

Estudio metabolómico de la reexpresión de interferón kappa en modelos celulares in vitro de
cáncer de cuello uterino infectados con virus del papiloma humano

Leidy Tatiana Sierra Guevara

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Ph.D. William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Codirector

Ph.D. Bladimiro Rincón Orozco

Doctor en Ciencias Naturales

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Grupo de Investigación en Química y Microbiología

Bucaramanga

2023

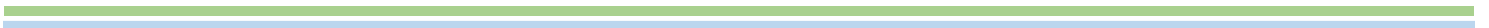
Dedicatoria

A Dios, por guiar mi mente, corazón y espíritu en este camino de la investigación y por acompañarme en cada uno de los retos que me formaron como la persona y profesional que quiero ser a diario.

A mi abuelo Juan Alfonso Sierra Ruiz, por enseñarme a ser feliz con las cosas más pequeñas de la vida, y realmente he sido muy feliz entre átomos y células.

A mis padres, Sandra Elena Guevara Salgado y Juan Alberto Sierra Mateus por su amor, entrega y apoyo incondicional en el proceso de cumplir cada uno de mis sueños. Todo lo que soy es gracias a lo que formaron con su ejemplo y gracias por enseñarme que lo importante no es la meta sino disfrutar y aprender del proceso.

A mis hermanos, Andres Felipe, Cristian Camilo y Ana Maria Sierra Guevara, porque son la mejor herencia que me han dejado mis padres. Gracias porque juntos desde niños entre juegos, exploraciones y diversión descubrimos esa curiosidad innata de la ciencia, que al final es a lo que me quiero dedicar el resto de mi vida.



Agradecimientos

Agradezco a mi alma Mater la Universidad Industrial de Santander por abrirme sus puertas para mi proceso de formación integral como profesional en química. A la Escuela de Química, el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) y el Laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer (GEMEICA) por el apoyo académico y económico, junto con la disposición de los laboratorios, materiales, equipos y reactivos necesarios para el desarrollo de este proyecto. A mis directores, los profesores William Hidalgo y Bladimiro Rincón, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta investigación bajo su orientación, en donde pude aprender de su recorrido personal como científicos y de su amplia experiencia profesional en el campo de biología celular, molecular y metabólica.

A mis familiares y seres queridos, porque su amor y entrega fue la fortaleza e inspiración para convertirme en la persona que quiere servir a la sociedad como el reflejo de todo lo que han sembrado en mí. A mis compañeras del GEMEICA, Ana Arboleda, Brigitte Peña, Natalia Jones, Karina Freyle y Eliana Mora, quienes amablemente compartieron sus conocimientos y junto a un café me permitieron la discusión, análisis y solución de los diferentes retos innatos de todo proceso de investigación. A mis amigos y futuros colegas, Daniela Jerez, Yuneidy Quintero, Jesús Becerra, Paulín Gonzalez, Sebastian Mora y Luis Acuña, porque juntos en este proceso de formación aprendimos, superamos, crecimos personalmente y disfrutamos cada momento de la Universidad que vivirán por siempre en mi memoria. Deseo de todo corazón que esos sueños de los que hablamos se hagan realidad y que nuestros caminos se sigan cruzando para apoyarnos y celebrar cada uno de los pequeños triunfos.

Finalmente, a las profesoras Stelia Mendez y Martha Daza, por disponer de su tiempo para evaluar este proyecto de investigación.

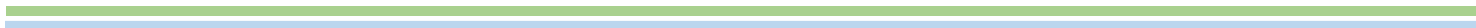


Tabla de Contenido

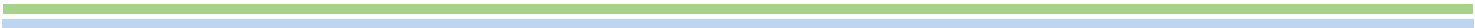
	Pág.
Introducción.....	14
1. Objetivos.....	17
1.1 Objetivo General	17
1.2 Objetivos Específicos	17
2. Estado del arte.....	18
3. Marco teórico.....	26
3.1 Cáncer de cuello uterino.....	26
3.2 Virus de Papiloma Humano (VPH).....	28
3.3 Queratinocitos.....	34
3.4 Interferón Kappa (IFN- κ).....	37
3.5 Métodos de transferencia de material genético a la célula.....	41
3.6 Metabolómica.....	43
4. Metodología.....	51
4.1 Extracción del plásmido pCMV-3Tag-1A clonado con IFN- <i>k</i> (pCMV-IFNk).....	52
4.1.1 Confirmación del plásmido pCMV-IFNk extraído con Miniprep.....	54
4.2 Cultivo y transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat.....	56
4.2.1 Estandarización de la transfección con el plásmido pEGFP-C1.....	57
4.2.2 Transfección con los plásmidos pCMV-empty y pCMV-IFNk.....	58
4.3 Comprobación de la expresión transcripcional del IFN- <i>k</i>	59
4.3.1 Extracción del ARN de las células control y tratamiento.....	59

4.3.2 Retrotranscripción del ARN a ADNc.....	60
4.3.3 Cuantificación absoluta del ADNc por ddPCR.....	62
4.4 Análisis metabolómico no dirigido.....	64
4.4.1 Estandarización de la extracción de los metabolitos.....	65
4.4.2 Análisis de los metabolitos extraídos por UHPLC-Orbitrap/HRMS.....	67
4.4.3 Procesamiento y análisis estadístico de los datos.....	68
5. Resultados y discusión.....	70
5.1 Extracción y confirmación del plásmido pCMV-3-Tag-1A con IFN- <i>k</i>	70
5.2 Transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat.....	75
5.3 Comprobación de la expresión transcripcional del IFN- <i>k</i>	82
5.3.1 Extracción del ARN de las líneas celulares de estudio.....	82
5.3.2 Retrotranscripción del ARN a ADNc.....	84
5.3.3 Cuantificación absoluta del ADNc por ddPCR.....	87
5.4 Estandarización del método de extracción de los metabolitos.....	90
5.5 Análisis metabolómico no dirigido de las células control y tratamiento.....	95
5.5.1 Procesamiento de los datos cromatográficos y espectrales en el software XCMS.....	95
5.5.2 Validación de la técnica analítica con el control de calidad.....	98
5.5.3 Análisis estadísticos multivariados de los controles y tratamiento en las células de estudio.....	100
5.5.4 Identificación presuntiva de los metabolitos representativos.....	107
5.5.5 Análisis de enriquecimiento para determinar las vías metabólicas moduladas por la expresión del IFN- <i>k</i>	113
6. Conclusiones.....	126

7. Recomendaciones.....128

8. Divulgación de resultados.....129

Referencias bibliográficas.....130



Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <u>Tamaño y función de las proteínas del virus del papiloma humano</u>	30
Tabla 2. <u>Métodos de transfección celular</u>	42
Tabla 3. <u>Clasificación metabólica de acuerdo al enfoque experimental</u>	45
Tabla 4. <u>Componentes de la reacción de amplificación por PCR</u>	55
Tabla 5. <u>Programa de amplificación en el termociclador T100 de Bio-Rad</u>	55
Tabla 6. <u>Condiciones experimentales para realizar transfecciones de un mayor número de células</u>	59
Tabla 7. <u>Componentes de la reacción de retrotranscripción</u>	61
Tabla 8. <u>Programa de retrotranscripción en el termociclador T100 de Bio-Rad</u>	62
Tabla 9. <u>Programa de amplificación en el termociclador C1000 de Bio-Rad</u>	64
Tabla 10. <u>Condiciones experimentales para estandarizar el método de extracción de metabolitos en células SiHa</u>	66
Tabla 11. <u>Resultados de cuantificación del ADN plasmídico extraído con miniprep</u>	73
Tabla 12. <u>Resultados de la transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat con el plásmido pEGFP-C1</u>	76
Tabla 13. <u>Resultados de la transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat con el plásmido pCMV-empty y pCMV-IFNk</u>	78
Tabla 14. <u>Resultados de cuantificación del ARN extraído con RNeasy Plus Mini kit</u>	84

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Asociaciones clínicas de los diferentes genotipos de VPH.....	20
Figura 2. Proceso de transcripción de interferones tipo I como respuesta inmune antiviral.....	22
Figura 3. Cambios morfológicos de las células epiteliales del cuello uterino.....	27
Figura 4. Organización del genoma de los virus del papiloma humano.....	29
Figura 5. Interacción de las proteínas de la cápside L1 y L2 para ingresar a la célula por endocitosis.....	32
Figura 6. Ciclo de replicación del VPH a medida que se diferencian los queratinocitos.....	33
Figura 7. Vía endocítica implicada en la internalización y el tráfico intracelular del virus.....	34
Figura 8. Composición, estructura y tipos celulares de la epidermis: Células de Merkel, melanocitos, células de Langerhans y queratinocitos.....	35
Figura 9. Cambios morfológicos de los queratinocitos desde el estrato germinativo o basal hasta el córneo.....	36
Figura 10. Mecanismo de señalización celular inducidos por los interferones tipo I, II y III.....	39
Figura 11. Flujo de trabajo de análisis del metaboloma.....	46
Figura 12. Niveles de confianza de identificación de metabolitos.....	48
Figura 13. Reprogramación metabólica por parte del sistema inmunológico.....	50
Figura 14. Diagrama general de la metodología desarrollada en el proyecto de investigación.....	52
Figura 15. Mezcla de ADN plasmídico y transfectina para formar los complejos de transfección.....	58
Figura 16. Comparación entre la retrotranscripción de un paso y dos pasos (RT-PCR).....	61
Figura 17. Equipos y reactivos del sistema QX200 ddPCR.....	63

Figura 18. Mapa circular del plásmido pCMV-3Tag-1A.....	71
Figura 19. Confirmación del plásmido extraído pCMV-3Tag-1A clonado con el gen del IFN- <i>k</i>	74
Figura 20. Secuencia de cambios estructurales en los mecanismos de muerte celular por apoptosis y necrosis.....	79
Figura 21. Esquema de tráfico intracelular general de plásmidos desde la membrana celular al núcleo.....	81
Figura 22. Confirmación del transcrito de IFN- <i>k</i> en las células SiHa y HaCat transfectadas.....	85
Figura 23. Cuantificación del número de copias de IFN- <i>k</i> en las líneas celulares transfectadas por medio de PCR de tercera generación (ddPCR).....	88
Figura 24. Cantidad de relaciones m/z correspondientes a metabolitos extraídos en cada método.....	91
Figura 25. Eficiencia de los métodos de extracción comparando las áreas relativas del patrón interno con las de algunos metabolitos implicados en las principales rutas metabólicas.....	93
Figura 26. Resultados del procesamiento de las muestras en el primer trabajo multigrupo.....	96
Figura 27. Análisis de Componentes Principales de las muestras de estudio frente al control de calidad.....	99
Figura 28. Análisis de Componentes Principales de los controles y tratamiento de las células de estudio.....	101

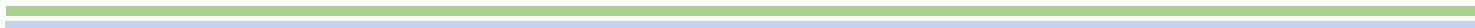
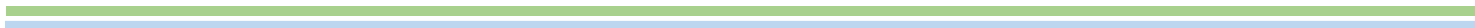


Figura 29. Diagramas de cargas del PCA de los controles y tratamiento en las células de estudio.....	103
Figura 30. Clasificación química de los metabolitos identificados presuntivamente en las células de estudio.....	108
Figura 31. Mapas de calor con los metabolitos representativos y diferenciales entre controles y tratamiento.....	111
Figura 32. Correlación del comportamiento de los metabolitos en los diagramas de cajas y el mapa de calor.....	113
Figura 33. Análisis de enriquecimiento con los metabolitos representativos y diferenciales entre controles y tratamiento en las células SiHa.....	114
Figura 34. Formación de un aminoacil-ARNt y aminoácidos modulados por la reexpresión del IFN- <i>k</i>	116
Figura 35. Metabolismo de aminoácidos aromáticos modulado por la reexpresión del IFN- <i>k</i>	118
Figura 36. Reacción general de la biosíntesis de ácidos grasos modulados por la reexpresión del IFN- <i>k</i>	120
Figura 37. Análisis de enriquecimiento con los metabolitos representativos y diferenciales entre controles y tratamiento en las células HaCat.....	123
Figura 38. Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada modulada por la reexpresión del IFN- <i>k</i>	125

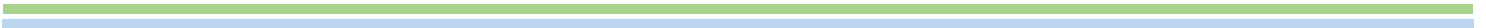


Lista de Apéndices

“Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS”

Apéndice A. Tablas de resultados de la estandarización del método de extracción de metabolitos en las células SiHa.

Apéndice B. Tablas de resultados del análisis metabólico con enfoque no dirigido



Resumen

Título: Estudio metabólico de la reexpresión de interferón kappa en modelos celulares in vitro de cáncer de cuello uterino infectados con virus del papiloma humano*

Autores: Leidy Tatiana Sierra Guevara, William Fernando Hidalgo Bucheli, Bladimiro Rincón Orozco**

Palabras Clave: Cáncer cervicouterino, VPH, interferón tipo I, queratinocitos epidérmicos, SiHa, HaCat, ADN recombinante, transfección, metabólica.

Descripción: Los Virus del Papiloma Humano (VPH) modulan procesos inmunológicos en queratinocitos y reconfiguran su metabolismo celular, favoreciendo la propagación viral, el desarrollo tumoral y la resistencia a tratamientos. Los responsables son los oncogenes E6 y E7, ya que inhiben la expresión de interferones tipo I como el IFN-*k*, ocasionando una proliferación descontrolada de los queratinocitos infectados, que desencadenan el cáncer de cuello uterino (CCU). A nivel mundial, el CCU genera más de 300.000 muertes anuales y en Colombia se registran más de 2.500 casos anuales con un 50 % de mortalidad en estadios muy avanzados.

Los queratinocitos expresan constitutivamente el IFN-*k* como respuesta ante patógenos. Sin embargo, en los queratinocitos infectados con VPH se inhibe la expresión de esta citoquina, ocasionando cambios inmunometabólicos, que hasta el momento no son bien comprendidos. Por tal motivo, en la presente investigación se realizó un estudio metabólico de la reexpresión del IFN-*k* en una línea celular cervical tumoral (SiHa) y en un queratinocito no tumoral (HaCat). La reexpresión del IFN-*k* se realizó por transfección química y se comprobó por retrotranscripción (RT-PCR) y cuantificación absoluta por ddPCR, para posterior análisis metabólico mediante UHPLC-Orbitrap/HRMS, procesamiento estadístico de datos e identificación de los metabolitos de interés.

Finalmente, se identificaron diferencias en los perfiles metabólicos entre las células control (sin transfección y mock) y tratamiento (transfectadas con IFN-*k*). Para las células cancerígenas (SiHa) fueron representativos los cambios ocurridos en el metabolismo de fenilalanina, tirosina, triptófano, ácidos grasos y aminoacil-ARNt. En los queratinocitos no tumorales (HaCat), fueron modulados el metabolismo de fenilalanina, valina, leucina e isoleucina. Por ende, los cambios metabólicos modulados por la reexpresión del IFN-*k* variaron entre los controles y tratamientos de células no tumorales y cancerígenas, permitiendo la activación de respuestas inmunometabólicas que contribuyen a disminuir la proliferación de células cancerígenas cervicales.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor en Química. Codirector: Bladimiro Rincón Orozco. Doctor en Ciencias Naturales

Abstract

Title: Metabolomic study of interferon kappa reexpression in cervical cancer cell models in vitro infected with human papillomavirus*

Authors: Leidy Tatiana Sierra Guevara, William Fernando Hidalgo Bucheli, Bladimiro Rincón Orozco**

Key Words: Cervical cancer, HPV, type I interferon, epidermal keratinocytes, SiHa, HaCat, recombinant DNA, transfection, metabolomics.

Description: Human Papilloma Viruses (HPV) modulate immunological processes in keratinocytes and reconfigure their cellular metabolism, favoring viral propagation, tumor development and resistance to treatment. The culprits are the E6 and E7 oncogenes, as they inhibit the expression of type I interferons such as IFN- κ , causing uncontrolled proliferation of infected keratinocytes, which trigger cervical cancer (CCU). Worldwide, cervical cancer causes more than 300.000 deaths per year and in Colombia there are more than 2.500 cases per year with a 50% mortality rate in very advanced stages.

Keratinocytes constitutively express IFN- κ in response to pathogens. However, in keratinocytes infected with HPV the expression of this cytokine is inhibited, causing immunometabolic changes, which so far are not well understood. For this reason, in the present investigation we performed a metabolic study of IFN- κ reexpression in a cervical tumor cell line (SiHa) and in a non-tumorigenic keratinocyte (HaCat). IFN- κ re-expression was performed by chemical transfection and tested by retrotranscription (RT-PCR) and absolute quantification with ddPCR, for subsequent metabolic analysis by UHPLC-Orbitrap/HRMS, statistical data processing and identification of metabolites of interest.

Finally, differences in metabolic profiles were identified between control (untransfected and mock) and treatment (transfected with IFN- κ) cells. For cancer cells, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, fatty acid and aminoacyl-tRNA metabolism were representative. In non-tumorigenic keratinocytes, phenylalanine, valine, leucine, isoleucine metabolism were characteristic. Thus, metabolic changes modulated by IFN- κ re-expression varied between non-tumor and cancer cell controls and treatments, allowing for the activation of immunometabolic responses that contribute to decreased cervical cancer cell proliferation.

* Degree Work

**Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Ph.D. in Chemistry. Co-director: Bladimiro Rincón Orozco. Ph.D. in Natural Sciences.

Introducción

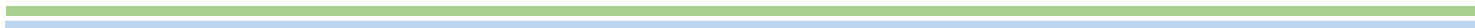
Los oncovirus a través de sus oncogenes aportan algunas de las características distintivas del cáncer que sumadas a otros factores como la inmunosupresión, infección e inflamación crónica pueden conducir al establecimiento de malignidades. Se estima que entre el 50 y 80% de las personas sexualmente activas, se infectan con uno o múltiples genotipos de VPH en algún momento de sus vidas (Stanley, 2010). Adicionalmente, los oncovirus causan cerca del 12% de todos los cánceres humanos a nivel mundial, siendo el VPH responsable del 5% de estas enfermedades, teniendo en cuenta que este virus genera cada año cerca de 570.000 casos de cáncer de cuello uterino (CCU), ocasionando más de 300.000 muertes (Bouvard et al., 2009). A nivel local, reportes de International Agency for Research on Cancer (IARC) revelan que la incidencia anual de CCU en Colombia es de 18,7 casos por cada 100.000 mujeres. Sumado a ello, el Ministerio de Salud y Protección Social ha determinado que el CCU es la primera causa de muerte por cáncer, en mujeres colombianas con edades entre 30 a 59 años, provocando aproximadamente 5 muertes diarias. En dichos estudios se encuentra que la prevalencia de infección por VPH es de 14,8% en mujeres con resultados citológicos normales, 26,1% en mujeres infectadas menores de 20 años y un 13,2% en mujeres infectadas mayores de 55 años (Molano et al., 2002).

Para que se establezca un proceso cancerígeno es indispensable adquirir progresivamente algunas características biológicas que mantengan su tumorigenicidad, entre estas: el mantenimiento de las señales de proliferación celular; la evasión de inhibidores de crecimiento, la evasión de la respuesta inmune, la resistencia a la muerte celular programada (apoptosis), el ingreso y mantenimiento en el ciclo de inmortalidad replicativa, la inducción de la inflamación protumoral; la activación de la invasión y metástasis; la mutabilidad e inestabilidad genómica; así como la reprogramación del

metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011). Con base a esto, una terapia exitosa contra el cáncer y la eficaz estratificación individual de los pacientes requiere una comprensión completa de la interacción entre las infecciones persistentes con virus oncogénicos, las vías inflamatorias inducidas, el metabolismo de las células cancerosas, los resultados clínicos y la resistencia terapéutica (Vinay et al., 2015). En este sentido, la metabolómica tiene el potencial de identificar moléculas que podrían contribuir a la comprensión de enfermedades, así como nuevos biomarcadores, que otros enfoques de alto rendimiento como la transcriptómica y la proteómica pueden pasar por alto. Por tanto, la metabolómica tiene la ventaja de identificar vías nuevas e imprevistas implicadas en cáncer, infecciones virales, patogénesis y respuestas a tratamientos (O'Neill et al., 2016).

En los últimos años, se ha descubierto que los VPH tienen varios mecanismos complejos a través de los cuales modulan la respuesta inmune innata del hospedador. Uno de estos es contrarrestar los IFN tipo I, como el interferon kappa (IFN- κ), el cual es expresado constitutivamente en los queratinocitos y cumple un papel crucial en la respuesta contra virus (Rincon-Orozco et al., 2009). Varios estudios afirman que los VPH de alto riesgo, como por ejemplo el VPH-16 y VPH-18, pueden interferir en la señalización intracelular de los IFN tipo I por medio de sus oncoproteínas E6 y E7. Sin embargo, es necesario comprender con mayor detalle las rutas metabólicas implicadas en la producción del IFN- κ y como se ven mediadas por la patogénesis del VPH, para tener una visión más amplia de la función de esta citoquina en las interacciones virus-hospedador. Por ende la presente investigación buscó dar respuesta a la pregunta ¿cuáles son los cambios del perfil inmunometabólico modulado por la reexpresión de interferón kappa en células de origen queratinocítico tumorales VPH positivas y no tumorales?

Para ello, la ruta metodológica de este estudio inició con la amplificación, extracción y confirmación del plásmido pCMV-3Tag-1A clonado con el gen de IFN-*k*, el cual se transfectó por medio de liposomas en dos líneas celulares: SiHa (cáncer cervical ocasionado por VPH-16) y HaCat (queratinocito no tumoral). Luego se analizó la reexpresión del transcrito de IFN-*k* en estas líneas celulares, por medio de la retrotranscripción del ARNm a ADNc (RT-PCR) y cuantificación absoluta por PCR digital (ddPCR). Al confirmar la expresión transitoria de la citoquina, se procedió a extraer los metabolitos celulares para preparar las muestras, las cuales se analizaron por medio de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Orbitrap/HRMS). Estos resultados permitieron establecer el mapa metabólico diferencial entre las células control (sin transfección y mock), y células tratadas (transfectadas con el plásmido clonado con IFN-*k*, pCMV-IFN*k*), por medio de la identificación presuntiva de los metabolitos modulados positiva y negativamente junto con su integración en las vías metabólicas moduladas por la expresión del IFN-*k*.



1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar los cambios del perfil metabólico modulado por la reexpresión del interferón kappa (IFN- κ) en una línea celular tumoral de cuello uterino SiHa (VPH-16) y un queratinocito control no tumoral HaCat (VPH negativo)

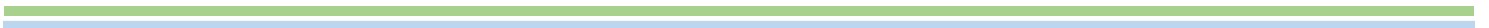
1.2 Objetivos Específicos

✓ Estandarizar los métodos de transfección en las líneas celulares SiHa y HaCat para reexpresar el interferón kappa (IFN- κ).

✓ Cuantificar el número de copias absolutas de IFN- κ en las líneas celulares transfectadas utilizando PCR de tercera generación (ddPCR)

✓ Optimizar la extracción de los metabolitos celulares, por medio de la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Orbitrap/HRMS).

✓ Establecer el mapa metabólico diferencial entre células control (transfectadas con el vector vacío) y células tratadas (transfectadas con el vector con IFN- κ)



2. Estado del arte

La transmisión sexual, como un factor de riesgo para el desarrollo de CCU, fue descrita desde 1842 por Domenico Rigoni-Stern, mientras que el origen infeccioso de las verrugas fue establecido en 1907 por Giuseppe Ciuffo (Ciuffo, G. 1907). A pesar de esto, no fue sino hasta 1983 que se relacionó la infección por VPH como una causa de CCU, cuando Harald zur Hausen y su equipo de investigadores encontraron ADN de VPH 16 en cerca de 60% de muestras de tejido (Ochoa Carrillo et al., 2015).

En 1974, el médico alemán Harald zur Hausen publicó su primer informe sobre el intento de encontrar ADN del VPH en biopsias de cáncer de cuello uterino y verrugas genitales. Para ello, realizó una hibridación de ADN tumoral con una sonda de ARN obtenido a partir del ADN del VPH de verrugas plantares (neoplasias duras y de apariencia granulada que crecen en los talones o las plantas de los pies) (zur Hausen, 2009). Con esta sonda de ARN, zur Hausen logró la hibridación en biopsias de verrugas plantares y verrugas cutáneas, mientras que las biopsias de condiloma acuminado (verrugas genitales) y cáncer de cuello uterino fueron consistentemente negativas. Dado que ninguno de los tipos de tumor obtuvo resultados positivos a pesar de la evidencia de partículas típicas de VPH en las lesiones de los condilomas, sospechaba de una heterogeneidad genética entre los tipos de virus del VPH (H. Z. Hausen et al., 1974). Esta teoría etiológica del VPH para el cáncer de cuello uterino fue apoyada por trabajos posteriores de Meisels y Fortin, quienes describieron las células atípicas coilocitóticas como la manifestación del cambio citopático inducido por el virus del papiloma en la displasia cervical (Meisels & Fortin et al., 1977).

En 1980, el equipo de este médico alemán modificó los experimentos anteriores, empleando esta vez sondas de ADN purificado de virus de diversas verrugas, que permitieron la

detección de distintos patrones de escisión de enzimas de restricción en aislamientos de VPH de muchos pacientes (Gissmann et al., 1977). Esto llevó a la identificación de múltiples cepas de VPH 1, 2 y 3. Un año más tarde, se encontró el VPH 4, que era claramente diferente de los tres primeros, ya que no hibridó de forma cruzada con los VPH 1-3, lo que ejemplifica aún más la heterogeneidad entre los tipos de VPH. Lutz Gissman (profesor asociado en el laboratorio de zur Hausen), continuó aplicando la hibridación de ácidos nucleicos en condiciones de baja rigurosidad para detectar nuevos tipos de VPH y desarrolló un procedimiento de clonación que condujo a la identificación del primer tipo de VPH genital, el VPH 6 (Gissmann & Hausen, 1980). El ADN de este tipo se aisló repetidamente de verrugas genitales y condilomas acuminados y este se conoce hoy como la principal causa de condilomas. Posteriormente, se identificó un VPH 11 que se encuentra estrechamente relacionado con el papiloma laríngeo y las verrugas genitales (Gissmann et al., 1982). Sin embargo, hasta este momento todavía no relacionaba el VPH con el cáncer de cuello uterino.

El punto decisivo ocurrió en 1983, cuando Dürst, Gissman y otros colaboradores de zur Hausen, encontraron que algunos tumores malignos, incluidas dos muestras de carcinoma invasivo de cuello uterino, mostraron una hibridación cruzada débil pero persistente con el ADN del VPH 11. Este ADN se clonó y se denominó ADN de VPH 16 (Durst et al., 1983); demostrando que más del 50% de las biopsias de CCU dieron positivo para esta clasificación. Por otra parte, se encontraron muestras negativas de pacientes africanas con CCU, lo que ocasionó que continuara una búsqueda exhaustiva de tipos adicionales de VPH. Nuevamente, la combinación de una hibridación de baja rigurosidad con una mezcla de sondas de ADN de VPH 9, 10 y 11 resultó en la clonación del ADN de VPH 18 (Boshart et al., 1984). Con estos resultados, se hizo evidente que las lesiones típicas precursoras del cáncer anogenital, las neoplasias intraepiteliales cervicales y la

enfermedad de Bowen contenían con frecuencia los tipos VPH 16 o 18. De esta forma, se fortaleció la hipótesis del VPH como agente causal del CCU y creció en gran medida el interés por la investigación entre este virus y otras neoplasias genitales. El profesor zur Hausen (ganador del premio Nobel de medicina en el año 2008), Gissmann y su grupo cedieron las sondas de los VPH 6, 11, 16 y 18, y diversos grupos de investigación en todo el mundo descubrieron otros subtipos (figura 1), lo cual permitió un rápido avance para entender cómo los virus causan el cáncer; con estos datos se inició el desarrollo de vacunas (Nobelpreis für Medizin, 2008).

Figura 1.

Asociaciones clínicas de los diferentes genotipos de VPH

Clinical associations of HPV genotypes
<ul style="list-style-type: none"> • Warts of the skin (HPV 1–4, 7, 10, 26–29, 41, 48, 49, 57, 60, 63, 65) <ul style="list-style-type: none"> – Verruca plantaris/plantar warts, mosaic-type warts, verruca plana/flat warts, butchers' warts
<ul style="list-style-type: none"> • Upper respiratory tract and eye (HPV 2, 6, 11, 13, 16, 32) <ul style="list-style-type: none"> – Laryngeal papilloma, recurrent respiratory, papillomatosis, nasal papilloma, oral papilloma, focal epithelial hyperplasia, conjunctival papilloma
<ul style="list-style-type: none"> • Epidermodysplasia verruciformis (HPV 5, 8–9, 12, 14, 15, 17, 19, 20–25, 36, 38, 47, 50) <ul style="list-style-type: none"> – Macular lesions – Squamous cell carcinoma
<ul style="list-style-type: none"> • Anogenital warts (HPV 2, 6, 11, 16, 18, 30, 40–42, 44, 45, 54, 55, 61) <ul style="list-style-type: none"> – Condylomata accuminata, flat condylomata, Bowen's disease, Buschke-Loewenstein tumours
<ul style="list-style-type: none"> • Anogenital carcinomas – the HR HPVs (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) <ul style="list-style-type: none"> – Squamous cell carcinoma of the cervix, vulva and penis – Squamous cell carcinoma of the remaining anogenital tract

Fuente: Prendiville, Department of Obstetrics and Gynaecology Walter. (2017). The Health Professional's Hpv Handbook: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. CRC Press.

Como ejemplo de los descubrimientos mencionados anteriormente, en 1985 se observó que en la mayoría de las mujeres con CCU, el virus había integrado su genoma al del hospedero, preservando siempre los oncogenes E6 y E7, con pérdida o interrupción del gen E2. Esto es importante debido a que en las lesiones preinvasoras del cuello uterino, el genoma viral se encuentra en forma episomal (circular), esto es, fuera del genoma celular y con el gen E2 completo. Este último inhibe la actividad de los oncogenes virales, por lo que el rompimiento del gen E2 durante la integración se considera un fenómeno indispensable para la activación de los oncogenes virales y con ello, la evolución tumoral de las lesiones preinvasoras a cáncer invasor (Schwarz et al., 1985). Así pues, el VPH tiene la capacidad de estimular de forma continua el crecimiento tumoral, lo que favorece que en un periodo habitualmente largo se generen mutaciones al azar en el genoma celular que apagan la respuesta inmune innata del hospedador.

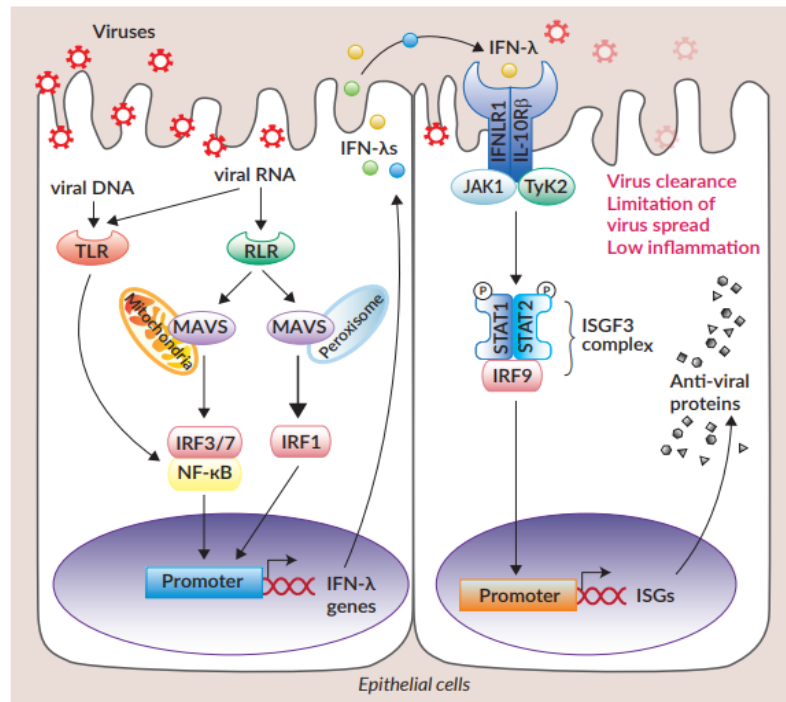
Los IFN se definieron por primera vez como moléculas liberadas de células infectadas con virus, que actúan para inhibir la replicación del patógeno (Isaacs & Lindenmann, 1987). Su producción es en gran parte transcripcional; ya que no están preformados ni almacenados dentro de las células. Adicionalmente, su expresión es rápida y dramática, es decir, se producen rápidamente poco después de la infección y, a menudo, en grandes cantidades. Para muchos IFN de tipo I, el proceso de transcripción comienza a través de la unión del ácido nucleico viral con las moléculas del receptor tipo Toll (TLR) intracelular, teniendo en cuenta que TLR está presente con frecuencia dentro de los endosomas, es decir, están dentro del mismo compartimento subcelular por el que los virus que ingresan a las células a través de endocitosis (Jensen & Thomsen, 2012).

Luego, los TLR inducen la señalización intracelular que involucra el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88) o el IFN β inductor del adaptador que contiene el dominio TIR (TRIF), lo que da como resultado la activación del factor regulador de IFN (IRF 3/7),

el factor nuclear kappa-beta (NF- κ B) y con ello la activación transcripcional de los promotores del gen de IFN tipo I (Sedger, 2013), como se observa en la figura 2.

Figura 2.

Proceso de transcripción de interferones tipo I como respuesta inmune antiviral



Fuente: InvivoGen. (2018). Interferon λ s: guardians of the front-lines. Invivogen Insight. <https://www.ibiantech.com/catalogos/invivogen-insight-newsletter-interferon2018.pdf>

Algunas de las vías bien caracterizadas de la respuesta inmune inducidas por IFN con potencial actividad antiviral directa incluyen cuatro proteínas: la proteína de 15 kDa estimulada por IFN (ISG15), la proteína Mx, la ribonucleasa L (ARNasa-L) y la proteína quinasa R (PKR). Sin embargo, hay más proteínas que funcionan como efectores antivirales importantes como ADAR1 y APOBEC; Teterina y Viperina; TRIM19; la exonucleasa ISG20; y las proteínas IFIT. Además, el IFN puede inducir ciertos microARN

interferentes con respuestas reguladoras de la infección viral. Estas proteínas van a estar involucradas en diversas funciones que implican la remodelación del citoesqueleto; inducción de la apoptosis; corte, empalme, edición y degradación de ARN viral; regulación en la expresión de proteínas y modificaciones postraduccionales (Narasimhan et al., 1996).

El gen del interferón IFN- κ se identificó en 2001 (LaFleur et al., 2001). Consta de 207 aminoácidos, incluido un péptido señal de 27 aminoácidos, y tiene aproximadamente un 30% de homología con otros genes de interferón tipo I. Se descubrió inicialmente que el IFN- κ se expresaba constitutivamente en queratinocitos primarios en proliferación y podría ser inducido significativamente por IFN- β , IFN- γ y el virus de la encefalomiocarditis (ECMV). Más tarde, también se encontró que el ARNm de IFN- κ se expresaba constitutivamente en células inmunitarias innatas humanas, incluidos los monocitos y las células dendríticas (Nardelli et al., 2002). Aunque IFN- κ se expresa mediante fuentes de células limitadas, activa la misma vía de señalización que otros IFN de tipo I por los receptores de IFNRA1/IFNRA2 (Li et al., 2020). Debido a que se expresa constitutivamente en queratinocitos, el IFN- κ se ha investigado por su papel en las enfermedades humanas causadas por el virus del papiloma humano (VPH), teniendo en cuenta que se ha encontrado los VPH de alto riesgo que inhiben la transcripción del gen IFN- κ en queratinocitos cervicales humanos, y su expresión es reducida e indetectable en queratinocitos cervicales humanos VPH positivos (DeCarlo et al., 2010).

Complementariamente, se ha sugerido que los VPH de alto riesgo tienen como blanco al IFN- κ para evitar la expresión de proteínas como Sp100 o como IFIT-1, las cuales tienen efectos inhibitorios sobre E1 de VPH-16, -18 y -31, y puede afectar la oligomerización de E1, la unión al ADN o la propia actividad helicasa, provocando finalmente la inhibición de la replicación del ADN de VPH (Vladimer et al., 2014). En el año 2009, el Departamento de Mecanismos de

Transformación Viral de la Universidad de Heidelberg (Alemania), identificó por primera vez el mecanismo de regulación del IFN- κ en el contexto de la carcinogénesis inducida por VPH utilizando cultivos primarios de queratinocitos del prepucio humano (QPH) inmortalizados por la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, de manera individual o sumada, y células de carcinoma de cérvix (Rincon-Orozco et al., 2009). En presencia del oncogén E6 y en las líneas celulares de carcinoma de cérvix, el IFN- κ se encuentra regulado negativamente, contrario a lo encontrado en presencia del oncogén E7 en donde no hubo cambios en su expresión. Además, se evidenció mediante secuenciación por bisulfito que en las células que codifican el oncogén E6 de VPH-16 se induce la metilación de novo en una región que contiene islas de CpGs, adyacentes al sitio del inicio de la transcripción, inhibiendo así epigenéticamente la expresión de IFN- κ . Este tipo de inhibición pudo revertirse después de demetilar el ADN de las células positivas para E6, E6/E7 y líneas celulares de carcinoma cervical usando inhibidores de la enzima ADN metil-transferasa-1 (DMNT-1) o inhibiendo E6 usando ARN de interferencia, sugiriendo la participación directa de la oncoproteína E6 en el silenciamiento epigenético de IFN- κ .

En contraposición, la reexpresión de IFN- κ en células de carcinoma cervical es relevante a nivel funcional ya que reconstituyó la respuesta antiviral, aumentando el nivel de proteína p53, MxA y de los factores reguladores, proteínas indispensables en la respuesta inmediata y tardía mediada por IFN. Esto se revirtió en células positivas para E7 suprimiendo la expresión constitutiva tanto del IFN- κ como de p53 con ARN interferentes, encontrándose el efecto inverso en los niveles de estas proteínas. Todo esto, sugiere la existencia de un circuito de retroalimentación positiva entre IFN- κ , p53 y componentes de la vía de señalización del IFN- κ para mantener un estado basal antiviral. Al estimar la relevancia clínica de los datos in vitro en biopsias de pacientes con CCU en comparación con biopsias de tejido normal, se corroboró una

relación inversa entre la expresión del IFN- κ y la transcripción de VPH, revelando una estrategia novedosa sobre cómo los VPH-AR pueden eliminar la respuesta inmune innata en sus células hospederas.

Finalmente, se ha encontrado que los cambios en las vías metabólicas celulares se adaptan a las necesidades específicas de cada virus, una vez se altera la vía metabólica se van a favorecer diferencialmente algunas etapas del ciclo replicativo (Nardelli et al., 2002). En 1956, se descubrió que al adicionar glucosa y glutamina a un cultivo de células HeLa infectadas con poliovirus, aumentaba hasta en 40.000 veces la producción viral (Darnell & Eagle, 1958). Actualmente, se sabe que los virus modulan el flujo de fuentes de carbono y promueven el cambio hacia la glutaminólisis, la síntesis de ácidos grasos y la glucólisis aeróbica, también conocida como efecto Warburg (Prusinkiewicz & Mymryk, 2019), con el fin de producir energía, nucleótidos, aminoácidos y ácidos grasos necesarios para aumentar el ensamblaje, la propagación de partículas virales y el mantenimiento de infecciones latentes. Por ejemplo, estudios metabólicos han mostrado que, en la etapa transcripcional de genes tempranos, el virus Herpes Humano tipo 8 potencia la glucólisis, mientras que, si necesita traducir estos genes, promueve la glutaminólisis y si lo que requiere es producir viriones infecciosos, activa la síntesis de ácidos grasos (Nardelli et al., 2002). Particularmente, algunos ensayos de cultivo celular han demostrado que el 25-HC inhibe múltiples virus con envoltura, incluido el VPH 16. Dichas demostraciones resultaron de la búsqueda de factores celulares antivirales dirigidos a las vías de los esteroides, en donde se descubrió el antiviral ISG Colesterol-25-hidroxisilasa (CH25H) que codifica una enzima que convierte el colesterol en oxisterol soluble, 25-hidroxicolesterol (25-HC) (Raniga & Liang, 2018). CH25H se expresa de forma potente en macrófagos y células dendríticas en respuesta a la activación de receptores tipo toll (TLR), a través de la producción de IFN de tipo I y II. El 25-HC

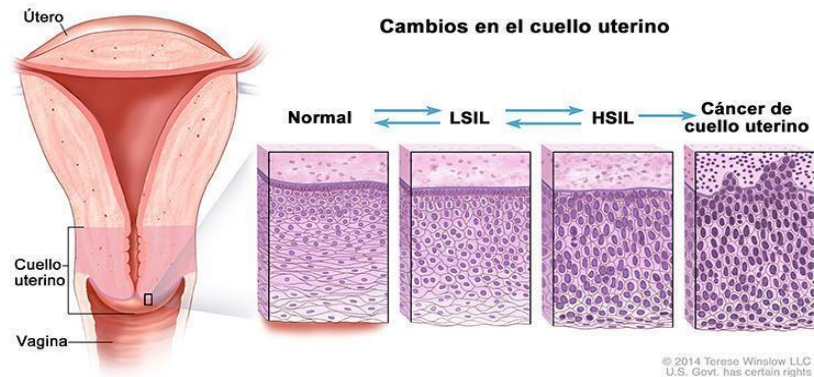
inducido por CH25H tiene un papel definido en la regulación de la biosíntesis de esteroides, reduciendo la acumulación de colesterol y ejecutando así sus funciones celulares antivirales; sin embargo, las funciones de este metabolito aún no se han dilucidado por completo (Liu et al., 2013). Por ende, es de gran relevancia continuar con estudios en el área de la metabolómica, para comprender las alteraciones virales del metabolismo celular que modulan la propagación del virus.

3. Marco teórico

3.1 Cáncer de cuello uterino

El cáncer, también conocido como neoplasia o tumor maligno, es un gran grupo de enfermedades que pueden comenzar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando las células anormales crecen de manera incontrolable, van más allá de sus límites habituales para invadir partes adyacentes del cuerpo y/o diseminarse a otros órganos (metástasis) (Cancer, 2019).

El cáncer de cuello uterino (CCU) es una neoplasia maligna asociada al Virus de Papiloma Humano (VPH) y es el tercer cáncer ginecológico más común y mortal. Se han identificado aproximadamente 15 tipos de VPH como oncogénicos, siendo los VPH 16 y 18 los más comunes y agresivos en el desarrollo del cáncer. Para que se desarrolle la tumorigénesis, una cepa de VPH oncogénica debe infectar constantemente el epitelio metaplásico de la zona de transformación del cuello uterino. Si el VPH no se elimina, las células epiteliales infectadas pueden transformarse e invadir la membrana basal para convertirse en carcinoma invasivo (figura 3). Este cáncer se disemina por extensión directa o por diseminación linfática o hematológica (Schwartz & Chuang, 2018).

Figura 3.*Cambios morfológicos de las células epiteliales del cuello uterino*

Nota: Estas imágenes muestran cómo las células de cuello uterino que tienen infecciones por el VPH de alto riesgo durante mucho tiempo pueden cambiar y volverse anormales. Las células de cuello uterino anormales pueden volver a la normalidad incluso sin tratamiento, especialmente en las mujeres jóvenes. Las LSIL y HSIL son dos tipos de cambios anormales en las células escamosas de cuello uterino. **Fuente:** Significado de los cambios en el cuello uterino: Guía para la salud de la mujer. (2019, 23 mayo). Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/significado-cambios-en-cuello-uterino>

Hay dos tipos histológicos principales de neoplasia, el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma, donde cada uno tiene lesiones precursoras asociadas. Para su detección se emplean análisis moleculares de VPH o la prueba citológica de Papanicolaou con espéculo, en la cual las células son examinadas al microscopio y se estudia su morfología en busca de anomalías (Schiffman & Solomon, 2013). El tratamiento puede involucrar cirugía, radioterapia, quimioterapia o una combinación de terapias, y depende del estadio de la enfermedad.

Teniendo en cuenta que el VPH es una infección de transmisión sexual, los factores de riesgo asociados al CCU, incluyen la aparición temprana de actividad sexual, mayor número de parejas sexuales de por vida, aumento de la paridad (3 nacimientos a término) y edad temprana en el primer parto (< 20 años). Dentro de los componentes para la prevención del cáncer de cérvix se encuentran, la vacunación contra el VPH (entre las edades de 9 y 26 años) y realizar pruebas

citológicas de detección cada 3 a 5 años (Cannistra & Niloff, 1996). Actualmente, hay tres vacunas profilácticas contra el VPH aprobadas por la FDA que se estima que tienen el potencial de prevenir el 70-90% de los cánceres asociados con el VPH (Serrano et al., 2017). Sin embargo, estas vacunas no son terapéuticas contra infecciones y lesiones preexistentes.

3.2 Virus de Papiloma Humano (VPH)

Los virus del papiloma humano (VPH) pertenecen a la familia Papovaviridae. Consisten en una cápside de 72 capsómeros que contiene el genoma viral (Pfister & Fuchs, 1994). Los capsómeros están formados por dos proteínas estructurales: la proteína L1 tardía de 57 kD, que representa el 80% de la partícula viral, y la proteína L2 de la cápside menor de 43 a 53 kD. Los VPH son relativamente estables y, debido a que no tienen envoltura, permanecen infecciosos en un ambiente húmedo durante meses (Stanley, 2012).

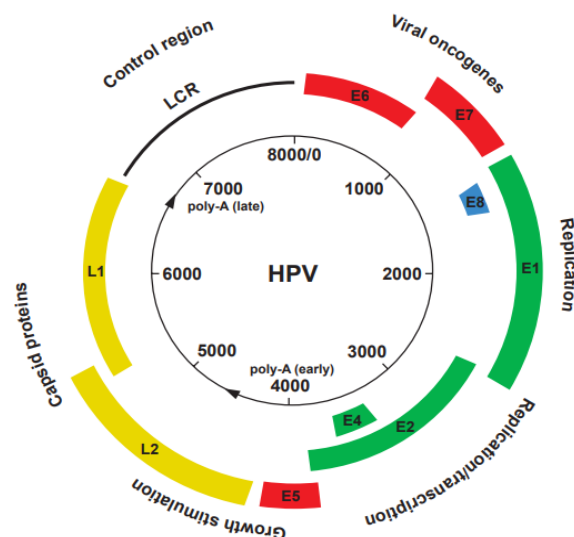
Los papilomavirus están muy extendidos entre los vertebrados superiores, pero exhiben una estricta especificidad de especie, y no se ha informado de transmisión desde primates a humanos. En general, provocan infecciones epiteliales locales, a excepción de los virus del fibropapiloma animal, donde la infección también se puede encontrar en la dermis. El VPH genital suele diseminarse a través de un contacto directo sostenido con la piel, y las formas más comunes (no las únicas) son el sexo vaginal y el sexo anal. Ocasionalmente, puede transmitirse de madre a bebé durante el embarazo.

Estudios recientes han demostrado que el ADN del VPH se puede encontrar en el 99,7% de todos los carcinomas de cuello uterino, siendo los tipos 16, 18, 45 y 31 del VPH los más frecuentes. Con base en estas observaciones, los VPH anogenitales se han dividido en dos grupos: el primero está asociado con un alto riesgo (HR) de desarrollo de cáncer de cuello uterino y se

encuentran los VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82; el segundo grupo corresponde a los VPH de bajo riesgo (LR), con un bajo potencial carcinogénico, y se hallan los VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 y 81 (Muñoz et al., 2003). El genoma del VPH consta de ocho kilopares de bases (Kbp) y es una molécula de ADN de doble hebra. La disposición relativa de los 8 a 10 marcos de lectura abiertos (ORF) dentro del genoma es la misma en todos los tipos de virus del papiloma, y una característica particular de los virus del papiloma es que los ORF que se superponen parcialmente están dispuestos en una sola hebra de ADN. El genoma se puede dividir en tres regiones, como se observa en la figura 4: la región de las proteínas tempranas (E1-E8), la región de proteínas tardías (L1 y L2), y la región de control larga (LCR) sin potencial de codificación, que es fundamental para la transcripción de los genes virales, el inicio de la replicación del ADN viral y la segregación del genoma viral en la mitosis (Prendiville et al., 2017).

Figura 4.

Organización del genoma de los virus del papiloma humano



Fuente: Prendiville, Department of Obstetrics and Gynaecology Walter. (2017). The Health Professional's HPV Handbook: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. CRC Press.

Los tamaños y funciones de las proteínas del virus del papiloma se muestran en la Tabla 1. E6 y E7 son las proteínas oncogénicas más importantes. Se encontró que la transcripción de los genes E6 y E7 siempre ocurría en los carcinomas de cuello uterino, y esta fue la primera indicación de un papel importante de estos genes en la tumorigénesis asociada al VPH. El potencial de immortalización y transformación de las proteínas E6 y E7 ha sido demostrado en numerosos experimentos, tanto en cultivo de tejidos como en modelos animales (Halbert et al., 1992).

Tabla 1.

Tamaño y función de las proteínas del virus del papiloma humano

Proteína viral / elemento genómico	Peso / Tamaño molecular	Función
Elementos no codificantes		
Región de control larga (LCR)	500 – 1000 bp	Origen de la replicación y regulación de la expresión del gen del VPH
Proteínas tempranas		
E1	68 – 85 kD	Función de la helicasa; esencial para la replicación viral y el control de la transcripción de genes. Regula a la baja los genes involucrados en la defensa antiviral
E2	48 kD	Factor de transcripción viral; esencial para la replicación viral y el control de la transcripción de genes; segregación y encapsulación del genoma
E3	Desconocido	Función desconocida; solo presente en algunos VPH
E1 [^] E4	10 – 44 kD	Unión a la proteína citoesquelética
E5	14 kD	Interacción con los receptores EGF / PDGF
E6	16 – 18 kD	Interacción con varias proteínas celulares; degradación de p53 y activación de telomerasa

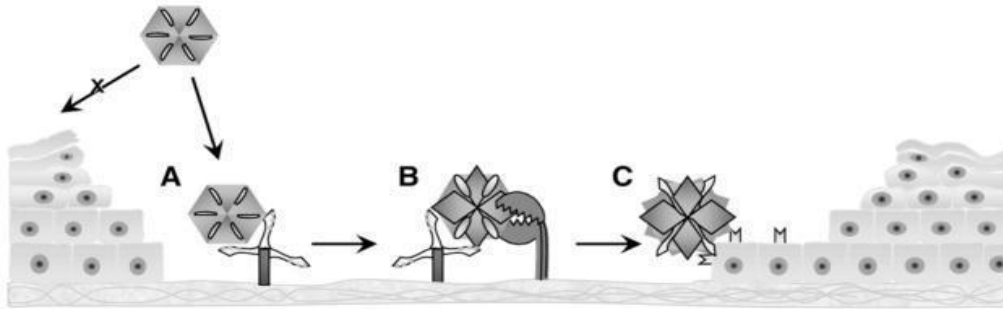
E7	10 kD	Interacción con varias proteínas celulares; interacción con pRB y transactivación de promotores dependientes de E2F
E8 [^] -E2C	20 kD	Proteína represora de transcripción y replicación a larga distancia
Proteínas tardías		
L1	57 kD	Proteína de la cápside principal
L2	43 – 53 kD	Proteína menor de la cápside

Adaptado de: Prendiville, Department of Obstetrics and Gynaecology Walter. (2017). The Health Professional's HPV Handbook: Human Papillomavirus and Cervical Cancer. CRC Press.

Para replicar su genoma, el VPH modula el ciclo celular, mientras despliega mecanismos para escapar de la respuesta inmune del huésped, la senescencia celular y la apoptosis. Como tal, la infección por VPH conduce directa e indirectamente a la inestabilidad genómica, lo que favorece aún más la transformación de los eventos genéticos y la progresión a malignidad (Prendiville et al., 2017). Los mecanismos que permiten la entrada desde el medio extracelular a la célula por endocitosis, involucran a las proteínas de la cápside L1 y L2 (figura 5). La proteína de la cápside principal L1 se une a proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) en segmentos de la membrana basal (BM) expuestos después de un trauma epitelial (microlesiones). Este enlace ocasiona un cambio conformacional que expone el extremo N de la proteína L2 a la escisión de furina. La proteólisis de L2 expone una superficie previamente ocluida de L1 que se une a un receptor de superficie celular (Schiller et al., 2010).

Figura 5.

Interacción de las proteínas de la cápside L1 y L2 para ingresar a la célula por endocitosis



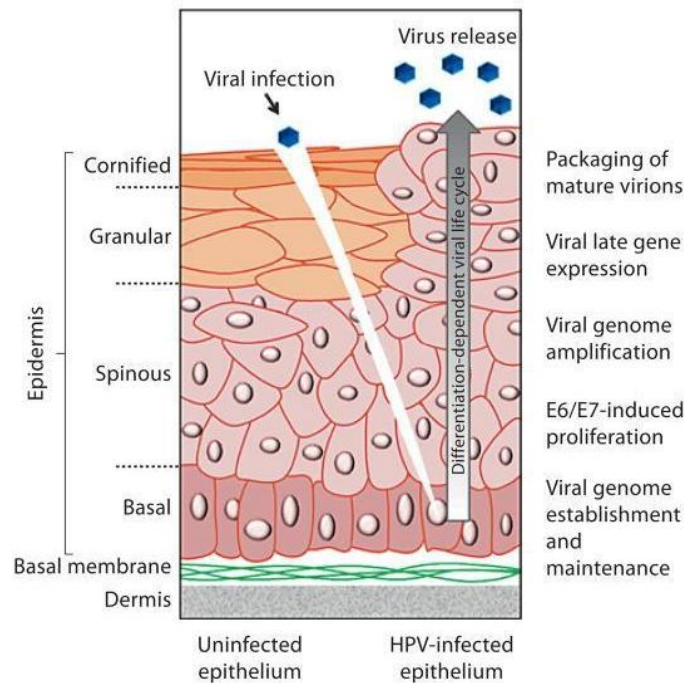
Nota: (A) El virión se une primero a las HSPG en la BM expuesta después de la rotura. (B) Esto induce un cambio conformacional que expone un sitio en L2 susceptible a la escisión de proproteína convertasa (furina). (C) Después de la escisión de L2, se expone un epítipo neutralizante de L2 y una región de L1 previamente no expuesta se une a un receptor secundario no identificado en el borde invasor de las células epiteliales. **Fuente:** (Schiller et al., 2010).

Luego, la translocación del ADN viral al núcleo involucra a la proteína de la cápside L2 y depende de su interacción con los microtúbulos (Spoden et al., 2008). A partir de entonces, el ciclo de vida viral está estrechamente acoplado al programa de diferenciación de los queratinocitos y se basa en varios factores celulares y proteínas virales. Las células epiteliales normales experimentan una diferenciación terminal a medida que migran hacia las capas superiores, una condición que no permitiría la replicación del VPH ya que el virus depende de la maquinaria de replicación del ADN del huésped para la replicación de su genoma. Para mantener activa la maquinaria de replicación celular, las proteínas virales E6 y E7 se expresan y desacoplan la detección y diferenciación del crecimiento celular (figura 6) principalmente a través de la inactivación de p53 y pRb.

En el centro de estos eventos está el hecho de que la inactivación de pRb por E7 obliga a las células infectadas a permanecer en un estado proliferativo y escapar de la salida del ciclo celular, mientras que la abrogación de p53 por E6 asegura la supervivencia celular al prevenir la apoptosis desencadenada por esta señal de crecimiento aberrante.

Figura 6.

Ciclo de replicación del VPH a medida que se diferencian los queratinocitos



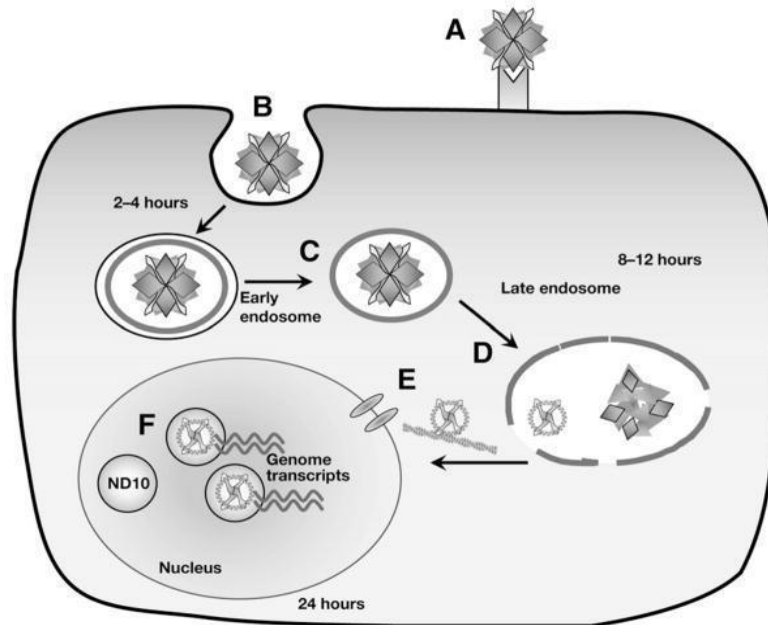
Nota: Representación esquemática del ciclo de replicación del VPH en el contexto de un epitelio diferenciador. En esta ilustración se representan secciones de epitelios normales no infectados (izquierda) e infectados por VPH (derecha). **Fuente:** (Schiller et al., 2010).

La replicación del genoma viral requiere la proteína iniciadora viral E1, que contiene una actividad helicasa-ATPasa, y la proteína viral multifuncional E2, que ayuda en el reclutamiento específico de E1 al ADN viral. E1 oligomeriza y ensambla como un doble hexámero en el origen viral de la replicación del ADN e interactúa funcionalmente con varios factores de replicación del hospedador, como la polimerasa α -primasa. E2 también funciona como un factor de transcripción, capaz de trans-activación y represión, y como mediador de la segregación del genoma, que es esencial para la persistencia viral. A medida que las células infectadas se diferencian, se induce la expresión génica tardía y la replicación del genoma viral. Los genes amplificados son luego empaquetados en viriones infecciosos por las proteínas L1 y L2, que forman las subunidades de la

cápside icosaédrica. Finalmente, la salida viral probablemente se produce por descamación natural del tejido y es facilitada por la capacidad de alteración de la queratina de E4 (Lehoux et al., 2009).

Figura 7.

Vía endocítica implicada en la internalización y el tráfico intracelular del virus



Nota: (A) Después de la unión inicial a las HSPG y la escisión de la furina, el virus se transfiere a un receptor no identificado en la superficie celular. (B) Luego, el virus ingresa a la célula a través de una vía endocítica y (C) en 4 h se localiza en el endosoma temprano. (D) A las 12 h, el virus se desdiseña dentro del endosoma tardío y se libera el genoma viral complejo con L2. (E) El complejo L2-genoma transita a través del citoplasma, quizás a través de los microtúbulos, y entra al núcleo a las 24 h. (F) Después de la entrada nuclear, el complejo co-localiza con ND10 y comienza la transcripción del ARN. **Fuente:** (Schiller et al., 2010).

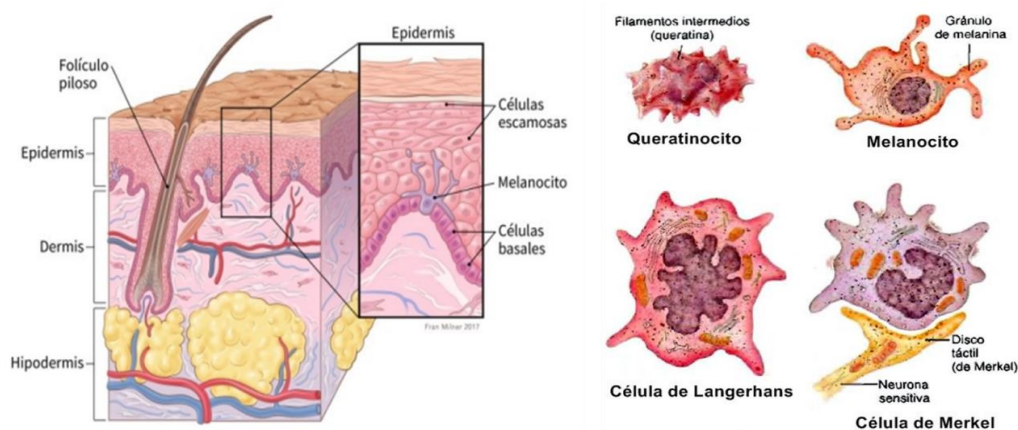
3.3 Queratinocitos

La piel ha evolucionado hasta convertirse en una barrera protectora resistente y flexible. Las capas externas de la epidermis, las capas cornificadas, están compuestas de placas duras y delgadas de material queratinoso, a veces denominadas escamas, que representan los restos de células individuales que se desprenden constantemente de la superficie. Debajo de las capas

cornificadas hay varios estratos suprabasales de células epidérmicas metabólicamente activas, pero reproductivamente muertas, que están estrechamente unidas entre sí, cuya capa inferior, la capa espinosa, tiene una intrincada membrana interdigitante con muchos desmosomas, que unen estas células a la capa más inferior, la , dentro de la cual ocurre la proliferación celular. Debajo de la epidermis, hay una dermis dura y elástica que contiene muchas fibras de colágeno y elastina. La piel proporciona una protección eficaz contra los daños causados por rayos ultravioleta, agentes patógenos y heridas menores y mayores. La gran pérdida constante de células de la superficie se compensa mediante la actividad de división celular en la capa basal (Potten, 2004). La epidermis está compuesta por muchos tipos de células, entre las que se destacan los queratinocitos, melanocitos y fibroblastos, como los más abundantes y funcionalmente importantes (figura 8).

Figura 8.

Composición, estructura y tipos celulares de la epidermis: Células de Merkel, melanocitos, células de Langerhans y queratinocitos.

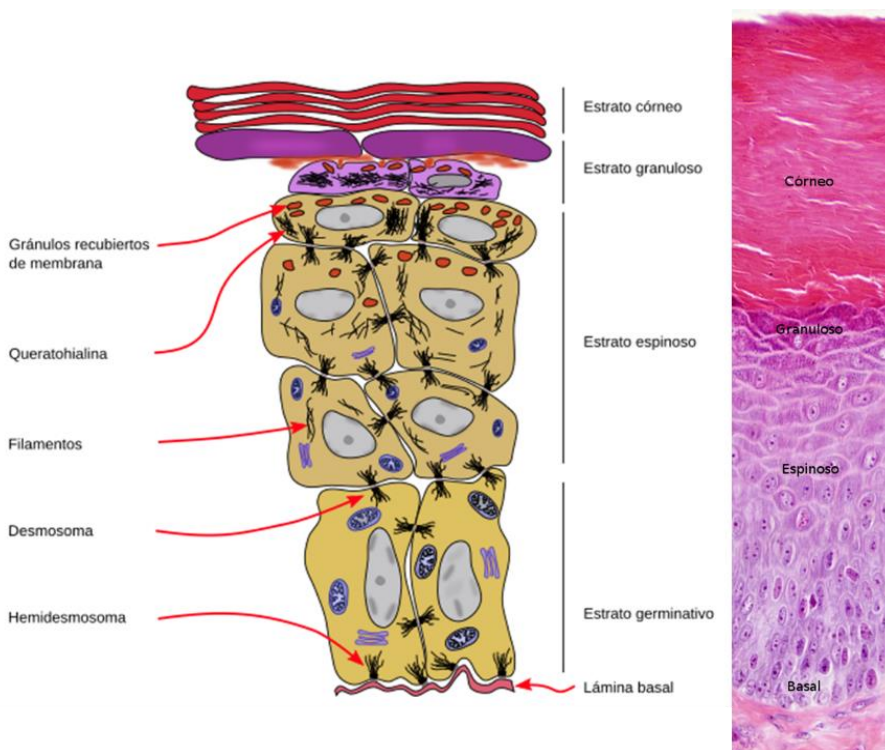


Fuente: ¿Qué es el cáncer de piel tipo melanoma? (s. f.). American Cancer Society. Recuperado 15 de noviembre de 2020, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-tipo-melanoma/acerca/que-es-melanoma.html>

En el desarrollo, los queratinocitos se originan a partir del ectodermo, formando capas cornificadas, que participan en la formación de estructuras como la epidermis, el cabello, las uñas y las glándulas sebáceas; en donde cumple la función de contener los fluidos corporales y brindar una protección de barrera contra el medio ambiente (Lee, 2015).

Figura 9.

Cambios morfológicos de los queratinocitos desde el estrato germinativo o basal hasta el córneo



Fuente: Megías, M. P. M. (s. f.). Tipos celulares. Queratinocito. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Atlas de histología vegetal y animal. <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/queratinocito.php>

Para mantener la homeostasis tisular, la progenie de las células madre epidérmicas debe elegir entre autorrenovarse o diferenciarse. En este proceso la metilación del ADN y la modificación de histonas juegan un papel importante, teniendo en cuenta que el inicio de la

diferenciación de queratinocitos implica la retirada del ciclo celular y el desprendimiento de la membrana basal. Las células progenitoras de queratinocitos de la capa basal proliferan y se mueven hacia arriba; lo que indica que el proceso de diferenciación comienza en las capas suprabasales y culmina en células muertas completamente diferenciadas en la superficie. Durante este transcurso que tarda 14 días, los queratinocitos muestran varios cambios morfológicos distintivos y se pueden dividir en varias capas estratificadas (figura 9), como capas basales, espinosas, granulares y cornificadas.

3.4 Interferón Kappa (IFN- κ)

Los interferones (IFN) son una familia de citocinas relacionadas funcionalmente que confieren una variedad de respuestas celulares que incluyen actividades antivirales, antiproliferativas, antitumorales e inmunomoduladoras (LaFleur et al., 2001). Estas citocinas se denominan interferones simplemente porque "interfieren" con la replicación de un virus. Su mecanismo de acción puede ser autocrino, influyendo directamente en las células infectadas, y también pueden afectar simultáneamente a las células vecinas no infectadas para crear un "estado antiviral" (Sedger, 2013). Para esto, los IFN inducen la expresión de genes que se activan transcripcionalmente como resultado de la señalización del receptor de IFN (IFN-R).

Dependiendo de las propiedades estructurales, funcionales y del receptor a través del cual señalizan intracelularmente, los interferones se clasifican como tipo I, tipo II o tipo III. Existen múltiples miembros de la clase de interferón de tipo I, que se divide en las subclases de IFN- α , IFN- β , IFN- ω e IFN- κ mientras que en la familia tipo II y tipo III solo existe un miembro que es el IFN- γ e IFN- λ , respectivamente. Los genes de IFN- α e IFN- ω son expresados

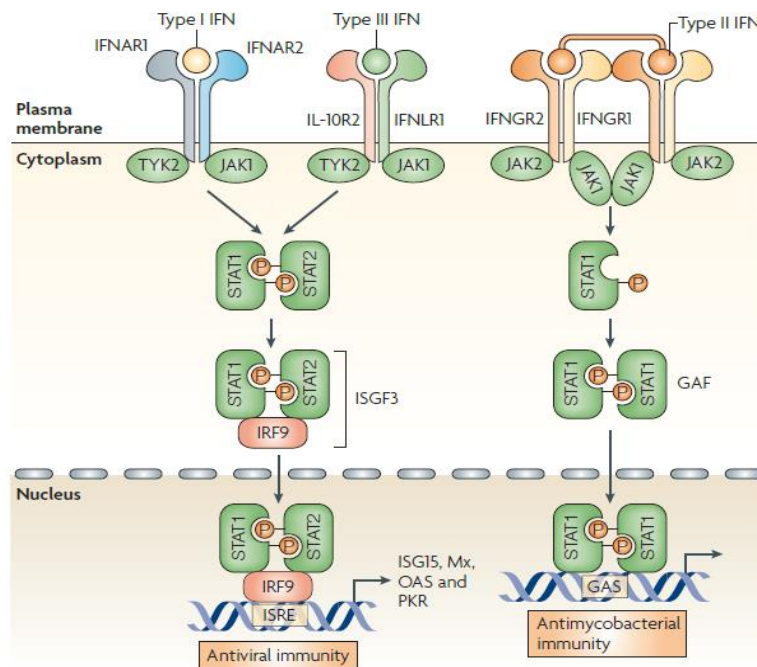
predominantemente por leucocitos, los IFN- β por fibroblastos, los IFN- κ por queratinocitos y los IFN- γ por linfocitos T y células asesinas naturales (Pindel et al., 2011).

La acción de los interferones está mediada por tres complejos de receptores: el complejo receptor IFNAR1 - IFNAR2 se une a los IFN de tipo I; el IL-10R2 - IFNLR1 se asocia a los IFN tipo III, y el tetrámero IFNGR2 - IFNGR1 se une a los IFN tipo II, como se observa en la figura 10 (Pindel & Sadler, 2011). Las respuestas de IFN tipo I y tipo III se inician en su mayor parte por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), principalmente ácidos nucleicos virales, por receptores de reconocimiento de patrones múltiples (PRR) (Moody, 2022). Estos PRR incluyen receptores tipo toll (TLR), receptores tipo RIG-I (RLR) (inducible por ácido retinoico), MDA5 (asociado a la diferenciación de melanoma), cGAS (guanosina monofosfato cíclico-adenosina monofosfato sintasa) e IFI16 (proteína 16 inducible por interferón gamma). Los TLR son proteínas transmembrana que atraviesan el plasma o la membrana endosomal y envían señales a través de diferentes conjuntos de proteínas adaptadoras (Fitzgerald & Kagan, 2020). Los TLR endosómicos reconocen ácidos nucleicos, que pueden ser ARN monocatenario, ARN bicatenario o ADN. RIG-I y MDA5 reconocen distintas formas de ARN en el citosol, pero usan el adaptador común MAVS (proteína de señalización antiviral mitocondrial) para la señalización (Kato et al., 2008). cGAS es un sensor de ADN que se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo, donde está atado y se mantiene inactivo por la cromatina. Cuando se une a ADN de doble cadena, cGAS cataliza adenosina 5'-trifosfato y guanosina 5'-trifosfato en GMP-AMP cíclico (2'3'cGAMP). cGAMP se une y activa el adaptador STING (estimulador de genes de interferón), que se localiza en la membrana del retículo endoplásmico (Ablasser et al., 2013). IFI16 es un sensor de ADN que reside tanto en el núcleo como en el citoplasma y también puede usar STING como adaptador (Unterholzner et al., 2010).

A pesar de reconocer distintos PAMP, las vías cGAS-STING y RLR-MAVS convergen en la activación de la quinasa 1 de unión a TANK (TBK1), que fosforila y activa los factores de transcripción IRF-3/IRF-7 para inducir la expresión de IFN tipo I y tipo III. Luego, los IFN se secretan desde la célula, donde pueden unirse de manera autocrina o paracrina a sus receptores afines (McNab et al., 2015). La unión del receptor/IFN estimula la cascada de señalización JAK (Janus kinase)/STAT (transductor de señal y activador de la transcripción), lo que resulta en la expresión de cientos de genes estimulados por IFN (ISG) que promueven la eliminación de patógenos (Moody, 2022).

Figura 10.

Mecanismo de señalización celular inducidos por los interferones tipo I, II y III



Fuente: Pindel, A., & Sadler, A. (2011). The Role of Protein Kinase R in the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), 59-70. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0099>

Después de la unión de los IFN, la transducción de señales es iniciada por la fosforilación de las enzimas tirosina quinasas asociadas, JAK1 y TYK2, que a la vez conducen al reclutamiento y fosforilación de los transductores de señales y activadores de la transcripción, STAT1 y STAT2. Estos heterodímeros STAT1 y STAT2 se pueden asociar entre sí para formar el factor de activación GAF, o se pueden enlazar con el factor regulador de IRF9 para formar el complejo ISGF3. La señalización de IFN culmina cuando los factores de transcripción GAF o ISGF3 activan los sitios promotores GAS o ISRE, respectivamente; que se encuentran corriente arriba de los genes inducibles por interferón, desencadenando la modulación de una amplia gama de respuestas celulares que incluyen la actividad antiviral (Li et al., 2020).

Particularmente, el interferón kappa tipo I (IFN- κ), consta de 207 aminoácidos, incluido un péptido señal de 27 aminoácidos y una serie de cisteínas conservadas, característica de los interferones tipo I. El gen que codifica el IFN- κ se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9 y se expresa selectivamente en los queratinocitos epidérmicos para amortiguar una respuesta inmunitaria innata, impulsando los niveles basales de expresión de ISG. La expresión de IFN- κ aumenta significativamente en los queratinocitos tras la infección viral, tras la exposición a ARN bicatenario o tras el tratamiento con IFN- γ o IFN- β (LaFleur et al., 2001). A diferencia del IFN- α/β y el IFN- λ tipo III, el IFN- κ es mínimamente inducido por la señalización de PRR y actúa principalmente de forma autocrina para estimular la señalización de JAK/STAT y la producción de ISG. Varios estudios han demostrado que la expresión de IFN- κ se suprime en queratinocitos que contienen episomas de VPH 18, 16 o 31 de alto riesgo, así como en tejido de biopsia positivo para VPH y líneas celulares de cáncer de cuello uterino que contienen genomas virales integrados (Reiser et al., 2011). La expresión heteróloga de IFN- κ en queratinocitos VPH positivos induce un estado antiviral, con reexpresión de numerosos PRR, IRF e ISG, incluidos STAT1 e IFIT1, que

han demostrado bloquear la replicación del VPH. Además, la expresión ectópica de IFN- κ conduce a un aumento de Sp100, que se localiza en las fábricas de replicación de HPV16 y HPV31 en los queratinocitos y reprime la expresión y replicación del gen HPV31 (Habiger et al., 2016).

3.5 Métodos de transferencia de material genético a la célula

La transfección es el proceso de insertar material genético, como ADN y ARN bicatenario, en células de mamíferos. La inserción de ADN permite la expresión o producción de proteínas utilizando la propia maquinaria de las células. Mientras que la inserción de ARN bicatenario se utiliza para detener la producción de una proteína específica deteniendo la traducción. Esta poderosa herramienta ha permitido a los investigadores estudiar mejor la función y expresión de los genes, la función de las proteínas y las mutaciones genéticas (An Introduction to Transfection | Protocol, s. f.).

Se han descrito múltiples métodos para la transfección de células de mamíferos; estos pueden subdividirse en métodos biológicos, químicos y físicos (tabla 2), y también en aquellos métodos que generan transfección transitoria o transfección estable (Sheikh et al., 2017). La elección del método depende del objetivo del experimento, pero en general el método de transfección ideal debería ser altamente reproducible y debería dar como resultado una alta eficiencia de transfección con una toxicidad celular mínima y sin alteraciones fisiológicas importantes en las células transfectadas.

La transfección transitoria puede usarse para investigar el impacto a corto plazo de la expresión alterada de genes o proteínas. El material genético transfectado de forma transitoria no se integra en el genoma del huésped y, por lo tanto, el efecto sobre la expresión del gen diana está limitado en el tiempo y se pierde durante la división celular en curso. Se ha demostrado que el

ADN introducido en las células de esta manera se encuentra en el núcleo y su impacto en la actividad de los genes transcripcionales suele medirse tan pronto como 24 horas después de la transfección (a veces antes) y la mayoría de los protocolos especifican entre 48 y 96 horas para un efecto óptimo. Por otro lado, el ARN transfectado generalmente se encuentra en el citoplasma con sus efectos diana óptimos medibles durante 24-72 horas después de la transfección (Geisse & Voedisch, 2012).

Tabla 2.*Métodos de transfección celular*

Tipo	Método	Ventajas	Desventajas
Química	Polímero catiónico		X Eficiencia variable.
	Lípido catiónico	✓ Fácil de usar. ✓ Relativamente económico.	X Toxicidad celular por algunos químicos. X Puede ser difícil en células pequeñas y no adherentes.
	Fosfato de calcio		
Física	Inyección directa	✓ Se usan para células difíciles de transfectar.	X Puede causar una toxicidad significativa a las células.
	Entrega de partículas biolísticas	✓ Permite la transfección de una sola célula	X Requiere equipo especializado y habilidad del operador.
	Electroporación	✓ Ayuda a la inserción precisa en el compartimento subcelular.	
	Laserfección		
Biológica	Mediada por virus	✓ Alta eficiencia de transfección. ✓ Puede usarse para células difíciles de transfectar.	X Requiere laboratorio de bioseguridad. X Riesgo de mutagénesis insercional. X Límite de tamaño de inserto de ADN.

Adaptado de: Sheikh, S., Coutts, A. S., & La Thangue, N. B. (2017). Transfection. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 191-209. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803077-6.00011-4>

Por el contrario, una transfección estable es aquella en la que el ADN transfectado se integra en el ADN cromosómico de la célula huésped o se mantiene en forma episomal. Un marcador de selección, como por ejemplo un gen de resistencia a antibióticos, puede utilizarse para seleccionar aquellas células que han integrado el material genético de interés y generar una línea celular que exprese permanentemente ese gen (Sheikh et al., 2017). Cuando un gen que codifica la resistencia a un antibiótico en particular se incorpora a un plásmido con fines de transfección (en ciertas transfecciones estables), este gen permite que las células crezcan en presencia de un antibiótico en particular (por ejemplo, kanamicina) solo cuando las células expresan el plásmido que contiene el ADN transfectado. De esta manera, las células pueden "seleccionarse" creciendo en presencia del antibiótico a una concentración que normalmente las mataría.

Aunque la transfección como técnica se ha utilizado principalmente para estudiar la función de un gen o producto génico en particular mejorando o inhibiendo su expresión, la mejora constante del método también ha hecho posible investigar la función de múltiples genes dentro de una célula simultáneamente y ha permitido la producción a gran escala de proteínas recombinantes. Otras áreas de aplicación incluyen su uso en terapia génica donde un gen de interés puede administrarse a células particulares en un intento de regular el fenotipo de una enfermedad e inducir la generación de células madre pluripotentes transfectando varios factores de transcripción diferentes (Yumura et al., 1995).

3.6 Metabolómica

La metabolómica se define como el estudio sistemático de metabolitos en un sistema biológico (Blow, 2008). Los metabolitos son pequeñas moléculas orgánicas (50 a 1500 Daltons)

que se caracterizan por una gran diversidad fisicoquímica en sus estructuras moleculares, entre las que se incluyen, una amplia gama de polaridades, pesos moleculares, grupos funcionales y reactividad química. Los metabolitos, tales como carbohidratos, ácidos grasos, lípidos, aminoácidos, nucleótidos, entre otros; cambian químicamente durante las reacciones metabólicas y son necesarios para el correcto crecimiento, mantenimiento y función de las células (Dettmer et al., 2007; Haggarty & Burgess, 2017). A diferencia de los genes y las proteínas, cuyas funciones están sujetas a regulación epigenética y modificaciones postraduccionales; los metabolitos cambian como resultado directo de actividad bioquímica (Patti et al., 2012). Por lo tanto, la correlación de las concentraciones de los metabolitos con la actividad metabólica proporciona una idea del fenotipo y sus cambios asociados como resultado de la respuesta celular a estímulos genéticos o ambientales (Fiehn, 2002).

El metaboloma se define como la suma de todos los metabolitos administrados en un sistema biológico en condiciones fisiológicas particulares y se puede dividir en el exometaboloma (metabolitos fuera de la célula) y el endometaboloma (metabolitos intracelulares) (Witting, 2013). El análisis del metaboloma es posible realizarlo mediante dos enfoques, el primero mediante metabolómica global o no dirigida, la cual tiene como objetivo proporcionar una visión imparcial del metaboloma a través de la detección y cuantificación de tantos metabolitos como sea posible dentro de una muestra biológica dada (Witting, 2013); y el segundo mediante metabolómica dirigida, cuyo objetivo es detectar y cuantificar un grupo predefinido de compuestos implicados en rutas metabólicas específicas (Roberts et al., 2012). Las características principales de estos dos enfoques metabólicos se resumen en la tabla que se muestra a continuación:

Tabla 3.*Clasificación metabolómica de acuerdo al enfoque experimental*

Metabolómica con enfoque no dirigido	Metabolómica con enfoque dirigido
Determina tantos metabolitos como sea posible de forma cualitativa, para proporcionar una visión imparcial del metaboloma. Además, usa una cuantificación relativa por comparación entre muestras.	Estudia un grupo predefinido de metabolitos seleccionados para su cuantificación absoluta (nM o mg/mL) y representan compuestos químicamente caracterizados de rutas metabólicas.
Los análisis son intensivos en datos y trabajo, en su mayoría generan hipótesis durante el análisis, que deberán ser probadas posteriormente.	Los compuestos analizados son definidos químicamente, por lo tanto, los métodos de preparación de muestra para su extracción y purificación pueden ser optimizados.
Se pretende identificar las alteraciones metabólicas y patrones que se correlacionan con un estado fisiológico particular.	Busca detectar compuestos conocidos relacionados con vías específicas definidas a priori, con base en las hipótesis del estudio.

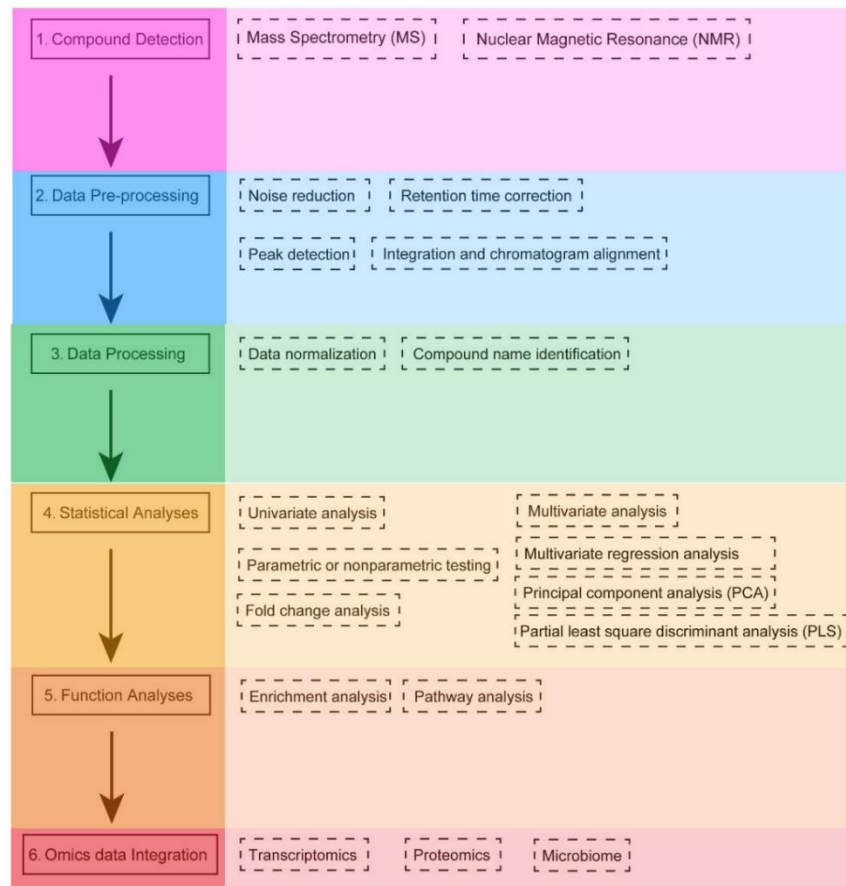
Adaptado de: Manchester, M., & Anand, A. (2017). Metabolomics. *Advances in Virus Research*, 57-81. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.02.001>

El análisis del metaboloma implica varios pasos (figura 11). El estudio comienza con un diseño experimental que consta de dos pasos principales (Pereira Braga & Adamec, 2019). El primer paso es definir el problema biológico, generando las hipótesis del estudio. Con base a eso, el segundo paso involucra varios pasos específicos y enfoques metabolómicos que incluyen preparación y análisis de muestras, adquisición de datos, procesamiento previo de la información adquirida y análisis e interpretación estadísticos de los resultados.

Las características específicas de los datos de metabolómica requieren la aplicación de diferentes herramientas bioinformáticas siguiendo un flujo de trabajo específico. El primer paso en el flujo de trabajo de metabolómica implica el uso de diferentes técnicas para aislar y caracterizar diferentes grupos de metabolitos.

Figura 11.

Flujo de trabajo de análisis del metaboloma



Fuente: Chen, Y., Li, E., & Xu, L. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4), 357. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>

Hay dos técnicas principales de análisis metabolómico: espectrometría de masas (MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) (Chen et al., 2022). La metabolómica

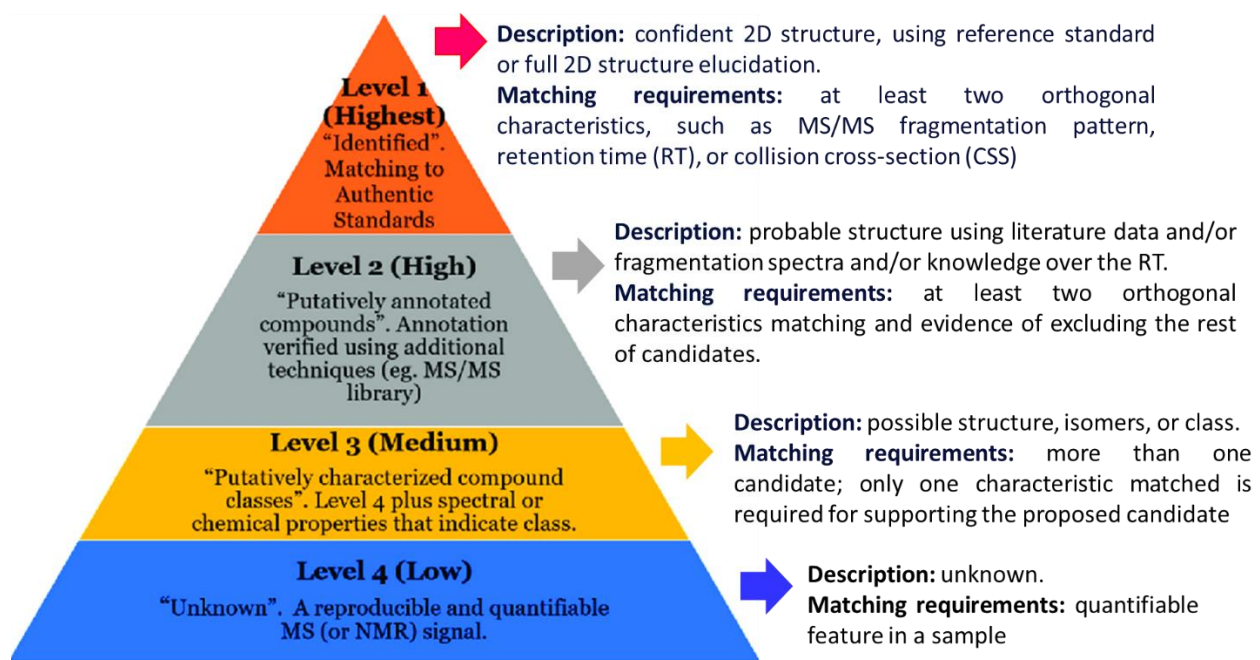
basada en MS generalmente está precedida por un paso de separación cromatográfica, que reduce la complejidad de la muestra biológica y permite el análisis de MS de diferentes conjuntos de moléculas en diferentes momentos (Beisken et al., 2015). Al mismo tiempo, MS tiene un ciclo de análisis corto (con un tiempo de análisis que oscila entre 5 y 140 min) y permite análisis cualitativos y cuantitativos selectivos; por lo tanto, esta técnica es la más utilizada. Con MS se adquieren datos espectrales en forma de una relación masa-carga (m/z) y una intensidad relativa del compuesto ionizado, permitiendo la detección de compuestos moderadamente polares y sustancias con alta polaridad, en términos de tipos específicos de sustancias, como ácidos grasos, alcoholes, fenoles, vitaminas, ácidos orgánicos, poliaminas, nucleótidos, polifenoles, terpenos, flavonoides, lípidos y entre otros (Theodoridis et al., 2011).

El segundo paso es el preprocesamiento de señales crudas (cromatogramas y espectros) mediante un software específico para el análisis cuantitativo de compuestos (por ejemplo, XCMS). En general, este paso incluye la reducción de ruido, la corrección del tiempo de retención, la detección e integración de picos y la alineación cromatográfica (Smith et al., 2006). En el tercer paso, se realiza el procesamiento de datos y es necesario un control de calidad (QC) para determinar la variación de las características de los metabolitos (si la varianza de una característica es demasiado alta, se eliminará del análisis), y para equilibrar el sesgo de la plataforma analítica y corregir el ruido en la señal (Mattoli et al., 2022). Luego, la normalización de datos se usa para reducir el sesgo sistemático o la variación técnica y para evitar la identificación errónea debido a la entrada no pareada de grandes cantidades de datos de metabolómica. Posteriormente, los datos de picos de espectrometría de masas se utilizan para la identificación de compuestos comparándolos con bases de datos públicas para la identificación de compuestos (por ejemplo, Ceu Mass Mediator) y/o con datos estándar auténticos (normalmente a través de una biblioteca

interna). En este paso se deben conocer los criterios para informar la anotación e identificación de metabolitos de acuerdo con La Metabolomics Standards Initiative (MSI) (Salek et al., 2013). MSI propone cuatro niveles diferentes de identificación de metabolitos observados en la literatura científica: metabolitos identificados (nivel 1), compuestos presuntamente anotados (nivel 2), clases de compuestos presuntamente caracterizados (nivel 3) y compuestos desconocidos (nivel 4) (figura 12).

Figura 12.

Niveles de confianza de identificación de metabolitos



Adaptado de: Reisdorph, N., Walmsley, S. J., & Reisdorph, R. (2019). A Perspective and Framework for Developing Sample Type Specific Databases for LC/MS-Based Clinical Metabolomics. *Metabolites*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.3390/metabo10010008>

El cuarto paso corresponde a análisis estadísticos de los datos con enfoques univariados y multivariados. Los métodos estadísticos tradicionales determinan las relaciones entre variables

basándose únicamente en criterios matemáticos, sin tener en cuenta las correlaciones biológicas, por lo que se recomienda el uso combinado de múltiples técnicas estadísticas al realizar análisis metabolómicos (Sugimoto et al., 2012). Los análisis multivariados utilizan los promedios ponderados para resumir las variables originales en menos variables y son útiles para el análisis exploratorio de datos. Dentro de este enfoque se encuentran el análisis de varianza múltiple (ANOVA), análisis de regresión múltiple, análisis factorial, análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS), análisis de conglomerados y aprendizaje automático. Por otra parte los análisis univariados proporcionan una visión general preliminar de las características representativas entre dos grupos de muestras, por medio de análisis de cambio de pliegue (fold change), pruebas t y gráficos de volcanes (Volcano plot). En este contexto, se debe determinar un umbral confiable para el valor de p, para clasificar los metabolitos expresados significativamente.

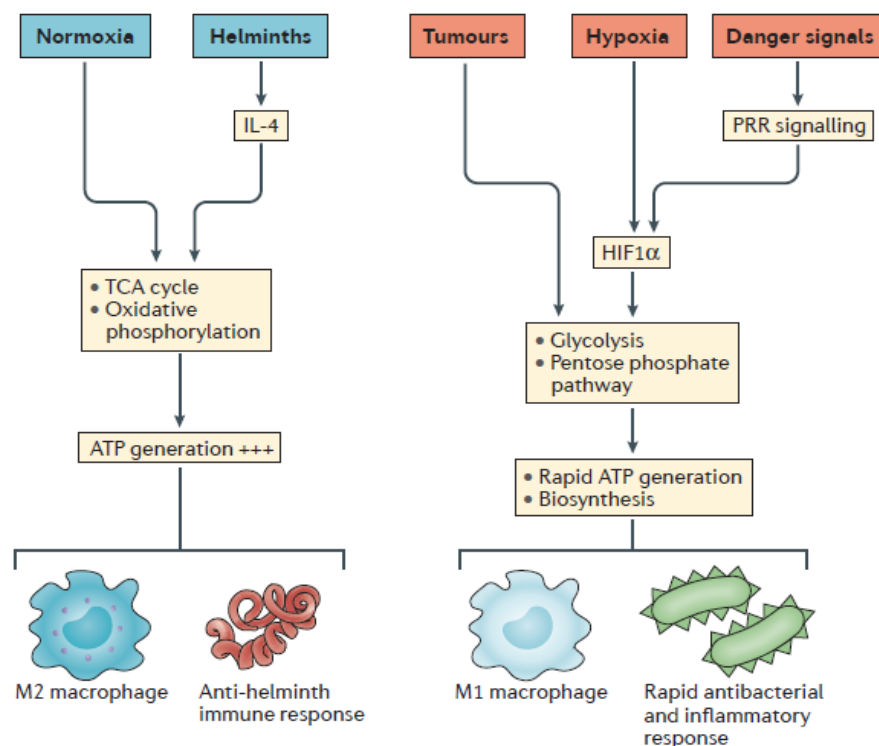
En el último paso, los metabolitos seleccionados se vinculan a su contexto biológico mediante análisis de enriquecimiento. El objetivo del análisis de enriquecimiento es explorar el perfil de metabolitos funcionalmente relevantes para determinar el vínculo entre los cambios de la expresión de metabolitos, el contexto biológico y las vías biológicas que tienen un impacto significativo en un proceso biológico específico de estudio (Chong et al., 2018). Los análisis de rutas y enriquecimiento se realizan utilizando herramientas de software especializadas (por ejemplo, Metaboanalyst) que asignan metabolitos a rutas bioquímicas conocidas basadas en información en bases de datos públicas como KEGG.

Finalmente, la metabolómica tiene el potencial de identificar moléculas que podrían contribuir a la comprensión de la patogénesis de enfermedades, así como nuevos biomarcadores, que otros enfoques de alto rendimiento como la transcriptómica y la proteómica pueden pasar por

alto. Por tanto, tiene la ventaja de identificar vías nuevas e imprevistas implicadas en la infección viral, la patogénesis y la respuesta fisiológica a las estrategias antivirales (O'Neill et al., 2016). Las vías metabólicas también se han implicado recientemente en la dirección de las respuestas inmunitarias en general, lo que puede tener un amplio impacto en la patogénesis viral. Por ejemplo, se ha demostrado que los intermediarios del ciclo del TCA influyen en la producción de citoquinas proinflamatorias en las células dendríticas (figura 13), considerando que estos metabolitos liberados de las células dañadas podrían actuar como señales de peligro en el sistema inmunológico para promover respuestas rápidas a los patógenos (O'Neill et al., 2016).

Figura 13.

Reprogramación metabólica por parte del sistema inmunológico



Fuente: O'Neill, L. A. J., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 553-565. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.70>

Además, se ha reportado que las citoquinas interfieren en el metabolismo energético de las células (teniendo en cuenta que los IFN de tipo I promueven la glucólisis) junto con la síntesis de ácidos grasos y colesterol, quienes actúan como promotores de generación de membranas (Hedl et al., 2016) y precursores de metabolitos como oxisteroles (productos de oxidación del colesterol), los cuales se unen a receptores acoplados a proteínas que regulan la migración de las células inmunitarias (Hannedouche et al., 2011). Por otra parte, los virus son incapaces de metabolizarse por sí mismos, por lo que dependen completamente del metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos del hospedador. Por ejemplo, muchos virus inducen cambios en el retículo endoplásmico de la célula huésped, que es el orgánulo en donde se traducen proteínas secretoras y de membrana, para afectar la fluidez de la membrana celular; y con ello favorecer su entrada, replicación y ensamblaje (Yu Y et al., 2011). En este sentido se observa que existe una relación mutua entre replicación viral, metabolismo y defensa del huésped, comprobando la importancia de realizar estudios metabólicos que permitan construir las rutas metabólicas implicadas y su función en procesos inmunológicos (Fritsch, 2016).

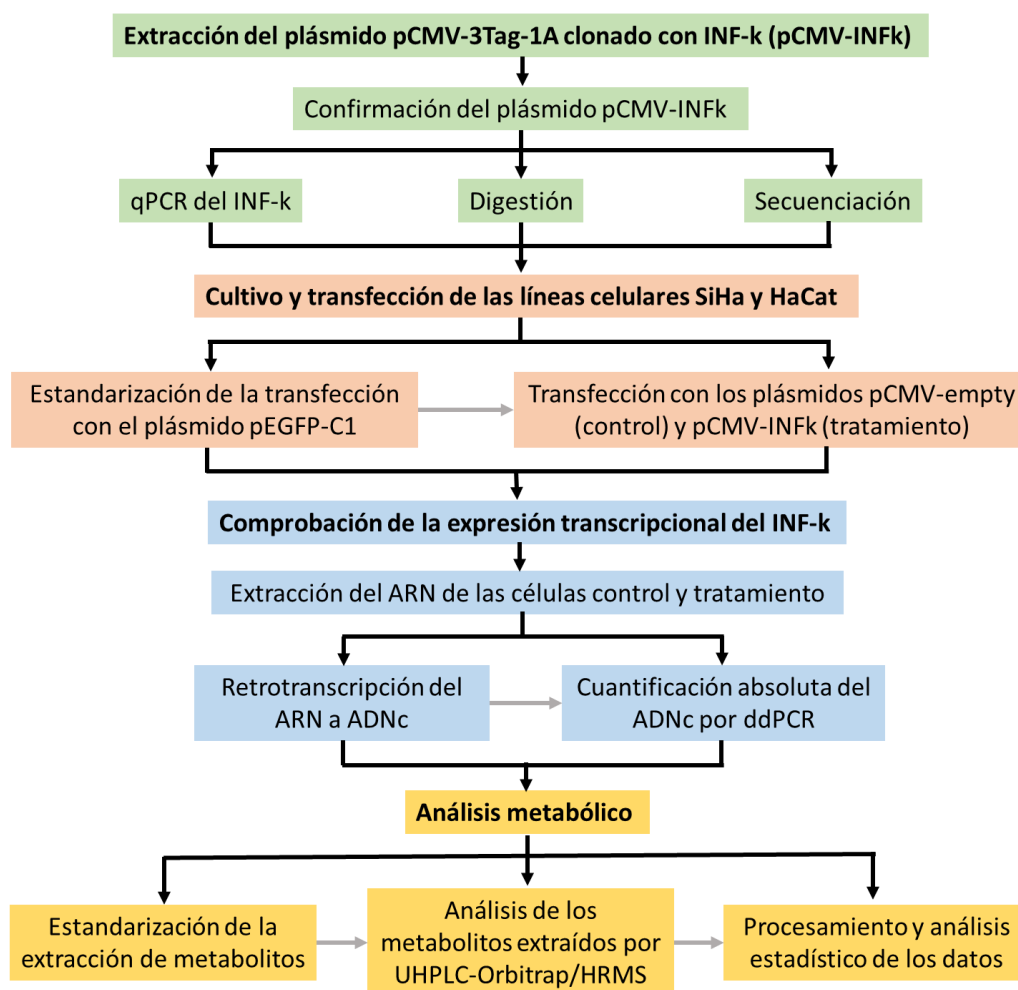
4. Metodología

Para llevar a cabo la parte experimental y el análisis de los resultados, se realizó la siguiente ruta metodológica: 1) Extracción del plásmido pCMV-3Tag-1A con IFN-*k* de las bacterias *E. coli* competentes One Shot™ Stbl3™; 2) cultivo y transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat; 3) comprobación de la reexpresión del IFN-*k* por ddPCR; 4) estandarización del método de extracción de metabolitos (preparación de la muestra); 5) análisis de las muestras por UHPLC-

Orbitrap/HRMS y 6) procesamiento y análisis estadístico de los datos con enfoque metabolómico no dirigido. Esta ruta metodológica se puede observar de manera general en la figura 14.

Figura 14.

Diagrama general de la metodología desarrollada en el proyecto de investigación



4.1 Extracción del plásmido pCMV-3Tag-1A clonado con IFN-*k* (pCMV-IFNk)

El plásmido pCMV-3Tag-1A (Stratagene) fue clonado con el gen de 624 bp que codifica para IFN-*k* humano (Genbank NM_020124) en investigaciones realizadas anteriormente por el Dr. Bladimiro Rincón (Rincon-Orozco et al., 2009). Este plásmido se amplificó transformando por

choque térmico bacterias *E. coli* quimiocompetentes One Shot™ Stbl3™ (ThermoFisher C737303), por Ms. Brigitte Peña, en el Laboratorio de Genética Molecular Enfermedades Infecciosas y Cáncer (GEMEICA). Posteriormente, el plásmido pCMV-IFN k , fue extraído y purificado a partir de 2 mL de suspensión bacteriana por la técnica de lisis alcalina, Miniprep, utilizando el kit Invisorb Spin Plasmid Mini Two de Invitex molecular (Berlín, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente, se añadieron los 2 mL de la suspensión bacteriana en un Eppendorf, se centrifugó a 12000 xg durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Luego las bacterias del pellet se lisaron con la solución A (que contiene el detergente SDS) haciendo vortex; se desnaturalizó el ARN con la solución B (que contiene ARNasa) mezclando por inversión; y se separó el ADN plasmídico de los restos celulares con la solución C (que contiene acetato de potasio) mezclando por inversión y centrifugando a 14000 xg durante 5 min. Enseguida se purificó el ADN plasmídico adicionando el sobrenadante sobre una columna Invisorb spin (que tiene afinidad por el ADN) y centrifugando a 11000 xg durante 1 min. Luego se agregó la solución de lavado (que contiene etanol) sobre la columna, se centrifugó a 11000 xg durante 1 min, se descartó el filtrado y se centrifugó una segunda vez a 11000 xg durante 3 min (para descartar el etanol residual). Después, en un nuevo eppendorf se eluyó el ADN plasmídico añadiendo agua grado de biología molecular sobre la columna y centrifugando a 11000 xg durante 1 min.

Finalmente, se cuantificó la concentración de ADN plasmídico (obteniendo 20 a 25 ug por cada extracción) y los radios de absorbancia entre 260/280 y 260/230 en el espectrofotómetro QFX Fluorometer de DeNovix (Wilmington, USA). Se realizaron 8 extracciones con Miniprep con el fin obtener la concentración necesaria de plásmido para toda la investigación (146 ug).

4.1.1 Confirmación del plásmido pCMV-IFN*k* extraído con Miniprep

La confirmación del plásmido extraído se realizó a 4 muestras por medio de digestión enzimática, amplificación del IFN-*k* con PCR y secuenciación del gen.

4.1.1.1 Digestión enzimática. Se realizó una digestión del plásmido pCMV-IFN*k* con las enzimas de restricción BamHI-HF y BsaI-HF de New England Biolabs (Massachusetts, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante durante 20 minutos a 37 °C. Luego se realizó una electroforesis utilizando un sistema horizontal Mini-Sub® Cell GT y la fuente de alimentación básica PowerPac de Bio-Rad (California, USA). Se corrieron 25 uL de los productos de la digestión en un gel con concentración de agarosa al 1,0%, a 80 voltios de potencia durante 1 hora. Se utilizó el patrón de peso molecular de 1 kb de Promega (Madison, WI USA) y para comprobar la integridad y pureza del ADN plasmídico también se corrió el plásmido sin digerir. Se tiñó el gel con HydraGreen de ACTGene (Nueva Jersey, USA) y se visualizó el ADN en el sistema de imágenes iBright CL1500 de Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA).

4.1.1.2 Amplificación del IFN-*k*. Se utilizó la GoTaq® Green Master Mix de Promega (Wisconsin, USA) para realizar la amplificación de un fragmento de 621 pares de bases del gen de IFN*k*. La mezcla para la PCR tuvo un volumen final de 25 µl como se muestra en la tabla 4. Las concentraciones de ADN oscilaron entre 50 a 250 ng, y se diseñaron los cebadores IFN*k*-Forward: 5'-ATGAGCACCAAACCTGATATGAT-3' e IFN*k*-Reverse: 5'-TTTCCTCCTGAATAGAGC TGT-3'. Se utilizó el termociclador T100 de Bio-Rad (California, USA), siguiendo el programa de amplificación descrito en la tabla 5.

Tabla 4.*Componentes de la reacción de amplificación por PCR*

Componente PCR	Concentración	Volumen
Cebadores 10 uM	1 uM	2,0 uL
ADN	50 - 250 ng	3 uL
Agua (Biología molecular)	-	7,5 uL
Master Mix GoTaq Green 2X		
DNTPs	0,2 mM	12,5 uL
Taq polimerasa	5 u	
MgCl₂	1,5 mM	
Volumen final		25 uL

Tabla 5.*Programa de amplificación en el termociclador T100 de Bio-Rad*

Programa PCR			
N° de ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 minutos
35	Desnaturalización	95°C	30 segundos
	Alineamiento	58°C	30 segundos
	Extensión	72°C	60 segundos
1	Extensión final	72°C	5 minutos
-	Conservación	4°C	∞

Posteriormente se corrieron 25 uL de los productos amplificados en la PCR en un gel con concentración de agarosa al 1,0%, a 80 voltios de potencia durante 1 hora. Se utilizó el patrón de peso molecular de 1 kb de Promega (Madison, WI USA). Se tiñó el gel con HydraGreen de ACTGene (Nueva Jersey, USA) y se visualizó el ADN en el sistema de imágenes iBright CL1500 de Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA).

4.1.1.3 Secuenciación del IFN-*k*. Las identidades de los amplicones obtenidos, se corroboraron por medio de secuenciación con el método de Sanger, realizado por el servicio del

Laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia). Para este análisis se eluyeron las bandas de IFN-*k* del gel realizado en el protocolo 6.1.1.2, utilizando el kit Monarch de New England Biolabs (Massachusetts, USA). Este ADN eludido se envió al laboratorio junto con los cebadores del protocolo 6.1.1.2, siguiendo las instrucciones de preparación de muestras para enviar a secuenciación.

4.2 Cultivo y transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat

Las líneas celulares inmortalizadas utilizadas en esta investigación fueron: SiHa, que corresponden a células de carcinoma cervical humano causado por VPH-16 (ATCC, HTB-35) y HaCat, que corresponden a células de queratinocitos humanos no tumorales (ATCC, PCS-200-010). Estas células se mantuvieron en cultivo durante todo el desarrollo del estudio, en frascos de cultivo de fondo plano (75 cm²) con Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) y antibiótico PenStrep 1X (este medio se denomina medio completo), bajo unas condiciones de incubación a 37 °C con un porcentaje de CO₂ al 5% y humedad controlada. Además, cuando tenían una confluencia mayor al 50 % se realizaban los pases celulares con tripsinización para cultivarlas de nuevo en un frasco, en placas con pozos de diferentes tamaños o en cajas Petri, dependiendo del análisis a realizar. En el proceso de tripsinización las células fueron despegadas con tripsina 1X durante 10 min; cumplido este tiempo la enzima fue inactivada con medio completo y el pellet celular se obtuvo por centrifugación a 1600 rpm durante 10 min. Este pellet se resuspendió en 1 mL de medio completo para determinar el número de células en el contador CellDrop FL de DeNovix (Wilmington, USA), y a partir de este resultado se realizaron los cálculos para sembrar la cantidad de células necesarias en los diferentes análisis.

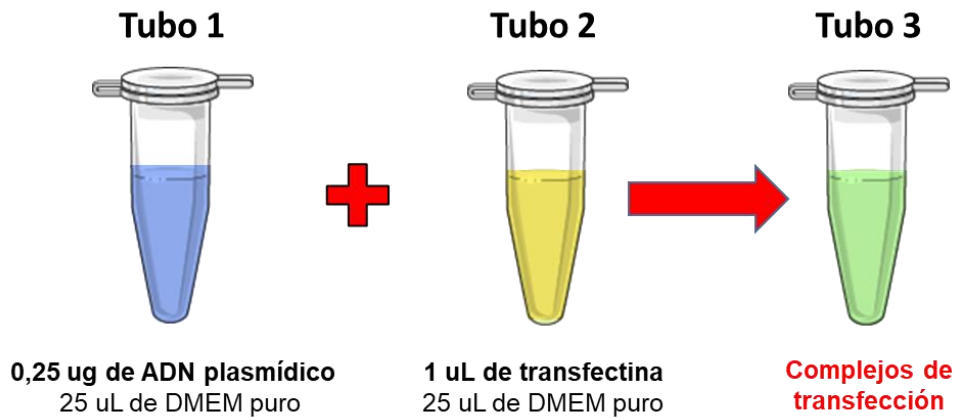
4.2.1 Estandarización de la transfección con el plásmido pEGFP-C1

La estandarización de la transfección en las líneas celulares SiHa y HaCat se realizó en placas de cultivo de 48 pozos con una confluencia celular del 80% que corresponde a 50.000 células. En el día 1 se realizaba el pase, conteo y siembra de las células en la placa, con 300 uL/pozo de medio DMEM suplementado con 10 % de SBF sin antibiótico (este medio se denomina DMEM 10 %). En el día 2 se observaba la confluencia celular en el microscopio ZOE Fluorescent Cell Imager de Bio-Rad y si las células estaban en buen estado y tenían la confluencia adecuada, se procedía a realizar la transfección con el plásmido pEGFP-C1 y el reactivo TransFectin, conocido como transfectina (Bio-Rad). Para ello, se retiraba el medio del día anterior y se adicionaban los siguientes volúmenes de DMEM 10 %: 300 uL/pozo de sobre las células control (que no serán expuestas a los complejos de transfección) y 250 uL/pozo sobre las células que se van a transfectadas. Luego se preparaban los complejos de transfección con DMEM sin SBF ni antibiótico (este medio se denomina DMEM puro), como se muestra en la figura 15. Una vez adicionada la solución del tubo 1 sobre la solución del tubo 2, se mezcló suavemente por inversión el tubo 3 y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, para permitir la formación de los complejos de transfección (ADN-lípido). Pasado este tiempo, se adicionó gota a gota en forma de espiral la solución del tubo 3 sobre los pozos que contienen las células, se centrifugó la placa a 1000 xg durante 30 min para ayudar a bajar los complejos de ADN-lípido a la superficie celular (spinoculation), y se llevó la placa a la incubadora.

Posteriormente en los días 3, 4 y 5 se observaron las células en el microscopio ZOE con el canal de fluorescencia verde (excitación a 480 nm y emisión a 517 nm) para comprobar la eficiencia de la transfección pasadas 24, 48 y 72 horas, a través de la expresión de la Proteína Verde Fluorescente (GFP).

Figura 15.

Mezcla de ADN plasmídico y transfectina para formar los complejos de transfección



4.2.2 Transfección con los plásmidos pCMV-empty y pCMV-IFN κ

Con base en los resultados de estandarización de la transfección y siguiendo las indicaciones del manual del reactivo TransFectin, se escalaron las concentraciones del ADN plasmídico y de la transfectina (tabla 6), para transfectar un mayor número de células SiHa y HaCat. Fue necesario aumentar el número de células, considerando que para la extracción del ARN se requieren de 1 a 2×10^5 células y para la extracción de los metabolitos son necesarias de 1 a 2×10^6 células. El proceso de transfección en estos análisis se llevó a cabo con los mismos pasos de los protocolos 6.2 y 6.2.1, a excepción del seguimiento de la expresión de la proteína GFP en el microscopio ZOE, puesto que los plásmidos pCMV-empty y pCMV-IFN κ no tienen en su estructura esta proteína reportera. En estos ensayos se incluyeron células que no fueron expuestas al proceso de transfección (control 1), células transfectadas con el plásmido pCMV-empty (control 2) y células transfectadas con el plásmido pCMV-IFN κ (tratamiento).

Tabla 6.*Condiciones experimentales para realizar transfecciones de un mayor número de células*

Células sembradas en placa de 24 pozos para posterior extracción de ARN (N° de células = 2×10^5)			
Nombre	Volumen de DMEM 10%	Tubo 1 (Eppendorf de 1,5 mL)	Tubo 2 (Eppendorf de 1,5 mL)
Control 1	500 uL	-	-
Control 2 (mock)	400 uL	0,5 ug de pCMV-empty 50 uL de DMEM puro	2,0 uL de transfectina 50 uL de DMEM puro
Tratamiento (IFN- <i>k</i>)	400 uL	0,5 ug de pCMV-IFNk 50 uL de DMEM puro	2,0 uL de transfectina 50 uL de DMEM puro
Células sembradas en caja Petri de 100 mm para posterior extracción de metabolitos* (N° de células = 2×10^6)			
Nombre	Volumen de DMEM 10%	Tubo 1 (falcon 15 mL)	Tubo 2 (falcon 15 mL)
Control 1	6,0 mL	-	-
Control 2 (mock)	3,0 mL	18 ug de pCMV-empty 1,5 mL de DMEM puro	30 uL de transfectina 1,5 mL de DMEM puro
Tratamiento (IFN- <i>k</i>)	3,0 mL	18 ug de pCMV-IFNk 1,5 mL de DMEM puro	30 uL de transfectina 1,5 mL de DMEM puro

* Estas células controles y tratamiento se realizaron por cuadruplicado biológico

4.3 Comprobación de la expresión transcripcional del IFN-*k*

Para comprobar la expresión del IFN-*k* se extrajo el ARN genómico (pasadas 48 h de transfección), se purificó, se retrotranscribió, se amplificó y finalmente se cuantificó de manera absoluta por PCR digital en gotas (ddPCR).

6.3.1 Extracción del ARN de las células control y tratamiento

Considerando que para extraer el ARN es necesario obtener el pellet celular, se tripsinizaron las células SiHa y HaCat (controles y tratamiento) en la placa de 24 pozos. En el proceso normal de pase celular, el medio de cultivo se descartaba. En este caso, al observar en el

microscopio ZOE (en campo claro) que un gran porcentaje de las células tratadas (después de 48 h) se encontraba en suspensión o estaban próximas a despegarse, se optó por no descartar los medios de cultivo de los controles y tratamiento, depositándolos en eppendorf por separado y centrifugándolos a 1600 rpm durante 10 min. Al pellet resultante (denominado pellet 1) se resuspendió en 500 uL de buffer PBS 1X. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de tripsinización en las células adheridas a la placa para obtener el pellet 2, que también se resuspendió en 500 uL de PBS 1X. Luego se añadieron las células resuspendidas del pellet 1 sobre el pellet 2 y se centrifugación a 1600 rpm durante 10 min, para obtener el pellet 3. Finalmente, a este pellet 3 se le descartó completamente el sobrenadante y se procedió a extraerle el ARN.

El ARN genómico se extrajo utilizando el kit RNeasy plus mini de Qiagen (Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lisaron y homogeneizan en un tampón RLT Plus con isotiocianato de guanidina altamente desnaturizante, que inactivó inmediatamente las ARNasas, garantizando el aislamiento del ARN intacto. Luego, el lisado se pasó a través de una columna gDNA Eliminator que, en combinación con el buffer con alto contenido de sal, eliminó la mayoría del ADN genómico. Después se añadió etanol para proporcionar las condiciones de unión adecuadas para el ARN y la muestra se agregó sobre una columna RNeasy con membrana de sílice que se une específicamente al ARN. Enseguida se realizaron varios lavados a la membrana con buffers que contienen etanol para remover cualquier resto no deseado. Finalmente, se eluyó el ARN con agua libre de ARNasas y se cuantificó en el espectrofotómetro QFX Fluorometer de DeNovix (Wilmington, USA).

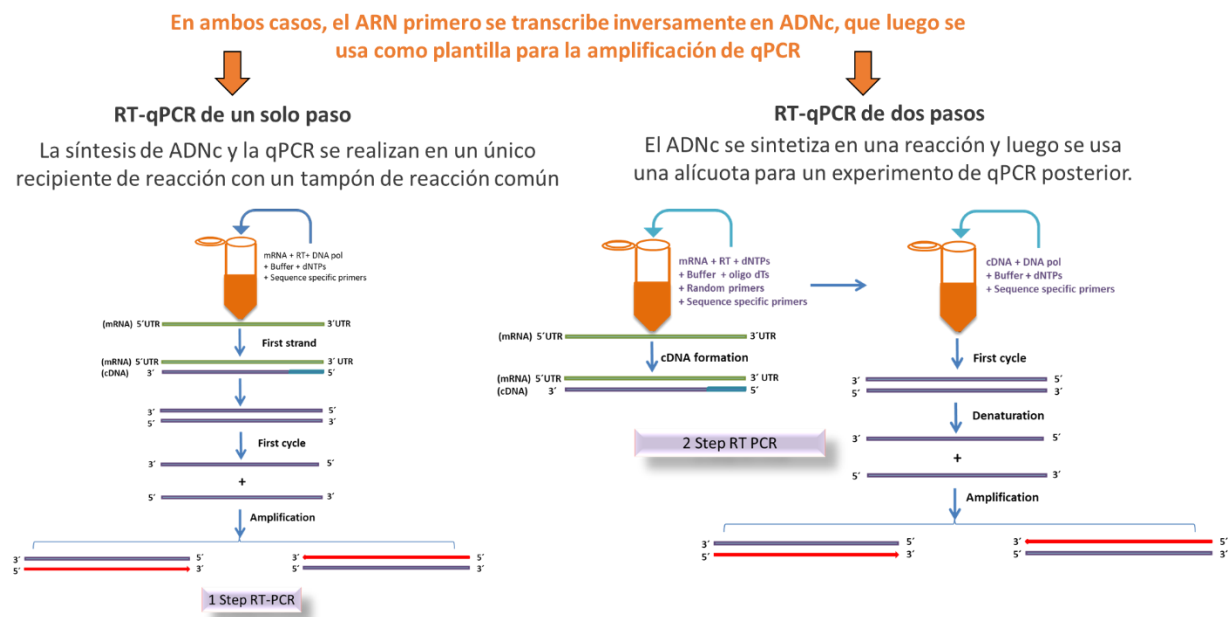
4.3.2 Retrotranscripción del ARN a ADNc

Se llevó a cabo una retrotranscripción de dos pasos (figura 16) al ARN extraído anteriormente, con LunaScript RT SuperMix de NEB (NEB #E3010). Igualmente, se realizó un

control a cada muestra con la mezcla sin RT de NEB (No-RT Control Mix). Para ello, se preparó la mezcla de reacción (tabla 7) y se utilizó el termociclador T100 de Bio-Rad (California, USA), siguiendo el programa de retrotranscripción descrito en la tabla 8.

Figura 16.

Comparación entre la retrotranscripción de un paso y dos pasos (RT-PCR)



Adaptado de: One step and Two step RT-PCR. Genaxxon Bioscience - Online Shop. <https://www.genaxxon.com/blog/one-step-and-two-step-rt-pcr>

Tabla 7.

Componentes de la reacción de retrotranscripción

Componente RT-PCR	Concentración	Volumen
LunaScript RT SuperMix (5X)	1X	4,0 uL
ARN	1 ug	8,0 uL
Agua (Biología molecular)	-	8,0 uL
Volumen final		20 uL

Tabla 8.*Programa de retrotranscripción en el termociclador T100 de Bio-Rad*

Programa RT-PCR			
N° de ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Primer recorrido	25°C	2 minutos
	Síntesis ADNc	55°C	10 minutos
	Inactivación por calor	95°C	1 minuto
-	Conservación	4°C	∞

Posteriormente, para confirmar la presencia de ARN sin ADN contaminante, se amplificó un fragmento del gen de la Tubulina humana con los cebadores Tubulina-Fw-2.0: 5'-TCCATACCCTGTTAATTGAGCTT-3' y Tubulina-Rev-2.0: 5'-CATCCAGGACAGAATCAA CCA-3' utilizando la GoTaq Green Master Mix de Promega y siguiendo el protocolo 6.1.1.2 anteriormente descrito. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 2% para comprobar la presencia del fragmento de 121 pb en las muestras y la ausencia de banda en los controles sin RT. Finalmente, se amplificó un fragmento corto del gen IFN-*k* con los primers IFNKshort-Fw-2.0: 5'-AGTCACCTGGCAAATCTGA-3' e IFNKshort-Rev-2.0: 5'-CCCTC TTCATAGGTTGGGTG-3' para confirmar el fragmento de 128 pb en un gel de agarosa al 2%.

4.3.3 Cuantificación absoluta del ADNc por ddPCR

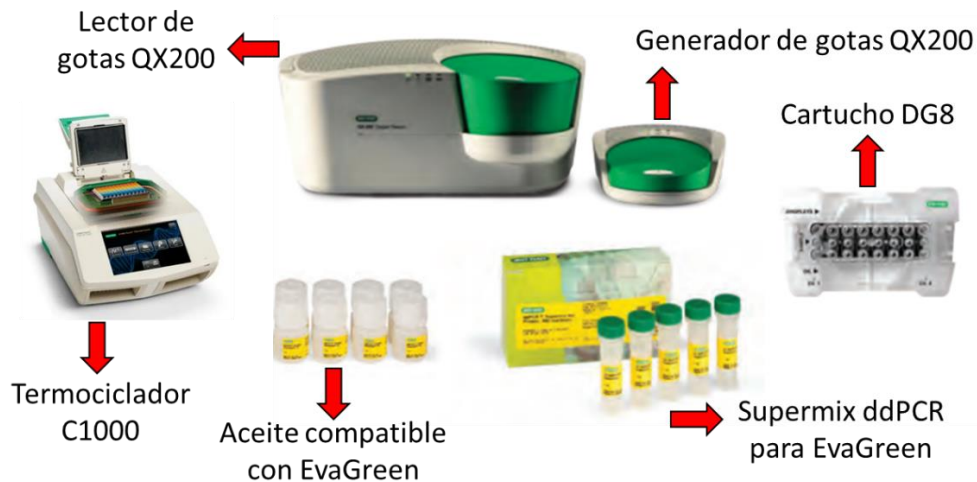
La ddPCR se llevó a cabo utilizando el sistema de PCR digital en gotas QX200 de Bio-Rad (California, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Antes de la generación de gotas, las muestras de ADNc (resultado del protocolo 6.3.2) se mezclaron en un tubo Eppendorf de 0,5 mL con los reactivos de la PCR de la siguiente forma: 12 uL de Supermix ddPCR para EvaGreen 2X, 1,2 uL de los cebadores IFNKshort (descritos en el

protocolo 6.3.2) para una concentración final de 125 nM, 5,8 uL de agua y 5 uL del ADNc, para un volumen final de 24 uL. Luego, se cargaron 20 uL de la mezcla de reacción (en los pocillos sample) junto con 70 uL de aceite compatible con EvaGreen (en los pocillos oil) en el cartucho DG8, el cual se ubicó en el generador de gotas QX200. Aquí se mezcló por microfluidica la muestra con el aceite, de tal manera que el ADNc se almacenó en gotas del tamaño de 20.000 nanolitros.

Figura 17.

Equipos y reactivos del sistema QX200 ddPCR



Adaptado de: Droplet Digital PCR Applications Guide. Bio-Rad. https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf

Una vez generadas las gotas en los pocillos droplet del cartucho, se transfirieron 40 uL a una placa de PCR de 96 pocillos, que se selló térmicamente con aluminio en un sellador de placas de PCR PX1 de Bio-Rad (California, USA) y se colocó en el termociclador C1000 de Bio-Rad (California, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Tabla 9.*Programa de amplificación en el termociclador C1000 de Bio-Rad*

Programa ddPCR			
N° de ciclos	Temperatura	Tiempo	Rampa
1	95°C	5 minutos	2°C/seg
40	95°C	30 segundos	2°C/seg
	58°C	1 minuto	2°C/seg
1	4°C	5 minutos	2°C/seg
1	90°C	5 minutos	2°C/seg
-	4°C	∞	-

Después de la amplificación por ddPCR, las muestras se colocaron en el lector de gotas QX200, el cual analizó cada gota individualmente usando un sistema de detección de fluorescencia con canales ópticos de dos colores (FAM y HEX), contando tanto las gotas PCR positivas como PCR negativas. Finalmente, los resultados fueron procesados en el software QuantaSoft (QuantaSoft Software, versión 1.7, Bio-Rad), con el cuál se obtuvieron diferentes gráficas que permitieron analizar el número de eventos (gotas generadas) y la cuantificación absoluta del ADNc en cada muestra.

4.4 Análisis metabolómico no dirigido

Se utilizó la técnica analítica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Orbitrap/HRMS) para llevar a cabo el estudio del metaboloma. Para ello, inicialmente se estandarizó la preparación de las muestras, que contenían como analitos, los metabolitos extraídos de células SiHa (sin transfección). Luego se seleccionó el método que presentó la mayor cantidad de características (relaciones m/z) y se aplicó el mismo procedimiento para las células de estudio SiHa y HaCat, tanto control (sin transfección y transfectadas con

pCMV-empty) como tratamiento (transfectadas con pCMV-IFN κ). Finalmente, los datos fueron procesados y analizados mediante análisis estadísticos uni- y multivariados (Fold-change, Volcano plot, PCA, PLS-DA), para identificar los metabolitos característicos de cada caso experimental.

4.4.1 Estandarización de la extracción de los metabolitos

Para estandarizar el método de extracción de los metabolitos en células adherentes de mamífero, se tomó como referencia el protocolo del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (Protocols Used for LC-MS Analysis – Metabolomics Core Facility, n.d.), variando el número de células SiHa de 1 a 2×10^6 , para determinar cuál era la cantidad mínima de células que permitían detectar más de 1000 características (relaciones m/z representativas). Estas células se sembraron por triplicado para cada método en cajas Petri de 100 mm con 6 mL, siguiendo el protocolo de cultivo mencionado en la sección 6.2. Pasadas 24 horas y observando que las células estaban adheridas, se procedió a extraer los metabolitos. Para ello, primero se aspiró completamente el medio de cultivo (6 mL), se depositó en Falcón de 15 mL y se centrifugó a 1600 rpm durante 10 min, con el propósito de precipitar y recuperar aquellas células que se encontraban en suspensión o estaban próximas a despegarse. Posteriormente, se descartó completamente el sobrenadante se resuspendió el pellet en 5 mL de solución de acetato de amonio 10 Mm (solución de lavado), se volvió a centrifugar, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de solución de extracción fría. La composición de esta solución se varió del método M1-1 a M3-2 (tabla 10).

Por otra parte, las células adheridas a la caja Petri, se lavaron con 5 mL de solución de lavado (para retirar cualquier resto de medio de cultivo), se les adicionó 2 mL de solución de extracción fría junto con los 2 mL de las células resuspendidas en el falcón, y se incubaron a -80°C

durante 20 min. Pasado el tiempo, se ubicaron las cajas Petri sobre bloques de hielo frío, se desprendieron completamente las células con cell scraper, se transfirieron junto con la solución de extracción a eppendorf de 2,0 mL, se homogenizó con haciendo vórtex y se colocaron en un baño de ultrasonidos (con hielo) durante 10 min. Enseguida, se centrifugó a 14000 xg durante 10 min a 4°C (para precipitar los restos celulares), se transfirieron a nuevos tubos Eppendorf de 2,0 mL los sobrenadantes que contienen los metabolitos y se secaron las muestras en un SpeedVac (SPD130DLX, Thermo Scientific) para concentrar los metabolitos. Finalmente, se resuspendieron los metabolitos en 300 uL de metanol acuoso al 80% (solución de reconstitución), se filtraron con un filtro estéril de 0,22 um, se prepararon las muestras de control de calidad (tomando volúmenes iguales de todas las muestras del estudio hasta completar 300 uL) y se analizaron por UHPLC-Orbitrap/HRMS. Las variables y condiciones de este experimento se muestran en la tabla 10.

Tabla 10.

Condiciones experimentales para estandarizar el método de extracción de metabolitos en células SiHa

Método	N° de células	Solución de lavado	Lisis*	Solución de extracción**	Solución de reconstitución
M1-1	1 x 10 ⁶	Acetato de amonio 10 mM	CT + S	MeOH:H ₂ O (8:2)	MeOH 80%
M1-2	2 x 10 ⁶	Acetato de amonio 10 mM	CT + S	MeOH:H ₂ O (8:2)	MeOH 80%
Blanco 1	-	-	CT + S	MeOH:H ₂ O (8:2)	MeOH 80%
M2-1	1 x 10 ⁶	Acetato de amonio 10 mM	CT + S	MeOH:H ₂ O (8:2) + ácido fórmico al 5% v/v	MeOH 80%
M2-2	2 x 10 ⁶	Acetato de amonio 10 mM	CT + S	MeOH:H ₂ O (8:2) + ácido fórmico al 5% v/v	MeOH 80%
Blanco 2	-	-	CT + S	MeOH:H ₂ O (8:2) + ácido fórmico al 5% v/v	MeOH 80%
M3-1	1 x 10 ⁶	Acetato de amonio 10 mM	CT + S	MeOH:ACN:H ₂ O (4:4:2)	MeOH 80%
M3-2	2 x 10 ⁶	Acetato de amonio 10 mM	CT + S	MeOH:ACN:H ₂ O (4:4:2)	MeOH 80%

Blanco 3	-	-	CT + S	MeOH:ACN:H ₂ O (4:4:2)	MeOH 80%
Control de calidad: Se prepararon tomando volúmenes iguales de todas las muestras del estudio hasta completar 300 uL					

*CT + S = Choque Térmico + Sonicación

**Todas las soluciones de extracción contienen 5,0 ppm del patrón interno (Z-Gly-Tyr-OH)

A partir del procesamiento y análisis de estos datos en los softwares XCMS online (versión 3.7) y Xcalibur (OPTON-30965, Thermo Scientific), se determinó que el método de extracción óptimo fue el M3-2. Por lo tanto, los metabolitos de las células de estudio SiHa y HaCat, tanto control (sin transfección y transfectadas con pCMV-empty) como tratamiento (transfectadas con pCMV-IFNk) se extrajeron siguiendo el método 3-2, siguiendo las condiciones descritas anteriormente (solamente se cambió la concentración del patrón interno (Z-Gly-Tyr-OH) de 5,0 ppm a 0,5 ppm).

4.4.2 Análisis de los metabolitos extraídos por UHPLC-Orbitrap/HRMS

Los metabolitos extraídos se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución (UHPLC-ESI-Orbitrap/HRMS) utilizando un equipo OrbitrapTM Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) equipado con una columna Hypersil GOLD TM aQ (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA; 100 X 2,1 mm, 1,9 μ m de tamaño de partícula). La fase móvil, compuesta por ácido fórmico al 0,2% en agua (A) y ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo (B), se aplicó para una elución en gradiente utilizando el siguiente programa: 100% A cambiando linealmente a 100% B en 8 min, se mantuvo constante durante 4 min, se volvió a 100% A en 1 min y se mantuvo en equilibrio durante 3 min. El caudal de la fase móvil fue de 300 uL/min y el volumen de inyección de 1 uL.

La espectrometría de masas de los metabolitos separados se llevó a cabo utilizando un sistema de detección de corriente iónica de tipo Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunny, CA, USA), equipado con una interfaz de ionización por electrospray con calentamiento (HESI) operado en modo positivo y negativo. El Orbitrap funcionó en modo de barrido MS completo con una resolución de 70000. Los iones se enviaron para su fragmentación a la celda de disociación de colisiones de alta energía (HCD) a diferentes energías (10 eV y 20 eV) en modo de barrido escalonado. Para cada energía de colisión, se utilizó una resolución RFWHM de 35000, y un AGC de 3×10^6 y un tiempo de inyección de la cámara C-trap de 50 ms. Todos los espectros de masas se obtuvieron en modo de adquisición de iones positivos y negativos en el intervalo m/z 50-1000.

4.4.3 Procesamiento y análisis estadístico de los datos

Los datos MS obtenidos se convirtieron en archivos de formato raw a mzXML, utilizando la herramienta MSconvert (software ProteoWizard 3.0), y se cargaron en la plataforma interactiva en línea XCMS (versión 3.7, <https://xcmsonline.scripps.edu/>). Los ajustes de los parámetros para el procesamiento de los datos por XCMS fueron los siguientes: Se ejecutó un análisis Multigrupo (con las muestras control, tratamiento y control de calidad) en el modo centWave para la detección de características ($\Delta\text{ppm} = 5$ ppm, anchura mínima del pico = 5 s, y anchura máxima del pico = 20 s); la corrección del tiempo de retención se realizó con un método obiwrap (profStep = 1); y para la alineación del cromatograma: minfrac = 0,5, bw = 5, mzwid = 0,015. La matriz de datos se filtró en función del coeficiente de variación (CV) de las muestras de control de calidad (QC). Se eliminaron los datos con mayor dispersión en la media (CV > 30%). Una vez depurados los datos, se generó una plantilla con las características (m/z) significativas, con sus respectivos valores de intensidad en cada una de las réplicas, para posterior análisis estadístico en el software

Metaboanalyst online (versión 5.0, <https://www.metaboanalyst.ca/>). Los ajustes de los parámetros para el procesamiento estadístico de los datos en MetaboAnalyst fueron los siguientes: Tipo de datos = intensidad de los picos, formato = muestras no emparejadas, normalización de las muestras = normalización por suma, transformación de datos = ninguno y escalado de datos = escalado automático.

A continuación, para determinar las características diferenciales entre los controles y tratamientos, las matrices de datos se sometieron a análisis estadísticos multivariados y univariados en el software MetaboAnalyst. En esta investigación se utilizaron los análisis de componentes principales (PCA) y la medida de la importancia de la variable en la proyección (VIP) del análisis discriminante de mínimo cuadrados parciales (PLS-DA), utilizando como parámetro de selección un valor de VIP mayor a 1,5.

Posteriormente, la identificación presuntiva de los metabolitos de interés (correspondientes a las características m/z - estadísticamente significativas) se llevó a cabo utilizando la plataforma CEU Mass Mediator (versión 3.0, <http://ceumass.eps.uspceu.es/>) la cual contiene una biblioteca de datos espectrales con las principales bases de datos de compuestos bioquímicos (KEEG, HMDB, Metlin, LipidMaps, PubChem). Aquí, mediante una búsqueda avanzada se ingresaron las relaciones m/z y sus respectivos tiempos de retención; se filtraron con una tolerancia menor o igual a 5 ppm y se utilizaron los principalmente los aductos $[M-H]^-$ y $[M+H]^+$ para el modo de adquisición en iones negativo y positivo, respectivamente. Sin embargo, cuando no se encontraban metabolitos con estos aductos, se utilizaron $[M+Cl]^-$, $[M-H-H_2O]^-$, $[M-HCOOH-H]^-$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M-HCOOH-H]^+$ y $[M+2H]^{+2}$ como segunda opción. Además, solamente se consideraron compuestos funcionalmente relacionados con células de mamífero.

Aquellas relaciones m/z que no se encontraban en esta biblioteca o que no cumplían con los requisitos de los filtros de búsqueda, se asignaron como “desconocidos”.

Finalmente, con estos metabolitos identificados presuntivamente, utilizando el software MetaboAnalyst se estableció su modulación positiva y negativa en los controles y tratamiento, de acuerdo a gráficas de mapas de calor, y se realizó un análisis de enriquecimiento para determinar las vías metabólicas moduladas por la expresión del IFN- κ , considerando como significativas aquellas rutas con un valor de p menor a 0,05.

5. Resultados y discusión

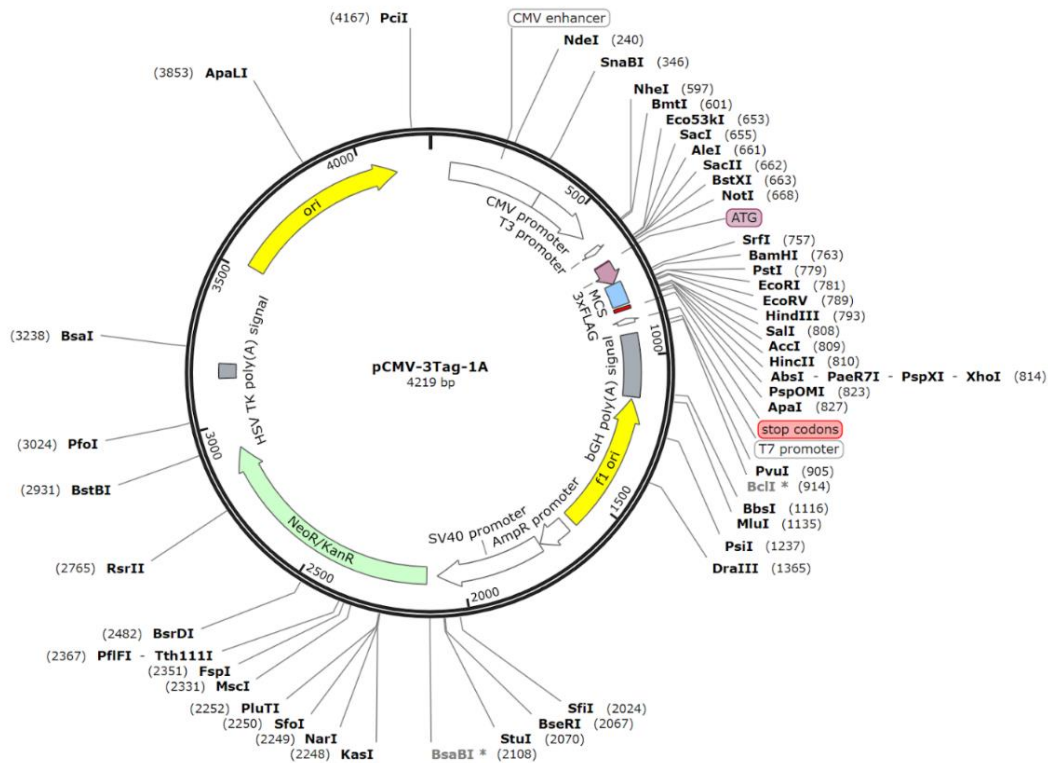
5.1 Extracción y confirmación del plásmido pCMV-3-Tag-1A con IFN- κ

Los plásmidos son fragmentos de ADN extracromosómico circular que se replican de forma independiente del ADN cromosómico y se segregan en las células hijas resultantes. Se encuentran principalmente en bacterias (aunque se pueden estar presentes en arqueas y eucariotas) en donde desempeñan un papel biológico muy importante como resistencia antibiótica. En su forma más simple, están constituidos por un origen de replicación bacteriano (*ori*), un gen de resistencia a los antibióticos y al menos un sitio único de reconocimiento de enzimas de restricción (MCS). En biología molecular se utilizan diferentes plásmidos como vectores de clonación o de expresión para transportar segmentos de ADN foráneo en una célula huésped. Para ello, la tecnología del ADN recombinante ha optimizado la estructura de los plásmidos adicionando una región promotora necesaria para la generación de ARN, una secuencia potenciadora para aumentar la transcripción del inserto, una secuencia de terminación que indica en donde se detiene el proceso de transcripción, un marcador de selección de resistencia a antibióticos (diferente a la selección de

las células bacterianas) o una proteína fluorescente, y una secuencia corta de primers como punto de inicio para la amplificación por PCR o la secuenciación del ADN del plásmido.

Figura 18.

Mapa circular del plásmido pCMV-3Tag-1A



Fuente: SnapGene. (2023). Pcmv-3Tag-1A Sequence and Map https://www.snapgene.com/plasmids/mammalian_expression_vectors/pCMV-3Tag-1A

El plásmido empleado en este estudio fue el pCMV-3Tag-1A (Stratagene). Este es un vector de expresión en mamíferos con un tamaño de 4219 bp, que se caracteriza porque marca proteínas con un epítipo 3XFLAG N-terminal, permitiendo una alta detección y purificación de la proteína recombinante sin afectar la función de la misma. Adicionalmente, como se observa en la figura 18, su estructura está compuesta por un ori (pUC) y dos sitios promotores (T3 y T7) que

generan un alto número de copias en las bacterias competentes con resistencia a Ampicilina; dos sitios promotores fuertes de expresión constitutiva en eucariotas (CMV y SV40) con un potenciador temprano inmediato de CMV, dos marcadores de selección estables (Kanamicina y Neomicina), un sitio de clonación múltiple con un amplio número de enzimas de restricción, un codón de inicio ATG y codones de parada con adición de cola poli (A) para la producción de un ARNm maduro para su traducción.

En investigaciones anteriores realizadas por el Dr. Bladimiro Rincón (Rincon-Orozco et al., 2009), fue clonado el gen de 621 bp que codifica para IFN-*k* humano (Genbank NM_020124) en el MCS del pCMV-3Tag-1A en dirección 5' a 3', generando un plásmido de 4840 bp, el cual se identificará como pCMV-IFNk para fines prácticos. Este plásmido a la vez fue clonado y amplificado en bacterias *E. coli* competentes One Shot™ Stbl3™ (ThermoFisher C737303), por Ms. Brigitte Peña, en el Laboratorio de Genética Molecular Enfermedades Infecciosas y Cáncer (GEMEICA). Posteriormente, el plásmido pCMV-IFNk amplificado, fue extraído de las bacterias por la técnica de lisis alcalina miniprep. Este método se basa en las diferentes propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el ADN plasmídico (pequeños fragmentos de ADN circular cerrados covalentemente) y el ADN bacteriano (tamaño grande que en el proceso de lisis se fragmenta en cadenas lineales largas). Inicialmente, el aumento de pH con una base fuerte en presencia de una detergente fuertemente aniónico (SDS) provoca la lisis celular (ya que solubiliza las proteínas y los fosfolípidos de la membrana) junto con la desnaturalización del ADN cromosómico y del ARN (quien se digiere por la presencia de ARNasa en la solución), ocasionado la liberación de ADN plasmídico (los plásmidos se ven menos afectados por su estructura pequeña y superenrollada). Luego para renaturalizar rápidamente el ADN plasmídico en suspensión, se neutraliza el medio adicionando una solución con una concentración alta de una sal (acetato de

potasio), que ocasiona la separación del plásmido del ADN cromosómico, basado en la coprecipitación de este último unido a la pared celular con complejos insolubles que contienen sal, detergente y proteínas. Enseguida para separar los restos celulares del ADN plasmídico se adiciona el lisado sobre una columna Invisorb spin en donde el ADN plasmídico es adsorbido en la membrana y los demás componentes son arrastrados por la fuerza centrífuga. Finalmente, el ADN plasmídico es eludido de la columna con agua de grado de biología molecular y se cuantifica en un espectrofotómetro (tabla 11). Siguiendo este método se obtienen a partir de 2 mL de inóculo de bacterias competentes, entre 20 y 25 ug de ADN plasmídico.

Tabla 11.

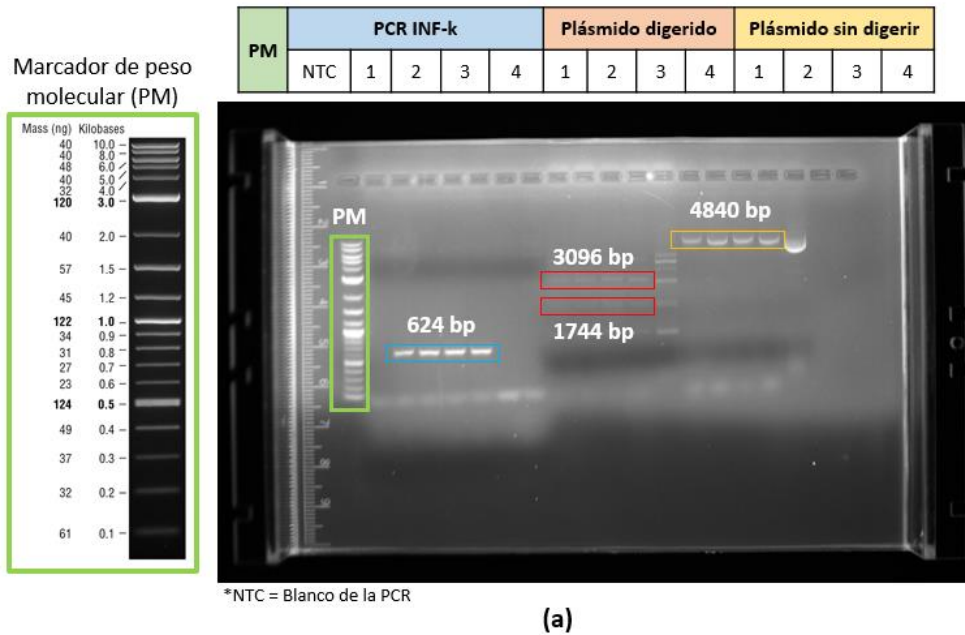
Resultados de cuantificación del ADN plasmídico extraído con miniprep

Muestra de plásmido	Concentración	Factor	A260	A260 / A280	A260 / A230
1	220,521 ng/uL	50	4,4104	2,06	2,36
2	218,656 ng/uL	50	4,373	2,07	2,32
3	260,324 ng/uL	50	5,2065	1,91	1,18
4	211,032 ng/uL	50	4,2206	1,99	1,99

Ahora bien, es necesario confirmar la pureza y la estructura del pCMV-IFNk aislado, para determinar que el ADN plasmídico extraído y cuantificado corresponde al vector correcto. Para tal fin, se realizaron a cuatro muestras extraídas con miniprep una digestión enzimática con las endonucleasas BamHI-HF y BsaI-HF, junto con una PCR para comprobar la presencia del inserto de IFN-*k*, y se mandó a secuenciar el amplicón por el método de Sanger (figura 19).

Figura 19.

Confirmación del plásmido extraído pCMV-3Tag-1A clonado con el gen del IFN-*k*



Consultation	Subject		Punctuation			Identities		
Name	Access in GenBank	Gene	Bit	Crude	E value	Coincidences	Total	%
H201231-032_G23_IFNkappaC2	BC141647.1	Kappa interferon	1153	624	0.0	631	634	99

Met Ser Thr Lys Pro Asp Met Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val
1 10 20 30

His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln
40 50 60 70

Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr
80 90 100

Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys
110 120 130 140

Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu
150 160 170

Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
180 190 200 207

(b)

Nota: (a) Electroforesis en gel de agarosa del gen amplificado de IFN-*k* por PCR, del plásmido de estudio digerido con dos endonucleasas (BamHI-HF y BsaI-HF) y del plásmido sin digerir en su conformación original (b) Secuencia de la proteína que codifica el gen de IFN-*k* que se encuentra en el plásmido de estudio (la flecha roja indica la posición de la sustitución conservativa de un aminoácido).

La electroforesis en gel de agarosa utilizada para separar por tamaño e identificar los fragmentos de ADN digeridos y amplificados por PCR, permite confirmar la presencia del IFN-*k* en las cuatro muestras de los plásmidos extraídos, puesto que se observa la presencia de una banda en la región entre 600 y 700 bp. Adicionalmente en los pozos que contienen el plásmido sin digerir se presenta una única banda de un tamaño entre 4000 y 6000 bp, indicando que el plásmido está íntegro y no fue degradado en el proceso de extracción. En el caso del plásmido digerido con las endonucleasas, se observan levemente los fragmentos correspondientes a 1744 bp y 3096 bp, que sumados dan el tamaño total del plásmido. Por otra parte, comparando la estructura reportada en la literatura para IFN-*k* con los resultados de la secuenciación, se observa que el gen clonado tiene una modificación de dos nucleótidos que ocasiona un cambio de los aminoácidos, ácido glutámico (Glu) por lisina (Lys) en la posición 133 de la proteína. Sin embargo, esta modificación no afecta funcionalmente a la proteína, puesto que es una sustitución conservativa, en donde ambos aminoácidos tienen propiedades bioquímicas similares (French & Robson, 1983).

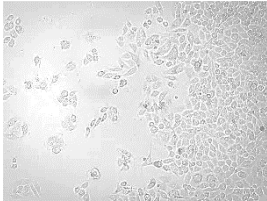
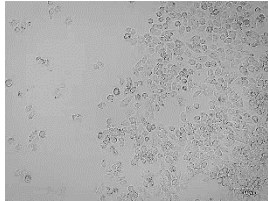
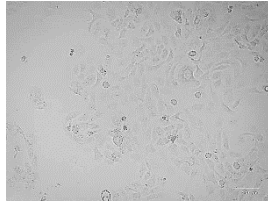
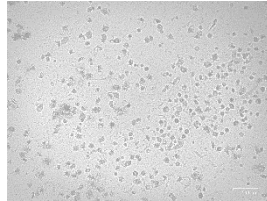
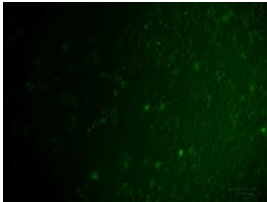
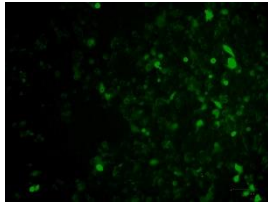
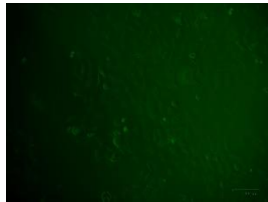
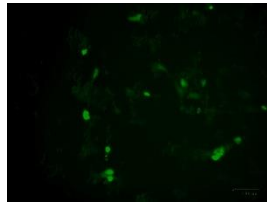
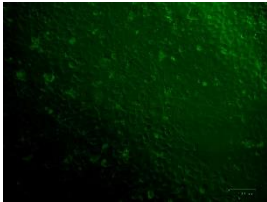
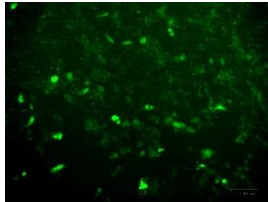
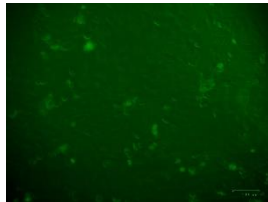
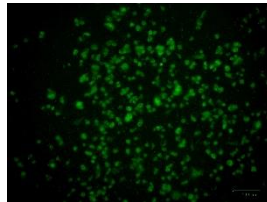
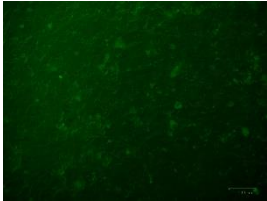
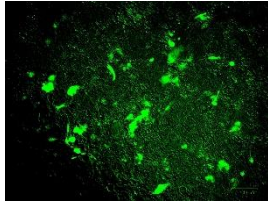
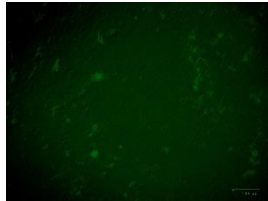
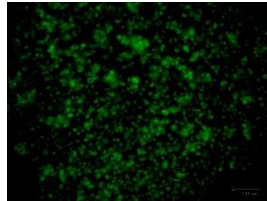
5.2 Transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat

La transfección mediada por lípidos utiliza lípidos catiónicos para administrar ADN a las células. En esta investigación se utilizó el reactivo lipídico TransFectin, que consta de una mezcla de lípidos catiónicos patentados y un DOPE colipídico (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), el cuál al mezclarse con el ADN plasmídico lo encapsula e ingresa a la célula a través de endocitosis. Considerando que el plásmido pCMV-IFNk no tiene en su estructura una proteína reportera, como por ejemplo GFP, que permita visualizar fácil y rápidamente si la transfección fue exitosa o no, se decidió utilizar el plásmido pEGFP-C1 (Addgene), con el fin de estandarizar la concentración adecuada del lípido y del ADN plasmídico (ya que concentraciones

muy elevadas pueden llegar a ser tóxicas para las células) y determinar indirectamente el tiempo en que se encuentra en mayor cantidad el transcrito para realizar la extracción del ARNm.

Tabla 12.

Resultados de la transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat con el plásmido pEGFP-C1

SiHa		HaCat	
Control	Transfectadas con pEGFP-C1	Control	Transfectadas con pEGFP-C1
Pasadas 0 horas de transfección			
			
Pasadas 24 horas de transfección			
			
Pasadas 48 horas de transfección			
			
Pasadas 72 horas de transfección			
			

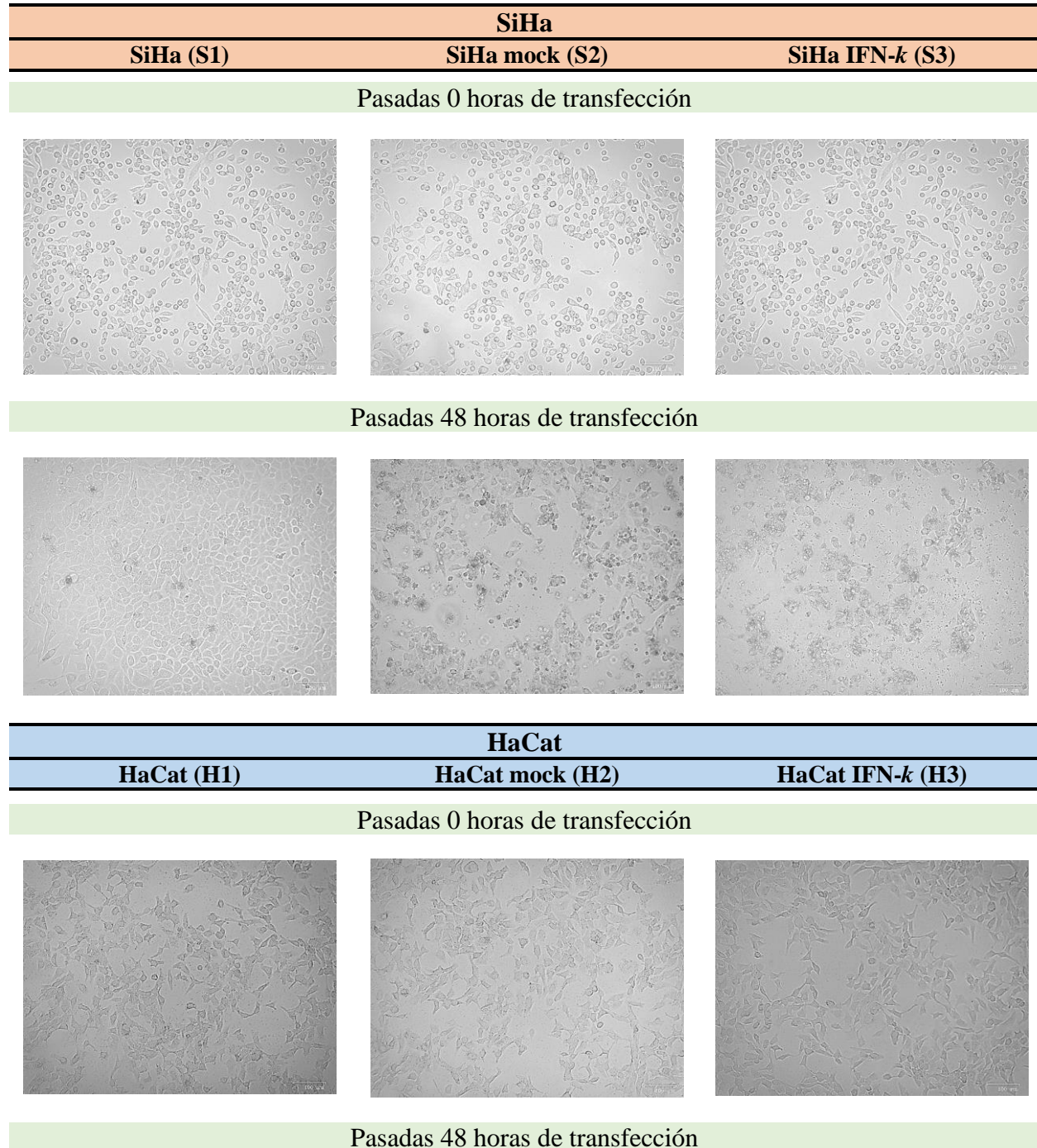
De acuerdo a estos resultados se observa que las células que no fueron transfectadas con el plásmido pEGFP-C1 no presentan ningún tipo de fluorescencia, mientras que las células transfectadas si emiten una fluorescencia verde, que indica la expresión de la proteína GFP en las células SiHa y HaCat. Esto permite, en primer lugar, comprobar que el reactivo TransFectin se encuentra en buen estado y logra una transfección eficiente. En segundo lugar, se observa que la expresión de la proteína GFP aumenta conforme pasa el tiempo de transfección (máximo 72 horas considerando que es una transfección transitoria), por ende, se tomaron como referencia estos resultados para extraer el ARNm de IFN-*k* pasadas 48 h de transfección. Además, se determinó que para un plato de 48 pozos con una confluencia celular del 80% (aproximadamente 50.000 células por pozo), la cantidad adecuada de ADN plasmídico fue de 0,25 ug y 1 uL de TransFectin, puesto que las células no se vieron afectadas en cuanto a su viabilidad, indicando que estas concentraciones no son tóxicas para estas dos líneas celulares.

Ahora bien, para realizar la extracción del transcrito de IFN-*k* y de los metabolitos en las células de estudio, se necesitó de un mayor número de células para lograr tener las cantidades sugeridas de estos analitos en los protocolos siguientes. Por consiguiente, se tomaron como referencia las concentraciones ADN plasmídico y TransFectin en el plato de 48 pozos y se escalaron para un plato de 24 pozos y una caja Petri de 100 mm.

Conforme a los resultados presentados en la tabla 13, se puede analizar que hay un cambio de morfología en las células transfectadas con el plásmido pCMV-IFN*k*, en comparación con las células control sin transfección y transfectadas con pCMV-empty (células mock). Este cambio fisiológico es aún más notorio en las células SiHa puesto que se ven deterioradas, despegadas, con una disminución en su tamaño y en su proliferación. Estas características se asocian con la muerte celular por apoptosis o necrosis.

Tabla 13.

Resultados de la transfección de las líneas celulares SiHa y HaCat con el plásmido pCMV-empty y pCMV-IFN*k*



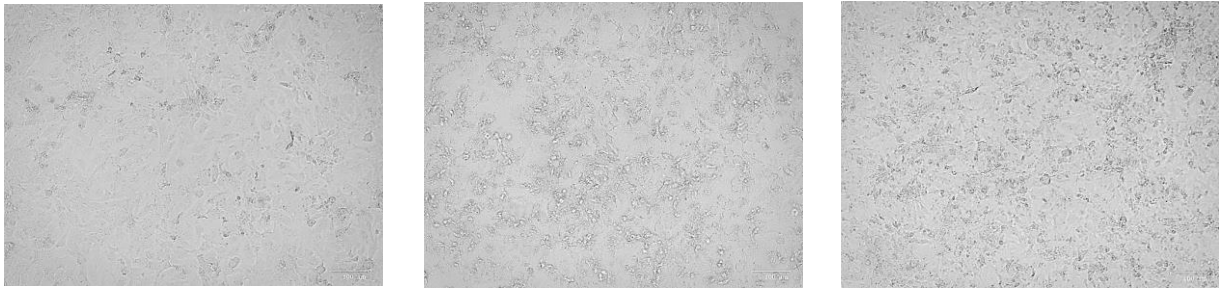
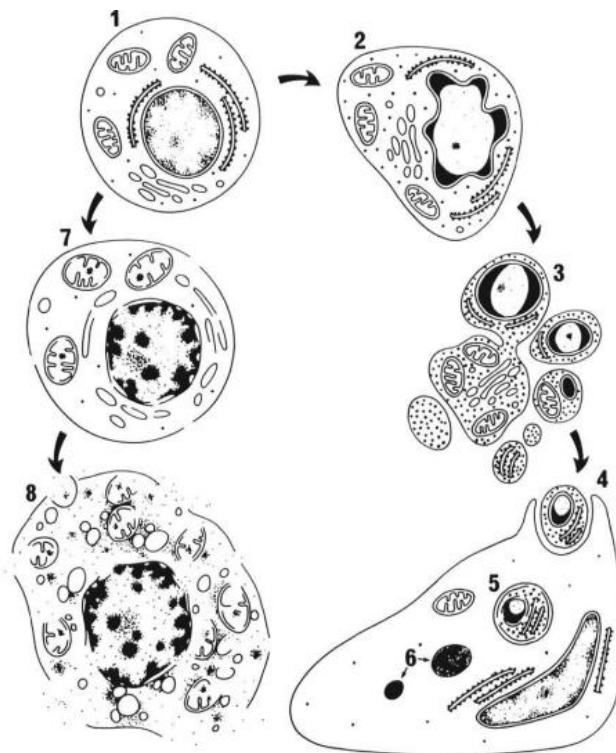


Figura 20.

Secuencia de cambios estructurales en los mecanismos de muerte celular por apoptosis y necrosis



Fuente: Kerr, J. F. R., Gobé, G. C., Winterford, C. M., & Harmon†, B. V. (1995). Chapter 1 Anatomical Methods in Cell Death. *Methods in Cell Biology*, 1–27. doi:10.1016/s0091-679x(08)61921-4

Como se observa en la figura 20, cuando la célula (1) está sufriendo apoptosis se observa una reducción en el volumen celular y marginación de la cromatina (2) junto con la fragmentación

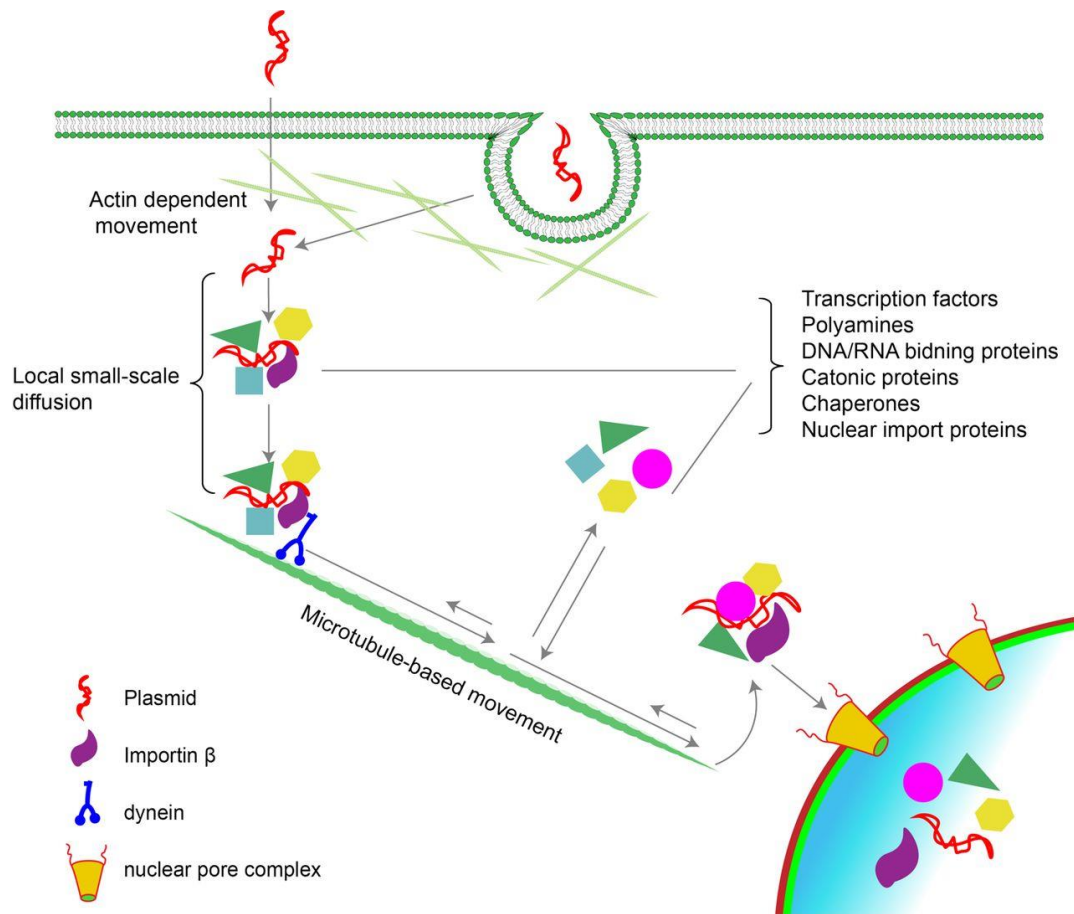
del núcleo y aparición de cuerpos apoptóticos (3). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o células vecinas (4) para degradarlos en residuos celulares (5 y 6). En el caso de la necrosis, esta se manifiesta por un agrupamiento aleatorio de la cromatina, tumefacción (inflamación) de las mitocondrias, degradación de los ribosomas y de la membrana celular (7), y finalmente la desintegración de los diferentes componentes celulares (8) (Kerr et al., 1995). A partir de esto se puede postular que probablemente la reexpresión del IFN-*k* activo un estado de muerte celular en la línea tumoral SiHa. Este hallazgo se correlaciona con datos previamente publicados, en donde se estable que la disminución de la reproducción de células cancerígenas cervicales corresponde con la baja expresión del oncogén E6 del VPH-16 (Rincon-Orozco et al., 2009).

El mecanismo de transfección empleado en este estudio comprende una serie de pasos que van desde la entrada del ADN plasmídico a través de la membrana celular, el tránsito en el citoplasma, el ingreso al núcleo, la transcripción y la traducción. Inicialmente es necesaria la formación de los complejos lipídicos con el ácido nucleico (pCMV-IFNk + TransFectin), los cuales se forman por la interacción de la carga negativa de los grupos fosfato del ADN con la carga positiva del reactivo de transfección lipídico. Estos complejos catiónicos a la vez interaccionan con los proteoglicanos de heparán sulfato de la membrana celular (cargados negativamente), ocasionando su encapsulamiento en vesículas endocíticas que permiten el ingreso del ácido nucleico al citosol. Una vez ingresan a la célula, el pCMV-IFNk debe transitar hacia el núcleo para que se produzca la expresión génica del IFN-*k*. Para ello los plásmidos se unen rápidamente a un gran número de proteínas para formar grandes complejos ADN-proteína (figura 21). Los factores de transcripción unidos al ADN interactúan con la importina β , la dineína y la quinesina para el movimiento a lo largo de los microtúbulos hacia el núcleo (Bai et al., 2017). Luego la entrada

nuclear esta mediada por la importina β quien permite el ingreso del pCMV-IFNk a través del complejo de poro nuclear (NPC).

Figura 21.

Esquema de tráfico intracelular general de plásmidos desde la membrana celular al núcleo



Fuente: Bai, H., Lester, G. M. S., Petishnok, L. C., & Dean, D. S. (2017). Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. *Bioscience Reports*, 37(6). <https://doi.org/10.1042/bsr20160616>

Una vez ingresa el pCMV-IFNk, al núcleo, el sitio promotor de citomegalovirus (CMV) es reconocido por la ARN polimerasa para dar inicio a la transcripción constitutiva del gen de IFN-*k* ubicado en dirección 5' a 3' después del codón de inicio ATG. Allí la ARN polimerasa desenrolla

el ADN, separándolo en dos hebras: la hebra codificante, cuya secuencia corresponde al transcripto de ARNm producido, y la hebra molde, que es la cadena copiada por la ARN polimerasa en la dirección 5' a 3', hasta que se encuentra con la secuencia de terminación. Como resultado, la ARN polimerasa y el transcrito primario se liberan del ADN, y el ARNm es exportado al citoplasma para traducirse en proteína.

El proceso de traducción sucede en los ribosomas, los cuales se dividen en una subunidad ribosomal pequeña y grande. La subunidad pequeña se une al extremo 5' de la molécula de ARNm y se mueve a lo largo de esta hasta que encuentra el codón de inicio, AUG. Allí se detiene y espera el ARNt iniciador, que tiene la subunidad ribosomal grande. Una vez todos estos componentes estén en su lugar, el ribosoma puede empezar a traducir la proteína de IFN-*k* formando enlaces peptídicos entre los aminoácidos, gracias a la peptidil transferasa. Esta traducción termina cuando el ribosoma se encuentra con un codón de parada (Thieman & Palladino, 2010).

5.3 Comprobación de la expresión transcripcional del IFN-*k*

5.3.1 Extracción del ARN de las líneas celulares de estudio

La extracción del ARN representa un paso clave para detectar e identificar correctamente el transcrito de IFN-*k*, ya que los resultados de las técnicas moleculares de PCR de transcripción inversa (RT-PCR) y PCR digital (ddPCR) dependen netamente de la calidad y concentración del ARN y la pureza de la muestra. Evidentemente para extraer el ARN no se pueden utilizar los mismos métodos de extracción de ADN, como por ejemplo el método de miniprep mencionado anteriormente, ya que estos ácidos nucleicos son muy diferentes estructuralmente. Además, extraer ARN intacto resulta una tarea laboriosa, puesto que las ARNasas abundan en el ambiente;

razón por la cual se debe realizar cuidadosamente considerando condiciones asépticas y que todos los materiales empleados estén libres de estas enzimas. Teniendo en cuenta lo anterior, se utilizó el RNeasy Plus Mini kit de Quiagen (QUIAGEN 74034). El principio general que utiliza este kit es el uso de un buffer que contiene el detergente TritonX junto con los agentes caotrópicos tiocianato de guanidinio y beta mercapto etanol para lisar las células y degradar el ADN, proteínas y ARNasas. Seguidamente, este kit emplea doble método de purificación siguiendo el principio de la cromatografía de afinidad; primero se separa el ADN del ARN, utilizando una columna gDNA Eliminator, la cual tiene una membrana que retiene al ADN y deja pasar los restos celulares y el ARN en la fase móvil orgánica. Luego, para separar el ARN de los restos celulares, se agrega etanol al 70%, de tal manera que el ARN queda en la fase acuosa, y se agrega esta mezcla sobre una columna RNeasy, que tiene una membrana de sílica que tiene una alta afinidad por el ARN. Por último, se realizan varios lavados a la membrana con soluciones tampón que contienen etanol, para eliminar cualquier resto no deseado, y se eluye el ARN con agua libre de ARNasas.

Ahora bien, para cuantificar y medir la pureza del ARN extraído, se utiliza un espectrofotómetro DeNovix. Para los ácidos nucleicos se usan principalmente 3 longitudes de onda en el rango de ultravioleta (UV): A 260 nm se mide la cantidad de ARN o ADN presente en la muestra, multiplicado la absorbancia por el factor de conversión (basado en el coeficiente de extinción único para cada ácido nucleico); a 280 nm se estiman la cantidad de proteínas considerando que los aminoácidos aromáticos absorben en esta longitud, y a 230 nm se determina la cantidad de otros contaminantes como etanol o tiocionato de guanidina presente en las soluciones de la extracción. A continuación, se presenta una tabla con los resultados de los ARN extraídos de las células SiHa y HaCat (controles y tratamiento).

Tabla 14.*Resultados de cuantificación del ARN extraído con RNeasy Plus Mini kit*

Muestra de ARN	Concentración	Factor	A260	A260 / A280	A260 / A230
SiHa (S1)	42,496 ng/uL	40,00	1,0624	1,90	1,41
SiHa mock (S2)	24,143 ng/uL	40,00	0,6036	1,38	0,68
SiHa IFN- <i>k</i> (S3)	15,955 ng/uL	40,00	0,3889	1,96	0,95
HaCat (H1)	47,982 ng/uL	40,00	1,1996	1,92	1,00
HaCat mock (H2)	72,788 ng/uL	40,00	1,9197	1,98	1,29
HaCat IFN- <i>k</i> (H3)	149,172 ng/uL	40,00	3,7293	2,07	0,86

Un ARN puro presenta una relación A260/A280 = 1,9 - 2,1 y una relación A260/A230 = 2,0 - 2,2. Sin embargo, valores mayores a 1,7 son aceptables. En este caso la mayoría de las muestras de ARN extraídas de las células tuvieron una pureza adecuada respecto a contaminación con proteínas, a excepción de la muestra SiHa + pCMV-empty. Sin embargo, todas las muestras parecen tener una contaminación con etanol, porque se encuentran por debajo de los rangos establecidos en la relación A260/A230. Esto último se podría mejorar realizando una segunda centrifugación antes de eluir el ARN con el agua libre de nucleasas, para eliminar la mayor cantidad posible de las soluciones de lavado que contienen etanol.

5.3.2 Retrotranscripción del ARN a ADNc

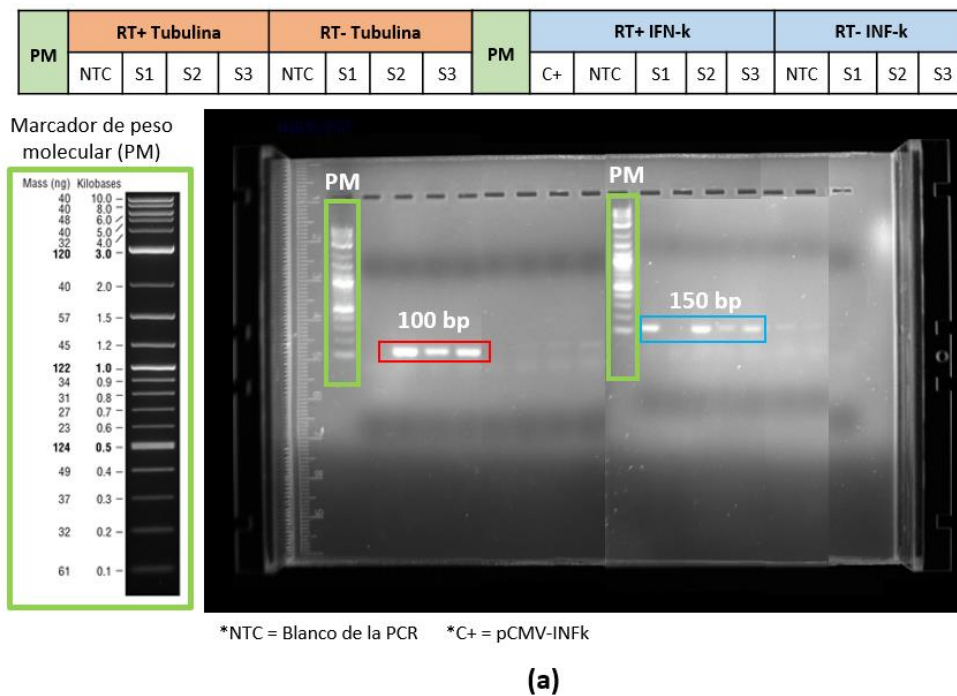
Con el propósito de determinar cualitativamente la reexpresión del IFN-*k* en las células SiHa y HaCat, se realizó una retro transcripción del ARN extraído. Para ello se utilizó el kit LunaScript RT SuperMix, el cual viene con un vial LunaScript RT SuperMix y otro vial de No-RT Control Mix. El primero cuenta con: la transcriptasa inversa termoestable Luna, que permite la síntesis del ADN complementario (ADNc) a temperaturas elevadas; cebadores aleatorios de

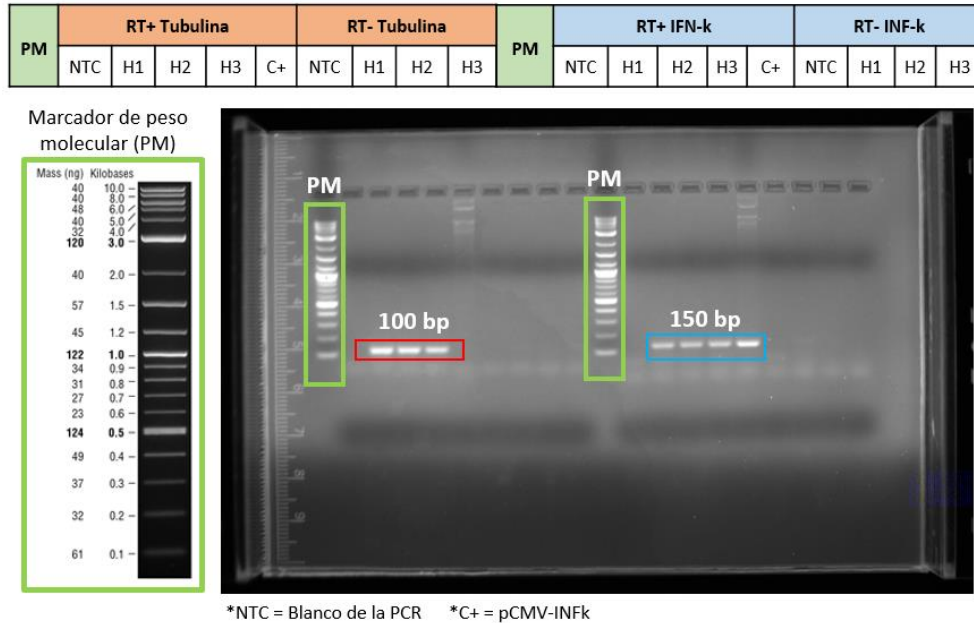
hexanucleotidos y poli-dT que tienen una cobertura uniforme a lo largo de los objetivos poly A; y el inhibidor de ARNasa murina para proteger el ARN molde de degradación. El segundo, se utiliza como un control para verificar la presencia de ADN genómico o productos de arrastre durante la extracción del ARN, que pueden interferir en la cuantificación específica. Una vez completado el proceso de RT-PCR se obtuvo el ADNc, a partir del cual se amplificó la tubulina (como control de eficiencia de la RT-PCR) y el IFN-*k* (figura 22).

La electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados de la RT (+) y RT (-) permitió confirmar que los reactivos empleados en las PCR (NTC) y las muestras de ARN extraídas no se encuentran contaminados con ADN, puesto que en la RT (-) tanto de la tubulina como del IFN-*k* no se observó ninguna banda amplificada.

Figura 22.

Confirmación del transcrito de IFN-*k* en las células SiHa y HaCat transfectadas





(b)

Nota: Resultados de la RT-PCR del ARN extraído de células (a) SiHa y (b) HaCat

Por otra parte, los resultados de la RT (+) de tubulina demuestran que se llevó a cabo de manera correcta la extracción de ARN y la RT-PCR, puesto que la tubulina, al ser un gen constitutivo que se encuentra en todas las células sirve como punto referencia en los procesos de extracción de material genético y como control de que no se inhibió la PCR. Además, los resultados de la RT (+) del IFN-*k*, muestran una banda entre 100 y 200 bp, correspondiente al tamaño de la región amplificada por los cebadores de IFN-*k* utilizados, permitiendo confirmar cualitativamente la presencia del transcrito IFN-*k* en las células SiHa y HaCat. Sin embargo, se observa la banda del IFN-*k* tanto en las células control (sin transfección y transfectadas con pCMV-empty) y tratamiento (transfectadas con pCMV-IFNk), indicando que las células por sí mismas tienen una expresión basal mínima de esta proteína. Por lo tanto, con estos resultados no fue posible

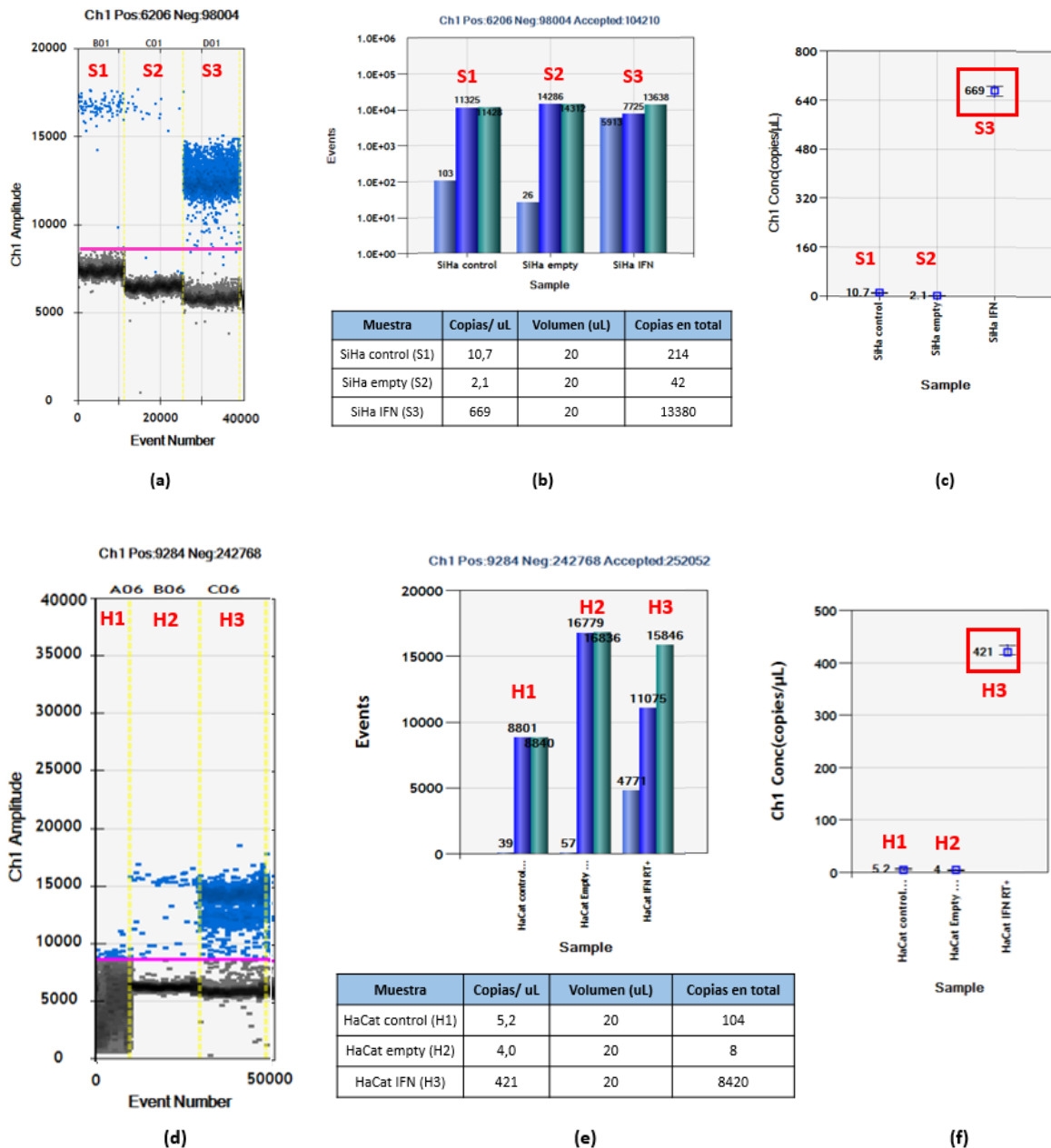
determinar la reexpresión esta citoquina y fue necesario realizar la cuantificación del ADNc para comparar su concentración en estado basal y luego de la transfección.

5.3.3 Cuantificación absoluta del ADNc por ddPCR

La tecnología Droplet Digital PCR (ddPCR) es un método de PCR de tercera generación que permite una detección ultrasensible de ácidos nucleicos y su cuantificación absoluta. Su sensibilidad es debida al sistema de emulsión de gotas agua-aceite que forma miles de particiones que separan las moléculas de ADN molde, convirtiendo cada gota en un espacio en donde se amplifica el ADN. En la PCR convencional, se realiza una sola medición por muestra, mientras que en ddPCR, la muestra se divide en gotas del tamaño de 1 nL, permitiendo la medición de mínimo 10.000 eventos de amplificación independientes dentro de una misma muestra. Después de la amplificación del ADNc (obtenido en el paso anterior de retrotranscripción), las muestras se analizan en el lector de gotas QX200, en donde se mide la cantidad de ADNc en cada gota por medio de un sistema de detección de fluorescencia con dos canales ópticos, que cuenta tanto las gotas PCR positivas como PCR negativas; las cuales se diferencian porque las primeras, que contienen al menos una copia del blanco, exhiben una mayor intensidad del fluoroforo FAM en comparación con las últimas. Con base en lo anterior, se obtuvieron los siguientes resultados para las células SiHa y HaCat con sus respectivos controles y tratamientos:

Figura 23.

Cuantificación del número de copias de IFN-*k* en las líneas celulares transfectadas por medio de PCR de tercera generación (ddPCR)

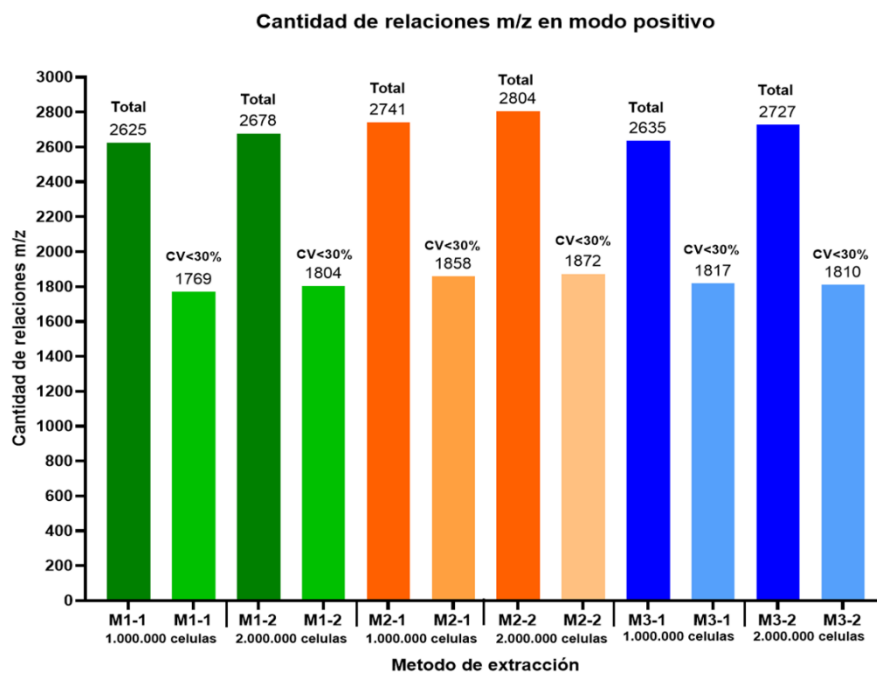


Nota: (a-d) Número de eventos totales vs. la detección de fluorescencia FAM en el canal óptico 1 (Ch1). (b-e) Cantidad de eventos totales, positivos y negativos para cada muestra (c-f) Concentración del ADNc de IFN-*k* (copias/uL de muestra).

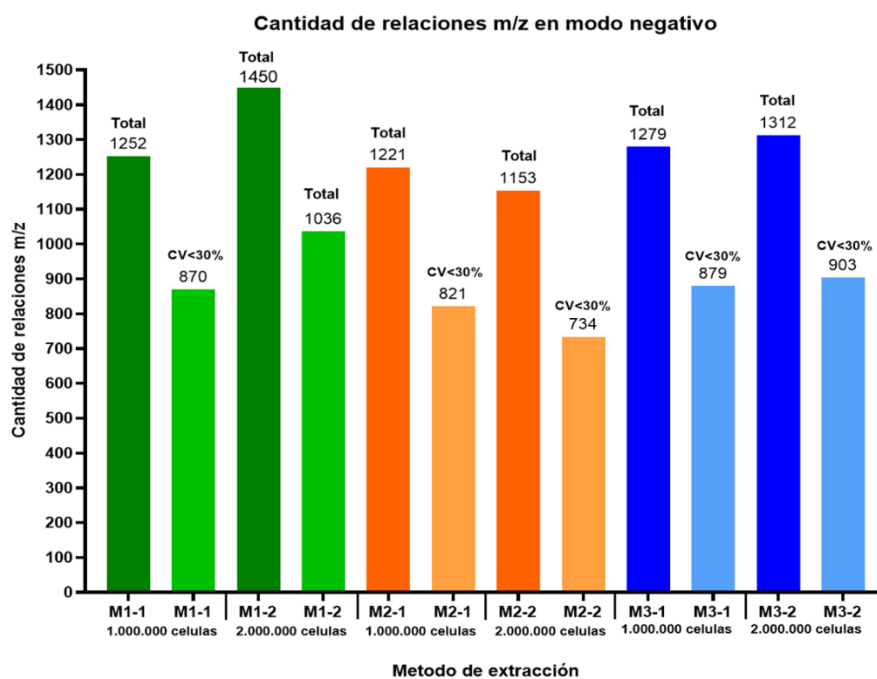
Los resultados de la ddPCR procesados en el software QuantaSoft (QuantaSoft Software, versión 1.7, Bio-Rad), permiten analizar el número de eventos (gotas generadas) y la cuantificación absoluta del ADNc en cada muestra. En la gráfica 22a-d se relacionan el número de eventos totales vs. la detección de fluorescencia FAM en el canal óptico 1 (Ch1). Aquí se puede determinar que la intensidad de fluorescencia para gotas PCR negativas (representadas con puntos negros) es menor a 10.000, por ende, este valor fue el umbral para designar las gotas PCR positivas (representadas con puntos azules). Además, se observó en primera instancia que la cantidad de gotas con el target amplificado (IFN-*k*) es muy significativa en las células SiHa y HaCat transfectadas, puesto que hay una alta densidad de puntos azules para estas muestras. Posteriormente, se generó una gráfica de barras (gráfica 22 b-e), en donde se muestran la cantidad de eventos totales, positivos y negativos para cada muestra; obteniendo un número de gotas totales mayor a 10.000 para la mayoría de las muestras (a excepción de la muestra control HaCat que solo tuvo 8840), predominando la cantidad de eventos positivos sobre los negativos. Estos resultados permiten determinar que la eficiencia en el proceso de formación de gotas en el cartucho está entre un 50 y 80 %, generando unos resultados estadísticamente confiables. Finalmente, en la gráfica 22 c-f se muestra la concentración del IFN-*k* (copias/uL de muestra) que al multiplicarse por los 20 uL de Master mix utilizada, calculan el número de copias totales. Con estos resultados se puede determinar con mayor certeza la reexpresión del IFN-*k*, mediada por el proceso de transfección transitoria las líneas celulares de estudio, puesto que las muestras control 1 (sin transfección) y control 2 (transfectadas con pCMV-empty) tienen un número de copias de IFN-*k* entre 40 y 215, mientras que las células tratamiento (transfectadas con pCMV-IFN*k*) tienen un número de copias de 13.380 (SiHa) y 8.420 (HaCat).

5.4 Estandarización del método de extracción de los metabolitos

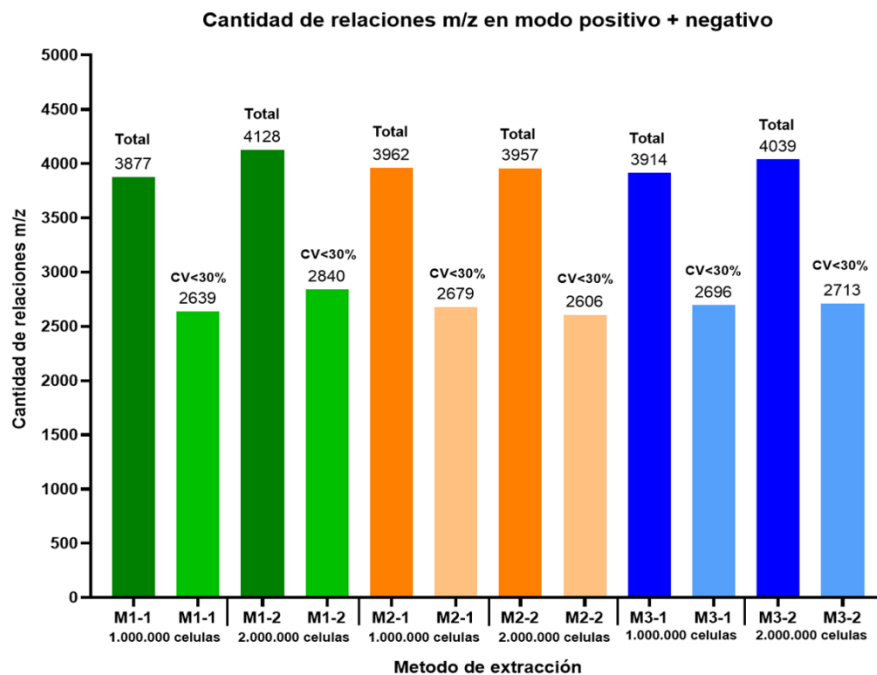
La preparación de la muestra en un análisis metabolómico es fundamental, considerando que de este proceso depende la cantidad de metabolitos extraídos y por ende la calidad de los resultados a la hora de determinar las rutas metabólicas diferenciales entre controles y tratamientos. Así pues, para estandarizar el método de extracción de los metabolitos en células adherentes de mamífero, se tomó como referencia el protocolo del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (Protocols Used for LC-MS Analysis – Metabolomics Core Facility, n.d.), variando el número de células SiHa de 1 a 2×10^6 , para determinar cuál era la cantidad mínima de células que permitían detectar más de 1000 características (relaciones m/z representativas) junto con el solvente de extracción (sección 6.4.1, tabla 10). Estas muestras se analizaron por la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Orbitrap/HRMS), la cual se caracteriza por su capacidad de separar los analitos con constantes de distribución muy cercanas (K_D) gracias a la dimensión de la columna (longitud, diámetro interno y grosor de la fase estacionaria); y por la precisión del analizador-detector Orbitrap, que funciona como una trampa de iones que los separa de acuerdo a su relación m/z y a su frecuencia de oscilación en un campo eléctrico (E. Stashenko et al., 2009). Los datos obtenidos de estos análisis se procesaron en el software XCMS para corregir el tiempo de retención e integrar los picos detectados en los triplicados de muestras de cada método. Luego estas muestras se compararon con el control de calidad, para validar el método analítico y filtrar los datos obtenidos, por medio de la varianza de las intensidades de una relación m/z entre las réplicas. Aquellas con un coeficiente de variación mayor al 30% fueron eliminadas del análisis. En la figura 24 se muestran la cantidad de datos crudos y filtrados, en modo de iones positivo y negativo, para cada método de extracción.

Figura 24.*Cantidad de relaciones m/z correspondientes a metabolitos extraídos en cada método*

(a)



(b)



(c)

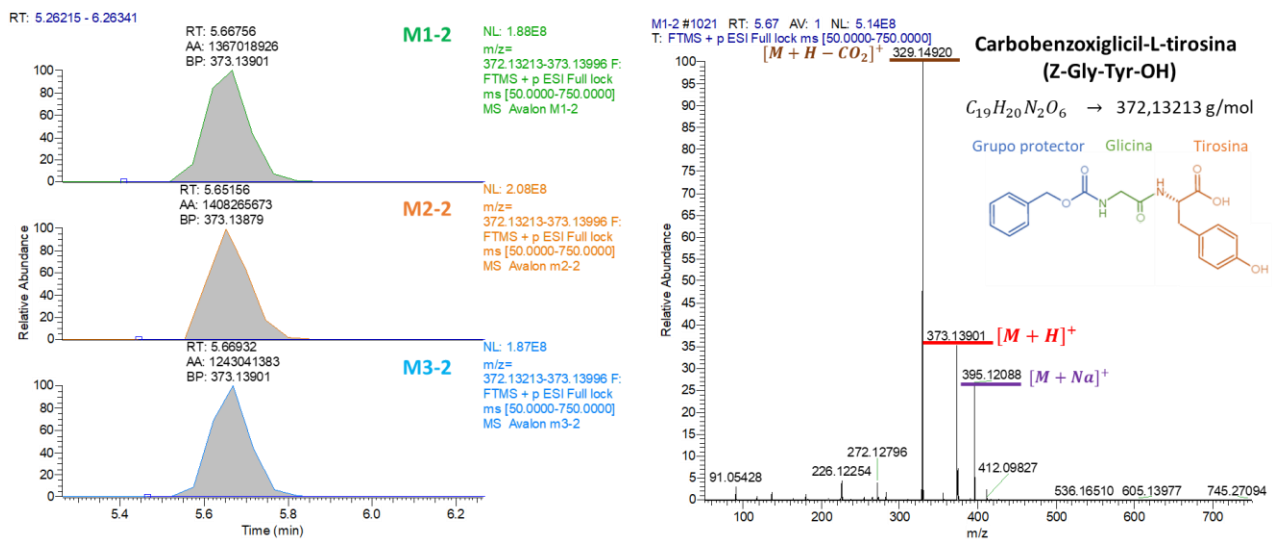
Nota: Cantidad de relaciones m/z : (a) detectadas en modo positivo con aducto $[M+H]^+$ (b) detectadas en modo negativo con aducto $[M-H]^-$ (c) totales.

De acuerdo con las gráficas de barras, se observó que no hay una variación significativa entre cada método de extracción, indicando que se pueden utilizar 1 o 2 millones de células para los análisis posteriores. Inicialmente, el método M2-2 condujo a una mayor cantidad de características (relaciones m/z) en modo de iones positivo (2804 en total). Sin embargo, cuando se filtraron los datos con un coeficiente de variación menor al 30%, todos los métodos resultaron en promedio un total de 1800 características (figura 24a). En el caso de las relaciones m/z en modo de iones negativo (figura 24b), el método de mayor cantidad fue el M1-2, tanto de los datos crudos (1450 en total) como de los corregidos (1036). No obstante, al sumar la cantidad de características corregidas tanto en modo de iones positivo como negativo (figura 24c) se observó que todos los métodos resultaron en alrededor de 2600 a 2800 características.

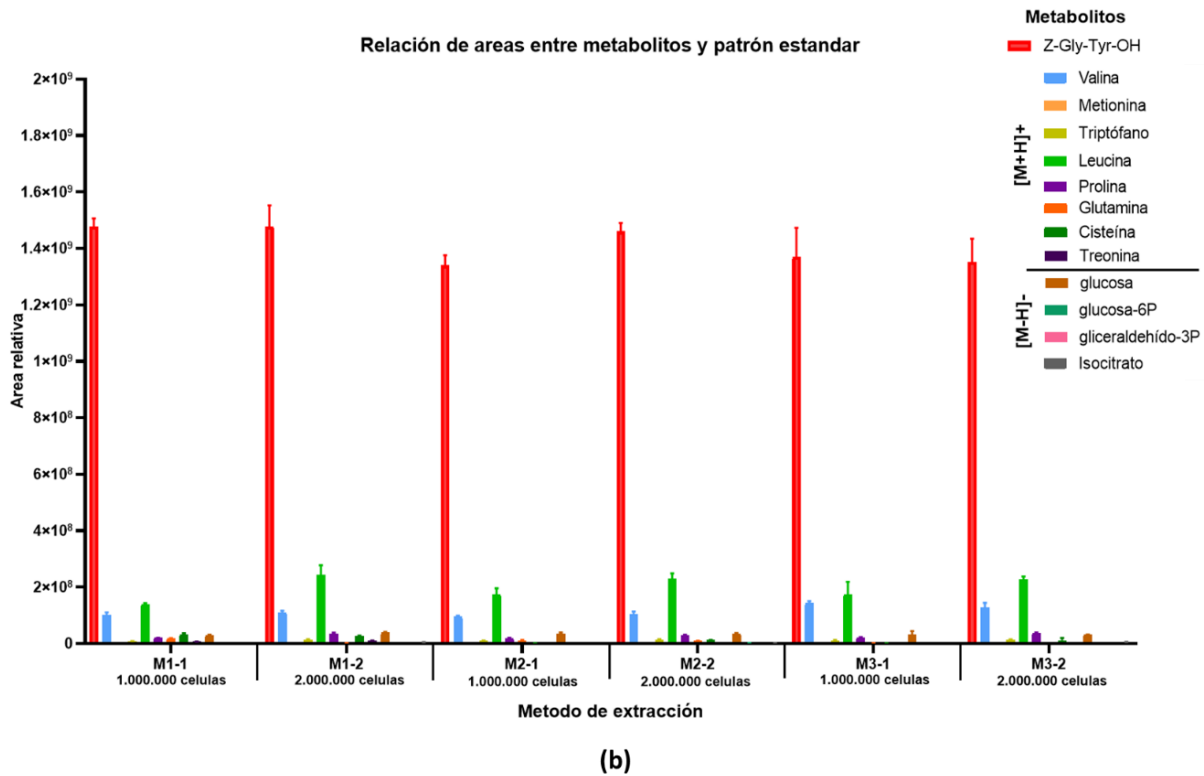
Ahora bien, el hecho de que un método logre extraer la mayor cantidad de características no implica necesariamente que obtenga los compuestos en una alta concentración. Para analizar si habían diferencias en este aspecto entre los métodos, se compararon las áreas relativas del patrón interno (Z-Gly-Tyr-OH) con la de doce metabolitos (seleccionados como metabolitos involucrados en las principales rutas metabólicas) que forman aductos $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$. En el software Xcalibur se analizaron los resultados respecto a la presencia de los iones moleculares, iones fragmento y áreas relativas (apéndice A) de los metabolitos seleccionados, para relacionar con el porcentaje de recuperación y reproducibilidad de los métodos (Figura 25).

Figura 25.

Eficiencia de los métodos de extracción comparando las áreas relativas del patrón interno con las de algunos metabolitos implicados en las principales rutas metabólicas



(a)



Nota: (a) Cromatograma y espectro de masas del patrón interno (Z-Gly-Tyr-OH) analizado con el método de extracción M3-2 (b) Área relativa del patrón interno y de los metabolitos seleccionados, con los diferentes métodos de extracción.

Estos resultados permitieron concluir una vez más que no hay diferencias muy relevantes entre los métodos de extracción, todos mostraron un porcentaje de recuperación similar y, en general, todo el proceso después de extracción se llevó a cabo correctamente, ya que el patrón interno fue adicionado en las soluciones de extracción, se siguió todo el protocolo establecido, y en todos los métodos la concentración de este patrón es muy similar. A partir de estos análisis, se decidió implementar el método de extracción M3-2, para tener una solución de extracción de polaridad alta y media, afín con la naturaleza de un amplio rango de metabolitos; y también se optó por bajar la concentración del patrón interno de 5 ppm a 0,5 ppm para el siguiente estudio de análisis metabólico no dirigido.

5.5 Análisis metabolómico no dirigido de las células control y tratamiento

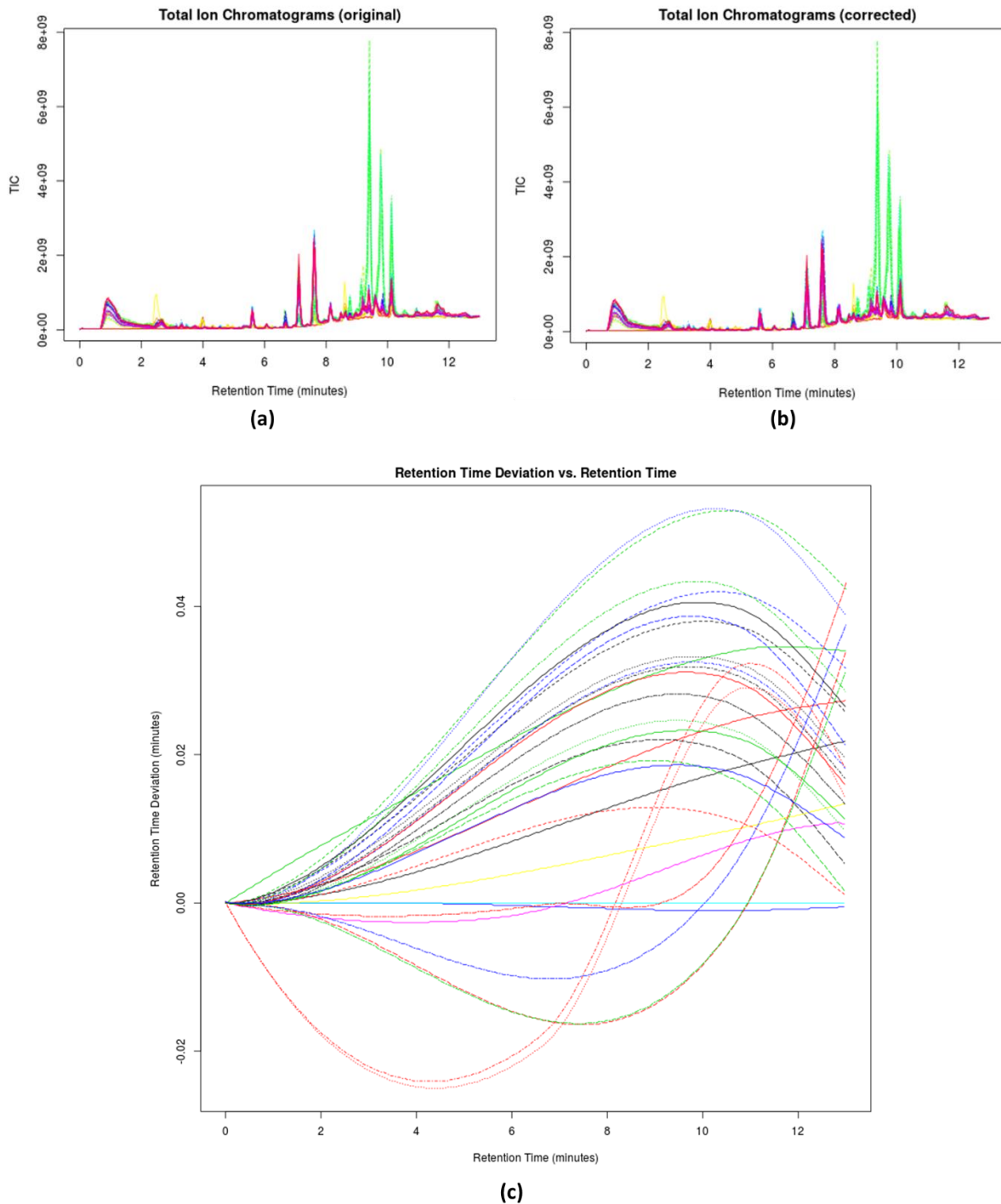
Una vez determinado el método de extracción de metabolitos y comprobada la reexpresión del IFN- κ en las células de estudio; se procedió a escalar la transfección mediada por lípidos, para realizar el análisis metabólico aplicando una estrategia no dirigida. Para ello, se cultivaron 2×10^6 células SiHa y HaCat, se transfectaron y se extrajeron los metabolitos pasadas 48 h de transfección siguiendo el método M3-2. Al igual que en la transfección a pequeña escala en los platos de 24 pozos (tabla 13), se observó un cambio en la morfología de las células SiHa transfectadas con el plásmido pCMV-IFN κ . Tal y como se describió en la sección 7.2, las células tratadas con IFN- κ se observaron deterioradas, despegadas, con una disminución en su tamaño y en su proliferación; características fisiológicas asociadas con la muerte celular por apoptosis o necrosis.

5.5.1 Procesamiento de los datos cromatográficos y espectrales en el software XCMS

Los datos crudos de los experimentos analizados por la técnica UHPLC-Orbitrap/HRMS, se procesaron en el software XCMS para reducir el ruido, corregir el tiempo de retención con respecto a su desviación, alinear el cromatograma de iones totales (TIC) y detectar e integrar los picos (ver ejemplo en la figura 26). En este software se realizaron seis trabajos multigrupo utilizando los parámetros descritos en la sección 6.4.3. En el primero y segundo se compararon todos los grupos de muestras con el control de calidad (QC), para validar la técnica analítica. Posteriormente, para resolver la pregunta de investigación de este proyecto, se compararon los controles y tratamiento de las células SiHa (tercer y cuarto trabajo) y HaCat (quinto y sexto trabajo). Los trabajos pares (2, 4 y 6) se llevaron a cabo con los datos crudos adquiridos en modo positivo y los impares (1, 3 y 5) con los datos crudos obtenidos en modo negativo.

Figura 26.

Resultados del procesamiento de las muestras en el primer trabajo multigrupo



Nota: (a) Cromatograma de iones totales original, (b) Cromatograma de iones totales corregido, (c) Desviación del tiempo de retención vs. Tiempo de retención.

De acuerdo a Smith y colaboradores (2006), la separación y detección simultáneas de analitos mediante LC y MS genera conjuntos de datos complejos que requieren un procesamiento significativo antes de que se puedan analizar estadísticamente las múltiples muestras. El análisis multigrupo de XCMS permite la comparación de más de dos grupos de muestras independientes, para identificar las características de metabolitos cuyo patrón de variación es estadísticamente significativo, por medio de análisis de varianza univariado (ANOVA). Dentro de este análisis se utilizan una serie de algoritmos para caracterizar de manera reproducible los picos en los tres espacios dimensionales de tiempo, masa e intensidad. El algoritmo seleccionado para la detección de picos fue centWave, puesto que se ha reportado en el suavizado de datos de espectrometría de masas de alta resolución; junto con el algoritmo estándar obiwarp para la corrección del tiempo de retención (Forsberg et al., 2018). De manera general, se observó en todos los trabajos realizados que el cromatograma de iones totales (TIC) original (figura 26a) no se diferenció significativamente del TIC corregido (figura 26b), lo cual indica que las condiciones de la corrida cromatográfica fueron estables y que la corrección aplicada tuvo un impacto mínimo en el perfil del cromatograma.

Una vez identificados los picos significativos en las muestras individuales, estos se compararon entre muestras para realizar el cálculo de las desviaciones del tiempo de retención y la comparación de la intensidad de iones relativa, utilizando secciones de intervalo fijo de 0,025 m/z de ancho para hacer coincidir los picos en el dominio de masas. Los perfiles de desviación del tiempo de retención utilizados para alinear los análisis de los grupos de muestras, resultan de comparar la mediana del tiempo de retención y la desviación de la mediana para cada muestra de un grupo (figura 26c), en donde una desviación positiva indica que la muestra eluyó después del

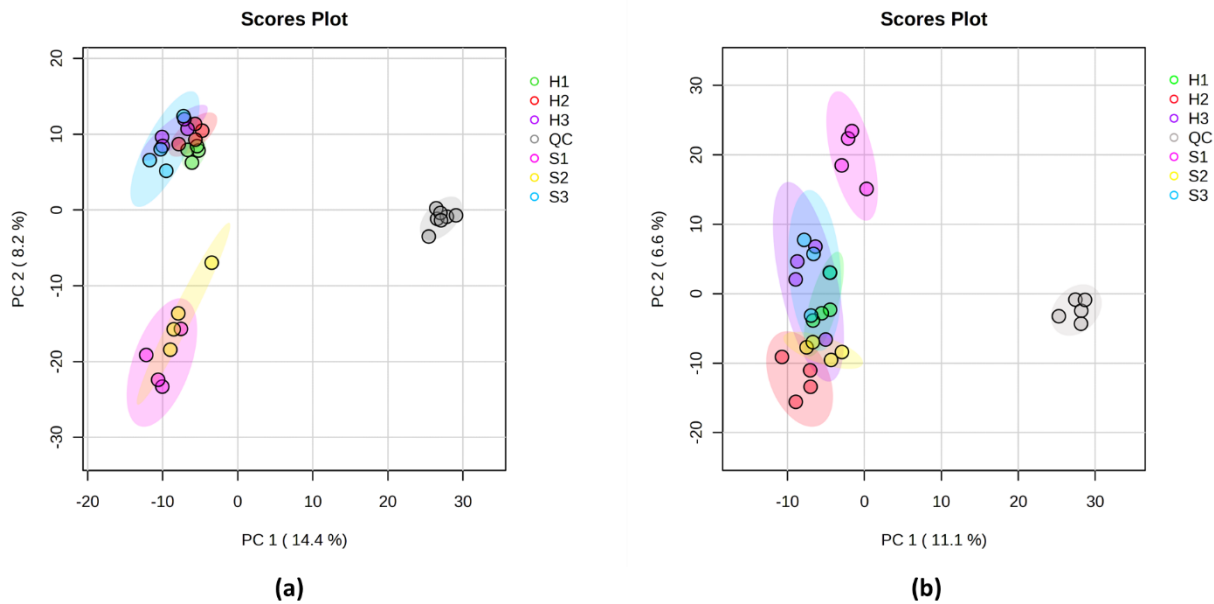
tiempo medio de retención y una desviación negativa indica que la muestra eluyó antes del tiempo medio de retención (Smith et al., 2006).

5.5.2 Validación de la técnica analítica con el control de calidad

Como resultado del anterior procesamiento de los datos crudos, se obtuvieron las matrices con las intensidades de las características detectadas (relaciones m/z) para cada grupo de muestras, tanto en el modo de iones positivo como negativo. Estas matrices de datos se filtraron en función del coeficiente de variación (CV) de las muestras de control de calidad (QC), en donde se eliminaron los datos con un $CV > 30\%$. Originalmente la matriz del trabajo 1 contenía 5239 características y el trabajo 2 contenía 4192. Luego del filtro, el trabajo 1 resultó con 2239 características y el trabajo 2 con 1679. Una vez depurados los datos, se generó la matriz de datos con las características (m/z) y sus respectivos valores de intensidad en cada una de las réplicas, para verificar la calidad del método analítico visualizando el comportamiento de las muestras por medio de un Análisis de Componentes Principales (PCA) en el software Metaboanalyst 5.0. Los datos empleados en el PCA fueron normalizados y escalados para corregir las diferencias de intensidad máxima no deseadas y para estabilizar la variación dentro del conjunto de datos. La normalización aplicada fue por suma, en donde cada valor intensidad de una característica se divide por la suma total de las intensidades de la misma característica y el cociente se multiplica por 100, para expresar en unidades de porcentaje. El enfoque de escala fue autoescalado en donde cada pico está centrado en la media y dividido por la desviación estándar de la columna, haciendo que la desviación estándar de cada metabolito sea igual a 1 (Di Guida et al., 2016).

Figura 27.

Análisis de Componentes Principales de las muestras de estudio frente al control de calidad



Nota: (a) Trabajo 1: Comparación de todas las muestras vs QC en modo de iones positivo, (b) trabajo 2: comparación de todas las muestras vs QC en modo de iones negativo.

Los análisis el control de calidad permiten validar los datos para asegurar que las diferencias significativas observadas entre los grupos de muestras se deben realmente a un cambio en las intensidades de las características, y no a factores de azar (extracción equivocada de alguna muestra, corrida cromatográfica deficiente, errores técnicos, entre otros). A partir del agrupamiento de las muestras en los PCA se puede observar que las réplicas de la muestra de QC tanto en modo de iones positivo (figura 27a) como negativo (figura 27b), están agrupadas entre sí (representadas en color gris) y no se superponen con las muestras de estudio, logrando una separación en la componente principal 1 (PC1) con valores superiores al 10% y en la componente principal 2 (PC2) mayores al 7%. Estos resultados, permiten comprobar que no hay problemas con la calidad del ensayo y que efectivamente las diferencias que se observarán al comparar los

controles y tratamiento de las células SiHa y HaCat, serán producto de cambios en los perfiles metabólicos.

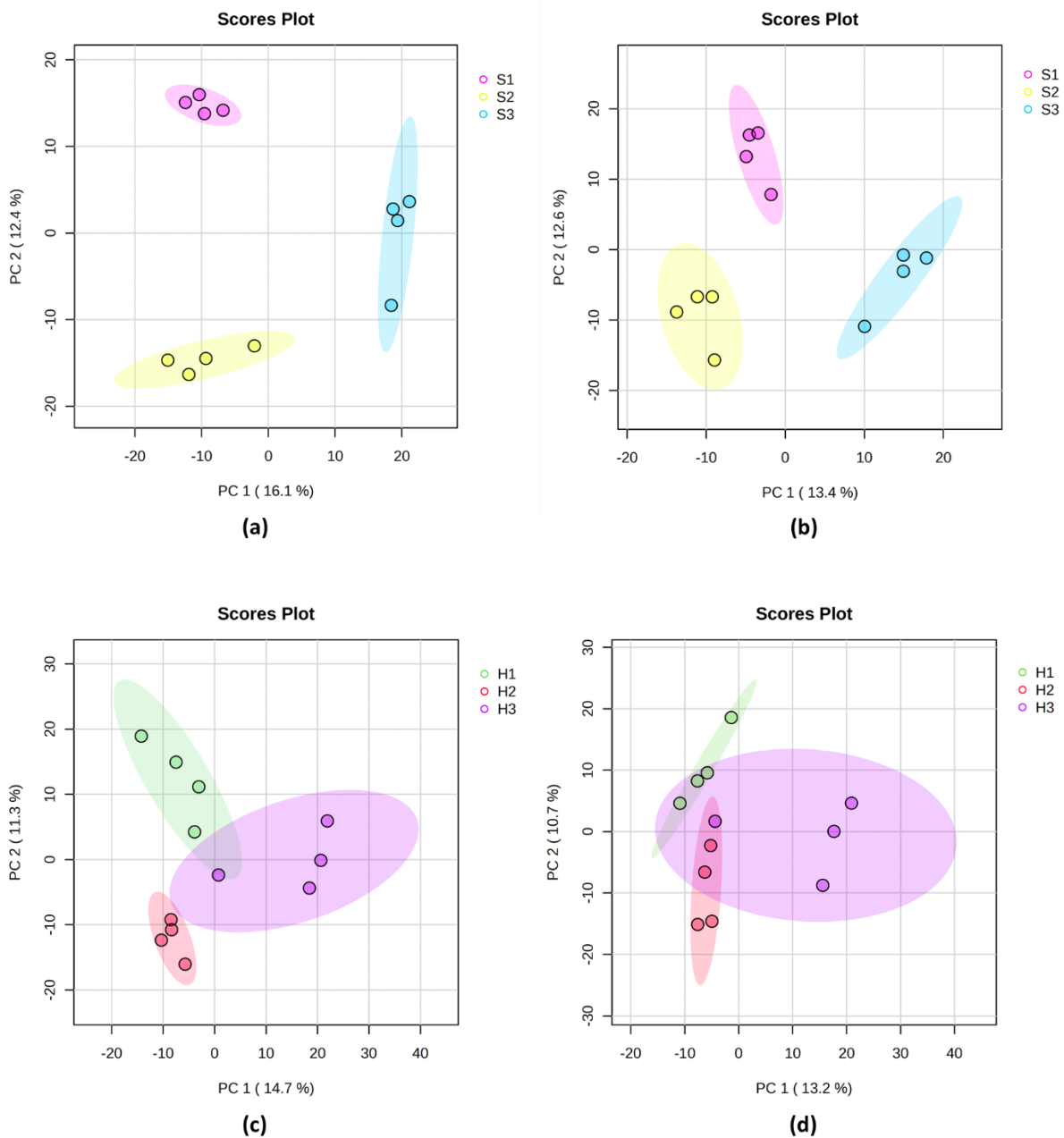
5.5.3 Análisis estadísticos multivariados de los controles y tratamiento en las células de estudio

Los análisis multivariados utilizan los promedios ponderados para reducir las variables originales en menos variables, siendo útiles para el análisis exploratorio de datos, partiendo de la premisa: ¿Hay diferencias significativas entre los grupos de muestras? Así pues, para analizar si había tendencias de clasificación intergrupala entre los controles y tratamiento de las células SiHa y HaCat, se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA) con los datos filtrados y normalizados, utilizando los parámetros mencionados anteriormente. Estas matrices de datos se filtraron en función del coeficiente de variación (CV) de las muestras de control de calidad, en donde se eliminaron los datos con un $CV > 30\%$. Originalmente las matrices de las células SiHa contenían 4637 características en modo positivo y 3687 en modo negativo; luego de la filtración, resultaron 1922 y 1361 características, respectivamente. En el caso de las células HaCat las matrices originales contenían 3974 características en modo positivo y 3330 en modo negativo; luego de la filtración, resultaron 1607 y 1356 características, respectivamente.

El objetivo del PCA es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos (por una transformación lineal) al resumir la información en un conjunto más pequeño de componentes principales. Estas componentes se ordenan según la varianza explicada de los datos y cuanto mayor sea este valor en una componente, mayor será la cantidad de información que retiene el conjunto de datos original (Chen et al., 2022).

Figura 28.

Análisis de Componentes Principales de los controles y tratamiento de las células de estudio



Nota: Comparación de los controles (S1 y S2) y tratamiento (S3) en las células SiHa **(a)** trabajo 3: S1 vs S2 vs S3 en modo positivo, **(b)** trabajo 4: S1 vs S2 vs S3 en modo negativo. Comparación de los controles (H1 y H2) y tratamiento (H3) en las células HaCat **(c)** trabajo 5: H1 vs H2 vs H3 en modo positivo, **(d)** trabajo 6: H1 vs H2 vs H3 en modo negativo.

Así pues, el PCA es un método que permite estudiar disposiciones de datos complejas, como los espectros de masas, considerando que se puede utilizar para estudiar la similitud en los espectros de masas de las muestras a través de gráficas de puntuación, que representa la covarianza de las mismas a través de dos ejes de coordenadas. En este sentido, las muestras que están próximas en un gráfico de puntuaciones se clasificarán en un mismo grupo, ya que seguramente tienen espectros de masas similares, y por lo tanto presentarán perfiles metabólicos parecidos (Worley & Powers, 2016).

De acuerdo a los resultados presentados en la figura 28, se observa que las distribuciones obtenidas en modo de iones positivo y negativo para las células de estudio fueron ocasionadas por una varianza explicada mayor al 10% en las componentes principales 1 y 2. Adicionalmente, se puede analizar que los controles se diferenciaron del tratamiento en PC1, mientras que los controles se separaron entre sí en PC2. En el caso de las células SiHa (figura 28 a y b), las réplicas de un mismo grupo presentaron una baja dispersión y no se presentó una superposición intergrupala, permitiendo una clara separación de S1, S2 y S3. Respecto a las células HaCat (figura 28 c y d), se observa que una de las cuatro réplicas del tratamiento (H3) presenta una dispersión alta, ocasionando una superposición intergrupala con los controles (H1 y H2). Esto indica que esta réplica biológica probablemente no fue transfectada correctamente y por ende no tuvo una reexpresión efectiva del IFN-*k*, presentando un perfil metabólico de una muestra control.

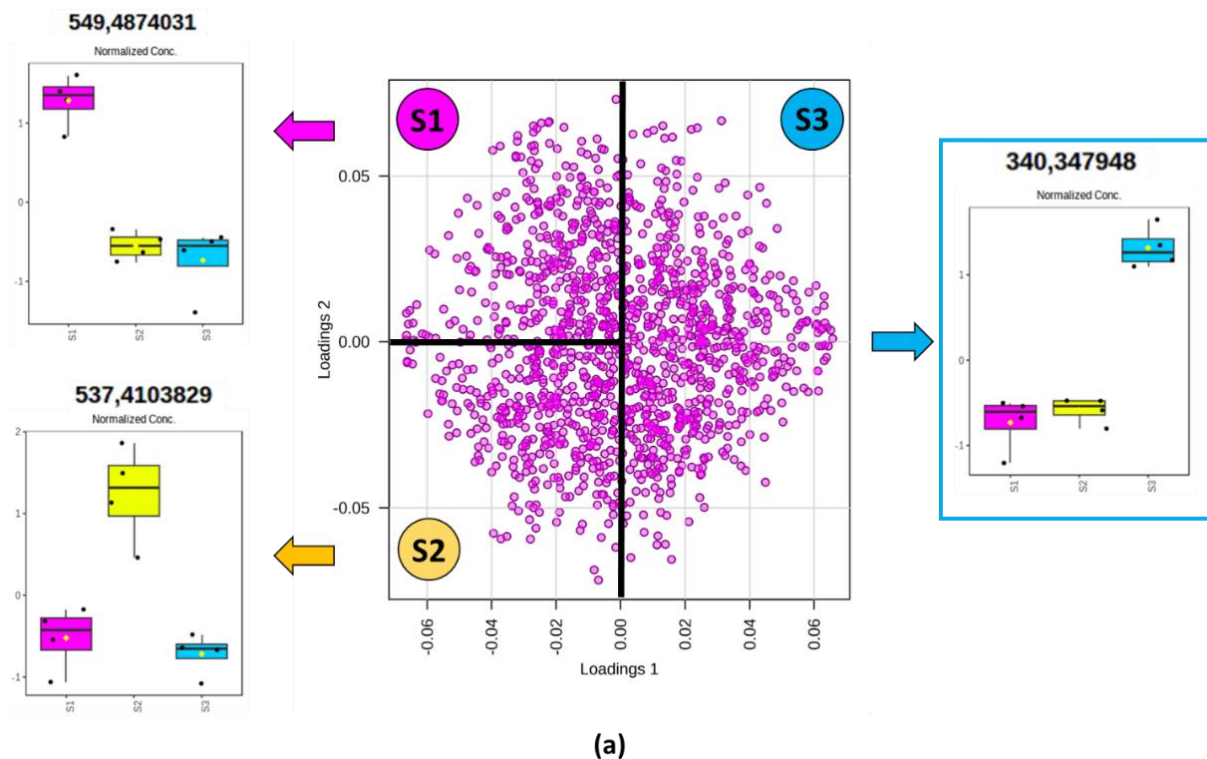
Estos resultados exploratorios en los PCA muestran que efectivamente hay diferencias entre los perfiles metabólicos de los controles y tratamiento. Considerando estos análisis se puede inferir que la endocitosis del plásmido vacío (pCMV-empty) y la traducción de los genes que componen este ADN recombinante (promovidos por los sitios promotores CMV) está ocasionando un cambio en el metabolismo en comparación con las células control sin transfección, puesto que

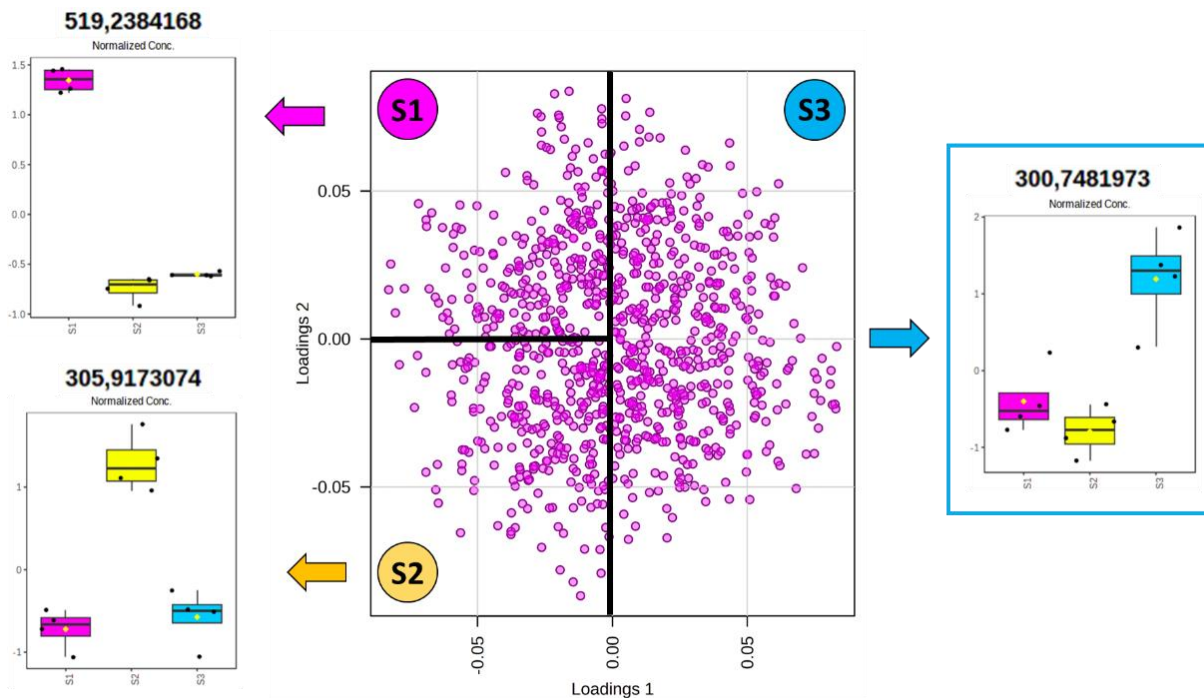
estas muestras se diferenciaron en la componente PC2. Es decir, que los metabolitos modulados únicamente por la reexpresión del IFN- κ , serán aquellos que generaron la varianza explicada en la componente principal PC1.

A partir de estos resultados surge una nueva premisa: ¿Cuántas y cuáles características permitieron diferenciar los grupos de muestras y fueron estadísticamente significativas en el análisis no pareado? Para dar respuesta a esta pregunta se utilizaron en combinación los diagramas de cargas del PCA (loadings plots) junto con la medida de la “importancia de la variable independiente en la proyección (VIP)” del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), generando los resultados que se presentan a continuación:

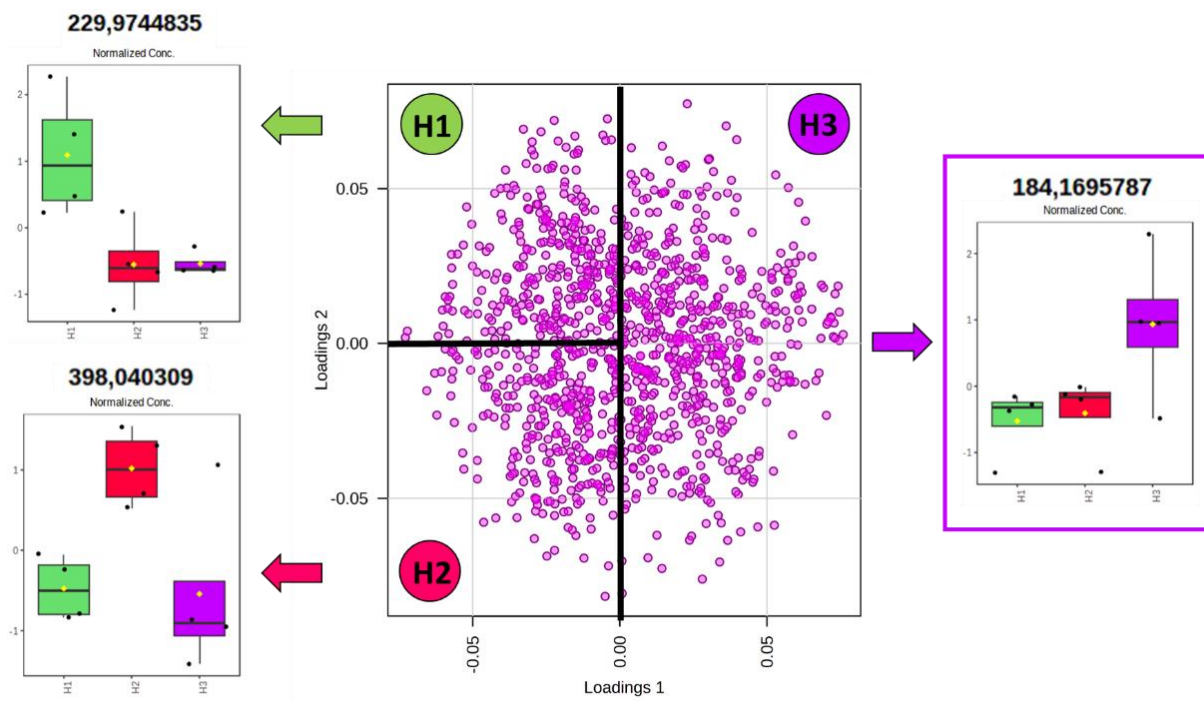
Figura 29.

Diagramas de cargas del PCA de los controles y tratamiento en las células de estudio

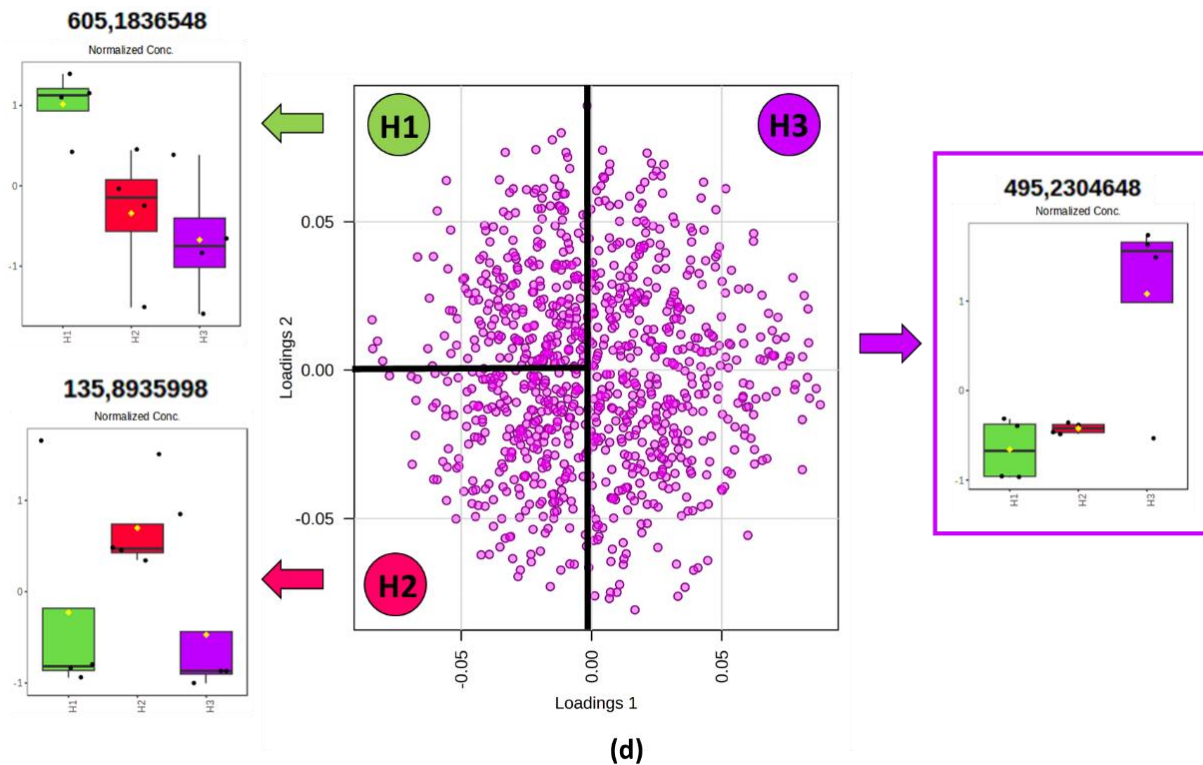




(b)



(c)



Nota: Comparación de los controles (S1 y S2) y tratamiento (S3) en las células SiHa (a) trabajo 3: S1 vs S2 vs S3 en modo de iones positivo, (b) trabajo 4: S1 vs S2 vs S3 en modo de iones negativo. Comparación de los controles (H1 y H2) y tratamiento (H3) en las células HaCat (c) trabajo 5: H1 vs H2 vs H3 en modo de iones positivo, (d) trabajo 6: H1 vs H2 vs H3 en modo de iones negativo.

En primer lugar, en el PCA se calculan los coeficientes de correlación entre los perfiles metabólicos (variables) y los componentes principales. Estos coeficientes se denominan cargas y representan la contribución de cada metabolito (o característica) en cada componente principal. En un diagrama de cargas (loadings plot) los metabolitos se representan como puntos y su posición en el espacio de la gráfica indica su relación con los componentes principales, en donde se puede inferir que las variables cuyas cargas se ubican lejos del origen (0,0) están correlacionadas con la distribución de las muestras en el PCA. Como se muestra en la figura 29, en los PCA los controles (S1 vs S2; H1 vs H2) se diferenciaron del tratamiento (S3; H3) en PC1, mientras que los controles se separaron entre sí en PC2. Este comportamiento se comprueba en los diagramas de cargas

(figura 29), los cuales se dividieron en tres cuadrantes, en relación con la distribución y agrupamiento de las muestras en el PCA. Por ejemplo, para la comparación de los controles y tratamientos en modo de iones positivo para las células SiHa (figura 29a), las réplicas de la muestra S1 se encuentran ubicadas espacialmente en el cuadrante superior izquierdo (negativo en x y positivo en y). Un punto representativo en este cuadrante fue la característica $m/z = 549,4874$ puesto que en el diagrama de cajas se observa aumentada para S1 y constante en proporciones similares para S2 y S3, lo cual indica que esta característica permitió diferenciar al grupo S1 en el PCA. En el caso de las muestras S2 ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo (negativo en x en y) se encontró como significativa la característica $m/z = 537,4104$ considerando que esta aumentada para S2 y constante en proporciones similares para S1 y S3. Para las muestras tratamiento S3, se dispuso de todo el cuadrante superior e inferior derecho (positivo en x , positivo y negativo en y) considerando la ubicación de estas muestras en el PCA; aquí la característica $m/z = 340,3480$ fue representativa puesto que esta aumentada para S3 y constante en proporciones similares para S1 y S2. Este análisis se aplicó tal cual con las otras comparaciones como se observa en la figura 29b, c y d.

Considerando que la hipótesis de estudio refiere a explorar la modulación metabólica ocasionada por la reexpresión del IFN- κ , el enfoque de búsqueda se centró en encontrar las características representativas que lograron diferenciar a las muestras tratadas con el interferón (S3 y H3) de las muestras control (S1, S2 / H1, H2). Por ende, se verificaron los diagramas de cajas de las características más alejadas del origen en el cuadrante derecho y se incluyeron aquellas que presentaban un comportamiento similar al mostrado en los recuadros azules y violetas en la figura 29, es decir, que estuvieran aumentadas o disminuidas para S3 o H3, pero constantes para los controles.

En segundo lugar y sumado a lo anterior, para filtrar la búsqueda de las características representativas se empleó la medida de la importancia de la variable independiente en la proyección (VIP). VIP representa la contribución de cada característica al modelo para incrementar la capacidad predictiva total, es decir, para lograr diferenciar y separar los grupos de muestras (Chen et al., 2022). Las variables con valores bajos de VIP (menores a 1,5 en este estudio) presentan una capacidad débil de predicción, y por lo tanto fueron eliminadas del modelo de regresión. Es decir, se consideraron como representativas las características con VIP mayor a 1,5. Así pues, las características filtradas con loadings plot y VIP para las células SiHa fueron 113 en modo de iones positivo y 63 en modo de iones negativo. En el caso de las células HaCat fueron 81 en modo de iones positivo y 47 en modo de iones negativo (apéndice B).

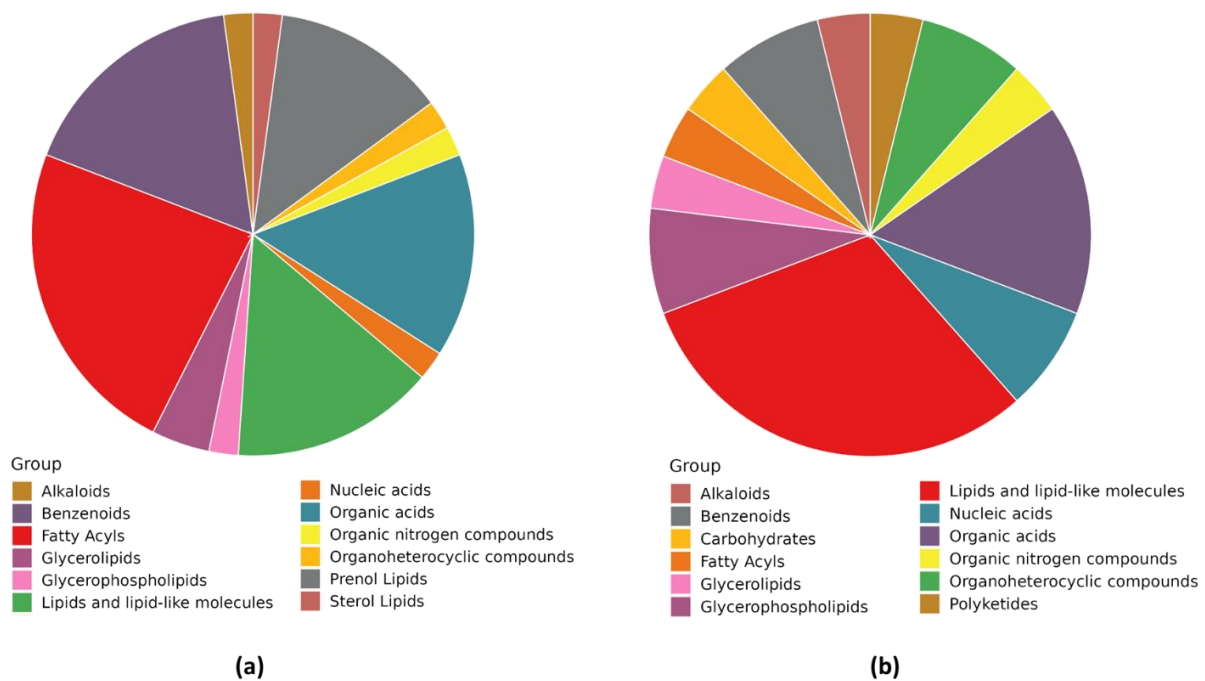
5.5.4 Identificación presuntiva de los metabolitos representativos

La identificación presuntiva de los metabolitos de interés (correspondientes a las características representativas filtradas anteriormente) se llevó a cabo utilizando la plataforma CEU Mass Mediator. Aquí mediante una búsqueda avanzada se ingresaron las relaciones m/z y sus respectivos tiempos de retención (nivel de identificación 3); se filtraron con una tolerancia menor o igual a 5 ppm y se utilizaron principalmente los aductos $[M-H]^-$ y $[M+H]^+$ para el modo de iones negativo y positivo, respectivamente. Sin embargo, cuando no se encontraban metabolitos con estos aductos, se utilizaron $[M+Cl]^-$, $[M-H-H_2O]^-$, $[M-HCOOH-H]^-$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M-HCOOH-H]^+$ y $[M+2H]^{+2}$ como segunda opción. Además, solo se consideraron compuestos funcionalmente relacionados con células de mamífero. Aquellas relaciones m/z que no se encontraban en esta biblioteca o que no cumplían con los requisitos de los filtros de búsqueda, se asignaron como “desconocido” (nivel de identificación 4). Por medio

de esta búsqueda avanzada, se identificaron presuntivamente 79 metabolitos en modo de iones positivo y 12 en modo de iones negativo para las células SiHa. En el caso de las células HaCat fueron 51 metabolitos en modo de iones positivo y 8 en modo de iones negativo (apéndice B).

Figura 30.

Clasificación química de los metabolitos identificados presuntivamente en las células de estudio



Nota: Grupos de metabolitos diferenciales modulados por la reexpresión del IFN-*k* en las células (a) SiHa y (b) HaCat.

Los metabolitos identificados presuntivamente se clasificaron químicamente como alcaloides, benzenoides, ácidos grasos, glicerolipidos, glicerofosfolipidos, prenoles, esteroides, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, carbohidratos, polipéptidos y compuestos orgánicos nitrogenados. Para las células SiHa IFN-*k* (S3) y HaCat IFN-*k* (H3) se encontraron como diferenciales en su mayoría compuestos de carácter lipídico (figura 30), indicando previamente que la reexpresión del IFN-*k* involucra cambios en el metabolismo de los lípidos. Estos metabolitos

se destacan por sus funciones de señalización celular (por ejemplo, inducción de apoptosis), estabilizadores de membrana, almacenamiento y fuente de energía. Dentro de estos compuestos se destacaron: Las glicerofosfolinas PC(18:0/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z), PC(P-18:1(9Z)/14:1(9Z)) y PC(P-16:0/18:3(9Z,12Z,15Z)), quienes han sido reportadas como biomarcadores en cáncer de cuello uterino (Yin et al., 2016); el ácido oleico, caracterizado por la capacidad de activar la expresión del transportador de ácidos grasos CD36, para promover la invasión y proliferación de células de CCU (Li & Sui, 2021); el farnesol como un metabolito estimulante de queratinocitos normales en el desarrollo epidérmico (Hanley et al., 2000); las alfa y beta iononas como estabilizadoras de membranas e inductoras del citocromo-P450 necesario para el metabolismo de compuestos xenobióticos anticancerígenos (Quiñones et al., 2008); y la fosfodietanolamina PE(18:3(6Z,9Z,12Z)/P-18:0) quien actúa como sustrato para importantes modificaciones postraduccionales, fusión de membranas celulares y orgánulos, fosforilación oxidativa y autofagia (Calzada et al., 2016).

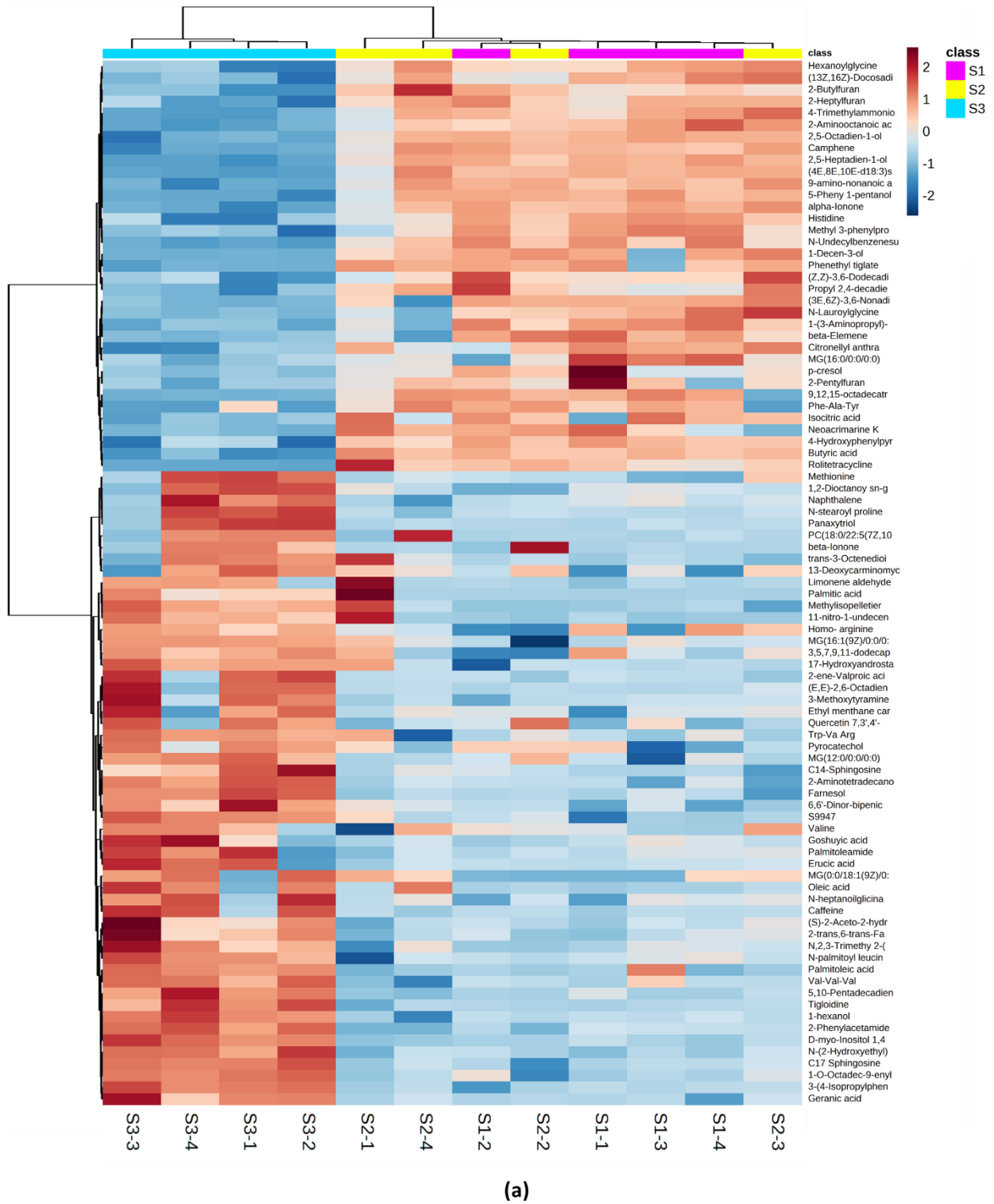
En cuanto a metabolitos relacionados con aminoácidos (incluidos sus derivados N-acetilados y polipéptidos), fueron significativos para S3: histidina, valina, metionina, homocisteína, N-heptenoilglicina, N-hexanoilglicina, N-laurilglicina, N-estearoilprolina, fenilalanil-tirosina (Phe-Tyr), valil-valil-valina (Val-Val-Val), y triptofanil-valil-arginina (Trp-Val-Arg). En el caso de H3 fueron representativos: leucina, trihomometionina, N-acilmetionina, N-propionilmetionina, N-lactoilfenilalanina, N-octadecanoilvalina, fenilalanil-tirosina (Phe-Tyr), fenilalanil-metionil-glicina (Phe-Met-Gly), triptofanil-valil-arginina (Trp-Val-Arg) y arginil-metionil-arginina. Estos metabolitos se destacan generalmente por estar implicados en el metabolismo central del carbono y son fundamentales para la obtención de energía y síntesis de moléculas necesarias para el funcionamiento celular, como las proteínas. Adicionalmente, se

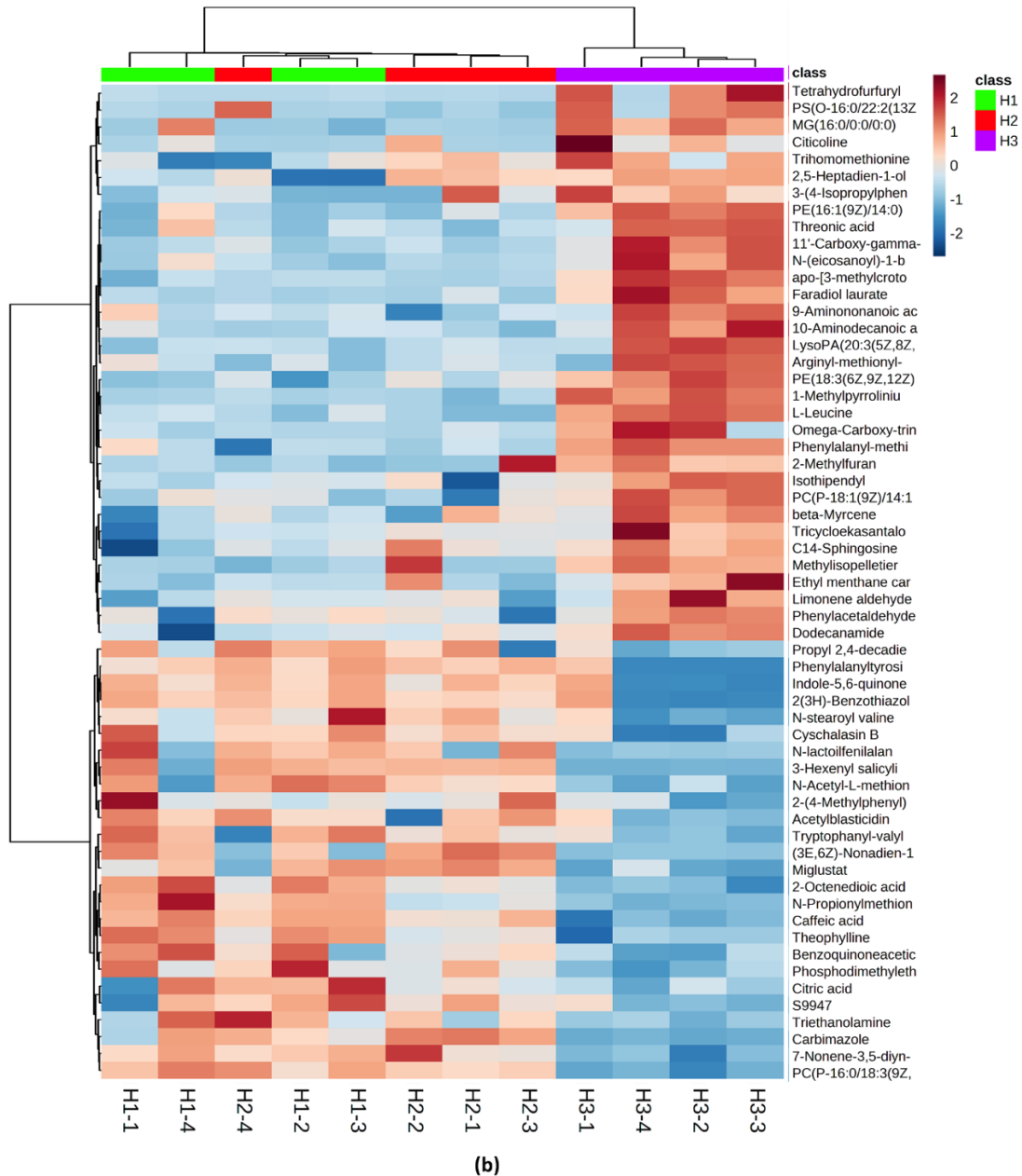
observó la presencia de N-acilaminoácidos, compuestos formados por la unión covalente de un aminoácido con el resto acilo con un ácido graso por un enlace amida, el cual confiere protección y estabilidad a las proteínas. Se ha reportado que estos compuestos funcionan como moléculas de señalización endógena y son de gran interés a nivel terapéutico (Battista et al., 2019). Por ejemplo, las N-heptenoilglicina y N-hexanoilglicina son biomarcadores del metabolismo anormal de la oxidación de ácidos grasos y de enfermedades metabólicas como la obesidad y resistencia a insulina (Grapov et al., 2012); las N-laurilglicina y N-lactoilfenilalanina tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, ayudando a proteger a la célula contra el daño causado por radicales libre e infecciones (Casillas-Vargas et al., 2021); las N-acilmetionina y N-propionilmetionina funcionan como agentes antioxidantes y antiinflamatorios (porque aumentan la producción del glutatión), y como donadores de grupos metilo necesarios en la metilación de ADN, síntesis de neurotransmisores y regulación de la expresión génica (Raboune et al., 2014); y la N-estearoilprolina quien presenta actividad anticancerígena, al inhibir el crecimiento de células cancerosas (Tanner et al., 2018).

Por otra parte, dentro de la categoría de ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, carbohidratos, polipéptidos y compuestos orgánicos nitrogenados, se destacaron los siguientes compuestos por sus propiedades biológicas reportadas en la base de datos HMDB: los ácidos cítrico e isocítrico (intermediarios del ciclo de Krebs); las xantinas cafeína y teofilina (antagonistas de histamina, con propiedades antitumorales, anticancerígenas y apoptóticas); la citcolina (intermediario en la biosíntesis de fosfolípidos estructurales como la fosfatidilcolina) y el ácido treónico (derivado de la treosa y metabolito del ácido ascórbico, reportado como biomarcador en cáncer colorectal y de estómago). Finalmente, la modulación positiva y negativa de estos metabolitos representativos en las líneas celulares de estudio se puede observar en los siguientes mapas de calor.

Figura 31.

Mapas de calor con los metabolitos representativos y diferenciales entre controles y tratamiento





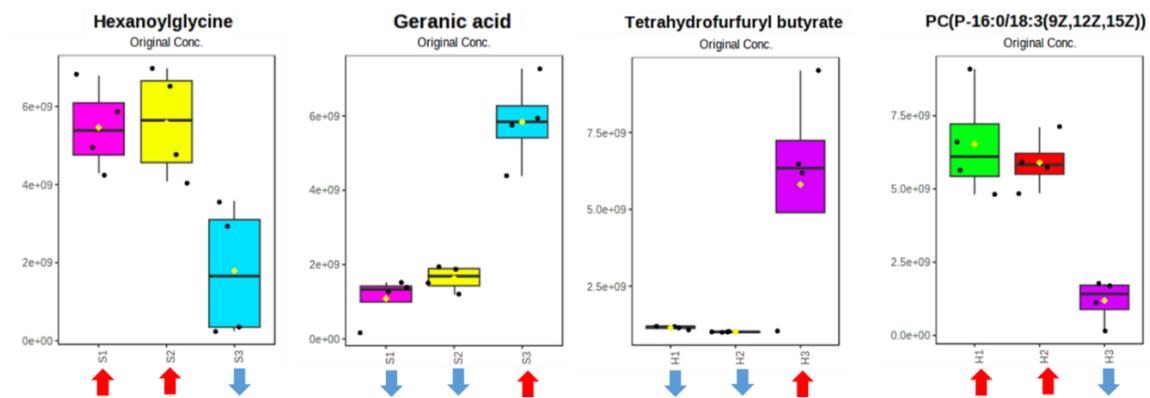
Nota: Metabolitos diferenciales modulados por la reexpresión del IFN κ en las células (a) SiHa y (b) HaCat.

Un mapa de calor (heatmap), es una representación visual de datos en la que se utiliza el color para mostrar la distribución y la intensidad de una variable en un área o conjunto de elementos, permitiendo resaltar patrones, tendencias y variación en los datos. En este contexto, el mapa de calor permitió analizar la modulación positiva (en rojo) y negativa (en azul) de estos

metabolitos representativos entre los controles y tratamiento de las líneas celulares de estudio. Por ejemplo, en las células SiHa el metabolito hexanoilglicina se encontró disminuido para S3 y aumentado para S1 y S2 (primer compuesto en la figura 31a); por el contrario, el ácido geránico se encontró aumentado para S3 y disminuido para S1 y S2 (ultimo compuesto en la figura 31a). En el caso de las células HaCat el metabolito tetrahidrofurfuril butirato se encontró aumentado para H3 y disminuido para H1 y H2 (primer compuesto en la figura 29b); mientras que la PC(P-16:0/18:3(9Z,12Z,15Z)) se encontró disminuida para H3 y aumentada para H1 y H2 (último compuesto en la figura 31b). El comportamiento de los metabolitos en estos mapas de calor se correlaciona con el observado en los diagramas de cajas (figura 32) empleados para seleccionar las características representativas con el loadings plot en la sección 7.5.3.

Figura 32.

Correlación del comportamiento de los metabolitos en los diagramas de cajas y el mapa de calor



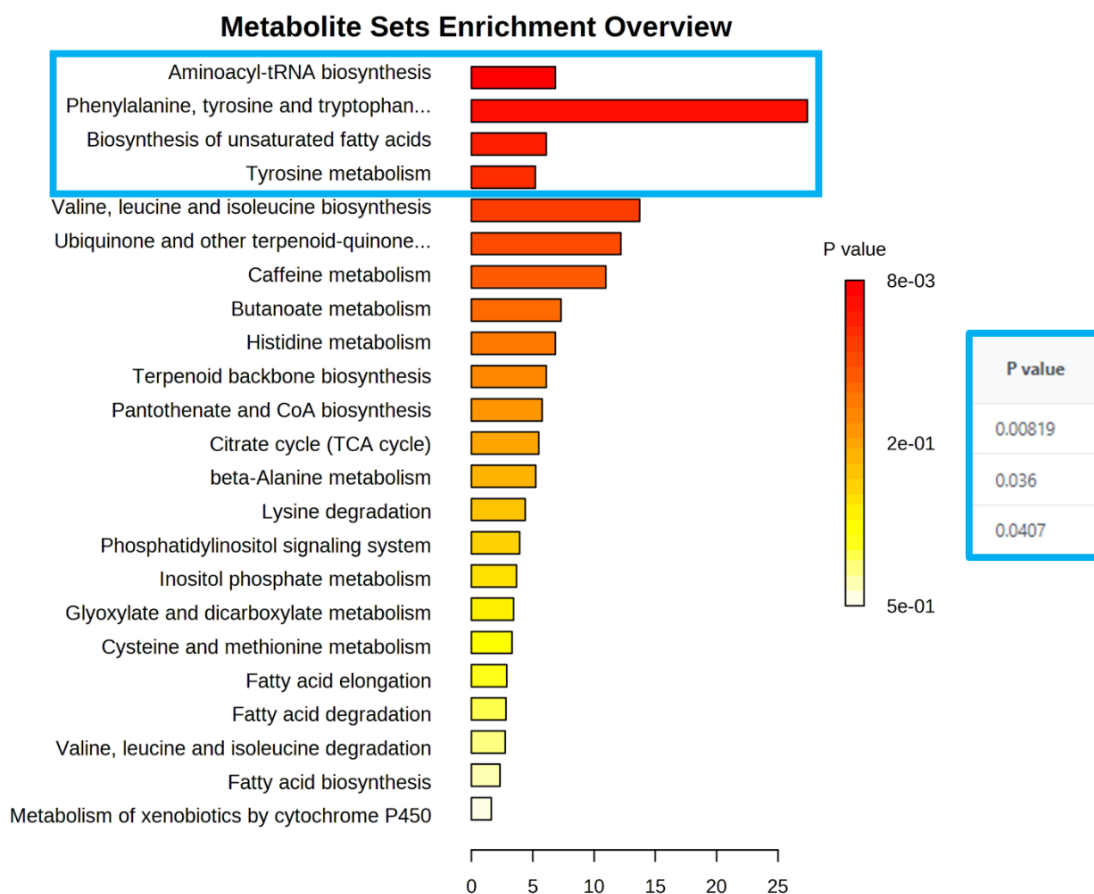
5.5.5 Análisis de enriquecimiento para determinar las vías metabólicas moduladas por la expresión del IFN κ

Por último, para resolver el planteamiento del problema y la pregunta de esta investigación: ¿Cuáles son los cambios del perfil inmunometabólico modulado por la reexpresión de interferón

κ en células de origen queratinocítico tumorales VPH positivas y no tumorales?; se realizó un análisis de enriquecimiento con los metabolitos representativos y diferenciales entre controles y tratamiento en las células SiHa y HaCat, para vincularlos a su contexto biológico y asociarlos con las posibles rutas metabólicas afectadas. Este análisis se llevó a cabo en el software Metaboanalyst, utilizando como metaboloma de referencia el reportado para Homo Sapiens en la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y considerando como significativas aquellas rutas con un valor de $p \leq 0,05$.

Figura 33.

Análisis de enriquecimiento con los metabolitos representativos y diferenciales entre controles y tratamiento en las células SiHa



Metabolite Set	Total	Hits	Expect	P value	Holm P	FDR
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	3	0.438	0.00819	0.688	0.688
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	1	0.0365	0.036	1.0	1.0
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36	2	0.328	0.0407	1.0	1.0

Nota: Gráfico de barras con todas las rutas diferenciales. Las vías seleccionadas en el cuadro azul fueron aquellas de mayor significancia estadística que presentaron un p-value $\leq 0,05$.

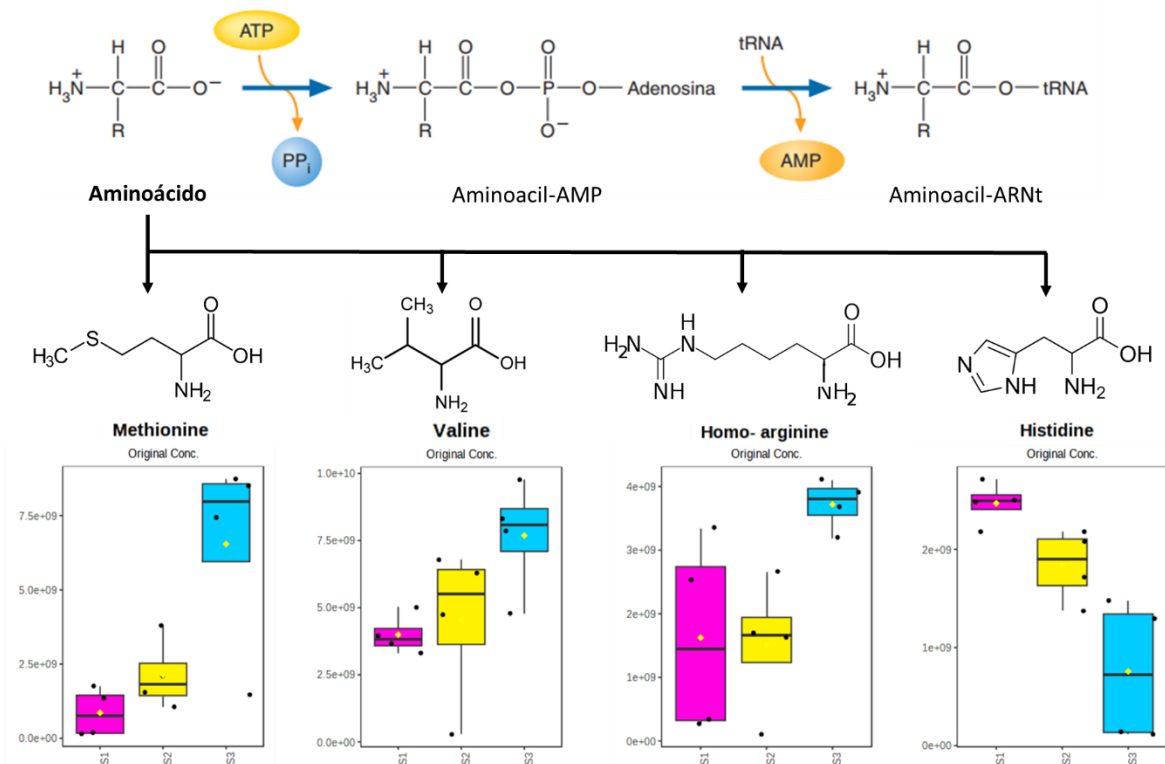
El análisis de enriquecimiento mostró 23 rutas afectadas por la reexpresión del IFN κ en las células cancerígenas SiHa. Sin embargo, las rutas metabólicas más significativas estadísticamente (con un p-value $\leq 0,05$) fueron: La biosíntesis de aminoacil-ARNt (p-value = 0,00819), el metabolismo de fenilalanina, tirosina y triptófano (p-value = 0,036) y la biosíntesis de ácidos grasos insaturados (p-value = 0,0407).

Los aminoácidos desempeñan múltiples funciones como fuentes principales de nitrógeno en las diversas rutas biosintéticas, sus esqueletos carbonados son precursores en la producción de energía y son las moléculas esenciales en la síntesis de proteínas. Para llevar a cabo esta síntesis (traducción del ARNm) los aminoácidos se unen a los ARNt correspondientes gracias a la acción de las enzimas aminoacil-ARNt sintetetasas, que son específicas para cada uno de los 20 aminoácidos, contribuyendo a exactitud de este proceso (McKee et al., 2014). La unión de un aminoácido al extremo 3' del ARNt consta de dos reacciones secuenciales dentro del sitio activo de la sintetasa: Primero la sintetasa cataliza la formación aminoacil-AMP por la formación de un enlace anhídrido mixto (carboxílico y fosfórico) y la hidrólisis de pirofosfato; luego un ARNt específico, que también está unido al sitio activo de la sintetasa, se enlaza de forma covalente al grupo aminoacilo a través de un enlace éster (figura 33). Esta biosíntesis de aminoacil-ARNt se correlaciona con la reexpresión de la proteína IFN κ y estuvo influenciada por la modulación

positiva de la metionina, valina y homo-arginina, junto con la modulación negativa de la histidina en S3.

Figura 34.

*Formación de un aminoacil-ARNt y aminoácidos modulados por la reexpresión del IFN-*k**



Adaptado de: McKee, T., McKee, J. R., Araiza Martínez, M. E., & Hurtado Chong, A. (2014). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida* (5a.ed.--.). México D.F.: Mc Graw-Hill.

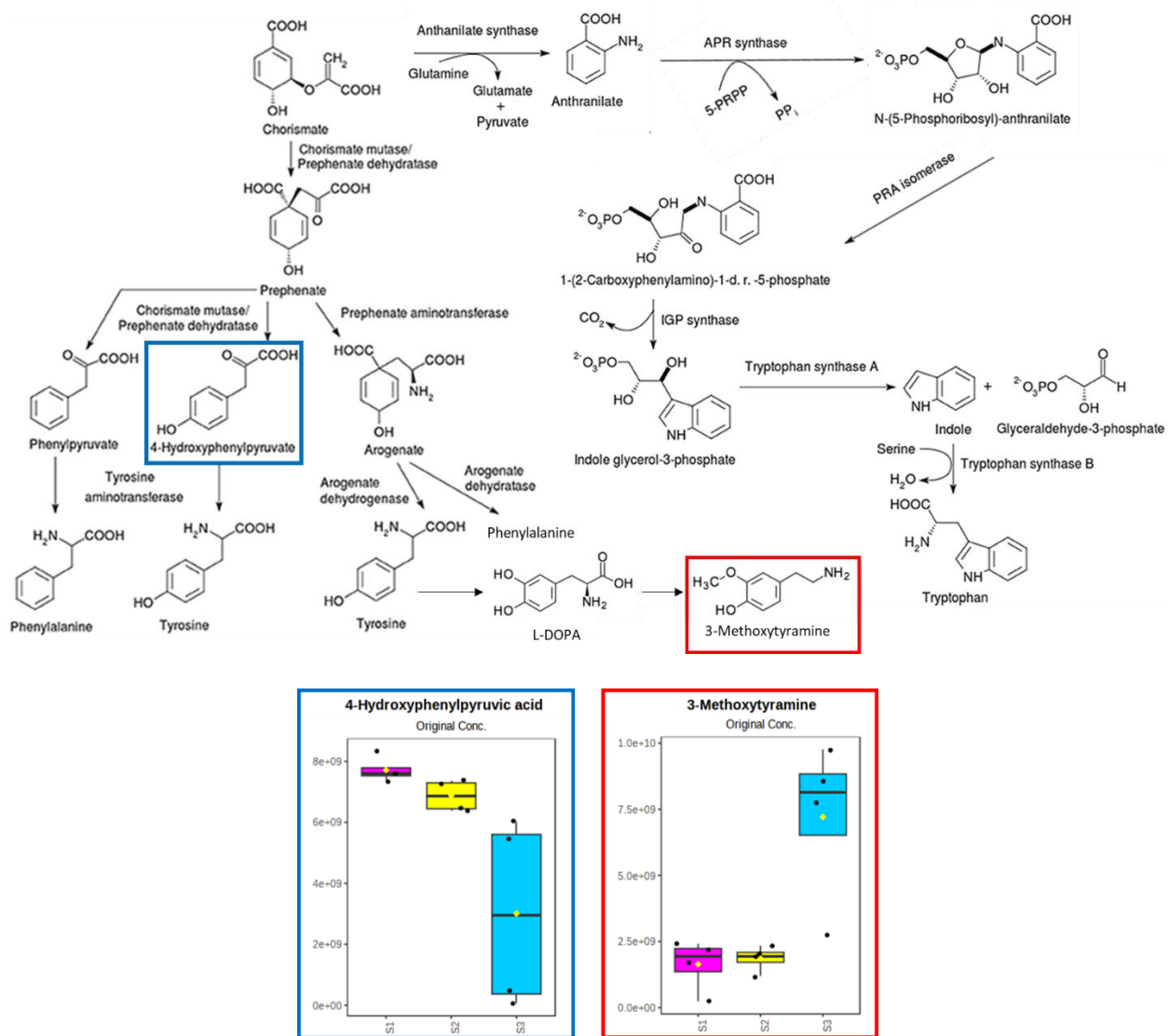
En cuanto al metabolismo de fenilalanina, tirosina y triptófano, estos metabolitos hacen parte de la familia de los aminoácidos aromáticos, en donde la tirosina se puede sintetizar a partir de la fenilalanina en una reacción de hidroxilación. Los dos primeros son necesarios para la síntesis de hormonas como las catecolaminas (por ejemplo, dopamina y epinefrina) y el último es un precursor de la síntesis de NAD^+ , $NADP^+$, serotonina y melatonina (McKee et al., 2014). Los anillos aromáticos de estos aminoácidos se caracterizan porque estabilizan las estructuras

polipeptídicas de las proteínas a través de los efectos de apilamiento π (Parthasarathy et al., 2018). Además, se ha reportado que: Pacientes sanas tienen una menor concentración de fenilalanina en comparación con pacientes con cáncer de endometrio, demostrando que su metabolismo tiene un efecto en la proliferación de células cancerígenas (Shi et al., 2018); derivados de la tirosina como la melanina son esenciales en las células inmunitarias para activar la respuesta inmune en células epiteliales (Kaplan et al., 2008); y derivados del triptófano como la quinurenina suprime las respuestas inmunitarias antitumorales y promueve la supervivencia y la motilidad de las células tumorales (Opitz et al., 2011).

Particularmente, el metabolismo de estos aminoácidos estuvo influenciado por una modulación negativa del ácido 4-hidroxifenilpirúvico y una modulación positiva de la 3-metoxitiramina (figura 35). En esta vía la conversión de fenilalanina en fenilpiruvato produce el 4-hidroxifenilpirúvico, el cual funciona como intermediario en la conversión de fenilalanina en tirosina a través de la fenilalanina hidroxilasa. Esta reacción funciona como el primer paso en el catabolismo de tirosina/fenilalanina mediante el cual el cuerpo elimina el exceso de fenilalanina y promueve la síntesis de tirosina. La tirosina se puede convertir en L-DOPA, que luego produce dopamina y 3-metoxitiramina, o puede metabolizarse para formar fumarato y dar paso al ciclo del ácido cítrico (Small Molecule Pathway Database, SMP0000008). El anillo bencénico de los aminoácidos aromáticos se forma por la vía del shikimato, en donde los carbonos del anillo bencénico proceden de la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato. Esta ruta es empleada por bacterias, algas, plantas y algunos hongos pero no por animales. La eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato se condensan para formar una molécula que después se convierte en corismato, el punto de ramificación en la síntesis de varios compuestos aromáticos, como el triptófano (KEGG Pathway map 00400).

Figura 35.

*Metabolismo de aminoácidos aromáticos modulado por la reexpresión del IFN-*k**



Adaptado de: Parthasarathy, A., Cross, P. J., Dobson, R. C. J., Adams, L. E., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2018). A Three-Ring Circus: Metabolism of the Three Proteogenic Aromatic Amino Acids and Their Role in the Health of Plants and Animals. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00029>

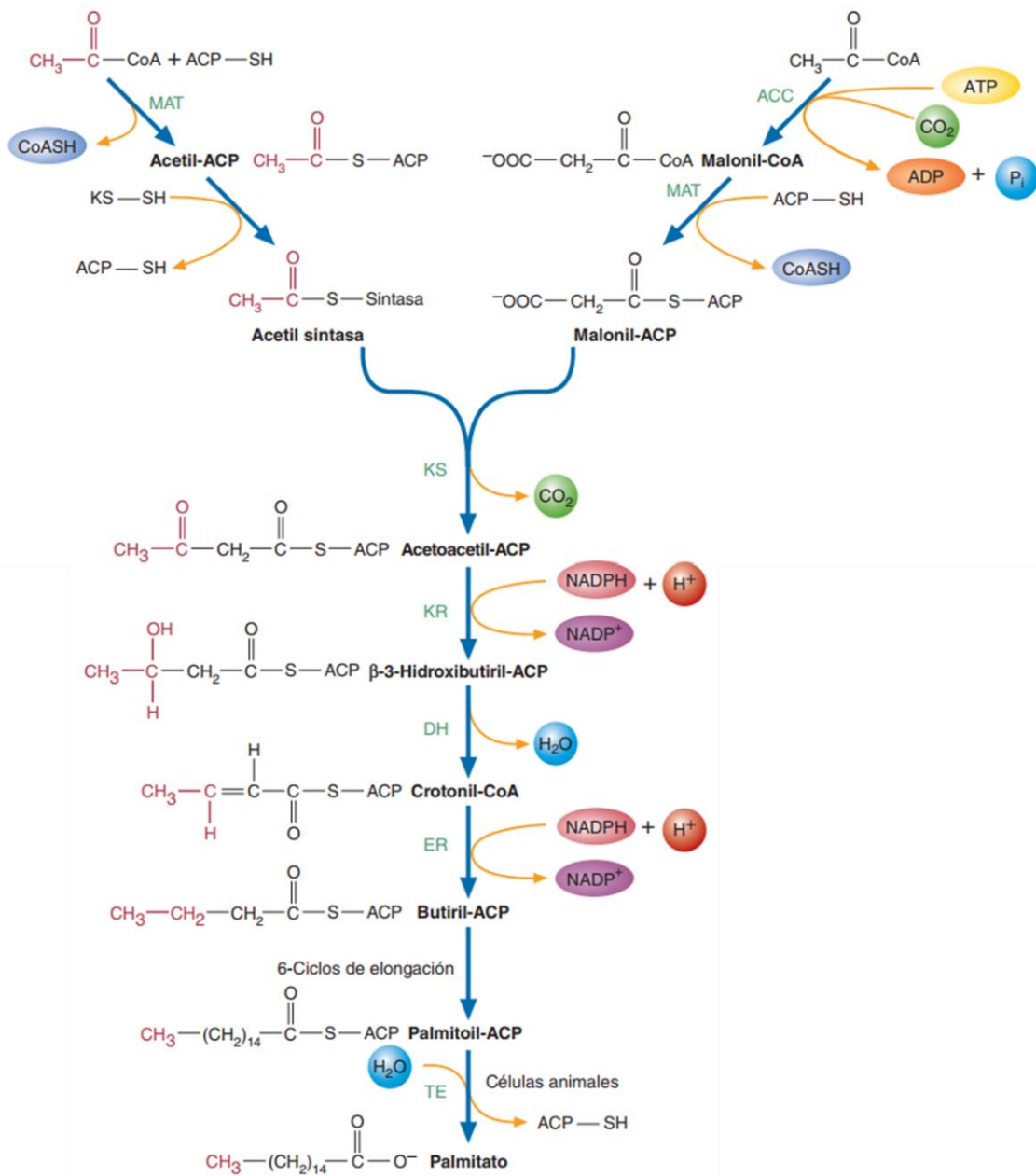
Otra de las rutas diferenciales fue la biosíntesis de ácidos grasos. Estos metabolitos son ácidos monocarboxílicos de longitudes variables (entre 12 y 20 carbonos), formados por un hidrocarburo de cadena larga (apolar) unido covalentemente a un grupo carboxilato (polar). La

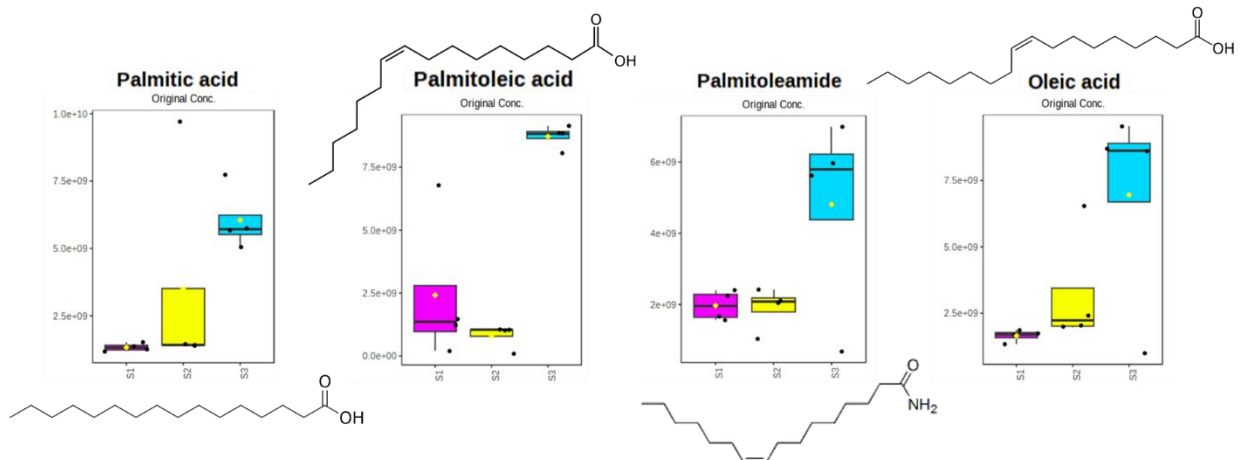
mayor parte de los ácidos grasos naturales poseen un número par de átomos de carbono que forman una cadena sin ramificaciones, que puede ser saturada o insaturada. Además, son los componentes de numerosas moléculas lipídicas (acilglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos y ceras) que hacen parte de la composición esencial de las membranas celulares y tienen funciones de almacenamiento de energía, señalización celular, transporte, fluidez y protección (McKee et al., 2014).

La biosíntesis de ácidos grasos se vio influenciada por una regulación positiva del ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido oleico y la palmitoleamida en las células S3 (figura 36). La mayoría de los ácidos grasos se sintetiza a partir de los carbohidratos cuando los requerimientos energéticos de la célula son bajos y hay suficiente cantidad de citrato, quien al salir de la mitocondria al citoplasma se fragmenta en acetil-CoA y oxaloacetato; construyendo los ácidos grasos por la adición secuencial de grupos de dos carbonos que suministra la acetil-CoA. De manera general, los sustratos para la síntesis de ácidos grasos son acetil-ACP y malonil-ACP, formados a partir de ACP con acetil-CoA y malonil-CoA, por la catálisis de la malonil/acetil transferasa (MAT). La formación de una cadena de ácido graso comienza con una reacción de condensación catalizada por la -cetoacil sintasa (KS), en donde el grupo acetilo se transfiere al grupo malonilo para formar acetoacetil-ACP. Luego, la reducción del grupo carbonilo catalizada por la cetoacil-ACP reductasa (KR) forma un alcohol, y este se deshidrata para formar un doble enlace entre dos carbonos por la catálisis de la hidroxiacil-ACP deshidratasa (DH). Posteriormente, la reducción por efecto de la enoil-ACP reductasa (ER) produce un grupo acilo saturado de cuatro carbonos, que se transfiere luego del ACP al grupo SH de la KS para iniciar un nuevo ciclo de elongación. La cadena acilo se prolonga en dos carbonos cuando se condensa con otro grupo malonilo unido con ACP. Finalmente, la síntesis de ácidos grasos termina con la liberación de palmitato del ACP mediada por la catálisis de la tioesterasa (TE) (McKee et al., 2014).

Figura 36.

Reacción general de la biosíntesis de ácidos grasos modulados por la reexpresión del IFN-*k*





Adaptado de: McKee, T., McKee, J. R., Araiza Martínez, M. E., & Hurtado Chong, A. (2014). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida* (5a.ed.--.). México D.F.: Mc Graw-Hill.

Particularmente el ácido palmítico se forma a partir de la unión de 8 acetyl-CoA y se caracteriza por ser el principal ácido graso saturado presente en el cuerpo humano, que sirve como fuente para formar ácidos grasos con insaturaciones (como el ácido palmitoleico monoinsaturado), de cadena más larga y sus derivados lipídicos (ceramidas, diacilgliceroles, triacilgliceroles o glicolípidos saturados).

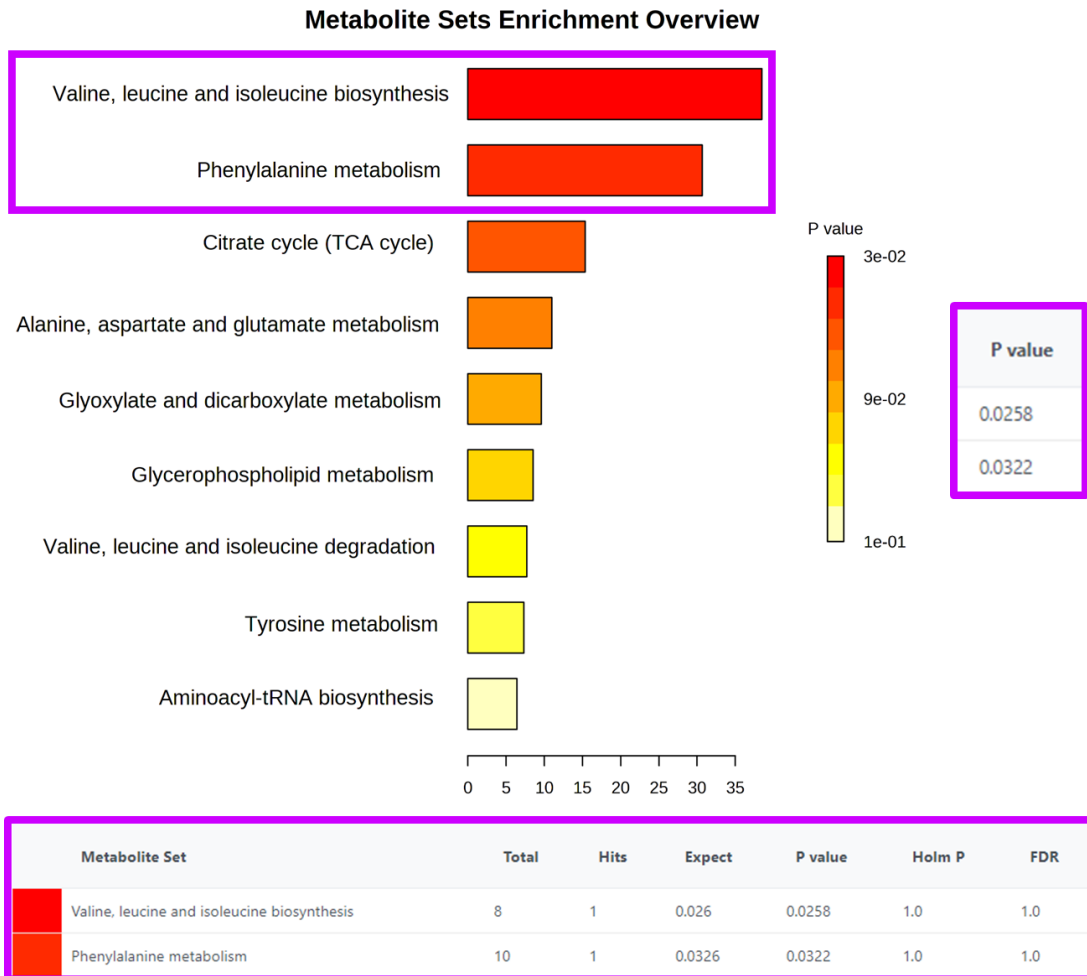
Funcionalmente el ácido palmítico se ha reportado que tiene un efecto directo y pronunciado en la morfogénesis y homeostasis epidérmica, permitiendo la formación correcta de una barrera de protección lipídica y la diferenciación normal de las células de la piel (Mieremet et al., 2019). Además, se ha demostrado que los ácidos grasos libres, son unos de los principales contribuyentes del pH de la membrana de los queratinocitos, permitiendo regular procesos de permeabilidad, inflamación y barreras contra patógenos (Khnykin et al., 2011). Asimismo, a los ácidos palmitoleico y oleico se les han atribuido propiedades cicatrizantes, permitiendo la formación y remodelación de un tejido nuevo sano, junto con un efecto beneficioso sobre el cáncer, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, al interferir en el funcionamiento de macrófagos,

linfocitos y neutrófilos (Weimann et al., 2018). En consecuencia, se puede analizar que la presencia de estos ácidos grasos en las células cancerígenas que reexpresaron el IFN- κ , están empezando a activar mecanismos que pueden favorecer la diferenciación de queratinocitos y a nivel del cuello uterino puede ser favorable para recuperar tejido sano una vez las células cancerígenas han disminuido su proliferación.

En este orden de ideas, es importante resaltar que las células cancerígenas tanto controles como tratamiento se caracterizaron por la presencia de metabolitos de carácter lipídico en diferentes proporciones. En el caso de las células SiHa IFN- κ (S3) se encontraron en mayor proporción ácidos grasos, prenoles y esteroides; quienes tienen propiedades como anticancerígenos y estabilizadores de membrana. Contrariamente, las células SiHa (S1) y SiHa mock (S2), presentaron en menor proporción los ácidos grasos, que concuerda con el comportamiento reportado para las células cancerígenas, en donde para su mantenimiento y crecimiento priorizan la oxidación de ácidos grasos (proceso opuesto a la biosíntesis) como fuente de energía, demostrando que este proceso influye en la quimioresistencia y metástasis (Carracedo et al., 2013). Adicionalmente, en estas células estuvieron en mayor proporción esfingolípidos, glicerolípidos y glicerofosfolípidos, que están relacionados con la producción de membranas celulares menos rígidas que ayudan a la migración de las células cancerosas (Li & Sui, 2021). Por ende, estos resultados resaltan la importancia del desarrollo de estudios enfocados en el comportamiento de los lípidos a nivel de células cancerígenas, que puedan llegar a ser utilizados como una estrategia terapéutica.

Figura 37.

Análisis de enriquecimiento con los metabolitos representativos y diferenciales entre controles y tratamiento en las células HaCat



Nota: Gráfico de barras con todas las rutas diferenciales. Las vías seleccionadas en el cuadro morado fueron aquellas de mayor significancia estadística que presentaron un p-value $\leq 0,05$.

En lo que corresponde a los queratinocitos no tumorales, se observó que el análisis de enriquecimiento con los metabolitos representativos entre controles y tratamiento en las células HaCat, arrojó 9 rutas afectadas por la reexpresión del IFN-*k*. No obstante, las rutas metabólicas más significativas estadísticamente (con un p-value $\leq 0,05$) fueron: La biosíntesis de valina, leucina e isoleucina (p-value = 0,0258) y el metabolismo de fenilalanina (p-value = 0,0322). De

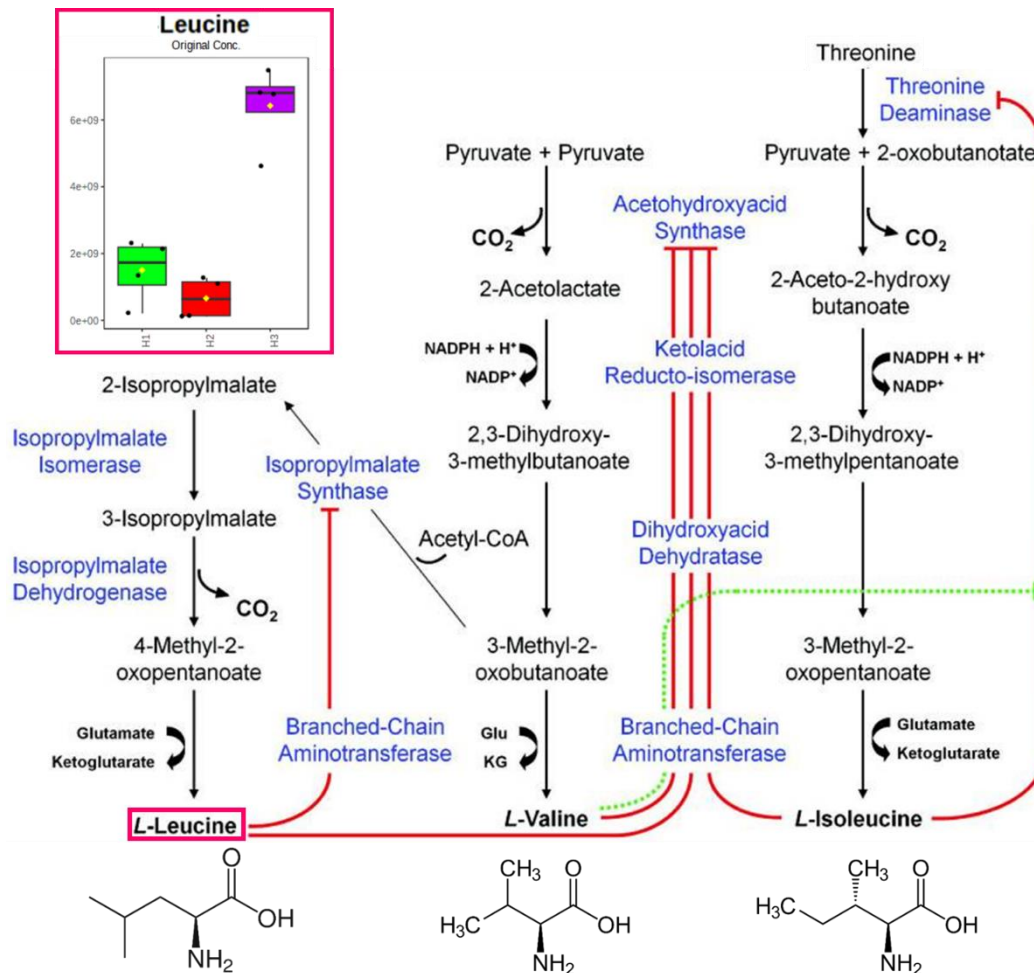
acuerdo a estos resultados, se encontró que la reexpresión del IFN-*k* en las células HaCat y SiHa tienen en común el metabolismo de la fenilalanina, que en este caso fue influenciado por la modulación positiva del fenilacetaldehído en H3. Esto indica, que el metabolismo de este aminoácido está implicado en la producción de esta citoquina y puede ser un punto de interés para un futuro estudio metabólico con enfoque dirigido en esta ruta.

Por otra parte, resulto como significativa la biosíntesis de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, influenciada por la modulación positiva de la leucina en los queratinocitos HaCat IFN-*k* (H3). Estos hacen parte de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés) puesto la cadena lateral (R) es un compuesto alifático no lineal, y se han caracterizado por ser componentes esenciales de los músculos esqueléticos en el cuerpo humano.

A pesar de la diversidad de posibles vías de síntesis de aminoácidos, todas tienen en común que el esqueleto carbonado de cada aminoácido procede de intermediarios metabólicos de fácil disposición como: piruvato, glicerato-3-fosfato, oxaloacetato y α -cetoglutarato. En el caso de estos aminoácidos ramificados, tienen como precursor biosintético el piruvato (McKee et al., 2014). La biosíntesis de BCAA se realiza en dos vías paralelas (una produce isoleucina y la otra leucina y valina) las cuales están catalizadas por un solo conjunto de cuatro enzimas: acetohidroxiácido sintasa, cetolácido reductoisomerasa, dihidroxiácido deshidratasa y aminotransferasa de cadena ramificada. En el caso de la isoleucina, la síntesis inicia con la treonina, quien tiene una reacción desaminación y deshidratación para producir amoníaco y 2-oxobutanoato (α -cetobutirato). Por el contrario la síntesis de leucina parte del 2-oxoisovalerato, y el último intermedio de esta reacción se transamina para formar valina (figura 38) (Binder, 2010)

Figura 38.

Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada modulada por la reexpresión del IFN- κ



Adaptado de: Binder, S. (2010). Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 8, e0137. <https://doi.org/10.1199/tab.0137>

Finalmente, se ha reportado que la suplementación con BCAA promueve en general las vías anabólicas, la síntesis de proteínas, la cicatrización de heridas, la producción de insulina, atenúa la fatiga durante el ejercicio físico e inhibe la proteólisis. Particularmente, la leucina estimula la síntesis de proteínas a través de la vía de señalización mTOR y la fosforilación de factores de iniciación de la traducción y proteínas ribosómicas (Holecek, 2018). A nivel del

sistema inmunitario, las células incorporan los BCAA como precursores de nuevas células inmunitarias, moléculas efectoras y protectoras. Por ejemplo, se ha demostrado que la isoleucina tiene una fuerte correlación con la excreción de β -defensina mejorando la inmunidad innata intestinal; la leucina a través de la vía de señalización mTOR promueve las citoquinas antiinflamatorias junto con la diferenciación, participa en el desencadenamiento de la autofagia y en la activación y función de la células T y B; y la valina a nivel extracelular mejora la función de células dendríticas, disminuyendo las citoquinas proinflamatorias (IL-8 y TNF- α) y aumentando las antiinflamatorias (IL-8 y TNF- α) (Zhang et al., 2017).

6. Conclusiones

✓ La estandarización del método de transfección mediado por lípidos catiónicos con el plásmido pEGFP-C1 determinó que las cantidades adecuadas del reactivo TransFectin y ADN plasmídico para 50.000 células fue de 1 uL y 0,25 ug, respectivamente; considerando que estas concentraciones no fueron citotóxicas para las células SiHa y HaCat, y se pueden tomar como referencia para escalar la transfección en un mayor número de células. Además, el estudio de la fluorescencia emitida por la proteína GFP en el transcurso del tiempo, permitió establecer que 48 horas después de la transfección es un periodo óptimo para extraer el ARN total para determinar la expresión del transcrito del interferón kappa. En este sentido, se valida el uso de TransFectin para transfectar células SiHa y HaCat, y se propone para investigaciones posteriores con ADN recombinante, incluir en el plásmido de estudio un gen que codifique para una proteína reportera, de tal manera que se pueda confirmar visualmente la eficiencia de la transfección.

✓ La cuantificación del número de copias absolutas del transcrito de interferón kappa por medio PCR digital (ddPCR) comprobó la reexpresión de la citoquina en las líneas celulares SiHa (carcinoma cervical VPH positivo) y HaCat (queratinocito no tumoral); puesto que el número de copias del transcrito fue menor en las células control (no transfectadas y transfectadas con pCMV-empty) en comparación con las células tratamiento (transfectadas con pCMV-IFN κ). Estos resultados se reflejaron en el comportamiento de las células, en donde aquellas que fueron sometidas al tratamiento cambiaron su morfología y en el caso de las células cancerígenas también disminuyeron su proliferación.

✓ La optimización del método de extracción de los metabolitos celulares se obtuvo con dos millones de células lisadas con choque térmico y ultrasonido, utilizando una solución de extracción con Metanol:Acetonitrilo:Agua en una proporción 4:2:2. Esta selección del método se realizó teniendo en cuenta que luego de analizar las muestras por la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Orbitrap/HRMS), aproximadamente el 70% de las características totales extraídas presentaron una baja variación y se consideraron como estadísticamente representativas. Además, se comprobó que con este método se mantiene la integridad de los metabolitos, puesto que el péptido utilizado como patrón interno añadido en la solución de extracción y sometido a las mismas condiciones de las muestras de estudio, no se degradó y se observó un pico uniforme y su ion molecular en el cromatograma y en el espectro de masas.

✓ El análisis metabolómico no dirigido mostró diferencias en los perfiles metabólicos modulados por la reexpresión del interferón kappa entre las células control y tratamiento de las células SiHa y HaCat. Para las células del carcinoma cervical VPH positivas (SiHa) fueron

representativos el metabolismo de fenilalanina, tirosina, triptófano, ácidos grasos y aminoácil-ARNt. En los queratinocitos no tumorales (HaCat), fueron característicos el metabolismo de fenilalanina, valina, leucina, isoleucina y ácidos tricarbóxicos. Estas rutas fueron influenciadas por metabolitos de diferente clasificación, como lípidos, aminoácidos y ácidos orgánicos, los cuales se encontraban modulados positiva o negativamente por efecto del tratamiento y quienes se han reportado con diversas propiedades como biomarcadores de cáncer, agentes antivirales, anticancerígenos, estabilizadores de membranas, activadores de señalización inmune y sensibilizadores de apoptosis.

7. Recomendaciones

De acuerdo a los resultados de la presente investigación, en los análisis de biología celular y molecular se recomienda: clonar el gen de una proteína reportera como GFP en el plásmido pCMV-3tag-1A, para facilitar la confirmación previa de la transfección; detectar la presencia de la proteína IFN-*k* por medio una técnica como Western blot, para complementar el análisis del transcrito aquí reportado; y realizar una transfección estable en donde se puedan seleccionar con el antibiótico blasticidina los clones y analizar el efecto prolongado de la citoquina (mayor a 48 horas). En cuanto a los análisis metabólicos se recomienda: Aumentar de nivel 3 a 2 la identificación de los metabolitos, por medio de la comparación de los espectros de masas experimentales con los reportados en la literatura, para tener un mayor grado de precisión en el reporte de los metabolitos significativos; comparar los controles y tratamientos entre las células SiHa y HaCat para determinar si existen rutas metabólicas diferenciales asociadas con el CCU y si están siendo influenciadas por la reexpresión del IFN-*k*, y realizar un estudio metabólico con

enfoque dirigido en las rutas de aminoácidos y lípidos aquí reportadas, para ampliar el número de características en cada ruta y comprobar su influencia en el tratamiento.

8. Divulgación de resultados

Los resultados de esta investigación fueron divulgados en:



Modalidad de poster en el 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020, el XVIII COLACRO, el X COCOCRO, el II SPAE y el IV C2B2.



Modalidad de poster y ponencia en el I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas: Epidemias, Endemias y Pandemias Persistentes y Emergentes, organizado por el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Industrial de Santander. En este congreso el trabajo fue premiado como mejor poster en la categoría de Enfermedades crónicas no transmisibles.

Además, los resultados de esta investigación están en proceso de escritura de un artículo para someterlo a una publicación en una revista científica.

Referencias Bibliográficas

- Ablasser, A., Schmid-Burgk, J. L., Hemmerling, I., Horvath, G., Schmidt, T., Latz, E., & Hornung, V. (2013). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature*, 503(7477), 530–534. <https://doi.org/10.1038/nature12640>
- An Introduction to Transfection | Protocol. (s. f.). Jove. <https://www.jove.com/v/5068/an-introduction-to-transfection>
- Bai, H., Lester, G. M. S., Petishnok, L. C., & Dean, D. S. (2017). Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. *Bioscience Reports*, 37(6). <https://doi.org/10.1042/bsr20160616>
- Battista, N., Bari, M., & Bisogno, T. (2019). N-Acyl Amino Acids: Metabolism, Molecular Targets, and Role in Biological Processes. *Biomolecules*, 9(12), 822. <https://doi.org/10.3390/biom9120822>
- Beisken, S., Eiden, M., & Salek, R. M. (2015). Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(1), 97–109. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.974562>
- Bhagavan, N. V. (2002). *Medical Biochemistry*. Academic Press.
- Binder, S. (2010). Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 8, e0137. <https://doi.org/10.1199/tab.0137>
- Blow, N. (2008). Biochemistry's new look. *Nature*, 455 (7213), 697–698.
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., & zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO Journal*, 3 (5), 1151-1157. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01944.x>
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., & Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The Lancet Oncology*, 10 (4), 321-322. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70096-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70096-8)
- Branco, A. C. C. C., Yoshikawa, F. S. Y., Pietrobon, A. J., & Sato, M. N. (2018). Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/9524075>
- Calzada, E., Onguka, O., & Claypool, S. M. (2016). Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. In Elsevier eBooks (pp. 29–88). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>
-
-

- Cancer. (2019, 12 julio). World Health Organization. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Cannistra, S., Niloff, J. (1996). Cancer of the Uterine Cervix. *New England Journal of Medicine*, 334 (16), 1030-1037. <https://doi.org/10.1056/nejm199604183341606>
- Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzman, C., Del Valle, R., Carballeira, N. M., & Sanabria-Ríos, D. J. (2021). Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, 82, 101093. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101093>
- Chen, Y., Li, E., & Xu, L. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4), 357. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S., & Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Ciuffo, G. 1907. Innesso positive con filtrato di verruca volgare. *Giornale Ital. Mal. Ven. Pelle* 48: 12–17.
- Danielyan, L., Zellmer, S., Sickinger, S., Tolstonog, G. V., Salvetter, J., Lourhmati, A., Reissig, D., Gleiter, C. H., Gebhardt, R., & Buniatian, G. H. (2009). Keratinocytes as Depository of Ammonium-Inducible Glutamine Synthetase: Age- and Anatomy-Dependent Distribution in Human and Rat Skin. *PLOS ONE*, 4(2), e4416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004416>
- Darnell, J. E., & Eagle, H. (1958). Glucose and glutamine in poliovirus production by HeLa cells. *Virology*, 6 (2), 556-566. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(58\)90102-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(58)90102-8)
- DeCarlo, C. A., Severini, A., Edler, L., Escott, N. G., Lambert, P. F., Ulanova, M., & Zehbe, I. (2010). IFN- κ , a novel type I IFN, is undetectable in HPV-positive human cervical keratinocytes. *Laboratory Investigation*, 90(10), 1482-1491. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.95>
- Dettmer, K., Aronov, P., & Hammock, B. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. 26(1), 51–78.
- Di Guida, R., Engel, J., Allwood, J. W., Weber, R. J. M., Jones, M., Sommer, U., Viant, M. R., & Dunn, W. B. (2016). Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics*, 12(5). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1030-9>
-
-

- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., & zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (12), 3812-3815. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3812>
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Functional Genomics*, 48, 155-171.
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 180(6), 1044-1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Floc'h, F., & Werner, G. S. (1976). In vivo antiviral activity of D-glucosamine. *Archives of Virology*, 52(1-2), 169-173. <https://doi.org/10.1007/bf01317877>
- Forsberg, E. M., Huan, T., Rinehart, D., Benton, H. P., Warth, B., Hilmers, B., & Siuzdak, G. (2018). Data processing, multi-omic pathway mapping, and metabolite activity analysis using XCMS Online. *Nature Protocols*, 13(4), 633-651. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.151>
- French, S. D., & Robson, B. (1983). What is a conservative substitution? *Journal of Molecular Evolution*, 19(2), 171-175. <https://doi.org/10.1007/bf02300754>
- Fritsch, S. D. (2016). Effects of Interferons and Viruses on Metabolism. *Frontiers*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00630/full>
- Geisse, S., & Voedisch, B. (2012). Transient Expression Technologies: Past, Present, and Future. *Methods in Molecular Biology*, 203-219. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_13
- Gissmann, L., & Hausen, H. Z. (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *International Journal of Cancer*, 25 (5), 605-609. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910250509>
- Gissmann, L., Diehl, V., Schultz-Coulon, H. J., & zur Hausen, H. (1982). Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *Journal of Virology*, 44 (1), 393-400. <https://doi.org/10.1128/jvi.44.1.393-400.1982>
- Gissmann, L., Pfister, H., & Zur Hausen, H. (1977). Human papilloma viruses (HPV): Characterization of four different isolates. *Virology*, 76 (2), 569-580. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90239-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90239-2)
- Grapov, D., Adams, S. H., Pedersen, T. L., Garvey, W. T., & Newman, J. H. (2012). Type 2 Diabetes Associated Changes in the Plasma Non-Esterified Fatty Acids, Oxylipins and Endocannabinoids. *PLOS ONE*, 7(11), e48852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048852>
-
-

- Habiger, C., Jäger, G., Walter, M. A., Iftner, T., & Stubenrauch, F. (2016). Interferon Kappa Inhibits Human Papillomavirus 31 Transcription by Inducing Sp100 Proteins. *Journal of Virology*, 90(2), 694–704. <https://doi.org/10.1128/jvi.02137-15>
- Haggarty, J., & Burgess, K. E. V. (2017). ScienceDirect Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 77–85.
- Halbert, C. L., Demers, G. W., & Galloway, D. A. (1992). The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *Journal of Virology*, 66 (4), 2125-2134. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.4.2125-2134.1992>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanley, K. P., Kömüves, L. G., Ng, D. C., Schoonjans, K., He, S., Lau, P., Bikle, D. D., Williams, M. L., Elias, P. M., Auwerx, J., & Feingold, K. R. (2000). Farnesol Stimulates Differentiation in Epidermal Keratinocytes via PPAR α . *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11484–11491. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11484>
- Hannedouche, S., Zhang, J., Yi, T. (2011). Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature* 475, 524–527 <https://doi.org/10.1038/nature10280>
- Hausen, H. Z., Meinhof, W., Scheiber, W., & Bornkamm, G. W. (1974). Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *International Journal of Cancer*, 13 (5), 650-656. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910130509>
- Hedl M, Yan J, Abraham C. IRF5 and IRF5 disease-risk variants increase glycolysis and human M1 macrophage polarization by regulating proximal signaling and Akt2 activation. *Cell Rep* (2016) 16:2442–55. [10.1016/j.celrep.2016.07.060](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.060)
- Holecek, M. (2018). Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & Metabolism*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0271-1>
- Invitrogen. (2010). pLenti6/V5 Directional TOPO Cloning Kit. Thermo Fisher Scientific. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/plenti6v5dtopo_man.pdf
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1987). Virus interference. I. The interferon. *Journal of Interferon Research*, 7(5), 429-438. <https://doi.org/10.1089/jir.1987.7.429>
- Jensen, S., & Thomsen, A. R. (2012). Sensing of RNA Viruses: A Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *Journal of Virology*, 86 (6), 2900-2910. <https://doi.org/10.1128/jvi.05738-11>
-
-

- Kaplan, J., De Domenico, I., and Ward, D. M. (2008). Chediak-Higashi syndrome. *Current Opin. Hematol.* 15, 22–29. doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f2bcce
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T., & Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1601–1610. <https://doi.org/10.1084/jem.20080091>
- Kerr, J. F. R., Gobé, G. C., Winterford, C. M., & Harmon†, B. V. (1995). Chapter 1 Anatomical Methods in Cell Death. *Methods in Cell Biology*, 1–27. doi:10.1016/s0091-679x(08)61921-4
- Kessler, A. T. (2022, July 18). Biochemistry, Histidine. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538201/>
- Khnykin, D., Miner, J. H., & Jahnsen, F. L. (2011). Role of fatty acid transporters in epidermis. *Dermato-endocrinology*, 3(2), 53–61. <https://doi.org/10.4161/derm.3.2.14816>
- LaFleur, D. W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, P., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roshke, V., Chen, G., Ruben, S. M., Pitha, P. M., Coleman, T. A., & Moore, P. A. (2001). Interferon- κ , a Novel Type I Interferon Expressed in Human Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (43), 39765-39771. <https://doi.org/10.1074/jbc.m102502200>
- Lee, J.-H. (2015). Keratinocyte Differentiation and Epigenetics. *Epigenetics and Dermatology*, 37-52. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800957-4.00003-5>
- Lehoux, M., D’Abramo, C. M., & Archambault, J. (2009). Molecular Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Public Health Genomics*, 12 (5-6), 268-280. <https://doi.org/10.1159/000214918>
- Li, B., & Sui, L. (2021). Metabolic reprogramming in cervical cancer and metabolomics perspectives. *Nutrition & Metabolism*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-021-00615-7>
- Li, Y., Song, Y., Zhu, L., Wang, X., Richers, B., Leung, D. Y. M., & Bin, L. (2020). Interferon Kappa Is Important for Keratinocyte Host Defense against Herpes Simplex Virus-1. *Journal of Immunology Research*, 2020, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2020/5084682>
- Liu, J., Lkhagva, E., Chung, H., Kim, H., & Hong, S. (2018). The Pharmabiotic Approach to Treat Hyperammonemia. *Nutrients*, 10(2), 140. <https://doi.org/10.3390/nu10020140>
- Liu S.Y., Aliyari R., Chikere K., Li G., Marsden M.D., Smith J.K., Pernet O., Guo H., Nusbaum R., Zack J.A., et al. Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity*. 2013;38:92–105. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.005.
-
-

- Matthews, D. E. (2007). An Overview of Phenylalanine and Tyrosine Kinetics in Humans. *Journal of Nutrition*, 137(6), 1549S-1555S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1549s>
- Mattoli, L., Gianni, M., & Burico, M. (2022). Mass spectrometry-based metabolomic analysis as a tool for quality control of natural complex products. *Mass Spectrometry Reviews*. <https://doi.org/10.1002/mas.21773>
- MarkerDB. <https://markerdb.ca/chemicals/MDB00000313>
- McKee, T., McKee, J. R., Araiza Martínez, M. E., & Hurtado Chong, A. (2014). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida (5a.ed.--)*. México D.F.: Mc Graw-Hill.
- McNab, F. W., Mayer-Barber, K. D., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- Meisels, A., Fortin, R. (1977). Condylomatous lesions of the cervix and vagina. i. cytologic patterns. *obstetrical & gynecological survey*, 32(5), 322-324. <https://doi.org/10.1097/00006254-197705000-00023>
- Mieremet, A., Helder, R. W., Nadaban, A., Gooris, G. S., Boiten, W. A., Ghalbzouri, A. E., & Bouwstra, J. A. (2019). Contribution of Palmitic Acid to Epidermal Morphogenesis and Lipid Barrier Formation in Human Skin Equivalents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6069. <https://doi.org/10.3390/ijms20236069>
- Molano, M., Posso, H., Weiderpass, E., van den Brule, A. J. C., Ronderos, M., Franceschi, S., Meijer, C. J. L. M., Arslan, A., & Munoz, N. (2002). Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *British Journal of Cancer*, 87(3), 324-333. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600442>
- Moody, C. A. (2022). Regulation of the Innate Immune Response during the Human Papillomavirus Life Cycle. *Viruses*, 14(8), 1797. <https://doi.org/10.3390/v14081797>
- Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., & David, M. Z. (2001). Arginine Methylation of STAT1 Modulates IFN α/β -Induced Transcription. *Cell*, 104(5), 731–741. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00269-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00269-0)
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., & Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-527. <https://doi.org/10.1056/nejmoa021641>
- Narasimhan, J., Potter, J. L., & Haas, A. L. (1996). Conjugation of the 15-kDa Interferon-induced Ubiquitin Homolog Is Distinct from That of Ubiquitin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 324-330. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.324>
-
-

- Nardelli, B., Zaritskaya, L., Semenuk, M., Cho, Y. H., LaFleur, D. W., Shah, D., Ullrich, S., Girolomoni, G., Albanesi, C., & Moore, P. A. (2002). Regulatory Effect of IFN- κ , A Novel Type I IFN, On Cytokine Production by Cells of the Innate Immune System. *The Journal of Immunology*, 169 (9), 4822-4830. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4822>
- National Human Genome Research Institute. (s. f.). Sonda | NHGRI. Genome.gov. Recuperado 17 de noviembre de 2020, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Sonda>
- Nobelpreis für Medizin (2008). https://www.dkfz.de/de/presse/veroeffentlichungen/nobel-Broschuere_web.pdf
- Ochoa Carrillo, F. J., Guarneros de Regil, D. B., & Velasco Jiménez, M. T. (2015). Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14 (3), 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2015.08.002>
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203. doi: 10.1038/nature10491
- Patti, G., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). NIH Public Access. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13 (4), 263–269.
- Parthasarathy, A., Cross, P. J., Dobson, R. C. J., Adams, L. E., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2018). A Three-Ring Circus: Metabolism of the Three Proteogenic Aromatic Amino Acids and Their Role in the Health of Plants and Animals. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00029>
- Pearce, E., Walsh, M., Cejas, P. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* 460, 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature08097>
- Pereira Braga, C., & Adamec, J. (2019). Metabolome Analysis. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 463-475. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20134-9>
- Pfister, H., & Fuchs, P. G. (1994). Anatomy, Taxonomy and Evolution of Papillomaviruses. *Intervirology*, 37 (3-4), 143-149. <https://doi.org/10.1159/000150372>
- Pindel, A., & Sadler, A. (2011). The Role of Protein Kinase R in the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31 (1), 59-70. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0099>
- Potten, C. S. (2004). Keratinocyte Stem Cells, Label-Retaining Cells and Possible Genome Protection Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 9 (3), 183-195. <https://doi.org/10.1111/j.1087-0024.2004.09305.x>
- Protocols used for LC-MS analysis – Metabolomics Core Facility. (n.d.). European Molecular Biology Laboratory. <https://www.embl.org/groups/metabolomics/protocols-used-for-lc-ms-analysis/>
-
-

- Prusinkiewicz, M. A., & Mymryk, J. S. (2019). Metabolic Reprogramming of the Host Cell by Human Adenovirus Infection. *Viruses*, 11 (2), 1-21. <https://doi.org/10.3390/v11020141>
- Quiñones S, Luis, Rosero P, Mario, Roco A, Ángela, Moreno T, Iván, Sasso A, Jaime, Varela F, Nelson, Cáceres L, Dante, & Saavedra S, Iván. (2008). Papel de las enzimas citocromo p450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas. *Revista médica de Chile*, 136(10), 1327-1335. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872008001000015>
- Raboune, S., Stuart, J., Leishman, E., Takacs, S. M., Rhodes, B. P., Basnet, A., Jameyfield, E., McHugh, D., Widlanski, T. S., & Bradshaw, H. B. (2014). Novel endogenous N-acyl amides activate TRPV1-4 receptors, BV-2 microglia, and are regulated in brain in an acute model of inflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00195>
- Raniga, K., & Liang, C. (2018). Interferons: Reprogramming the Metabolic Network against Viral Infection. *Viruses*, 10(1), 36. <https://doi.org/10.3390/v10010036>
- Reisdorph, N., Walmsley, S. J., & Reisdorph, R. (2019). A Perspective and Framework for Developing Sample Type Specific Databases for LC/MS-Based Clinical Metabolomics. *Metabolites*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.3390/metabo10010008>
- Reiser, J., Hurst, J., Voges, M., Krauss, P. R., Münch, P., Iftner, T., & Stubenrauch, F. (2011). High-Risk Human Papillomaviruses Repress Constitutive Kappa Interferon Transcription via E6 To Prevent Pathogen Recognition Receptor and Antiviral-Gene Expression. *Journal of Virology*, 85(21), 11372–11380. <https://doi.org/10.1128/jvi.05279-11>
- Rincon-Orozco, B., Halec, G., Rosenberger, S., Muschik, D., Nindl, I., Bachmann, A., Ritter, T. M., Dondog, B., Ly, R., Bosch, F. X., Zawatzky, R., & Rosl, F. (2009). Epigenetic Silencing of Interferon- in Human Papillomavirus Type 16-Positive Cells. *Cancer Research*, 69 (22), 8718-8725. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-0550>
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1(SUPPL.98), 1–24.
- Salek, R. M., Steinbeck, C., Viant, M. R., Goodacre, R., & Dunn, W. B. (2013). The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *GigaScience*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2047-217x-2-13>
- Schiffman, M., & Solomon, D. (2013). Cervical-Cancer Screening with Human Papillomavirus and Cytologic Cotesting. *New England Journal of Medicine*, 369 (24), 2324-2331. <https://doi.org/10.1056/nejmcp1210379>
- Schiller, J. T., Day, P. M., & Kines, R. C. (2010). Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic Oncology*, 118 (1), S12-S17. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.004>
-
-

- Schwartz, M., & Chuang, L. (2018). Cervical Cancer. *Encyclopedia of Reproduction*, 121-124. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64740-2>
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., & Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314, 111-114. <https://doi.org/10.1038/314111a0>
- Sedger, L. M. (2013). microRNA control of interferons and interferon induced anti-viral activity. *Molecular Immunology*, 56 (4), 781-793. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.07.009>
- Serrano, B. M., Brotons, M., Bosch, F., & Bruni, L. (2017). Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 47, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006>
- Shi, K., Wang, Q., Su, Y., Xuan, X., Liu, Y., Chen, W., Qian, Y., & Lash, G. E. (2018). Identification and functional analyses of differentially expressed metabolites in early stage endometrial carcinoma. *Cancer Science*, 109(4), 1032–1043. <https://doi.org/10.1111/cas.13532>
- Smith, C., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Soto, U., Denk, C., Finzer, P., Hutter, K.-J., zur Hausen, H., & Rsl, F. (2000). Genetic complementation to non-tumorigenicity in cervical-carcinoma cells correlates with alterations in AP-1 composition. *International Journal of Cancer*, 86 (6), 811-817. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000615\)86](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000615)86)
- Spinelli, J. B., Yoon, H., Ringel, A. E., Jeanfavre, S., Estruch, R., & Haigis, M. C. (2017). Metabolic recycling of ammonia via glutamate dehydrogenase supports breast cancer biomass. *Science*, 358(6365), 941–946. <https://doi.org/10.1126/science.aam9305>
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., & Florin, L. (2008). Clathrin- and Caveolin-Independent Entry of Human Papillomavirus Type 16—Involvement of Tetraspanin-Enriched Microdomains (TEMs). *PLoS ONE*, 3 (10), e3313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003313>
- Stanley, M. (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*, 117 (2), S5-S10. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>
- Stanley, M. A. (2012). Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 25 (2), 215-222. <https://doi.org/10.1128/cmr.05028-11>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., & Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. (2009). ¿Cuántos componentes hay en una mezcla? Respuesta cromatográfica. *Scientia*
-
-

- Chromatographica, 1.
<https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a3.pdf>
- Stepp, W. H., Meyers, J. M., & McBride, A. A. (2013). Sp100 Provides Intrinsic Immunity against Human Papillomavirus Infection. *mBio*, 4 (6), 1-13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00845-13>
- Sugimoto, M., Kawakami, M., Robert, M., Soga, T., & Tomita, M. (2012). Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. *Current Bioinformatics*, 7(1), 96–108. <https://doi.org/10.2174/157489312799304431>
- Tanner, J. J., Fendt, S., & Becker, D. P. (2018). The Proline Cycle As a Potential Cancer Therapy Target. *Biochemistry*, 57(25), 3433–3444. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00215>
- Thaker, S. K., Ch'ng, J., & Christofk, H. R. (2019). Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biology*, 17 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0678-9>
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2010). *Introducción a la biotecnología* (2nd ed.). Pearson Educación.
- Theodoridis, G., Gika, H. G., & Wilson, I. A. (2011). Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. *Mass Spectrometry Reviews*, 30(5), 884–906. <https://doi.org/10.1002/mas.20306>
- Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. H., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T., Fitzgerald, K. A., Paludan, S. R., & Bowie, A. R. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology*, 11(11), 997–1004. <https://doi.org/10.1038/ni.1932>
- Vargas, H., Sánchez, J. P., Guerrero, M. L., Ortiz, L. T., Rodríguez, D. M., Amaya, J., Diaz, L. P., Gómez, S. L., & Golijow, C. (2016). Type-Specific Identification of Genital Human Papillomavirus Infection in Women with Cytological Abnormality. *Acta Cytologica*, 60 (3), 211-216. <https://doi.org/10.1159/000446389>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185-S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
- Vladimer, G. I., GÃ3rna, M. W., & Superti-Furga, G. (2014). IFITs: Emerging Roles as Key Anti-Viral Proteins. *Frontiers in Immunology*, 5, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00094>
-
-

- Weimann, E., Silva, M. B. B., Murata, G. M., Bortolon, J. R., Dermargos, A., Curi, R., & Hatanaka, E. (2018). Topical anti-inflammatory activity of palmitoleic acid improves wound healing. *PLOS ONE*, 13(10), e0205338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205338>
- Witting, M. (2013). Host - Pathogen metabolomics of *Pseudomonas aeruginosa* infection models.
- Yin, M., Tan, S. F., Li, X., Hou, Y., Cao, G., Li, K., Kou, J., & Lou, G. (2016). Identification of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine as novel biomarkers for cervical cancers in a prospective cohort study. *Tumor Biology*, 37(4), 5485–5492. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4164-x>
- Young, S. L., & Lessey, B. A. (2010). Progesterone Function in Human Endometrium: Clinical Perspectives. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(01), 005–016. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1242988>
- Yu Y, Clippinger AJ, Alwine JC. Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends Microbiol* (2011) 19:360–7. [10.1016/j.tim.2011.04.002](https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.002)
- Yuan, C., Filippova, M., Krstenansky, J. L., & Duerksen-Hughes, P. J. (2016). Flavonol and imidazole derivatives block HPV16 E6 activities and reactivate apoptotic pathways in HPV+ cells. *Cell Death and Disease*, 7(1), e2060. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.391>
- Yumura, S., Matsuzaki, R., & Kitanishi-Yumura, T. (1995). Introduction of Macromolecules into Living Dictyostelium Cells by Electroporation. *Cell Structure and Function*, 20 (3), 185–190. <https://doi.org/10.1247/csf.20.185>
- Zhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X., & Qiao, S. (2017). Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0139-z>
- zur Hausen, H. (2009b). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 384 (2), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>
-
-