

Establecimiento de dos líneas celulares de cáncer de cuello uterino con la mutación M593S en la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A)

Briyid Celenny Ordóñez Guarín

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Director

Bladimiro Rincón-Orozco

Doctor en Ciencias Biológicas

Codirector

Brigitte Ofelia Peña-López

Magíster en Microbiología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Pregrado en Biología

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander y al laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer, por permitirme explorar una pequeña parte de la vida.

A mi familia y amigos, quienes me enseñaron a ser antes de saber.

A Brigitte, por su entusiasmo y apoyo incondicional.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	12
1. Objetivos.....	20
1.1 Objetivo General.....	20
1.2 Objetivos Específicos.....	21
2. Metodología.....	21
2.1 Avances del Laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer (GEMEICA).....	22
2.2 Caracterización de las líneas celulares HeLa y SiHa.....	24
2.2.1 Detección de <i>Mycoplasma sp.</i> en HeLa y SiHa.....	24
2.2.1.1 Extracción de ADN.....	24
2.2.1.2 PCR digital de <i>Mycoplasma sp.</i>	25
2.2.2 Niveles transcripcionales de VPH E7 en HeLa y SiHa.....	25
2.2.2.1 Extracción de ARN.....	25
2.2.2.2 Retrotranscripción.....	26
2.2.2.3 PCR digital de E7 en HeLa (VPH-18) y SiHa (VPH-16).....	26
2.2.3 Niveles transcripcionales de CPT1A endógeno.....	25
2.2.3.1 Extracción de ARN y retrotranscripción.....	25
2.2.3.2 PCR digital de <i>CPT1A</i> en HeLa y SiHa.....	26
2.2.4. Western-blot de CPT1A endógeno.....	26
2.2.4.1 Extracción de proteínas.....	26
2.2.4.2 Cuantificación de proteínas.....	27
2.2.4.3 Western-blot.....	28
2.2.4.3.1 Marcaje con anticuerpos y detección por quimioluminiscencia para detección de CPT1A.....	28
2.2.4.3.2 Stripping (remoción de anticuerpos).....	29
2.2.4.3.3 Control de carga con β -actina.....	29
2.3 Establecimiento de dos líneas celulares de CCU con CPT1A M593S.....	31
2.3.1 Titulación de blasticidina.....	32
2.3.2 Titulación de polibreno.....	33
2.3.3 Producción de partículas lentivirales.....	34
2.3.3.1 Cultivo celular.....	34
2.3.3.2 Transfección.....	35

2.3.3.3 Colecta de partículas lentivirales.....	36
2.3.3.4 Concentración de partículas lentivirales.....	36
2.3.4 Transducción de células de CCU.....	36
2.3.4.1 Cultivo celular.....	36
2.3.4.2 Transducción.....	37
2.3.4.3 Selección de las células transducidas.....	38
3. Resultados y discusión.....	39
3.1 Caracterización de las líneas celulares HeLa y SiHa.....	39
3.1.1 Detección de Mycoplasma sp. en HeLa y SiHa.....	39
3.1.2 Niveles transcripcionales del gen VPH <i>E7</i> en HeLa y SiHa.....	40
3.1.3 Niveles transcripcionales del gen <i>CPT1A</i>	41
3.1.4 Detección de la proteína CPT1A endógena.....	42
3.2 Establecimiento de dos líneas celulares de CCU con CPT1A M593S5.....	44
3.2.1 Titulación de blasticidina.....	44
3.2.2 Titulación de polibreno.....	46
3.2.3 Producción de lentivirus en células HEK293FT.....	47
3.2.4 Transducción.....	48
3.2.5 Detección de CPT1A M593S.....	51
4. Conclusiones.....	51
5. Recomendaciones y limitaciones.....	52
Referencias Bibliográficas.....	53
Apéndices.....	70

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1A. Cebadores y secuencias de la mutagénesis sitio dirigida de M593S en <i>CPT1A</i>	61
Tabla 1B. Cebadores para la generar extremos romos en <i>CPT1A</i> M593S para la clonación.....	62
Tabla 1C. Secuencias de los cebadores utilizados en las PCRs digitales.....	62
Tabla 1D. Cuantificación de los plásmidos pLenti6/V5-D-TOPO <i>CPT1A</i> M593S extraídos	75
Tabla 2D. Secuencias de los cebadores para PCR de <i>CPT1A</i> M593S.....	78

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Actividad de CPT1A en la membrana externa de la mitocondria.....	16
Figura 2. Mapa de pLenti6/V5-D-TOPO.....	19
Figura 3. Diagrama general de la metodología.....	21
Figura 4. Avances del Laboratorio de Genética Molecular y Cáncer (GEMEICA).....	22
Figura 5. Distribución celular para la cuantificación de las proteínas extraídas de HeLa y SiHa.	27
Figura 6. Experimentos para el establecimiento de dos líneas celulares de CCU con CPT1A M593S.....	30
Figura 7. Distribución celular para titulación de blasticidina para HeLa y SiHa	31
Figura 8. Distribución celular para titulación de polibreno para HeLa y SiHa.....	33
Figura 9. Distribución celular para transducción de HeLa y SiHa.....	36
Figura 10. Cuantificación de <i>Mycoplasma sp.</i> en HeLa y SiHa mediante PCR digital.....	37
Figura 11. Cuantificación de VPH <i>E7</i> en HeLa y SiHa mediante PCR digital.....	38
Figura 12. Cuantificación de <i>CPT1A</i> en HeLa y SiHa mediante PCR digital.....	39
Figura 13. Western-blot de CPT1A.....	40
Figura 14. Tasa de viabilidad de HeLa a diferentes concentraciones de blasticidina.....	42
Figura 15. Tasa de viabilidad de SiHa a diferentes concentraciones de blasticidina.....	42
Figura 16. Efecto de la transfección en células HEK293FT.....	44
Figura 17. Selección con blasticidina de células transducidas.....	46
Figura 1D. Electroforesis de <i>CPT1A</i> M593S con los extremos romos.....	73
Figura 2D. Transformación de pLenti6/V5-D-TOPO <i>CPT1A</i> M593S en <i>E. coli</i> competentes.....	74
Figura 3D. Digestión enzimática de pLenti6/V5-D-TOPO <i>CPT1A</i> M593S con 30 ng/μL.....	76
Figura 4D. Digestión enzimática de pLenti6/V5-D-TOPO <i>CPT1A</i> M593S con 60 ng/μL.....	77
Figura 5D. PCR de las colonias de 60 ng/μL de ADN en la clonación.....	78

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Mutagénesis sitio dirigida de M953S en <i>CPT1A</i>	71
Apéndice B. Clonación de <i>CPT1A</i> M593S en pLenti6/V5-D-TOPO.....	71
Apéndice C. Listado de cebadores.....	72
Apéndice D. Experimentos adicionales para la verificación del plásmido.....	72

Glosario

CPT1A (carnitina palmitoiltransferasa 1A): enzima mitocondrial esencial en la beta-oxidación de ácidos grasos, un proceso clave para la producción de energía. Su función principal es facilitar el transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior de las mitocondrias, y su actividad es regulada por el malonil-CoA.

Lentivirus: virus de ARN de cadena sencilla con envoltura, capaz de adherirse a los receptores de las células hospedadoras para transferir material genético modificado al citoplasma.

M593S: mutación que implica un cambio del aminoácido metionina (M) en la posición 593 por una serina (S) en la proteína CPT1A.

Transducción: proceso mediante el cual se transfiere material genético a una célula eucariota a través de un vector, como un lentivirus. Esta transferencia puede generar una expresión genética estable o transitoria.

Transgén: Gen introducido artificialmente en el genoma de un organismo mediante técnicas de ingeniería genética. Puede provenir de la misma especie o de una especie diferente, y se inserta con el fin de que sea expresado por el organismo receptor, otorgándole nuevas características o funciones.

Resumen

Título: Establecimiento de dos líneas celulares de cáncer de cuello uterino con la mutación M593S en la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A)^{1*}

Autores: Briyid Celenny Ordóñez-Guarín^{2*}

Palabras Clave: cáncer de cuello uterino, CPT1A, lentivirus, M593S, transducción, vector.

Descripción: El cáncer de cuello uterino (CCU) constituye un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta incidencia y morbilidad. Diversas investigaciones han identificado la glucólisis y la beta-oxidación como vías metabólicas clave en la progresión tumoral, lo que las convierte en posibles dianas terapéuticas. En este contexto, el desarrollo de modelos *in vitro* resulta esencial para el estudio del metabolismo de las células cancerosas y la identificación de estrategias terapéuticas dirigidas. El objetivo de esta investigación es establecer dos líneas celulares de CCU con la proteína CPT1A mutada en la posición M593S, una región crucial para la beta-oxidación. Para ello, se llevó a cabo la transducción de las líneas celulares de interés mediante lentivirus generados a partir del vector pLenti6/V5-D-TOPO, el cual contiene el gen de *CPT1A* mutado en M593S a través de mutagénesis sitio-dirigida. Sin embargo, se observó que el vector no insertaba correctamente el gen mutado (2322 pb), lo que resultaba en la generación de lentivirus aberrantes y provocaba una transducción fallida. En conclusión, se resalta la importancia de una correcta construcción y validación de los vectores, ya que son esenciales para el éxito de la transducción. Finalmente, se recomienda realizar una nueva transducción utilizando el vector confirmado, lo que permitirá establecer modelos adecuados para investigar las implicaciones metabólicas específicas de este tipo de cáncer y contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos.

^{1*} Trabajo de Grado

^{2**} Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Bladimiro Rincón-Orozco. Doctor en Ciencias Biológicas. Codirector: Brigitte Ofelia Peña-López. Magíster en Microbiología.

Abstract

Title: Establishment of two cervical cancer cell lines with the M593S mutation in Carnitine Palmitoyltransferase 1A (CPT1A) enzyme.^{3*}

Author(s): Briyid Celenny Ordóñez-Guarín^{4*}

Key Words: cervical cancer, CPT1A, M593S, lentivirus, transduction, vector.

Description: Cervical Cancer (CCU) constitutes a global public health problem due to its high incidence and morbidity. Various research studies have identified glycolysis and beta-oxidation as key metabolic pathways in tumor progression, making them potential therapeutic targets. In this context, the development of *in vitro* models is essential for studying cancer cell metabolism and identifying targeted therapeutic strategies. The objective of this research is to establish two cervical cancer cell lines with the CPT1A protein mutated at the M593S position, a crucial region for beta-oxidation. To achieve this, the cell lines of interest were transduced using lentiviruses generated from the pLenti6/V5-D-TOPO vector, which contains the *CPT1A* gene mutated at M593S through site-directed mutagenesis. However, it was observed that the vector did not correctly insert the mutated gene (2322 bp), resulting in the generation of aberrant lentiviruses and causing failed transduction. In conclusion, the importance of proper vector construction and validation is emphasized, as these are essential for the success of transduction. Finally, it is recommended to perform a new transduction using the confirmed vector, which will allow the establishment of appropriate models to investigate the specific metabolic implications of this type of cancer and contribute to the development of new treatments.

^{3*} Degree Work

^{4**} Faculty of Sciences, School of Biology. Biology Program. Director: Bladimiro Rincón-Orozco, PhD in Biological Sciences. Co-director: Brigitte Ofelia Peña-López, MSc in Microbiology.

Introducción

El cáncer de cuello uterino (CCU) es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2022). Solo en 2020, se reportaron alrededor de 604,000 nuevos casos y 342,000 muertes asociadas (Song et al., 2024). En América Latina, Colombia figura entre los países con mayor incidencia, junto con Ecuador y Brasil (Armijo and Sánchez, 2019). Sus factores de riesgo principales incluyen la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), el tabaquismo y el nivel socioeconómico (Beavis et al., 2017; Zhang et al., 2020). Estudios sobre el CCU han establecido diversas líneas celulares que permiten estudiar procesos metabólicos específicos. En particular, se han realizado experimentos *in vitro* enfocados en la inhibición de transportadores o enzimas clave en la glucólisis (Ma y Song, 2019; Chen et al., 2021). Investigaciones recientes han relacionado la disminución de la beta-oxidación, mediada por la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A), con el aumento de la glucólisis en este tipo de cáncer. Este fenómeno parece ser una estrategia que favorece la proliferación de las células cancerosas (Abudula et al., 2020; Arip et al., 2022). Sin embargo, hasta la fecha, no se han informado estudios que exploren la posibilidad de redirigir el metabolismo hacia la beta-oxidación como un mecanismo para reducir la glucólisis en el CCU.

Teniendo en cuenta lo anterior, esta investigación propuso establecer dos líneas celulares de CCU con la mutación M593S, que evita la inhibición de la enzima CPT1A, mediante un sistema de transducción lentiviral de tercera generación. El objetivo fue utilizar esta mutación como un mecanismo para reorientar el metabolismo tumoral hacia la beta-oxidación, con el fin de establecer modelos experimentales que permitan investigar la importancia de esta vía metabólica y su interacción con la glucólisis. Ambas rutas metabólicas han sido ampliamente

investigadas debido a su potencial terapéutico en distintos tipos de cáncer. Asimismo, este enfoque podría abrir nuevas oportunidades para identificar compuestos capaces de modular la resistencia a la quimioterapia a través de la alteración del metabolismo celular. De esta manera, estos avances aportarían información valiosa para una mejor comprensión de la biología del CCU y para el diseño de estrategias que reduzcan el impacto de esta enfermedad en las personas afectadas.

Cáncer de cuello uterino

El CCU se caracteriza por el crecimiento incontrolado de células en el cuello uterino, la estructura que conecta el útero con la vagina (Ghosh et al., 2022). Este tipo de cáncer se desarrolla en la zona de transformación, donde confluyen dos tipos celulares: las células escamosas del exocérvix y las glandulares del endocérvix (Ghosh et al., 2022). Según el tipo celular de origen, el CCU se clasifica en tres formas principales: el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma adenoescamoso (Ghosh et al., 2022).

La causa principal del CCU es la infección persistente con el VPH, una infección de transmisión sexual (Luo et al., 2022). Se ha identificado la presencia del VPH en más del 90 % de los casos, siendo los genotipos 16 y 18 los responsables de aproximadamente el 70 % de ellos (Kong et al., 2019; Lin et al., 2021). Esta infección puede provocar neoplasia intraepitelial cervical (NIC), una lesión precursora que puede evolucionar al cáncer invasivo si no es tratada y detectada a tiempo (Li et al., 2022).

Alteraciones metabólicas en el CCU

El CCU se caracteriza por presentar alteraciones metabólicas cruciales para la supervivencia, invasión y proliferación de las células tumorales (Wang et al., 2018; Sun et al.,

2020). Una de las más estudiadas es la glucólisis aeróbica, conocida como el efecto Warburg, que describe la preferencia de las células por la producción y acumulación de lactato en presencia de oxígeno (Gatto y Nielsen, 2015; Liberti y Locasale, 2016; Saito et al., 2020). Esta reprogramación metabólica permite a las células cancerosas satisfacer sus elevadas demandas energéticas y biosintéticas que favorecen su crecimiento y proliferación (Meng, 2024).

Además de la glucólisis, otras rutas metabólicas también desempeñan un papel relevante en la progresión tumoral, entre ellas la beta-oxidación. Este proceso permite a las células producir energía a partir de la degradación de los ácidos grasos en las mitocondrias (Choi et al., 2024). Esta vía adquiere particular relevancia, especialmente en fenómenos como la metástasis, que ocurre cuando un grupo de células madre tumorales escapan del tumor primario e invaden otros tejidos (Chu et al., 2024). Estudios han demostrado que el aumento de la oxidación de ácidos grasos es fundamental para la adquisición de características invasivas y migratorias, así como para la promoción de los procesos metastásicos (Quan et al., 2022). Por otra parte, se ha reportado una mayor expresión de la carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A), una enzima clave y limitante en la beta-oxidación, lo que refuerza su papel en la progresión tumoral (Huang et al., 2022).

Por otro lado, la beta-oxidación ha sido implicada en la supervivencia de tumores cervicales avanzados, los cuales presentan alteraciones en los perfiles de ácidos grasos y fosfatidilcolinas, lo que sugiere una dependencia predominante de la oxidación lipídica como fuente alternativa de energía (Currie et al., 2013). Además, estas modificaciones en las vías lipídicas no solo favorecen la síntesis de nuevas membranas, sino que también impactan en su composición y en la señalización celular, influyendo directamente en el comportamiento tumoral (Currie et al., 2013). Adicionalmente, la beta-oxidación se ha relacionado con la resistencia a la

anoikis, un tipo de muerte celular programada que ocurre cuando las células se desprenden de la matriz extracelular (Liu, 2024). En este sentido, estudios respaldan que la beta-oxidación es fundamental para la progresión e invasión tumoral (Liu, 2024; Yuan, 2024).

La disfunción de la glucólisis y la beta-oxidación en las células cancerosas tiene importantes implicaciones terapéuticas. Ambas rutas metabólicas están asociadas con características como la resistencia a tratamientos, la proliferación celular rápida y la supervivencia en condiciones adversas (Qu et al., 2016; Kuo y Ann, 2018; Lin et al., 2019; Ma y Zong, 2020; Cao et al., 2021; Peng et al., 2021). En este contexto, se ha sugerido que redirigir el metabolismo hacia una de estas vías ofrece un prometedor potencial terapéutico (Jiang et al., 2021).

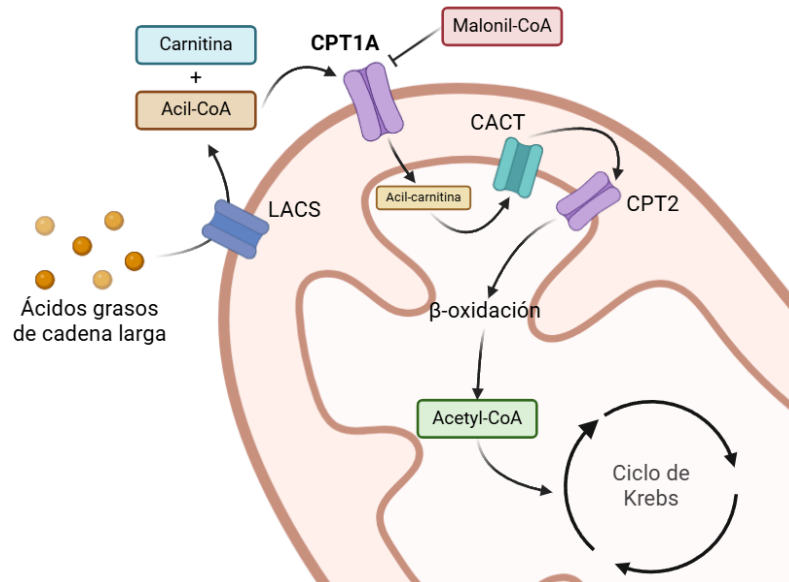
Carnitina palmitoiltransferasa 1A (CPT1A)

La carnitina palmitoiltransferasa (CPT) cumple una función clave en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga, al transportar estas moléculas a las mitocondrias para generar energía mediante la beta-oxidación (Choi et al., 2024). Existen dos isoformas principales de esta enzima: CPT1 y CPT2. La CPT1 está ubicada en la membrana mitocondrial externa y cataliza la transferencia del grupo acilo desde la acil-CoA hacia la carnitina, formando acilcarnitina, una molécula capaz de atravesar la membrana mitocondrial (Hao et al., 2021) (Figura 1). Esta enzima se subdivide en tres isoformas: CPT1A, CPT1B y CPT1C, las cuales presentan distribuciones tisulares y mecanismos de regulación diferenciados. En particular, CPT1A se expresa predominantemente en el hígado y tiene un papel central en la regulación de la oxidación de ácidos grasos (Efeoğlu et al., 2022). Su actividad representa un paso limitante dentro de esta ruta metabólica, regulando la velocidad de oxidación (Ji et al., 2024). Esta isoforma es inhibida por el

malonil-CoA, un metabolito clave en la síntesis de ácidos grasos que bloquea la entrada de sustratos a la beta-oxidación (Lu et al., 2021).

Figura 1.

Actividad de CPT1A en la membrana externa de la mitocondria.



En el CCU, la expresión de CPT1A está significativamente aumentada en las células metastásicas en comparación con las no metastásicas. Este incremento se asocia con una mayor oxidación de ácidos grasos, la cual proporciona energía y apoya la síntesis de intermediarios metabólicos necesarios para el crecimiento tumoral y la metástasis (Zhao et al., 2021; Liu et al., 2024).

Mutación M593S

La mutación M593S en el gen de *CPT1A* ha llamado la atención debido a sus implicaciones en el metabolismo de ácidos grasos. El reemplazo de la metionina por serina en la posición 593 insensibiliza el sitio de unión al malonil-CoA, lo cual mejora la catálisis de la carnitina y evita la inhibición de la actividad de CPT1A (Gao et al., 2011; Morillas et al., 2003).

Este cambio podría modificar los mecanismos de regulación del metabolismo lipídico en las células cancerosas (Rodríguez-Rodríguez et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, la beta-oxidación mediada por CPT1A es esencial para la proliferación y metástasis de las células cancerosas. En este contexto, el desarrollo de modelos experimentales con la mutación M593S podría favorecer un entorno metabólico óptimo para el crecimiento tumoral, al potenciar la producción de energía mediante beta-oxidación. Esta estrategia podría ofrecer información clave sobre el valor terapéutico de esta vía metabólica y su relación con la glucólisis.

Sistemas de transducción lentiviral

Los sistemas de transducción lentiviral son una herramienta eficaz para generar líneas celulares con mutaciones específicas y estables (Elegheert et al., 2018). Los lentivirus son un tipo de retrovirus perteneciente al género *Lentivirus*, se caracterizan por su capacidad para infectar tanto a células que se dividen como a las que no lo hacen (Naldini et al., 1996; Saenz y Poeschla, 2004). Una de sus propiedades más relevantes es la eficiencia con la que transfieren e integran su material genético en el genoma de la célula hospedadora (Naldini et al., 1996; Yu et al., 2014), lo que permite una expresión estable y sostenida de los transgenes en las células diana (Naldini et al., 1996).

Clasificación de los sistemas de transducción lentiviral

Los sistemas de transducción lentiviral pueden clasificarse en tres generaciones (Wolff and Mikkelsen, 2022). Las diferencias entre ellas consisten en su capacidad de minimizar la generación de virus recombinantes (McGinley et al., 2011; Dautzenberg et al., 2020). En particular, los vectores de tercera generación presentan un genoma viral dividido, lo que mejora

su seguridad y ha permitido su aplicación en diversos estudios (Milone and O'Doherty, 2018). La producción de partículas lentivirales requiere de una línea celular productora, como la HEK293FT, donde se ensamblan el plásmido de transferencia lentiviral junto con tres plásmidos que contienen los genes de empaque y envoltura (White et al., 2017). La eficiencia de la transducción lentiviral se ha demostrado en diversos tipos de células, incluyendo neuronas, células madre hematopoyéticas, células epiteliales renales, fibroblastos y células dendríticas (Naldini et al., 1996; Zarei et al., 2004; Mandal and Chaubey, 2018).

El sistema lentiviral elegido para esta investigación es el *ViraPower Lentiviral Expression Systems* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.). Este permite generar lentivirus basados en el VIH-1, que serán posteriormente utilizados para la transferencia y expresión de un gen de interés en células mamíferas. Este sistema está compuesto por un plásmido de expresión (pLenti6/V5-D-TOPO, descrito más adelante) que contiene el gen de interés bajo el control de un promotor específico, junto con las secuencias necesarias para su empaquetamiento en viriones. Además, incorpora una mezcla de tres plásmidos de empaquetamiento (pLP1, pLP2 y pLP/VSVG) que proporcionan las proteínas estructurales y de replicación necesarias para la producción del lentivirus (Thermo Fisher Scientific, 2010).

pLenti6/V5-D-TOPO

pLenti6/V5-D-TOPO es un vector de expresión lentiviral de tercera generación, con un tamaño aproximado de 6963 pb ([Figura 2](#)), diseñado para facilitar la clonación direccional rápida mediante el sistema TOPO y permitir la alta expresión de productos de PCR en células de mamíferos utilizando el sistema *ViraPower Lentiviral Expression* (Thermo Fisher Scientific, 2010).

Este vector posee un esqueleto derivado del genoma del VIH-1, lo cual facilita la integración estable del gen de interés en el genoma de la célula hospedadora a través de las repeticiones terminales largas (LTRs), que promueven la expresión sostenida tanto en células en división como en células quiescentes (Relić et al., 2018).

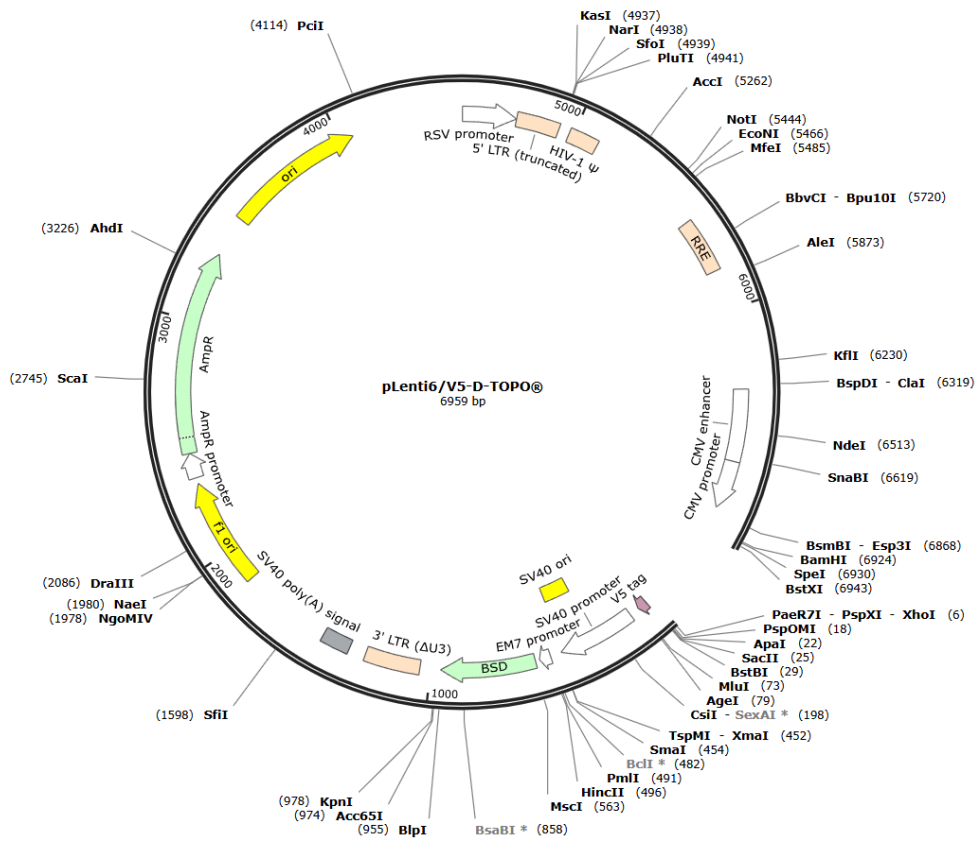
El vector incorpora un sitio de clonación TOPO, que permite la inserción rápida del gen de interés mediante el uso de la topoisomerasa I, para la ligadura de fragmentos de ADN sin necesidad de enzimas de restricción, ni ligasas, lo que agiliza el proceso de clonación y reduce el tiempo de construcción del vector (Ray et al., 2012; Rima et al., 2017).

Además, cuenta con un promotor de citomegalovirus (CMV), que garantiza una expresión robusta del gen de interés en diversas células de mamíferos (Helbig et al., 2013; Song et al., 2016). Para facilitar la detección, el vector incluye una etiqueta epítopa V5 que facilita la identificación y purificación de la proteína expresada (Horie et al., 2010; Shigeyasu et al., 2018).

Finalmente, el gen de resistencia a la blasticidina presente en el vector permite la selección de células transducidas con éxito, lo cual es esencial para aislar líneas celulares que expresan el gen de interés de manera estable (Kim et al., 2021).

Figura 2.

Mapa de pLenti6/V5-D-TOPO.



1. Objetivos

1.1 *Objetivo General*

Establecer dos líneas celulares HeLa y SiHa de cáncer de cuello uterino con la proteína CPT1A mutada en M593S.

1.2 *Objetivos Específicos*

Generar los lentivirus con el gen de *CPT1A* mutado en M593S en células hospederas 293FT.

Transducir las líneas celulares HeLa y SiHa mediante un sistema de transducción lentiviral.

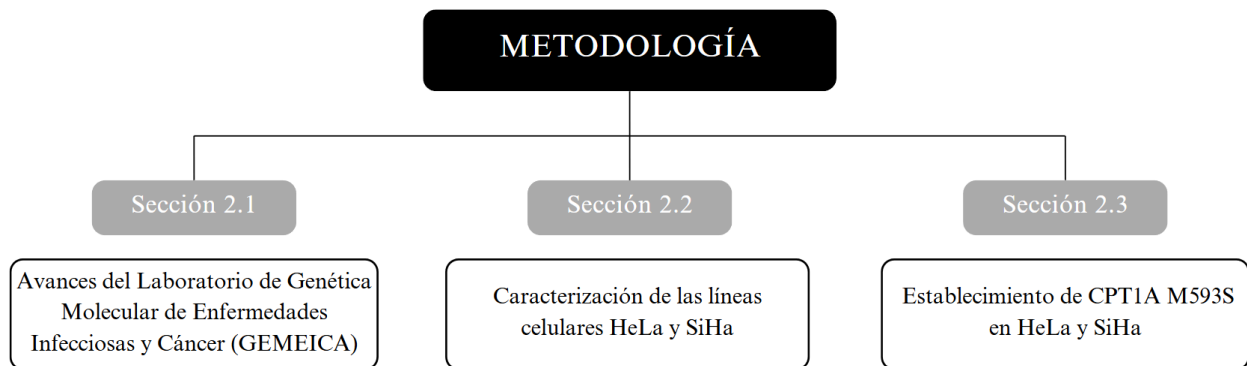
Confirmar la expresión de la proteína *CPT1A* mutado en M593S en ambas líneas celulares.

2. Metodología

La metodología realizada en esta investigación se organizó en tres secciones principales, como se detalla en la [Figura 3](#).

Figura 3.

Diagrama general de la metodología.



2.1 *Avances del Laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer (GEMEICA)*

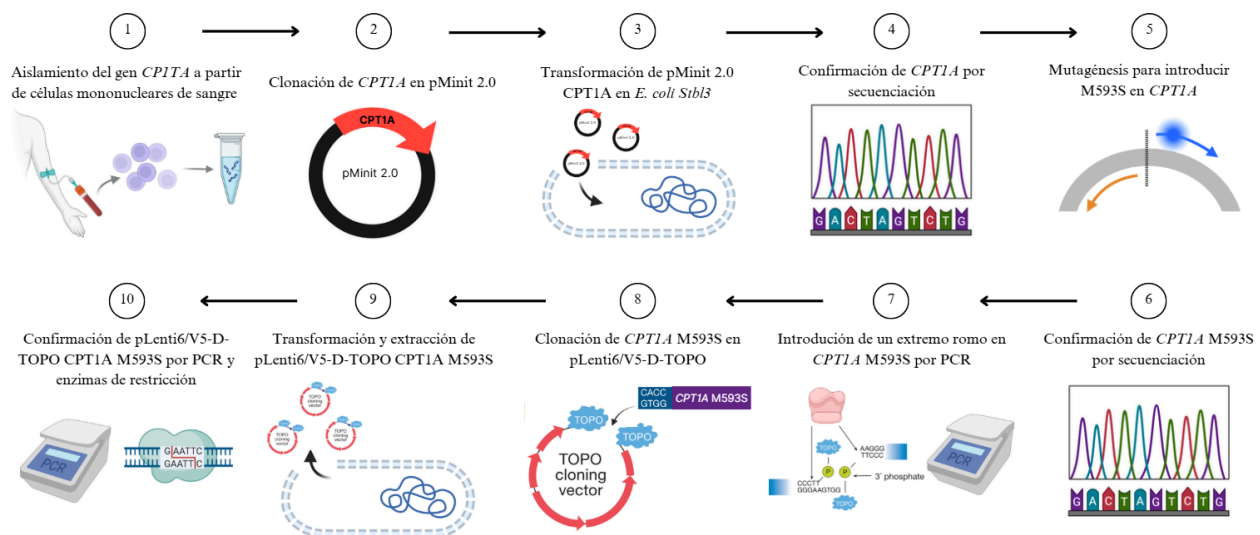
El Laboratorio GEMEICA realizó experimentos que incluyeron el aislamiento del gen *CPT1A* y su clonación en el vector pMinit 2.0 (2588 pb) de New England Biolabs (Massachusetts, USA) utilizando células competentes *One Shot Stbl3 Chemically Competent E. coli* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, E.E.U.U.), diseñadas para la manipulación segura de vectores lentivirales (Thermo Fisher Scientific, 2010). Posteriormente, se confirmó la presencia del gen *CPT1A* mediante secuenciación Sanger y se introdujo la mutación puntual M593S utilizando la técnica de mutagénesis sitio-dirigida por PCR, empleando los cebadores diseñados con el *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* de Agilent Technologies (Santa Clara, USA) ([Apéndice A](#)). La secuencia de la mutación se verificó nuevamente por secuenciación Sanger. Tras la validación de los plásmidos pMinit 2.0 *CPT1A M593S*, se introdujeron extremos romos

en el gen *CPT1A M593S* mediante PCR, utilizando cebadores diseñados según las especificaciones del kit *pLenti6/V5 Directional TOPO® Cloning Kit* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, E.E.U.U.) (Apéndice B).

Posteriormente, se realizó la clonación del gen *CPT1A M593S* con extremos romos en el vector *pLenti6/V5-D-TOPO* para realizar la transformación en células competentes de *E. coli*. Los plásmidos recombinantes de interés se extrajeron mediante el kit de miniprep *Spin Plasmid Mini Two* de Invisorb (Birkenfeld, Alemania). Finalmente, se realizaron las digestiones enzimáticas de verificación y las PCR de control recomendadas por el kit *pLenti6/V5-D-TOPO* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, E.E.U.U.) para confirmar la correcta construcción del vector *pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S* (Figura 2).

Figura 4.

Avances del Laboratorio de Genética Molecular y Cáncer (GEMEICA).



2.2 *Caracterización de las líneas celulares HeLa y SiHa*

2.2.1 *Detección de Mycoplasma sp. en HeLa y SiHa*

2.2.1.1 **Extracción de ADN**

Se cultivaron aproximadamente 500.000 células de cada línea celular en frascos T-75. El medio de cultivo utilizado fue Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de Biowest (Nuailé, Francia), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1X penicilina/estreptomicina de Biowest (Nuailé, Francia). Las células fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80 %. Luego, las células fueron desprendidas de los frascos utilizando tripsina 1X y PBS 1X.

Las células recolectadas se centrifugaron a 3.500 rpm durante 5 min, y se descartó el sobrenadante; este paso se repitió dos veces. A continuación, se añadieron 650 µL de buffer de lisis II (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl) y 10 µL de 10 % SDS. La mezcla se incubó a 56°C durante 1 h, agitando a 400 rpm. Posteriormente, se agregaron 150 µL de 6 M HCl, se agitó con vórtex y se incubó durante 5 min en frío.

Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo. A continuación, se añadieron 750 µL de isopropanol frío, y la mezcla se agitó por inversión hasta observar la formación de la malla de ADN. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 13.000 rpm durante 6 min, se descartó el sobrenadante con precaución y el pellet fue lavado con 200 µL de 70 % etanol, repitiendo este paso una vez más. Finalmente, los pellets se incubaron en un bloque térmico a 40 °C y se suspendieron en 50 µL de buffer TE (pH 7,5). El ADN obtenido fue cuantificado mediante el espectrofotómetro DS-11 de DeNovix (Wilmington, EE.UU.).

2.2.1.2 PCR digital de *Mycoplasma sp.*

A partir del ADN extraído de cada línea celular, se realizó una PCR digital utilizando cebadores cortos específicos para *Mycoplasma sp.* tomados de Timenetsky et al. (2006) (Apéndice C). La reacción se preparó con una concentración de 0,25 ng/μL de ADN, empleando la mezcla *QX200 ddPCR EvaGreen Supermix*, siguiendo el protocolo del fabricante. Las gotas fueron generadas mediante el sistema *QX200 Droplet Generator* y la amplificación se llevó a cabo en un termociclador C1000, utilizando los parámetros establecidos en el manual de la mezcla. Posteriormente, las reacciones fueron analizadas con el software *QuantaSoft* versión 1.7, mediante el lector de gotas *QX200 Droplet Reader*. Todos los reactivos y equipos utilizados fueron suministrados por Bio-Rad (Berkeley, EE. UU.). Finalmente, los datos obtenidos de cada línea celular fueron graficados utilizando el software *GraphPad Prism*, versión 6.04.

2.2.2 Niveles transcripcionales de VPH E7 en HeLa y SiHa

2.2.2.1 Extracción de ARN

Se cultivaron aproximadamente 500.000 células de cada línea celular en frascos T-75 utilizando medio de cultivo DMEM de Biowest (Nuaille, Francia), suplementado con 10 % SFB y 1X penicilina/estreptomicina de Biowest (Nuaille, Francia). Las células fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80 %. Posteriormente, las células fueron desprendidas de los frascos utilizando tripsina 1X y PBS 1X. Para la extracción de ARN, se siguió el protocolo indicado por el kit *Monarch Total RNA Miniprep* de New England Biolabs (Massachusetts, EE.UU.). La cuantificación del ARN obtenido se realizó utilizando un espectrofotómetro DS-11 de DeNovix (Wilmington, EE.UU.).

2.2.2.2 Retrotranscripción

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir del ARN previamente extraído de cada muestra correspondiente a cada línea celular, siguiendo los lineamientos del protocolo de la retrotranscriptasa *LunaScript RT SuperMix Kit* de New England Biolabs (Massachusetts, EE.UU.). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador T100 de Bio-Rad (Berkeley, EE. UU.), empleando los parámetros establecidos en el manual del kit.

2.2.2.3 PCR digital de E7 en HeLa (VPH-18) y SiHa (VPH-16)

Se realizó PCR digital del gen *E7* utilizando 1,0 ng de ADNc correspondiente a cada línea celular. Para las muestras HeLa se emplearon los cebadores y sondas específicas de *E7* del VPH-18, mientras que para las muestras SiHa se utilizaron los correspondientes al *E7* del VPH-16 (Apéndice C) diseñados por el laboratorio GEMEICA. Las reacciones se prepararon con la mezcla *ddPCR Supermix for Probes* siguiendo las indicaciones del fabricante. Los pasos restantes se realizaron conforme a lo descrito en la sección 2.2.1.2. En el software *GraphPad Prism*, versión 6.04, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro and Wilk, 1965), y las diferencias entre las medias de expresión se analizaron mediante la prueba t de Welch (Welch, 1947). En ambas pruebas, se consideró un nivel de significancia de $p = 0.05$.

2.2.3 Niveles transcripcionales de *CPT1A* endógeno

2.2.3.1 Extracción de ARN y retrotranscripción

La extracción de ARN y la retrotranscripción se llevaron a cabo según lo descrito en las secciones 2.2.2.1 y 2.2.2.2, respectivamente.

2.2.3.2 PCR digital de *CPT1A* en HeLa y SiHa

Se realizó PCR digital del gen *CPT1A* utilizando 1,0 ng de ADNc correspondiente a cada línea celular. Para ambas líneas celulares se utilizaron cebadores cortos de *CPT1A* (Apéndice C) diseñados por el laboratorio GEMEICA. Las reacciones se prepararon utilizando la mezcla *QX200 ddPCR EvaGreen Supermix*. Los pasos adicionales se llevaron a cabo según lo descrito en la sección 2.2.1.2. Los resultados se graficaron y analizaron en el software *GraphPad Prism*, versión 6.04, empleando las mismas pruebas estadísticas detalladas en la sección 2.2.2.3.

2.2.4. Western blot de *CPT1A* endógeno

2.2.4.1 Extracción de proteínas

Se cultivaron aproximadamente 500.000 células de cada línea celular en frascos T-75. El medio de cultivo utilizado fue DMEM de Biowest (Nuaille, Francia), suplementado con 10 % SFB y 1X penicilina/estreptomicina de Biowest (Nuaille, Francia). Las células fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80 %.

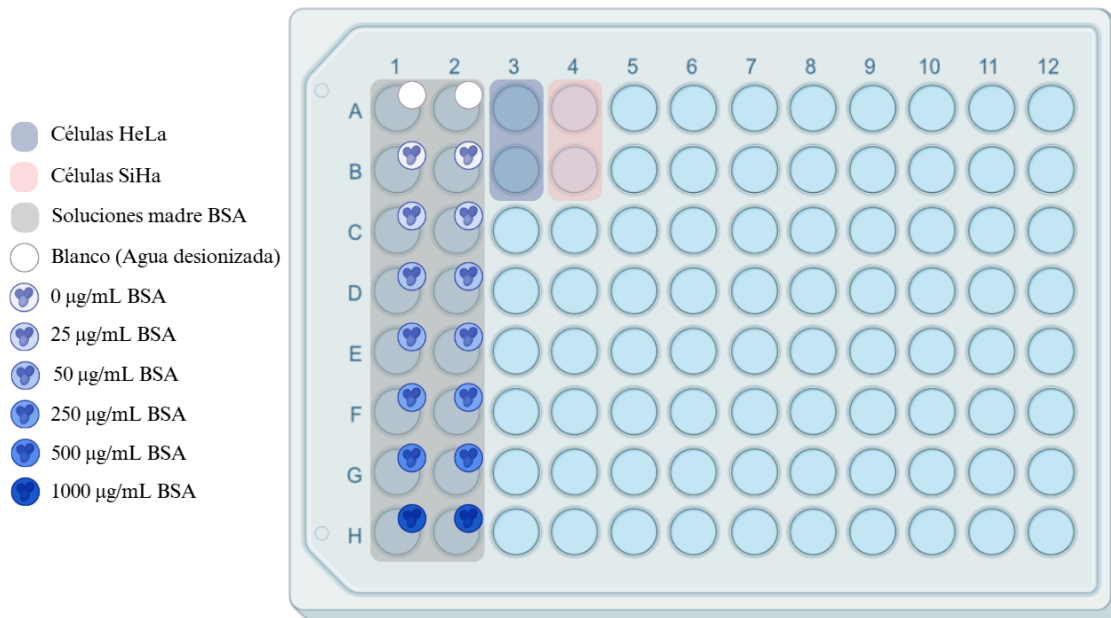
A continuación, las células fueron desprendidas de los frascos mediante tratamiento con 1X tripsina y 1X PBS. Luego, se lavaron con PBS 1X frío para eliminar posibles residuos. La extracción de proteínas se realizó utilizando un buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA), compuesto por 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % desoxicolato de sodio, 0,1 % SDS y un cóctel de inhibidores de proteasas. Para lograr una lisis celular completa y homogeneizar la muestra, se aplicó un pipeteo suave. Todo el procedimiento se llevó a cabo a bajas temperaturas para preservar la integridad de las proteínas.

2.2.4.2 Cuantificación de proteínas

Se cuantificaron las proteínas extraídas mediante el método de Bradford. Para ello, se prepararon soluciones madre de albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones de 0, 25, 50, 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente se añadieron 10 μL de cada solución madre por duplicado en un plato de 96 pozos (Figura 5) para generar la curva de calibración, junto con 10 μL de las muestras de proteínas extraídas de cada línea celular.

Figura 5.

Distribución celular para la cuantificación de las proteínas extraídas de HeLa y SiHa.



Se preparó la cantidad necesaria del reactivo colorante, diluyendo una parte del reactivo de Bradford concentrado de Bio-Rad (Berkeley, USA) con cuatro partes de agua desionizada. Luego, se añadieron 200 μL del reactivo Bradford diluido a cada pozo y se incubó la placa durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia utilizando el espectrofotómetro *CLARIOstar Plus* de BMG LABTECH (Ortenberg, Alemania), los datos

obtenidos fueron graficados para determinar la concentración de proteínas extraídas de cada línea celular.

2.2.4.3 Western blot

Se prepararon dos geles de poliacrilamida siguiendo las especificaciones del kit TGX Stain-Free FastCast. Posteriormente, se acondicionó la estación de electroforesis utilizando la celda de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra con 1X TGS (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 0,1 % de SDS a pH 8.3) y la fuente de alimentación básica PowerPac™. Cada gel fue cargado 40 µg de las proteínas extraídas de cada línea celular y se utilizó un marcador de peso molecular de 250 kD. La electroforesis se realizó en frío a 100 V durante 90 min. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron retirados cuidadosamente. Uno de ellos se preparó para realizar la transferencia, mientras que el otro se incubó en azul de Coomassie durante 1 h para verificar la separación de las proteínas en el gel.

Para la transferencia, la membrana de PVDF se equilibró previamente en metanol, y las mini pilas necesarias se acondicionaron en buffer antes de ensamblar el sándwich de transferencia. Se utilizó el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo, siguiendo su protocolo estándar. Posteriormente, la membrana de PVDF fue bloqueada con TBST (buffer salino con tris y 0,1 % Tween 20) al 5 % BSA y agitación suave durante la noche a 4°C. Todos los materiales y reactivos utilizados fueron adquiridos de Bio-Rad (Berkeley, USA).

2.2.4.3.1 Marcaje con anticuerpos y detección por quimioluminiscencia para detección de CPT1A

Antes de realizar el marcaje con los anticuerpos primarios, la membrana se lavó tres veces con TBST durante 5 min para eliminar los residuos del BSA resultantes del bloqueo. Para el marcaje, la membrana se incubó con agitación suave durante la noche a 4 °C en una dilución

de 1:1000 del anticuerpo monoclonal de conejo CPT1A (D3B3) en TBST al 5 % de BSA. Tras la incubación del primer anticuerpo, se realizaron nuevamente los lavados correspondientes. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP en una dilución 1:2000 en TBST al 5 % de Blotto, durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados fueron adquiridos de Cell Signaling Technology (Danvers, USA). Luego de esta incubación, la membrana se lavó nuevamente tres veces con TBST durante 5 min.

Finalmente, se realizó la detección de CPT1A incubando la membrana durante 2 min con el sustrato quimioluminiscente ECL de Abcam (Cambridge, Reino Unido) siguiendo las recomendaciones del protocolo. Seguido a esto, la membrana fue revelada en el sistema de adquisición iBright 1500 de Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) utilizando el tiempo de exposición automático. Las imágenes obtenidas fueron capturadas, procesadas y analizadas mediante el software del equipo.

2.2.4.3.2 Stripping (remoción de anticuerpos)

Con el objetivo de retirar los anticuerpos previamente fijados en la membrana, se preparó una solución de *stripping* con 5 mL de 10 % SDS, 3,13 mL de 0.5 M Tris-HCl (pH 6,8) y 0,2 mL de β -mercaptoetanol, ajustando el volumen final a 25 mL con agua tipo I. La membrana se incubó en dicha solución durante 30 min a 50°C con agitación suave. Tras la incubación, se bloqueó nuevamente la membrana con TBST al 5 % BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de esto, se lavó con abundante TBST cinco veces durante 5 min.

2.2.4.3.3 Control de carga con β -actina

Para marcar el control de carga, la membrana se incubó con agitación suave durante 8 h a 4°C en una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal de ratón contra β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) en TBST al 5 % BSA. Después de esta incubación, se realizaron

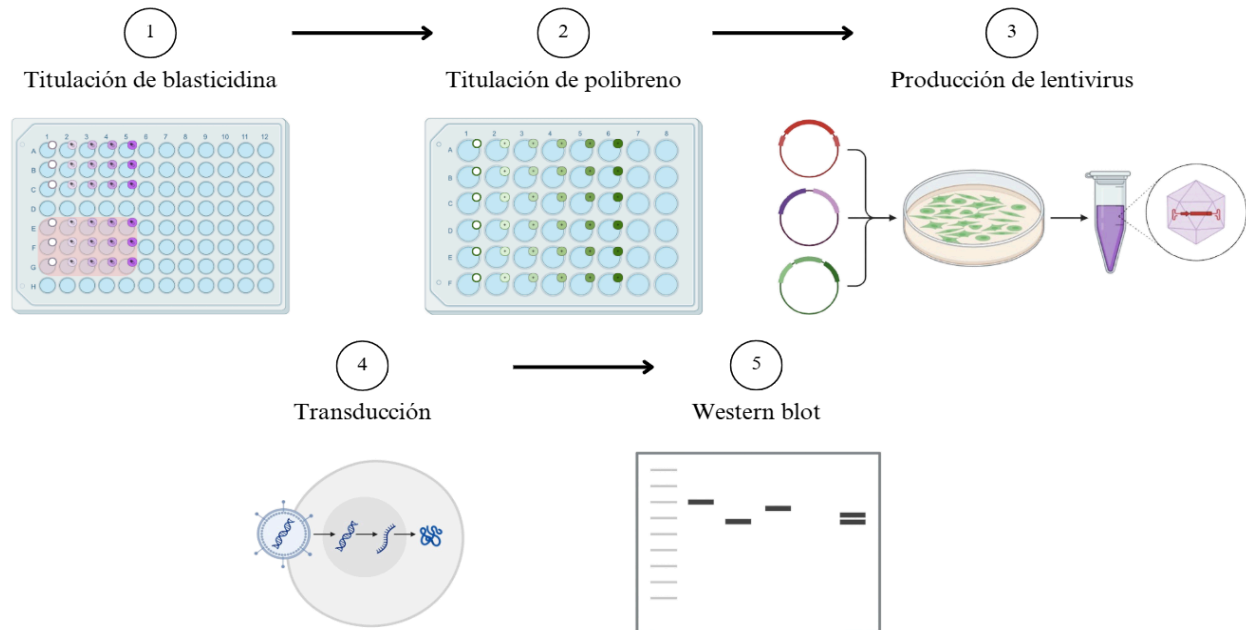
tres lavados consecutivos con TBST durante 5 min cada uno. Luego, la membrana se incubó durante la noche a 4°C en una dilución 1:1000 del anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (específico para la cadena ligera) conjugado con HRP (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) en Blotto (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) al 5 %, para la detección de β -actina. Finalmente, la detección se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito para CPT1A. Las imágenes fueron capturadas, procesadas y analizadas mediante densitometría utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012), normalizando los datos con respecto al control de carga.

2.3 Establecimiento de dos líneas celulares de CCU con CPT1A M593S

Tras la caracterización de ambas líneas celulares, se llevaron a cabo los experimentos dirigidos a introducir la mutación M593S, siguiendo el protocolo descrito en el manual del *ViraPower™ Lentiviral Expression System* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Este procedimiento comenzó a partir del último avance documentado en el laboratorio GEMEICA (Figura 4). A continuación, se detallan los experimentos realizados en esta sección (Figura 6).

Figura 6.

Experimentos para el establecimiento de dos líneas celulares de CCU con CPT1A M593S.



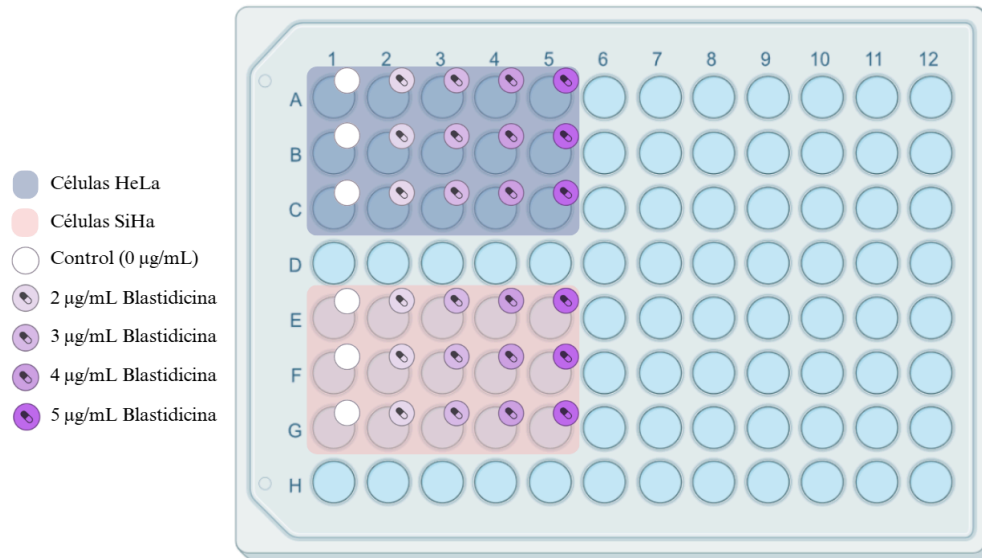
2.3.1 Titulación de blasticidina

Se cultivaron 1.500 células por pozo de las líneas celulares de HeLa y SiHa en medio DMEM de Biowest (Nuaillé, Francia), suplementado con 10 % SFB de Biowest (Nuaillé, Francia) y 1X penicilina/estreptomicina de Biowest (Nuaillé, Francia). Las células fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ en cinco platos de 96 pozos, hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Este proceso se llevó a cabo durante 22 días, con el objetivo de evaluar la viabilidad celular.

En cada plato se asignaron columnas correspondientes al control y a concentraciones de blasticidina de entre 2-5 µg/mL. Se distribuyeron un total de cinco columnas por cada línea celular en cada plato, y cada tratamiento fue realizado por triplicado ([Figura 7](#)). Para garantizar condiciones óptimas de crecimiento y evitar la sobre confluencia en los pozos de control, se realizaron pases celulares de manera regular.

Figura 7.

Distribución celular para titulación de blasticidina para HeLa y SiHa.



Posteriormente, se aplicaron ensayos de viabilidad celular en los días 3, 6, 9, 12 mediante el método colorimétrico MTT. Este ensayo se basa en la reducción del MTT por enzimas mitocondriales, lo que genera cristales de de color púrpura en células vivas. La absorbancia resultante fue medida en un espectrofotómetro *CLARIOstar Plus* de BMG LABTECH (Ortenberg, Alemania) y los datos obtenidos fueron graficados para determinar la concentración de blasticidina en la cual la viabilidad celular era nula. Además, este mismo ensayo se repitió en el día 22 con el objetivo de evaluar la resistencia celular a la blasticidina.

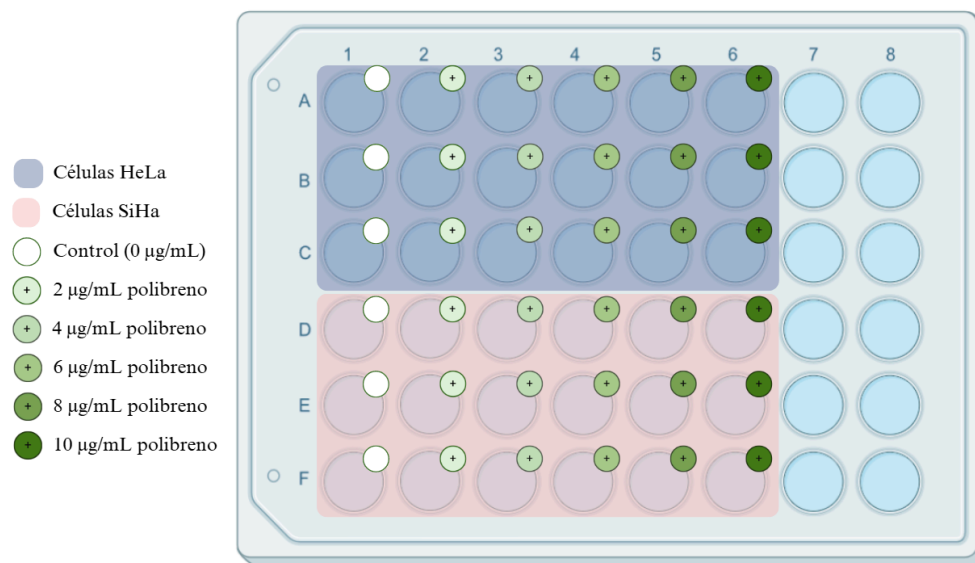
2.3.2 Titulación de polibreno

Se cultivaron 3.500 células por pozo de las líneas celulares de SiHa y HeLa en un plato de 48 pozos. El medio de cultivo utilizado fue DMEM de Biowest (Nuailé, Francia), suplementado con 10 % SFB de Biowest (Nuailé, Francia) y 1X penicilina/estreptomicina de Biowest (Nuailé, Francia). Las células fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ hasta alcanzar una

confluencia aproximada del 50%. Para el tratamiento, se asignaron columnas correspondientes al control y a diferentes concentraciones de polibreno, que variaron entre 2 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aumentando en incrementos de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se distribuyeron un total de seis columnas por cada línea celular en el plato de cultivo, y cada tratamiento fue realizado por triplicado (Figura 8).

Figura 8.

Distribución celular para titulación de polibreno para HeLa y SiHa.



Este tratamiento se mantuvo durante 12 días, y la concentración óptima de polibreno para cada línea celular se determinó en función de la morfología celular observada durante el período de tratamiento.

2.3.3 Producción de partículas lentivirales

2.3.3.1 Cultivo celular

Se cultivaron células HEK293FT productoras de lentivirus en frascos de 75 cm^2 con 10 mL de medio completo selectivo, compuesto por: medio DMEM de Biowest (Nuaille, Francia), 10 % SFB de Biowest (Nuaille, Francia), 0.1 mM de aminoácidos no-esenciales, 6 mM de

L-glutamina, 500 µg/mL de geneticina y 1X penicilina/estreptomicina de Biowest (Nuaille, Francia). Las células fueron incubadas a 37°C, 5 % CO₂ hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80 %.

El día antes de la transfección (día 1), se realizó un subcultivo de tres millones de células por caja de Petri para asegurar una confluencia del 90-95 % el día de la co-transfección, en seis cajas de Petri revestidas con poly-L-lisina de Merck (Nueva Jersey, USA) para mejorar la adherencia celular. Se designaron 3 cajas de Petri para realizar la transfección, cada una con su control correspondiente. El medio utilizado para este subcultivo fue el mismo descrito anteriormente, pero sin geneticina ni penicilina/estreptomicina.

2.3.3.2 Transfección

El día de la transfección (día 2), se prepararon los complejos de pLenti6/V5-D-TOPO *CPT1A* M593S y Lipofectamina™ 2000 de Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) en tubos estériles para cada muestra siguiendo los siguientes pasos: se agregaron 9 µg de ViraPower™ Packaging Mix de Thermo Fisher Scientific (Waltham, E.E.U.U.) y se ajustaron las concentraciones de pLenti *CPT1A* M593S a 6, 9 y 12 µg, se mezclaron suavemente con 1.5 mL de medio sin suero ni antibióticos. En un tubo estéril adicional para cada muestra, se diluyeron 36 µL de Lipofectamina™ 2000 en 1.5 mL de medio sin suero ni antibióticos, se mezclaron suavemente y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se combinaron el ADN de pLenti6/V5-D-TOPO *CPT1A* M593S y la lipofectamina diluida para cada muestra y se incubaron durante 20 min. A continuación, se retiró el medio de cultivo previo de las células y se reemplazó por 5 mL con suero pero sin antibióticos y la mezcla preparada. Las células se incubaron durante la noche a 37°C, 5 % CO₂. Al día siguiente (en la mañana del día 3), se retiraron los complejos de pLenti6/V5-D-TOPO *CPT1A* M593S-Lipofectamina 2000 y se

reemplazó por medio de cultivo completo sin antibióticos. Las células se incubaron a 37°C, 5 % CO₂ durante 8 h.

2.3.3.3 Colecta de partículas lentivirales

En la tarde del día 3, se realizó la primera colecta de partículas lentivirales en tubos Falcon estériles de 50 mL correspondientes a cada concentración de pLenti6/V5-D-TOPO *CPT1A* M593S [6, 9 y 12 µg]. El medio colectado fue almacenado a 4°C y se reemplazó por medio completo sin antibióticos. A las 48 y 72 h post-transfección (días 4 y 5), se llevaron a cabo dos colectas adicionales por día: una por la mañana y otra por la tarde. En total, se realizaron cinco colectas después de la transfección para cada concentración de pLenti6/V5-D-TOPO *CPT1A* M593S.

2.3.3.4 Concentración de partículas lentivirales

Se centrifugaron las colectas a 3.000 rpm durante 15 min a 37°C para sedimentar los desechos celulares. Posteriormente, se filtró el sobrenadante utilizando filtros PES de 0.45 µm de Sartorius (Aubagne, Francia). A continuación, las partículas lentivirales fueron concentradas mediante centrifugación a 22.000 gravedades durante 1 h a 4 ° C. Se descartó cuidadosamente un tercio del volumen total centrifugado.

2.3.4 Transducción de células de CCU

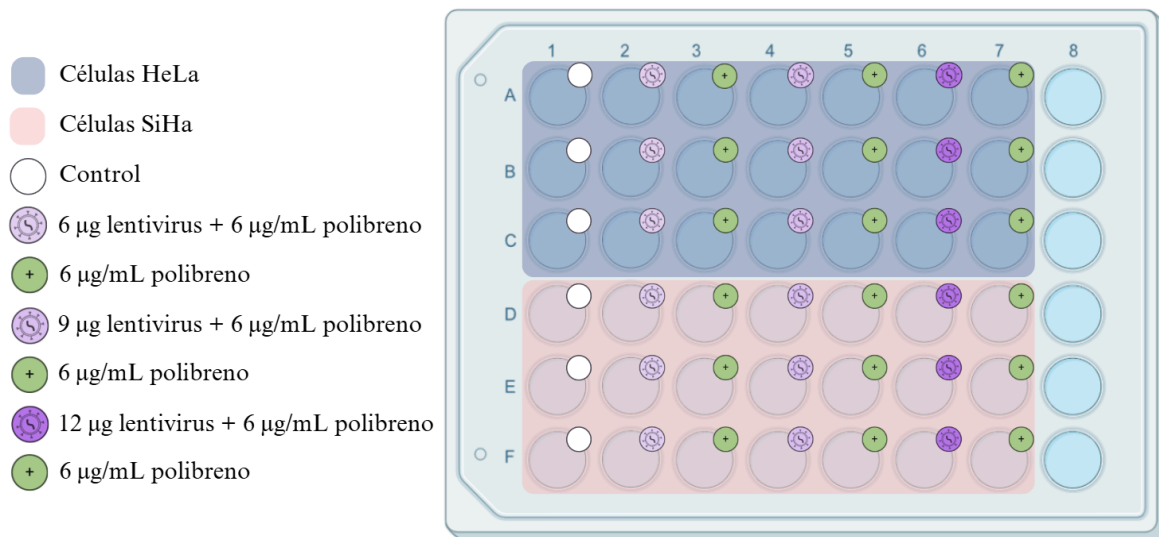
2.3.4.1 Cultivo celular

Se cultivaron 5.000 células por pozo de las líneas celulares de SiHa y HeLa en medio DMEM de Biowest (Nuaille, Francia), suplementado con 10 % SFB de Biowest (Nuaille, Francia) y 1X penicilina/estreptomicina de Biowest (Nuaille, Francia). Las células se incubaron 37 °C, 5 % CO₂ en un plato de 48 pozos hasta alcanzar una confluencia del 30-50 %. Para la

transducción, se asignaron las columnas de la siguiente manera: una para el control, tres para las tres concentraciones de partículas lentivirales obtenidas y tres para evaluar las células tratadas únicamente con polibreno (Figura 9). La concentración de polibreno se determinó en la titulación de realizada previamente.

Figura 9.

Distribución celular para transducción de HeLa y SiHa.



2.3.4.2 Transducción

Una vez las células alcanzaron la confluencia deseada, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó cuidadosamente por la mezcla de lentivirus concentrados y polibreno [6 µg/mL] en los pozos previamente asignados (Figura 9). Para los pozos que solo contenían polibreno, se preparó una mezcla de medio completo sin antibiótico y polibreno [6 µg/mL], la cual se añadió a los pozos correspondientes (Figura 9). Los pozos control se mantuvieron con medio de cultivo completo sin antibiótico.

Posteriormente, las células fueron incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ durante 8 h. Tras este tiempo, se repitió el procedimiento de transducción y se incubaron durante la noche bajo las

mismas condiciones. Al día siguiente, se retiró el medio con virus y se reemplazó con medio completo fresco, incubando nuevamente las células durante toda la noche a 37 °C, 5 % CO₂.

2.3.4.3 Selección de las células transducidas

Después de 48 h de incubación, con el fin de permitir que las células se recuperaran de la transducción, se preparó medio fresco con la concentración de blasticidina determinada en la titulación para cada línea celular. A partir de este momento, se reemplazó el medio de cultivo de todos los pozos, excepto los controles, por medio completo con blasticidina. Este reemplazo se realizó cada 3-4 días durante 12 días, hasta que se identificaron colonias resistentes al antibiótico y no se observó ninguna colonia en los pozos con polibreno, lo que indicaba el éxito de la transducción. El día 13, el medio con blasticidina fue sustituido por medio fresco completo para facilitar la recuperación celular.

3. Resultados y discusión

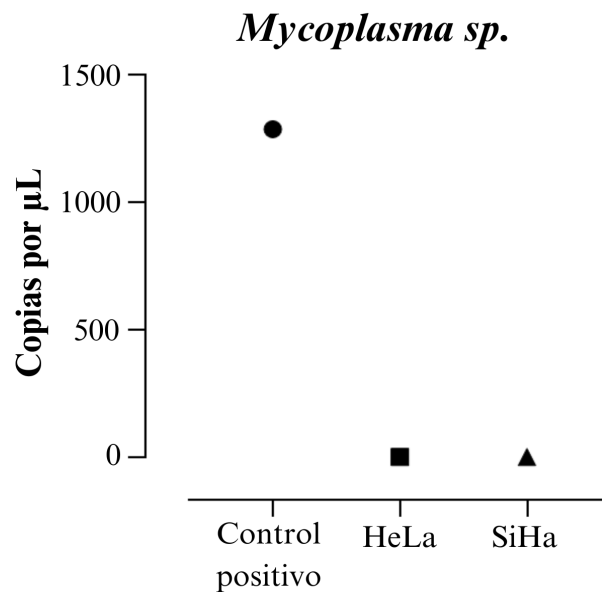
3.1 Caracterización de las líneas celulares HeLa y SiHa

3.1.1 Detección de *Mycoplasma sp.* en HeLa y SiHa

No se obtuvieron copias de *Mycoplasma sp.* para ninguna de las dos líneas celulares. En comparación, el control positivo presenta alrededor de 1300 copias por μL . (Figura 10).

Figura 10.

Cuantificación de *Mycoplasma sp.* en HeLa y SiHa mediante PCR digital.



Mycoplasma sp. es una bacteria contaminante de gran importancia en el cultivo celular, ya que su infección puede alterar el comportamiento celular, interferir en procesos metabólicos, favorecer los mecanismos de evasión inmune e influir en las interacciones dentro del microambiente tumoral (Morsy and Trippier, 2020; Liu and Zhang, 2022). En el contexto del CCU, diversas especies de *Mycoplasma* se han asociado con el microbioma cervical y con la persistencia del VPH, actuando como un factor que potencia la progresión tumoral al modular el riesgo y la severidad de la infección (Arokiyaraj et al., 2018). Además, se ha demostrado que las líneas celulares contaminadas con *Mycoplasma* presentan dinámicas de crecimiento alteradas y

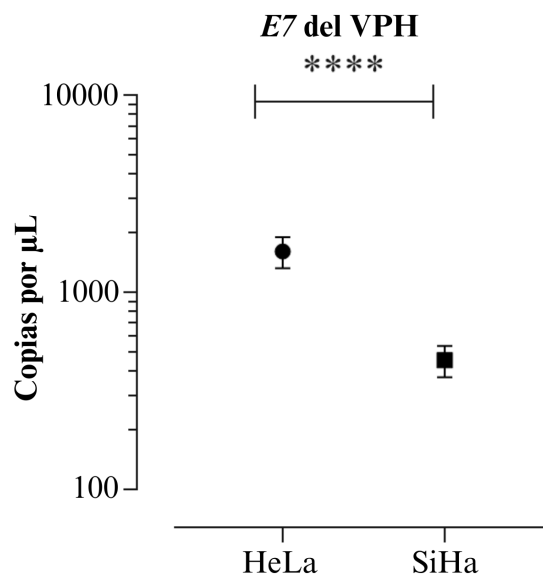
una respuesta modificada a los tratamientos quimioterapéuticos (Borchsenius et al., 2018). Por estas razones, la detección rutinaria y el tratamiento de las líneas celulares contra de *Mycoplasma* se considera un procedimiento esencial para garantizar la confiabilidad de los resultados experimentales (Haider et al., 2018).

3.1.2 Niveles transcripcionales del gen *VPH E7* en *HeLa* y *SiHa*

La prueba estadística de Shapiro-Wilk indicó que los datos correspondientes a las líneas celulares *HeLa* y *SiHa* presentan una distribución normal ($p = 0.7962$ y $p = 0.1399$, respectivamente). Por otro lado, la prueba *t* de Welch reveló una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de expresión de ambas líneas celulares ($p < 0.0001$). De acuerdo con estos resultados, la cuantificación del número de copias por μL muestra que la línea *HeLa* presenta una mayor expresión del oncogén *E7* del VPH-18 en comparación con la línea *SiHa*, que contiene el VPH-16 (Figura 11).

Figura 11.

Cuantificación de VPH E7 en HeLa y SiHa mediante PCR digital.



En ambos tipos de VPH, la oncoproteína E7 desempeña un papel fundamental en el desarrollo y el mantenimiento del cáncer. Su acción principal consiste en interferir con la proteína supresora de tumores del retinoblastoma (pRb), lo que provoca una desregulación del ciclo celular y una proliferación celular descontrolada (Zhang et al., 2017; Gbala et al., 2025). En el VPH-18, además de interactuar con pRb, E7 se une a otras proteínas reguladoras como p130 y regula genes del ciclo celular mediante ARN largos no codificantes (He et al., 2019). Esta función no ha sido descrita para E7 del VPH-16, el cual promueve la degradación directa de pRb (Fiedler et al., 2004; McLaughlin-Drubin and Münger, 2009).

Las diferencias en la expresión de la proteína E7 observadas entre ambas líneas celulares (Figura 11) pueden atribuirse al origen tumoral de cada una y al número de copias de VPH que presentan. La línea celular HeLa proviene de un adenocarcinoma (ADC), un tipo de cáncer menos frecuente pero más agresivo en comparación con el carcinoma de células escamosas (CCE), del cual se deriva la línea celular SiHa (Pan et al., 2020). Estudios han demostrado que pacientes con CCE presentan mejores respuestas a la terapia que aquellos con ADC (Molijn et al., 2015). Asimismo, se ha documentado que la línea HeLa contiene hasta 40 copias integradas de VPH-18, mientras que SiHa presenta únicamente entre 1 y 2 copias integradas de VPH-16 (de Boer et al., 2007). Aunque cada línea celular está asociada a un genotipo diferente de VPH, ambos son considerados de alto riesgo y se han relacionado positivamente con los niveles de E7 (Sabri et al., 2024).

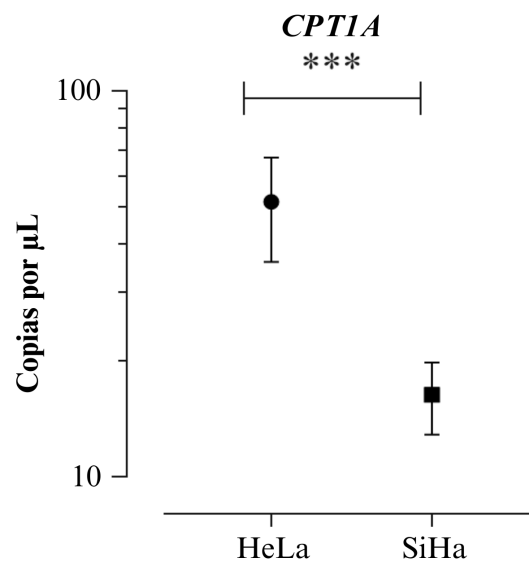
3.1.3 Niveles transcripcionales del gen CPT1A

La prueba estadística de Shapiro-Wilk indicó que los datos correspondientes a las líneas celulares HeLa y SiHa presentan una distribución normal ($p = 0.333$ y $p = 0.1527$,

respectivamente). Por otro lado, la prueba t de Welch reveló una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de expresión de ambas líneas celulares ($p = 0.0007$). En concordancia con lo obtenido, es posible afirmar que línea celular HeLa presenta una mayor expresión del gen *CPT1A* en comparación con la línea SiHa ([Figura 12](#)).

Figura 12.

Cuantificación de CPT1A en HeLa y SiHa mediante PCR digital.

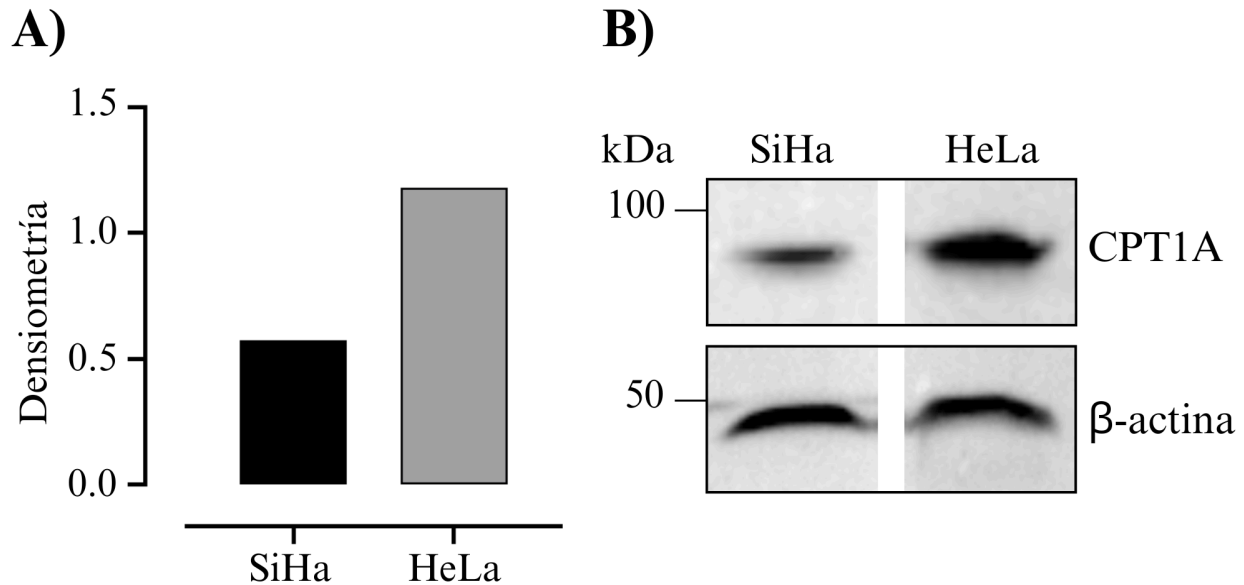


3.1.4 Detección de la proteína *CPT1A* endógena

El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas a partir del western blot realizado también permitió identificar una mayor expresión de la proteína *CPT1A* en línea celular HeLa en comparación con SiHa ([Figura 13](#)), este resultado es consistente con los niveles transcripcionales de este detectados en la sección 3.1.3.

Figura 13.

Western blot de CPT1A. A). Resultados del análisis densitométrico; B). Western blot de CPT1A con beta-actina como control de carga.



Los resultados obtenidos sobre los niveles transcripcionales y proteicos de CPT1A son coherentes con los datos previamente reportados en la literatura sobre la expresión de ARN en las líneas celulares analizadas (Pontén et al., 2009; Human Protein Atlas, s.f.). La sobreexpresión de CPT1A en células de CCU respecto a las células sanas ha sido previamente estudiada, esto se relaciona con las ventajas metabólicas que esta enzima ofrece en la progresión tumoral (Liang, 2023; Liu et al., 2024). En consenso, las células sanas del cérvix expresan aproximadamente 19.7 nTPM, mientras que HeLa alcanza hasta 60.4 nTPM y SiHa 37.7 nTPM (Pontén et al., 2009; Human Protein Atlas, s.f.). En cuanto a las diferencias de expresión observadas entre las líneas celulares, estas podrían estar relacionadas con su origen tumoral. Según lo reportado, las células glandulares del cérvix presentan mayor expresión de esta proteína en comparación con las células epiteliales escamosas (Pontén et al., 2009; Human Protein Atlas, s.f.). Lo anterior podría

explicar las diferencias en la expresión observadas en HeLa, derivada de tejido glandular, en comparación con la línea SiHa, de origen epitelial escamoso. Estas diferencias también pueden estar relacionadas con la mayor agresividad de los ADC en comparación con los CCE. Varios autores han señalado que los ADC son más propensos a la metástasis en comparación con los CCE (Gadducci et al., 2019). Además, la metástasis se ha asociado con niveles elevados de beta-oxidación, lo cual sugiere una sobreexpresión de CPT1A (Quan et al., 2022).

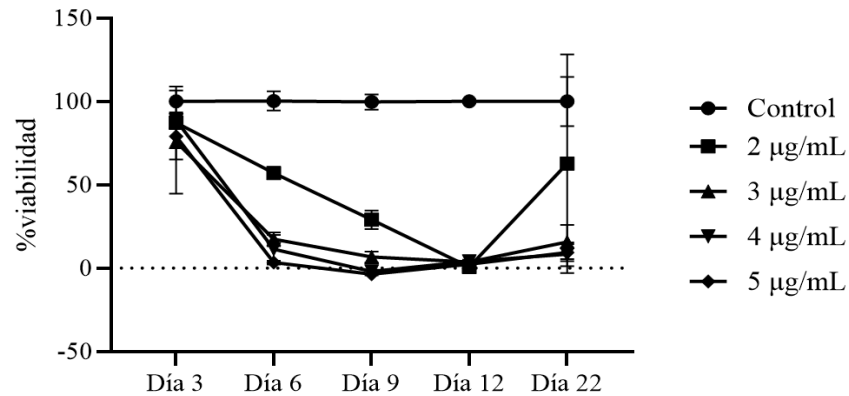
3.2 Establecimiento de dos líneas celulares de CCU con CPT1A M593S5

3.2.1 Titulación de blasticidina

Los ensayos de MTT realizados para la línea celular Hela mostraron una viabilidad superior al 50 % en el día 3 para todas las concentraciones de blasticidina. A partir del día 6, la viabilidad comenzó a disminuir progresivamente, alcanzando el 0 % en los días 9 y 12 para las concentraciones 3-5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ mantuvo cierta viabilidad hasta el día 12. En cuanto a la proliferación de colonias resistentes, la medición realizada en el día 22 indica que las concentraciones 3-5 $\mu\text{g/mL}$ mantienen la resistencia a la blasticidina, mientras que la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ presenta colonias resistentes. El control conservó una viabilidad cercana al 100 % para todas las mediciones (Figura 14).

Figura 14.

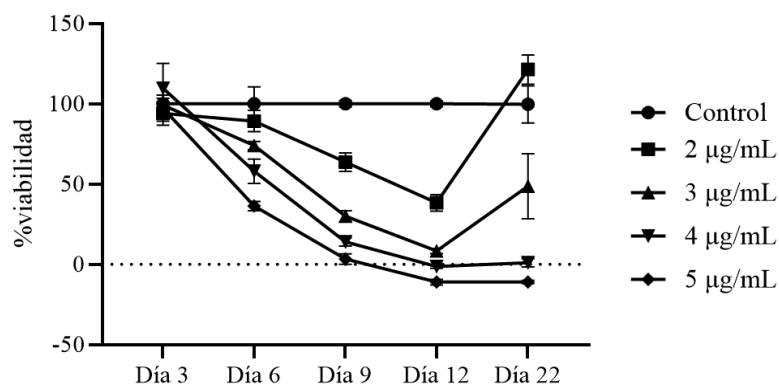
Tasa de viabilidad de HeLa a diferentes concentraciones de blasticidina durante 22 días.



Los ensayos de MTT realizados para la línea celular SiHa mostraron una viabilidad cercana al 100 % en el día 3 para todas las concentraciones de blasticidina. Luego del día 6, la viabilidad de cada concentración fue disminuyendo progresivamente. Sin embargo, solo las concentraciones de 4-5 µg/mL alcanzaron la viabilidad del 0 % en el día 12 y la mantuvieron hasta el día 22. En contraste, las concentraciones 2-3 µg/mL no alcanzaron una viabilidad nula y en ambos casos se presentaron colonias resistentes tras la última medición. Por otro lado, el control mantuvo una viabilidad cercana al 100 % para todas las mediciones (Figura 15).

Figura 15.

Tasa de viabilidad de SiHa a diferentes concentraciones de blasticidina durante 22 días.



A partir de los resultados obtenidos, se determinó que la concentración mínima de blasticidina necesaria para asegurar una selección celular efectiva en ambas líneas celulares evaluadas es de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las concentraciones inferiores fueron descartadas, ya que permitieron la formación de colonias resistentes. La determinación de esta concentración óptima es crucial, ya que permite eliminar las células no transducidas y establecer poblaciones celulares modificadas de manera precisa. Estudios han señalado que el uso de blasticidina no solo mejora la eficiencia del proceso de selección, sino que también contribuye a la estabilidad de las células modificadas, lo cual es esencial para estudios posteriores enfocados en la sobreexpresión del gen de interés (Günyüz et al., 2022; Alaimo et al., 2024).

El mecanismo de acción de la blasticidina se basa en su capacidad de interferir con el proceso de traducción proteica. Este antibiótico atrapa el ribosoma en un estado de pre-terminación, bloqueando la etapa final de la síntesis proteica y provocando la muerte de células que no poseen el gen de resistencia correspondiente (Svidritskiy and Коростелев, 2018; Tomás et al., 2018; Lee et al., 2022). En este sentido, la determinación precisa de la concentración adecuada de blasticidina resulta un paso fundamental en el proceso de transducción y posterior establecimiento de líneas celulares funcionales.

3.2.2 Titulación de polibreno

A partir de la titulación realizada, se estableció que la concentración óptima de polibreno es de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo la mayor concentración que no provocó alteraciones morfológicas en ninguna de las dos líneas celulares evaluadas. Las concentraciones superiores a la determinada provocaron cambios fenotípicos en las células evaluadas, por lo cual fueron descartadas.

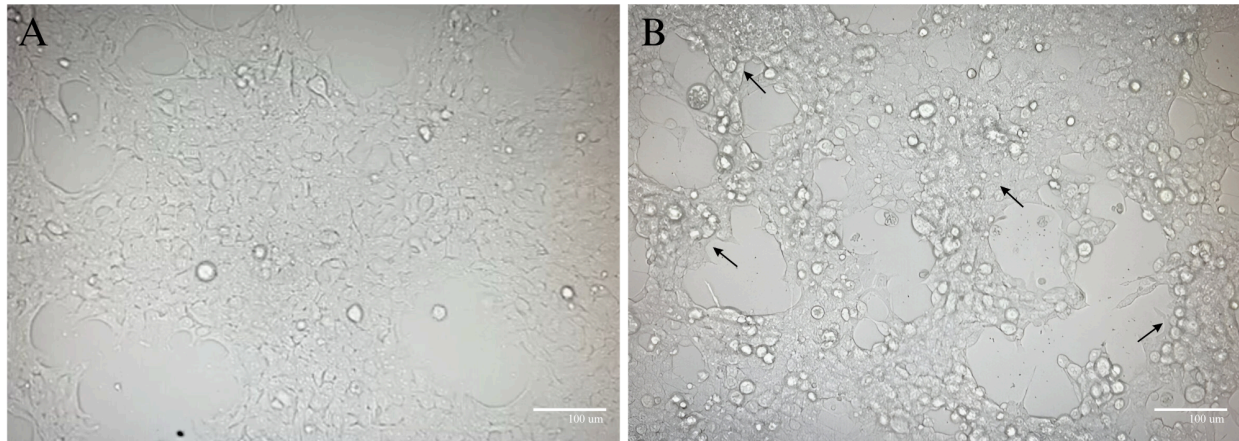
El polibreno es un lípido catiónico que ha demostrado mejorar la efectividad de la transducción génica (Nasiri et al., 2023). Su efecto se debe a su capacidad de neutralizar las cargas electrostáticas negativas presentes en las membranas celulares, las cuales suelen repeler las partículas virales de las membranas celulares e impedir el ingreso (Heindel et al., 2024). Esta característica es particularmente importante en el uso de vectores lentivirales derivados del VIH, en los cuales el polibreno ha mostrado potenciar tanto la eficiencia de infección como la entrega génica (Heindel et al., 2024). Sin embargo, aunque se ha demostrado que concentraciones más altas de polibreno mejoran la eficiencia de la transducción, su uso en exceso puede resultar citotóxico (Zhang et al., 2024). Por esta razón, la determinación de una concentración adecuada para cada línea celular es un parámetro fundamental antes de proceder con la transducción.

3.2.3 Producción de lentivirus en células HEK293FT

Se observaron cambios morfológicos en las células productoras HEK293FT en comparación con las células control (Figura 16). Entre ellos, se identificaron células de gran tamaño y multinucleadas resultado de la fusión celular, conocidos como sincitios (Espinoza et al., 2019). Este fenómeno es un resultado esperado durante la producción de lentivirus y está reportado como una característica típica de la generación de partículas virales en el manual del sistema utilizado *ViraPower Lentiviral Expression System* (Thermo Fisher Scientific, 2010).

Figura 16.

Efecto de la transfección en células HEK293FT. (A) Células control sin transfectar, (B) Células transfectadas con formación de sincitios (indicados con flechas).



Este efecto se debe principalmente a la expresión de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) presente en uno de los vectores de empaquetamiento del sistema *ViraPower Lentiviral Expression System* (Thermo Fisher Scientific, 2010; Jin and Jung, 2020). Dicha glicoproteína induce la fusión de las células productoras HEK293FT con células vecinas no infectadas, dando lugar a estructuras celulares de grandes tamaños y varios núcleos (Jin and Jung, 2020). La presencia de estas células multinucleadas se ha asociado positivamente con la eficiencia de los sistemas lentivirales, ya que puede influir directamente en la capacidad de transducción del vector (Espinoza et al., 2019).

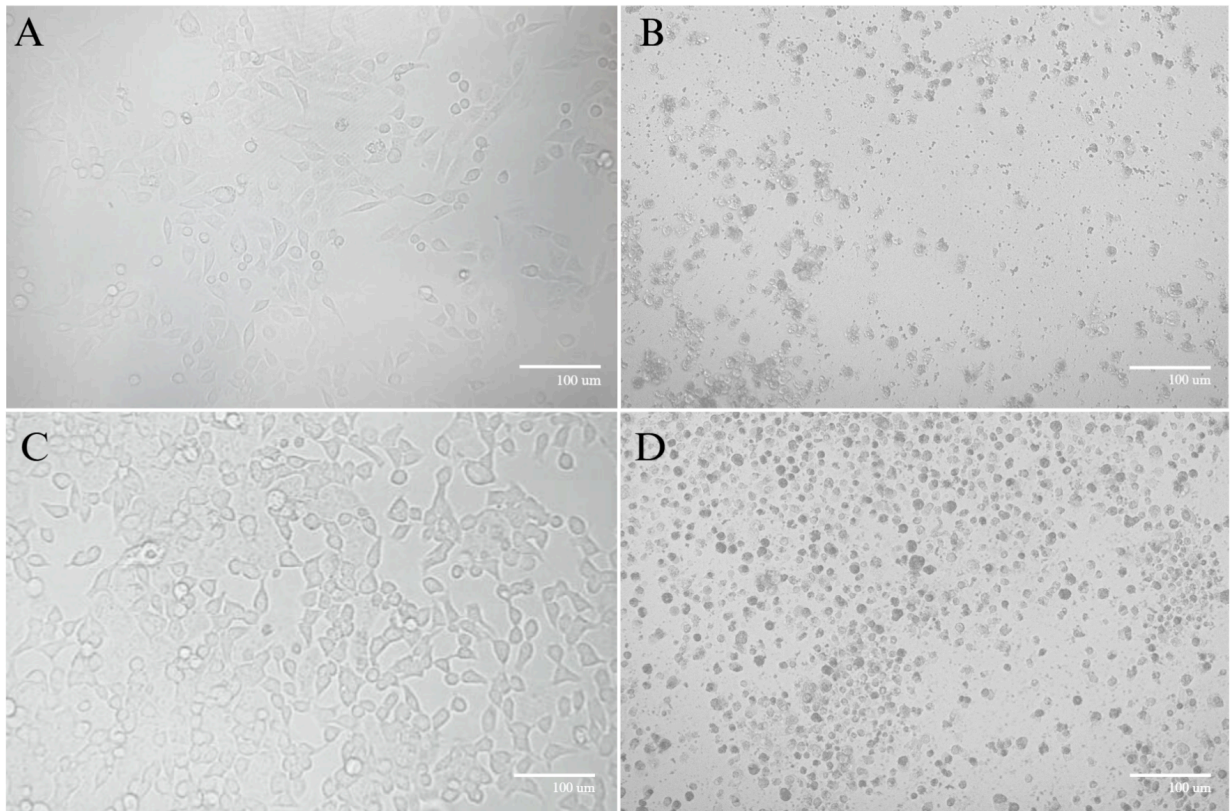
3.2.4 Transducción

Después de 12 días de selección con 4 µg/mL de blasticidina, ninguna de las dos líneas celulares evaluadas presentó resistencia (Figura 17). Tras el cambio de medio para permitir la recuperación celular, no se detectaron colonias vivas en ninguno de los pozos sometidos a la

transducción. De la misma manera, los pozos control expuestos únicamente a polibreno también presentaron muerte celular, lo que indica que la blasticidina funciona correctamente como agente de selección.

Figura 17.

Selección con blasticidina de células transducidas: (A) Células SiHa control sin transducir, (B) Células SiHa transducidas después de la selección (muertas), (C) Células HeLa control sin transducir, (D) Células HeLa transducidas después de la selección (muertas).



La formación de sincitios sugiere que la generación de los lentivirus fue exitosa (Figura 16). No obstante, los resultados de la transducción indican que las partículas lentivirales producidas no lograron una transducción efectiva en las líneas celulares de interés (Figura 17).

Los vectores lentivirales derivados del VIH tipo 1 representan una alternativa novedosa y eficaz, gracias a su capacidad para asegurar la expresión continua y estable de transgenes de interés en investigaciones relacionadas con el cáncer (Milone and O'Doherty, 2018; Shams et al., 2023). No obstante, la producción adecuada de estas partículas presenta varios desafíos, uno de los más relevantes es la recombinación de repeticiones terminales largas (LTRs, por sus siglas en inglés). Estos vectores contienen dos LTRs (5' y 3') que rodean el genoma viral y desempeñan un papel esencial en el ciclo de vida del virus. Dado que ambas secuencias son idénticas, existe una alta probabilidad de recombinarse con facilidad durante la transcripción inversa o la integración del genoma en la célula huésped (Rom et al., 2015; Bruce et al., 2021). Como consecuencia, dicha recombinación puede afectar la funcionalidad de los lentivirus y generar partículas defectuosas incapaces de generar la correcta integración del gen de interés en el genoma huésped (Shang et al., 2017).

De acuerdo con el manual de *pLenti6/V5 Directional TOPO® Cloning Kit* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, E.E.U.U.), la generación de lentivirus aberrantes está directamente relacionada con la integridad estructural del vector. Con el objetivo de identificar posibles fallas en el vector, se realizaron experimentos adicionales replicando el proceso de clonación, en los cuales se ajustaron variables como la cantidad de ADN y la duración de la reacción. Los resultados obtenidos confirmaron que el vector pLenti6/V5-D-TOPO no contenía el gen de interés *CPT1A* M593S en su estructura (Apéndice D).

La pérdida del gen de interés en vectores lentivirales puede tener diversas causas, una de las más comunes es la recombinación entre las LTRs previamente mencionadas (Pfeifer et al., 2002). Aunque estas secuencias han sido modificadas en los vectores de tercera generación con el propósito de para aumentar su seguridad, también se ha reportado que dichas modificaciones

pueden facilitar la escisión del transgén insertado, lo que da lugar a colonias celulares que carecen completamente del mismo (Pfeifer et al., 2002; Mariyanna et al., 2012). En este contexto, los antecedentes revisados respaldan la hipótesis de que las partículas lentivirales generadas fueron defectuosas debido a un evento de recombinación en las LTRs del vector pLenti6/V5-D-TOPO, lo cual explica la transducción ineficiente de las células evaluadas. Asimismo, esta recombinación pudo provocar la pérdida del gen *CPT1A* M593S, generando un vector vacío incapaz de producir partículas lentivirales funcionales.

3.2.5 Detección de CPT1A M593S

Como se mencionó anteriormente, no se obtuvieron colonias resistentes a la blasticidina que expresaran la variante mutada *CPT1A* M593S. Por lo cual, no fue posible realizar la detección mediante western blot. Sin embargo, se detectó y se analizó la expresión del gen endógeno en cada una de las líneas evaluadas ([Figura 13](#) y [Sección 3.1.4](#)).

4. Conclusiones

La caracterización de las líneas celulares HeLa y SiHa confirmó la ausencia de *Mycoplasma sp.*, asegurando la validez de los experimentos realizados. En cuanto a la expresión del oncogén *E7*, HeLa (VPH-18) presentó niveles superiores a los de SiHa (VPH-16), diferencia que puede atribuirse al número de copias insertadas de cada tipo de VPH y al origen histológico de cada línea. Asimismo, HeLa mostró una expresión significativamente más alta del gen *CPT1A*, tanto a nivel transcripcional como proteico.

Por otro lado, la producción de lentivirus en células HEK293FT fue exitosa, evidenciada por los cambios morfológicos característicos como lo son la formación de sincitios multinucleados. Este fenómeno es consecuencia de la expresión de la glicoproteína VSV-G en el sistema de empaquetamiento *ViraPower Lentiviral Expression Systems*, lo que confirma la actividad viral esperada. Sin embargo, pese a la generación de partículas lentivirales, la transducción de las líneas celulares tratadas no fue efectiva. Esto posiblemente se debe a que el vector pLenti6/V5-D-TOPO perdió el gen de *CPT1A* M593S, debido a eventos de recombinación entre las secuencias terminales largas (LTRs) del vector, lo que produjo partículas lentivirales defectuosas incapaces de integrar el transgén en el genoma de las células huésped.

Como consecuencia de la ineficiencia de la transducción, no fue posible detectar la proteína mutada *CPT1A* M593S ya que no se obtuvieron colonias resistentes a la blasticidina. Sin embargo, se aprovechó esta limitación para analizar la expresión endógena del gen *CPT1A* en las líneas celulares evaluadas. Como se mencionó anteriormente, HeLa presentó una mayor expresión en comparación con SiHa. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el origen histológico de las células y con el comportamiento biológico de los respectivos tipos de CCU. En

particular, los adenocarcinomas (HeLa) suelen mostrar una mayor agresividad y capacidad metastásica, características que se han asociado a una mayor actividad de la beta-oxidación y sobreexpresión de CPT1A.

5. Recomendaciones y limitaciones

Entre las principales limitaciones del presente trabajo de investigación se encuentra la ineficacia de la transducción debido a la generación de lentivirus defectuosos. Esta situación restringe el establecimiento de modelos celulares que sobreexpresen la proteína CPT1A M593S y limita la realización de posibles análisis funcionales de esta variante en el CCU. Además, cabe reconocer que la presencia del gen endógeno de *CPT1A* en las líneas celulares utilizadas pudo generar competencia en la expresión, dificultando el análisis específico de la variante mutada. Finalmente, el carácter aleatorio de la inserción del vector lentiviral en el genoma de las células huésped representa otra limitación relevante, ya que la integración en sitios genómicos críticos podría afectar la viabilidad celular.

Para superar estas limitaciones, se recomienda optimizar el diseño y construcción del vector lentiviral para evitar recombinaciones en las secuencias LTRs. Asimismo, sería conveniente explorar sistemas alternativos de expresión génica que puedan reducir la pérdida del gen insertado. Por otro lado, para contrarrestar la competencia con el gen endógeno, se sugiere utilizar técnicas de edición génica como CRISPR/Cas9 para noquear el gen *CPT1A* salvaje en las líneas celulares de interés. Por último, para minimizar los efectos de la inserción aleatoria, es recomendable evaluar métodos de integración dirigidos o sistemas que permitan una inserción más controlada y segura en el genoma.

Referencias Bibliográficas

- Abudula, A., Rouzi, N., Xu, L., Yang, Y., & Hasimu, A. (2020). Tissue-based metabolomics reveals potential biomarkers for cervical carcinoma and HPV infection. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 20(1), 78–87. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2019.4359>
- Alaimo, A., Genovesi, S., Annesi, N., de Felice, D., Subedi, S., Macchia, A., la Manna, F., Ciani, Y., Vannuccini, F., Mugoni, V., Notarangelo, M., Libergoli, M., Broso, F., Taulli, R., Ala, U., Savino, A., Cortese, M., Mirzaaghaei, S., Poli, V., ... Lunardi, A. (2024). Sterile inflammation via TRPM8 RNA-dependent TLR3-NF-kB/IRF3 activation promotes antitumor immunity in prostate cancer. *The EMBO Journal*, 43(5), 780-805–805. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s44318-024-00040-5>
- Arip, M., Tan, L. F., Jayaraj, R., Abdullah, M., Rajagopal, M., & Selvaraja, M. (2022). Exploration of biomarkers for the diagnosis, treatment and prognosis of cervical cancer: a review. *Discover Oncology*, 13(1), 91. <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00551-9>
- Armijo, D., & Sanchez, K. (2019). Prevalence of Human papillomavirus (HPV) genotypes in Ecuadorian women. *Bionatura*, 4(4), 1010–1012. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.04.12>
- Arokiyaraj, S., Seo, S., Kwon, M., Lee, J., & Kim, M. (2018). Association of cervical microbial community with persistence, clearance and negativity of human papillomavirus in Korean women: a longitudinal study. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33750-y>
- Beavis, A. L., Gravitt, P. E., & Rositch, A. F. (2017). Hysterectomy-corrected cervical cancer mortality rates reveal a larger racial disparity in the United States. *Cancer*, 123(6), 1044–1050. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.30507>

- Borchsenius, S., Daks, A., Fedorova, O., Чернова, O., & Barlev, N. (2018). Effects of mycoplasma infection on the host organism response via p53/nf- κ b signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 234(1), 171-180. <https://doi.org/10.1002/jcp.26781>
- Bruce, J. W., Bracken, M., Evans, E., Sherer, N., & Ahlquist, P. (2021). ZBTB2 represses HIV-1 transcription and is regulated by HIV-1 Vpr and cellular DNA damage responses. *PLoS pathogens*, 17(2), e1009364. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009364>
- Cao, B., Li, M., Zha, W., Zhao, Q., Gu, R., Liu, L., Shi, J., Zhou, J., Zhou, F., Wu, X., Wu, Z., Wang, G., & Aa, J. (2013). Metabolomic approach to evaluating adriamycin pharmacodynamics and resistance in breast cancer cells. *Metabolomics*, 9(5), 960–973. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0517-x>
- Chen, X., Zhao, Y., Lyu, S., Gao, G., Gao, Y., Qi, Y., & Du, J. (2021). Identification of novel inhibitors of GLUT1 by virtual screening and cell-based assays. *Investigational New Drugs*, 39(5), 1242–1255. <https://doi.org/10.1007/s10637-021-01109-2>
- Choi, J., Smith, D. M., Scafidi, S., Riddle, R. C., & Wolfgang, M. J. (2024). Carnitine palmitoyltransferase 1 facilitates fatty acid oxidation in a non-cell-autonomous manner. *Cell reports*, 43(12), 115006. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.115006>
- Chu, X., Tian, W., Ning, J., Xiao, G., Zhou, Y., Wang, Z., Zhai, Z., Tanzhu, G., Yang, J., & Zhou, R. (2024). Cancer stem cells: advances in knowledge and implications for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 170. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01851-y>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V. (2013). Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism*, 18(2), 153–161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>

- Dautzenberg, I. J. C., Rabelink, M. J. W. E., & Hoeben, R. C. (2021). The stability of envelope-pseudotyped lentiviral vectors. *Gene Therapy*, 28(1), 89–104. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00193-y>
- de Boer, M. A., Jordanova, E. S., Kenter, G. G., Peters, A. A., Corver, W. E., Trimbos, J. B., & Fleuren, G. J. (2007). High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(1), 132–138. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1568>
- Efeoğlu, E., Henry, M., Clynes, M., & Meleady, P. (2022). Label-free quantitative proteomics analysis of adriamycin selected multidrug resistant human lung cancer cells. *Biomolecules*, 12(10), 1401. <https://doi.org/10.3390/biom12101401>
- Elegheert, J., Behiels, E., Bishop, B., Scott, S., Woolley, R. E., Griffiths, S. C., Byrne, E. F. X., Chang, V. T., Stuart, D. I., Jones, E. Y., Siebold, C., & Aricescu, A. R. (2018). Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins. *Nature protocols*, 13(12), 2991–3017. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0075-9>
- Fiedler, M., Müller-Holzner, E., Viertler, H.-P., Widschwendter, A., Laich, A., Pfister, G., Spoden, G.A., Jansen-Dürr, P. and Zwerschke, W. (2004), High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies. *The FASEB Journal*, 18: 1120-1122. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1332fje>
- Gadducci, A., Guerrieri, M. E., & Cosio, S. (2019). Adenocarcinoma of the uterine cervix: Pathologic features, treatment options, clinical outcome and prognostic variables. *Critical*

Reviews in Oncology/Hematology, 135, 103–114.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.01.006>

Gao, S., Keung, W., Serra, D., Wang, W., Carrasco, P., Casals, N., Hegardt, F. G., Moran, T. H., & Lopaschuk, G. D. (2011). Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1a. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 301(1), R209–R217.

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00092.2011>

Gatto, F., & Nielsen, J. (2016). In search for symmetries in the metabolism of cancer. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 8(1), 23–35.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wsbm.1321>

Gbala, I., Kavcic, N., & Banks, L. (2025). The retinoblastoma protein contributes to maintaining the stability of hpv e7 in cervical cancer cells. *Journal of Virology*, 99(4).

<https://doi.org/10.1128/jvi.02203-24>

Ghosh, S., Jayaram, P., Kabekkodu, S. P., & Satyamoorthy, K. (2022). Targeted drug delivery in cervical cancer: Current perspectives. *European Journal of Pharmacology*, 917, 174751.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174751>

Gunyuz, Z. E., Sahi-Ilhan, E., Kucukkose, C., Ipekgil, D., Tok, G., Mese, G., Ozcivici, E., & Yalcin-Ozuysal, O. (2022). SEMA6D Differentially Regulates Proliferation, Migration, and Invasion of Breast Cell Lines. *ACS Omega*, 7(18), 15769–15778.

<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00840>

Hao, Z., Xu, L., Zhao, L., He, J., Li, G., & Li, J. (2021). Transcriptome analysis of the liver of *Eospalax fontanierii* under hypoxia. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11166>

- Haider, A., Zarschler, K., Joshi, S.A., Smith, R.M., Lin, Z., Mougharbel, A.S., Herzog, U., Müller, C.E., Stephan, H. and Kortz, U. (2018), Preyssler-Pope-Jeannin Polyanions [NaP₅W₃₀O₁₁₀]¹⁴⁻ and [AgP₅W₃₀O₁₁₀]¹⁴⁻: Microwave-Assisted Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 644: 752-758. <https://doi.org/10.1002/zaac.201800113>
- He, H., Liu, X., Liu, Y., Zhang, M., Lai, Y., Hao, Y., Wang, Q., Shi, D., Wang, N., Luo, X. G., Ma, W., & Zhang, T. C. (2019). Human Papillomavirus E6/E7 and Long Noncoding RNA TMPOP2 Mutually Upregulated Gene Expression in Cervical Cancer Cells. *Journal of virology*, 93(8), e01808-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01808-18>
- Heindel, D., Acosta, D. F., Goff, M., Jan, M., Wang, X.-H., Petrova, M., Chan, K.-W., Kong, X.-P., Chen, B., Mahal, L., Bensing, B., & Hioe, C. (2024). HIV-1 interaction with an O-glycan-specific bacterial lectin enhances virus infectivity and resistance to neutralization by antibodies. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2596269/v2>
- Helbig, K. J., Carr, J. M., Calvert, J. K., Wati, S., Clarke, J. N., Eyre, N. S., Narayana, S. K., Fiches, G. N., McCartney, E. M., & Beard, M. R. (2013). Viperin Is Induced following Dengue Virus Type-2 (DENV-2) Infection and Has Anti-viral Actions Requiring the C-terminal End of Viperin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2178. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002178>
- Horie, T., Ono, K., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Kuwabara, Y., Nakashima, Y., Takanabe-Mori, R., Nishi, E., Hasegawa, K., Kita, T., & Kimura, T. (2010). Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway. *Cardiovascular Research*, 87(4), 656–664. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq148>

- Huang, Y., Du, Y., Zheng, Y., Wen, C., Zou, H., Huang, J., Zhou, H., Zhao, H., & Wu, L. (2022). Ct-OATP1B3 promotes high-grade serous ovarian cancer metastasis by regulation of fatty acid beta-oxidation and oxidative phosphorylation. *Cell Death & Disease*, 13(6), 556. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05014-1>
- Human Protein Atlas. (s.f.). *CPT1A expression in cell lines*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110090-CPT1A/cell+line>
- Ji, J. X., Hoang, L. N., Cochrane, D. R., Lum, A., Senz, J., Farnell, D., Tessier-Cloutier, B., Huntsman, D. G., & Klein Geltink, R. I. (2024). The unique metabolome of clear cell ovarian carcinoma. *The Journal of Pathology*, 264(2), 160–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/path.6329>
- Jiang, X., Yuan, J., Dou, Y., Zeng, D., Xiao, S. (2021). Lipopolysaccharide Affects the Proliferation and Glucose Metabolism of Cervical Cancer Cells Through the FRA1/MDM2/p53 Pathway. *International Journal of Medical Sciences*, 18(4), 1030-1038. <https://doi.org/10.7150/ijms.47360>
- Jin, S. Y., & Jung, Y.-T. (2020). Construction of a replication-competent retroviral vector for expression of the VSV-G envelope glycoprotein for cancer gene therapy. *Archives of Virology*, 165(5), 1089–1097. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04585-8>
- Kim, L. K., Park, S.-A., Yang, Y., Kim, Y. T., Heo, T.-H., & Kim, H. J. (2021). LncRNA SRA mediates cell migration, invasion, and progression of ovarian cancer via NOTCH signaling and epithelial–mesenchymal transition. *Bioscience Reports*, 41(9), BSR20210565. <https://doi.org/10.1042/BSR20210565>

- Kong, Y., Zong, L., Yang, J., Wu, M., & Xiang, Y. (2019). Cervical cancer in women aged 25 years or younger: a retrospective study. *Cancer Management and Research*, 11, 2051–2058. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S195098>
- Kuo, C.-Y., & Ann, D. K. (2018). When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance. *Cancer Communications*, 38(1), 47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40880-018-0317-9>
- Lee, Y.-H., Hou, X., Chen, R., Feng, J., Liu, X., Ruszczycky, M. W., Gao, J.-M., Wang, B., Zhou, J., & Liu, H. (2022). Radical S-Adenosyl Methionine Enzyme BlsE Catalyzes a Radical-Mediated 1,2-Diol Dehydration during the Biosynthesis of Blasticidin S. *Journal of the American Chemical Society*, 144(10), 4478–4486. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c12010>
- Li, T., Lai, Y., & Yuan, J. (2022). The diagnostic accuracy of TCT + HPV-DNA for cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Annals of Translational Medicine*, 10(14), 761–761. <https://doi.org/10.21037/atm-22-1732>
- Liang K. (2023). Mitochondrial CPT1A: Insights into structure, function, and basis for drug development. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1160440. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1160440>
- Liberti, M. v, & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lin, J., Xia, L., Liang, J., Han, Y., Wang, H., Oyang, L., Tan, S., Tian, Y., Rao, S., Chen, X., Tang, Y., Su, M., Luo, X., Wang, Y., Wang, H., Zhou, Y., & Liao, Q. (2019). The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo- and radio-resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1214-z>

- Lin, S., Gao, K., Gu, S., You, L., Qian, S., Tang, M., Wang, J., Chen, K., & Jin, M. (2021). Worldwide trends in cervical cancer incidence and mortality, with predictions for the next 15 years. *Cancer*, 127(21), 4030–4039. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.33795>
- Liu, H., Liu, Y., Zhou, Y., Chen, X., Pan, S., Zhou, Q., Ji, H., & Zhu, X. (2024). TM7SF2-induced lipid reprogramming promotes cell proliferation and migration via CPT1A/Wnt/ β -Catenin axis in cervical cancer cells. *Cell Death Discovery*, 10(1), 207. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-01975-8>
- Liu, J. and Zhang, Y. (2022). Intratumor microbiome in cancer progression: current developments, challenges and future trends. *Biomarker Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00381-5>
- Liu, X., Wang, L., Jiang, W., Lu, W., Yang, J., & Yang, W. (2018). B cell lymphoma with different metabolic characteristics show distinct sensitivities to metabolic inhibitors. *Journal of Cancer*, 9(9), 1582–1591. <https://doi.org/10.7150/jca.24331>
- Lu, J., Zhang, Y., Sun, M., Ding, C., Zhang, L., Kong, Y., Cai, M., Miccoli, P., Ma, C., & Yue, X. (2021). Multi-Omics Analysis of Fatty Acid Metabolism in Thyroid Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.737127>
- Luo, A., Lan, X., Qiu, Q., Zhou, Q., Li, J., Wu, M., Liu, P., Zhang, H., Lu, B., Lu, Y., & Lu, W. (2022). LncRNA SFTA1P promotes cervical cancer progression by interaction with PTBP1 to facilitate TPM4 mRNA degradation. *Cell Death & Disease*, 13(11), 936. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05359-7>
- Ma, D., Huang, Y., & Song, S. (2019). Inhibiting the HPV16 oncogene-mediated glycolysis sensitizes human cervical carcinoma cells to 5-fluorouracil. *OncoTargets and Therapy*, Volume 12, 6711–6720. <https://doi.org/10.2147/OTT.S205334>

- Ma, L., & Zong, X. (2020). Metabolic Symbiosis in Chemoresistance: Refocusing the Role of Aerobic Glycolysis. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00005>
- Mandal, A., & Chaubey, B. (2018). Expression of Duplex shRNAs through a Lentiviral Vector against Cellular and Viral Genes Inflicts Sustained Inhibition of Hepatitis C Virus Replication. *Intervirology*, 61(2), 79–91. <https://doi.org/10.1159/000492220>
- Mariyanna, L., Priyadarshini, P., Hofmann-Sieber, H., Krepstakies, M., Walz, N., Grundhoff, A., Buchholz, F., Hildt, E., & Hauber, J. (2012). Excision of HIV-1 Proviral DNA by Recombinant Cell Permeable Tre-Recombinase. *PLoS ONE*, 7(2), e31576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031576>
- McGinley, L., McMahon, J., Strappe, P., Barry, F., Murphy, M., O'Toole, D., & O'Brien, T. (2011). Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(2), 12. <https://doi.org/10.1186/scrt53>
- McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384(2), 335–344. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006>
- Meng, Q., Sun, H., Zhang, Y., Yang, X., Hao, S., Liu, B., Zhou, H., Xu, Z.-X., & Wang, Y. (2024). Lactylation stabilizes DCBLD1 activating the pentose phosphate pathway to promote cervical cancer progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 43(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02943-x>
- Milone, M. C., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 1529–1541. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>

- Molijn, A., Jenkins, D., Chen, W., Zhang, X., Pirog, E., Enqi, W., Liu, B., Schmidt, J., Cui, J., Qiao, Y., Quint, W. and (2016), The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 138: 409-416. <https://doi.org/10.1002/ijc.29722>
- Morillas, M., Gómez-Puertas, P., Bentebibel, A., Sellés, E., Casals, N., Valencia, A., Hegardt, F. G., Asins, G., & Serra, D. (2003). Identification of Conserved Amino Acid Residues in Rat Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Critical for Malonyl-CoA Inhibition: MUTATION OF METHIONINE 593 ABOLISHES MALONYL-CoA INHIBITION. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9058–9063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M209999200>
- Morsy, A. and Trippier, P. (2020). Reversal of apalutamide and darolutamide aldo-keto reductase 1c3-mediated resistance by a small molecule inhibitor. *Acs Chemical Biology*, 15(3), 646-650. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00069>
- Naldini, L., Blömer, U., Gage, F. H., Trono, D., & Verma, I. M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11382–11388. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11382>
- Nasiri, F., Muhammadnejad, S., & Rahbarizadeh, F. (2023). Effects of polybrene and retronectin as transduction enhancers on the development and phenotypic characteristics of VHH-based CD19-redirected CAR T cells: a comparative investigation. *Clinical and experimental medicine*, 23(6), 2535–2549. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00928-8>
- New England Biolabs. (s.f.). *NEB® PCR Cloning Kit*. New England Biolabs. https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/manuals/manuale1202_e1203.pdf?rev=403d289f250b4630a0af0cb0d8c10f2c&hash=D6E8E2FF5B54C666B677EA99FC78652A

- Organización Mundial de la Salud (2022). Cervical cancer. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
- Pan, X., Yang, W., Wen, Z., Li, F., Tong, L., & Tang, W. (2020). Does adenocarcinoma have a worse prognosis than squamous cell carcinoma in patients with cervical cancer? A real-world study with a propensity score matching analysis. *Journal of gynecologic oncology*, 31(6), e80. <https://doi.org/10.3802/jgo.2020.31.e80>
- Peng, J., Cui, Y., Xu, S., Wu, X., Huang, Y., Zhou, W., Wang, S., Fu, Z., & Xie, H. (2021). Altered glycolysis results in drug-resistant in clinical tumor therapy (Review). *Oncology Letters*, 21(5), 369. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12630>
- Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., & Verma, I. M. (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2140–2145. <https://doi.org/10.1073/pnas.251682798>
- Qu, Q., Zeng, F., Liu, X., Wang, Q. J., & Deng, F. (2016). Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death & Disease*, 7(5), e2226–e2226. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.132>
- Quan, J., Cheng, C., Tan, Y., Jiang, N., Liao, C., Liao, W., Cao, Y., Luo, X. (2022). Acyl-CoA synthetase long-chain 3-mediated fatty acid oxidation is required for TGFβ1-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma. *International Journal of Biological Sciences*, 18(6), 2484–2496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.69802>
- Ray, R. M., Li, C., Bhattacharya, S., Naren, A. P., & Johnson, L. R. (2012). Spermine, a molecular switch regulating EGFR, integrin β3, Src, and FAK scaffolding. *Cellular Signalling*, 24(4), 931–942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.016>

- Relic, B., Charlier, E., Deroyer, C., Malaise, O., Crine, Y., Neuville, S., Gillet, P., de Seny, D., & Malaise, M. G. (2018). Serum starvation raises turnover of phosphorylated p62/SQSTM1 (Serine 349), reveals expression of proteasome and N-glycanase1 interactive protein RAD23B and sensitizes human synovial fibroblasts to BAY 11-7085-induced cell death. *Oncotarget*, 9(88), 35830–35843. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26295>
- Rima, M., Daghsni, M., Lopez, A., Fajloun, Z., Lefrancois, L., Dunach, M., Mori, Y., Merle, P., Brusés, J. L., de Waard, M., & Ronjat, M. (2017). Down-regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by Cacnb4. *Molecular Biology of the Cell*, 28(25), 3699–3708. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-01-0076>
- Rodríguez-Rodríguez, R., Miralpeix, C., Fosch, A., Pozo, M., Calderón-Domínguez, M., Perpinyà, X., Vellvehí, M., López, M., Herrero, L., Serra, D., & Casals, N. (2019). CPT1C in the ventromedial nucleus of the hypothalamus is necessary for brown fat thermogenesis activation in obesity. *Molecular Metabolism*, 19, 75–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.10.010>
- Rom, S., Reichenbach, N. L., Dykstra, H., & Persidsky, Y. (2015). The dual action of poly(ADP-ribose) polymerase -1 (PARP-1) inhibition in HIV-1 infection: HIV-1 LTR inhibition and diminution in Rho GTPase activity. *Frontiers in Microbiology*, Volume 6-2015. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00878>
- Sabri, N. A., Shamsuddin, S. H., & Zin, A. A. M. (2024). Evaluation of hpv 16 and hpv 18 oncoprotein expression as alternative diagnostic tools in cervical lesion. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 25(2), 521-527. <https://doi.org/10.31557/apjcp.2024.25.2.521>

- Saenz, D. T., & Poeschla, E. M. (2004). FIV: from lentivirus to lentivector. *The Journal of Gene Medicine*, 6(S1), S95–S104. <https://doi.org/10.1002/jgm.500>
- Saito, Y., Takasawa, A., Takasawa, K., Aoyama, T., Akimoto, T., Ota, M., Magara, K., Murata, M., Hirohashi, Y., Hasegawa, T., Sawada, N., Saito, T., & Osanai, M. (2020). Aldolase A promotes epithelial-mesenchymal transition to increase malignant potentials of cervical adenocarcinoma. *Cancer Science*, 111(8), 3071–3081. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cas.14524>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shams, S., Mokhtari, A., Kazemimanesh, M., & Saffar, B. (2023). Cloning of BHV-UL25 Conserved Fragment in a Lentiviral Transfer Plasmid for the Preparation of a Monitoring Cell Line. *Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.5812/jjcmb-133981>
- Shang, Y., Yang, F., Schulman, A. H., Zhu, J., Jia, Y., Wang, J., Zhang, X.-Q., Jia, Q., Hua, W., Yang, J., & Li, C. (2017). Gene Deletion in Barley Mediated by LTR-retrotransposon BARE. *Scientific Reports*, 7(1), 43766. <https://doi.org/10.1038/srep43766>
- Shapiro, S.S. and Wilk, M.B. (1965) An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52, 591-611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Shigeyasu, K., Okugawa, Y., Toden, S., Miyoshi, J., Toiyama, Y., Nagasaka, T., Takahashi, N., Kusunoki, M., Takayama, T., Yamada, Y., Fujiwara, T., Chen, L., & Goel, A. (2018). AZIN1 RNA editing confers cancer stemness and enhances oncogenic potential in colorectal cancer. *JCI Insight*, 3(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99976>

- Song, L.-M., Yao, D.-J., Xia, L., Wang, X.-M., Liu, T., Tang, Q.-Q., & Zhou, J. (2024). DSG2 and c-MYC Interact to Regulate the Expression of ADAM17 and Promote the Development of Cervical Cancer. *Cancer Management and Research*, Volume 16, 703–710. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S456548>
- Song, Y., Wu, X., Xu, Y., Zhu, J., Li, J., Zou, Z., Chen, L., Zhang, B., Hua, C., Rui, H., Zheng, Q., Zhou, Q., Wang, Q., Cheng, H. (2020). HPV E7 inhibits cell pyroptosis by promoting TRIM21-mediated degradation and ubiquitination of the IFI16 inflammasome. *International Journal of Biological Sciences*, 16(15), 2924-2937. <https://doi.org/10.7150/ijbs.50074>
- Song, Y., Li, X., Zeng, Z., Li, Q., Gong, Z., Liao, Q., Li, X., Chen, P., Xiang, B., Zhang, W., Xiong, F., Zhou, Y., Zhou, M., Ma, J., Li, Y., Chen, X., Li, G., & Xiong, W. (2016). Epstein-Barr virus encoded miR-BART11 promotes inflammation-induced carcinogenesis by targeting FOXP1. *Oncotarget*, 7(24), 36783–36799. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9170>
- Sun, T., Liu, Z., & Yang, Q. (2020). The role of ubiquitination and deubiquitination in cancer metabolism. *Molecular Cancer*, 19(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01262-x>
- Svidritskiy, E., & Korostelev, A. A. (2018). Mechanism of Inhibition of Translation Termination by Blastocidin S. *Journal of Molecular Biology*, 430(5), 591–593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.01.007>
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent E. coli*. Thermo Fisher Scientific. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/oneshot_stbl3_man.pdf
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *pLenti6/V5 Directional TOPO® Cloning Kit*. Thermo Fisher Scientific. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/plenti6v5dtopo_man.pdf

- Timenetsky, J., Santos, L. M., Buzinhani, M., & Mettifogo, E. (2006). Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(7), 907–914. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000700009>
- Tomás, H. A., Rodrigues, A. F., Carrondo, M. J. T., & Coroadinha, A. S. (2018). LentiPro26: novel stable cell lines for constitutive lentiviral vector production. *Scientific Reports*, 8(1), 5271. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23593-y>
- Wang, Y.-Y., Chen, J., Liu, X.-M., Zhao, R., & Zhe, H. (2018). Nrf2-Mediated Metabolic Reprogramming in Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1), 9304091. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/9304091>
- Welch, B. L. (1947). The generalization of Student's problem when several different population variances are involved. *Biometrika*, 34(1/2), 28–35. <https://doi.org/10.1093/biomet/34.1-2.28>
- White, M., Whittaker, R., Gándara, C., & Stoll, E. A. (2017). A Guide to Approaching Regulatory Considerations for Lentiviral-Mediated Gene Therapies. *Human Gene Therapy Methods*, 28(4), 163–176. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.096>
- Wolff, J. H., & Mikkelsen, J. (2022). Delivering genes with human immunodeficiency virus-derived vehicles: still state-of-the-art after 25 years. *Journal of Biomedical Science*, 29. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00865-4>
- Yu, X., Zheng, B., & Chai, R. (2014). Lentivirus-mediated knockdown of eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D inhibits proliferation of HCT116 colon cancer cells. *Bioscience Reports*, 34(6), e00161. <https://doi.org/10.1042/BSR20140078>
- Yuan, L., Jiang, H., Jia, Y., Liao, Y., Shao, C., Zhou, Y., Li, J., Liao, Y., Huang, H., Pan, Y., Wen, W., Zhao, X., Chen, L., Jing, X., Pan, C., Wang, W., Yao, S., & Zhang, C. (2024). Fatty Acid Oxidation Supports Lymph Node Metastasis of Cervical Cancer via Acetyl-CoA-Mediated

- Stemness. *Advanced Science*, 11(21), 2308422.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/advs.202308422>
- Zarei, S., Abraham, S., Arrighi, J.-F., Haller, O., Calzascia, T., Walker, P. R., Kündig, T. M., Hauser, C., & Piguet, V. (2004). Lentiviral Transduction of Dendritic Cells Confers Protective Antiviral Immunity In Vivo. *Journal of Virology*, 78(14), 7843–7845.
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.14.7843-7845.2004>
- Zhang, R., Lu, H., Lyu, Y., Yang, X., Zhu, L., Yang, G., Jiang, P., Re, Y., Song, W., Wang, J., Zhang, C., Gu, F., Luo, T., Wu, Z., & Xu, C. (2017). E6/E7-P53-POU2F1-CTHRC1 axis promotes cervical cancer metastasis and activates Wnt/PCP pathway. *Scientific Reports*, 7(1), 44744. <https://doi.org/10.1038/srep44744>
- Zhang, S., Xu, H., Zhang, L., & Qiao, Y. (2020). Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(6), 720–728.
<https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05>
- Zhang, Y., Wu, B., Liu, D., Chen, Y., Xu, Y., Fu, L., Lin, Z., Wu, G., & Huang, F. (2024). Targeting HIF-1 α with Specific DNA Yokes for Effective Anticancer Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 13(22), 2401087.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adhm.202401087>
- Zhao, J., Liu, M., Shi, T., Gao, M., Lv, Y., Zhao, Y., Li, J., Zhang, M., Zhang, H., Guan, F., He, K., & Chen, L. (2021). Analysis of Serum Metabolomics in Rats with Osteoarthritis by Mass Spectrometry. *Molecules*, 26(23), 7181. <https://doi.org/10.3390/molecules26237181>
- Zhao, J., Xie, F., Yang, Y., & Wang, S. (2021). Reprogramming of fatty acid metabolism in breast cancer: a narrative review. *Translational Breast Cancer Research*, 2, 5–5.
<https://doi.org/10.21037/tbcr-20-53>

Apéndices

Apéndice A. Mutagénesis sitio dirigida de M953S en CPT1A

Los cebadores fueron diseñados de acuerdo a los lineamientos establecidos en el manual del *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* de Agilent Technologies (Santa Clara, USA).

Tabla 1A.

Cebadores y secuencias de la mutagénesis sitio dirigida de M593S en CPT1A

Mutagénesis sitio dirigida (M593S en CPT1A)	
<i>CPT1A</i> wild type	5' CGGAAGAGCCGGGTCATGGAGGCCTCGTAT 3'
Cebadores <i>CPT1A</i> M593S	Fwd 5' ATACGAGGCCTCCAG T ACCCGGCTCTTCCG 3'
	Rev 5' CGGAAGAGCCGGT A CTGGAGGCCTCGTAT 3'
<i>CPT1A</i> M593S secuenciado	5' CGGAAGAGCCGGT A CTGGAGGCCTCGTAT 3'

Nota. Las bases en negrita corresponden a las posiciones en las que se generó la mutación.

Apéndice B. Clonación de CPT1A M593S en pLenti6/V5-D-TOPO

Los cebadores utilizados para generar los extremos romos en CPT1A M593S, necesarios para la clonación, fueron diseñados de acuerdo a los lineamientos establecidos en el manual del *pLenti6/V5 Directional TOPO Cloning Kit* de Thermo Fisher Scientific (Waltham, E.E.U.U).

Tabla 1B.

Cebadores para la generación de extremos romos en CPT1A M593S necesarios para la clonación.

Extremos romos en CPT1A M593S para pLenti6/V5-D-TOPO	
Cebadores <i>CPT1A</i> pLenti6/V5-D-TOPO	Fwd 5' CACC A TGGCAGAAAGCTCA 3'
	Rev 5' CTTTTTGGGAATTAGAACTGAGACCA 3'

Nota. En el cebador *CPT1A* pLenti Fwd, las bases en negrita corresponden a las posiciones -3 y +4 de la secuencia Kozak, y el codón de inicio está subrayado.

Apéndice C. Listado de cebadores**Tabla 1C.**

Secuencias de los cebadores utilizados en las PCRs digitales.

Cebadores PCR digitales	
<i>Mycoplasma sp.</i>	Fwd 5' GGGAGCAAACACGATAGATACCCT '3
	Rev 5' TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC 3'
E7 VPH-16	Fwd 5' TGCAACCAGAGACAACCTGAT '3
	Rev 5' GCACAACCGAAGCGTAGA 3'
E7 VPH-18	Fwd 5' CGAACCACAACGTCACACAA '3
	Rev 5' CACGGACACACAAAGGACAG
<i>CPT1A</i>	Fwd 5' CACTACAAGGACATGGGCAA '3
	Rev 5' TCCTCCCCTCTCGGAAGA 3'

Apéndice D. Experimentos adicionales para la verificación del plásmido.**1. Verificación del plásmido****1.1 Extremos romos mediante PCR y purificación**

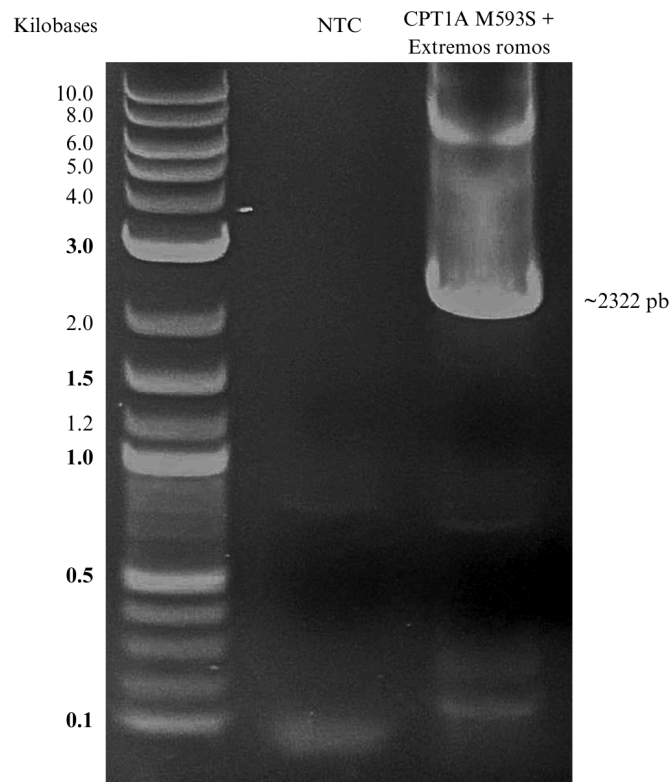
Se generaron extremos romos en el vector confirmado pMinit 2.0 *CPT1A* M593S mediante una PCR utilizando la polimerasa *Q5 High Fidelity 2x Master Mix* de New England Biolabs (Massachusetts, USA) y los cebadores detallados en el [Apéndice B](#). La reacción se llevó a cabo en un termociclador T-100 de Bio-Rad (Berkeley, USA) de acuerdo con los parámetros de la enzima modificando la extensión a 72°C por 2 min y medio debido al tamaño del gen (2322 pb). Posteriormente, los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, realizada durante 1 h a 80 V. Se verificó la presencia del fragmento correspondiente al gen *CPT1A* M593S con los extremos romos generados. Las bandas específicas fueron purificadas utilizando el protocolo del *Monarch DNA Gel Extraction Kit* (New

England Biolabs, Massachusetts, EE. UU.), y el ADN recuperado fue cuantificado con un espectrofotómetro DS-11 de DeNovix (Wilmington, EE. UU.).

La electroforesis reveló una banda del tamaño esperado (~2322 pb), correspondiente al gen *CPT1A* M593S con extremos romos. Se incluyó una muestra sin ADN como control negativo (NTC) (Figura 1D).

Figura 1D.

Electroforesis de CPT1A M593S con los extremos romos producidos mediante PCR.



1.2 Transformación de E. coli competentes y extracción de los plásmidos

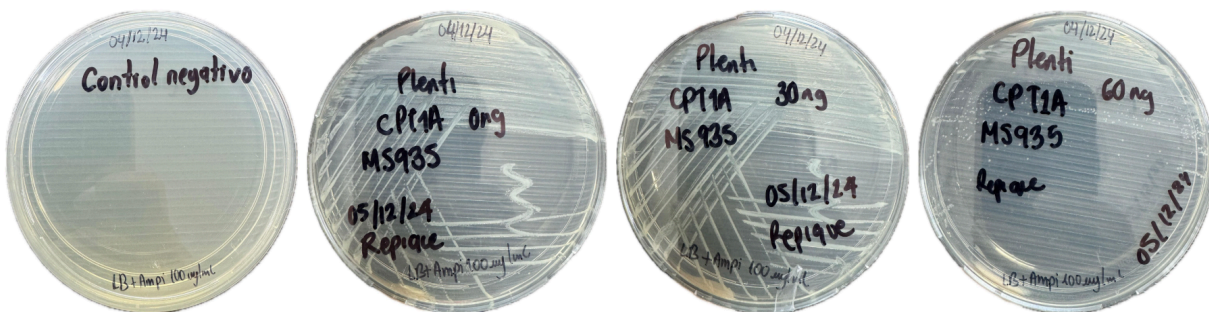
Se realizaron tres reacciones de clonación del gen previamente amplificado y purificado en el vector pLenti6/V5-D-TOPO, con modificaciones al protocolo recomendado en el manual. En la primera reacción, la concentración de ADN se incrementó a 60 ng/μL, mientras que en la

segunda se utilizó una concentración de 30 ng/μL, debido a que valores inferiores a estos resultaban en vectores no confirmados. En la tercera reacción, se empleó 0 ng/μL de ADN para verificar la funcionalidad del vector y determinar si podía insertarse sin el fragmento deseado. Finalmente, el tiempo de incubación se extendió de 5 min a 20 h a 16°C para las tres reacciones, siguiendo la recomendación del protocolo de aumentar la duración según el tamaño del gen.

A partir de la transformación de *E. coli* competentes, se obtuvieron colonias bacterianas en las placas correspondientes a las tres concentraciones de ADN (0, 30 y 60 ng/μL) (Figura 2D). En el control negativo no se observan colonias, lo que indica que el medio de cultivo mantenía su estabilidad en selección con la ampicilina. Por otra parte, el crecimiento de colonias en concentración de 0 ng/μL, sugiere que el vector puede insertarse sin el gen, lo que confirma su integridad y funcionalidad.

Figura 2D.

Transformación de pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S en E. coli competentes.



Se extrajeron cuatro colonias por cada concentración utilizando el kit de miniprep *Spin Plasmid Mini Two* de Invisorb (Birkenfeld, Alemania). Los resultados de la cuantificación de los plásmidos extraídos en cada transformación (0, 30 y 60 ng/μL) se presentan en la [Tabla 1D](#). En la cuantificación de la mayoría de los plásmidos extraídos para las clonaciones de 30 y 60 ng/μL se obtuvieron valores superiores a 200 ng/μL (Tabla 1). Sin embargo, se presume que la extracción

no recupera exclusivamente ADN plasmídico, ya que los resultados de las electroforesis no coinciden con las concentraciones esperadas en cada análisis de restricción.

Tabla 1D.

Cuantificación de los plásmidos pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S extraídos.

Plásmido	ADN en la clonación (ng)	Concentración del plásmido (ng/μL)
pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S	30	233,711
		253,864
		228,788
		245,583
	60	216,860
		262,013
		356,108
		123,096

1.3 Confirmación de los plásmidos

1.3.1 Digestión enzimática

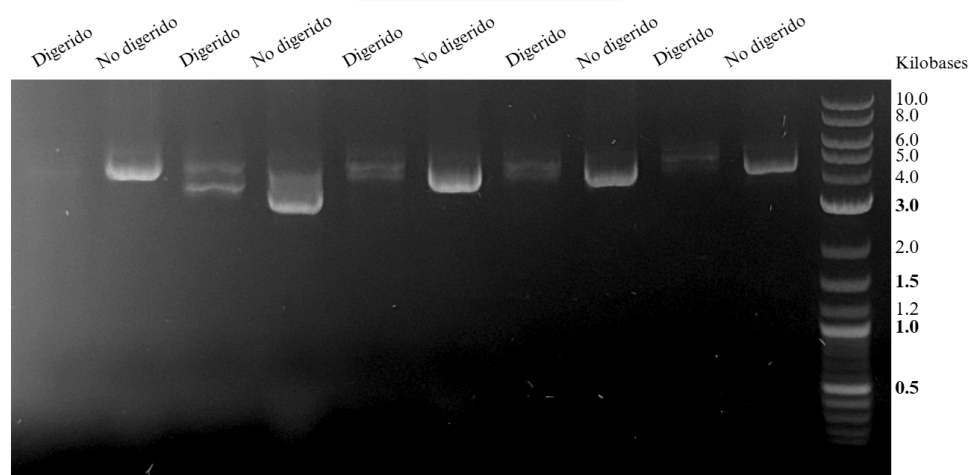
Se realizaron las digestiones enzimáticas de los plásmidos extraídos de pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S utilizando una enzima recomendada en el manual, la cual debía cortar tanto en el vector como en el inserto. Se seleccionó la enzima NdeI de New England Biolabs (Massachusetts, EE.UU.), la cual corta en la base 1925 de CPT1A M593S y en la base 6513 de pLenti6/V5-D-TOPO (Figura 2). Cada digestión se llevó a cabo con 1 μg de plásmido por muestra, incubando a 37°C durante 15 min según el protocolo de New England Biolabs. Finalmente, los fragmentos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % a 80 V durante 90 min.

Para cada digestión enzimática de cada clonación, se esperaban dos fragmentos: uno de 6910 pb y otro de 2371 pb, sumando un total de 9281 pb, correspondiente al tamaño del vector pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S. Los plásmidos resultantes tras la transformación con 30

ng/ μ L de ADN clonado no presentan el tamaño esperado en las bandas de las muestras digeridas y sin digerir (Figura 3D). En la mayoría de los pozos digeridos se identifican dos conformaciones del plásmido. Sin embargo, el fragmento lineal no corresponde con ninguno de los dos tamaños esperados en la digestión (6910 pb y 2371 pb).

Figura 3D.

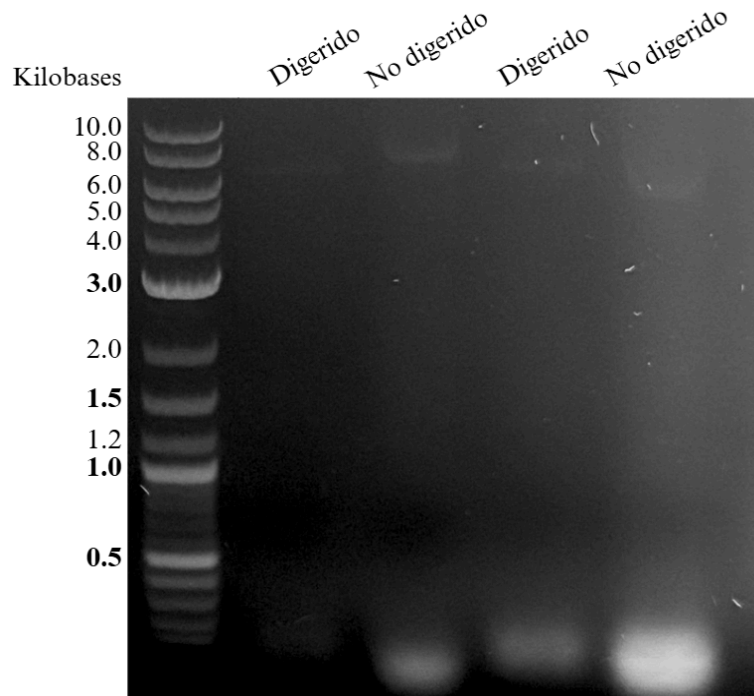
Digestión enzimática de pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S con 30 ng/ μ L en la clonación.



Por otro lado, la digestión de los plásmidos resultantes de la transformación con 60 ng/ μ L de ADN clonado no muestra bandas correspondientes a los tamaños esperados. No obstante, se observa una banda de aproximadamente 7 kb, correspondiente al plásmido sin inserto, lo que sugiere que la clonación no fue exitosa (Figura 4D). Además, la intensidad de las bandas en la electroforesis indica que la concentración del plásmido no coincide con el 1 μ g de ADN agregado en la digestión. Asimismo, se detecta ADN de tamaños muy pequeños en el gel, posiblemente correspondiente a material cuantificado pero no relacionado con el vector, lo que explicaría la discrepancia en las concentraciones. Por último, en los carriles no digeridos se pueden apreciar formas no lineales del plásmido.

Figura 4D.

Digestión enzimática de pLenti6/V5-D-TOPO CPT1A M593S con 60 ng/μL en la clonación.



Nota. Únicamente se muestran dos colonias analizadas puesto que en las otras tres evaluadas no se observan bandas.

1.3.2 PCR de CPT1A M593S

Para confirmar la presencia del gen *CPT1A* en el vector, se realizó una PCR utilizando los cebadores específicos para la mutación M593S de *CPT1A*, detallados en la [Tabla 2D](#). Estos cebadores permiten detectar el sitio específico de la mutación, por lo que su amplificación indica la presencia del gen mutado. Como control positivo, se empleó el plásmido pMinit 2.0 *CPT1A* M593S previamente confirmado. La PCR se llevó a cabo con la mezcla *GoTaq Green Master Mix* de Promega (Wisconsin, EE.UU.), empleando 250 ng de ADN por muestra. Las reacciones se realizaron en un termociclador T-100 de Bio-Rad (Berkeley, EE.UU) siguiendo los parámetros de la enzima.

Tabla 2D.

Secuencias de los cebadores cortos para PCR de CPT1A M593S.

Cebadores cortos <i>CPT1A M593S</i>	
<i>CPT1A M593S</i>	Fwd 5' CACTACAAGGACATGGGCAA '3
	Rev 5' TCCTCCCCTCTCGGAAGA 3'

En ninguna de las colonias de 60 ng/μL analizadas se detectó el fragmento de 73 pb correspondiente al gen *CPT1A M593S*, lo que confirma que las colonias están vacías. La banda esperada se observó correctamente en el control positivo con el plásmido pMiniT 2.0 *CPT1A M593S*, previamente confirmado. Estos resultados indican que el vector pLenti6/V5-D-TOPO no integró adecuadamente el gen *CPT1A M593S*. Las posibles causas de este resultado se abordan en la [sección 3.2.4](#) del documento.

Figura 5D.

PCR de las colonias de 60 ng/μL de ADN en la clonación.

