muerte celular (Moar & Tandon, 2021).
Una célula dendrítica debe de estar madura para desempeñar una adecuada respuesta inmune. Un estudio realizado en ensayos *in vitro* de células dendríticas mostró que al agregar de forma exógena a la galectina-9, ésta puede inducir la maduración de las células dendríticas. Existen otros factores que contribuyen a la maduración de las células dendríticas como ciertas citocinas, y a su vez pueden aumentar la expresión de galectina-9; por consiguiente, una alta expresión de galectina-9 también puede ayudar en la maduración de células dendríticas (Moar & Tandon, 2021).

El efecto de galectina-9 sobre las células T activadas depende de su concentración. En concentraciones altas, galectina-9 induce la apoptosis de las células T activadas (CD8+ y CD4+), pero en concentraciones bajas aumenta la producción de citocinas por parte de las células T activadas. Uno de los ligandos responsables de inducir la apoptosis en las células T activadas por galectina-9 es TIM-3 (John & Mishra, 2016).

Mediante un análisis bioinformático de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) y del recurso de estimación inmune del tumor (TIMER) se evaluó la expresión de los genes *LGALS* en muestras de cáncer cervical y tejidos normales se identificaron cambios en los niveles de ARNm de los genes de las galectinas *LGALS1, LGALS2, LGALS4, LGALS7 y LGALS9*. Específicamente, se obtuvo un aumento significativo en la expresión de *LGALS9* tanto en carcinoma de células escamosas (CCE), como en adenocarcinoma (AC), mostrando que las pacientes con CCE y mayor expresión de *LGALS9* mostraron una supervivencia significativamente mejor, esto no se observó en las pacientes con AC. Además, se hizo un análisis de enriquecimiento para identificar las vías relacionadas con la alta expresión de *LGALS9*. Los resultados mostraron que la galectina-9 en tumores de cáncer cervical está asociada con las vías de respuesta inmune, como el complemento y la respuesta al interferón alfa; y también la expresión de *LGALS9* se asoció positivamente con la infiltración de células inmunitarias, presentando de mayor a menor abundancia: neutrófilos, células T CD4+, células B, células T CD8+ y células dendríticas (Mendieta-Carmona *et al*., 2023).

Además de la expresión alterada en tejidos en diferentes tipos de cáncer, también existen reportes de que la concentración sérica de galectina-9 puede está aumentada en diferentes tipos de cáncer, incluyendo adenocarcinoma ductal pancreático, leucemia linfocítica crónica y linfoma de células T cutáneas. La concentración de galectina-9 sérica en pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado y cáncer cervical fue evaluada para determinar si se relacionaba con las características clínico patológicas, se encontró que la concentración de galectina-9 fue significativamente más alta en el grupo de cáncer cervical que en los grupos de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) y control (negativos para lesiones intraepiteliales o malignidad). Además, se correlacionó

la concentración sérica de esta proteína con el nivel de expresión en tejido tumoral para determinar si los niveles séricos podrían ser secretados por el tumor, sin embargo, no se encontró correlación por lo que se propone que la galectina-9 sérica no está siendo secretada por las células tumorales, sin embargo, esto debe de ser demostrado (Reyes-Vallejo *et al*., 2022).

2.3. Regulación de la expresión de galectina-9

Poco se sabe sobre los mecanismos de regulación de la expresión de galectina-9, pero es claro que los cambios de expresión modifican múltiples funciones celulares, por lo que algunos estudios se han enfocado en evaluar aquellos factores que pueden estar participando en los cambios de expresión de esta galectina.

En cuanto al efecto de diversas moléculas que pueden modificar la expresión del gen *LGALS9* existen algunos reportes: se ha reportado en células del estroma endometrial (ESCs) que la transcripción del gen *LGALS9* es activada por la proteína 2 expresada en derivados del corazón y de la cresta neural (HAND2) y disminuida por la proteína *forkhead box O1* (FOXO1), ambos factores de transcripción (Murata *et al*., 2021).

Adicionalmente, se ha demostrado que, el interferón gamma puede regular la expresión de ciertos genes a través de su efecto sobre la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) adyacente a sus promotores. Se evaluó si el interferón gamma puede regular la actividad de H3K27me3 y del potenciador del homólogo 2 de zeste (EZH2) en dos líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HepG2 y Hep3B), encontrando un aumento en los niveles de proteína y

ARNm de EZH2 y H3K27me3 en ambas líneas celulares estimuladas por interferón gamma, así mismo, hubo un incremento en la expresión de galectina-9 (Chen *et al*., 2018).

De igual manera, se evaluó la expresión de galectina-9 en células HepG2 y Hep3B tratadas con 10 ng/ml de IFN-γ, el nivel de ARNm y de proteína se reguló positivamente de manera dependiente de la concentración y del tiempo. De igual manera, al realizar un análisis de inmunofluorescencia de células HepG2 y Hep3B se notó una intensidad significativamente mayor de fluorescencia de galectina-9 en células tratadas con interferón gamma respecto a las células de control. En conjunto, estos resultados indicaron que la expresión de galectina-9 inducida por interferón gamma se correlacionaba positivamente con la expresión de EZH2 en células de carcinoma hepatocelular (Chen *et al*., 2018).

Interferón gamma puede inducir la expresión de galectina-9 en varios tipos celulares, como las células endoteliales (a través de la histona desacetilasa 3 (HDAC3) / la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) / factor de transcripción regulador interferón 3 (IRF3)) y los fibroblastos (a través de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), PI3K y JAK/STAT) (John & Mishra, 2016).

Se ha demostrado que, en células endoteliales, el interferón gamma es capaz de inducir la expresión de la galectina-9, desempeñando un papel en la respuesta inflamatoria ya que regula las interacciones entre la pared vascular y los eosinófilos. Se ha demostrado que, en las células endoteliales, la regulación de la expresión de galectina-9 por interferón gamma ocurre por la activación de la histona deacetilasa 3 (HDAC3) a través de la interacción con la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y el factor de respuesta de IFN (IRF) 3. El interferón gamma induce la fosforilación de IRF3 Ser-386 de manera dependiente de PI3K y HDAC3, y esta fosforilación de Ser-386 es

necesaria para la expresión de galectina-9 mediada por IRF3 ya que se transloca al núcleo e induce la expresión de galectina-9 (Alam *et al*., 2011).

Por otro lado, al analizar la expresión de diferentes galectinas en las células estromales mesenquimales multipotentes (MSC) con células T, ante diferentes estímulos inflamatorios, se reportó un aumento en la transcripción del ARNm de galectina-9 en las MSC cuando se estimuló con interferón gamma y a la vez que se co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas. Se concluye que la galectina-9 es inducida por varios estímulos proinflamatorios y liberada por las MSC, y puede contribuir a las funciones inmunomoduladoras inducibles de las MSC (Gieseke *et al*., 2013).

Estudios han reportado que el interferón gamma estimula la expresión de galectina-9 en fibroblastos-1 fetales humanos. Considerando que la galectina-9 es un quimioatrayente, se estudiaron, tanto en fibroblastos dérmicos como en queratinocitos epidérmicos, los cambios de expresión de genes involucrados en el proceso de quimioatracción, cuando se incubaban con diferentes citocinas. En los fibroblastos se encontró que los niveles de expresión de ARNm de galectina-9 se incrementaron por efecto del interferón gamma y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) siendo menor el efecto en presencia de este último. Sin embargo, en los queratinocitos epidérmicos, los niveles de ARNm de galectina-9 no aumentaron por el estímulo del interferón gamma (Igawa *et al*., 2006).

La expresión de galectina-9 en biopsias de piel humana fue analizada tanto en muestras de controles como en muestras de pacientes con dermatitis atópica, los resultados mostraron un

aumento de la expresión de galectina-9 en las muestras con dermatitis atópica. Los análisis del transcriptoma de igual manera mostraron altos niveles de ARNm del gen de galectina-9 en pieles con lesiones de dermatitis atópica en comparación con pieles sin lesiones de dermatitis atópica y pieles de control (sanas). Adicionalmente, este estudio mostró que en las células HaCaT estimuladas con interleucina-17A (IL-17A) aumentaron los niveles de ARNm del gen *LGALS9*. Un patrón similar de expresión de *LGALS9* se detectó en los queratinocitos primarios bajo estimulación con IL-17A (Corrêa *et al*., 2021).

2.4. Interferón Gamma (IFN- γ)

El interferón gama (IFN- γ) pertenece a la familia de interferones. Estos son proteínas secretadas por las células como respuesta ante diferentes tipos de estímulos teniendo así una actividad en la modulación de la respuesta inmune. Los IFN se clasifican en 3 grupos de acuerdo con secuencias, estructuras y función (Pestka, 2000) (**Tabla 3**).

Tabla 3: Clasificación de los interferones de acuerdo con su secuencia, estructura y función.

Tipo	***Subtipos***	***Receptor***	***Función***	***Referencia***
I	IFN-α, IFN-β, IFN-ε, IFN-κ, IFN-ω	IFNAR1 IFNAR2	Modulación en las respuestas inmunes innatas y adaptativas, algunas funciones antiproliferativas y la más destacada, la actividad antiviral.	(Stanifer *et al*., 2019) (Zamora-Salas *et al*., 2023)
II	IFN-γ	IFNGR1 IFNGR2	Vigilancia inmune del cáncer mediante la estimulación de la inmunidad antitumoral y la eliminación del tumor.	(Castro *et al*., 2018)

III	IFN-λ1 (IL-29), IFN-λ2 (IL-28A), IFN-λ3 (IL-28B), IFN-λ4	IFNLR1/IL28Rα IL10Rβ/IL10R2	Interacción huésped-patógeno, y su expresión se activa a través de los receptores del sistema inmunitario.	(Castro *et al*., 2018)

El interferón gamma es el único miembro de los interferones tipo II (IFN-II) (Zhang *et al*., 2021), que forma homodímeros constituidos por dos subunidades polipeptídicas de 17 kDa unidas de manera no covalente (Castro *et al*., 2018). Es producido por células del sistema inmunológico, principalmente por las células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), células T CD4+ y CD8+, los linfocitos B y las células presentadoras de antígenos como lo son: los macrófagos, los monocitos y células dendríticas (Burke & Young., 2019, Zhang *et al*., 2021). Esta citocina da lugar a una serie de respuestas en los macrófagos, las células T CD4+ y en las células cancerosas, que son inducidas por cascadas de señalizaciones activadas por el IFN- γ. El IFN-γ puede ser secretado por estímulo de una variedad de citocinas (IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, IFN-α/β y TNF-α), en varios tipos de células inmunitarias (Zhang *et al*., 2021).

2.4.1. Funciones del IFN- γ

Una de las primeras funciones descritas del INF-γ es actuar como un potente activador de las funciones de células como los monocitos y macrófagos (Kelker *et al*., 1984). Sin embargo, actualmente se le atribuyen otras funciones importantes como su participación en las respuestas inmunes innata y adaptativa contra las bacterias, cáncer, virus y procesos inflamatorios patológicos (Mertowska *et al*., 2023), así como en la apoptosis y el ciclo celular (Castro *et al*., 2018).

A diferencia de otros interferones, el IFN-γ destaca por su amplia capacidad para estimular y modular el sistema inmunológico. El IFN-γ desencadena respuestas inmunitarias que dan como resultado la fagocitosis, el aumento en la expresión de los receptores del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) I y II en las células presentadoras de antígenos (Fenimore & Young, 2016; Ng *et al*., 2023).

El IFN-γ ejerce efectos autocrinos sobre las principales células productoras del mismo IFN-γ, pero también puede actuar sobre otras células del sistema inmune. El IFN-γ activa a los macrófagos al estimular la liberación de óxido nítrico (NO), al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y aumentar la actividad fagocítica (Ng *et al*., 2023), de igual manera actúa reprogramando los macrófagos al fenotipo proinflamatorio M1, ya que, conlleva a que los macrófagos aumenten su capacidad de respuesta a moléculas inflamatorias (Jorgovanovic *et al*., 2020).

El IFN-γ interactúa con las células dendríticas estimulando la maduración, la regulación positiva de MHC I y MHC II a través del aumento de la expresión del Factor Regulador del Interferón 1 (IRF1), pero a su vez, la disminución la supervivencia de las células dendríticas depende del IFN-γ. En las células T, el IFN-γ estimula el crecimiento (Fenimore & Young, 2016) y la diferenciación hacia el subconjunto Th1, del mismo modo, activa su producción en las células Th1, mediante un circuito de retroalimentación positiva e inhibe la diferenciación de Th2 (linfocito T *helper* 2) y Th17. El IFN-γ es indispensable para la maduración de células T vírgenes a células T efectoras CD8+. Del modo contrario, IFN-γ inhibe las células T reguladoras inmunosupresoras

(Jorgovanovic *et al*., 2020). Durante una infección viral, IFN-γ impulsa la respuesta Th1 (Ng *et al*., 2023).

Adicionalmente del rol del IFN-γ sobre la activación, maduración y crecimiento de las células inmunes también tiene efectos sobre otros tipos de células como las células endoteliales y los fibroblastos, por ello es importante en la respuesta inflamatoria y en las respuestas inmunes mediadas por células (Fenimore & Young, 2016).

En otro contexto, el IFN-γ juega un papel importante en la inmunidad tanto pro-tumoral como anti-tumoral (Jorgovanovic *et al*., 2020). Una de las funciones anti-tumorales que tiene el IFN-γ es inducir la muerte celular apoptótica de varios tipos de células cancerosas. Además, induce la muerte celular regulada "necroptosis" que es similar a una necrosis mediante la activación de la serina-treonina quinasa proteína inactivadora de ribosomas 1 (RIP1) también, la inhibición de la angiogénesis tumoral y proliferación a través de la inhibición del ciclo celular activando los supresores tumorales p21 y p27 (Zaidi, 2019).

IFN-γ regula uno de los mecanismos más importantes en el control inmunológico, que es la expresión de ligando de la muerte programada 1(PD-L1) y 2 (PD-L2) en la superficie de las células tumorales y en las células estromales. Los ligandos PD-L1/2 inducidos por IFN-γ se unen a su receptor 1 de muerte programada (PD-1), haciendo que se supriman las actividades efectoras inmunes de las células T y las células NK, que pueden promover la progresión del cáncer (Zaidi, 2019). Otra de las funciones importantes del IFN-γ es la inducción de genes antivirales regulados por el elemento de respuesta estimulado por IFN (ISRE) presente en la región promotora, mediante

la activación del factor 3 del gen estimulado por IFN (ISGF3), que se asocia convencionalmente con la respuesta de IFN tipo I (Zaidi, 2019).

Algunos estudios proponen que este papel pro-tumoral y anti-tumoral que tiene el IFN-γ en el cáncer es por la inducción de genes tanto en la vía canónica como en la no canónica, ya que se activan proteínas efectoras con diferentes blancos dependiendo de cada caso. De igual manera, un mismo gen que pertenece a la vía canónica del IFN-γ, puede ejercer funciones duales en torno a sus niveles de expresión (Zamora-Salas *et al*., 2023).

2.4.2. Vía de señalización del IFN-γ

IFN-γ tiene un receptor heterotetramérico conformado por dos receptores 1 de interferón gamma (IFNGR1) y otros dos receptores 2 de interferón gamma (IFNGR2). IFNGR1 reconoce y se une a IFN-γ, mientras que IFNGR2 es responsable de la transducción de señales. Ambas subunidades de IFNGR se expresan de manera ubicua en todas las células de mamíferos (Zhang *et al*., 2021).

IFN-γ participa en la vía activadora de la transcripción Janus Quinasa-Transductor de Señales y Activador de la Transcripción (JAK-STAT), que inicia cuando IFN-γ se une a su receptor transmembranal a través de sus dominios intracelulares que se encuentran asociados con las Janus cinasas (JAK) 1 y 2, entonces, JAK1/2 se activan por transfosforilación y a su vez fosforilan a las subunidades del receptor, y esta activación genera un par de sitios de acoplamiento en los receptores para el transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT), al mismo tiempo, las enzimas JAK1/2 se fosforilan activando así a STAT1, lo que permite su

homodimerización (conocido como complejo GAF) y su consecuente translocación al núcleo para unirse a los elementos de ADN del sitio de activación de IFN-γ (GAS, en la secuencia consenso: TTCN (2–4) GAA) en la región promotora de genes específicos clasificados como genes estimulados por interferón (ISGs).

La cascada de señalización finaliza cuando la subunidad IFNGR1 en complejo con el IFN-γ se internaliza, entonces IFN-γ es degradado, por otro lado, se almacena la subunidad IFNGR1 hasta su posterior reciclaje hacia la membrana celular (Michalska *et al*., 2018) (Zamora-Salas *et al*., 2023) (**Figura 4**). Tanto los IFN tipo II como los tipos I se unen a sus receptores correspondientes y se desencadena una serie de pasos para finalmente translocarse al núcleo e iniciar una expresión alta de los genes con GAS y/o ISG que contienen ISRE (Platanias, 2005) (**Figura 5**). Debido a que el complejo GAF no se une a STAT2, pero sí a todos los demás STAT es más potente en comparación con la vía activada por GAF dependiente de IFN tipo I (Michalska *et al*., 2018).

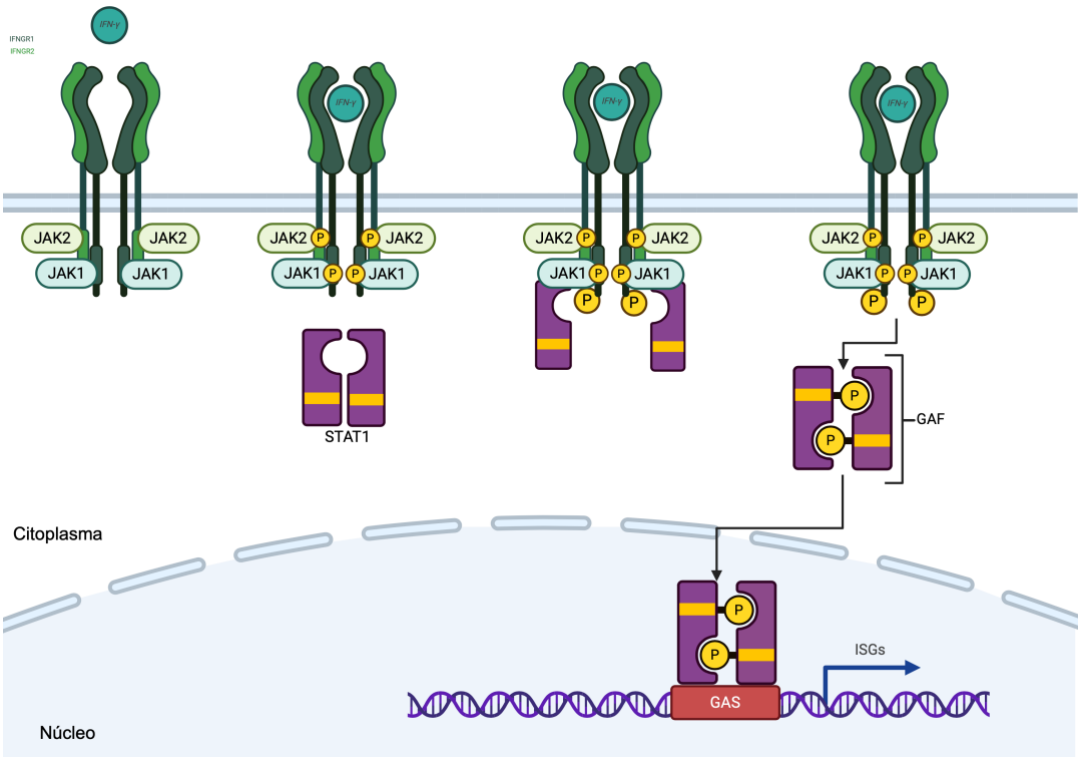


Figura 4. Representación esquemática de la vía de señalización canónica del IFN-γ. Empieza con la unión de IFN-γ con su receptor formado por IFNGR1 e IFNGR2 asociado a las cinasas JAK1 y JAK2 en sus dominios intracelulares. Después de esta unión, en el citoplasma, ocurre una transfosforilación de JAK1/2 que hace que se active y entonces, por una fosforilación de los dominios internos del receptor por las proteínas JAK ocurre el reclutamiento de STAT1 que luego será fosforilado y así estar activado. STAT1 fosforilado se homodimeriza y se transloca al núcleo para iniciar la transcripción de los genes con secuencias GAS en sus regiones promotoras. *Nota. Adaptado de "Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer" (p. 4), por S. Zamora, 2023, Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. (26).*

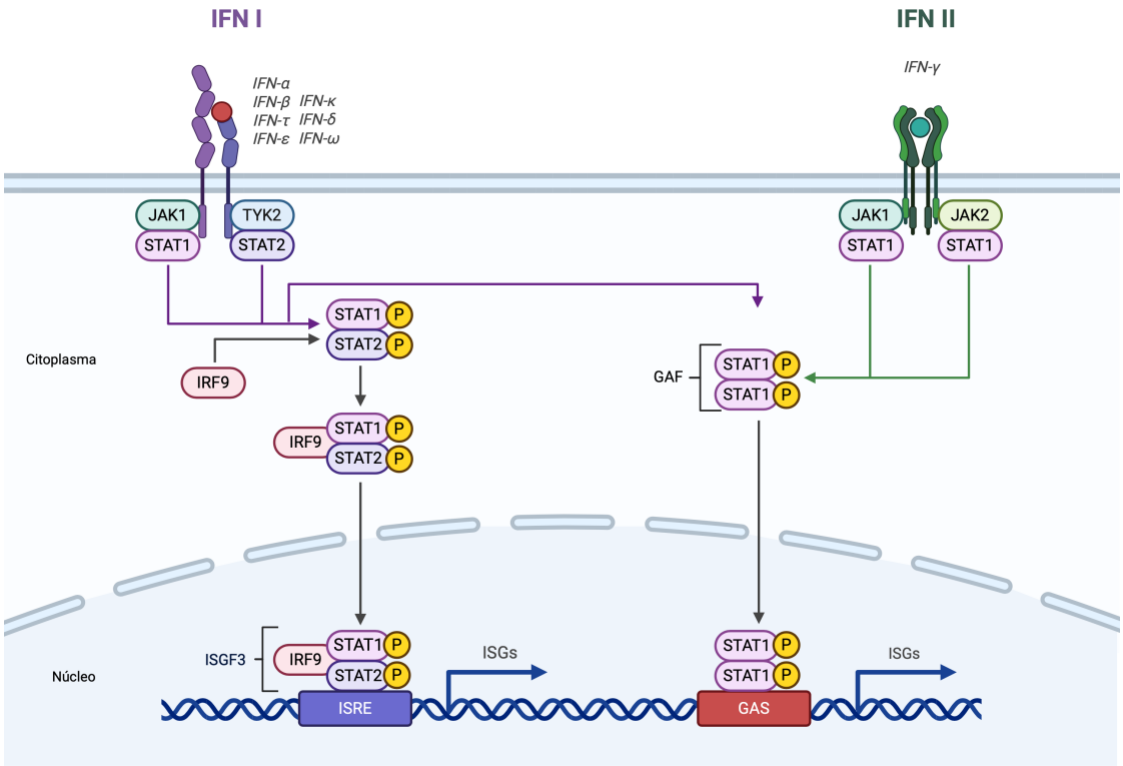


Figura 5. Vía de señalización de los IFN tipo I y tipo II. Los tipos de interferones de tipo I se unen a un receptor heterodimérico compuesto por dos cadenas, IFNAR1 e IFNAR2, que señalan a través del reclutamiento de las quinasas activadas TYK2 y JAK1, la activación de estas JAKs provoca la fosforilación de tirosina de STAT1 y STAT2, y posteriormente la unión de IRF9 formando el complejo trimérico 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. La activación de receptor de IFN tipo I también puede ser por la activación de homodímeros de STAT1 que se unen y activan motivos de secuencia GAS como usualmente lo hacen los interferones de tipo II. *Nota. Adaptado de "Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer" (p. 2), por S. Zamora, 2023, Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. (26).*

Por otro lado, la mayoría de los efectos celulares ejercidos por el IFN-γ son a través de su vía canónica (JAK-STAT), sin embrago, también pueden ocurrir por la activación de vías de señalización no canónicas protagonizadas por la proteína tirosina quinasa 2 (Pyk2) (Alspach *et al*., 2019), STAT3, STAT5, factor nuclear-κB (NF-kB), proteína activadora 1 (AP-1), molécula de adhesión intercelular (I-CAM), PI3K, MAPK, proteína 1 homologa de muesca de locus neurogénico (Notch1), quinasas reguladas por el extracelular 1/2 (ERK1/2). Las vías no canónicas

del IFN-γ son características del tipo celular y en el cáncer se asocian con la promoción y la supervivencia del tumor (Zamora-Salas *et al*., 2023).

Se ha demostrado que IFN-γ puede activar genes regulados por GAS mediante la activación de STAT3 por la vía no canónica independiente de STAT1, esto sugieren que IFN-γ puede inducir señalización no canónica de una manera específica del tipo de célula y dependiente del contexto (Zaidi, 2019).

La estimulación por IFN-γ es importante porque induce la activación de los ISGs que tiene como consecuencia la modificación de distintas respuestas celulares, como la proliferación celular, la apoptosis, la respuesta inmune y la migración (Zamora-Salas *et al*., 2023).

2.4.3. Factores reguladores del interferón (IRF)

Los factores reguladores del interferón (IRF) son una familia de nueve (IRF1–9) proteínas homólogas que regulan la transcripción de los interferones (IFN) y la expresión génica inducida por IFN (Antonczyk *et al*., 2019; Michalska *et al*., 2018). Estas proteínas modulan la vía de señalización del receptor de tipo Tool (TLR) y la vía de señalización de IFN que participan en el sistema inmunitario innato (Antonczyk *et al*., 2019).

Todos los IRF en la parte N-terminal contienen un dominio de unión al ADN (DBD) conservado con una estructura hélice-bucle-hélice de tipo a y un motivo que contiene cinco residuos de triptófano; y un dominio de asociación IRF. El DBD reconoce un elemento de secuencia consenso

en el ADN consenso (A/GNGAAANNGAAACT), y en específico se une a un motivo GAAA (elemento IRF: IRE) presente en los promotores de los genes de los IFN-α e IFN-β, así como en los ISG (núcleo ISRE). La parte C-terminal de todos los IRF, a excepción de IRF-1 e IRF-2 (Paun & Pitha, 2007) contienen el dominio de asociación IRF (IAD), con el cual puede auto asociarse, unirse a los miembros de la familia IRF o interactuar con otros factores de transcripción (Michalska *et al*., 2018; Negishi *et al*., 2018;Antonczyk *et al*., 2019).

El elemento regulador de interferón (IRE, NAANNGAAA) es una versión más corta de la ISRE, no reconocida por ISGF3 y el elemento de respuesta a estímulos de interferón (ISRE, A/GNGAAANNGAAACT) están presentes en las regiones reguladoras de los genes de interferón tipo I y los ISGs (Michalska *et al*., 2018;Antonczyk *et al*., 2019).

Una de las funciones de los IRF es formar complejos (con STAT) y colaborar con otros factores de transcripción de coacción como el NF-κB y PU.1, además, varios estudios han descubierto que los IRF pueden desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de algunas enfermedades como la inflamación aguda o crónica en las enfermedades autoinmunes y el cáncer (Antonczyk *et al*., 2019).

2.4.4. Regulación transcripcional de ISG

La estimulación con cualquier tipo de IFN induce a la transcripción de IRF1, IRF5, IRF7, IRF8 e incluso STAT1, STAT2 e IRF9. Como los IRF se unen a un motivo GAAA específico (elemento

IRF; IRE), los IRF pueden unirse a dominios regulatorios positivos (PRD-I) que contienen dichos IRE, así como ISRE (Antonczyk *et al*., 2019).

IRF1 es un factor de transcripción con una función anti-tumoral, una de las funciones en las que participa es en la transcripción de otro grupo de genes con una secuencia consenso ISRE. IRF1 facilita el reclutamiento de la ARN polimerasa II hacia los promotores de los ISGs y la unión a regiones potenciadoras o *enhancers* para impulsar la formación tridimensional de asas en el DNA facilitando el acceso de las enzimas hacia las regiones promotoras de los ISGs; también, cuando existe una inducción del IFN-γ se hace una interacción entre STAT1 e IRF1 en la transcripción de ISGs (Zamora-Salas *et al*., 2023). IRF1 e IRF9 son inducidos por una infección viral y también por los IFN tipo I y II, ambos IRF regulan la transcripción de ISGs a través de la activación de la vía de señalización JAK-STAT (Michalska *et al*., 2018).

Al igual que IRF1, STAT1 es un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes, incluyendo el mismo IRF1. Cuando hay una sobreexpresión de la IRF1 ejerce una inducción de señales apoptóticas en respuesta al IFN-γ, de modo contrario, si se inhibe por IRF2 que se une competitivamente a las secuencias ISRE de sus promotores blanco, el IFN-γ activa señales proliferativas (Zamora-Salas *et al*., 2023). La fosforilación de STAT1 después de ser estimulado con IFN-γ muestra un aumento rápido que disminuye dependiendo con el tiempo.

Actualmente, existen varios genes objetivo de STAT1 que contienen la secuencia GAS, como la proteína de unión a guanilato (GBP), Supresor de la Señalización de Citoquinas 1 (SOCS1), IRF1 e IRF8 (Michalska *et al*., 2018).

Los genes STAT1, STAT2, IRF9 e IRF1 tienen una regulación por retroalimentación positiva ya que los complejos (GAF / ISGF3 / STAT2-IRF9) se unen a secuencias reguladoras que contienen ISRE y GAS combinadas. Al mismo tiempo, estos complejos ayudan al aumento de la expresión de otros ISRE y/o ISG que contienen GAS (Michalska *et al*., 2018).

Cuando se sintetizan en el citoplasma las proteínas STAT1, STAT2 e IRF9 pueden conducir a la creación de nuevos factores de transcripción en una forma no fosforilada (U-ISGF3, U-STAT1 y U-STAT2/IRF9). Cuando la cantidad de fosfoproteínas disminuye, estos complejos no fosforilados como el ISGF3 no fosforilado, el dímero STAT1 no fosforilado o el complejo STAT2/IRF9 pueden apoyar o asumir el papel de los complejos fosforilados en el mantenimiento de la expresión de los ISG.

Ambos grupos de proteínas controlan la expresión prolongada de muchos ISG fundamentales para generar una potente respuesta antiviral y defensa del huésped (Antonczyk *et al*., 2019; Michalska *et al*., 2018) (**Figura 6**).

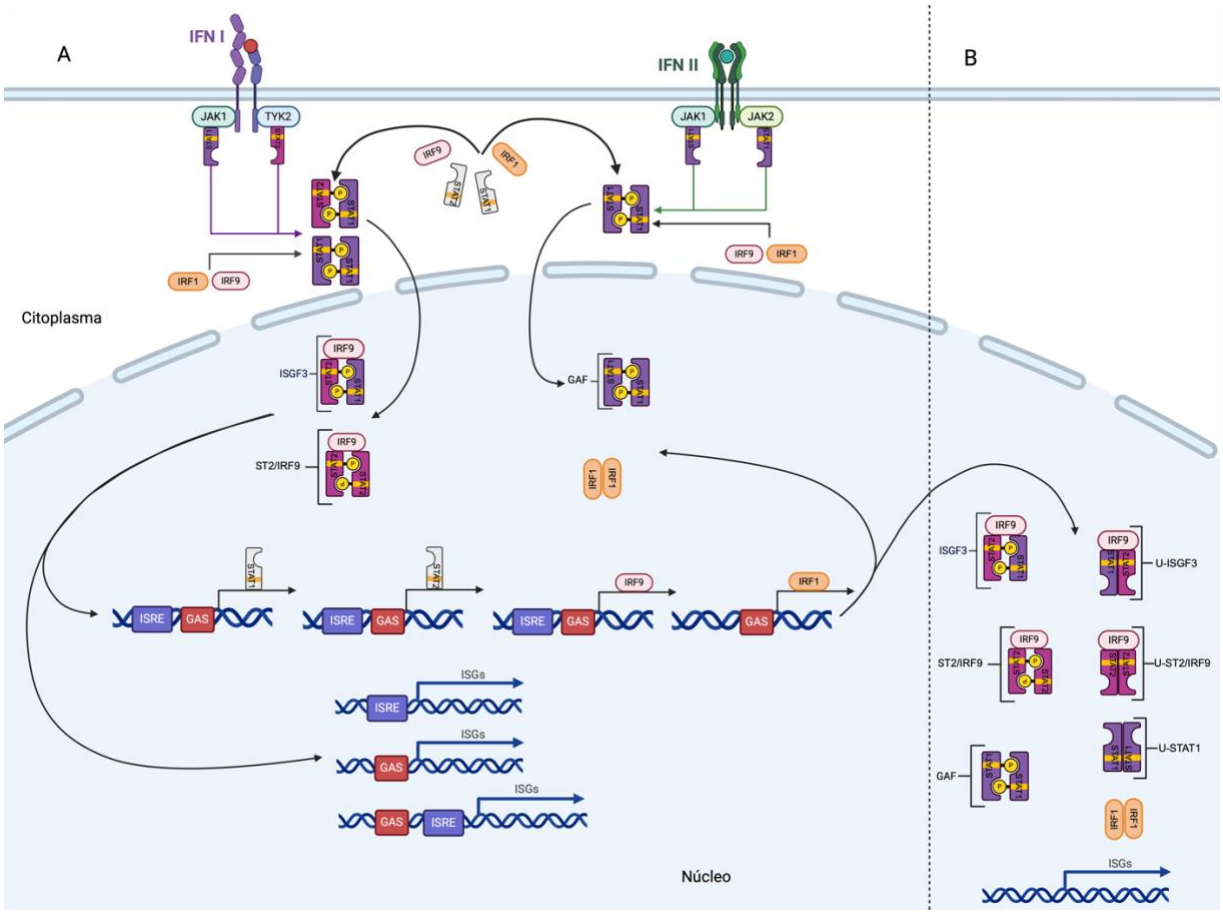


Figura 6: Cooperación de componentes ISGF3 y GAF fosforilados y no fosforilados de IRF1 en la regulación de la transcripción basal e inducida por IFN. La vía clásica de señalización de los IFN tipo I y II se basa en complejos de proteínas STAT fosforiladas que dan una respuesta temprana de que los receptores se dimerizan y permiten la transfosforilación de quinasas unidas a los receptores (JAK1 y TYK2 para IFN-I o JAK1 y JAK2 para IFN-II) y el reclutamiento de proteínas STAT. Posteriormente, se fosforilan las STATs, que pueden ahora dimerizarse y crear complejos (ISGF3, STAT2/IRF9, STAT 1 Y 2/IRF9 y GAF) luego translocarse al núcleo y comenzar una de ISGs que contienen GAS y/o ISRE. Esto conduce a la acumulación rápida de proteínas STAT1, STAT2, IRF9 e IRF1 recién sintetizadas en el citoplasma, que pueden crear nuevos factores de transcripción en forma no fosforilada (U-ISGF3, U-STAT1 y U-STAT2/IRF9) y, mientras el nivel de proteínas fosforiladas disminuye, estos factores de transcripción apoyan o asumen el papel de complejos fosforilados en el mantenimiento de la expresión de ISGs. Además, los factores de transcripción no estimulados se involucran en el mantenimiento de la expresión basal de ciertos ISGs en células no estimuladas (independiente de IFN). IRF1 puede ocupar genes que contienen ISRE y co-ligarse con otros factores para modular la respuesta inducida por IFN, así como la expresión basal de ISG. Como se muestra en el gráfico, IRF1 puede autorregularse uniéndose a secuencias GAS en el núcleo y ejercer una función en el mantenimiento de la expresión basal de ciertos ISGs en células no estimuladas por algún tipo de IFN. *Nota. Adaptado de "a positive Feedback amplifier Circuit that regulates interferon (ifn)-stimulated Gene expression and Controls type i and type ii ifn responses" (p. 13), por: A. Michalska, 2018, Frontiers in Immunology. (9).*

IRF8 también es inducido por IFN-γ. El IRF8 contribuye directamente a la inducción de numerosos genes en células tratadas con IFN-γ. Además, numerosos genes están regulados por complejos multiproteícos que contienen IRF8 inducido por IFN-γ y otros factores de transcripción, especialmente PU.1, STAT1 y, en algunos casos, IRF1 (Negishi *et al*., 2018).

En un estudio realizado en el grupo de investigación en el que se hizo el modelado *in silico* de la interacción entre los factores de transcripción IRF y NF-κB con sus elementos de respuesta localizados en la región promotora del gen *LGALS9* (de -565 a +162 pb) se propuso que el sitio ISRE localizado en la posición de -42 a -33 pb, en la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* puede estar relacionada con el aumento de la expresión del gen *LGALS9* inducida por interferones, y que los factores de transcripción IRF1/3/5/7/8/9, y notablemente IRF9 e IRF3, podrían estar involucrados en el aumento de expresión al promover la transcripción del gen (Vega, 2021).

3. Justificación

Galectina-9 ejerce un papel importante en funciones como la adhesión celular, la inmunomodulación, la muerte celular, la comunicación celular, la diferenciación celular, y en el proceso de inflamación. En diversas patologías como el cáncer y algunas enfermedades autoinmunes se ha reportado un cambio en su nivel de expresión. Existen estudios que muestras que la expresión de galectina-9 puede verse afectada por distintas citocinas, entre ellas los IFN. En este estudio es de interés evaluar el efecto del IFN-γ sobre el nivel de expresión de galectina-9 en queratinocitos y si este efecto puede ser por cambios en la actividad el promotor del gen *LGALS9*, ya que se ha identificado sitios de unión a los factores de transcripción IRF que pueden estar activando vías de señalización relacionadas directamente con el IFN-γ ejerciendo a su vez funciones en las respuestas inmunes innatas y adaptativas o como mediador antitumoral y protumoral.

4. Planteamiento del problema

¿El interferón-γ puede modificar la expresión del gen *LGALS9* a través de cambios en la actividad de su promotor?

5. Hipótesis

H0: El INF-γ regula positivamente la expresión del gen *LGALS9* a través de cambios en la actividad de su promotor

HA: El INF-γ no modifica la expresión del gen *LGALS9* ni la actividad de su promotor

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del INF-γ sobre el nivel de expresión del gen *LGALS9* en queratinocitos.

6.2. Objetivo especifico

1. Evaluar el efecto del INF-γ sobre los niveles del ARNm del gen *LGALS9* en queratinocitos

2. Evaluar el efecto del INF-γ en la actividad del promotor del gen *LGALS9* en queratinocitos

7. Materiales y métodos

7.1. Niveles de expresión de ARN mensajero

7.1.1. Cultivo celular

Para evaluar la expresión de galectina-9, se cultivaron células de queratinocitos de piel humana adulta (línea HaCaT) en un medio de crecimiento Dulbecco Eagle modificado (DMEM) (Caisson) con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Biowest) y antibiótico/antimicótico al 1% (Biowest). Se incubaron a 37◦C, 5% CO_2 y atmósfera húmeda, hasta alcanzar el 80% de confluencia en las botellas p25. Transcurrido el tiempo, las células se despegaron de la botella de cultivo adicionando 0.5 ml de tripsina e incubando por 5 minutos, posteriormente se resuspendieron en 1 mL de DMEM con 5% de SFB.

Después, las células se contaron en una cámara de Neubauer tiñendo con azul tripán y se realizaron los cálculos usando la fórmula de concentración celular, una vez obteniendo el número de C/mL se sembraron 8 pozos con 80,000 células cada uno en una placa de 24 pozos.

La fórmula empleada para el cálculo del número de células es la siguiente:

$$\frac{\#células}{mL} = \frac{\sum de\ células\ en\ los\ 4\ cuadrantes}{4} \times Dilución \times 10\ 000$$

7.1.2. Inducción con IFN-γ

Después de las 24 horas, cuatro de los ochos pozos fueron incubados con INF-γ (Recombinant Human IFN-γ, Gibco) a dos concentraciones diferentes [10 ng/mL] y [100 ng/mL] por 6 horas y

los otros cuatro pozos se tomaron como condición control incubándose con PBS (buffer fosfato salino) la placa se incubó a 37 ºC, 5% CO_2 en atmósfera húmeda.

7.1.3. Extracción de ARN total

Después de 6 horas de incubación, el ARN total se extrajo utilizando el mini kit RNeasy Protect (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración y pureza del ARN fueron analizadas usando el nanofotómetro PEARL (IMPLEN) en relación con los valores de las absorbancias A260/280 nm (un valor entre 2.0 - 2.2 se considera indicativo de un ARN de pureza óptima) y A260/280 nm (con valor > 1.7 se considera aceptable).

Después se hizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad de ARN observando las bandas brillantes y sin degradación de los ARN ribosomales (ARNr) 28s y 18s.

7.1.4. Síntesis de ADNc

Luego de verificar la integridad del ARN total, se hizo la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando el kit Revert Aid H Minus First Strand cDNA (Thermo Fisher Scientific). La reacción se hizo en un volumen de 20 μL utilizando 20 ng de ARN, 1 μL de primers oligo (dT), 4 μL de buffer de reacción 2X, 1 μL de inhibidor de RNasa RiboLock, 2 μL de mezcla de dNTP, 1 μL de la enzima Transcriptasa Reversa y agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen final. Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc en el termociclador utilizando el protocolo siguiente: 42 °C durante 60 minutos, y después a 70 °C durante 5 minutos.

7.1.5. PCR Tiempo Real (RT-PCR)

Para determinar el efecto del INF-γ sobre los niveles de ARNm del gen *LGALS9* se realizó la técnica de PCR en tiempo real. Para ello el volumen final reacción fue de 10 µL, utilizando 5 µL de SYBR Green/Rox (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 1 µL de cebador sentido, 1 µL de cebador antisentido y 1 µL de ADNc *[20 ng]*. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicados amplificando el gen *LGALS9* y como control el gen endógeno *HPRT*. La secuencia de oligos de ambos genes se muestra en la (Tabla 4). Se usó el equipo de PCR en tiempo real Step One (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.), con las siguientes condiciones de temperatura: 95 °C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 61 °C durante 30 segundos y 70 °C durante 30 segundos.

Posteriormente se hizo la cuantificación relativa para determinar el nivel de expresión del gen *LGALS9* por el método 2 Delta Delta Ct (*cycle threshold*) (2Δ-Δ Ct). El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se basa en el análisis comparativo de los Cts de las muestras y de los Cts de un control endógeno (*HPRT*).

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

Tabla 4. Secuencia de los oligos utilizados para (RT-PCR), se muestran las temperaturas de alineamiento y el tamaño del producto amplificado.

Nombre del oligo		***Secuencia (5` → 3`)***	***Tm***	***Producto***
LGALS9	Sentido	CTG TGC AGC TGT CCT ACA TCA	57.0ºC	177 pb
	Antisentido	GGA TGA CTG TCT GGG TAA TGG	54.9ºC	

HPRT	Sentido	CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT GAT	58.8ºC	130 pb
	Antisentido	GCA AGA CGT TCA GTC CTG TC	59.7ºC	

7.2. Evaluación de la actividad del promotor mediante ensayos de luciferasa

Para medir la actividad de promotor del gen *LGALS9* se sembraron 80,000 células HaCaT en placas de 24 pozos en un medio de DMEM con 5% de SFB y antibiótico/antimicótico al 1%. Se incubaron a 37 ºC, 5% CO_2 y atmósfera húmeda, por 24 horas a una confluencia del 80%.

7.2.1. Transfección

Después de 24 horas, se retiró el DMEM, se realizaron 2 lavados con 500 µL de buffer PBS. Las células fueron transfectadas mediante lipofección utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher), 600 ng del plásmido pGL4Gal9-727 que contiene clonado el fragmento del promotor del gen *LGALS9* de 727 pb, en el vector pGL4.12 que tiene el gen reportero de luciferasa luc2CP de *Photinus pyralis* (

Figura 7A). Como control de la transfección se utilizó el vector pGL4.72; este vector contiene el gen hRlucCP de *Renilla reniformis* (

Figura 7B), se cotransfectó con 20 ng de dicho plásmido.

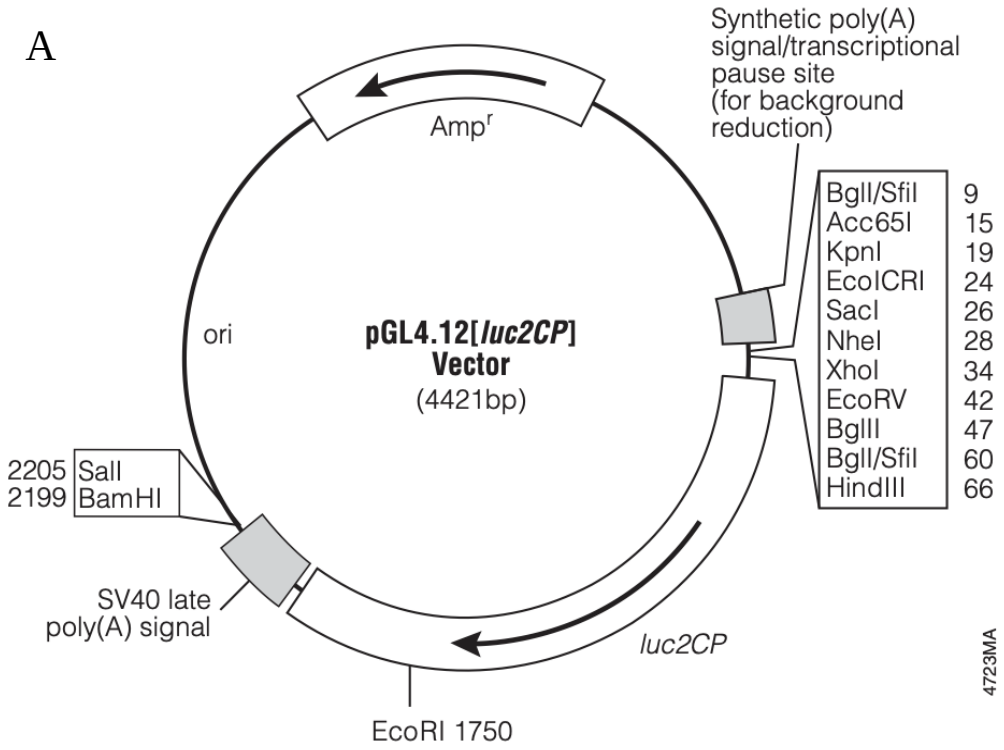
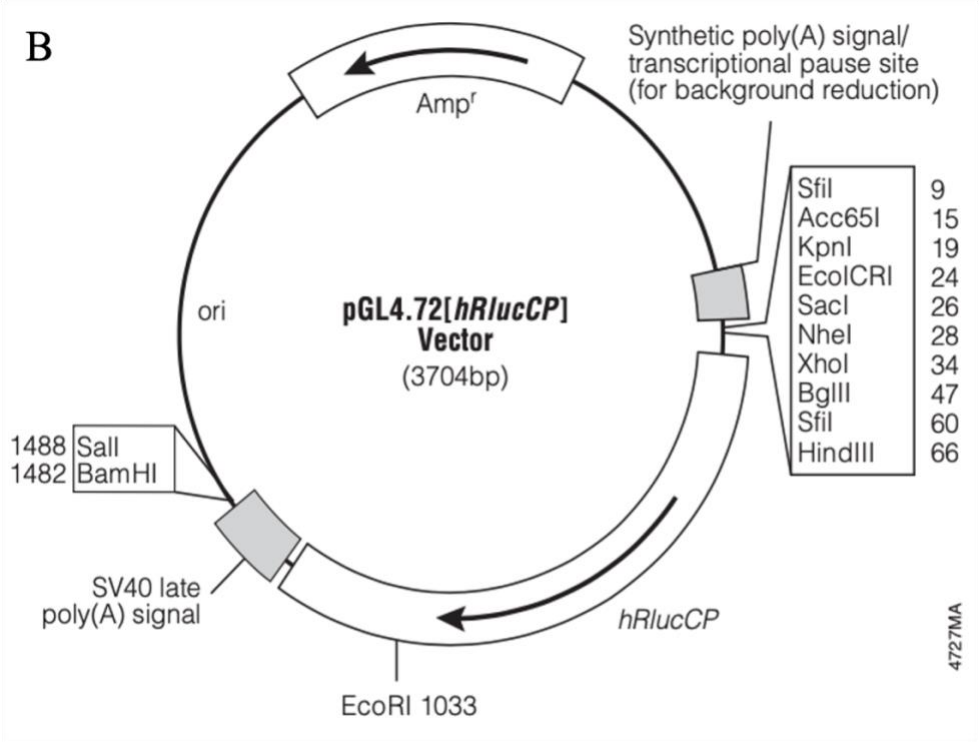


Figura 7: Plásmidos usados en las transfecciones para los ensayos de luciferasa. A) Se muestra el plásmido pGL4.12 en que fue clonado el promotor de 727 pb y que contiene el marco de lectura de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. B) Se muestra el plásmido usado como control de transfección pGL4.72 que contiene el marco de lectura de la luciferasa de *Renilla reniformisla.*

Después, ambos plásmidos fueron diluidos en medio de cultivo DMEM sin suero fetal bovino (SFB) ni antibiótico/antimicótico. A esta mezcla se le añadieron 1 µL de p3000 y 0.5 µL de lipofectamina, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación se agregaron 450 µL de medio de cultivo DMEM sin SFB y antibiótico/antimicótico; y 50 µL gota a gota de la mezcla de los complejos y se incubó durante 24 horas a 37°C con 5% CO_2.



Después de 24 h de incubación se retiró el medio, y se agregaron 500 µL de medio de cultivo DMEM al 5% de SFB y antibiótico/antimicótico al 1%; y se añadió IFN-γ [100 ng/mL] a cuatro

pozos y los otros cuatro pozos restantes fueron la condición control con PBS [100 ng/mL]. La placa se incubó durante 6 horas a 37◦C, 5% CO_2 y atmósfera húmeda.

7.2.2. Ensayo de luciferasa

Para evaluar la actividad del promotor a través de ensayos de luciferasa se utilizó el kit Dual Luciferase Assay System (Promega).

Transcurridas las 6 horas de incubación con IFN-γ, se retiró el medio de DMEM y se lavaron las células con PBS; se añadió a cada pozo 100 μL del buffer de lisis PLB 1x y se incubó durante 1 hora 45 minutos en la temperatura ambiente, en agitación.

El lisado se recuperó y se centrifugó durante 30 segundos a velocidad máxima para bajar los restos celulares, se tomaron 20 μL del sobrenadante del lisado y se agregaron 70 μL del reactivo LARII para medir la actividad de la luciferasa de luciérnaga que al actuar sobre el sustrato generó una señal luminiscente que corresponde a la actividad del promotor del gen *LGALS9*, una vez cuantificada la luminiscencia, se agregaron70 μL del reactivo Stop & Glow 1x, el cual además de tener un reactivo para inactivar la actividad de la luciferasa de luciérnaga contiene el sustrato de la luciferasa de Renilla, se mezcló por pipeteo y se midió la actividad de luciferasa. La emisión de luz se cuantificó en un luminómetro Glomax 20/20 (Promega). La actividad del promotor de *LGALS9* en cada lisado se normalizó con respecto a la actividad de luciferasa de *Renilla*. Los resultados se presentaron en número de veces la actividad del promotor en presencia del IFN-γ con respecto a la condición control.

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

7.3. Análisis estadísticos

Para determinar si el interferón gamma genera cambios en los niveles de expresión de ARNm y del promotor del gen *LGALS9* en línea HaCaT y determinar si existe diferencia significativa entre la actividad de promotor (727 pb) entre la condición control y la condición experimental, así como las diferencias del ARNm, se realizó una prueba t de student. Se consideró un valor de $p<0.05$ como significativo. Las pruebas estadísticas y los gráficos fueron obtenidos con el programa Prism v.10.2.1 de GraphPad.

8. Resultados

8.1. Efecto de INF-γ sobre los niveles de ARNm de gen *LGALS9* en queratinocitos

El efecto de INF-γ sobre los niveles de expresión del ARNm del gen *LGALS9* fue evaluado en la línea celular HaCaT. Los resultados mostraron que los niveles de expresión del ARNm del gen *LGALS9* en la línea celular HaCaT estimuladas con diferentes concentraciones de INF-γ (10 ng/mL y 100 ng/mL) aumentaron significativamente en ambas concentraciones (**Figura 8**

Figura 9). En la concentración de 10 ng/mL se puede observar que el aumento fue de 1.5 veces respecto a la condición control. Por otro lado, para la concentración 100 ng/mL el aumento fue de 2.5 veces más.

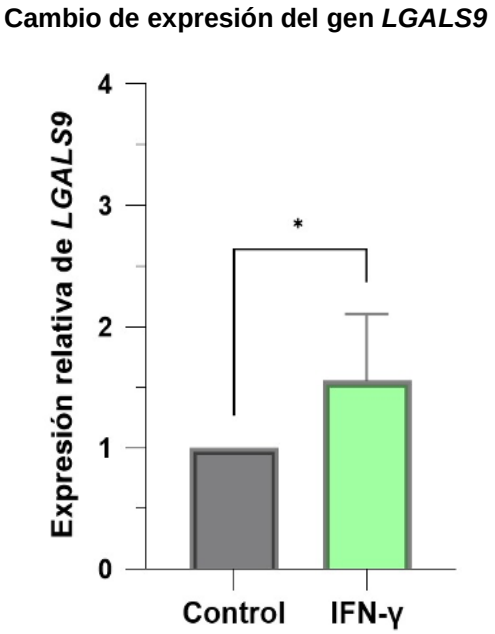


Figura 8: Gráfica que muestra el cambio de nivel de expresión del gen *LGALS9*. Niveles de expresión de *LGALS9* en la línea celular HaCaT estimulados con INF-*γ* [*10 ng/mL]* evaluados por PCR tiempo real utilizando como gen endógeno *HPRT*. El ARN se aisló 6 h después de la estimulación. Para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó un análisis de t de student *$p<0.05$.

Cambio de expresión del gen *LGALS9*

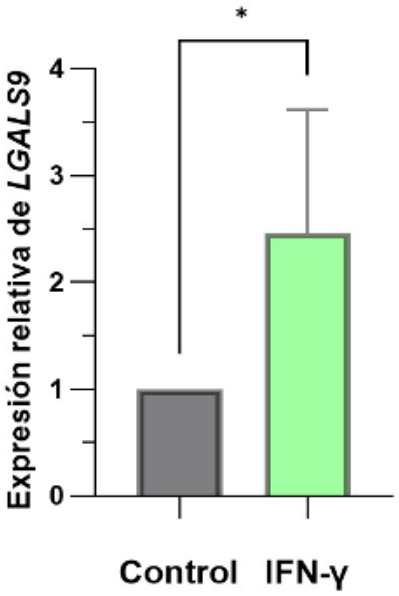


Figura 9: Gráfica que muestra el cambio de nivel de expresión del gen *LGALS9*. Niveles de expresión de *LGALS9* en la línea celular HaCaT estimulados con INF-*γ* [*100 ng/mL]* evaluados por PCR tiempo real utilizando como gen endógeno *HPRT*. El ARN se aisló 6 h después de la estimulación. Para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó un análisis de t de student *p<0.05.

8.2. Actividad de promotor

Para evaluar el efecto del INF-*γ* sobre la actividad transcripcional del promotor de 727 pb del gen *LGALS9*, se co-transfectaron células HaCaT con el plásmido pGL4Gal9-727, que contiene clonado el fragmento del promotor del gen *LGALS9* de 727 pb en el vector pGL4.12. Como control para la eficiencia de la transfección, se utilizó el plásmido pGL4.72, que contiene el gen hRlucCP de *Renilla reniformis.*

Los resultados mostraron que la actividad del promotor de 727 pb del gen *LGALS9* aumentó 3.8 ante el estímulo del INF-*γ* [100 ng/mL] (**Figura 10**).

Actividad del promotor de 727 pb del gen *LGALS9*

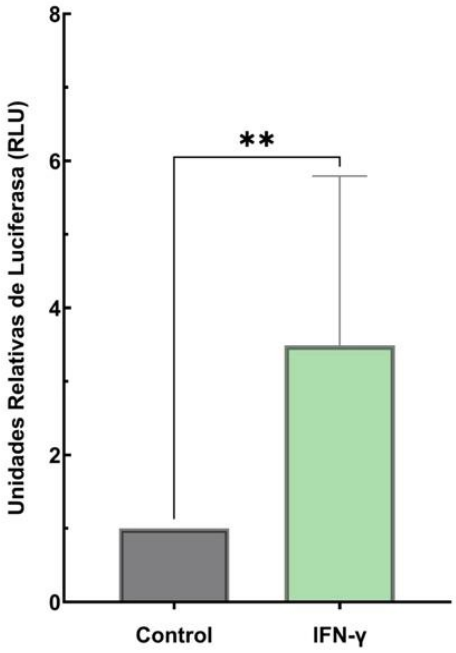


Figura 10: Gráfica que muestra la actividad del promotor de 727 pb del gen *LGALS9.* La actividad del promotor del gen *LGALS9* fue evaluada mediante el ensayo de lucifersa después de 6 horas de estimulación con IFN- *γ* [*100 ng/mL]* una vez que las células fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes. Los ensayos se normalizaron con la actividad de luciferasa de *Renilla*. Para determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas se realizó un análisis de t de student **$p<0.01$

Se realizó una búsqueda de los sitios de respuesta al factor de transcripción IRF1 presentes en la secuencia del promotor de 727 pb del gen *LGALS9* empleando el programa EPD. Dentro de la región promotora de 727 pb del gen *LGALS9* de (-565 a +162 pb), se encontraron dos secuencias a las que se unen IRF1.

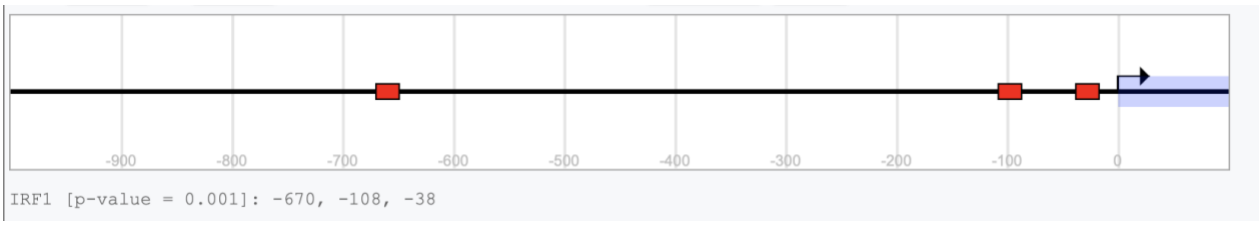


Figura 11: Representación gráfica de los sitios encontrados con EPD. Los rectángulos de color rojo representan los 3 sitios de respuesta a IRF1 encontrados en región promotora de 727 pb del gen *LGALS9*. La flecha representa el inicio de la transcripción del gen *LGALS9*.

9. Discusión

Una de las dos funciones importantes del ADN es ser el molde para la traducción de la información genética en las proteínas, las cuales son la unidad funcional de la célula. Esta función se puede definir como la expresión génica.

Para el inicio de la transcripción se necesitan de un conjunto de proteínas denominadas factores de transcripción, así pues, la maquinaria transcripcional se une a la región promotora del gen, que es una región específica del ADN que esta inmediatamente rio arriba del gen en dirección 5` y que también incluye el sitio de inicio de la transcripción. Posterior a que los factores de transcripción se unen pueden interactuar con la maquinaria transcripcional basal para modificar la transcripción génica (Igarashi, 2017). El estudio de la regulación de expresión genética es de gran relevancia porque permite conocer que factores modifican la expresión de un gen. La expresión de genes de una célula específica define el fenotipo de esta, pero también durante las diferentes fases del ciclo celular los patrones de expresión génica se modifican. Ciertas alteraciones en la expresión de genes están ligadas con el desarrollo de enfermedades (Alberts *et al*., 2002).

En nuestro estudio se evaluó el efecto del INF-γ sobre la expresión del gen *LGALS9* en queratinocitos de piel y si el efecto se observa sobre la actividad del promotor. El gen *LGALS9* codifica para la galectina-9, esta proteína pertenece a la familia de galectinas, las cuáles han adquirido gran relevancia en el estudio del cáncer porque los cambios en su expresión se han asociado con diversas funciones ligadas a la transformación maligna, tales como: proliferación, angiogénesis, invasión, entre otras (Chou *et al*., 2018,)

Los resultados muestran que el INF-γ incrementa los niveles de ARNm del gen *LGALS9* en las células de la línea HaCaT. Esto concuerda con los resultados de estudios previos en donde se ha visto que la expresión de galectina-9 es estimulada por el IFN-γ en células endoteliales, fibroblastos dérmicos, astrocitos (Igawa *et al*., 2006), MSC (Gieseke *et al*., 2013), células de carcinoma hepatocelular (Chen *et al*., 2018) y células del sistema inmune (Alam *et al*., 2011; John & Mishra, 2016).

Es evidente que el IFN-γ puede inducir un cambio en la expresión del gen *LGALS9* en una variedad de células. Al evaluar dos concentraciones diferentes (10 ng/nL y 100 ng/mL), se observó un cambio en la expresión del ARNm del gen *LGALS9* dependiente de la concentración de IFN-γ. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Chen y colaboradores (2018), quienes evaluaron el efecto del IFN-γ sobre la expresión de galectina-9 en células HepG2 y Hep3B a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 ng/mL) y en tiempos progresivos (0, 12, 24 y 36 horas). Encontraron que 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 galectina-9 conforme aumentaba la concentración.

Se ha reportado que el IFN-γ induce la expresión de galectina-9 en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) a nivel de ARN mensajero en tiempos tempranos. Las células HUVEC fueron tratadas con 10 ng/mL de IFN-γ durante 4, 8 y 16 horas, seguido de un análisis de RT-PCR cuantitativo para medir el ARNm de galectina-9. La expresión de galectina-9 aumentó significativamente a partir de las 8 horas (Alam *et al*., 2011).

Contrario a los resultados obtenidos, Igawa y colaboradores (2006) reportaron que el IFN-γ estimuló la expresión de ARNm de galectina-9 en fibroblastos dérmicos, por el contrario, inhibió débil pero significativamente la expresión de ARNm de galectina-9 en queratinocitos con las concentraciones de 10 ng/mL y 100 ng/mL después de 24 hora de incubación con IFN-γ.

Estos efectos opuestos del IFN-γ sobre la expresión de galectina-9 en queratinocitos podrían estar relacionados con la acción de las proteínas CIS (inhibidores de señalización inducida por citoquinas) o las SOCS (supresoras de señalización de citoquinas). Estas proteínas interactúan con JAK o con los receptores de citoquinas, inhibiendo los procesos de señalización celular. Específicamente, IFN-γ y STAT1 inducen la expresión de SOCS1, un potente inhibidor que regula negativamente la señalización de IFN-γ. Por lo tanto, la inhibición mediada por SOCS1 podría explicar el efecto supresor de IFN-γ galectina-9 por en ciertas vías de señalización. De manera similar, SOCS1 y SOCS3 también inhiben otras rutas como Ras/ERK y PI3K, que afectan la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación (Hu & Ivashkiv, 2009; Yoshimura *et al*., 2012).

Los cambios del nivel de expresión del ARNm del gen *LGALS9* pueden deberse a la unión directa de factores de transcripción a la región promotora del gen. Se ha reportado que los factores de transcripción RUNX1 y RUNX2, regulan de manera positiva la expresión de galectina-3 en células tumorales de pituitaria humana, a través de su unión directa a diferentes secuencias de ADN en la región promotora de *LGALS3* (Wang & Guo, 2016).

En específico, los resultados obtenidos de la actividad del promotor del fragmento de 727 pb del gen de *LGALS9* mostraron un aumento en presencia del IFN-γ. El factor regulador de interferón 1 (IRF1), es un factor de transcripción que regula la transcripción de otro grupo de genes que contienen la secuencia consenso ISRE o IRE, entre los cuales se encuentran los ISGs. IRF1 es inducido tanto por interferón gamma (IFN-γ) como por la activación de STAT1, ya que se ha demostrado que STAT1 se une a regiones promotoras específicas de varios ISGs, incluidos IRF1, IRF9, STAT1 e ISG15. Esta regulación transcripcional ocurre a través de la homo o heterodimerización de IRF1 y su unión a secuencias IRE o ISRE (Michalska *et al*., 2018; Tecalco-Cruz *et al*., 2021; Zamora-Salas *et al*., 2023). La estimulación con IFN-γ provoca una interacción entre STAT1 e IRF1 (Zamora-Salas *et al*., 2023).

Mediante el modelado de los complejos IRF-ADN, se encontraron energías de afinidad altas, así como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en cada una de las secuencias núcleo TTTC (GAAA) de las dos que conforman la secuencia ISRE. Estos resultados se corroboraron con la obtención de altas energías de afinidad en los acoplamientos entre los DBD de IRF y el sitio IRE canónico (secuencia GAAA), así como con los sitios IRE alternativos (secuencias GAGA, GACA). Se propuso que los factores de transcripción IRF1/3/5/7/8/9 están involucrados en el aumento de la expresión al promover la transcripción del gen (Vega, 2021).

También se ha reportado que el IFN-γ estimula las vías de señalización STAT no canónicas debido a la formación de complejos de factor regulador de interferón STAT1 (IRF-9). Se encontró que en células Vero después de ser incubadas con IFN-γ, los complejos STAT1-IRF 9 se unen a elementos de respuesta estimuladas por interferón (ISRE) de regiones promotoras. Estos resultados sugieren

que la actividad transcripcional inducida por IFN-γ también puede ser resultado de la asociación de STAT1 con otras proteínas, aparte de la fosforilación STAT1 observada en la vía canónica JAK-STAT (Ng *et al*., 2023).

Cabe mencionar que, en otros estudios se ha propuesto que IFN-γ puede generar una respuesta de STAT2 a pesar de que se ha informado que GAF no interactúa con STAT2 (Michalska *et al*., 2018), ya que, en células epiteliales pulmonares humanas, el complejo ISGF3II que contiene STAT1 fosforilado, STAT2 no fosforilado e IRF-9 se unió a las secuencias ISRE en la fase tardía de la respuesta al IFN-γ. Dado que la actividad del complejo ISGF3II está influenciada por la concentración de IFN-γ y parece estar asociada solo con ciertos genes y etapas de la respuesta al IFN-γ, se necesita más evidencia para describir el papel exacto de STAT2 en las vías de señalización inducidas por IFN-γ (Ng *et al*., 2023).

Por otro lado, algunas de las vías no canónicas activadas por IFN-γ son las vías MAPK y PI3K que regulan la expresión de genes involucrados en la iniciación, propagación y resolución de respuestas inmunes e inflamatorias (Park *et al*., 2011). Se ha demostrado que las vías de señalización JAK/STAT, PI3K, JNK y p38 juegan un papel crucial en la expresión de galectina-9 inducida por IFN-γ en las fracciones citosólica y de membrana (Imaizumi *et al*., 2002), sugiriendo que el mecanismo de la expresión de galectina-9 está mediado por la activación de las vías de señalización JAK/STAT, PI3K, JNK y p38 (Kobayashi *et al*., 2010; Park *et al*., 2011). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que la regulación de la expresión del gen *LGALS9* sea consecuencia de la activación de una vía de señalización de INF-γ de manera indirecta. El efecto puede ser a través de una vía canónica o a través de una vía no canónica activadas por IFN-γ. Esta activación contribuiría a entender mejor el equilibrio entre la iniciación de la respuesta inmunitaria y la

resolución de la inflamación. El conocer los mecanismos de regulación permitirá mejorar el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, autoinmunes y cáncer, donde la modulación de la respuesta inmunitaria es crucial.

Cabe mencionar que, ya se ha reportado que el INF-γ induce la expresión de galectina-3 en una línea celular monocítica U937, que no expresa cantidades detectables de galectina-3 en estado de reposo (Nishi *et al*., 2007).

10. Conclusión

En conclusión, el IFN-γ regula la expresión génica de galectina-9 de forma positiva en queratinocitos de piel, la regulación del gen *LGALS9, que* posiblemente sea resultado la unión de factores de transcripción a elementos de respuesta como IRF1 presentes en el promotor de dicho gen. De esta manera, la galectina-9 puede contrarrestar los efectos proinflamatorios del IFN-γ en situaciones determinadas. Además, ayuda a proteger a las células epiteliales y endoteliales del daño inflamatorio, contribuyendo a mantener la integridad del tejido y reduciendo la inflamación local.

11. Bibliografía

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. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(51), 44211–44217. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242289

Alspach, E., Lussier, D. M., & Schreiber, R. D. (2019). Interferon γ and its important roles in promoting and inhibiting spontaneous and therapeutic cancer immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(3). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028480

Antonczyk, A., Krist, B., Sajek, M., Michalska, A., Piaszyk-Borychowska, A., Plens-Galaska, M., Wesoly, J., & Bluyssen, H. A. R. (2019). Direct inhibition of IRF-dependent transcriptional regulatory mechanisms associated with disease. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAY). https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01176

Caballero, G. G., Kaltner, H., Kutzner, T. J., Ludwig, A. K., Manning, J. C., Schmidt, S., Sinowatz, F., & Gabius, H. J. (2020). How galectins have become multifunctional proteins. En *Histology and Histopathology* (Vol. 35, Número 6, pp. 509–539). Histology and Histopathology. https://doi.org/10.14670/HH-18-199

Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018a). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Número MAY). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847

Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018b). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Número MAY). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847

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. En *Glycobiology* (Vol. 12, Número 2).

Chen, S., Pu, J., Bai, J., Yin, Y., Wu, K., Wang, J., Shuai, X., Gao, J., Tao, K., Wang, G., & Li, H. (2018). EZH2 promotes hepatocellular carcinoma progression through modulating miR-22/galectin-9 axis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *37*(1). https://doi.org/10.1186/s13046-017-0670-6

Chou, F. C., Chen, H. Y., Kuo, C. C., & Sytwu, H. K. (2018). Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Número 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms19020430

Corrêa, M. P., Areias, L. L., Correia-Silva, R. D., D'ávila, S. C. G. P., Leopoldino, A. M., Greco, K. V., & Gil, C. D. (2021). The role of galectin-9 as mediator of atopic dermatitis: Effect on keratinocytes. *Cells*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/cells10040947

Fenimore, J., & Young, H. A. (2016). Regulation of IFN-γ expression. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 941, pp. 1–19). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_1

Gieseke, F., Kruchen, A., Tzaribachev, N., Bentzien, F., Dominici, M., & Müller, I. (2013a). Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation. *European Journal of Immunology*, *43*(10), 2741–2749. https://doi.org/10.1002/eji.201343335

Gieseke, F., Kruchen, A., Tzaribachev, N., Bentzien, F., Dominici, M., & Müller, I. (2013b). Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation. *European Journal of Immunology*, *43*(10), 2741–2749. https://doi.org/10.1002/eji.201343335

Grewal, P. K. (2010). The Ashwell-Morell receptor. En *Methods in Enzymology* (Vol. 479, Número C, pp. 223–241). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)79013-3

Heusschen, R., Griffioen, A. W., & Thijssen, V. L. (2013). Galectin-9 in tumor biology: A jack of multiple trades. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1836, Número 1, pp. 177–185). https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.04.006

Holderried, T. A. W., De Vos, L., Bawden, E. G., Vogt, T. J., Dietrich, J., Zarbl, R., Bootz, F., Kristiansen, G., Brossart, P., Landsberg, J., & Dietrich, D. (2019). Molecular and immune correlates of TIM-3 (HAVCR2) and galectin 9 (LGALS9) mRNA expression and DNA methylation in melanoma. *Clinical Epigenetics*, *11*(1). https://doi.org/10.1186/s13148-019-0752-8

Hu, X., & Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon-γ: Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. En *Immunity* (Vol. 31, Número 4, pp. 539–550). https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.002

Hughes, R. C. (2001). *Galectins as modulators of cell adhesion*.

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

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., … Satoh, K. (2002). Interferon-γ stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, *72*(3), 486–491. https://doi.org/10.1189/jlb.72.3.486

John, S., & Mishra, R. (2016). Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. En *Journal of Biosciences* (Vol. 41, Número 3, pp. 507–534). Springer India. https://doi.org/10.1007/s12038-016-9616-y

Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN-γin tumor progression and regression: A review. En *Biomarker Research* (Vol. 8, Número 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x

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. *International Journal of Cancer*, *99*(6), 809–816. https://doi.org/10.1002/ijc.10436

Kaminker, J. D., & Timoshenko, A. V. (2021). Expression, regulation, and functions of the galectin-16 gene in human cells and tissues. *Biomolecules*, *11*(12). https://doi.org/10.3390/biom11121909

Kelker, H. C., Le, J., Rubin, B. Y., Yip, Y. K., Nagler, C., & Vilcek, J. (1984). Three molecular weight forms of natural human interferon-γ revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(7), 4301–4304. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43045-6

Kobayashi, T., Kuroda, J., Ashihara, E., Oomizu, S., Terui, Y., Taniyama, A., Adachi, S., Takagi, T., Yamamoto, M., Sasaki, N., Horiike, S., Hatake, K., Yamauchi, A., Hirashima, M., & Taniwaki, M. (2010). Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia*, *24*(4), 843–850. https://doi.org/10.1038/leu.2010.25

Liu, F. T., & Stowell, S. R. (2023). The role of galectins in immunity and infection. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 23, Número 8, pp. 479–494). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41577-022-00829-7

Lv, Y., Ma, X., Ma, Y., Du, Y., & Feng, J. (2023a). A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). En *Genes and Diseases* (Vol. 10, Número 6, pp. 2366–2382). KeAi Communications Co. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.020

Lv, Y., Ma, X., Ma, Y., Du, Y., & Feng, J. (2023b). A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9). En *Genes and Diseases* (Vol. 10, Número 6, pp. 2366–2382). KeAi Communications Co. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.020

Mendieta-Carmona, V., Delgado-López, G., Reyes-Leyva, J., Gutiérrez-Quiroz, C. T., Vazquez-Zamora, V. J., Picazo-Mendoza, D. A., Montiel-Jarquín, A. J., Martinez-Morales, L. P., & Vallejo-Ruiz, V. (2023). Galectin-9 Expression is Correlated to Cervical Squamous Cell Carcinoma Progression and Overall Survival. *OncoTargets and Therapy*, *16*, 891–904. https://doi.org/10.2147/OTT.S433710

Mertowska, P., Smolak, K., Mertowski, S., & Grywalska, E. (2023). Immunomodulatory Role of Interferons in Viral and Bacterial Infections. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Número 12). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms241210115

Michalska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J., & Bluyssen, H. A. R. (2018). A positive feedback amplifier circuit that regulates interferon (IFN)-stimulated gene expression and controls type I and type II IFN responses. *Frontiers in Immunology*, *9*(MAY). https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01135

Moar, P., & Tandon, R. (2021). Galectin-9 as a biomarker of disease severity. En *Cellular Immunology* (Vol. 361). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104287

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). https://doi.org/10.3892/or.2021.8056

Murata, H., Tanaka, S., Hisamatsu, Y., Tsubokura, H., Hashimoto, Y., Kitada, M., & Okada, H. (2021). Transcriptional regulation of LGALS9 by HAND2 and FOXO1 in human endometrial stromal cells in women with regular cycles. *Molecular Human Reproduction*, *27*(11). https://doi.org/10.1093/molehr/gaab063

Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(11). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423

Ng, C. T., Fong, L. Y., & Abdullah, M. N. H. (2023). Interferon-gamma (IFN-γ): Reviewing its mechanisms and signaling pathways on the regulation of endothelial barrier function. En *Cytokine* (Vol. 166). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156208

Nio-Kobayashi, J. (2017). Tissue- and cell-specific localization of galectins, β-galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. En *Anatomical Science International* (Vol. 92, Número 1, pp. 25–36). Springer Tokyo. https://doi.org/10.1007/s12565-016-0366-6

Nishi, Y., Sano, H., Kawashima, T., Okada, T., Kuroda, T., Kikkawa, K., Kawashima, S., Tanabe, M., Goto, T., Matsuzawa, Y., Matsumura, R., Tomioka, H., Liu, F.-T., & Shirai, K. (2007). Role of Galectin-3 in Human Pulmonary Fibrosis. En *Allergology Internatinal* (Vol. 56). www.jsaweb.jp!

Park, W. S., Jung, W. K., Park, S. K., Heo, K. W., Kang, M. S., Choi, Y. H., Kim, G. Y., 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. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.110

Paun, A., & Pitha, P. M. (2007). The IRF family, revisited. *Biochimie*, *89*(6–7), 744–753. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.014

Pestka, S. (2000). The human interferon α species and receptors. En *Biopolymers - Peptide Science Section* (Vol. 55, Número 4, pp. 254–287). https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:4<254::AID-BIP1001>3.0.CO;2-1

Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 5, Número 5, pp. 375–386). https://doi.org/10.1038/nri1604

Ramos-Martínez, J. C., Altamirano-Gómez, G., Ramos-Martínez, I., Valencia, J., Hernández-Zimbrón, L., Hernández-Juárez, J., Echeverría-Vásquez, P., Hernández-González, L. L., Pérez-Campos, E., Pérez-Campos Mayoral, L., & Ramos-Martínez, E. (2022). Prognostic Value of Galectin Expression in Patients with Breast Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. En *Clinical Breast Cancer* (Vol. 22, Número 5, pp. 399–409). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.12.011

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

Rio-Aige, K., Girbal, M., Selma-Royo, M., Parra-Llorca, A., González, S., Martínez-Costa, C., Castell, M., Collado, M. C., Pérez-Cano, F. J., & Rodríguez-Lagunas, M. J. (2022). Galectins-1, -3 and -9 Are Present in Breast Milk and Have a Role in Early Life Development. *Nutrients*, *14*(20). https://doi.org/10.3390/nu14204338

Shete, A., Bhat, M., Sawant, J., & Deshpande, S. (2022). Both N- and C-terminal domains of galectin-9 are capable of inducing HIV reactivation despite mediating differential immunomodulatory functionalities. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.994830

Stanifer, M. L., Pervolaraki, K., & Boulant, S. (2019). Differential regulation of type I and type III interferon signaling. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Número 6). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms20061445

Tecalco-Cruz, A. C., Macías-Silva, M., Ramírez-Jarquín, J. O., & Méndez-Ambrosio, B. (2021). Identification of genes modulated by interferon gamma in breast cancer cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *27*. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101053

Thijssen, V. L., Heusschen, R., Caers, J., & Griffioen, A. W. (2015). Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. En *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1855, Número 2, pp. 235–247). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.03.003

Troncoso, M. F., Elola, M. T., Croci, D. O., & Rabinovich, G. A. (2012). Integrating structure and function of "tandem-repeat" galectins. En *Frontiers in Bioscience* (Vol. 4).

Vizcaíno, C., Mansilla, S., & Portugal, J. (2015). Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. En *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 152, pp. 111–124). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.008

Wang, L., & Guo, X. L. (2016). Molecular regulation of galectin-expression and therapeutic implication in cancer progression. En *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 78, pp. 165–171). Elsevier Masson SAS. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.014

Yang, R. Y., Rabinovich, G. A., & Liu, F. T. (2008). Galectins: Structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *10*(17). https://doi.org/10.1017/S1462399408000719

Yoshimura, A., Suzuki, M., Sakaguchi, R., Hanada, T., & Yasukawa, H. (2012). SOCS, inflammation, and autoimmunity. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Número MAR). https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00020

Yuan, F., Ming, H., Wang, Y., Yang, Y., Yi, L., Li, T., Ma, H., Tong, L., Zhang, L., Liu, P., Li, J., Lin, Y., Yu, S., Ren, B., & Yang, X. (2020). Molecular and clinical characterization of Galectin-9 in glioma through 1,027 samples. *Journal of Cellular Physiology*, *235*(5), 4326–4334. https://doi.org/10.1002/jcp.29309

Zaidi, M. R. (2019). The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *39*(1), 30–38. https://doi.org/10.1089/jir.2018.0087

Zamora-Salas, S. X., Robles-Villarruel, M. L., Macías-Silva, M., Álvarez-Sánchez, M. E., & Tecalco-Cruz, Á. C. (2023). Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *26*. https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.533

Zhang, X., Wang, S., Zhu, Y., Zhang, M., Zhao, Y., Yan, Z., Wang, Q., & Li, X. (2021a). Double-edged effects of interferons on the regulation of cancer-immunity cycle. En *OncoImmunology* (Vol. 10, Número 1). Bellwether Publishing, Ltd. https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1929005

Zhang, X., Wang, S., Zhu, Y., Zhang, M., Zhao, Y., Yan, Z., Wang, Q., & Li, X. (2021b). Double-edged effects of interferons on the regulation of cancer-immunity cycle. En *OncoImmunology* (Vol. 10, Número 1). Bellwether Publishing, Ltd. https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1929005