BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



EFECTO DE LAS ONCOPROTEÍNAS E6 Y E7 DEL VPH18 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLICANOS Y GENES DE LA GLICOSILACIÓN

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

M. C. Miguel Angel Aco Tlachi

ASESOR (ES) DE TESIS:

D.C. Verónica Vallejo Ruiz

D.C. Ricardo Carreño López

PUEBLA, PUE. **Octubre, 2018**

BUAP

Puebla, Pue. a 25 de septiembre 2018.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOG[A
CICM-ICUAP
PRESENTE.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado del alumno **Miguel Ángel Aco Tlachi,** les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH18 sobre la expresión de glicanos y genes de la glicosilación"

A nuestro juicio, el alumno **Miguel Ángel Aco Tlachi** puede proceder a la impresión de la tesis y a la pr sentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Ate n t a m e n te.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C.Lorena ores

D.C. Patricia Sánchez Alonso

D.C. Elsa I. Castañeda Roldán

D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta

D.C. Alberto Ramírez Mata

D.C. Candelario Vázquez Cruz

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio ICII,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiolo gia@correo.buap.mx

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular, del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS

La presente tesis contó con el apoyo del Fondo Sectorial de Investigación en Salud. SALUD-2012-01-180219

Algunos resultados del presente trabajo fueron publicados en una revista arbitrada, cuyo costo de publicación fue cubierta por el programa para el desarrollo profesional docente para el tipo superior de la dirección general de educación superior universitaria, dirección de superación académica, SEP-SES.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí apoyo de:

Beca del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, número de CVU 364279

Beca del Instituto Mexicano del Seguro Social, número de matrícula 98227565

Beca de movilidad de la vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado

Agradecimientos

A mis asesores D.C. Verónica Vallejo Ruiz y D.C. Ricardo Carreño López, por permitirme integrarme a su grupo de investigación, por todo su incondicional apoyo y por compartir su experiencia para la culminación del presente trabajo, así como de mi formación profesional y personal.

A las Dras. Lorena Milflores Flores, Patricia Sánchez Alonso, Elsa I. Castañeda Roldán, Nora H. Rosas Murrieta, que siguieron muy de cerca el presente trabajo, sus sugerencias y observaciones fueron de mucha importancia para la culminación de esta tesis.

A los Dres. Luis Felipe Jave Suárez y Adriana Aguilar Lemarroy y su grupo de trabajo, por todas las facilidades prestadas durante el desarrollo de una estancia en el CIBO, así como su valiosa participación para el desarrollo de este trabajo.

A los Dres. Alberto Ramírez Mata y Candelario Vázquez Cruz que amablemente revisaron este trabajo.

A toda la plantilla de investigadores y personal técnico del CIBIOR, mis compañeros y amigos de biología molecular y los demás laboratorios. Mis compañeros de generación, al D.C. José Antonio Munive, M.C. Claudia Montalvo, amigos de la maestría, licenciatura y demás personas que se me escapan de la mente y que han dejado una huella imborrable en mi desarrollo profesional y personal… ¡Gracias!

Dedicatoria

A mis abuelos (Q.E.P.D), que se encuentren descansando en brazos de quien confiaron su fe en vida...

A mis padres Roman y Casimira, nunca habrá palabras que puedan expresar todo lo agradecido que estoy con ustedes…

A mis hermanos, que nunca dejaron que los ánimos decayeran, que siempre han estado presentes…

FUERZA, CORAZON Y RESISTECIA…

ÍNDICE

	RESUMEN	**1**
1	**INTRODUCCIÓN**	**2**
1.1	**Cáncer cervicouterino (CaCu)**	**2**
1.2	**Virus del Papiloma Humano (VPH)**	**3**
1.2.1	**Virus del Papiloma Humano Tipo 18 (VPH18)**	**4**
1.3	**Genoma del Virus del Papiloma Humano**	**5**
1.3.1	**Proteínas de expresión temprana**	**6**
1.4	**Ciclo viral del Virus del Papiloma Humano**	**11**
1.5	**Modulación de la expresión génica por la oncoproteínas E6 y E7 del VPH**	**14**
1.6	**Glicosilación y cáncer**	**17**
1.6.1	**Generalidades de la glicosilación**	**17**
1.6.2	**Alteraciones de la glicosilación en cáncer**	**19**
2	**ANTECEDENTES**	**22**
3	**JUSTIFICACIÓN**	**27**
4	**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**	**28**
5	**HIPÓTESIS**	**28**
6	**OBJETIVOS**	**29**
6.1	**Objetivo general**	**29**
6.2	**Objetivos específicos**	**29**
7	**MATERIAL Y MÉTODOS**	**30**
7.1	**Material biológico y condiciones de cultivo**	**30**
7.2	**Silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 del VPH18**	**30**
7.2.1	**Selección clonal**	**31**
7.3	**Evaluación de la viabilidad celular**	**32**
7.3.1	**Ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)**	**32**
7.3.2	**Ensayo de cristal violeta**	**32**
7.4	**Evaluación del silenciamiento de E6 y E7 del VPH18**	**33**
7.4.1	**Extracción de RNA total para la cuantificación de los transcritos de E6 y E7 del VPH18**	**33**
7.4.2	**qRT-PCR para la cuantificación de los transcritos de E6 y E7 del VPH18**	**34**
7.4.2.1	**Construcción de una curva de rango dinámico para la validación del gen endógeno**	**35**
7.4.2.2	**Cuantificación de los transcritos de E6 y E7 del VPH18**	**35**
7.5	**Evaluación del silenciamiento por western blot**	**35**
7.5.1	**Extracción de proteínas**	**36**
7.5.2	**Electroforesis (SDS-PAGE)**	**36**
7.6	**Microarreglos de expresión de línea silenciada contra línea control**	**37**
7.6.1	**Preparación de la muestra**	**38**
7.6.2	**Adquisición de datos y análisis de las imágenes de los microarreglos**	**39**
7.7	**Cuantificación de los transcritos de glicogenes por qRT-PCR**	**40**
7.8	**Análisis de expresión de glicanos en superficie celular**	**41**

7.8.1	Citoquímicas	41
7.9	Análisis bioinformáticos	42
7.9.1	Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con expresión alterada	42
7.9.2	Búsqueda de glicogenes (construcción de una base de datos)	43
7.9.3	Construcción de las redes de interacción proteína-proteína (PPI)	44
8	**RESULTADOS**	**46**
8.1	Evaluación del silenciamiento de *E6* y E7, sobre la viabilidad y proliferación celular	46
8.1.1	Viabilidad celular	46
8.1.2	Proliferación celular	47
8.2	Validación del método de cuantificación relativa (ΔΔCt) de *E6* y *E7* del VPH18	48
8.2.1	Cuantificación de los transcritos de *E6* y *E7* en la línea celular Hela silenciadas y controles	50
8.2.2	Cuantificación de los transcritos de *E6* y *E7* del VPH18 en las líneas seleccionadas	52
8.3	Evaluación del silenciamiento de E6 y E7 por western blot	53
8.4	Perfil de genes alterados por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18 (microarreglos de expresión)	55
8.5	Análisis bioinformáticos de los genes expresados diferencialmente en el microarreglo	58
8.5.1	Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con expresión alterada (DAVID)	58
8.6	Identificación de genes con expresión alterada por el silenciamiento de E6 y E7 relacionados con la glicosilación	59
8.7	Cuantificación de la abundancia de los transcritos de glicogenes alterados por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18	64
8.7.1	Validación del método de cuantificación relativa (ΔΔCt), en los glicogenes seleccionados	64
8.7.2	Cuantificación relativa de los transcritos de los glicogenes seleccionados	66
8.8	Evaluación de glicanos de superficie celular	69
8.9	Construcción de redes de interacción proteína-proteína (PPI)	72
8.10	Glicogenes con expresión diferencial con un Z-score de ≥ 1.5 y ≤ 1.5	78
9	**DISCUSIÓN**	**83**
9.1	Glicogenes expresados diferencialmente y su relación con el cáncer	83
9.2	Alteración de glicanos de superficie celular	83
9.3	Fenotipos predichos a partir de las redes de interacción proteína-proteína	85
9.3.1	E6 y E7 del VPH18 afectan la expresión de glicogenes que se encargan de regular la vía NOTCH	85
9.3.2	Alteraciones en la glicosilación tipo mucina	87
9.3.3	*UGT8* y el metabolismo de la ceramida	88
10	**CONCLUSIONES**	**91**
11	**PERSPECTIVAS**	**92**
12	**BIBLIOGRAFÍA**	**93**
13	**ANEXOS**	**104**
13.1	Glycogene expression profiles based on microarray data from cervical carcinoma HeLa cells with partially silenced E6 and E7 HPV oncogenes	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Genoma circular del VPH que contiene las 3 regiones funcionales.	**6**
Figura 2	Representación esquemática del ciclo de vida de los papilomavirus.	**12**
Figura 3	Participación de los glicanos en procesos biológicos.	**18**
Figura 4	Alteraciones de la expresión de glicanos durante la transformación maligna.	**19**
Figura 5	Viabilidad celular a diferentes tiempos de la línea celular HeLa, de clonas silenciadas en E6 y E7 y de las clonas control.	**47**
Figura 6	Efecto del RNAi contra E6 y E7, en la proliferación celular.	**48**
Figura 7	Curva de validación del método ΔΔCt para cuantificación de los transcritos de *E6*, utilizando como gen endógeno *HPRT*, en la línea celular HeLa parental.	**49**
Figura 8	Curva de validación del método ΔΔCt para cuantificación de los transcritos de *E7*, utilizando como gen endógeno *HPRT*, en la línea celular HeLa parental.	**50**
Figura 9	Expresión relativa de E6 (A) y E7 (B), en diversas clonas silenciadas y controles.	**51**
Figura 10	Expresión relativa de E6 (A) y E7 (B), en las dos líneas celulares seleccionadas.	**52**
Figura 11	Ensayo de western blot en el que se detectó a la proteína p53 (una proteína blanco de E6) en la línea celular HeLa, en la clona control y la silenciada.	**54**
Figura 12	Ensayo de western blot en el que se detectó a la proteína E7 en la línea celular HeLa, en la clona control y la silenciada.	**55**
Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del RNA total extraído de las clonas control y silenciada.	**56**
Figura 14	Zscore.plot, que muestra los valores absolutos del Z-score en código de colores.	**57**
Figura 15	Análisis del Gene-Ontology, realizado en Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID).	**59**
Figura 16	Curva para la validación del método ΔΔCt para la cuantificación de los transcritos de los genes *POFUT1* y *XXYLT1*.	**65**
Figura 17	Curva para la validación del método ΔΔCt para la cuantificación de los transcritos de los genes *DPY19L1* y *UGT8*.	**66**
Figura 18	Cuantificación relativa de los glicogenes *POFUT1* (A), *ALG14* (B), *DPY19L1* (C) y *XXYLT1* (D).	**67**
Figura 19	Cuantificación relativa de los glicogenes *UGT8* (A), *PIGV* (B) y *GALNT1* (C).	**68**
Figura 20	Distribución del antígeno T en la membrana celular, reconocida la lectina *Peanut agglutinin* en las líneas celulares HeLa parental, shControl y shRNAE6/E7.	**70**

Figura 21	Red de interacción proteína-proteína (PPI), realizada en String DB con los glicogenes que modifican su expresión. Glicogenes que incrementan (A), glicogenes que disminuyen (B).	**73**
Figura 22	PPI con POFUT1, XXYLT1 y FUT4 (aumentan su expresión por el silenciamiento de E6 y E7).	**75**
Figura 23	PPI de GALNT1 y C1GALT1C1, (disminuyen su expresión por el silenciamiento de E6 y E7).	**76**
Figura 24	PPI del glicogen *UGT8* (A) interacción visualizada a partir de una PPI con todos los genes expresados diferencialmente, (B) interacción de UGT8 aumentando a 10 el número de interacciones.	**78**
Figura 25	PPI que incluye los glicogenes alterados con un corte de Z-score de ≥ 1.5 y ≤ -1.5. A) glicogenes relacionados a la regulación de la vía NOTCH, B) glicogenes relacionados a la glicosilación tipo mucina, C) glicogenes relacionados al metabolismo de la ceramida.	**82**
Figura 26	E6 y E7 afectan la expresión de genes involucrados con el metabolismo de la ceramida.	**90**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Géneros que incluyen genotipos de VPH de importancia clínica, se muestra su asociación con el desarrollo de diversas patologías incluyendo el cáncer.	**4**
Tabla 2	Interacción de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH con proteínas celulares que regulan la expresión génica a diversos niveles.	**16**
Tabla 3	Alteraciones de glicanos en membrana celular en diferentes tipos de cáncer.	**23**
Tabla 4	Oligonucleótidos utilizados para las cuantificaciones relativas de este estudio.	**40**
Tabla 5	Glicogenes que aumentan su expresión, por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18.	**60**
Tabla 6	Glicogenes que disminuyen su expresión, por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18	**61**
Tabla 7	Glicogenes alterados por la expresión de E6 y E7, su relación con otros tipos de cáncer y la importancia clínica por la alteración en sus niveles de expresión.	**62**
Tabla 8	Lectinas y sus ligandos utilizadas para la evaluación de los glicanos de superficie celular en las líneas parental, silenciada y control.	**69**
Tabla 9	Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia, obtenidas de la tinción de las diferentes lectinas en las tres líneas celulares.	**70**
Tabla 10	Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de las lectinas JAC y PNA en las diferentes líneas celulares.	**71**
Tabla 11	Glicogenes con expresión diferencial por silenciamiento parcial de E6 y E7, con un corte de Z-score de ≥ 1.5 y ≤ -1.5.	**79**

RESUMEN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres en países en vías de desarrollo, incluido México, representando un problema importante de salud pública. Los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo son los agentes etiológicos del CaCu, el VPH18, tiene mayor prevalencia en adenocarcinoma cervical. El genoma del VPH codifica para dos proteínas virales E6 y E7 con alta capacidad oncogénica y que son esenciales para el desarrollo del fenotipo maligno, al interaccionar con diversas proteínas que regulan la homeostasis celular e inducir cambios globales en la expresión génica hospedera.

Alteraciones a nivel de la glicosilación están íntimamente ligadas a la carcinogénesis; se ha observado expresión aberrante de glicanos de superficie celular y de los genes responsables de su biosíntesis en diversos tipos de cáncer, afectando el comportamiento tumoral. En la actualidad poco se sabe acerca de alteraciones de la glicosilación en CaCu. El objetivo de este trabajo fue evaluar si E6 y E7 del VPH18 afectan la expresión de glicogenes y estructuras glicánicas. En la línea celular HeLa VPH18 positiva se realizó un silenciamiento parcial de los oncogenes *E6/E7* y a través de un microarreglo de expresión se evaluó el efecto del silenciamiento sobre la expresión de glicogenes. Se consideraron genes diferencialmente expresados aquellos que presentaron un valor de Z-score ≥ 2. Se identificaron 16 glicogenes que modifican su expresión por el silenciamiento parcial de E6 y E7; 7 de los glicogenes que modificaron su expresión fueron cuantificados por qRT-PCR, para corroborar los resultados observados en el microarreglo. Análisis *"in* silico" de interacción proteína-proteína fueron realizados con los glicogenes cuya expresión transcripcional sufrió cambios para conocer vías de glicosilación relacionadas con la infección por VPH. Se identificaron cambios que resultaron en la O-glicosilación sobre las mucinas, la glicosilación de proteínas con repetidos de tipo del factor de crecimiento epidermal, metabolismo de la ceramida y la biosíntesis del antígeno T. E6 y E7 modifican la expresión de glicogenes, que podría tener un efecto sobre cambios en la glicosilación durante la transformación maligna del cérvix. Estos resultados sirven de base para estudios futuros para la búsqueda de marcadores glicosídicos en el pronóstico y detección del CaCu.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una enfermedad crónico degenerativa que involucra la proliferación y transformación celular con características morfológicas y metabólicas completamente diferentes a las células originales, como la inestabilidad genética, incapacidad de entrar a la apoptosis y evasión del sistema inmune entre otras características en la célula cancerosa. Un cérvix normal se compone de dos distintas zonas epiteliales; el ectocérvix, que está constituido por un epitelio escamoso y el endocérvix, compuesto por un epitelio glandular simple. Durante la adolescencia y la etapa adulta temprana el epitelio endocervical es reemplazado por epitelio escamoso inmaduro, el cual eventualmente madurará mediante un proceso llamado metaplasia escamosa (Stoler, 2004). El área metaplásica escamosa también es llamada zona de transformación, esto se debe a que es el sitio dónde de manera más frecuente se desarrollan los tumores malignos. El desarrollo de CaCu, es precedida por diferentes estadios celulares precancerosos o displásicos que son clasificados como: neoplasia intraepitelial cervical (NIC) la cual presenta diferentes grados de acuerdo al estadio de la enfermedad; NIC I (neoplasia de bajo grado) es similar a una lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG), del sistema de clasificación Bethesda (Lacruz Pelea, 2003), mientras que un NIC II y III corresponden a una lesión intraepitelial de alto grado (LIAG), la cual finalmente progresa a carcinoma invasor cuando las células neoplásicas malignas del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente (Jenkins, 2007).

El cáncer cervical es el cuarto tipo de cáncer más común que afecta a las mujeres en el mundo, con un estimado de 520, 000 nuevos casos por año y 280, 000 muertes anuales (ICO HPV Information Centre, 2015). Sin embargo, en países en vías de desarrollo esta neoplasia maligna es la segunda causa de muerte por tumores en mujeres. En la república mexicana, de acuerdo con datos recabados hasta el 2013 por la Secretaria de Salud, se estima que anualmente ocurren 13,960 nuevos casos, con una incidencia de 23.3 casos por

cada 100,000 mujeres, mientras que la mortalidad es alrededor de 11.3 defunciones por cada 100,000 mujeres.

El desarrollo de este tipo de cáncer se ha asociado a diversos factores de riesgo como: el inicio temprano de actividad sexual, múltiples parejas sexuales, tabaquismo, inmunosupresión, uso prolongado de anticonceptivos orales, predisposición genética, sin embargo, la infección persistente del virus del papiloma humano es el agente etiológico causante de cáncer cervicouterino (Castellsagué *et al*., 2002; López Saavedra *et al*., 2006; Castellsagué, 2008).

1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano pertenece a la familia de los papilomavirus, los cuales tienen la capacidad de infectar a mamíferos, aves y reptiles; en la actualidad se han descrito y secuenciado aproximadamente 300 genotipos, de los cuales alrededor de 200 tienen la capacidad de infectar al humano (VPHs) (PaVE: Papilomavirus Episteme). La clasificación y nomenclatura de los papilomavirus, incluyendo a los que infectan al humano, se basa en el gen L1 (el cual codifica para una proteína de cápside viral) debido a que es el más conservado evolutivamente; así mismo, para definir un nuevo genotipo la secuencia nucleotídica del genoma del virus analizado debe diferir más del 10 % del genotipo más cercano, si las diferencias se encuentran entre el 2-10 % se define como un subtipo viral del VPH, una diferencia menor al 2 % es definida como una variante viral del VPH (De Villiers *et al.*, 2004; Bernard, 2005).

Los VPHs son agrupados en diferentes géneros (basados en la homología del gen *L1*), el alfa incluye virus que infectan epitelios mucosos, el beta, el gamma y mu que agrupan virus que infectan epitelios cutáneos (Egawa *et al.*, 2015), los géneros alfa, beta y gamma contienen el mayor número de genotipos descritos (tabla 1). Los VPHs se han asociado con diversas patologías clínicas que afectan al humano, como las lesiones benignas o verrugas, sin embargo, otras tienen un significado clínico diferente, ya que una infección persistente con ciertos genotipos que infectan las mucosas puede conducir a la formación de neoplasias y displasias en el epitelio infectado (Doorbar *et al.*, 2015; Egawa *et al.*, 2015). Los VPHs que

infectan mucosas (género alfa) se han dividido en dos grupos, los de bajo riesgo que se relacionan con lesiones benignas y verrugas y los de alto riesgo que se han relacionado principalmente al desarrollo de CaCu y cáncer en zonas anogenitales (tabla 1), criptas tonsilares y en regiones orofaríngeos. En el CaCu las lesiones son originadas por infecciones persistentes de VPHs de alto riesgo en las regiones del endocérvix y la zona de transformación del cuello uterino (Jenkins, 2007).

Tabla 1. Géneros que incluyen genotipos de VPH de importancia clínica, se muestra su asociación con el desarrollo de diversas patologías incluyendo el cáncer (modificado de Tommasino, 2013).

		Tipo de VPH	Neoplasias relacionadas
Alfa	**Mucosa de alto riesgo**	VPH16	Carcinoma escamoso de cérvix Adenocarcinoma de cérvix Cáncer orofaríngeo
		VPH18	Adenocarcinoma de cérvix Carcinoma escamoso de cérvix
		VPH31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Carcinoma escamoso de cérvix
	Mucosa de bajo riesgo	VPH6, 11	Lesiones genitales benignas Papilomatosis respiratoria
		VPH13, 32	Hiperplasia epitelial focal oral
	Cutáneos benignos	VPH2, 3, 27, 57	Verrugas cutáneas
Mu		VPH1	Verrugas cutáneas
Beta		VPH5, 8	Carcinoma escamoso multifocal (piel), en pacientes con epidermodisplasia verruciforme
	Cutáneos	VPH9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36 -38, 47, 49, 75, 76, 80, 92, 93, 96, 98-100, 104, 105, 107, 110, 111, 113, 115, 118, 120, 122, 124, 143, 145, 150-152, 159	Probablemente asociados con carcinoma escamoso multifocal (piel) en pacientes inmuno-comprometidos
Gamma		VPH4, 48, 50, 60, 65, 88, 95, 101, 103, 108, 109, 112, 115, 116, 119, 121, 123, 126-142, 144, 146-149, 153-158, 161 -170	Desconocido

1.2.1 Virus del Papiloma Humano Tipo 18 (VPH18)

El VPH de genotipo 18, pertenece al género alfa; éste se encuentra agrupado dentro de los virus de alto riesgo e infecta mucosas. El VPH18 está presente en alrededor del 12 % de los casos de cáncer cervical de origen escamoso, y tiene una prevalencia ~37 % en adenocarcinoma cervical (ADC; Li *et al.*, 2011), este tipo de cáncer es originado en las células de origen glandular situadas en la unión escamo-columnar del cérvix.

A pesar de que se ha relacionado con el desarrollo de tumores con el peor pronóstico clínico, se conoce poco del adenocarcinoma causado por VPH18 y de su afinidad por las células glandulares, así como de los factores que hacen a este genotipo más agresivo respecto al genotipo 16 (Xi *et al.*, 2007); tampoco no está claro si la carga viral del VPH18 o coinfecciones con otros tipos virales están asociadas con la gravedad de la neoplasia cervical, sin embargo, el lugar donde se origina el adenocarcinoma favorece una rápida invasión al estroma, así como una metástasis lo que se asocia con un mal pronóstico clínico (Im *et al.*, 2003).

El VPH18 presenta una alta variabilidad genética intratipo en una sección del genoma viral llamada región larga de control (LCR), sin embargo, en las otras regiones no existe mucha variabilidad genética. No existe evidencia de recombinación genética entre estos virus, las variantes del VPH18 difieren una de otra por tan solo 1 % dentro de la región hipervariable en la región larga de control (LCR) y parte del gen *E2* (figura 1). El VPH 18 está estrechamente relacionado al VPH45 (también de alto riesgo, relacionado con el desarrollo de CaCu de origen escamoso) y difieren solo por 26 pares de bases en su secuencia (Ong *et al.*, 1993).

1.3 Genoma del Virus del Papiloma Humano

El genoma de los virus del papiloma humano está compuesto por DNA circular de cadena doble, su tamaño es de aproximadamente 8,000 pb, y comprende de seis a ocho marcos de lectura abiertos (MLAs) dentro del genoma circular. El genoma se ha dividido en tres regiones diferentes (figura 1): i) una región no codificante llamada región regulatoria rio arriba (URR) o región larga de control (LCR), la cual contiene sitios de unión a factores de transcripción (virales y de la célula hospedera) y el sitio de origen de replicación; ii) una

región de expresión temprana (Early), que contiene seis marcos de lectura (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) que codifican para proteínas que regulan el ciclo viral y iii) una región de expresión tardía (Late), que contiene dos marcos de lectura abiertos que codifican para las proteínas estructurales de la cápside viral L1 y L2 (Bernard, 2005; Zheng y Baker, 2006; De Villiers, 2013).

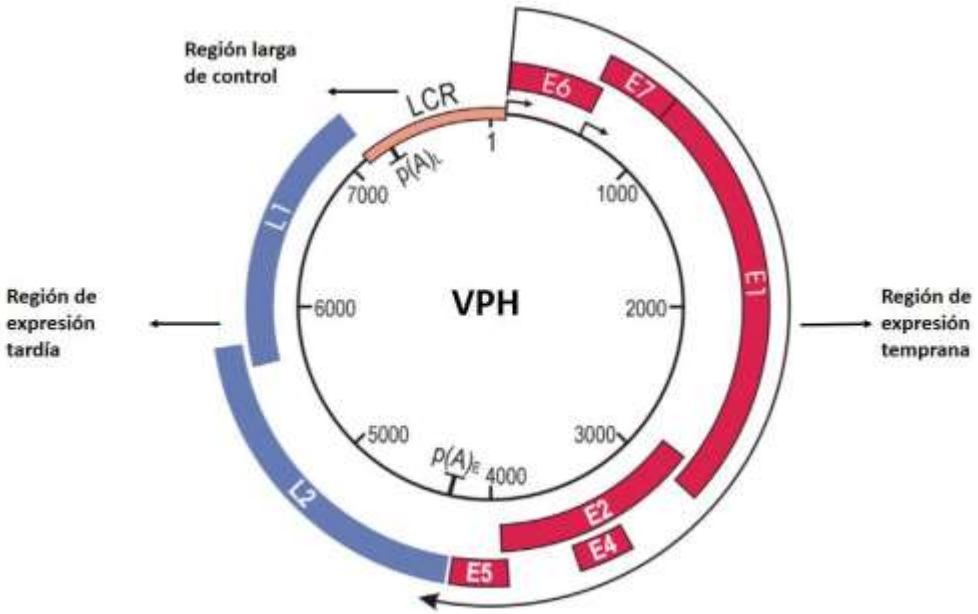


Figura 1. Genoma circular del VPH que contiene las 3 regiones funcionales; una región larga de control, una región de expresión temprana y una región de expresión tardía. Modificado de Durzynska *et al.,* 2017.

1.3.1 Proteínas de Expresión Temprana

E1 es una DNA helicasa dependiente de ATP y es la única proteína codificada por los papilomavirus con actividad enzimática. Dependiendo del tipo de papilomavirus el tamaño oscila entre los 600 a 650 aminoácidos, se divide en tres segmentos funcionales: i) una región amino-reguladora que es esencial para una óptima replicación *in vivo* del genoma viral; ii) un dominio central llamado dominio de unión al DNA (DBD), que reconoce sitios específicos dentro del sitio de origen de replicación del genoma viral y un carboxilo terminal que es el dominio enzimático, este dominio forma hexámeros con actividad ATPasa que son capaces de desenrollar las hebras del DNA (Amin *et al.*, 2000; Titolo *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2011).

E2 es una proteína regulatoria esencial codificada por todos los papilomavirus, se encuentra regulando los procesos de replicación y transcripción del genoma viral. La proteína E2 se divide en tres dominios funcionales, la región de transactivación (amino terminal), un dominio de unión al DNA (carboxilo terminal), unidos por un dominio rico en arginina y serina llamado dominio de bisagra (Hegde, 2002). El dominio de unión al DNA de E2 reconoce secuencias consenso o sitios de unión de E2 (E2BSs), estas se localizan principalmente en la región larga de control del genoma viral, E2 normalmente se encuentra como homodímero al unirse al DNA, sin embargo, a través de este mismo dominio puede formar dímeros con otras proteínas E2 unidas al DNA, pero en sitios más distantes provocando cambios conformacionales y curvaturas en el DNA ejerciendo funciones reguladoras. En los VPHs que infectan mucosas se encuentran dos secuencias de unión a proteína E2 en las cercanías del promotor de la región de expresión temprana, también se han identificado otras secuencias regulatorias: una cercana al sitio de origen de replicación y la otra en la región "enhancer" del genoma viral. Estas secuencias son sensibles a las modificaciones covalentes, ej. si hay modificaciones (como la metilación) en las secuencias de unión a E2 la capacidad de unión se modifica y también la capacidad de regular la transcripción (McBride, 2013; Graham, 2016).

La proteína E4 es codificada a partir de un RNAm procesado por *splicing* (E1^E4), el marco de lectura abierto (MLA) de E4, se encuentra dentro del MLA de E2, sin embargo, el codón de inicio y los primeros aminoácidos derivan del MLA de E1 (Wang *et al.*, 2011). E4 se expresa de manera abundante en las etapas tardías del ciclo viral y cuando inicia la amplificación del genoma viral (Doorbar, 2013), su síntesis precede a la de las proteínas de la cápside viral (L1 y L2). E4 tiene la habilidad de interrumpir las redes de queratina celular y la formación de una envoltura cornificada para facilitar la liberación y/o transmisión del virus (Bryan y Brown, 2001). También se ha observado que E4 junto a E2 es capaz de inhibir la proliferación celular en G2, esta capacidad puede ser debida a la interacción con cinasas celulares (Davy y Doorbar, 2007).

La proteína E5 no es codificada por todos los VPHs y a través de análisis filogenéticos se ha observado la existencia de diferentes proteínas E5, su tamaño es de aproximadamente 80 aminoácidos (Bravo, 2004), sin embargo, las bases moleculares de su actividad biológica han sido pobremente elucidadas. E5 es una proteína altamente hidrofóbica que se localiza primariamente en el retículo endoplásmico, cuando hay una alta expresión de esta proteína también es posible localizarla en las membranas del aparato de Golgi, membrana plasmática y membrana nuclear (Oetke *et al.*, 2000; Krawczyk *et al*., 2009; Hu y Ceresa, 2009).

E5 se expresa en etapas tempranas de la infección viral, su expresión protege a las células infectadas inhibiendo la apoptosis, esto lo realiza por dos rutas i) una mediada por la inhibición de los receptores de muerte, y la otra ii) inhibiendo la apoptosis inducida por el estrés en el retículo endoplasmático (Venuti *et al.*, 2011). La proteína E5 también interactúa con varias proteínas celulares alterando procesos biológicos importantes como la angiogénesis, la evasión del sistema inmune y la proliferación favoreciendo la transformación maligna en las células que expresan esta proteína. Algunas de las proteínas que interactúan con E5 son el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHCI) y la subunidad de 16 KDa de la ATPasa vacuolar (V-ATPase). Por otro lado, se sabe que E5 incrementa la expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) en la superficie celular, haciendo más sensibles a las células al factor de crecimiento epidermal (EGF; Venuti *et al.*, 2011; DiMaio y Petti, 2014).

E6 es una de las proteínas virales con alto potencial oncogénico, su tamaño es de alrededor de 150 aminoácidos, su estructura consiste en tres dominios de los cuales, dos son motivos de dedos de zinc ubicados en sus dos extremos el amino y el carboxilo terminal, estos motivos están unidos por un interdominio de 35 aminoácidos (Mantovani y Banks, 2001). Seguido del dedo de zinc del extremo carboxilo, hay un pequeño motivo de unión a dominios PDZ (acrónimo de 3 proteínas, PSD95, DlgA y zo-1, que fueron las primeras en las cuales se descubrió el dominio) llamado PBM (motivo de unión a PDZ), el cual le permite interactuar con proteínas que contienen dominios PDZ que se encuentran presentes en la

célula, el dominio PBM sólo lo contienen las proteínas E6 de virus de alto riesgo (Kiyono *et al*., 1997). E6 no tiene ninguna actividad enzimática y los tres dominios que posee le permiten múltiples interacciones con proteínas del hospedero, influyendo en diferentes vías del metabolismo celular (Mantovani y Banks, 2001).

E6 interacciona con diversas proteínas celulares como: la ubiquitin-ligasa E3 (E6AP, por su asociación con E6), esta interacción le permite a E6 reconocer uno de sus principales blancos, la proteína supresora de tumores p53, el resultado de esta interacción es la transferencia de monómeros de ubiquitina a p53, marcándola para su posterior degradación por la vía del proteosoma (Scheffner *et al*., 1993). La proteína p53 es un importante factor transcripcional que se encarga de regular la prosecución del ciclo celular en situaciones de emergencia, estimulando la expresión de genes relacionados a estos procesos celulares de reparación del DNA, entrada a la senescencia y la apoptosis.

La vía intrínseca es regulada por el estrés mitocondrial y del RE, la oncoproteína E6 puede bloquear la apoptosis al inducir la degradación de p53 y de proteínas proapoptóticas como Bax y al aumentar los niveles de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Cai *et al*., 2013). La vía apoptótica extrínseca que tiene que ver con la expresión de receptores de muerte también es inhibida por E6, ya que tiene la capacidad de interactuar con receptores de muerte como el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR-1) bloqueándolo e impidiendo la activación de las señales de muerte. E6 también induce la degradación de caspasa-8 y del adaptador FADD (dominio de muerte asociado a Fas) que son también, proteínas proapoptóticas de la vía extrínseca (Garnett *et al*., 2006). E6 participa junto con la proteína celular Ras para promover el crecimiento independiente del anclaje celular (Spanos *et al.*, 2008).

E6 también tiene la capacidad de retener a p53 en el citoplasma, bloqueando su translocación al núcleo, e impidiendo su actividad transcripcional en sus genes blanco independientemente de su degradación (Chakrabarti, 2003).

E6 es capaz de impedir que las células entren a una etapa de senescencia impidiendo el acortamiento de los telómeros, activando la trascripción del gen *hTERT* (Klingelhutz *et al*., 1996), este gen codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa, enzima importante para el mantenimiento de los telómeros. La proteína E6 (de VPHs de alto riesgo) activa la transcripción de *hTERT* en varios niveles, a través del heterodímero E6-E6AP induce la degradación de NFX1-91, proteína represora de *hTERT*, la degradación de NFX1-91 permite la unión del heterodímero c-Myc/Max en la región promotora activando la transcripción (Gewin *et al*., 2004). La actividad represora de NFX1-91 le permite reclutar HDAC al promotor de *hTERT* para reprimirlo también a nivel epigenético, sin embargo, su degradación induce que la actividad de HDAC disminuya mientras que las HAT aumenten activando el gen; el heterodímero E6-E6AP induce la degradación de otros represores como cMyc/Mad, USF1, Maz, e induce la actividad de activadores de *hTERT* como c-Myc/Max, Sp1 e histonas acetiltransferasas (Katzenellenbogen, 2016).

A través de su dominio PBM, E6 puede interactuar con proteínas celulares que contienen dominio PDZ, entre las funciones que desempeñan las proteínas que contienen estos dominios, se encuentran: regulación de la polaridad celular, participación en las uniones celulares, así como en vías de señalización y diferenciación (Thomas *et al*., 2008; Pim *et al.*, 2012). Algunas proteínas celulares que son degradadas a través de la interacción con el dominio PBM de E6 (en asociación con E6AP) son: DLG1, MAGI-1, Scribble, entre otras; la degradación de estas proteínas provoca la progresión de la malignidad celular por la pérdida de la polaridad celular y las uniones celulares que sirven de comunicación entre ellas (Pim *et al.*, 2012). Adicionalmente se ha visto que las mutaciones en el dominio PBM de E6, guían a la producción de partículas virales defectuosas con niveles bajos de actividad replicativa, así mismo este dominio está relacionado con el correcto mantenimiento del episoma viral, aunque el mecanismo aún no está claro, se cree que es por la regulación de la transición de la fase S a G2-like del ciclo celular impidiendo una completa diferenciación de las células infectadas (Lee y Laimins, 2004; Pim *et al.*, 2012).

La proteína E7, tiene un tamaño de alrededor de 100 aminoácidos, en su dominio carboxilo terminal contiene un motivo de dedo de zinc. Esta proteína tiene tres dominios altamente conservados, CD1-CD3. CD1 y CD2 son homólogos a los dominios CR1 y CR2 en la proteína E1A del adenovirus y CD3 tiene homología con el antígeno largo T del virus vacuolado del simio 40 (SV40). A través de estos dominios E7 interactúa con proteínas celulares, aunque la mayoría de sus interacciones se atribuye que sean a través de los dominios CD2 y CD3 (Mclaughlin-drubin y Münger, 2010).

Las principales proteínas blanco de E7, son la proteína supresora de tumores retinoblastoma (pRb) y proteínas relacionadas a ésta, como p107 y p130, esta interacción se realiza por un dominio conservado Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) de CD2 (Lagunas-Martínez *et al*., 2010). La función principal de pRb y sus proteínas asociadas es la regulación del ciclo celular, en la entrada de la fase G1 y progresión a la fase S, pRb es un regulador negativo del ciclo celular, su actividad la realiza por interacción con factores de transcripción de la familia E2F; E7 es capaz de desacoplar el complejo pRb-E2F, permitiendo la liberación de E2F, quien a su vez activa la trascripción de los genes involucrados en la progresión del ciclo celular como las ciclinas A y E y la cinasa dependiente de ciclinas (CDK2) (Tommasino, 2013; Tomaić, 2016). E7 tiene la capacidad de reprimir la actividad de los inhibidores de CDKs (CKIs) $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ para permitir la progresión del ciclo celular y la proliferación (Jones *et al*., 1997).

1.4 Ciclo Viral del Virus del Papiloma Humano

El ciclo de reproducción del VPH, está estrechamente ligado a la diferenciación del epitelio infectado, estos virus ingresan a un tejido mucoso a través de pequeñas lesiones e infectan las células basales del epitelio (células que aún no se han diferenciado), a medida que las células infectadas se van diferenciando y se estratifican, el ciclo de vida del virus avanza de manera altamente coordinada, de manera que en cada etapa, las proteína de origen viral generan los precursores que finalmente dan como resultado la generación de nuevas partículas virales (figura 2) (Doorbar, 2006).

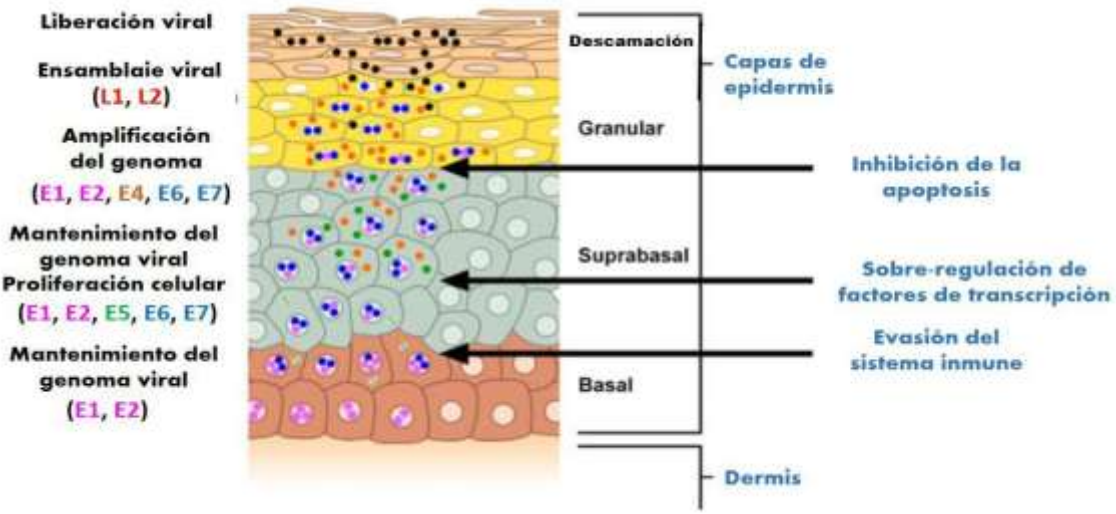


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de los papilomavirus. En cada sección se muestra las proteínas que son expresadas y algunas de sus funciones, hasta la generación de nuevas partículas virales (modificado de Venuti *et al.*, 2011).

Una vez que el VPH ha llegado a la capa basal del epitelio, los primeros contactos entre los virus y las células se realiza a través de cadenas de proteoglicanos heparán sulfato (HSPG) localizadas en la membrana citoplasmática, esta unión está basada en las cargas de la proteína L1 y el HSPG (Shafti-keramat *et al.*, 2003). Esta interacción provoca cambios conformacionales en el virión, exponiendo sitios de corte en el extremo amino terminal de L2 (proteína estructural de la cápside del virus) a una convertasa proproteína/furina de la célula hospedera (Egawa *et al.*, 2015). Posterior a esa primera interacción los virus son internalizados por vías endocíticas dependientes de clatrina (Tommasino, 2013).

Posterior a la infección, hay una fase de amplificación del genoma viral, esta fase sucede antes del mantenimiento del genoma viral (episomas), generando un bajo número de copias del episoma (entre 50 y 100 copias por célula), en las células basales infectadas (Pyeon *et al.*, 2009). Las proteínas que son esenciales en esta primera amplificación son E1 y E2, estas mismas se encargan del mantenimiento del DNA viral como un episoma y su replicación (Maglennon *et al*., 2011). En la fase proliferativa, hay expresión de las proteínas E6 y E7, su papel esencial en el ciclo viral es primariamente modificar el medio ambiente

celular para permitir la amplificación del genoma viral, principalmente redirigiendo las células de la capa superior a la fase S del ciclo celular. Posterior a la fase de proliferación las células infectadas son redireccionadas de la fase S a la fase G2-like para la amplificación del genoma viral, antes de iniciar su completa diferenciación; E6 y E7 participan en esta etapa regulando la proliferación celular de células basales y parabasales (Doorbar *et al.*, 2015; Egawa *et al.*, 2015).

Una vez que se ha completado la amplificación del genoma viral en las capas superiores del tejido infectado, se expresan las dos proteínas estructurales del virión, L1 (mayor) y L2 (menor). La proteína L2 (se expresa antes que L1), se acumula en estructuras nucleares donde hay regiones de replicación del DNA viral, posteriormente se recluta a L1 para el ensamble de los viriones (Holmgren *et al.*, 2005). La maduración de los viriones toma lugar en queratinocitos que son próximos a ser reemplazados, los cuales han perdido su actividad mitocondrial cambiando el ambiente de un medio reductor a uno oxidante. Los viriones son liberados cuando se rompen las células que se desprendieron por descamación del epitelio (Doorbar *et al.*, 2015). El correcto ensamblaje del virión es asistido por la proteína E4, que también participa en la liberación y/o transmisión del virus al interrumpir las redes de queratina celular lo que provoca la fragilidad celular (Bryan y Brown, 2001).

Si el ciclo viral (replicativo) progresa de una manera controlada y eficiente se tendrán partículas virales, sin embargo, por razones que aún se desconocen, en ocasiones fallan los controles replicativos lo que lleva a una infección no replicativa o abortiva (Egawa *et al.*, 2015). En esta etapa hay una expresión desregulada de las proteínas transformantes E6 y E7 que guían a una alta capacidad proliferativa e inmortalización de las células hospederas que finalmente progresa a cáncer. Durante este proceso el genoma viral normalmente sufre una ruptura y se integra al genoma hospedero, lo que genera una pérdida de la expresión de varios genes virales entre ellos E2, proteína que regula la replicación y transcripción del resto de los genes virales.

En la actualidad se han descrito dos tipos de integración del genoma del VPH al genoma hospedero: los del tipo 1, en la que una sola copia del genoma viral se integra al

genoma hospedero y los de tipo 2, en este tipo de integración, varias copias completas del genoma viral forman concatémeros y se integran al genoma hospedero, estos concatémeros son formados durante la replicación del DNA, posiblemente por procesos de recombinación. En la integración tipo 2 se ha observado que la secuencia viral más cercana al extremo 3´ sufre hipermetilación en la región LCR, silenciando la expresión de los genes virales, sin embargo, en las secuencias siguientes del concatémero la transcripción ocurre de manera normal (Durzynska *et al.*, 2017).

1.5 Modulación de la expresión génica por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH

La expresión de las proteínas E6 y E7 del VPH son capaces de inducir cambios globales en la expresión génica en la célula hospedara a través de las interacciones con proteínas celulares que funcionan como activadores o inhibidores de la transcripción. E6 y E7 tienen un enorme impacto en los patrones de expresión de genes del hospedero y ambos funcionan como reguladores de la transcripción a diversos niveles.

Ambas oncoproteínas pueden regular la expresión global de genes a nivel epigenético, estas alteraciones son el resultado de la interacción con enzimas encargadas del remodelamiento de la cromatina como las histonas acetiltransferasas (HATs), y las histonas deacetilasas (HDACs). E6 y E7 interactúan con p300 y su parálogo CBP (HATs), afectando su actividad enzimática (Vande Pol y Klingelhutz, 2014; Durzynska *et al.*, 2017), el promotor de IL8 es reprimido por estas interacciones. Se ha observado que E7 puede formar complejos con HDAC1 y HDAC2 junto con una proteína accesoria llamada Mi2β que son parte de un complejo de remodelamiento de la cromatina llamado NuRD (Brehm *et al.*, 1999) y de esta manera afectar la transcripción por diferentes mecanismos relacionados al remodelamiento de la cromatina (Por ej. por acetilación mediada por HATs); E7 puede interactuar con el factor de respuesta a interferón 1 (IRF1), después recluta a alguna HDAC para suprimir la actividad transcripcional de IRF1 (Um *et al.*, 2002). La represión de IRF1 impide que haya activación transcripcional del gen INF-β, el producto de este gen está relacionado a la respuesta celular inmune durante una infección viral y se cree que de esta manera el VPH suprime este proceso (Durzynska *et al.*, 2017).

E6 y E7 pueden influenciar la metilación del DNA, una manera de regulación epigenética, ambas proteínas inducen la expresión del gen de la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) y estimulan su actividad. En células sin infección, p53 forma un complejo con el factor de transcripción Sp1 y proteínas remodeladoras de la cromatina (Lin *et al.*, 2010), este complejo se une al promotor de DNMT1, p53 impide que Sp1 active la transcripción de este gen, sin embargo, E6 al degradar p53 induce la expresión de DMNT1 (Au Yeung *et al.*, 2010). E7 puede establecer una interacción directa con DNMT1, para estimular su actividad de metilación, la interacción con E7 provoca un cambio conformacional en DNMT1 exponiendo el sitio activo, este complejo se une al DNA, una vez estable la unión DNA-DNMT1, E7 se disocia del complejo DMNT1-DNA (Leonard *et al.*, 2012). E7 también es capaz de inducir la sobre expresión de DNMT1 y de otras DNA metiltransferasas como DNMT3A y DNMT3B, a través de la liberación del factor transcripcional E2F (por la degradación de pRb), ya que en sus secuencias promotoras existen sitios de unión para E2F (Burgers *et al.*, 2007; Mccabe *et al*., 2005). En adenocarcinoma se ha observado hipermetilación en diversos genes como *CADM1*, *CDH1*, *DAPK1*, *EPB41L3*, *FAM19A4*, *MAL*, *PAX1*, *PRDM14* entre otras que se relacionan a adhesión, apoptosis y otros procesos celulares, también se ha observado que secuencias represivas del gen *hTERT* son hipermetiladas (Mersakova *et al.*, 2016).

E6 y E7, además de influenciar cambios a nivel epigenético, son capaces de interaccionar directamente con factores de transcripción para inhibir o activar la expresión génica. Los ejemplos mejor estudiados de estas interacciones son E6-p53 (degradación proteolítica de p53), que subregula la expresión de genes controlados por p53, responsables de diversos procesos como apoptosis, puntos de control del ciclo celular, reparación del DNA, metabolismo y respuesta a diversos tipos de estrés celular; mientras que E7 desestabiliza el complejo pRb/E2F, permitiendo la liberación del factor de transcripción E2F y activando genes relacionados a la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, entre ellos la ciclina A, ciclina E y p73 (Tomaić, 2016). La tabla 2 resume las interacciones de las proteínas E6 y E7 con diversas proteínas celulares y su importancia en la regulación de la expresión génica.

Tabla 2. Interacción de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH con proteínas celulares que regulan la expresión génica a diversos niveles (Lin *et al*., 2010; Mersakova *et al*., 2016; Durzynska *et al*., 2017).

Proteínas que interaccionan con E6 y E7	Regulación a nivel	Descripción
Histonas acetiltransferasas (HATs como p300 y CBP), histonas deacetilasas (HDACs como HDAC1 y HDAC2)	Epigenético	La interacción de las oncoproteínas con estas enzimas afecta su actividad y por el remodelamiento de la cromatina se afecta la expresión de diversos genes por ejemplo IL8 y INF-β
DNA metiltransferasas como DNMT1, DNMT3A y DNMT3B	Epigenético	Inducen la metilación del DNA para la represión de su expresión, por ejemplo *CADM1, CDH1, DAPK1, EPB41L3, FAM19A4, MAL, PAX1, PRDM14,* genes que son hipermetilados en adenocarcinoma
p53, E2F, c-Myc, c-Jun, JunD, JunB, c-Fos, HIF-α, STAT1, STAT5	Transcripcional	Activación o inhibición de la transcripción de diversos genes

c-Myc es otro importante factor transcripcional que juega un importante papel en la diferenciación celular, regulación del crecimiento y apoptosis, se ha observado que E7 induce la expresión de c-Myc por la vía de la liberación de E2F, mientras que E6 tiene la capacidad de unirse a c-Myc para favorecer su unión con Max así inducir la transcripción de *hTERT* (McMurray y McMance, 2003); existe evidencia que E7 también interactúa físicamente con c-Myc permitiendo establecer complejos c-Myc/Max en los promotores de genes que contienen una secuencia de DNA llamada "E-box" permitiendo su activación transcripcional (Wang *et al.*, 2007). Otros factores de transcripción que interactúan con las oncoproteínas son: miembros de la familia AP-1 (proteína activadora 1) como c-Jun, JunD, JunB y c-Fos, HIF-α (factor-1 α inducible de hipoxia), el factor nuclear kappa B (NF_KB), STAT1, STAT5, factores de respuesta a interferón (IRFs), que se relacionan a procesos de inflamación, respuestas inmune antiviral, daño al DNA, entre otros procesos celulares (Chakrabarti, 2003; Songock *et al.*, 2017).

Ambas oncoproteínas a través de la interacción con factores de transcripción como p53, E2F y c-Myc pueden también regular la expresión o inhibición de microRNAs (miRNAs), que a su vez se encuentran regulando la expresión génica a nivel postraduccional; Los miRNAs participan en la regulación de diversos procesos como la apoptosis, diferenciación, crecimiento etc.; algunos miRNAs cuya expresión se altera por la interacción de E6 y E7 con factores de transcripción son: miR-16, miR-25, miR-92a (aumento de expresión) y miR-22, miR-27a, miR-29a y miR-100 (disminución de expresión), la alteración de la expresión de algunos miRNAs correlacionan con la progresión de las lesiones del cérvix, ya que regulan diversos procesos celulares como proliferación, apoptosis (Zheng y Wang, 2011; Durzynska *et al*., 2017).

1.6 Glicosilación y cáncer

En la superficie de las células de mamíferos se encuentran densas capas de glicanos (llamado glicocálix), los cuales funcionan como un punto primario de interacción entre la célula y su medio ambiente, debido a su importancia en las funciones biológicas, los cambios en la glicosilación son frecuentemente asociados a diversas patologías clínicas entre las cuales podemos destacar al cáncer (Dube y Bertozzi, 2005). Una glicosilación aberrante es una característica universal de todos los tipos de cáncer, diversos estudios han demostrado que una glicosilación aberrante está mediando procesos relacionados al cáncer particularmente en los procesos primarios de la tumorigénesis, colonización, metástasis y resistencia a fármacos (Fuster y Esko, 2005; Zhao *et al.*, 2008).

1.6.1 Generalidades de la glicosilación

La glicosilación se define como un proceso enzimático que produce enlaces glicosídicos de sacáridos a otros sacáridos, proteínas o lípidos, este es uno de los principales procesos postraduccionales que sufren las proteínas y lípidos (Moremen, 2012). Los sacáridos que han sido agregados a una proteína o lípido reciben el nombre de glicanos, estas estructuras glicánicas son generadas por la acción específica y ordenada de cientos de enzimas con funciones catalíticas de glicosidasas y glicosiltransferasas (Nairn *et al.*, 2008). Las glicosilación es importante para el correcto plegamiento y localización de las proteínas;

sin embargo, también tiene roles fundamentales en procesos biológicos y eventos de reconocimiento entre los cuales podemos mencionar que las estructuras glicánicas sirven como receptores específicos para microorganismos, toxinas o anticuerpos, modulación de la función de las proteínas de manera dependientes de su estado de glicosilación, participación en el tráfico intra e intercelular, también participan en las interacciones célula-célula o matriz celular-célula (figura 3) (Marchal *et al.*, 2003; Defaus *et al*., 2014).

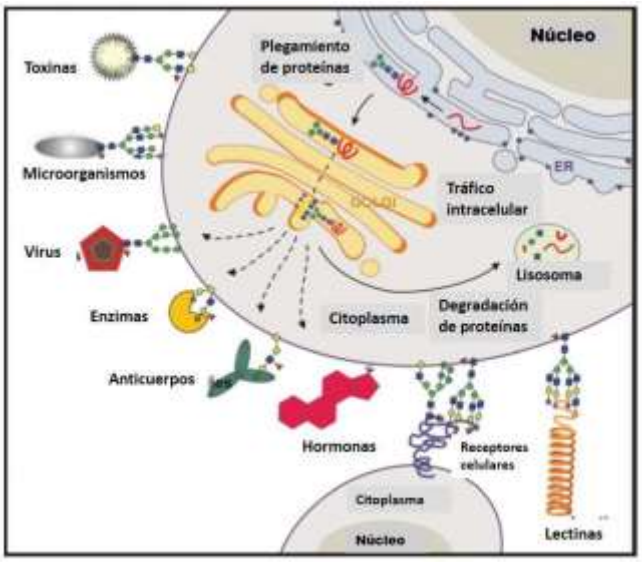


Figura 3. Participación de los glicanos en procesos biológicos. Los glicanos están involucrados en procesos muy variados que incluyen localización y plegamiento de proteínas, comunicaciones celulares y receptores para diversos agentes incluyendo microrganismos (modificado de Defaus *et al.*, 2014).

Existen dos principales tipos de glicosilación de proteínas i) la O-glicosilación, donde un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) es adicionado al grupo hidroxilo de residuos de serina o treonina del polipéptido y posteriormente es elongado por la adición de otros carbohidratos, este tipo de glicosilación ocurre en el aparato de Golgi y es característica en las proteínas llamadas mucinas; ii) la N-glicosilación ocurre en el retículo endoplasmático y consiste en la adición de N-acetilglucosamina (GlcNAc) al grupo amino de residuos de asparagina que se encuentra dentro de una secuencia peptídica consenso (Asn-X-Ser/Thr donde X es cualquier aminoácido excepto prolina), la N-glicosilación puede dar origen a tres tipos de N-glicanos: alta manosa, complejos e híbridos (Dall'Olio, 1996). Existen otros tipos de glicosilaciones como la O-Fucosa, O-Glucosa, O-GlcNAc, O-Xilosa entre otras, son poco frecuentes y ocurren en sitios muy específicos de las proteínas, estas modificaciones

pueden regular la actividad de la proteína (por ejemplo en receptores Notch) (Moloney *et al.*, 2000; Moremen, 2012; Pinho y Reis, 2015).

1.6.2 Alteraciones de la glicosilación en cáncer

Se han propuesto dos mecanismos esenciales de las alteraciones de los glicanos asociados al desarrollo del tumor. Uno de ellos involucra la síntesis incompleta de glicanos y el otro el proceso de neo-síntesis de glicanos (Hakomori y Kannagi, 1983). Los mayores cambios de glicosilación se han observado en los dos tipos de O y N-glicanos, durante los diferentes estadios del desarrollo del tumor, sin embargo, una síntesis incompleta de glicanos, como los antígenos T, Tn, sTn es mayormente observada en los estadios tempranos del cáncer, mientras que la neo-síntesis ocurre ya en etapas avanzadas del cáncer (figura 4), algunos antígenos sintetizados "de novo" son sialil Lewis a/x (sLe^a, sLe^x) (Pinho y Reis, 2015; Stowell *et al.*, 2015).

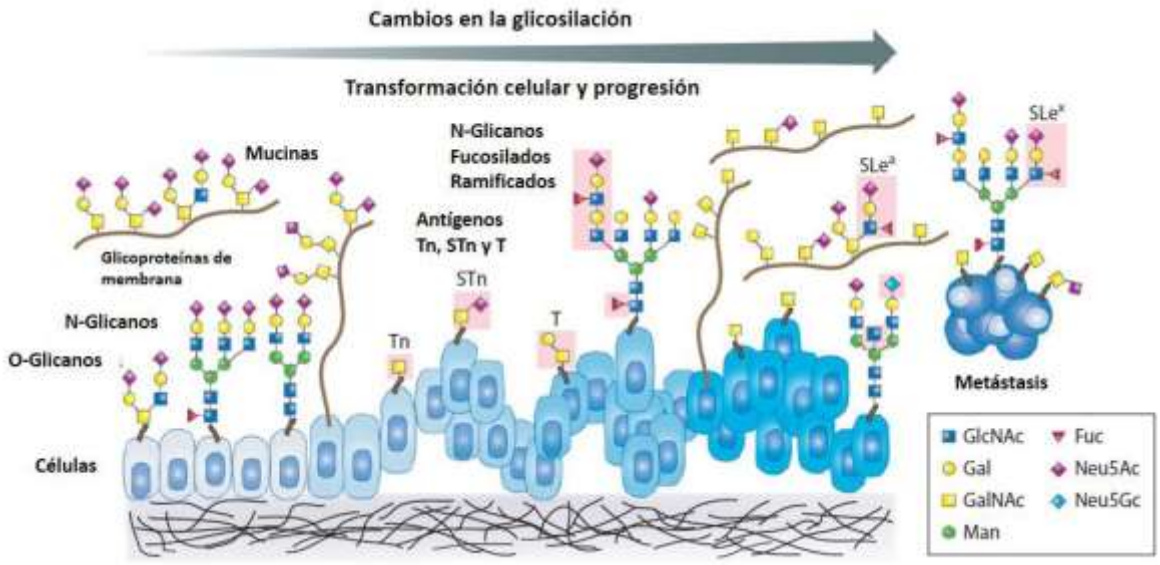


Figura 4. Alteraciones de la expresión de glicanos durante la transformación maligna. En estadios tempranos del cáncer hay expresión de antígenos de cadena corta, mientras que en estadios avanzados hay reexpresión de antígenos sintetizados "de novo" (modificado de Stowell *et al*., 2015).

Los cambios a nivel de glicosilación son amplios, pero se han descrito mayoritariamente O- glicanos de cadena trunca, O y N-glicanos altamente ramificados, altos niveles de sialilación y fucosilación en las cadenas de glicanos. El ácido siálico es un carbohidrato que normalmente es adicionado en las terminaciones de los glicanos, por lo que está directamente relacionado a diversos procesos como la adhesión, reconocimiento y señalización celular. Durante la transformación maligna se ha observado un aumento en la sialilación principalmente en enlaces α2,6 y α2,3 (Kim y Varki, 1997). Algunos antígenos sialilados que se han asociado al cáncer son los sLe^a y sLe^x, su expresión correlaciona con un pobre pronóstico para el paciente debido a su importancia clinica; por ejemplo sLe^x es un ligando para las selectinas, su elevada expresión en células tumorales les permite adherirse al endotelio para posteriormente ser extravasado (Rosen y Bertozzi, 1994), permitiéndole invadir otros tejidos diferentes a donde se originó el tumor.

Las selectinas son una familia de glicoproteínas de adhesión, que se unen a carbohidratos de una manera dependiente de calcio, son proteínas membranales tipo 1, que consiste en un dominio tipo lectina en su extremo amino, un dominio del tipo de factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), seguido de un repetido consenso (2-9 repetidos consenso), una región transmembranal y una pequeña cola citoplasmática. Existen tres miembros de las selectinas tipo E, L y P, se encargan de la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio en el torrente sanguíneo, durante procesos inflamatorios, sin embargo, tanto las selectinas y sus ligandos se han relacionado a procesos cancerígenos como la metástasis (Feng *et al.*, 2017).

Algunos glicanos que son altamente fucosilados como los antígenos $Lewis^{a/b}$ ($Le^{a/b}$) y los $Lewis^{x/y}$ ($Le^{x/y}$) son altamente enriquecidos en la membrana celular durante la transformación maligna (Julien *et al.*, 2011). Se ha observado una alta expresión de antígenos de cadena corta o trunca, esta glicosilación aberrante se produce en la síntesis de los O-glicanos, principalmente en un tipo de proteínas llamadas mucinas (por esta razón también se pude llamar glicosilación tipo mucina), algunos de estos glicanos de cadena trunca son los antígenos T, Tn y sus formas sialiladas, sT y sTn, la expresión de estos

antígenos en cáncer son correlacionados con una baja adhesión celular, aumento del tamaño del tumor, migración, metástasis y un pobre pronóstico para el paciente (Kudelka *et al.*, 2015).

Los cambios en la expresión de glicanos durante la carcinogénesis son asociados a diversos factores como: cambios en la regulación en la expresión de las glicosiltransferasas y glicosidasas a nivel transcripcional o por mecanismos epigenéticos (por ejemplo metilaciones); cambios en la cinética de intercambio sustrato-donador de las enzimas relacionadas a la glicosilación, disponibilidad de azúcares activados (PAPS), cambios en el pH del aparato de Golgi y RE, y la disponibilidad de transportadores de azúcares (Pinho y Reis, 2015; Stowell *et al.*, 2015). Otro factor que afecta la biosíntesis de los glicanos es una mala localización de las glicosiltransferasas, por ejemplo algunos estudios han mostrado que las enzimas que actúan en las etapas tempranas de la O-glicosilación (GalNAc-transferasas), se encuentran localizadas en las cisternas cis y parte media del aparato de Golgi, mientras que las enzimas terminales (sialiltransferasas) se ubican en la cisterna trans del Golgi; en células tumorales la sobreexpresión de la enzima (ST6GalNAc-I) responsable de la síntesis del antígeno sTn, hace que esta enzima se localice en todo el Golgi, terminando la glicosilación prematuramente por la adición de ácido siálico (Sewell *et al.*, 2006).

2. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, las estructuras glicánicas son generadas por la acción de enzimas llamadas glicosiltransferasas, que ensamblan los carbohidratos a las cadenas lineales o ramificadas de los glicanos. Las glicosiltransferasas generan un tipo específico de enlace (alfa o beta) y posición del enlace (α1-3, β1-4), en células de mamíferos existen alrededor de 300 miembros de glicosiltransferasas divididos en 40 familias (Nairn *et al.*, 2008). Estas enzimas reciben su nombre de acuerdo al sacárido que transfieren por ejemplo, las que transfieren ácido siálico son denominadas sialiltransferasas, las que transfieren fucosa son llamadas fucosiltransferasas etc. Los sustratos donadores de los azúcares son: UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-GlcNAc (N-Acetilglucosamina), UDP-GalNAc (N-Acetilgalactosamina), UDP-xilosa, UDP-ácido glucorónico, GDP-manosa, GDP-fucosa y CMP-ácido siálico (Glavey *et al.*, 2015). Otras enzimas que participan en la biosíntesis de los glicanos son las glicosidasas (enzimas que hidrolizan sacáridos) y enzimas que adicionan grupos funcionales a los glicanos como las sulfotransferasas, O-acetiltransferasas, estos grupos funcionales les confieren otro tipo de características a las estructuras glicánicas.

Las alteraciones en la biosíntesis de los glicanos, está influenciado directamente por cambios en la expresión de las enzimas que participan en la glicosilación. En la actualidad existen muchos reportes de alteraciones a nivel de expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas a la glicosilación en diversos tipos de cáncer. Algunos genes que modifican su expresión en cáncer son: miembros de genes de sialiltransferasas *(ST3GAL 1, ST3GAL 2, ST3GAL 3, ST3GAL 4, ST3GAL 6, ST6GALNAC2, ST6GAL 1, ST6GALNAC 2, ST8SIA 1*), miembros de genes de fucosiltransferasas (*FUT 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11*), miembros de genes de N-acetilgalactosaminiltransferasas (*GALNT1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 14*) en diversos tipos de cáncer como mama, ovario, colorectal, hepático y melanoma (revisado en Potapenko *et al.*, 2010; Christiansen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Estas alteraciones se han relacionado con cambios en la glicosilación, que se asocian con funciones relacionadas con células tumorales.

Las estructuras glicánicas, también han sido evaluadas en distintos tipos de cáncer, haciendo uso de diversas herramientas disponibles como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos glicosilados, el uso de lectinas (proteínas que tiene afinidad por diversos carbohidratos unidos en un tipo específico de enlace), el uso de microarreglos de lectinas o ligandos afines a las estructuras glicánicas. La espectrometría de masa y la cromatografía de afinidad han permitido una mejor caracterización de las estructuras glicánicas. Esto ha permitido la identificación de glicanos alterados en diferentes tipos de cáncer (tabla 3) (Christiansen *et al.*, 2014).

Tabla 3. Alteraciones de glicanos en membrana celular en diferentes tipos de cáncer. (A) Aumento en la detección del glicano, (B) disminución en la detección del glicano (revisado en Christiansen *et al*., 2014).

	Tipo de cáncer				
Glicano alterado	**Mama**	**Colorectal**	**Hígado**	**Melanoma**	**Ovario**
Sialil-Lewis A	**A**				**A**
Sialil-Lewis X	**A**	**A**	**A**		**A**
Sialilación α2–3	**A**	**A**		**A**	
Sialilación α2–6	**A**		**A**	**A**	**A**
Core fucosilación	**A**				
Lewis A	**B**				**A**
Lewis B	**A, B**				**A**
Lewis X	**A**	**B**			**A**
Lewis Y	**A**				**A**
T, Tn	**A**	**A, B**			
sTn	**A**	**A**			**A**

Debido a que algunas estructuras glicánicas alteradas en cáncer se asocian con ciertas características del tumor, se han propuesto como blancos para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra éstas o contra las enzimas involucradas en su síntesis. Algunos de los glicanos que se expresan durante la carcinogénesis, han sido propuestos como biomarcadores (glico-biomarcadores) para uso clínico en el diagnóstico, "screening" y monitoreo en diversos tipos de cáncer. Algunos antígenos empleados comúnmente para estos propósitos son: el antígeno especifico prostático (PSA), para el diagnóstico y monitoreo en cáncer de próstata, antígeno Tn en cáncer de mama y colon, antígeno

carcinoembrionario (CEA) para el cáncer colorectal, el antígeno CA15-3 (relacionado a la glicosilación de la Mucina 1) para el monitoreo en cáncer de mama, el antígeno CA125 (relacionado a la Mucina 16), para monitoreo en cáncer de ovario (Pinho y Reis, 2015; Stowell *et al.,* 2015). Sin embargo, aún tienen algunas limitaciones para su uso, algunos de ellos por la baja sensibilidad de detección, pero con el avance tecnológico se espera mejorar la sensibilidad y especificidad de los marcadores.

A pesar de la importancia de la glicosilación en los procesos de carcinogénesis en el caso del cáncer cervical, los estudios llevados a cabo sobre las alteraciones en la biosíntesis de glicanos y de las enzimas relacionadas son limitados, a continuación, se describen algunas alteraciones de glicogenes y estructuras glicánicas en CaCu.

Se han observado aumento en los niveles de RNAm de los genes que codifican para las enzimas ST6Gal I, ST3Gal III y ST3Gal IV en lesiones premalignas y CaCu (Wang *et al.*, 2001, 2002; López-Morales *et al.*, 2009). Como se ha mencionado anteriormente aumento en la expresión de sialiltransferasas, se relaciona con un aumento en la presencia de antígenos sialilados en la membrana celular, por ejemplo, sLe^x, confiriéndole al tumor la capacidad de migrar a otros tejidos. Otros genes que se han reportado con sobre expresión en CaCu son *B4GALT3* y *GALNT7,* su sobre expresión se ha relacionado con migración e invasión celular (Peng *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016). En un análisis de búsqueda de genes asociados a un fenotipo metastásico en muestras de CaCu, se reportó una diminución de los genes *HYALI* (hialuronglucosaminidasa I) y *DDOST* (dolicol-difosfo-oligosacárido-proteinglicosiltransferasa), lo que nos sugiere que la baja expresión de estos genes podría estar participando en el desarrollo de la capacidad metastásica (Lyng *et al.*, 2006).

Otros estudios relacionados con cambios en la expresión de glicogenes en CaCu, han reportado un aumento en la metilación de genes de sialiltransferasas, (*ST6GAL2*, *ST8SIA3*, *ST8SIA4)* y de la familia de las N-acetilgalactosaminiltransferasas (*GALNT9*, *GALNT13*, *GALNTL6)*, lo que se relaciona con bajos niveles de expresión (Chen *et al.*, 2014; Vojta *et al.*, 2016).

También se han realizado estudios sobre la expresión de estructuras glicánicas en CaCu, usando diversas metodologías para la detección de los epítopes glicosilados (lectinas y anticuerpos). Diversos estudios han reportado la expresión de glicanos de cadena corta como los antígenos T, Tn y sTn; su expresión en cáncer cervical se ha correlacionado con la permeabilización vascular y metástasis a nodo linfático (Hirao *et al.*, 1993; Hamada *et al*., 1993; Numa *et al.*, 1995; Terasawa *et al.*, 1996). En carcinoma cervical invasivo se ha observado un aumento en la expresión del antígeno Le^y, mientras que en esa misma condición se pierde la expresión de los antígenos Le^x y Le^a, lo que sugiere que con la evolución de las lesiones precancerosas existe pérdida de antígenos de grupos sanguíneos (Moro-rodríguez y Álvarez-fernández, 2008). Respecto a la evolución de las lesiones cervicales durante el desarrollo de cáncer se ha reportado que con el avance de las lesiones premalignas hay aumento en la expresión de ácido siálico en enlaces α2,3 y α2,6 (López-Morales *et al.*, 2010). Velázquez-Márquez (2012), reportó un incremento del antígeno sLe^x en raspados cervicales, el aumento de la expresión de este antígeno se relaciona con el grado de la lesión intraepitelial escamosa.

A la fecha en el grupo de trabajo de biología molecular del CIBIOR se ha interesado en evaluar las alteraciones a nivel de glicosilación relacionadas con el cáncer cervical. Como se ha descrito la alta expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de VPHs de alto riesgo, guía a la transformación maligna del cérvix, es por esa razón que diversos estudios se han realizado para evaluar la participación de E6 y E7 en las alteraciones a nivel de la glicosilación. Algunos hallazgos importantes obtenidos en el grupo de trabajo han descrito que en presencia de E6, aumenta la expresión del antígeno sLe^x (Velázquez-Márquez, 2009). Rivera Juárez (2013), evaluó la actividad del promotor B3 del gen de la ST3Gal IV (cataliza la adición de ácido siálico en enlace α2,3), que es responsable en la síntesis del antígeno sLe^x. Los resultados obtenidos mostraron que E6 es capaz de incrementar la actividad del promotor, sin embargo, en presencia de E7, no hubo cambio alguno. Estos resultados nos sugieren que E6 podría modificar la expresión del gen *ST3GAL4* y por lo tanto en la biosíntesis de estructuras glicánicas.

Por otro lado, en un ensayo de microarreglos de expresión de 10K (10 mil genes del genoma humano) se comparó el cambio de expresión de genes en muestras de cáncer de cérvix comparado con respecto a tejido cervical sano (Morán Cruz, 2014). El perfil de expresión de genes de sialiltransferasas, obtenido después del análisis del microarreglo, muestra un aumento en la expresión de los genes *ST6GAL1*, *ST3GAL3*, *ST3GAL5* y *ST6GALNAC4* en las muestras de cáncer, mientras que el gen *ST6GALNAC2* disminuye su expresión.

Los antecedentes obtenidos en el grupo de trabajo muestran que existen cambios a nivel de la glicosilación durante la transformación maligna del cérvix, y que estos cambios ocurren en etapas previas al cáncer. Considerando que el agente etiológico del CaCu es la infección con ciertos genotipos de VPH, y que las oncoproteínas E6 y E7, son las responsables de la transformación celular, ha surgido el interés por conocer el papel que estas proteínas ejercen a nivel de la glicosilación.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de cérvix ocupa el segundo lugar como causa de muerte por cáncer en la mujer mexicana. El principal agente etiológico de este tipo de cáncer es el VPH, el genoma de estos virus se ha identificado en más del 99 % de los tumores malignos de cérvix. El VPH18 ocupa el segundo lugar en prevalencia en los tumores de origen escamoso, sin embargo, ocupa el primer lugar en adenocarcinoma de cérvix (originado en células glandulares), un tipo de cáncer más agresivo por su mayor capacidad de metástasis.

Durante la infección persistente con el VPH18, el aumento en la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, son clave para la transformación maligna del cérvix. E6 y E7 pueden interaccionar con diversas proteínas hospederas alterando diversas funciones celulares. Las investigaciones aún siguen describiendo más blancos de interacción de estas oncoproteínas.

En CaCu, poco se ha investigado acerca de los cambios en la síntesis de estructuras glicánicas y de las alteraciones en la expresión de genes que codifican para las enzimas que participan en la glicosilación; por esta razón, este estudio estuvo dirigido a evaluar qué papel juegan los oncoproteínas E6 y E7 del VPH18 en la expresión de glicogenes en células derivadas de adenocarcinoma cervical. Los hallazgos de este estudio nos permitirán conocer que vías de la glicosilación podrían ser afectadas por la expresión de E6 y E7, sentando las bases para estudios futuros enfocados a la identificación de biomarcadores para el diagnóstico oportuno del CaCu y/o como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la transformación maligna del cérvix, ocurren cambios a nivel de la glicosilación que se asocian con el grado de neoplasia. La infección persistente con VPH de alto riesgo es el principal factor asociado al desarrollo del CaCu, por la expresión de dos proteínas con alto potencial oncogénico E6 y E7. Estas oncoproteínas virales, interaccionan con diversas proteínas celulares del hospedero como factores de transcripción o proteínas que se encargan del mantenimiento de la cromatina, induciendo cambios globales en la expresión génica. Debido a estas interacciones E6 y E7, podrían estar jugando un papel importante en los cambios a nivel de la glicosilación.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación.

¿Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 18 son capaces de modificar la expresión de genes que codifican enzimas que participan en la glicosilación?

5. HIPÓTESIS

Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 18 modifican la expresión de genes involucrados en la glicosilación.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH18 en la línea celular de cérvix HeLa sobre la expresión de glicanos y genes de la glicosilación

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Seleccionar y caracterizar clonas silenciadas en los oncogenes *E6* y *E7* en la línea celular HeLa

6.2.2 Identificar glicogenes que modifican su expresión por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18 en la línea celular de cérvix HeLa

6.2.3 Cuantificar el RNAm de genes relacionados con la glicosilación que modifican su expresión por efecto del silenciamiento de E6 y E7 del VPH18

6.2.4 Establecer redes de interacción de los glicogenes con expresión diferencial para la identificación de posibles vías de glicosilación alteradas

6.2.5 Analizar los cambios en la expresión de glicanos por efecto del silenciamiento de E6 y E7 del VPH18

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico y condiciones de cultivo.

La línea celular HeLa fue utilizada en este estudio, esta línea proviene de un adenocarcinoma de cérvix y se caracterizan por tener integrado en el genoma alrededor de 10 copias del genoma del virus del papiloma humano tipo 18 (VPH18). En la línea celular HeLa las oncoproteínas E6 y E7 se expresan sin ningún tipo de regulación, debido a que se ve alterado el marco de lectura del principal regulador viral (el factor de transcripción viral E2). Se decidió trabajar sobre la línea celular HeLa por la importancia que ha adquirido a nivel clínico el VPH18 (desarrollo de adenocarcioma cervical).

Esta línea celular se cultivó en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium con sales de Earle y L-glutamina) enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, penicilina 100 u/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera de CO_2 al 5 % y a una temperatura de 37 °C, en botellas de cultivo celular de 25 cm^2 de superficie.

Una vez que los cultivos llegaban a confluencia (cobertura total del área de cultivo por las células), fueron lavadas dos veces con buffer de fosfatos (PBS, NaCl 130 mM, KCl 3 mM, Na_2PO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.5 mM) estéril y divididas por tripsinización (tripsina-solución Hanks).

7.2 Silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 del VPH18

Para el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo del grupo de inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, dirigido por los doctores Aguilar-Lemarroy A y Jave-Suárez L, quienes nos proporcionaron un "pool" de la línea celular HeLa, que fue transfectada de manera estable con short hairpin RNAs (shRNAs), que codifican para RNAs de interferencia (RNAi), dirigidos contra el RNAm bicistrónico que codifica para las oncoproteínas E6 y E7 y un RNAi como control que no va a reconocer ningún RNAm viral ni hospedero.

El silenciamiento se realizó clonando los shRNA dentro del vector pLVX-shRNA1 (Clontech Laboratories), los RNAi utilizados fueron reportados previamente por Qi *et al.*,

2010, para el control (5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3') y por Butz *et al.*, 2003, (5'-CTAACACTGGGTTATACAA-3') que es complementario a los nucleótidos 385–403 (región codificante de E6) del RNAm bicistrónico que codifica para E6 y E7, el efecto inhibitorio afecta a todo el RNAm bicistrónico codificante para las E6 y E7 (Butz *et al.*, 2003). Este RNAm bicistrónico puede sufrir procesos de splicing afectando el marco de lectura abierto de E6, generando tres tipos de transcritos; los de tipo 1 que van a codificar una proteína completa y con las funciones previamente descritas, los transcritos de tipo 2 y 3, generan proteínas truncadas llamadas E6* sin actividades comprobadas. Los nucleótidos que reconoce el RNAi solo están presentes en los transcritos de tipo 1, inhibiendo solo la expresión de la proteína E6 completa, que participa en las actividades transformantes en cáncer; mientras que los transcritos de tipo 2 y 3 no se ven afectados por este RNAi, ya que durante el *splicing* los nucleótidos que son complementarios al RNAi se eliminan (Butz *et al.*, 2003).

La obtención de partículas lentivirales se realizó utilizando el sistema Lenti-X™ Lentiviral Expression Systems (Clontech Laboratories), brevemente, se cultivaron células Lenti-X 293T, posteriormente fueron cotransfectados los plásmidos de interés (pLVX-shControl o pLVX-shE6/E7) y Lenti-X HTX Packaging Mix, la transfección se realizó con lipofectamina.

Las partículas virales fueron recuperadas del sobrenadante, después fueron purificadas con un filtro de 0.45 µm, posteriormente se verificó la presencia de partículas virales en el medio recuperado usando el kit LentiX-Gostik (Clontech Laboratories). La transducción del cultivo celular HeLa se realizó con 500 µl del filtrado con lentivirus que contenían el vector pLVX-shControl o pLVX-shE6/E7. La selección de células correctamente transducidas se realizó por la resistencia a puromicina (1 µg/µl), manteniendo durante una semana la selección.

7.2.1 Selección clonal

La selección de clonas silenciadas fue realizada en el CIBIOR. Una vez que los cultivos que se mantuvieron en selección con el antibiótico, alcanzaron una confluencia del 60%, fueron lavados con PBS y tripsinizados. Se realizó un conteo con cámara de Neubauer,

posteriormente se prepararon diluciones para la obtención de cultivos monoclonales para seleccionar la clona que tuviera un mejor grado de silenciamiento de E6 y E7.

7.3 Evaluación de la viabilidad celular

Diferentes cultivos monoclonales de las líneas celulares silenciadas y controles fueron evaluados para verificar si había afectaciones a nivel de proliferación y viabilidad celular, esto se realizó por dos metodologías.

7.3.1 Ensayo de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Las células que se mantuvieron creciendo en botellas de 25 cm^2 de superficie, fueron despegadas con tripsina, posteriormente se resuspendieron en un mL de PBS, se homogenizaron y fueron contadas con cámara de Neubauer. Se sembraron cinco mil células por pozo de los diferentes cultivos monoclonales, en placas de 96 pozos, mientras que se tomaron 4 tiempos para realizar el ensayo, los cuales fueron a las 0, 24, 48 y 72 h, para el tiempo 0 los cultivos fueron incubados durante 4 h, tiempo suficiente para esperar su adherencia a la superficie de la placa.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se dieron 2 lavados con PBS, evitando despegar las células, posteriormente se adicionaron 50 µL de MTT (0.2 mg/mL) y se incubó durante 4 h a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5 %. Transcurrido ese tiempo se adicionaron a cada pozo, sin retirar el MTT, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), la placa se mantuvo en agitación durante 15 min o hasta disolver completamente los cristales de formazán. Posteriormente se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 570 nm. Las lecturas de las absorbancias fueron graficadas con los 4 tiempos que fueron analizados.

7.3.2 Ensayo de cristal violeta

En placas de 96 pozos, se sembraron cinco mil células de los diferentes cultivos celulares, también se evaluaron a cuatro diferentes tiempos de incubación (0, 24, 48 y 72 h), para el tiempo 0, la placa fue incubada a 37 °C con atmósfera de CO_2 al 5 %, durante 4 h

para esperar su adhesión a la superficie de la placa. Transcurrido ese tiempo, se les retiró el medio y se dieron 2 ligeros lavados (evitando despegar las células) con PBS.

Las células fueron fijadas durante 10 min a temperatura ambiente, con una solución que contenía ácido acético al 10 %, metanol al 10 %, agua 80 %, transcurrido ese tiempo, se retiró la solución para fijar y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente las células se tiñeron con una solución de cristal violeta (al 0.2 %), durante 20 min, al término de ese tiempo, se recuperó el cristal violeta y se realizaron varios lavados con agua destilada. Una vez que se secaron completamente los pozos, las colonias celulares fueron solubilizadas con 200 µL ácido acético al 30 %. Para la lectura de la absorbancia se transfirieron 100 µL de las muestras solubilizadas y se leyeron a 540 nm, utilizando como blanco la solución de ácido acético al 30 %. Las lecturas de las absorbancias fueron graficadas con los 4 tiempos que fueron analizados.

7.4 Evaluación del silenciamiento de E6 y E7 del VPH18

7.4.1 Extracción de RNA total para la cuantificación de los transcritos de E6 y E7 del VPH18

Diferentes cultivos monoclonales de las líneas silenciadas, controles y parental, que se mantuvieron en crecimiento en botellas de 25 cm^2, cuando tuvieron una confluencia de 80 % fueron tripsinizadas. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 5 000 RPM a 4 °C durante 5 min.

El RNA total fue extraído de las pastillas celulares usando el NucleoSpinII RNA kit (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del material extraído fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y revelado con bromuro de etidio, mientras que la concentración se determinó por espectrofotometría con el equipo NanoPhotometer P-Class P 360 (Implen, CA, USA).

El RNA extraído fue sometido a una digestión con DNAsa (Fermentas) de 30 a 60 min dependiendo de la presencia de DNA genómico, transcurrido ese tiempo, la DNAsa fue inactivada adicionando 1 µl de EDTA a las muestras e incubándolas a 65 °C durante 10 min. Nuevamente la integridad fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Mientras que para verificar que el RNA ya se encontraba libre de DNA genómico, se realizó un PCR de punto final amplificando un gen "Housekeeping" (*GAPDH*), los productos de esta PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1 %, cuando notamos ausencia de bandas correspondientes a la amplificación del gen "Housekeeping", se procedió a realizar la síntesis del DNA complementario; en caso de tener amplificados las muestras se sometieron nuevamente a una digestión con DNAsa.

El DNA complementario fue sintetizado, a partir de 500 ng de RNA extraído usando el RevertAid First-Strand cDNA Synthesis kit (cat no. K1621; Thermo Fisher Scientific) utilizando random primers y siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.4.2 qRT-PCR para la cuantificación de los transcritos de E6 y E7 del VPH18

Los transcritos de E6 y E7 del VPH18 fueron evaluados por qRT-PCR, en una cuantificación relativa que "es la comparación cuantitativa del ácido nucleico blanco con respecto a una muestra de referencia o calibrador", los resultados se van a expresar como un cambio en el número de veces que un RNAm se expresa en una muestra con respecto al calibrador. El calibrador por definición siempre tiene un valor de 1 o del 100 % y el cambio puede ser positivo o negativo al ser comparado con este.

Para la cuantificación relativa se utilizó el método del ΔΔCt, el cual requiere el uso de un gen de expresión constitutiva (Housekeeping), que sea expresado constantemente en las condiciones experimentales que se estén analizando. Para este método de cuantificación lo primero fue construir una curva de rango dinámico para el gen problema (blanco) y el gen endógeno para obtener la ΔCt (Ct gen blanco – Ct gen endógeno), para cada una de las concentraciones de RNA probadas. La ΔCt fue graficada contra el logaritmo de cada concentración, el gráfico debe tener una pendiente menor o igual a 0.1, entrando en ese rango, el uso de nuestro gen endógeno contra nuestros genes blancos fue validado (lo que nos indica que a las concentraciones probadas para ambos genes pueden ser comparables) para su uso en la cuantificación.

7.4.2.1 Construcción de una curva de rango dinámico para la validación del gen endógeno

La validación se realizó a través de la construcción de curvas de rango dinámico en los genes de interés y a través de la pendiente obtenida, se calculó la eficiencia de amplificación, la cual debe ser cercana al 100 % y ser similar en los genes problema y endógeno.

El rango dinámico que utilizamos fue establecido evaluando las siguientes concentraciones 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl de RNA total, mientras que el gen endógeno que utilizamos para la validación contra E6 y E7 fue *HPRT* (Hipoxanthina Fosforibosiltransferasa 1). La mezcla de reacción se preparó con 5 µl de Sybeer Gren (Thermo Fisher Scientific cat no. K0221), 0.5 µl de cada par de oligonucleótidos específicos (100 mM), 1 µl cDNA (ajustando a las concentraciones finales para la validación) y se llevó la reacción a un volumen final de 10 µl. Las condiciones de amplificación del qRT-PCR fueron temperatura inicial de 95 °C seguida de 40 ciclos a 95 °C por 30 seg y 60 °C durante 30 seg, utilizando el equipo Step One™ (Life Technologies). Los oligonucleótidos específicos y sus características utilizados para la cuantificación se encuentran en la tabla 4.

7.4.2.2 Cuantificación de los transcritos de E6 y E7 del VPH18

La cuantificación relativa de los transcritos de E6 y E7 de diferentes muestras de RNA total de las líneas silenciadas y controles, se realizaron con una concentración final de 0.1 ng/µl de RNA. Las condiciones de qRT-PCR se realizaron de manera similar a las utilizadas en la validación. El análisis de la cuantificación relativa de E6 y E7 se realizó obteniendo la ΔCt de cada muestra, posteriormente para el cálculo de la ΔΔCt, se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra de referencia})$$

Se utilizó como muestra calibradora (muestra usada como base o referencia para los cálculos), la ΔCt de HeLa parental. Una vez que fue calculada la ΔΔCt se aplicó la siguiente fórmula $\mathbf{2}^{-\Delta\Delta Ct}$, graficando los resultados.

7.5 Evaluación del silenciamiento por western blot

La eficiencia del silenciamiento de los transcritos de *E6* y *E7* del VPH18 en la línea celular HeLa, fue evaluada a nivel de proteínas de E7 y p53 ya que con esta se evaluó indirectamente el silenciamiento de E6, al ser uno de los blancos principales de degradación de esta oncoproteína.

7.5.1 Extracción de proteínas

A partir de cultivos monoclonales que fueron seleccionados a través del análisis de cuantificación relativa de E6 y E7, fueron cultivados en botellas p75, cuando estos alcanzaron una confluencia del 90 %, fueron tripsinizados recuperando las células por centrifugación a 5 000 RPM a 4 °C durante 5 min. Posteriormente la pastilla celular se resuspendió en 500 µl de PBS, adicionando 5 µl de inhibidor de proteasas (GE), manteniéndolas en hielo a partir de este momento. La extracción de proteínas se realizó por lisis mecánica, haciendo pasar el resuspendido celular por jeringas de 25G y 27G varias veces, posterior a la lisis de la suspensión celular se centrifugó a 5 000 RPM a 4 °C durante 10 min recuperando el sobrenadante.

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó utilizando el kit “DC protein Assay” (BIO-RAD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método consiste en preparar una curva de estándar de concentraciones conocidas de albumina, obteniendo la ecuación de la curva (Y = MX + B) y despejando X para conocer la concentración de nuestras muestras problema, solo se tomaron como válidas curvas estándar cercanas a una R^2 de 0.99.

7.5.2 Electroforesis (SDS-PAGE)

Para la identificación de p53 (proteína blanco de E6 que usamos para medir indirectamente el silenciamiento de E6) se usaron 70 µg de proteína, mientras que para la proteína E7 se usaron 50 µg. Las muestras fueron llevadas a ebullición durante cinco minutos con amortiguador de muestra 4X (40 % glicerol, 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 8 % SDS, 0.04 % azul de bromofenol, 5 % β-mercaptoetanol) transcurrido el tiempo se pusieron en hielo. Posteriormente se cargaron en pozos de un gel de poliacrilamida (28 g acrilamida, 2

g bis acrilamida) al 15 %, la electroforesis corrió (buffer de corrida Tris-base 7.5 g, glicina 36 g, SDS 2.5 g) a 60 V durante los primeros 15 min y después se aumentó el voltaje a 100 V hasta que el frente de corrimiento llego al extremo del gel.

Al término de la electroforesis, el gel fue depositado en solución amortiguadora de transferencia durante 10 min, mientras se activaban membranas PVDF (Millipore) haciéndolas pasar por metanol y posteriormente por agua destilada estéril. Una vez activadas se realizó una transferencia húmeda (buffer de transferencia Tris-base 3.1 g, glicina 14.2 g, SDS 0.6 g, metanol 200 ml, pH 8.2), durante 1 hora a 100 V, transcurrido ese tiempo las membranas se retiraron del gel y se sometieron a un bloqueo con PBS-T (5 % de leche-PBS-tween 20 al 0.3 %) durante 3 horas. Al término del boqueo se adicionaron los anticuerpos primarios anti p53 (dilución 1:1000; Abcam cat ab1101), anti E7 (DO 1:1000; Abcam cat ab100953), anti β-actina, usado como control (DO 1:3000; Abcam cat ab8224), los anticuerpos fueron diluidos en solución de bloqueo y las membranas que contenían las muestras fueron incubados a 4 °C toda la noche en movimiento.

Al día siguiente las membranas fueron lavadas con PBS-T (Tris-base 20 mM, NaCl 0.15 M, 300 µl tween 20), tres veces durante 10 min por lavado, posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario, anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:4000; Abcam cat ab97046), incubándolo por dos horas a temperatura ambiente en movimiento. Al término de la incubación se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron tres lavados a las membranas con PBS-T. Las señales fueron detectadas usando ImmPACT™ DAB peroxidase sustrate (Vector cat SK-4105).

Los experimentos se realizaron por triplicado, las membranas fueron sometidas a un análisis densitométrico utilizando el software ImageJ, graficando los resultados obtenidos.

7.6 Microarreglos de expresión de línea silenciada contra línea control

La tecnología de los microarreglos ha permitido el análisis múltiple de genes de acuerdo a una muestra problema y un control. El uso de esta tecnología en cáncer ha

permitido el estudio de genes expresados diferencialmente y que se relacionan a los procesos de carcinogénesis (adhesión, angiogénesis, proliferación).

Este ensayo se basa en la comparación de las intensidades de fluorescencia de RNA total de dos muestras biológicas, marcadas con diferente fluoróforo y así poder saber de acuerdo a esta intensidad cuales genes aumentan o disminuyen de expresión. La cantidad mínima necesaria para llevarlo a cabo es de 10 µg de RNA total y esta tiene que estar libre de sales, sin degradación u otros posibles inhibidores del ensayo.

7.6.1 Preparación de la muestra

Se extrajo RNA total utilizando el Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research) de la línea celular con un mejor grado de silenciamiento y un control (HeLa shRNAE6/E7 y HeLa shControl), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se precipitaron alrededor de 30 µg de RNA total de cada línea celular con acetato de sodio 3M a pH 5.2 (1/10 volúmenes) y 2.5 volúmenes de etanol puro frio, fue homogenizado con vórtex y se almacenó a -70 °C, durante toda la noche. Al día siguiente fueron centrifugados a 13 000 RPM a temperatura ambiente y fueron transportados a 4 °C.

Los microarreglos de expresión se realizaron en la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Jorge Ramírez y la colaboración técnica de Lorena Chávez González, Simón Guzmán León y José Luis Santillán Torres. En este trabajo se utilizó un chip del genoma humano completo (35K), los oligonucleótidos que fueron hibridados en esta laminilla corresponden a la librería de Human 70-mer oligo de OPERON (http://omad.operon.com/).

La preparación de la prueba y la hibridación de los microarreglos se realizó de la siguiente manera: 10 µg de RNA total fueron usados para la síntesis del DNAc, incorporando dUTP-Alexa555 (línea silenciada) o dUTP-Alexa647 (línea control), utilizando el First-Strand cDNA labeling kit (Invitrogen). La incorporación de los fluoróforos fue verificada midiendo la absorbancia de 555 nm para Alexa555 y 650 nm para Alexa647. Cantidades iguales de

DNAc marcado fueron hibridadas usando la solución de hibridización, UniHyb (TeleChem International INC). Las laminillas fueron incubadas durante 14 horas a 42 °C, transcurrido ese tiempo fue lavada 3 veces con 1X SCC, 0.05 % SDS a temperatura ambiente.

7.6.2 Adquisición de datos y análisis de las imágenes de los microarreglos

La adquisición y cuantificación de las imágenes obtenidas de las laminillas de los arreglos fueron realizadas con un sistema de lectura de laser confocal ScanArray 4000, el cual es acompañado del software ScanArray 4000 Packard BioChips. Todas las imágenes fueron capturadas usando un 65 % de adquisición del PTM (tubo fotomultiplicador), un poder de laser entre 70 a 75 % y una resolución de 10 µm a 50 % de la velocidad de escaneo. Para cada spot de Alexa555 y Alexa647 se calculó el valor medio de la densidad y el valor medio del fondo (background), los cuales fueron realizados con el software ArrayPro Analyzer de Media Cibernetics.

Los datos de los microarreglos fueron realizados con el software genArise, desarrollado por la unidad de computación del Instituto de fisiología celular de la UNAM (http://www.ifc.unam.mx/genarise/), bajo la asesoría técnica de Gerardo Coello, Gustavo Corral y Ana Patricia Gómez. El genArise lleva a cabo una serie de transformaciones: "background correction", "lowess normalization", "intensity filter", replica los análisis y selecciona genes expresados diferencialmente. La meta del genArise es identificar cuál de los genes muestra una buena evidencia de ser expresado diferencialmente. Este software identifica los genes expresados diferencialmente por el cálculo de la intensidad media dependiente del Z-score. Usando un algoritmo para calcular la media y la desviación estándar de cada dato y define un Z-score, donde Z se refiere al número de desviaciones estándar de un dato de la media general.

$$\mathbf{Z_i = (R_i - mean(R)) / sd(R)}$$

Donde z_i es el z-score para cada elemento, R_i es el log-ratio para cada elemento, y sd(R) es la desviación estándar del log-ratio. Bajo ese criterio, los elementos con un Z-score > 2 de desviaciones estándar, serían los genes significativamente expresados diferencialmente.

7.7 Cuantificación de los transcritos de glicogenes por qRT-PCR

Para la cuantificación de los glicogenes se realizó con el método de expresión relativa ΔΔCt, se estableció un rango dinámico (concentraciones 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl), para la validación del método usando como gen endógeno a *HPRT*. La mezcla de reacción se preparó con 5 µl de Sybeer Gren (Thermo Fisher Scientific cat no. K0221), 0.5 µl de cada par de oligonucleótidos específicos (100mM), 1 µl cDNA (ajustando a las concentraciones finales para la validación) y se llevó la reacción a un volumen final de 10 µl. Las condiciones del qRT-PCR fueron temperatura inicial de 95 °C seguida de 40 ciclos a 95 °C por 30 seg y 60 °C durante 30 seg, utilizando el equipo Step One™ (Life Technologies). La concentración final usada para la cuantificación relativa de los glicogenes fue de 0.1 ng/µl, los oligonucleótidos utilizados y sus características para la cuantificación, se encuentran descritas en la tabla 4.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para las cuantificaciones relativas de diversos genes en este estudio.

Gen		Oligonucleótidos 5´- 3´	Tm	Producto
E6 VPH18	Forward	GCGACCCTACAAGCTACCTGAT	64	295 pb
	Reverse	GCACCGCAGGCACCTTAT		
E7 VPH18	Forward	TGTCACGAGCAATTAAGCGACT	60	215 pb
	Reverse	CACACAAAGGACAGGGTGTTC		
HPRT	Forward	CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT	60	130 pb
	Reverse	CGAGCAAGACGTTCAGTCCTGTC		
GAPDH	Forward	CACTGCCACCCAGAAGACTGTG	60	450 pb
	Reverse	TGTAGGCCATGAGGTCCACCA		
POFUT1	Forward	CAGCCCAGTTCCCCGTCCTA	59	190 pb
	Reverse	GAGCCTGCAGTCCCGTCCTTC		
XXYLT1	Forward	GTGCTGGCTTGGGAACCTACTA	55	230 pb
	Reverse	GCGGAACTGCCAGAATGTGT		
UGT8	Forward	AAACCAGCCAGCCCACTACCAG	59	93 pb
	Reverse	GACACCAGCTCCAAAAGACACCAA		
DPY19L1	Forward	GAGAGTGTACCCGTGTAATGTG	62	134 pb
	Reverse	GAGTGCAATCAAGCTTCCTCTA		
PIGV	Forward	CCTGGGCAACTTGGACATA	56	95 pb
	Reverse	GGGCTTCTCTAGGGTCTTATTG		

ALG14	Forward	CCGGGAGTCTCTCAGTATCTT	57	100 pb
	Reverse	TCTAGGTGAGTAGGCATTGGA		
GALNT1	Forward	GGATAAAGCCACAGAAGAGGATAG	56	94 pb
	Reverse	CAGGGTGACGTTTCGAAGAA		

7.8 Análisis de expresión de glicanos en superficie celular

7.8.1 Citoquímicas

Los cultivos celulares de las líneas celulares parental, silenciada y control, que se mantenían creciendo en botellas de 25 cm^2 de superficie, fueron despegadas con tripsina, posteriormente fueron resuspendidas en un ml de PBS, se homogenizaron y fueron contadas con cámara de Neubauer. Posteriormente se realizaron diluciones para sembrar 50 mil células por pozo de cada línea en placas de 24 pozos (que previamente se le ha depositado un cubreobjetos de 1 mm^2 aproximadamente, completamente desinfectado). Una vez que fueron sembradas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5 %.

Transcurrido ese tiempo se sacaron las placas (con un 60 % de confluencia aproximadamente), se les retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente las células fueron fijadas con 500 µl de paraformaldehído al 2 %, durante 10 min, después se retiró el paraformaldehído y se realizaron 3 lavados con solución amortiguadora TN-TrisHCL (500 µl por pozo). Se realizó un bloqueo con el "Casein Vector kit" (Vector Labs), siguiendo las instrucciones del fabricante, durante 40 min en cámara húmeda, asegurando que todas las células son cubiertas por la solución de bloqueo.

Una vez que las células fueron bloqueadas, se les retiró el exceso de caseína y se adicionaron las lectinas biotiniladas (0.2 µg/ml en cada pozo), se incubaron en cámara húmeda durante 60 min, posteriormente se realizaron tres lavados con TN-TrisHCL. Se preparó una solución de ficoeritrina-estreptavidina en una dilución de 1:100 en PBS y se adicionó a cada pozo cuidando que todas las células quedaran cubiertas con la solución y que no tuvieran contacto directo con la luz, se incubó en cámara húmeda durante 20 min.

Transcurrida esta incubación se lavaron 3 veces con TN-TrisHCL, posteriormente se hizo una contratinción de los núcleos con el colorante fluorescente Hoesch (dilución 1:1000 en PBS) y se incubó en cámara húmeda durante 20 min y protegido de la luz.

Al término de la contratinción los pozos se lavaron 2 veces con PBS, posteriormente se retiró el cubreobjetos de cada uno de los pozos y se montaron con pinzas limpias en un portaobjetos completamente limpio, evitando la deshidratación de las células y manteniéndolas sin tener contacto con la luz, posteriormente se sellaron con barniz de uñas incoloro.

Las laminillas fueron visualizadas en el microscopio de fluorescencia (marca Zeiss), tomando alrededor de cinco fotografías por campo de cada laminilla. La intensidad media de fluorescencia fue medida en cada fotografía usando el softwate ZEN blue 2. El valor neto de la intensidad media de fluorescencia se obtuvo restando la intensidad media de 2 controles, el primer control negativo (autofluorescencia) que no contenía lectina, ni ficoeritrina (para descartar la autofluorescencia que pueden emitir las células por sí mismas) y el segundo control, el de inespecificidad (solo contenía la ficoeritrina), que nos permitió eliminar valores de fluorescencia por el reconocimiento inespecífico del segundo componente.

7.9 Análisis bioinformáticos

7.9.1 Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con expresión alterada

Para estudios funcionales de larga escala o datos de transcriptómica como microarreglos y/o secuenciación masiva, una herramienta comúnmente usada es el Gen Ontology (GO). Los genes que se vieron alterados en su expresión por el silenciamiento parcial de E6 y E7 del VPH18, fueron sometidos a un análisis de clasificación funcional, este análisis se realizó utilizando el software Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (“DAVID”, http://david.abcc.ncifcrf.gov/) disponible en línea.

El primer paso para realizar este análisis fue subir o cargar una lista de genes (los genes con expresión alterada). La lista de genes se sometió copiando los genes alterados de

nuestra base de datos y pegándolos en el recuadro A del software (paso 1). En el paso 2, es necesario seleccionar un identificador, en esta sección se refiere al tipo de microarreglos utilizado, para nuestros datos fue seleccionado el "official gene symbol" debido a que esta nomenclatura es la más cercana a la que se usó en el microarreglo. El pasó 3, que hace referencia al tipo de lista, seleccionamos "gene list", y el paso 4, se selecciona "submit list", y se cargaran los datos al software.

Para realizar una clasificación funcional de los genes que han sido cargados al programa y poder explorar los resultados, seleccionar las herramientas de DAVID, "Funtional annotation tool" el cual nos genera una nueva vista mostrándonos una serie de hipervínculos con diferentes categorías que son de nuestro interés. Como ya se había mencionado se realizó un agrupamiento de los genes basados en el GO, la lista de genes se sometió a un análisis basado en la categoría relacionada a los procesos biológicos (BP), para esto se seleccionó la pestaña "Gene Ontology" y posteriormente en "GOTERM_BP_DIRECT", se le dio click en "chart". Al realizar esto se genera una nueva ventana con los resultados el cual contiene términos que son enriquecidos y que son asociados con la lista de genes que fueron sometidos al análisis, el número de genes que participan en este término (solo los que fueron ingresados), así como un valor estadístico llamado P-value, cuando este valor es menor o igual a 0.05 se pude decir que el término mostrado por el programa es fuertemente enriquecido y tiene una mayor relevancia biológica.

El Gen Ontology también permite realizar otro tipo de agrupamientos de nuestros genes de interés en categorías basadas en función molecular (MF), y componentes celulares (CC), así como otros tipos de análisis que pueden ser consultados en la página del programa o en la publicación de Huang *et. al.,* 2008. Este mismo software contiene un enlace unido a la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que permite analizar procesos celulares y vías metabólicas alterados que se asocian a los genes que son sometidos a este análisis.

7.9.2 Búsqueda de glicogenes (construcción de una base de datos)

Debido a que no hay una herramienta o base de datos que conjunte todos los genes relacionados a la glicosilación del humano, para la identificación de los glicogenes, nosotros recopilamos la información disponible de GlycoGene database (http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/ggdb/) y del Consortium for Functional Glycomics-CAZy databases (disponible http://www.cazy.org/CAZY/). También tomamos en cuenta publicaciones previas (Milde-Langosch *et al*., 2014) relacionadas a los glicogenes los cuales complementaron la información disponible hasta el momento. Nosotros tomamos en cuenta 335 glico-genes. Las proteínas de unión a glicanos y transportadores de glicanos (así como de carbohidratos) no fueron incluidos en esta base de datos.

7.9.3 Construcción de las redes de interacción proteína-proteína (PPI)

Los genes relacionados a la glicosilación fueron sometidos a un análisis "*in* silico"de interacción proteína-proteína (PPI), que nos permitió conocer las relaciones que tiene nuestros genes de interés y su posible función biológica en el desarrollo del cáncer cervical mantenida por la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. Para realizar este análisis bioinformático se utilizó la herramienta informática, disponible en línea el Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (String DB, http://string-db.org).

Esta herramienta permite al usuario realizar 2 tipos de análisis, la primera es ingresando una lista de genes que son de nuestro interés y el programa realiza una predicción, pronosticando las posibles interacciones que pueden tener los productos de los genes que han sido ingresados al programa. El segundo análisis consiste en solo ingresar el nombre de un único gen de interés y el programa nos permite conocer cuáles son las proteínas que se relacionan inmediatamente a nuestro gen de interés. Las redes de interacción que son predichas en STRING, son construidas a partir de interacciones ya conocidas (con evidencia experimental) y otras se basan en algoritmos propios de esta herramienta y en otras fuentes (Szklarczyk *et al.*, 2011) bibliográficas y de actividades similares a otra proteína.

Se realizaron diferentes tipos de interacciones (una general con todos los glicogenes, una red con los genes que disminuyen su expresión y otra con la que aumentan), estos se

ingresaron en forma de grupo de genes. También realizamos redes de interacción de proteína aumentando el número de nodos que aparecen en la red.

Para realizar el análisis en forma de grupo de genes, en la ventana del STRING, seleccionar la pestaña llamada “Multiple proteins”, posteriormente seleccionar nuestro grupo de genes de interés, copiar y pegarlos en el recuadro “List of names”. Una vez que han sido cargados los datos, seleccionar el organismo de interés (*Homo sapiens*), y darle click en “search”. Posteriormente se despliega una nueva ventana donde se muestran los genes de interés con su nombre completo y función, pidiendo ser revisadas, una vez que verificamos nuestros genes ingresados, dar click en la pestaña “continue”.

Después de este proceso se despliega la red de interacción de proteínas que se asocian a las de nuestro interés. Existen varias visualizaciones, la forma que nos da automáticamente muestra nodos de colores y de diferente tamaño los cuales se refieren a si existe la estructura terciaria de la proteína. Para realizar cambios en la forma de visualización de las redes o de los parámetros tales: como la fuente de interacciones activas de las cuales se obtuvieron los resultados o el número de interacciones que queremos observar en la red, se da click en “Settings” y seleccionamos la opción deseada.

La obtención de los datos se puede realizar de dos maneras, al abrir la ventana de “Exports” nos da una lista de las diversas maneras en que podemos obtener nuestra información, ya sea a través de imágenes con formato PNG o en forma de tabla en formato XML; este formato nos da los análisis estadísticos de la red visualizada y nos permite su uso en otros programas como “Cytoscape” donde nos reconstruye la red obtenida en STRING, donde es posible manipular la red, si deseamos resaltar alguna proteína de interés.

8. RESULTADOS

El estudio de la participación de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH sobre los cambios en los niveles de glicosilación y genes relacionados a este proceso, se realizó en la línea celular HeLa (proveniente de adenocarcinoma cervical), en cuyo genoma se encuentran integradas secuencias del ADN viral del VPH genotipo 18.

A partir del "pool" de células HeLa silenciadas, se realizó una selección clonal, para obtener cultivos homogéneos con un mismo nivel de silenciamiento, ya que el sistema utilizado para el silenciamiento de los oncogenes *E6* y *E7*, no se pueden controlar cuantas partículas virales infectan una célula, ni tampoco se controla el sitio de integración del genoma del lentivirus, lo que afecta los niveles de expresión de los RNAs de interferencia.

La selección clonal se realizó por dilución infinita, para obtener los cultivos monoclonales los cuales fueron evaluados para seleccionar aquella con un mejor nivel de silenciamiento. Después de la selección clonal, se obtuvieron tres cultivos monoclonales que fueron transfectados con shRNAs contra E6 y E7, llamados clonas 5, 8 y 11, Mientras que se obtuvieron dos cultivos monoclonales control (con shRNA que no regula ningún RNAm) llamados shIrrB4 y shIrrD1, que sería nuestro control para las diversas metodologías. Estos cultivos monoclonales se les realizaron análisis de viabilidad celular y se les evalúo la expresión relativa del RNAm E6 y E7 del VPH18.

8.1 Evaluación del silenciamiento de *E6* y E7, sobre la viabilidad y proliferación celular

8.1.1 Viabilidad celular

Los cultivos monoclonales obtenidos fueron caracterizados inicialmente por ensayos de viabilidad celular, esta característica se evalúo por la capacidad de reducir un compuesto amarillo llamado Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), por enzimas deshidrogenasas mitocondriales de células metabólicamente activas a cristales de color púrpura llamadas formazán, que después de ser solubilizado fueron cuantificadas por espectrometría a una longitud de onda de 570 nm. Los valores de la absorbancia fueron medidos a diferentes tiempos, posteriormente graficados, una tasa de absorbancia menor

a la del grupo control indica una menor reducción del MTT a formazán, lo que sugiere que hay menos células viables (también indirectamente indica que hubo una menor proliferación celular). Los resultados fueron graficados a 4 diferentes tiempos, como se muestra en la figura 5, la absorbancia inicial fue entre 0.08 a 0.1 a 570 nm, en la última medición que se realizó a las 72 h. Las clonas controles (IrrB4, IrrD1) y la clona 8, mostraron el mismo comportamiento que la línea parental (absorbancia de 0.5-0.58 a 570 nm), sin embargo, para las clonas 5 y 11 la absorbancia fueron valores de 0.28 a 570 nm, indicándonos que la viabilidad de estas clonas se redujo alrededor del 50 % con respecto a la línea parental y a los grupos controles. Estos resultados nos indican que hay una menor viabilidad (e indirectamente nos podría estar indicando una menor proliferación celular), en las clonas 5 y 11 que podría ser atribuido a la expresión de los RNAs de interferencia contra E6 y E7 del VPH18 y por la restauración de p53 y pRb.

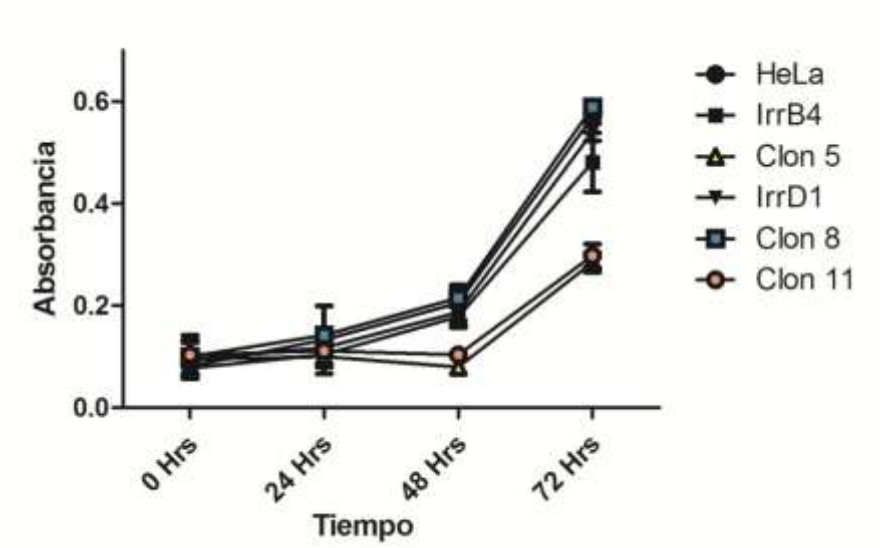


Figura 5. Viabilidad celular a diferentes tiempos de la línea celular HeLa, de clonas silenciadas en E6 y E7 y de las clonas control. En las clonas controles (IrrB4 y IrrD1) y clona 8 no hay ningún cambio en la viabilidad celular, con respecto a la línea HeLa parental; sin embargo en las clonas 5 y 11 hay una reducción de alrededor del 50 % en la viabilidad celular.

8.1.2 Proliferación celular

De acuerdo a los resultados del ensayo anterior, se seleccionaron dos cultivos (un grupo control IrrB4 y una clona silenciada la 11) y se evaluó la capacidad proliferativa de los 2 grupos seleccionados comparándolas con la proliferación de HeLa parental. La

proliferación celular se evaluó a través de la capacidad de retención del cristal violeta de las células adheridas; posterior a su elución se midió la absorbancia a 540 nm del colorante liberado. Cuando los cultivos son capaces de absorber una mayor cantidad de cristal violeta, la absorbancia aumenta y nos indica una mayor proliferación celular (e indirectamente la viabilidad celular) con respecto al tiempo transcurrido. Los tres grupos al tiempo 0 tienen un valor de 0.24, en la figura 6, se muestran los resultados que se obtuvieron, se puede observar que los 3 grupos celulares tienen una proliferación similar a la 24 horas de incubación, mientras que conforme transcurre el tiempo, hay un aumento en las lecturas de la absorbancia en los grupos celulares de HeLa y shControl (1.31 y 1.34 respectivamente), mientras que la línea silenciada (clona 11), a las 72 horas muestra una disminución de la absorbancia dando lecturas de 0.9 a 540 nm, lo que nos indica que hay una menor capacidad proliferativa. El comportamiento de los grupos parental y control fue similar durante los 4 tiempos que se midió la absorbancia, lo que refuerza los resultados obtenidos del ensayo de MTT (figura 5) y nos indica que el shRNA utilizado como control no interfiere en la viabilidad y proliferación de la línea utilizada como control; mientras que la clona 11 hay una disminución en la absorbancia, donde a las 72 horas hay una disminución cercana al 50 % con respecto a los otros dos grupos, por lo tanto una menor proliferación.

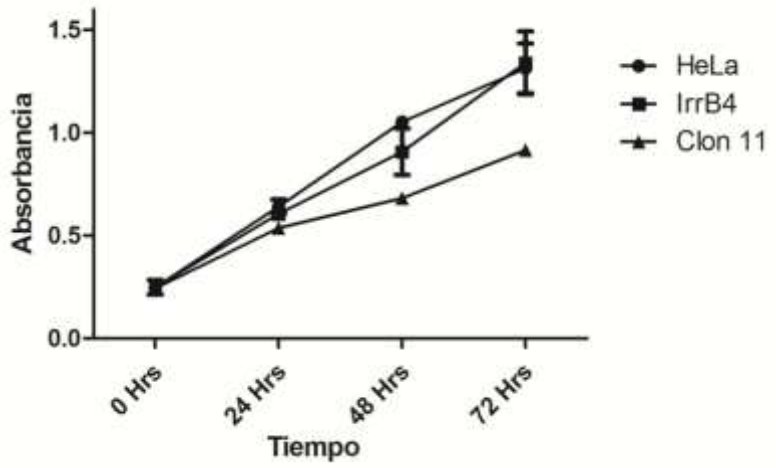


Figura 6. Efecto del RNAi contra E6 y E7, en la proliferación celular. Un ensayo de absorción de cristal violeta muestra reducción en la proliferación de la línea silenciada (clon 11) con respecto al grupo control (IrrB4) y sin tratamiento (parental).

8.2 Validación del método de cuantificación relativa (ΔΔCt), de *E6* y *E7* del VPH18

Previo a la cuantificación relativa de la expresión de E6 y E7, se realizó la validación del gen endógeno y se estableció un rango dinámico de concentración. La construcción del rango dinámico para los genes de interés *E6, E7* y el gen endógeno usado como control (*HPRT*), se realizó con las siguientes concentraciones 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl de RNAm de la línea celular HeLa sin tratamiento. Las Cts obtenidas fueron graficadas y las pendientes resultantes de cada gráfico se utilizaron para calcular la eficiencia de amplificación de cada gen, los cuales fueron de 103.83 %, 99.55 % y 104.78 % para *HPRT*, *E6* y *E7* respectivamente, estos resultados nos muestran que todos están cercanos al 100 % de eficiencia de amplificación y tienen valores cercanos los cuales pueden ser comparables entre los genes a cuantificar.

Una vez obtenidas las eficiencias de amplificación, el siguiente paso para la validación del método de cuantificación es la obtención de la primera ΔCt, la cual se obtuvo graficando el Ct gen blanco – Ct gen endógeno contra el Log [RNAm], la pendiente obtenida en este gráfico debe ser menor o igual a 0.1 para poder validar el método. En la figura 7 se muestra el grafico obtenido de la ΔCt entre *E6-HPRT*, en el cual la pendiente obtenida es de -0.09, la cual es cercana al valor óptimo de la metodología.

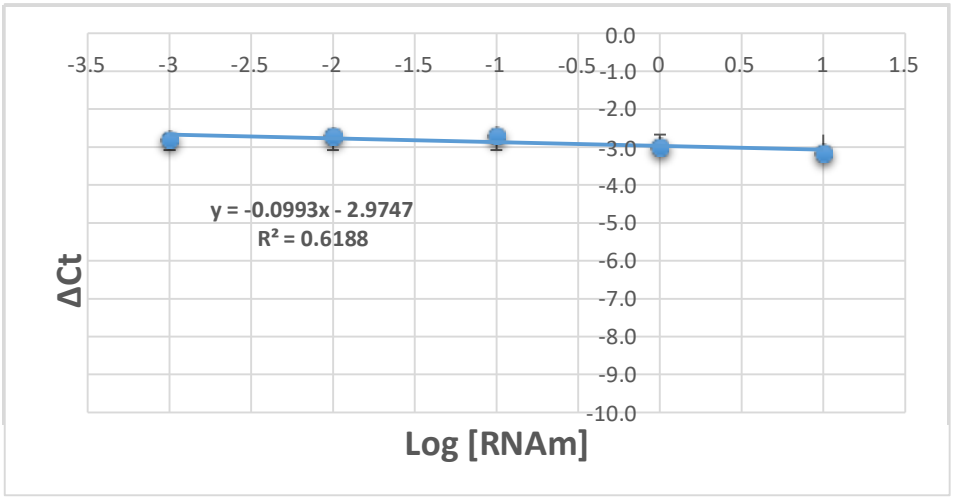


Figura 7. Curva de validación del método ΔΔCt para cuantificación de los transcritos de *E6*, utilizando como gen endógeno *HPRT*, en la línea celular HeLa parental.

Mientras que la pendiente obtenida al comparar las Cts de *E7-HPRT* fue de 0.021, valor cercano al ideal (figura 8). De esta manera se validó el método para la cuantificación de *E6* y *E7,* utilizando el rango dinámico previamente mencionado y utilizando el mismo gen endógeno para ambos genes.

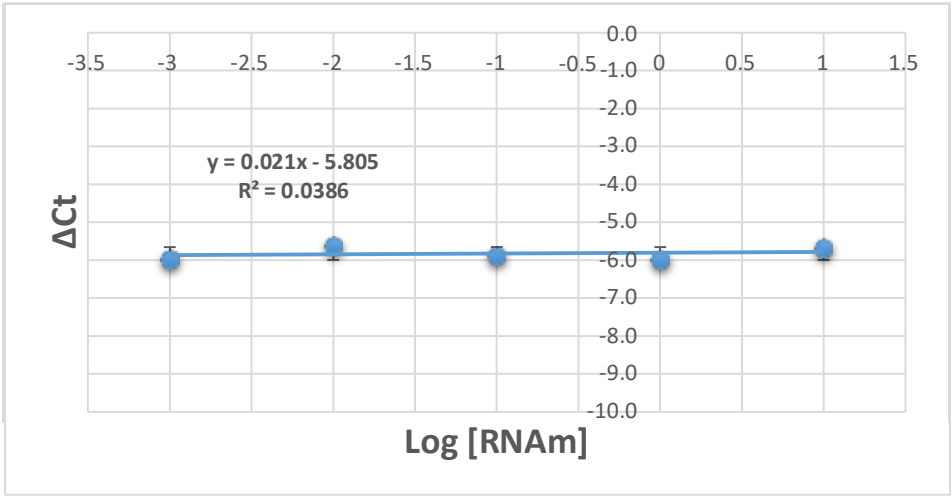


Figura 8. Curva de validación del método ΔΔCt para cuantificación de los transcritos de *E7*, utilizando como gen endógeno *HPRT*, en la línea celular HeLa parental.

8.2.1 Cuantificación de los transcritos de *E6* y *E7* en la línea celular Hela silenciadas y controles

Para la cuantificación de los genes *E6* y *E7* del VPH18 en las diferentes clonas, seleccionamos la concentración de 0.1 ng/µl de RNAm.

La cuantificación se realizó para seleccionar aquella clona que tuviera el mayor nivel de silenciamiento de *E6* y *E7*, también para la selección de un grupo control que se asemeje más a nuestra línea HeLa parental. La abundancia de RNAm de *E6* y *E7* de la línea celular sin tratamiento (HeLa parental) se utilizó como calibrador, es decir su valor siempre fue de 1 o del 100 % de expresión y sobre ese valor se compararon los resultados de las clonas experimentales (silenciadas o controles). Los resultados de la cuantificación relativa de transcritos de *E6* y *E7* se muestran en la figura 9, que incluye las 3 clonas silenciadas y 2 clonas control.

En el caso de la cuantificación relativa de E6 (figura 9A), los resultados muestran una muy ligera disminución de los grupos controles (IrrB4, IrrD1), con respecto a HeLa, mientras que las clonas 5 y 8 muestran un nivel de expresión similar al calibrador, lo que nos sugiere que no hay ningún efecto del shRNA sobre el transcrito de E6. La clona 11 mostró una disminución cercana al 50 %, respecto a la línea calibradora HeLa. En la cuantificación relativa de E7 (figura 9B), los grupos controles y la clona cinco tuvieron el mismo nivel de expresión respecto a HeLa sin tratamiento, mientras que la clona 8 tuvo una ligera disminución y nuevamente la clona 11 tuvo una disminución del 50 % del transcrito de E7, lo que nos sugiere que esta clona es la que mejor silenció parcialmente ambos genes.

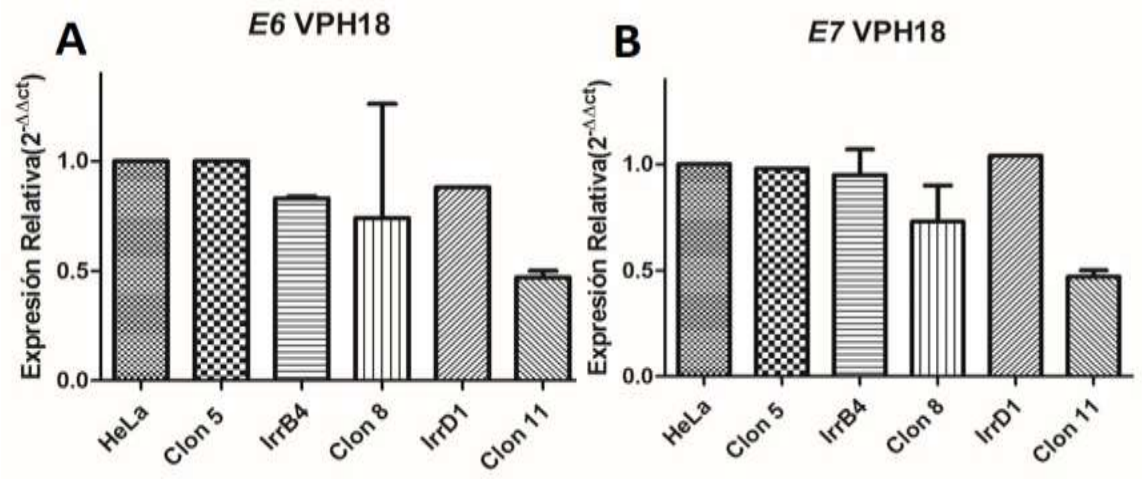


Figura 9. Expresión relativa de E6 (A) y E7 (B), en diversas clonas silenciadas y controles. Este primer tamizaje sirvió para la selección de las líneas con las que continuaríamos el estudio (clon 11 y IrrB4).

Esta primera cuantificación nos permitió seleccionar una clona control y una clona con un mayor silenciamiento parcial de ambas proteínas, los cuales fueron IrrB4 y clon 11 respectivamente; con ellas continuamos con nuestra investigación. Después de la selección de los cultivos monoclonales para trabajar, nos referiremos a ellos como HeLa parental (línea sin tratamiento), shControl (refiriéndonos al grupo control que contiene shRNAs que no reconocen a ningún RNAm blanco hospedero ni viral) y shRNAE6/E7 (clon 11 que contiene los shRNA's dirigidos contra los transcritos de *E6/E7*, cuya abundancia disminuyó

más pronunciadamente respecto a las de las otras clonas analizadas), estas primeras cuantificaciones se realizaron por duplicado

8.2.2 Cuantificación de *E6* y *E7* del VPH18 en las líneas seleccionadas

Los niveles de expresión transcripcional de los genes *E6* y *E7*, en las clonas antes seleccionadas fueron cuantificados por qRT-PCR en los dos grupos seleccionados. La concentración de RNA usada fue de 0.1 ng/µl y se utilizó la expresión de HeLa parental como calibrador de la expresión relativa de ambos tipos de transcritos. En la figura 10 se muestran la expresión relativa de E6 y E7; en el panel A, se puede observar una disminución de alrededor del 60 % del trascrito de E6 en la línea shRNAE6/E7, mientras que hay una expresión similar en el grupo parental y control.

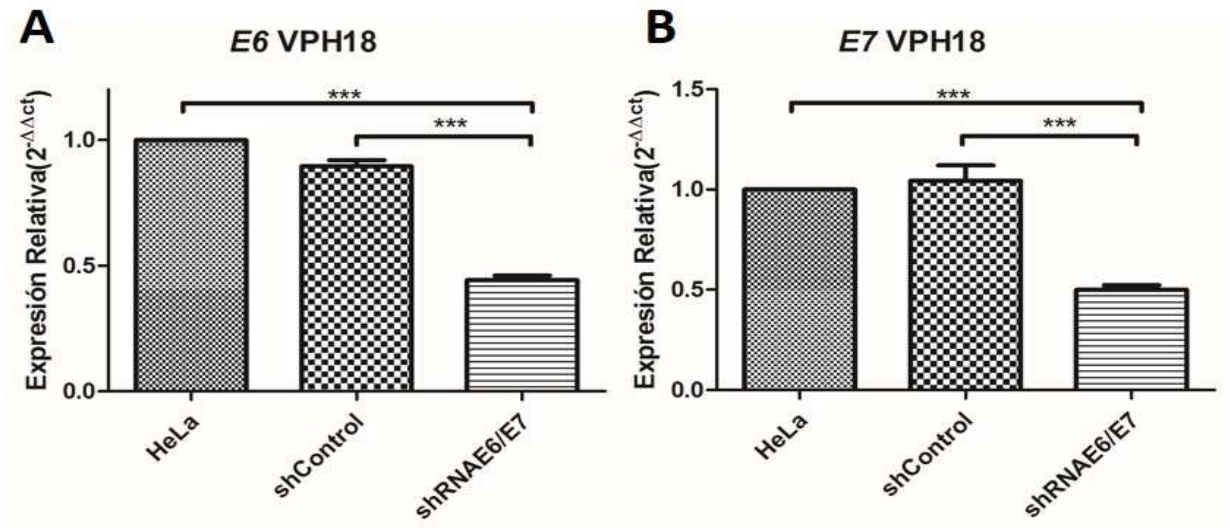


Figura 10. Expresión relativa de E6 (A) y E7 (B), en las dos líneas celulares seleccionadas. La expresión de HeLa parental se usó como normalizador, los experimentos se realizaron por triplicado y posteriormente se sometieron aun análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un test de Tukey ***$p < 0.001$.

En el panel B, se muestra la expresión relativa de E7, en la que los resultados son similares a los de la expresión de E6. No encontramos cambios significativos entre el grupo calibrador (parental) y el grupo control, mientras que la línea silenciada (shRNAE6/E7), tiene una disminución de alrededor del 50 %. En ambos casos se realizó un análisis de varianza

de una vía (ANOVA), seguido de un test de Tukey con un valor de $p<0.001$, para la significancia estadística; los resultados mostraron que para ambos transcritos hay una disminución en la expresión significativa entre la línea silenciada respecto a los grupos parental y control y que estos dos últimos no tienen diferencia estadística en expresión (figura 10).

8.3 Evaluación del silenciamiento de E6 y E7 por western blot

El silenciamiento de E6 y E7 también fue evaluado por western blot, para corroborar que hay una inhibición de expresión a nivel proteico. La expresión de E6 se evaluó de una manera indirecta, esto es porque de acuerdo a la bibliografía se menciona que en la línea celular HeLa, hay niveles muy bajos de expresión de proteína endógena, lo que hace muy difícil su detección por western blot, a pesar de que existan anticuerpos específicos contra E6 de VPH18 (Butz *et al.*, 2003; Hall y Alexander, 2003; Qi *et al.*, 2010). Para medir el efecto del silenciamiento en E6, se evaluó la expresión de la proteína p53, ya que ésta es el blanco principal de la degradación proteolítica mediada por E6; por lo que al haber una disminución de la expresión de E6, los niveles de p53 deben aumentar. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11, en el panel izquierdo, se puede observar que hay una mayor intensidad en la banda que corresponde a p53 en la línea shRNAE6/E7, en comparación con las intensidades de las bandas de HeLa y shControl, lo que nos indica que hay una mayor presencia de p53 en la línea silenciada y que los niveles de E6 han disminuido a nivel de proteína, mientras que las bandas correspondientes a β-actina, proteína que se utilizó como control las intensidades son similares.

La intensidad de la señal de cada banda obtenida en los ensayos de western blot fue cuantificada mediante un análisis densitométrico utilizando el software ImageJ. La cantidad de proteína fue normalizada utilizando como control la cantidad detectada de β-actina endógena; los resultados se graficaron como unidades arbitrarias (el cociente de la división de la intensidad de la banda de p53 sobre la intensidad de banda de β-actina). En la figura 11, en el panel derecho se muestra la gráfica del análisis densitométrico de los niveles de p53 en los 3 grupos celulares. La intensidad de banda de p53 correspondiente a shRNAE6/E7

tiene un aumento de alrededor de 2.5 respecto al grupo parental y control, mismo que es estadísticamente significativo ($p<0.001$), sugiriéndonos que hay una baja degradación de p53, esto debido a la inhibición de la expresión de la oncoproteína E6.

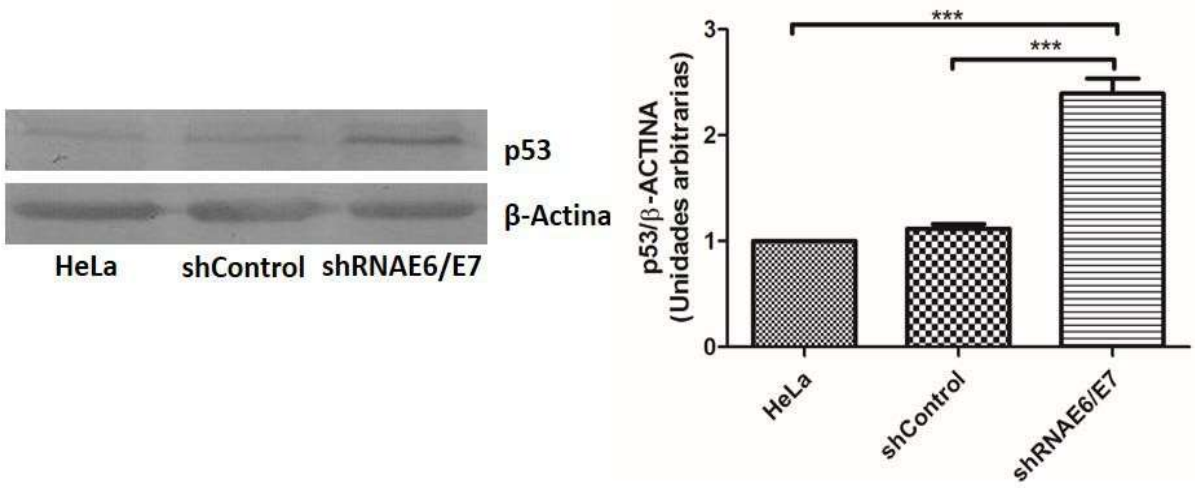


Figura 11. Ensayo de western blot en el que se detectó a la proteína p53 (una proteína blanco de E6) en la línea celular HeLa, en la clona control y la silenciada, el panel izquierdo muestra la señal en la membrana correspondiente a las proteínas p53 y β-actina (control endógeno), el panel derecho muestra el análisis densitométrico de la membrana. La señal de β-actina se utilizó como control y normalizador para la cuantificación. Los experimentos fueron realizados por triplicado y sometidos a un análisis estadístico de varianza de una vía (ANOVA), con un test de Tukey ***$p < 0.01$.

La expresión de la oncoproteína E7, fue detectada de manera directa, los resultados concuerdan con lo obtenido en la expresión relativa del transcrito de E7; como se esperaba hay una disminución en la señal de la proteína E7 en la línea silenciada respecto a la línea control y parental (figura 12, panel izquierdo), se utilizó como control endógeno la expresión de β-actina, estos niveles se muestran con una intensidad similar en las tres líneas celulares. Las membranas también fueron sometidas a un análisis densitómetro, la expresión de β-actina fue utilizada como calibrador mientras que la expresión de E7 en HeLa parental fue utilizada como referencia del cambio en las intensidades de las bandas, los resultados son mostrados en el panel derecho de la figura 12. Como se puede ver en el gráfico hay una disminución de la intensidad de banda en E7, indicándonos una disminución en la expresión de la proteína; los resultados se sometieron a un análisis estadístico. Los

resultados son similares a p53 donde no hay diferencia estadística entre el grupo control y parental, mientras que hay una diferencia estadísticamente importante ($p<0.001$) al comparar estos grupos con la línea silenciada, la disminución es cercana a 2 respecto al control y la línea parental.

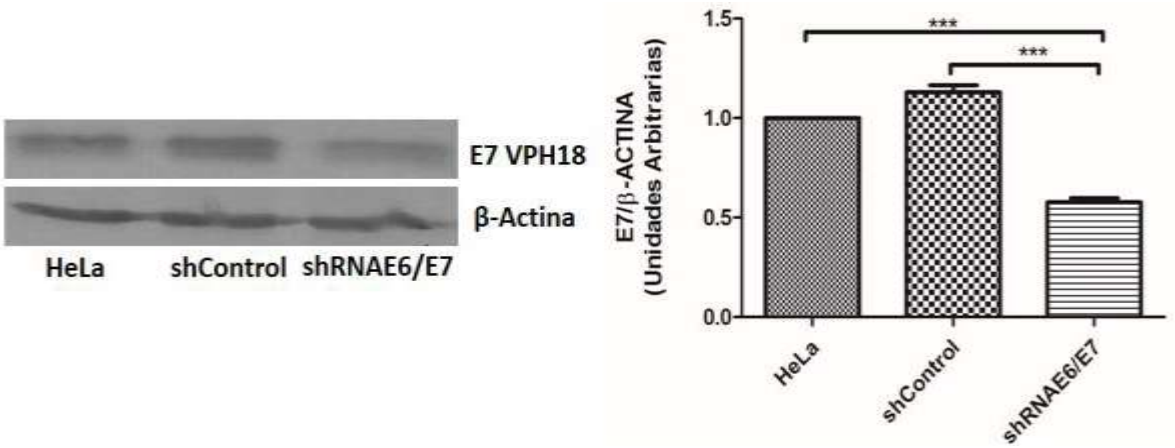


Figura 12. Ensayo de western blot en el que se detectó a la proteína E7 en la línea celular HeLa, en la clona control y la silenciada, el panel izquierdo muestra la señal en la membrana correspondiente a las proteínas E7 y β-actina (control endógeno), el panel derecho muestra el análisis densitométrico de las membranas. La señal de β-actina se utilizó como control y normalizador de la expresión. Los experimentos fueron realizados por triplicado y se hizo un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un test de Tukey ***$p < 0.01$.

8.4 Perfil de genes alterados por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18 (microarreglos de expresión)

La obtención del perfil transcripcional de las líneas shControl y shRNAE6/E7, se realizó mediante un análisis de microarreglos de expresión, este ensayo se hizo en la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del doctor Jorge Ramírez y su equipo de colaboradores. El chip que se utilizó en este ensayo fue de 35K, el cual cubre el genoma completo de la colección del genoma humano depositada en el Gene Bank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El RNA extraído fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar su integridad. En la figura 13 se puede observar el gel y las bandas definidas que

corresponden a los RNAs ribosomales subunidades 28S y 18S, mientras que en la zona de resolución de bajo peso molecular del gel se puede ver la banda que corresponde al RNA de transferencia o a la subunidad 5S del RNA ribosomal. Una vez que se corroboró la calidad del material extraído se enviaron a la unidad de microarreglos alrededor de 28 µg de RNA total de shRNAE6/E7 y 31 µg de RNA total de la línea control.

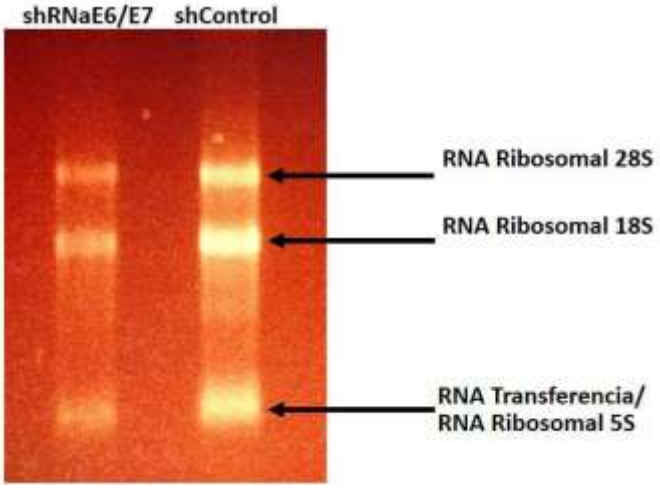


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA total extraído de la clona control y la silenciada. El gel fue teñido con bromuro de etidio para visualizar el material genético extraído.

El marcaje del RNA extraído se realizó durante la síntesis del cDNA, utilizando los fluoróforos Alexa555 para shRNAE6/E7 y con Alexa647 para shControl, posteriormente las laminillas de los microarreglos fueron analizados con software ArrayPro Analyzer fabricado por Media Cibernetics para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia detectadas en el microarreglo; los datos arrojados por este software fueron analizados con el programa GeneArise, desarrollado por la unidad de computación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para el análisis estadístico que permite discriminar aquellos que tienen cambios significativos, ya que estos son los que pueden representar un cambio real en la expresión.

El GeneArise utiliza una función llamada Z-score que calcula la media y la desviación estándar de la distribución de cada uno de los valores (radio de fluorescencia) y establece un rango de confianza para poder identificar los genes que son diferencialmente

expresados. La visualización de estos datos se realiza en una gráfica llamada Zscore.plot, que grafica los valores absolutos del Z-score (figura 14), el conjunto de datos son graficados en colores dependiendo del valor del Z-score; cuando el valor del Z-score es menor a uno el color es verde, cuando el valor se encuentra entre 1 y 1.5 es azul, si el valor oscila entre 1.5 y 2 el color es azul celeste, mientras que valores superiores a 2 es de color blanco. Valores más alejados del centro del gráfico (color blanco) contienen un mayor rango de confianza, es decir son los genes que estadísticamente se tiene la seguridad que son expresados diferencialmente (aumento o disminución de expresión).

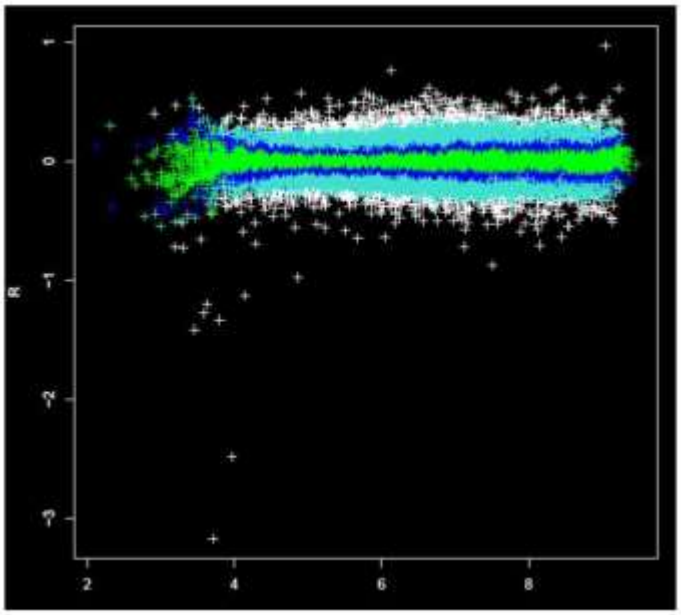


Figura 14. Zscore.plot, que muestra los valores absolutos del Z-score en código de colores. Cada punto representa un gen, aquellos más alejados del centro (0 o color verde), son los que estadísticamente tienen un mayor rango de confianza y son considerados de expresión diferencial.

Los datos que analizamos en este estudio fueron depositados en el Gene Expression Omnibus del NCBI y se puede acceder a ellos con el número de serie del GEO GSE90903. En este estudio sólo se trabajó con aquellos genes cuyo valor de Z-score fuera ≥ 2 y ≤ -2, ya que tienen un mayor rango de confianza. Del total del genoma analizado los resultados arrojaron un total de 1157 genes que son expresados diferencialmente, los resultados quedaron en función del silenciamiento parcial de E6 y E7; del total de los genes cuya expresión se altera, 613 genes disminuyen su expresión y 544 aumentan (si se requieren

ver estos resultados en función de la expresión de E6 y E7, los genes que aumentan serian 544 y 613 los que disminuyen).

8.5 Análisis bioinformáticos de los genes expresados diferencialmente en el microarreglo

Los estudios bioinformáticos usualmente sirven como punto de inicio para una investigación más profunda de los procesos de interés del investigador, en este estudio nosotros hicimos uso de la plataforma de microarreglos y de herramientas bioinformáticas (DAVID y String DB), para cumplir los objetivos planteados en esta investigación.

8.5.1 Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con expresión alterada (DAVID)

Para el análisis de un conjunto muy grande de genes que son expresados diferencialmente provenientes de metodologías como los microarreglos o la secuenciación masiva del RNAm, existen programas bioinformáticos que permiten el agrupamiento de los genes de interés ya sea por su nivel de expresión, función, estructura, localización celular, etc. Nosotros utilizamos el software Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery ("DAVID", http://david.abcc.ncifcrf.gov/) disponible en línea, que nos permite el agrupamiento de nuestros genes de interés basados en el Gene Ontology (GO). El GO contiene tres términos en los cuales podemos agrupar nuestros genes los cuales son: componentes celulares (CC), función molecular (MF) y procesos biológicos (BP).

Los datos crudos (los 1157 genes con expresión diferencial) fueron sometidos a un análisis con este software utilizando solo la función de procesos biológicos, los resultados que mostró este análisis fueron agrupados en aquellos que son similares por ejemplo algunos procesos biológicos enriquecidos fueron; meiosis y fase M del ciclo celular meiótico, que se agruparon bajo el término "ciclo celular". La figura 15 muestra los procesos biológicos que fueron mayormente enriquecidos con este análisis, los cuales sólo se tomaron en cuenta solo si tuvieron un valor estadístico menor o igual a 0.05 (P-value), ya que estos son considerados de una mayor relevancia biológica. Los procesos biológicos que tuvieron una mayor cantidad de genes alterados (con aumento o disminución de expresión) son la organización celular, señalización celular y adhesión lo cual nos sugiere que estos

procesos son los que mayormente se ven afectados por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH, otros procesos biológicos que también tuvieron resultados relevantes son el ciclo celular, diferenciación y la respuesta inmune, los cuales son procesos que en distintos tipos de cáncer se ven afectados.

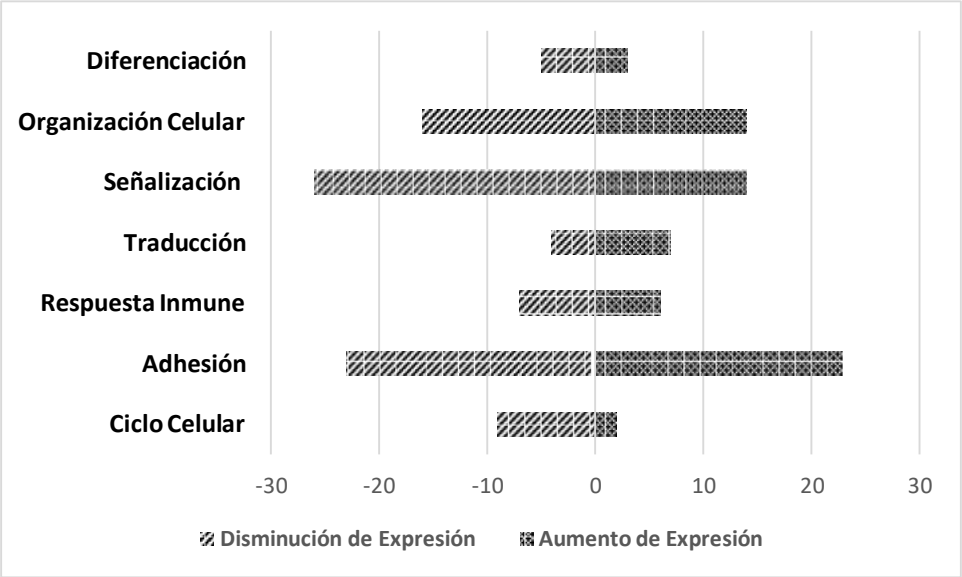


Figura 15. Análisis del Gene-Ontology, realizado en *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* (DAVID). Los genes que se expresaron diferencialmente fueron agrupados con base en su proceso biológico, los términos mayormente enriquecidos son mostrados en el gráfico señalando el aumento o disminucion pero que participan en un proceso biologico similar.

Con el análisis anterior, se pretendía encontrar resultados de términos que hicieran referencia a los procesos de glicosilación, que es el tema de interés de la investigación; sin embargo, con este análisis no se obtuvieron resultados relacionados con este proceso biológico, así que se buscó otra estrategia para la identificación de los genes que se relacionan a la glicosilación.

8.6 Identificación de genes con expresión alterada por el silenciamiento de E6 y E7 relacionados con la glicosilación

Se recabó información de 2 bases de datos especializados en la glicosilación como el GlycoGene database (http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/ggdb/), que contiene descritos 333 glicogenes humanos y el Consortium for Functional Glycomics-CAZy databases (http://www.cazy.org/CAZY/), con 214 glicogenes, (ambas bases de datos fueron

complementadas una con la otra, debido a que entre ellas carecían de algunos glicogenes descritos); También tomamos en cuenta publicaciones relacionadas a la identificación de genes con expresión alterada que participan en la glicosilación en diversos tipos de cáncer, para establecer nuestra base de datos de glicogenes. Nosotros identificamos 335 genes del genoma humano relacionados a la glicosilación. Los genes que codifican para transportadores de carbohidratos y proteínas de unión a glicanos no fueron tomados en cuenta. Los 335 glicogenes que nosotros tomamos en cuenta para este estudio, estaban incluidos en el chip de 35K del microarreglo, ya que como se mencionó previamente, abarca el genoma humano completo.

Una vez que recabamos la información, buscamos en nuestros datos los genes que se relacionan a la glicosilación y que modifican su expresión por el silenciamiento de las oncoproteínas del VPH18. Nosotros identificamos 9 glicogenes que aumentan de expresión (*ALG14, POFUT1, FUT4, MAN2A1, DPY19L1, C3orf21 (XXYLT1), UGT2B17, IDUA, UGCGL1*) y 7 glicogenes (*GALNT1, B4GALT2, UGT8, MANBAL, PIGV, FCMD,* C1GALT1C1) que disminuyen su expresión por el silenciamiento de E6 y E7, cabe recordar que nosotros solo tomamos en cuenta aquellos que contienen un valor de Z-score ≥ 2 y ≤ -2. Los nombres de las enzimas codificadas por los genes con expresión diferencial y sus funciones son mostrados en las tablas 5 y 6 para los glicogenes que aumentan y disminuyen su expresión respectivamente.

Tabla 3. Glicogenes que aumentan su expresión, por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18.

Gene/Enzima	Función
ALG14 UDP-N-Acetilglucosaminiltransferasa	Transfiere (junto con ALG13) GlcNAc sobre GlcNAc-PP-Dol (síntesis de precursor N-glicanos)
FUT4 Fucosiltransferasa 4	Cataliza la transferencia de fucosa (GDP-Fuc) a [Fucα1→2Galβ1→4GlcNAcβ1→R] en enlace α-1, 3
MAN2A1 Manosidasa Alfa Clase 2A Miembro 1	Hidrólisis de dos residuos de manosa periféricas de la estructura Manαl--6(Manαl--3) Manαl--6(GlcNAcβ1--2Manα1--3) [Manβ1--4GlcNAcβ1--4GlcNAcβ1]--asparagina.
DPY19L1 Dpy-19 Like 1 (C. Elegans)	C-manolisación a residuos de triptófano sobre proteínas que contienen repetidos TSR-like
C3orf21 (XXYLT1) Xilosida Xilosiltransferasa 1	Elongación del disacárido Xyl-Glu-O-Ser, adicionando una segunda Xilosa

IDUA Iduronidasa, Alfa-L-	Hidrólisis de ácido idurónico unido en enlace α, de extremos no reductores de glicosaminoglicanos (GAGs), heparán sulfato y dermatán sulfato
UGT2B17 UDP Glucuronosiltransferasa Familia 2 Miembro B17	Cataliza la glucoronidación de esteroides (desintoxicación)
POFUT1 O-Fucosiltransferasa 1	Adición de O-Fucosa sobre residuos conservados de serina o treonina de proteínas que contienen repetidos EGF-like
UGCGL1 UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa-like 1	Adición de Glucosa sobre la ceramida (síntesis de Glucosilceramida)

Tabla 4. Glicogenes que disminuyen su expresión, por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18.

Gene/Enzima	Función
PIGV Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class V	Transferencia de la segunda manosa en el anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI)
GALNT1 Polipéptido N-Acetilgalactosaminiltransferasa 1	Transferencia de N-AcetilGalactosamina (GalNAc) a residuos de serina o treonina (O-glicosilación)
C1GALT1C1 Chaperona especifica 1 de C1GALT1	Chaperona esencial para la función de C1GALT1 y la formación del core 1 de la O-glicosilación (antigeno T).
FCMD Fukutina	Glicosilación de α-distroglucano (α-DG)
MANBAL Manosidasa beta A, lisosomal-like	Mannosidasa beta-like
B4GALT2 Beta-1,4-Galactosiltransferasa 2	Transfiere galactosa a N-AcetilGlucosamina, relacionada en O-glicosilación y síntesis de glicolipidos
UGT8 UDP-Galactosiltransferasa-ceramida	Cataliza la transferencia de galactosa a ceramida (síntesis de Galactosilceramida)

Los glicogenes identificados con expresión alterada por el silenciamiento de las oncoproteínas del VPH18 participan en distintos tipos de glicosilación que abarcan las del tipo O-glicosilación o glicosilación tipo mucina (*C1GALT1C1, GALNT1*), N-glicosilación

(*B4GALT2, MAN2A1, ALG14*), metabolismo de la ceramida (*UGT8*), síntesis de proteoglicanos (*FCMD, IDUA*), en O-glicosilación no mucina que participan en el plegamiento y regulación de proteínas relacionadas a vías de señalización (*POFUT1, DPY19L1, XXYLT1*) entre otros. De los 16 glicogenes que identificamos con expresión diferencial, ninguno se ha reportado en cáncer de cérvix, solo los genes *UGT2B17* y *FCMD*, se ha reportado con una expresión moderada en la línea celular HeLa (Nakamura *et al.,* 2008; Yamamoto *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha reportado que la mayoría de ellos tienen una expresión alterada en otros tipos de cáncer con importantes repercusiones a nivel clínico, pues se han asociado con el comportamiento celular tumoral, esos reportes son mostrados en la tabla 7. Las publicaciones que se tomaron en cuenta para la construcción de esta tabla fueron aquellas en las que se analizó la expresión de genes a nivel de transcritos en tejidos tumorales o líneas culares, mismos que se realizaron por microarreglos, qRT-PCR o ambas técnicas, en algunos reportes también se analizó la expresión de los genes a nivel de proteína; en este análisis excluimos aquellos estudios que evidenciaban mutaciones y polimorfismos a nivel de DNA de los glicogenes o hipermetilaciones, ya que este estudio solo se realizó a nivel transcripcional.

Tabla 5. Glicogenes alterados por la expresión de E6 y E7, su relación con otros tipos de cáncer y la importancia clínica por la alteración en sus niveles de expresión.

Gen	Tipo de cáncer	Importancia tumoral/clínica
ALG14	Carcinoma oral escamoso (OSSC) (Severino *et al.*, 2008)	_____
FUT4	Leucemia (Stirewalt *et al.*, 2008), Hepático (Cheng *et al.*, 2013), Gástrico (Petretti *et al.*, 1999), Melanoma (Ciolczyk-Wierzbicka *et al*., 2007), Mama (Yan *et al.*, 2015), Colorrectal (Petretti *et al.*, 2000)	Incremento en la expresión de este gen se ha relacionado con metástasis y resistencia a fármacos. Se ha propuesto como un marcador tumoral en cáncer de mama

MAN2A1	Glioblastoma (Kroes *et al*., 2007), Hepático (Costantini *et al.*, 2013), vejiga (Guo *et al.*, 2014)	Este gen se ha relacionado con la transición epitelial-mesénquima (EMT) de células tumorales
DPY19L1	Cáncer de colon (Márquez *et al*., 2013)	En modelos in vitro se ha relacionado con la adhesión celular
XXYLT1	Cáncer de pulmón (Yang *et al.,* 2017)	Relacionado a proliferación y migración de células tumorales
IDUA	Sin Reporte	
UGT2B17	Líneas celulares HeLa, MCF-7 (Nakamura *et al*., 2008), Endometrial (Hirata *et al.*, 2010), Pancreático (Broeck *et al.*, 2012)	La baja expresión se relaciona con un pobre pronóstico de sobrevivencia para el paciente
POFUT1	Glioblastoma (Kroes *et al.*, 2007), Hepático (Sawey *et al.*, 2011), Colorrectal (Loo *et al.*, 2013), OSCC (Yokota *et al.*, 2013)	Su baja expresión afecta la vía de señalización NOTCH
*UGCGL*1	Colorrectal (Martinez-Cardu *et al.*, 2009)	Su incremento en expresión se asocia con la resistencia a fármacos como el oxiplatino
PIGV	Mama (Naoi *et al.*, 2011), Osteosarcoma (Du *et al.*, 2014)	_____
GALNT1	Mama (Milde-Langosch *et al.*, 2014), Vejiga (Ding *et al.*, 2012), Hepático (Huang *et al.*, 2015)	La sobreexpresión de este gen se ha relacionado con una baja sobrevivencia para el paciente, también le confiere capacidad metastásica
C1GALT1C1	Colorectal (Huang *et al.*, 2014), Pancreático (Radhakrishnan *et al.*, 2014)	Un aumento de este transcrito, influye en la síntesis del antígeno T, que incrementa el comportamiento maligno de las células tumorales
FCMD	Líneas celulares ZR-75-1, HeLa (Yamamoto *et al.*, 2008)	_____
MANBAL	Sin Reporte	

B4GALT2	Mama (Potapenko *et al.*, 2010), Osteosarcoma (Du *et al.*, 2014)	_____
UGT8	Glioblastoma (Kroes *et al.*, 2007), Mama (Dziegiel *et al.*, 2010), Próstata (Oudes *et al.*, 2005), Pulmón (Rzechonek *et al.*, 2016)	Su alta expresión provoca un acumulamiento de galactosilceramida impidiendo la apoptosis de células tumorales, se ha propuesto como un marcador de metástasis en cáncer de mama

8.7 Cuantificación de la abundancia de los transcritos de glicogenes alterados por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18

7 glicogenes fueron seleccionados para cuantificar la expresión relativa del RNAm, por qRT-PCR. Los glicogenes que se evaluaron fueron *ALG14*, *POFUT1*, *XXYLT1* y *DPY19L1*, cuya expresión transcripcional se aumenta por el silenciamiento parcial de E6 y E7, también seleccionamos a los glicogenes *UGT8, GALNT1* y *PIGV* que disminuyen su expresión bajo las mismas condiciones, según los resultados del microarreglo.

8.7.1 Validación del método de cuantificación relativa (ΔΔCt), en los glicogenes seleccionados

Para la cuantificación de los glicogenes seleccionados, nuevamente usamos el método del ΔΔCt utilizando al gen endógeno *HPRT* como control. Para la validación se evaluó un rango dinámico para los genes de interés (*ALG14*, *POFUT1, XXYLT1, DPY19L1*, *UGT8, GALNT1* y *PIGV*) y el gen control. El rango dinámico se estableció con las siguientes concentraciones 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl de RNA de la línea celular HeLa sin tratamiento. Las Cts obtenidas de cada gen fueron graficadas, las pendientes resultantes de cada gráfico se utilizaron para calcular la eficiencia de amplificación de cada gen, los cuales fueron de 102.5 %, 96.85 % y 97.5 % para *POFUT1*, *XXYLT1* y *HPRT* respectivamente, mientras que para *DPY19L1*, *UGT8* y *HPRT* su eficiencia fue de 97.6 %, 87.63 % y 92.6 % respectivamente; las eficiencias de amplificación aunque no se encuentran cercanas al valor óptimo que es el 100 % tienen eficiencia de amplificación similares, por lo que tomamos estas concentraciones para la validación de los glicogenes, eficiencias de amplificación similares se observaron para los glicogenes *ALG14, GALNT1* y *PIGV.*

Posteriormente se calcularon las ΔCt´s, de cada gen y se graficaron contra el Log [RNAm], se verificó que la pendiente obtenida en estos gráficos sea menor o igual a 0.1 para poder validar el método. En la figura 16, se muestran los gráficos de los genes *POFUT1* (izquierda) y *XXYLT1* (derecha), la pendiente obtenida para *POFUT1* fue de 0.11, mientras que para XXYLT1 fue de -0.017, las cuales son cercanas a la pendiente ideal según el método usado para la cuantificación, por lo cual estos 2 genes se tomaron como validados con las concentraciones propuestas.

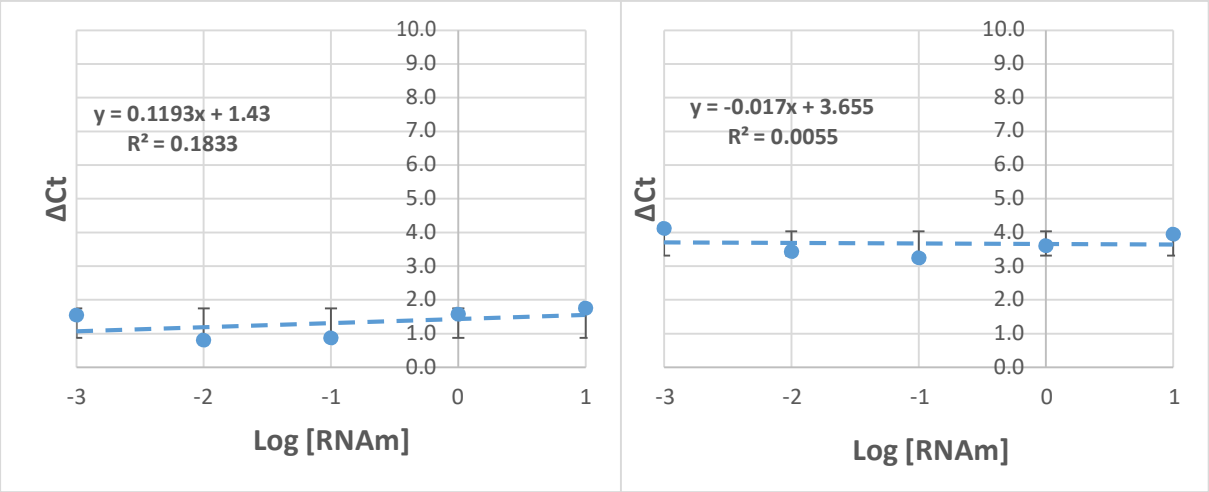


Figura 16. Curva para la validación del método ΔΔCt para la cuantificación de los transcritos de los genes *POFUT1* (izquierda) y *XXYLT1* (derecha), utilizando como gen endógeno a *HPRT*, en la línea celular HeLa parental.

En la figura 17, se muestran los gráficos de las validaciones de *DPY19L1* (izquierda) y *UGT8* (derecha), de los cuales sus pendientes fueron 0.13 y 0.42 respectivamente. En el caso del gen *DPY19L1*, se validó con las concentraciones propuestas, mientras que para el gen *UGT8* la pendiente estaba muy distante al valor óptimo, sin embargo, el valor de la ΔCt correspondiente a la concentración más baja de RNA propuesta, era la que salía del rango y su valor modificaba la pendiente, por lo cual se decidió no considerar ese valor de ΔCt, obteniendo así una nueva pendiente cuyo valor fue de -0.028, que ya se encontraba dentro del valor ideal, de esta manera validamos el gen UGT8, solo usando cuatro concentraciones de RNA (figura 17 panel derecho). Solo se muestran los gráficos de cuatro glicogenes, sin embargo, los glicogenes *ALG14, GALNT1* y *PIGV*, también se encontraron dentro del valor óptimo para el uso de este método de cuantificación.

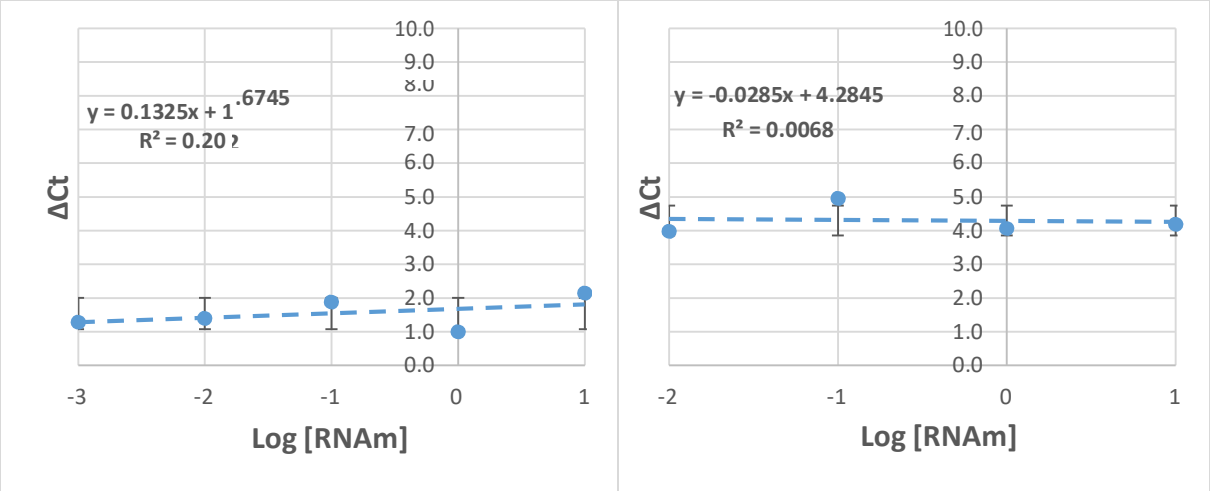


Figura 17. Curva para la validación del método ΔΔCt para la cuantificación de los transcritos de los genes *DPY19L1* (izquierda) y *UGT8* (derecha), utilizando como gen endógeno a *HPRT*, en la línea celular HeLa parental.

8.7.2 Cuantificación relativa de los transcritos de los glicogenes seleccionados

Una vez validado el método para la cuantificación relativa de la abundancia de los transcritos de los glicogenes antes mencionados, seleccionamos una concentración para la cuantificación la cual fue 0.1 ng/µl de RNA. La expresión relativa de los glicogenes se determinó con los valores de la línea celular HeLa control.

La expresión relativa de los glicogenes *POFUT1, XXYLT1*, *DPY19L1* y *ALG14,* se muestran en la figura 18, estos glicogenes son sobre expresados por el silenciamiento de las oncoproteínas E6 y E7, por lo cual se espera un aumento de estos transcritos en la línea shRNAE6/E7 al compararla con el control. Aunque en todos los gráficos se observa que hay un aumento en la abundancia de transcritos en estos glicogenes en la línea silenciada; los resultados de las cuantificaciones se sometieron a un análisis estadístico que consistió en un test T sin parear, ($p<0.05$), para verificar si estadísticamente estos cambios son significativos. Posterior a este análisis, se observó que sólo en la cuantificación del gen *POFUT1* (17-A) y *ALG14* (18-B), existe una diferencia estadística entre la línea shRNAE6/E7 y la línea control, estos resultados son similares a los obtenidos en el microarreglo.

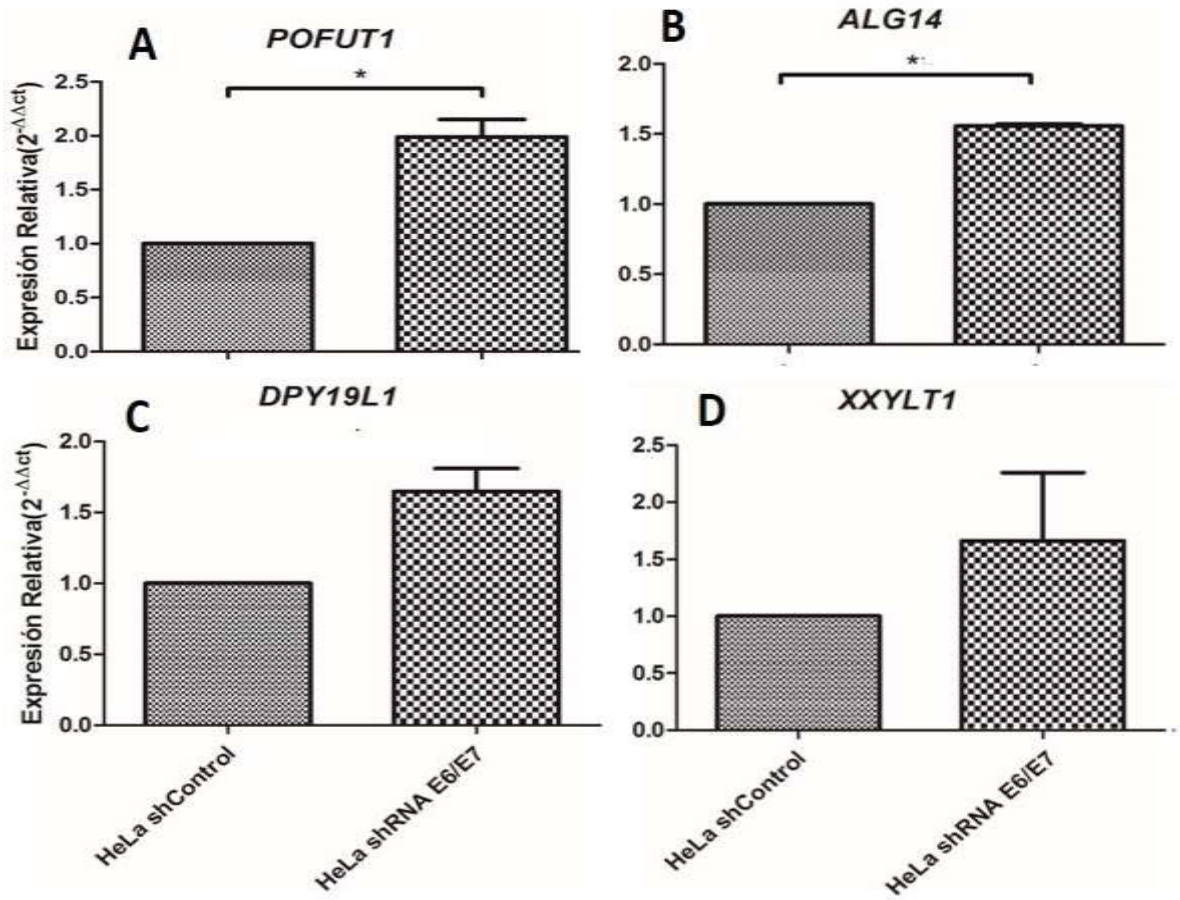


Figura 18. Cuantificación relativa de los glicogenes *POFUT1* (A), *XXYLT1* (B), *DPY19L1* (C) y *ALG14* (D). La expresión relativa de HeLa shControl se utilizó como normalizador, los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis estadístico Test T sin parear, p value Two-tailed con un intervalo de confianza del 95 % ($p<0.05$, *), donde solo *poFUT1* y *ALG14* tuvieron diferencia estadística.

En el caso de los otros dos glicogenes *DPY19L1* (18-C) y *XXYLT1* (18-B), a pesar de que los resultados de la cuantificación relativa mostraron una tendencia a incrementar su expresión en la línea shRNAE6/E7, el análisis estadístico de las cuantificaciones de transcritos del glicogen *DPY19L1* por qRT-PCR (valor de confianza de $p<0.05$), muestra una diferencia cercana al obtenido en el microarreglo; caso contrario sucedió con el glicogen *XXYLT1,* en el que los resultados no siempre fueron reproducibles, aumentando la desviación estándar y por lo tanto no se obtuvo ninguna diferencia estadística según el test usado. De los 4 glicogenes cuantificados solo 2 (*POFUT1* y *ALG14*), mostraron cambios estadísticos significativos.

3 glicogenes que son subregulados fueron cuantificados por qRT-PCR: *UGT8*, *PIGV* y *GALNT1,* de los que se esperaba que la abundancia de su RNAm disminuya en la línea silenciada. La cuantificación relativa de los transcritos de estos glicogenes se muestran en la figura 19; el glicogen *UGT8* (19-A) en la línea silenciada exhibe una disminución de su expresión de alrededor de un 40 % y según el análisis estadístico (valor de confianza de $p<0.05$), tiene una diferencia estadística significativa. El gen *PIGV,* disminuye su expresión alrededor de un 50 %, y el análisis estadístico de esta cuantificación nos indica que *PIGV* tiene una tendencia en su expresión similar a la del resultado obtenido en el microarreglo. En la cuantificación del glicogen *GALNT1* (19-C), no se observan cambios en los niveles de expresión entre la línea control y la línea silenciada.

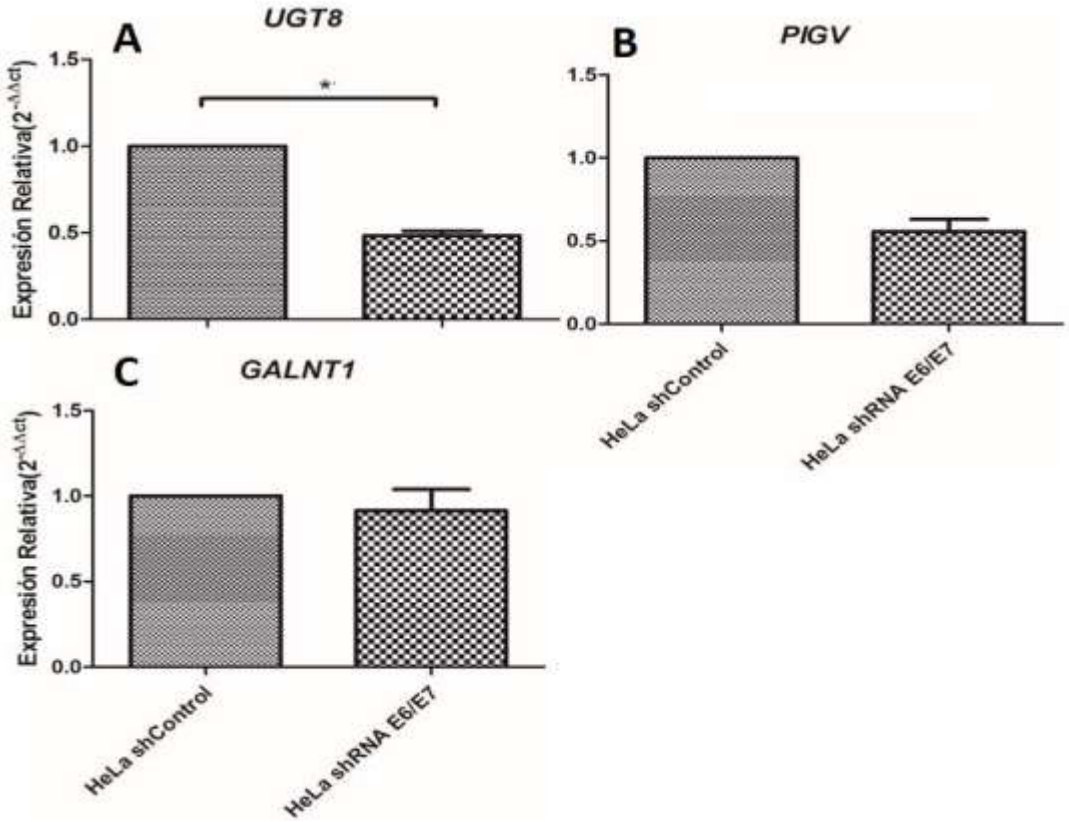


Figura 19. Cuantificación relativa de los glicogenes *UGT8* (A), *PIGV* (B) y *GALNT1* (C). La expresión relativa de HeLa shControl se utilizó como normalizador, los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis estadístico Test T sin parear, p value Two-tailed con un intervalo de confianza del 95 % ($p<0.05$, *), donde solo *UGT8* tuvo diferencia estadística, mientras que *PIGV* muestra una tendencia de disminución del transcrito.

8.8 Evaluación de glicanos de superficie celular

Como se ha mencionado, las células exhiben un perfil de glicanos en su superficie, y estos son vitales para un correcto funcionamiento de la célula. El perfil de glicanos se ve afectado durante el desarrollo de la carcinogénesis. Nosotros realizamos una caracterización de la composición de glicanos presentes en la membrana celular de las células HeLa, de la línea shControl y de shRNAE6/E7, con el propósito de conocer el efecto del silenciamiento parcial de *E6* y *E7* sobre la expresión de los glicanos de superficie.

La identificación de los glicanos presentes de superficie se realizó utilizando técnicas citoquímicas basadas en la microscopia de fluorescencia y el uso de lectinas conjugadas a fluoróforos. Las lectinas se caracterizan por su alta afinidad a carbohidratos de diferente naturaleza y se han vuelto una importante herramienta molecular para la identificación de cadenas glicánicas específicas (y glicoproteínas), así como para su purificación (Abbott y Pierce, 2010). Las lectinas que usamos para la identificación de glicanos, y poner de manifiesto posibles cambios en la composición glicánica de la superficie celular, se muestran en la tabla 8, en las que se incluyen los carbohidratos/estructuras glicánicas que son reconocidas de manera específica por cada lectina.

Tabla 6. Lectinas y sus ligandos utilizadas para la evaluación de los glicanos de superficie celular en las líneas parental, silenciada y control.

Lectina	**Abr.**	**Ligando**
Maackia amurensis	MAA	NeuAcα2,3Galβ1,4GlcNAc
Elderberry lectin	SNA	Neu5Acα2,6Gal(NAc)-R
Ulex europaeus agglutinin	UEA	Fucα1,2Gal-R
Concavalin A	Con-A	Residuos de α-D-manosil y α-D-glucosil
Jacalina	JAC	(Sia)Galβ1-3GalNAcα1-Ser/Thr (Antígenos T, sT, dsT)
Peanut agglutinin	PNA	Galβ1,3GalNAcα1-Ser/Thr (Antígeno T)

Las pruebas citoquímicas, además de permitir la identificación de los glicanos de superficie, también nos permite la visualización de su distribución en la membrana celular tal como se muestra en la figura 20 el reconocimiento de glicanos por la lectina PNA en las tres líneas celulares. Sin embargo, en la imagen no es posible discernir si hay cambios en la cantidad de cada glicano de superficie.

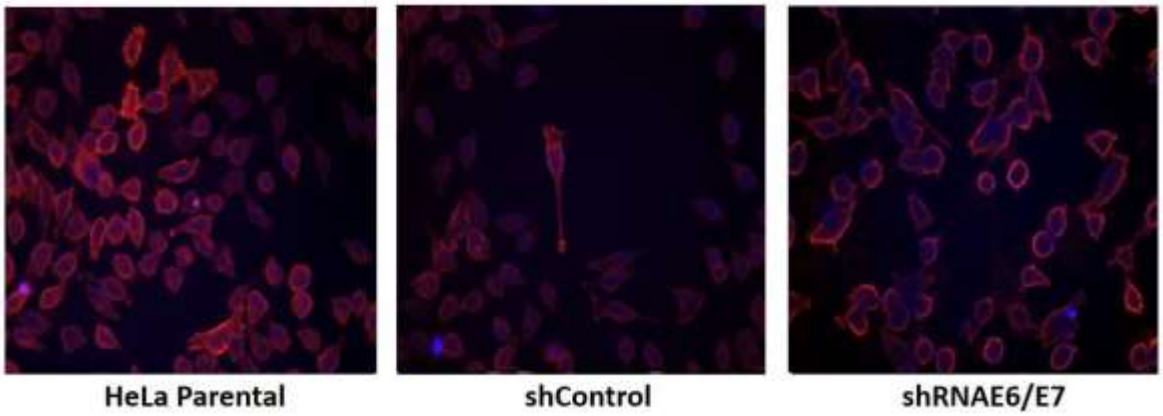


Figura 20. Distribución del antígeno T en la membrana celular, reconocida la lectina *Peanut agglutinin* en las líneas celulares HeLa parental, shControl y shRNAE6/E7. La lectina al reconocer su ligando va a emitir fluorescencia roja, mientras que los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul).

Para conocer si hay cambios en cantidad de los glicanos reconocido por las lectinas (cambios en los perfiles de glicanos) en las tres líneas celulares, realizamos la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia. La cuantificación de la fluorescencia se realizó sobre 5 diferentes campos del porta objetos, analizando las células presentes en cada zona utilizando el softwate ZEN blue 2, y de acuerdo a la metodología descrita, los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 7. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia, obtenidas de la tinción de las diferentes lectinas en las tres líneas celulares.

	Intensidad media de fluorescencia		
Lectina	**HeLa**	**shControl**	**shE6/E7**
MAA	130 (SD 10.3)	125 (SD 22.4)	127 (SD 20.4)
SNA	266.1 (SD 50.1)	263.2 (SD 31)	259.2 (SD 49.7)
UEA	345.1 (SD 19.5)	374.5 (SD 66.4)	364.2 (SD 28)
Con-A	341.8 (SD 54.8)	200.4 (SD 44)	271.2 (SD 21.3)
JAC	298.8 (SD 30.7)	325.8 (SD 36.5)	448.2 (SD 31.6)
PNA	235 (SD 61.1)	236.8 (SD 36.7)	196.7 (SD 12.36)

De acuerdo a las intensidades medias de fluorescencia, no hay cambios aparentes en el reconocimiento de tres lectinas MAA, SNA y UEA (reconocimiento de ácido siálico en diferentes enlaces y fucosa respectivamente), lo que sugiere que no hay cambio en la expresión de estos carbohidratos en la superficie celular. Las lecturas de Con-A exhiben una disminución de la intensidad de fluorescencia entre la línea parental y la silenciada, sin embargo, la línea control tiene una intensidad muy por debajo de ambas líneas.

Del panel de seis lectinas usadas en esta caracterización solo dos mostraron cambios en la intensidad media de fluorescencia, los cuales son JAC (antígenos T, ST y dST) y PNA (antígeno T), los cuales aumentan y disminuyen respecto a la línea parental y control respectivamente (tabla 9). Estos resultados que exhiben estas dos lectinas fueron nuevamente corroborados en otros nuevos ensayos de citoquímicas obteniendo la misma tendencia (tabla 10), que es un aumento en la intensidad de fluorescencia en JAC y una disminución en PNA de la línea shRNAE6/E7.

Tabla 10. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de las lectinas JAC y PNA en las diferentes líneas celulares.

	Intensidad media de fluorescencia		
Lectina	**HeLa**	**shControl**	**shE6/E7**
JAC	298.8 (SD 30.7)	325.8 (SD 36.5)	448.2 (SD 31.6)
	278.4 (SD 23.9)	276.5 (SD 28.6)	439.5 (SD 61.7)
PNA	235 (SD 61.1)	236.8 (SD 36.7)	196.7 (SD 12.36)
	288.3 (SD 66.7)	272.1 (SD 32.9)	162.9 (SD 23.4)
	321.2 (SD 57)	350.8 (SD 43.6)	229.6 (SD 47.2)

De acuerdo con los resultados de expresión diferencial obtenidos en el microarreglo, 2 glicogenes están relacionados a la biosíntesis del antígeno T, *GALNT1* y *C1GALT1C1*, los cuales disminuyen su expresión transcripcional por el silenciamiento de E6 y E7, por esta razón vemos una disminución en la intensidad media de fluorescencia al marcar las células con la lectina PNA, la cual reconoce exclusivamente al antígeno T; sin embargo, se puede observar un aumento en la fluorescencia de la lectina JAC que reconoce a tres diferentes antígenos (T, ST y dST), la cual tiene una menor especificidad de reconocimiento de las

estructuras glicánicas, probablemente a esto se deba el aumento en la fluorescencia de esta lectina marcada.

8.9 Construcción de redes de interacción proteína-proteína (PPI)

Una vez identificados los glicogenes con expresión alterada por el silenciamiento de E6 y E7, realizamos un análisis "*in silico*" con el propósito de predecir las posibles interacciones físicas, funcionales (complejos estables y/o rutas metabólicas), así como los fenotipos bioquímicos relacionados con la expresión de glicanos de superficie de las células transformadas. Para poder visualizar gráficamente estas interacciones, se utilizó el software disponible "en línea" llamado Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes ("STRING", http://string-db.org). A este programa inicialmente introducimos los datos de los 2 grupos de genes de interés (sub y sobreexpresados); las gráficas generada por el programa son mostradas en la figura 21, los nodos (burbujas de colores) representan las proteínas codificadas por los glicogenes con cambios en la expresión transcripcional, las interacciones son mostradas por líneas azules que conectan a los nodos que tienen algún tipo de interacción; la tonalidad del azul de las líneas que conectan a los nodos hace referencia al nivel de interacción, una línea más gruesa y oscura representa una mayor evidencia de interacción respecto a una línea delgada y con una tonalidad más clara. El score de interacción requerido mínimo, usado para la construcción de estas redes fue de 0.4 (confidencialidad media).

En el panel A de la figura 21, se presentan los genes cuyos transcritos aumentaron por el silenciamiento de las oncoproteínas virales, en ella se puede ver una interacción de tres glicogenes *FUT4*, *POFUT1* y *XXYLT1*, mientras que los otros seis no generan ningún tipo de interacción y solo aparecen como nodos solitarios. En el panel B, se muestra el resultado de los glicogenes que disminuyeron sus transcritos, en la imagen se representa una fuerte interacción de *GALNT1* y *C1GALT1C1*, en ambos paneles las interacciones nos indican que los genes que han sido unidos pueden estar participando en una misma vía de glicosilación.

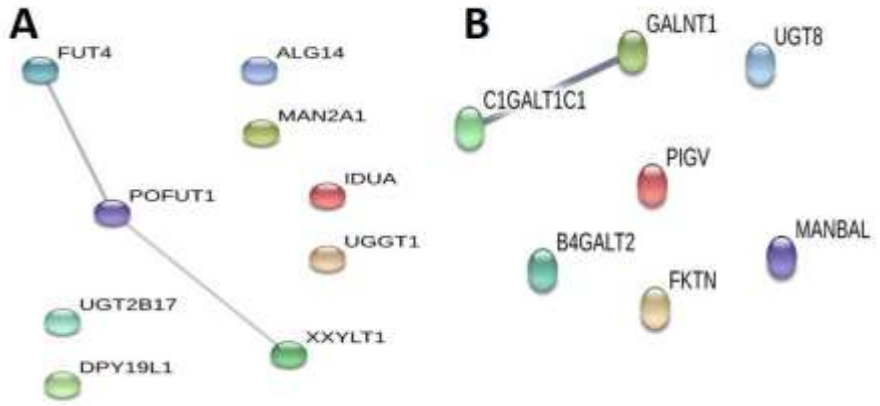


Figura 21. Red de interacción proteína-proteína (PPI), realizada en String DB con los glicogenes que modifican su expresión. Glicogenes que incrementan (A), glicogenes que disminuyen (B). Una línea más gruesa significa una mayor evidencia de interacción, mientras que una linea tenue significa que la evidencia es menor.

Un análisis más profundo se realizó sobre estas interacciones con el programa STRING DB; se construyeron nuevas redes ingresando los genes que interaccionan de la figura 21, sin embargo aumentamos a 10 el número de interacciones que pueden tener las proteínas de interés. Estas 10 interacciones que el programa genera, pueden ser de proteínas blanco a ser glicosiladas por las enzimas que están siendo afectadas, o bien pueden ser enzimas que actúan sobre un mismo sustrato o proteínas regulatorias de las enzimas que mostraron interacción en la figura 21 (POFUT1, XXYLT1 y FUT4 con un aumento en expresión y GALNT1 y C1GALT1C1 que disminuyen); estos nuevos nodos de proteínas que el programa nos genera, no necesariamente estarán alteradas en nuestro microarreglo, pero nos permite conocer un poco más acerca de la vía de glicosilación que está siendo afectada por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18.

En la figura 21 panel A, se mostraba la interacción de POFUT1, XXYLT1 y FUT4, al aumentar a 10 el número de interacciones se nos muestra cual es la posible afectación en el sistema por el aumento de expresión de los genes de interés (marcadas con estrella roja y línea roja). La figura 22 corrobora la predicción de que POFUT1 es una enzima que cataliza la adición de O-fucosa sobre serina o treonina en proteínas que contienen repetidos del

tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF-like) (Wang *et al.*, 1996), la adición de esta fucosa sobre estas proteínas tiene una función importante en el correcto plegamiento, localización y función de las proteínas que son ricas en estos repetidos. Como se puede ver en la figura, POFUT1 interacciona con nodos llamados NOTCH, que hacen alusión precisamente a proteínas con este mismo nombre (NOTCH1-4), y a ligandos de estas proteínas llamados Delta–like 1 (DLL1) y Jagget 1 (JAG1). Estas proteínas son bastante ricas en repetidos EGF-like en su región transmembranal, y son componentes de una vía de transducción de señales (vía NOTCH), la cual es importante para el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que puede estar regulando procesos como proliferación, apoptosis, diferenciación entre otros (Vasudevan y Haltiwanger, 2014).

Las proteínas y ligandos de NOTCH, pueden sufrir múltiples reacciones de glicosilación, su correcto plegamiento, función, y su interacción entre las diferentes proteínas y ligandos va a depender de su estado de glicosilación. La O-fucosa puede ser sustrato para la adición de otros carbohidratos por otras enzimas que actúan secuencialmente. La O-glucosa puede adicionarse por la acción de una enzima llamada RUMI, y esta puede ser decorada por la acción de enzimas GXYLT1/2 (aparecen en los nodos), que adicionan una molécula de Xilosa. Finalmente el disacárido Xyl-Glu-O-Ser formado, va a sufrir la adición de una segunda xilosa por la acción de XXYLT1 (Sethi *et al.*, 2012), sobre la primer Xilosa presente en el disacárido . La adición de xilosas sobre los repetidos EGF-like, se ha relacionado con una regulación negativa de estas proteínas con sus ligandos.

La figura 22 muestra una débil interacción entre NOTCH y XXYLT1, esto se debe a los pasos secuenciales de modificaciones glicanicas que sufre NOTCH, ya que XXYLT1 actúa en las etapas finales de la decoración glicanica, mientras que POFUT1 es quien actúa inicialmente sobre las proteínas con EGF-like. Ha estos niveles de interacción por jerarquía se debe que con una interacción de 10 proteínas ya no aparezca el nodo de FUT4, ya que esta actuaría en etapas muy tardías.

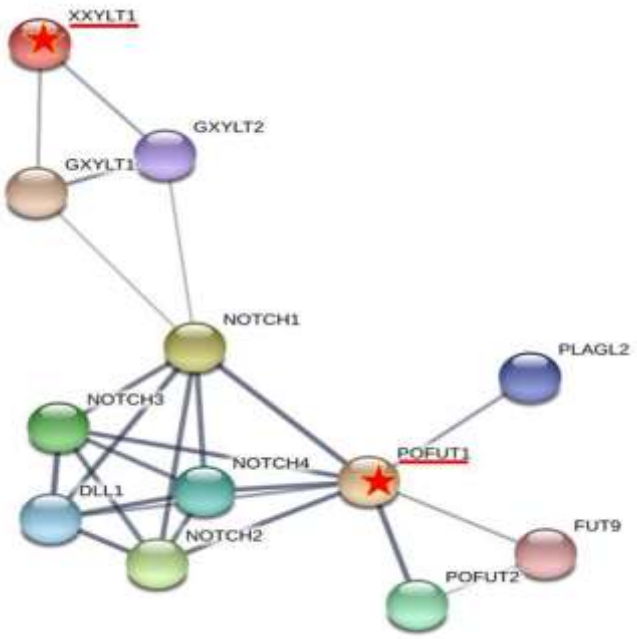


Figura 22. PPI con POFUT1, XXYLT1 y FUT4 (aumentan su expresión por el silenciamiento de E6 y E7). En esta red se aumentó el número de interacciones a 10, en la figura se puede observar la interacción con proteínas NOTCH, mismas que pertenecen a una vía de señalización celular con el mismo nombre y que es regulada por sus niveles de glicosilación en las proteínas responsables de desencadenar la señalización.

La interacción entre los productos de los glicogenes *GALNT1* y *C1GALT1C1*, con un aumento en los nodos a 10, se muestra en la figura 23. Los glicogenes con expresión alterada son resaltados con una estrella y línea roja, se puede notar que además de estos 2 genes, al hacer esta red de proteínas, aparece otro glicogen que cuya expresión disminuye en los microarreglos, *B4GALT2* (relacionado a las vías O-glicanos tipo mucina, glicosaminoglicanos, queratan sulfato, N-glicanos, glicolípidos, series lacto/neolacto). Esta red PPI, muestra que estos genes con expresión diferencial están relacionados a la glicosilación del tipo mucina (O-glicosilación).

La glicosilación tipo mucina se caracteriza por la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GalNAc) a grupo hidroxilo sobre residuos de serina o treonina del polipéptido y posteriormente es decorado por la adición de otros carbohidratos. GALNT1 es una enzima que se encuentra dentro de una familia de 20 miembros llamadas polipéptido N-acetilgalactosaminil transferasas (ppGalNAc), que catalizan la adición de GalNAc, que es

el paso inicial para la glicosilación del tipo mucina, formando el antígeno de cadena corta Tn (GalNAc-O-Ser/Thr). Este antígeno puede sufrir modificaciones subsecuentes por la acción de diversas enzimas que adicionan otros carbohidratos como ácido siálico por la enzima ST6GALNAC1 para la formación del antígeno sialil-Tn (sTn).

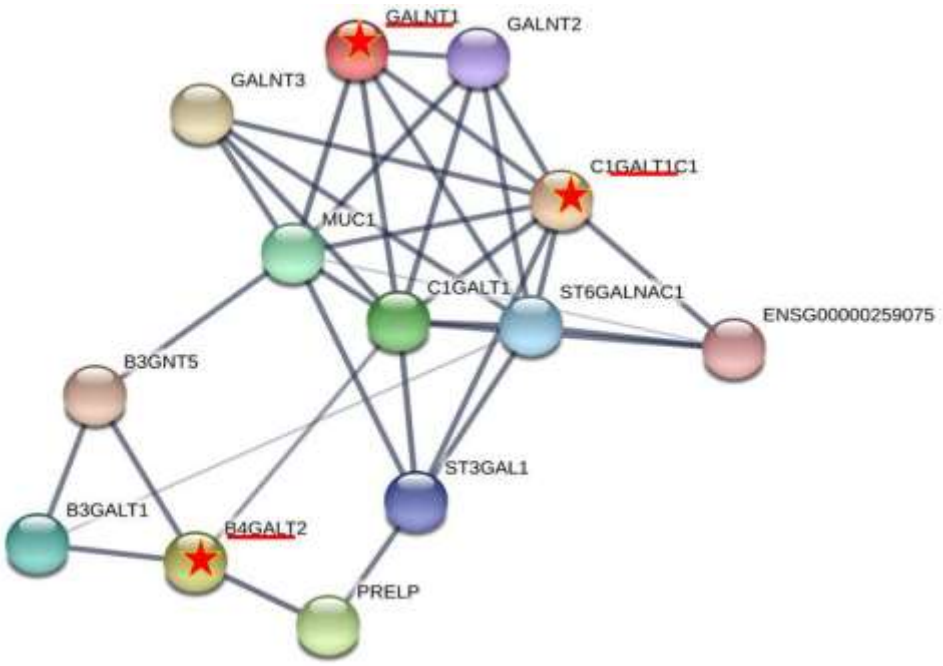


Figura 23. PPI de GALNT1 y C1GALT1C1, (disminuyen su expresión por el silenciamiento de E6 y E7). Se aumentó el número de interacciones a 10, donde se pueden observar las interacciones con otras enzimas que participan en las etapas iniciales de la O-glicosilación principalmente para la generación de antígenos de cadena corta.

La glicosilación del tipo mucina puede ser altamente ramificada, para que estas ramificaciones se lleven a cabo, diversas enzimas glicosiltransferasas actúan secuencialmente formando varios “cores” que posteriormente serán alargados. El antígeno Tn, sirve como sustrato para β3-Galactosiltransferasa o T-sintasa (C1GALT1), para la biosíntesis del antígeno T (core 1 de la O-glicosilación); sin embargo, la T-sintasa para su correcta actividad necesita la asistencia de una chaperona molecular específica llamada C1GALT1C1 (también llamada COSMC). El gen de T-sintasa, está presente como gen único en el genoma humano, las alteraciones en la cantidad de sus productos génicos T-sintasa/COSMC, afecta la síntesis del core 1 (antígeno T).

El antígeno Tn además de dar origen al antígeno sTn, sirve como sustrato para la biosíntesis de los cores 3 al 8 de la glicosilación tipo mucina. El core uno o antígeno T, es sustrato para la biosíntesis de los antígenos sialilT (ST) y disialilT (diST), que son antígenos de cadena corta; este mismo core puede ser ramificado o puede dar lugar a la biosíntesis del core 2 de la O-glicosilación. La biosíntesis del core 2 a partir del antígeno T, se da por la participación de GCNT1,3,4, adicionando N-acetilglucosamina (GlcNac) sobre este antígeno, posteriormente los pasos subsecuentes para la generación del core 2 es la adición de galactosa sobre el residuo de GlcNAc, por acción de las enzimas B4GALT1,2,3 (B4GALT2 aparece entre los genes con expresión disminuida en los microarreglos, al silenciar las oncoproteínas virales), lo anterior sugiere que la formación del antígeno T y su posterior polimerización para la biosíntesis del core 2, son favorecidas en las células HeLa no silenciadas.

Durante la construcción de estas redes de interacción de proteínas, inicialmente realizamos una PPI donde incluimos todos los genes que son alterados por el silenciamiento de E6 y E7, un resultado que saltó a la vista fue la formación de una red independiente al resto de los genes cuya expresión fue modificada. Esta red de interacción (figura 24 panel A) sólo era formada por el glicogen *UGT8* (marcado con estrella y línea roja) y dos genes más (remarcados con estrella y línea amarilla), *ACER1* también llamado *ASAH3* (ceramidasa alcalina 1) y *SMPD3* (esfingomielina fosfodiesterasa 3).

En el panel B se muestra esta misma red, pero al igual que las redes anteriores se pidió al programa un aumento en el número de interacciones, en la red se puede observar la presencia de genes que son expresados diferencialmente.

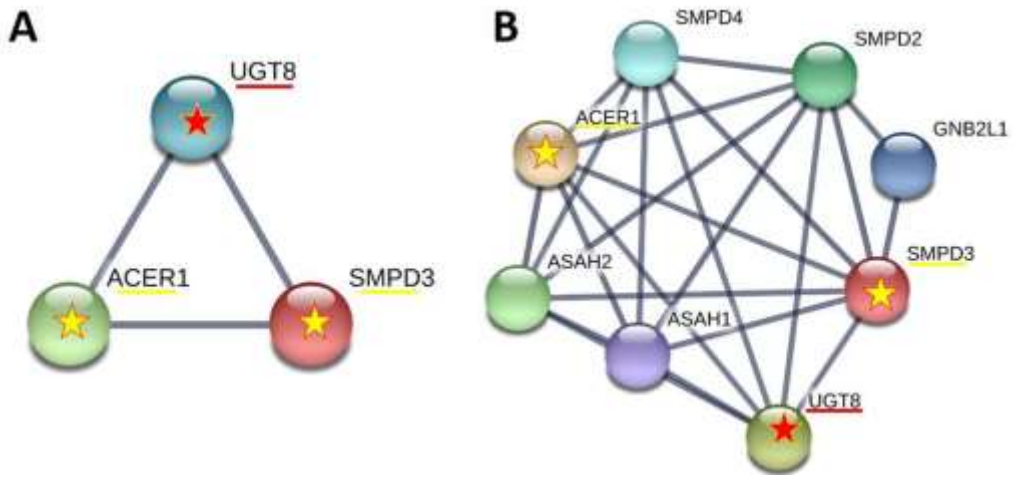


Figura 24. PPI del glicogen *UGT8* (A) interacción visualizada a partir de una PPI con todos los genes expresados diferencialmente, (B) interacción de UGT8 aumentando a 10 el número de interacciones. UGT8 se relaciona al metabolismo de la ceramida, la alteración de otros dos genes que participan en el mismo proceso nos sugiere que ésta puede estar alterada por la expresión de las oncoproteínas del VPH.

Los 3 genes que formaron esta red independiente disminuyen su expresión cuando son silenciadas las oncoproteínas virales; estos genes están relacionados al metabolismo de los esfingolípidos, en el que UGT8 juega un papel importante por su actividad enzimática, modificando a la ceramida, que es una importante molécula que actúa como un segundo mensajero para desencadenar cascadas de señalización.

El uso de esta herramienta bioinformática, nos permitió la predicción de tres fenotipos relacionados a la glicosilación que podrían estarse viendo afectados por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH18; estas vías de glicosilación afectadas por la expresión diferencial de las enzimas que participan en alguna etapa de ellas son: glicosliación de proteínas que contienen multiples repetidos de motivos EGF-like como las proteínas y ligandos NOTCH, glicosilación tipo mucina (biosíntesis del antígeno Tn y T) y metabolismo de esfingolípidos (ceramida).

8.10 Glicogenes con expresión diferencial con un Z-score de ≥ 1.5 y ≤ 1.5

Los análisis realizados en este estudio están basados en la expresión diferencial de glicogenes cuyo valor de Z-score se encuentra entre ≥ 2 y ≤ -2, pues es el valor recomendado

por los fabricantes del microarreglo; sin embargo, algunos glicogenes con valores de Z-score 1.9 no se tomaron en cuenta a pesar de estar muy cercanos al límite de corte. Con el propósito de observar si hay más glicogenes relacionados a los fenotipos previamente descritos, incluimos este apartado con los glicogenes que se encuentran con un valor de Z-score ≥ 1.5 y ≤ -1.5.

Los glicogenes que se encuentran entre estos valores de Z-score son 25 en total, de los cuales en 14 disminuye su expresión y en 11 aumentan sus transcritos por el silenciamiento de E6 y E7 del VPH18. La tabla 11 contiene los glicogenes identificados con cambios de expresión pero con un corte de Z-score ≥ 1.5 y ≤ -1.5.

Tabla 8. Glicogenes con expresión diferencial por el silenciamiento parcial de E6 y E7, con un corte de Z-score de ≥ 1.5 y ≤ -1.5.

Gen/ Nombre	Función
Glicogenes con aumento de expresión	
ST8SIA4 Alfa-2,8-sialiltransferasa 4	Transferencia de ácido siálico en enlace α2-8 (síntesis de ácido polisiálico)
GALNTL5 N-Acetilgalactosaminiltransferasa-like 5	Transferencia de N-Acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de serina o treonina (O-glicosilación)
MGAT1 Beta-1,2-N-Acetilglucosaminiltransferasa	Síntesis de N-glicanos híbridos y complejos
KDELC2 O-Glucosiltransferasa	Adición de O-Glucosa sobre residuos conservados de serina de proteínas que contienen repetidos EGF-like
HPSE2 Heparanasa 2	Hidrólisis del proteoglicano heparán sulfato
B4GALT4 Beta 1,4-Galactosiltransferasa	Transferencia de galactosa en enlace β1-4 a GlcNAc, Glc
GALNT6 N-Acetilgalactosaminiltransferasa 6	Transferencia de N-Acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de serina o treonina (O-glicosilación)
ST3GAL3 Alfa-2,3-sialiltransferasa 3	Transferencia de ácido sálico a sustratos que contienen galactosa
GALC Galactosilceramidasa	Hidrólisis de la galactosilceramida (GalCer)

PIGS GPI Clase S	Componente de una unidad multienzimática glicosilfosfatidilinositol transaminasa
PIGX GPI Clase X	Componente de una unidad multienzimática glicosilfosfatidilinositol transaminasa
poFUT2 O-Fucosiltransferasa 2	Adición de O-Fucosa sobre residuos conservados de serina y treonina de proteínas que contienen repetidos TSR
MGAT4B Beta-1,4-N-Acetilglucosaminiltransferasa	Transferencia de N-acetilglucosamina a residuos de manosa
Glicogenes con baja expresión	
FUT6 Fucosiltransferasa 6	Transferencia de fucosa a sustratos sialilados (síntesis de sialil-lewis x)
B4GALNT2 N-Acetilgalactosaminiltransferasa 2	Transferencia de residuos de galactosa a N-acetilgalactosamina biosíntesis del antígeno Sd(a)
DPM2 Dolicol-fosfato Manosiltransferasa 2	Sub unidad regulatoria de DPM1
DPM1 Dolicol-fosfato Manosiltransferasa 1	Transferencia de manosa al dolicol monofosfato, para la generación de dolicolfosfatomanosa (Dol-P-Man)
GLT8D1 Xilosiltransferasa 1 (GXYLT1)	Adición de xilosa sobre la O-glucosa que están unidos a residuos de serina en repetidos EGF-like
MAN1B1 Manosidasa alfa clase 1B	Manosidasa que cataliza la hidrólisis de Man9GlcNAc a Man8GlcNAc
PIGF GPI Clase F	Componente de una unidad multienzimática glicosilfosfatidilinositol transaminasa
EXT2 Exostosina Glicosiltransferasa 2	Participa en la elongación del heparán sulfato
HS3ST5 Glucosamina 3-O-sulfotransferasa 5	Transferencia de grupos sulfato para la síntesis de heparán sulfato y heparina
GALNT14 N-Acetilgalactosaminiltransferasa 14	Transferencia de N-AcetilGalactosamina (GalNAc) a residuos de serina o treonina (O-glicosilación)
LFNG Beta1,3-N-Acetilglucosaminiltransferasa (lunatic fringe)	Elongación de residuos de O-fucosa unidos a repetidos EGF-like con D-GlcNAc

Al tomar en cuenta estos glicogenes, se pude observar que algunos de ellos están participando en procesos que no se habían incluido para los glicogenes del corte inicial, como la biosíntesis de proteoglicanos (específicamente del heparán), los componentes de la unidad multienzimática de la vía del glicosilfosfatidilinositol (GPI). También se pudieron identificar enzimas que participan en los procesos de glicosilación que se describieron con los glicogenes con un corte de Z-score de ≥ 2 y ≤ -2, los cuales son: componentes de la glicosilación tipo mucina, genes que codifican a enzimas que glicosilan proteínas y ligandos NOTCH y del metabolismo de la ceramida.

Buscamos las redes de interacción proteína-proteína, para confirmar la participación de los glicogenes que no se habían incluido, con los fenotipos previamente descritos; los resultados se pueden observar en la figura 25, los nodos de color verde son los glicogenes con un valor de Z-score ≥ 2 y ≤ -2, mientras que los nodos rojos representan los glicogenes cuya expresión es alterada con un corte de Z-score ≥ 1.5 y ≤ -1.5.

En el panel A se encuentran los glicogenes relacionados en la glicosilación de proteínas con múltiples repetidos del motivo EGF-like, entre los cuales se encuentran Lunatic Fringe (que adiciona sobre la O-fucosa presente sobre los múltiples repetidos de motivos EGF-like una molécula de GlcNAc,), KDELC2 (homólogo de RUMI) una O-glucosiltransferasa que adiciona glucosa sobre los repetidos EGF-like y la xilosiltransferasa GLT8D1, que adiciona xilosa sobre la O-glucosa para que posteriormente por XXYLT1, adicionar otra xilosa sobre este disacárido, también se incluyeron 2 enzimas que glicosilan a proteínas con repetidos del tipo trombospondina (TSR-like; POFUT2 y DPY19L1) pero que también se encuentran regulando la vía NOTCH.

En el panel B se encuentran las enzimas relacionadas a la glicosilación del tipo mucina, donde se puede observar a más miembros de la familia ppGalNAc que son *GALNT6, GALNTL5* y *GALNT14*, así mismo se incluyeron en esta red enzimas que participan en la ramificación de los diversos cores de la glicosilación tipo mucina como B4GALT4, MGAT1, FUT6, ST3GAL3. En el panel C se observa la incorporación de GALC, que es la enzima que hidroliza la galactosilceramida. Al incluir estos glicogenes con el corte de Z-score ≥ 1.5 y ≤ -1.5, se refuerzan los resultados previamente descritos de los fenotipos predichos a partir de las PPI.

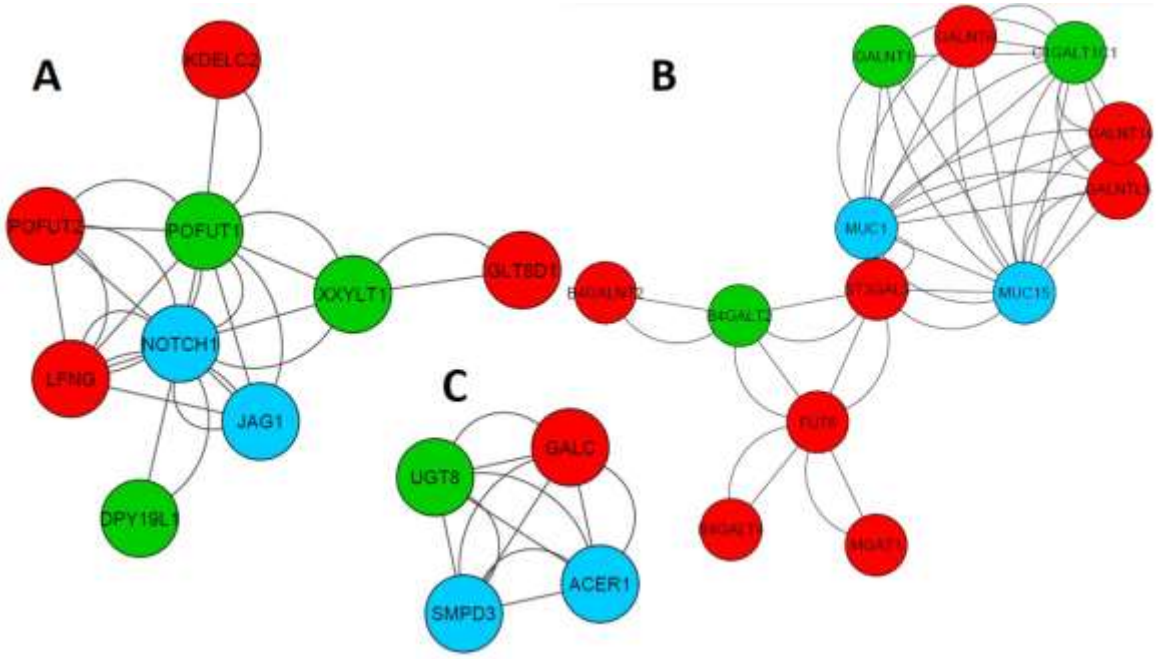


Figura 25. PPI que incluye los glicogenes alterados con un corte de Z-score de ≥ 1.5 y ≤ -1.5. A) glicogenes relacionados a la regulación de la vía NOTCH, B) glicogenes relacionados a la glicosilación tipo mucina, C) glicogenes relacionados al metabolismo de la ceramida. Los nodos en verde representan los glicogenes con un Z-score de ≥ 2 y ≤ -2, mientras que los nodos rojos corresponden a los glicogenes con un Z-score de ≥ 1.5 y ≤ -1.5.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo realizado se centró en conocer el efecto de las proteínas E6 y E7 sobre la expresión de genes relacionados a la glicosilación, así como en los cambios en la expresión de glicanos. Para cumplir los objetivos planteados se trabajó con la línea celular proveniente del cérvix llamada HeLa que expresan las oncoproteínas E6 y E7 encargadas del mantenimiento del fenotipo maligno. Para la inhibición de la expresión de estas proteínas, aprovechamos un mecanismo biológico propio de las células animales, que consiste en el proceso de degradación de RNAm específicos a partir del alineamiento de estos a una secuencia complementaria, la formación de RNAds impide la expresión de las proteínas que serían sintetizadas a partir del RNAm blanco, este proceso es llamado RNA de interferencia (RNAi) (Elbashir *et al.*, 2001). Esta técnica permite la investigación de los fenotipos relacionados a la inhibición de proteínas específicas, que en este estudio son E6 y E7 del VPH18.

9.1 Glicogenes expresados diferencialmente y su relación con el cáncer

A pesar que diversos estudios han evaluado la alteración en la regulación de la expresión de glicogenes y su implicación clínica en diferentes tipos de cáncer; en CaCu este tema no ha sido ampliamente explorado, en este trabajo reportamos glicogenes que por primera vez se describen con expresión diferencial en una línea de origen de cérvix y que posiblemente estén siendo moduladas por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.

Los genes que identificamos, con cambios en su expresión la mayoría ha sido reportados en otros tipos de cáncer (ver tabla 7). Las implicaciones clínicas que surgen a raíz de una expresión no regulada de algunos glicogenes son amplias y pueden ir desde el establecimiento de fenotipos metastásicos (transición epitelial-mesenquima), migración, adhesión celular y resistencia a fármacos; la homeostasis celular también se puede ver afectada por la alteración de vías de señalización que son reguladas según el nivel de glicosilación de las proteínas efectoras, por ejemplo, la vía NOTCH.

9.2 Alteración de glicanos de superficie celular

A pesar de la importancia de las estructuras glicánicas a nivel de membrana celular y su relación con el desarrollo de cáncer, poco se ha investigado en la composición de estas estructuras en cáncer de cérvix o en líneas celulares provenientes de la misma, ni mucho menos se han asociados cambios en la biosíntesis de estas estructuras dependientes de la expresión de las oncoproteínas virales.

Nosotros realizamos una evaluación de la presencia y cantidad de algunos glicanos de superficie celular en la línea celular HeLa y en una silenciada parcialmente en *E6* y *E7*, utilizando lectinas que reconocen estructuras glicánicas específicas. Mediante esta técnica nuestros resultados indicaron que no hay cambios de expresión en las estructuras NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAc, Neu5Acα2-6Gal(NAc)-R, Fucα1-2Gal-R y α-D-manosil terminal y α-D-glucosil terminal (ver tabla 9), lo que sugiere que E6 y E7, no afectan su biosíntesis.

Cuando se usaron las lectinas JAC y PNA, se detectó un cambio en la señal de fluorescencia en las células silenciadas (tabla 9 y 10), estas lectinas reconocen los antígenos de cadena corta T, sT y dsT, los cuales son sintetizados en la vía de la O-glicosilación. Los resultados observados con estas lectinas específicamente con la lectina PNA, que solo reconoce al antígeno T, concuerdan con la expresión diferencial de los genes *GALNT1* y *C1GALT1C1* ya que son los responsables de la biosíntesis de los antígenos Tn y T respectivamente y disminuyen su expresión por el silenciamiento de E6 y E7. Los cambios en la señal de fluorescencia observados con la lectina JAC que reconoce tres diferentes antígenos T, sT y dsT, no fueron concordantes con la expresión diferencial de los glicogenes, el aumento en la intensidad de fluorescencia observado en la línea silenciada puede ser debido a la propia naturaleza de la lectina que reconoce diversos ligandos como los ya mencionados además también reconoce al antígeno Tn (Tachibana *et al*., 2005), lo que pudo provocar un aumento en la señal de fluorescencia.

Previamente un estudio evaluó el perfil de N-glicanos con espectrometría de masas comparando diversas líneas celulares, en ella se evaluaron líneas celulares provenientes del cérvix VPH positivas y fueron comparadas con una negativa a VPH, sus resultados mostraron que entre las líneas VPH positivas y negativas tienen un diferente perfil de N-glicanos, los

cambios pueden ser atribuidos a la infección por el virus, específicamente por la expresión de E6 y E7 (Hua *et al.*, 2014). Esto nos permite hipotetizar que la infección del VPH podría estar induciendo cambios en las estructuras glicánicas expuestas al exterior de las células y que algunos de estos cambios pueden ser regulados por la expresión de E6 y E7; ya que como se observó en nuestros resultados E6 y E7, están modificando la expresión del antígeno T, ya que al silenciar parcialmente a ambas oncoproteínas, la cantidad de la señal del antígeno T también disminuyen.

9.3 Fenotipos predichos a partir de las redes de interacción proteína-proteína

9.3.1 E6 y E7 del VPH18 afectan la expresión de glicogenes que se encargan de regular la vía NOTCH

Los análisis bioinformáticos de las PPI, permitieron la identificación de la asociación de 2 genes (*POFUT1* y *XXYLT1*), que participan en la glicosilación de proteínas ricas en repetidos EGF-like, entre las proteínas que contienen estos repetidos encontramos a proteínas y ligandos NOTCH, las cuales funcionan en la vía de señalización celular con el mismo nombre, y se encuentra regulando procesos importantes del desarrollo como la diferenciación celular, el destino y asimetría celular, la apoptosis,la angiogénesis, entre otros. La vía NOTCH es regulada a diferentes niveles, sin embargo su correcto funcionamiento depende del estado de glicosilación en los múltiples repetidos de los motivos EGF-like presentes en las proteínas y ligandos de esta vía. La glicosilación de los motivos EGF-like son catalizadas por glicosiltransferasas como POFUT1, Fringe, poGLUT1, GXYLT1/2, XXYLT1 (Haines e Irvine, 2003), que actúan de manera coordinadas; por ejemplo para un correcto plegamiento y localización de las proteínas con repetidos EGF-like es necesaria la adición de glucosa y fucosa (catalizadas por poGLUT1 y por POFUT1 respectivamente). Sin embargo, la glucosa puede seguir siendo decorada por la adición de xilosa (por las enzimas GXYLT1/2, XXYLT1), que regula negativamente la vía; mientras que la fucosa por si sola es capaz de activar la vía de señalización, pero esta al ser decorada por la adición de GlcNAc (por la enzima Fringe) va a favorecer la interacción con los ligandos (Delta1/3/4 o Jagged1/2).

En diversos tipos de cáncer se han encontrado alteraciones funcionales de la vía, en algunos tipos de tumores esta vía esta sobreregulada y se ha relacionado con la carcinogénesis por lo que funciona como promotora tumoral, mientras que en otros tumores esta es subregulada ya que está funcionando como supresora de tumores y es por eso su inactivación (Aithal y Rajeswari, 2013).

En la actualidad los estudios referentes a la expresión de enzimas que se relacionan a la glicosilación de las proteínas con repetidos EGF-like en muestras clínicas de Cacu o líneas celulares del cérvix son nulos, sin embargo, estudios sobre la expresión de proteínas NOTCH, si han sido reportados (Maliekal *et al.*, 2008). El papel que juega NOTCH durante la carcinogénesis del cérvix, no ha sido completamente elucidado. En líneas celulares de cáncer cervical positivas a VPH (HeLa, C40I, C4-II, SiHa y Caski) se ha mostrado que hay una disminución a nivel de RNAm y proteína de NOTCH1, comparadas con queratinocitos primarios y con C33A (línea celular de carcinoma de cérvix negativa a VPH), resultados similares fueron observados en muestras clínicas de CaCu, donde los niveles de expresión de NOTCH1 disminuyen en comparación con tejido sano (Talora *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2009), lo que podría sugerir que E6 y E7 regula de manera negativa a NOTCH1. Una expresión constitutiva de la forma activa de NOTCH1 (ICD), induce al arresto de crecimiento celular en líneas celulares VPH-positivas, lo que sugiere que esta vía está actuando como supresora de tumores en cáncer de cérvix ocasionada por la infección del VPH (Talora *et al.*, 2005).

La O-fucosilación de proteínas con repetidos EGF-like va a asistir a las proteínas a un correcto plegamiento, sin embargo, en HeLa el silenciamiento de E6 y E7 aumenta la expresión de *POFUT1*, sugiriendo que las oncoproteínas virales podrían estar guiando a un plegamiento incorrecto de las proteínas NOTCH, afectando negativamente la vía de señalización. Utilizando una herramienta bioinformática de Qiagen (http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?app=TFBS), que identifica posibles factores de transcripción en la región promotora de *POFUT1* que podrían estar regulando a este gen, identificamos 5 sitios de unión para p53, esto nos sugiere que p53 regula la

expresión transcripcional de *POFUT1*. E6 al degradar a p53 disminuye de manera indirecta la expresión de *POFUT1* en la línea celular HeLa; esta idea puede relacionar la evidencia que describe que la expresión de NOTCH1 es regulada por p53, tomando en cuenta que POFUT1 y NOTCH1 son expresadas de forma simultánea (Yugawa *et al.*, 2007).

9.3.2 Alteraciones en la glicosilación tipo mucina

La glicosilación del tipo mucina es una de las más abundantes en proteínas de células animales, la glicosilación de las mucinas es altamente ramificada, sin embargo, en cáncer las alteraciones en la expresión de enzimas que participan en su glicosilación, generan glicanos de cadena corta, confiriendo ventajas para sobrevivir a las células tumorales. La glicosilación tipo mucina (O-glicosilación), inicia por la adición de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de serina y treonina de las mucinas, este primer paso es generado por una familia de enzimas llamadas polipéptido N-acetilGalactosaminil transferasas (ppGalNAc), que está formada por 20 miembros, aunque cada uno de ellos se expresa en diferentes tejidos y también pueden ser dependientes de alguna etapa celular específica. A través de ensayos inmunnohistoquímicos, en tejido cérvix sano se han detectado la expresión de cuatro miembros de esta familia, ppGalNAc1, 2, 3 y 12 (Bennett *et al.*, 2012), mientras que el silenciamiento de E6 y E7, *GALNT1*, disminuye su expresión, lo que nos podría sugerir que este glicogen es sobreexpresado en HeLa. *GALNT1* podría estar participando en el establecimiento del fenotipo maligno en cérvix, ya que la sobreexpresión de este gen se relaciona con la adhesión de las células cancerígenas al endotelio vascular y aumenta su capacidad de metástasis (Beaman, 2014).

La familia de enzimas ppGalNAc, genera un antígeno de cadena corta el Tn, sin embargo, específicamente en la línea celular HeLa este antígeno de cadena corta no está presente en la superficie celular (Medeiros *et al.*, 2013); este antígeno sirve de sustrato para otras enzimas para la biosíntesis de los antígenos sTn, T (que puede seguir siendo ramificado, hasta generar glicanos más complejos). La síntesis del antígeno T depende de la enzima C1GALT1 y de su chaperona molecular específica C1GALT1C1, las alteraciones en alguna de estas dos proteínas influirá en la síntesis del antígeno T. El gen *C1GALT1C1*,

disminuye su expresión por el silenciamiento de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH, lo que sugeriré que el antígeno Tn está siendo transformado al antígeno T en presencia de las oncoproteínas virales y por esta razón el antígeno Tn no se detecta en la superficie de HeLa.

A pesar de que ambos antígenos (Tn y T), son de importancia clínica por su asociación con fenotipos malignos, en CaCu pocos son los estudios que se han realizado para evaluar su expresión (Hirao *et al.*, 1993; Hamada *et al.,* 1993; Terasawa *et al.*, 1996); y estos estudios no son concluyentes, ya que hablan de una expresión heterogénea de ambos antígenos en los tumores de cérvix, por lo que no ha sido posible una asociación clínica o su uso en el pronóstico en CaCu.

Al encontrar alteraciones en la glicosilación del tipo mucina, nosotros realizamos una búsqueda de mucinas que presentaron un cambio de expresión por silenciamiento de E6 y E7, entre las mucinas cuya expresión se alteró (con un Z-score ≥ 2 y ≤ -2) están la mucina 15 (sobreregulada) y la mucina 13 (subregulada). La mucina 13 se localiza anclada en membrana celular y se ha propuesto que participa en vías de señalización celular al contener múltiples motivos del tipo EGF-like (Chauhan *et al.*, 2009) y también por su sobreexpresión se ha relacionado con aumento en la metástasis en cáncer de ovario, colón y gástrico (Shimamura *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013). En CaCu, no se han reportado alteraciones de la mucina 13, sin embargo, con los resultados obtenidos en el microarreglo podemos hipotetizar que la mucina 13, podría estar relacionada con el mantenimiento del fenotipo maligno en HeLa.

9.3.3 *UGT8* y el metabolismo de la ceramida

En la vía del metabolismo de esfingolípidos, la ceramida juega un papel central, ya que ésta funciona como un segundo mensajero para desencadenar cascadas de señalización. La ceramida interactúa con proteínas blanco específicas regulando diversos procesos celulares como el crecimiento celular, senescencia, diferenciación y apoptosis (Bose *et al.*, 1995). Algunas proteínas blanco para la señalización mediada por la ceramida son proteínas fosfatasas activadas por la ceramida (CAPP) como PP1 y PP2A, quienes a su vez modulan la actividad de c-Myc, c-Jun, defosforilación de pRb, BCL-2; otras proteínas que

también son moduladas durante la señalización por la ceramida son Proteínas kinasas (catepsina D), MEKK (MAPK/ERK kinasa kinasa), caspasas, CDKs, telomerasa entre otras. Esta vía también altera el potencial de membrana de la mitocondria, a través de la defosforilación de BCL-2, permitiendo la liberación de citocromo C y el aumento de especies reactivas de oxígeno para inducir la apoptosis (Ogretmen y Hannun, 2004).

La ceramida puede ser generada por 2 vías metabólicas (Bieberich., 2008), la síntesis de novo (a partir de la serina y ácidos grasos- coenzima A, realizada en el RE) o por hidrólisis de la esfingosina (por el recirculamiento de los esfingolípidos en la membrana celular). El silenciamiento de E6 y E7, disminuye la expresión 2 genes que participan en la síntesis de la ceramida, por la vía del recirculamiento de los esfingolípidos (*ACER1* y *SMPD3*). *ACER1* codifica para una enzima que hidroliza la ceramida para la síntesis de la esfingosina, este intermediario puede ser transformado a esfingosinfosfocolina y posteriormente a esfingomielina, la hidrólisis de la esfingomielina da como resultado la ceramida catalizada por SMPD3 (figura 26). La ceramida puede ser modificada por adición de carbohidratos para la generación de 2 compuestos, Glucosilceramida (GluCer) catalizada por UGCG, UGCGL1 (aumento de expresión en el microarreglo) y UGCGL2 y Galactosilceramida (GalCer) catalizado por UGT8, impidiendo una transducción de señales mediada por esta molécula. La acumulación de GluCer y GalCer, le otorgan a las células tumorales (figura 26), la capacidad de resistencia a fármacos, inhibición de la apoptosis y aumento en su capacidad de metástasis (Lavie *et al.*, 1996; Owczarek *et al.*, 2013).

La mayor expresión de UGT8 en la línea celular HeLa nos permite hipotetizar que podría haber acumulamiento de GalCer, impidiendo la apoptosis por la vía de la ceramida, un factor que podría reforzar esta teoría es que la enzima encargada de la hidrólisis de GalCer, la Galactosilceramidasa (GALC), en el análisis del microarreglo, el transcrito que codifica para esta enzima tiene un valor de Z-score de 1.589 por efecto del silenciamiento de E6 y E7 que no está en el rango establecido para su inclusión en el estudio, sugiriendo que en HeLa este gen disminuyen sus niveles de transcrito, mientras que *UGT8* aumenta su expresión.

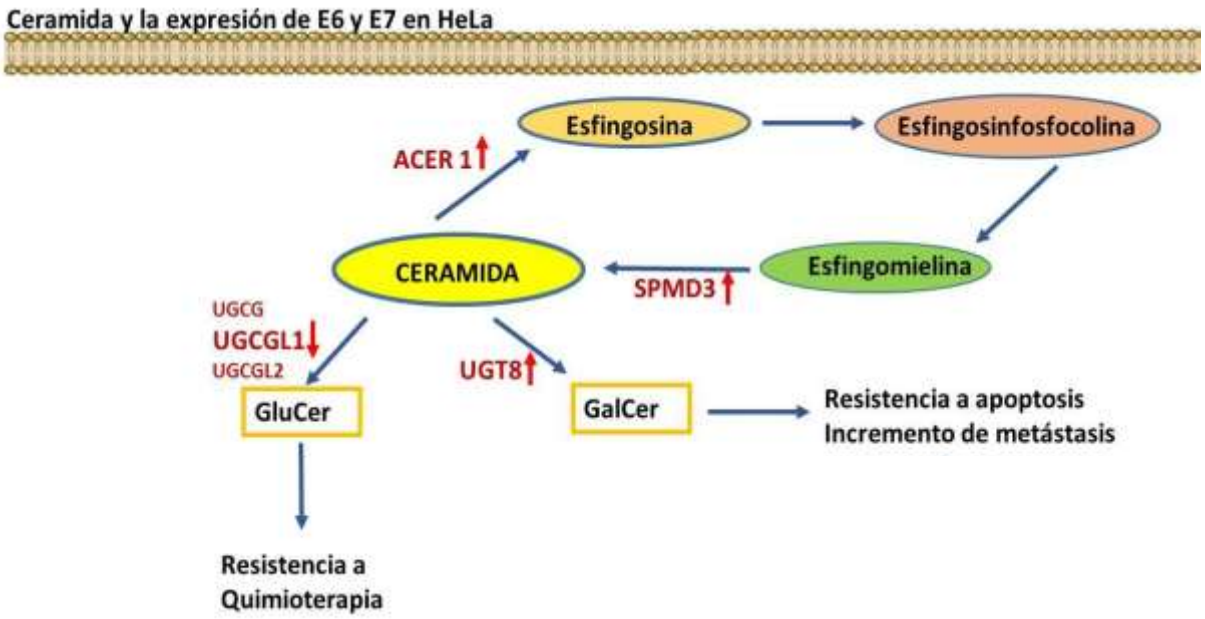


Figura 26. E6 y E7 afectan la expresión de genes involucrados con el metabolismo de la ceramida. Genes expresados diferencialmente por el silenciamiento de E6 y E7 en HeLa y su partición en el metabolismo de esfingolípidos y sus repercusiones en procesos cancerígenos.

En la secuencia promotora del gen *UGT8*, contiene sitios de unión para factores de transcripción (http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?app=TFBS) que podrían estar regulando su expresión, los cuales comprenden elementos de respuesta a AMP-cíclico, y miembros de la familia E2F, entre otros. Tomando en cuenta que E7 interactúa con el complejo pRb-E2F, disociando el complejo, enviando a degradación a pRb y liberando los factores de transcripción, la liberación de E2F, podría estar relacionado al incremento de *UGT8*. Ganguly y Ganguly, 2015, realizaron una transfección de E6-VPH18 y E6-VPH11 (bajo riesgo) en una línea celular de cáncer oral, y analizaron los genes que son expresados diferencialmente en la línea transfectada contra los de la línea sin transfectar; sus resultados mostraron un aumento de *UGT8* con E6 de bajo riesgo, pero al comparar con E6 del VPH18, el aumento fue más evidente, sugiriendo que E6 también podría estar regulando la expresión de *UGT8* y que este aumento puede ser dependiente del tipo de E6, si proviene de un VPH de alto o bajo riesgo.

10. CONCLUSIONES

- El silenciamiento de E6 y E7 del VPH18 en la línea celular HeLa afecta la expresión de 1157 genes, de los cuales 613 genes disminuyen su expresión y 544 la aumentan (valor de Z-score ≥ 2 y ≤ -2).
- Los términos mayormente enriquecidos en el análisis con DAVID fueron: organización celular, señalización celular, adhesión, ciclo celular, diferenciación y la respuesta inmune, los cuales son procesos que se han relacionado con la carcinogénesis.
- El silenciamiento de E6 y E7 del VPH18 modifica la expresión de 16 glicogenes, de los cuales 9 aumentan su expresión (*ALG14, POFUT1, FUT4, MAN2A1, DPY19L1, C3orf21 (XXYLT1), UGT2B17, IDUA, UGCGL1*) y 7 la disminuyen (*GALNT1, B4GALT2, UGT8, MANBAL, PIGV, FCMD, C1GALT1C1*).
- La cuantificación de los transcritos de *POFUT1, ALG14* y *UGT8,* en la línea celular HeLa con un silenciamiento parcial de E6 y E7, tuvieron significancia estadística validando los resultados observados en los microarreglos, mientras que los genes *XXYLT1, DPY19L1* y *PIGV* no, sin embargo, exhiben una tendencia de expresión similar a los resultados de los microarreglos.
- E6 y E7 del VPH18 modifican la expresión del antígeno T, ya que al silenciar parcialmente ambas oncoproteínas este antígeno disminuye en la línea celular que expresa niveles bajos de E6 y E7.
- E6 y E7 no modifican la expresión de las estructuras glicánicas como: NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAc, Neu5Acα2-6Gal(NAc)-R, Fucα1-2Gal-R y α-D-manosil y α-D-glucosil.
- El análisis "*in silico*" de las interacciones proteína-proteína, nos permite hipotetizar tres fenotipos: la regulación de la vía NOTCH, por el aumento de expresión de *POFUT1* y *XXYLT1*, alteraciones en la glicosilación del tipo mucina, relacionadas a la biosíntesis del antígeno T y la acumulación de la galactosilceramida (GalCer) por UGT8; todos estos fenotipos están participando en procesos tumorales en la línea celular HeLa.

11. PERSPECTIVAS

El análisis de los glicogenes alterados por el silenciamiento parcial de E6 y E7, combinados con los análisis bioinformáticos realizados con los glicogenes identificados, han sentado las bases para desarrollo de proyectos enfocados al estudio de las vías de glicosilación que estamos reportando como alteradas.

Proyectos enfocados a:

- Evaluar la actividad de la vía NOTCH, para elucidar su participación durante el establecimiento del fenotipo maligno en el cérvix.
- Realizar un estudio de las mucinas por ejemplo la mucina 13, que son alteradas por la expresión de E6 y E7, su estado de glicosilación y su posible participación en los procesos cancerígenos.
- Evaluar los niveles de expresión de la proteína UGT8 en líneas celulares de cérvix, los niveles de GalCer; realizar un silenciamiento del gen *UGT8* y evaluar si las células con el silenciamiento son sensibles a la ceramida.
- Analizar cómo E6 y E7 regulan la expresión de los glicogenes identificados y si este cambio favorece el fenotipo maligno.
- Analizar los niveles de expresión de los glicogenes *POFUT1* y *UGT8* en muestras clínicas de cáncer de cérvix.
- Evaluar la expresión de glicanos de superficie celular en las líneas celulares estudiadas empleando metodologías más sensibles como la espectrometría de masa o cromatografía de afinidad, para conocer con más detalle las estructuras glicánicas que se ven afectadas por la expresión de E6 y E7.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, K. L. and Pierce, J. M. (2010) 'Lectin-Based Glycoproteomic Techniques for the Enrichment and Identification of Potential Biomarkers', in Fukuda, M. (ed.) *Glycobiology*. Academic Press (Methods in Enzymology), pp. 461–476. doi: https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)80020-5.

Aithal, M. G. S. and Rajeswari, N. (2013) 'Role of Notch signalling pathway in cancer and its association with DNA methylation', *Journal of Genetics*, 92, pp. 667–675. doi: 10.1007/s12041-013-0284-5.

Amin, A. A., Titolo, S., Pelletier, A., Fink, D., Cordingley, M. G. and Archambault, J. (2000) 'Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro.', *Virology*, 272(1), pp. 137–50. doi: 10.1006/viro.2000.0328.

Au Yeung, C. L., Tsang, W. T., Tsang, T. Y., Co, N. N., Yau, P. I. and Kwok, T. T. (2010) 'HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53', *Oncology Reports*, 24, pp. 1599–1604. doi: 10.3892/or.

Beaman, E. M. and Brooks, S. A. (2014) 'The extended ppGalNAc-T family and their functional involvement in the metastatic cascade', *Cellular and Molecular Biology*, 29, pp. 293–304.

Bennett, E. P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T. A., Fritz, T. A. and Tabak, L. A. (2012) 'Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family', *Glycobiology*, 22(6), pp. 736–756. doi: 10.1093/glycob/cwr182.

Bernard, H. (2005) 'The clinical importance of the nomenclature , evolution and taxonomy of human papillomaviruses', *Journal of Clinical Virology*, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.jcv.2004.10.021.

Bieberich, E. (2008) 'Ceramide signaling in cancer and stem cells', *Future Lipidol*, 3(3), pp. 273–300. doi: 10.2217/17460875.3.3.273.

Bose, R., Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z. and Kolesnick, R. (1995) 'Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: An alternative mechanism for generating death signals', *Cell*, 82(3), pp. 405–414. doi: 10.1016/0092-8674(95)90429-8.

Bravo, I. G. (2004) 'Mucosal Human Papillomaviruses Encode Four Different E5 Proteins Whose Chemistry and Phylogeny Correlate with Malignant or Benign Growth', *Journal of Virology*, 78(24), pp. 13613–13626. doi: 10.1128/JVI.78.24.13613.

Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1999) 'The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth.', *The EMBO journal*, 18(9), pp. 2449–58. doi: 10.1093/emboj/18.9.2449.

Broeck, A. V. D., Vankelecom, H., Eijsden, R. V., Govaere, O. and Topal, B. (2012) 'Molecular markers associated with outcome and metastasis in human pancreatic cancer', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(68), pp. 1–10.

Bryan, J. T. and Brown, D. R. (2001) 'Transmission of Human Papillomavirus Type 11 Infection by Desquamated Cornified Cells', *Virology*, 281, pp. 35–42. doi: 10.1006/viro.2000.0777.

Burgers, W. A., Blanchon, L., Pradhan, S., De Launoit, Y., Kouzarides, T. and Fuks, F. (2007) 'Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases', *Oncogene*, 26(11), pp. 1650–1655. doi: 10.1038/sj.onc.1209950.

Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M. and Hoppe-seyler, F. (2003) 'siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells', *Oncogene*, 22, pp. 5938–5945. doi: 10.1038/sj.onc.1206894.

Cai, Q., Liang, Lv., Shao, Q., Li, X. and Dian, A. (2013) 'Human papillomavirus early proteins and apoptosis', *Gynecologic Oncology*, 287, pp. 541–548. doi: 10.1007/s00404-012-2665-z.

Castellsagué, X. (2008) 'Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer', *Gynecologic Oncology*, 110, pp. 4–7. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.07.045.

Castellsagué, X., Bosch, F. X. and Muñoz, N. (2002) 'Environmental co-factors in HPV carcinogenesis', *Virus Research*, 89(2), pp. 191–199. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00188-0.

Chakrabarti, O. and Krishna, S. (2003) 'Molecular interactions of " high risk " human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins : implications for tumour progression', *Journal of Biosciences*, 28(3), pp. 337–348.

Chauhan, S. C., Vannatta, K., Ebeling, M. C., Vinayek, N., Watanabe, A., Pandey, K. K., Bell, M. C., Koch, M. D., Aburatani, H., Lio, Y. and Jaggi, M. (2009) 'Expression and functions of transmembrane mucin MUC13 in ovarian cancer', *Cancer Research*, 69(3), pp. 765–774. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0587.

Chen, Y. C., Huang, R. L., Huang, Y. K., Liao, Y. P., Su, P. H., Wang, H. C., Chang, C. C., Lin, Y. W., Yu, M. H., Chu, T. Y. and Lai, H. C. (2014) 'Methylomics analysis identifies epigenetically silenced genes and implies an activation of β-catenin signaling in cervical cancer', *International Journal of Cancer*, 135(1), pp. 117–127. doi: 10.1002/ijc.28658.

Cheng, L., Luo, S., Jin, C., Ma, H., Zhou, H. and Jia, L. (2013) 'FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K / Akt signaling pathway', *Cell Death and Disease*, pp. 1–12. doi: 10.1038/cddis.2013.450.

Christiansen, M. N., Chik, J., Lee, L., Anugraham, M., Abrahams, J. L. and Packer, N. H. (2014) 'Cell surface protein glycosylation in cancer', *Proteomics*, 14(4–5), pp. 525–546. doi: 10.1002/pmic.201300387.

Ciolczyk-Wierzbicka, D., Bodzioch, M., Gil, D., Zmudzinska, D., Dembinska-Kiec, A. and Laidler, P. (2007) 'Expression of Fucosyltransferases Contributes to Melanoma Invasive Phenotype', *Medicinal Chemistry*, 3, pp. 418–424.

Costantini, S., Bernardo, G. D., Cammarota, M., Castello, G. and Colonna, G. (2013) 'Gene expression signature of human HepG2 cell line', *Gene*, 518(2), pp. 335–345. doi: 10.1016/j.gene.2012.12.106.

Dall'Olio, F. (1996) 'Leaders Protein glycosylation in cancer biology : an overview', *Clinical Pathology: Molecular Phatology*, 49, pp. 126–135.

Davy, C. and Doorbar, J. (2007) 'G2 / M cell cycle arrest in the life cycle of viruses', *Virology*, 368, pp. 219–226. doi: 10.1016/j.virol.2007.05.043.

Ding, M., Wang, H., Wang, J., Zhan, H., Zuo, Y., Yang, D., Liu, J., Wang, W., Ke, C. and Yan, R. (2012) 'ppGalNAc T1 as a Potential Novel Marker for Human Bladder Cancer', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, pp. 5653–5657.

Doorbar, J. (2006) 'Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer', *Clinical Science*, 541, pp. 525–541. doi: 10.1042/CS20050369.

Doorbar, J. (2013) 'The E4 protein; structure, function and patterns of expression', *Virology*, 445(1), pp. 80–98. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.008.

Doorbar, J., Egawa, N., Grif, H. and Kranjec, C. (2015) 'Human papillomavirus molecular biology and disease association', *Reviews in Medical Virology*, 25, pp. 2–23. doi: 10.1002/rmv.

Defaus, S., Gupta, P., Andreua, D. and Gutiérrez-Gallego, R. (2014) 'Mammalian protein glycosylation – structure versus function', *Analyst*, 139, pp. 2944–2967. doi: 10.1039/c3an02245e.

De Villiers, E.-M. (2013) 'Cross-roads in the classification of papillomaviruses', *Virology*, 445(1–2), pp. 2–10. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.023.

De Villiers, E. -M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. and Hausen, H. (2004) 'Classification of papillomaviruses', *Virology*, 324, pp. 17–27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033.

DiMaio, D. and Petti, L. (2014) 'The E5 Proteins', *Virology*, 445(0), pp. 99–114. doi: 10.1186/1756-9966-28-4.

Du, X., Yang, J., Yang, D., Tian, W. and Zhu, Z. (2014) 'The genetic basis for inactivation of Wnt pathway in human osteosarcoma', *BMC Cancer*, 14, p. 450.

Dube, D. H. and Bertozzi, C. R. (2005) 'Glycans in cancer and inflammation - potential for therapeutics and diagnostics', *Nat. Rev. Drug Discovery*, 4, pp. 477–488. doi: 10.1038/nrd1751.

Durzynska, J., Lesniewicz, K. and Poreba, E. (2017) 'Human papillomaviruses in epigenetic regulations', *Mutation Research*, 772, pp. 36–50. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.09.006.

Dziegiel, P., Owczarek, T., Plazuk, E., Gomułkiewicz, A., Majchrzak, M., Podhorska-Okołów, M., Driouch, K., Lidereau, R. and Ugorski, M. (2010) 'Ceramide galactosyltransferase (UGT8) is a molecular marker of breast cancer malignancy and lung metastases', *British Journal Of Cancer*, 103, pp. 524–531. doi: 10.1038/sj.bjc.6605750.

Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. and Doorbar, J. (2015) 'Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia', *Viruses*, 7(7), pp. 3863–3890. doi: 10.3390/v7072802.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) 'Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells', *Nature*, 411, pp. 494–498.

Feng, Y., Ma, X., Deng, L., Yao, B., Xiong, Y., Wu, Y., Wang, L., Ma, Q. and Ma, F. (2017) 'Role of selectins and their ligands in human implantation stage', *Glycobiology*, 27(5), pp. 385–391. doi: 10.1093/glycob/cwx009.

Fuster, M. M. and Esko, J. D. (2005) 'The sweet and sour of cancer : glycans as novel therapeutic targets', *Nature Reviews Cancer*, 5(July), pp. 526–542. doi: 10.1038/nrc1649.

Ganguly, P. and Ganguly, N. (2015) 'Transcriptomic analyses of genes differentially expressed by high-risk and low-risk human papilloma virus E6 oncoproteins', *Virus Disease*, 26(3), pp. 105–116. doi: 10.1007/s13337-015-0259-7.

Garnett, T. O., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P. J. (2006) 'Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis', *Cell Death and Differentiation*, 13, pp. 1915–1926. doi: 10.1038/sj.cdd.4401886.

Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T. and Galloway, D. A. (2004) 'Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6 / E6-AP complex', *Genes and Development*, 18, pp. 2269–2282. doi: 10.1101/gad.1214704.cells.

Glavey, S. V., Huynh, D., Reagana, M. R., Manier, S., Moschetta, M., Kawano, Y., Roccaro, A. M., Ghobrial, I. M., Joshi, L. and O'Dwyer, M. E. (2015) 'The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis', *Blood review*, 29(4), pp. 269–279. doi: 10.1016/j.blre.2015.01.003.

Graham, S. V. (2016) 'Human papillomavirus E2 protein: linking replication, transcription, and RNA processing', *Journal of virology*, 90, pp. 8384–8388. doi: 10.1128/JVI.00502-16.

Guo, J., Li, X., Tan, Z., Lu, W., Yang, G. and Guan, F. (2014) 'Alteration of N-glycans and Expression of Their

Related Glycogenes in the Epithelial-Mesenchymal Transition of HCV29 Bladder Epithelial Cells', *Molecules*, 19, pp. 20073–20090. doi: 10.3390/molecules191220073.

Haines, N. and Irvine, K. D. (2003) 'Glycosylation regulates Notch signalling', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, pp. 786–797. doi: 10.1038/nrm1228.

Hakomori, S. and Kannagi, R. (1983) 'Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers', *Journal of the National Cancer Institute*, 71, pp. 231–251.

Hall, A. H. S. and Alexander, K. A. (2003) 'RNA Interference of Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Induces Senescence in HeLa Cells', *Journal of virology*, 77(10), pp. 6066–6069. doi: 10.1128/JVI.77.10.6066.

Hamada, S., Furumoto, H., Kamada, M., Hirao, T. and Aono, T. (1993) 'High expression rate of Tn antigen in metastatic lesions of uterine cervical cancer', *Cancer letters*, 74, pp. 167–173.

Hegde, R. S. (2002) 'The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology', *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 31, pp. 343–360. doi: 10.1146/annurev.biophys.31.100901.142129.

Hirao, T., Sakamoto, Y., Kamada, M. and Hamada, S. (1993) 'Tn Antigen , a Marker of Potential for Metastasis of Uterine Cervix Cancer Cells', *Cancer*, 72(1), pp. 154–159.

Hirata, H., Hinoda, Y., Zaman, M. S., Chen, Y., Ueno, K., Majid, S., Tripsas, C., Rubin, M., Chen, L. and Dahiya, R. (2010) 'Function of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 (UGT2B17) is involved in endometrial cancer', *Carcinogenesis*, 31(9), pp. 1620–1626. doi: 10.1093/carcin/bgq124.

Holmgren, S. C., Patterson, N. A., Ozbun, M. A. and Lambert, P. F. (2005) 'The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle', *Journal of Virology*, 79(7), pp. 3938–3948. doi: 10.1128/JVI.79.7.3938.

Hu, L. and Ceresa, B. P. (2009) 'Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell – cell fusion', *Virology*, 393(1), pp. 135–143. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.034.

Hua, S., Saunders, M., Dimapasoc, L. M., Jeong, S. H., Kim, B. J., Kim, S., So, M., Lee, K., Kim, J. H., Lam, K. S. and Lebrilla, C. B. (2014) 'Differentiation of Cancer Cell Origin and Molecular Subtype by Plasma Membrane N-Glycan Profiling', *Journal of Proteome*, 13, pp. 961–968.

Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2008) 'Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources', *Nature Protocols*, 4(1), pp. 44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.

Huang, J., Che, M., Lin, N., Hung, J., Huang, Y., Lin, W., Huang, H., Lee, P., Liang, J. and Huang, M. (2014) 'The Molecular Chaperone Cosmc Enhances Malignant Behaviors of Colon Cancer Cells Via Activation of Akt and ERK', *Molecular Carcinogenesis*, 53, pp. E62–E71. doi: 10.1002/mc.22011.

Huang, M., Hu, R., Chou, C. and Hsu, C. (2015) 'Knockdown of GALNT1 suppresses malignant phenotype of hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR signaling', *Oncotarget*, 6(8), pp. 5650–5665.

ICO HPV Information Centre (2015) 'Human Papillomavirus and Related Diseases Report', *HPV Information Centre*, p. 60.

Im, S. S., Wilczynski, S. P., Burger, R. A. and Monk, B. J. (2003) 'Early Stage Cervical Cancers Containing Human Papillomavirus Type 18 DNA Have More Nodal Metastasis and Deeper Stromal Invasion', *Clinical Cancer Research*, 9(714), pp. 4145–4150.

Jenkins, D. (2007) 'Histopathology and Cytopathology of Cervical Cancer', *Disease Markers*, 23(4), pp. 199–212. doi: 10.1155/2007/874795.

Jones, D.L., Alani, R. M. and Munger K. (1997) 'The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1 mediated inhibition of cdk2', *Genes and Development*, 16, pp. 2101–2111. doi: 10.1101/gad.11.16.2101.

Julien, S., Ivetic, A. and Grigoriadis, A. (2011) 'Selectin Ligand Sialyl-Lewis x Antigen Drives Metastasis of Hormone-Dependent Breast Cancers Selectin Ligand Sialyl-Lewis x Antigen Drives Metastasis', *Cancer Research*, 71, pp. 7683–7693. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1139.

Katzenellenbogen, R. A. (2017) 'Activation of telomerase by HPVs', *Virus Research*, 231, pp. 50–55. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.003.

Kim, Y. J. and Varki, A. (1997) 'Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer', *Glycoconjugate Journal*, 14, pp. 569–576.

Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T. and Ishibashi, M. (1997) 'Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94, pp. 11612–11616.

Klingelhutz, A. J., Foster, S. A. and McDougall, J. K. (1996) 'Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16', *Nature*, 380, pp. 79–82.

Krawczyk, E., Suprynowicz, F. A., Sudarshan, S. R. and Schlegel R. (2009) 'Membrane Orientation of the Human Papillomavirus Type 16 E5 Oncoprotein', *Journal of virology*, 84(4), pp. 1696–1703. doi: 10.1128/JVI.01968-09.

Kroes, R. A., Dawson, G. and Moskal, J. R. (2007) 'Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas', *Journal of Neurochemistry*, 103, pp. 14–24.

Kudelka, M. R., Ju, T., Heimburg-molinaro, J. and Cummings, R. D. (2015) *Simple Sugars to Complex Disease — Mucin-Type O-Glycans in Cancer*. 1st edn, *Glycosylation and Cancer*, doi: 10.1016/bs.acr.2014.11.002.

Lacruz Pelea C. (2003) 'Nomenclatura de las lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001)'. *Revista Española de Patología*. 36(1), pp. 5 -10.

Lagunas-martínez, A., Madrid-Marina, V. and Gariglio, P. (2010) 'Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer', *BBA - Reviews on Cancer*, 1805(1), pp. 6–16. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.03.005.

Lavie, Y., Cao, H., Bursten, S. L., Giuliano, A. E. and Cabot, M. C. (1996) 'Accumulation of Glucosylceramides in Multidrug-resistant Cancer Cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(32), pp. 19530–19536.

Lee, C. and Laimins, L. A. (2004) 'Role of the PDZ Domain-Binding Motif of the Oncoprotein E6 in the Pathogenesis of Human Papillomavirus Type 31', *Journal of virology*, 78(22), pp. 12366–12377. doi: 10.1128/JVI.78.22.12366.

Leonard, S. M., Wei, W., Collins, S. I., Pereira, M., Diyaf, A. C., Williams, C., Young, L., Sally, R. and Woodman, C. (2012) 'Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women', *Carcinogenesis*, 33(7), pp. 1286–1293.

Li, N., Franceschi, S., Howell-jones, R., Snijders, P. J. F. and Clifford, G. M. (2011) 'Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication', *International Journal of Cancer*, 128, pp. 927–935. doi: 10.1002/ijc.25396.

Lin, R. K., Wu, C. Y., Chang, J. W., Juan, L. J., Hsu, H. S., Chen, C. Y., Lu, Y. Y., Tang, Y. A., Yang, Y. C., Yang, P. C. and Wang, Y. C. (2010) 'Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer', *Cancer Research*, 70(14), pp. 5807–5817. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4161.

Liu, T., Zhang, S., Chen, J., Jiang, K., Zhang, Q., Guo, K. and Liu, Y. (2014) 'The Transcriptional Profiling of Glycogenes Associated with Hepatocellular Carcinoma Metastasis', *Plos One*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0107941.

Loo, L. W. M., Tiirikainen, M., Cheng, I., Lum-jones, A., Seifried, A., Church, J. M., Gryfe, R., Weisenberger, D. J., Lindor, N. M., Gallinger, S. and Haile, R. W. (2013) 'Integrated Analysis of Genome-Wide Copy Number Alterations and Gene Expression in Microsatellite Stable , CpG Island Methylator Phenotype-Negative Colon Cancer', *Genes, Cromosomes and Cancer*, 52, pp. 450–466. doi: 10.1002/gcc.

López-morales, D., Reyes-leyva, J., Santos-lópez, G., Zenteno, E. and Vallejo-ruiz, V. (2010) 'Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions', *Diagnostic Pathology*, 5(1), p. 74. doi: 10.1186/1746-1596-5-74.

López-Morales, D., Velázquez-Márquez, N., Valenzuela, O., Santos-López, G., Reyes-Leyva, J. and Vallejo-Ruiz, V. (2009) 'Enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia', *Investigacion Clinica*, 50(1), pp. 45–53. doi: 10.1111/IGC.0b013e31819d8a5c.

López Saavedra, A. y Lizano Soberón, M. (2006) 'Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina', *Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. UNAM - INCan*, 1, pp. 31–55. Available at: http://www.incan.edu.mx/i/revista/articulos/articulo2.pdf.

Lyng, H., Brøvig, R. S., Svendsrud, D. H., Holm, R., Kaalhus, O., Knutstad, K., Oksefjell, H., Sundfør, K., Kristensen, G. B. and Stokke, T. (2006) 'Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer.', *BMC genomics*, 7, p. 268. doi: 10.1186/1471-2164-7-268.

Maglennon, G. A., Mcintosh, P. and Doorbar, J. (2011) 'Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression', *Virology*, 414(2), pp. 153–163. doi: 10.1016/j.virol.2011.03.019.

Maliekal, T. T., Bajaj, J., Giri, V., Subramanyam, D. and Krishna, S. (2008) 'The role of Notch signaling in human cervical cancer: Implications for solid tumors', *Oncogene*, 27(38), pp. 5110–5114. doi: 10.1038/onc.2008.224.

Mantovani, F. and Banks, L. (2001) 'The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression', *Oncogene*, 20, pp. 7874–7887.

Marchal, I., Golfier, G., Dugas, O. and Majed, M. (2003) 'Bioinformatics in glycobiology', *Biochimie*, 85(1), pp. 75–81. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00068-3.

Márquez, J., Kohli, M., Arteta, B., Chang, S., Li, W. B., Goldblatt, M. and Vidal-Vanaclocha, F. (2013) 'Identification of hepatic microvascular adhesion-related genes of human colon cancer cells using random homozygous gene perturbation', *International Journal of Cancer*, 133, pp. 2113–2122. doi: 10.1002/ijc.28232.

Martinez-Cardu, A., Martinez-Balibrea, E., Bandre, E., Malumbres, R. and Gine, A. (2009)

‘Pharmacogenomic approach for the identification of novel determinants of acquired resistance to oxaliplatin in colorectal cancer’, *Molecular Cancer Therapeutics*, pp. 194–202. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0659.

McBride, A. A. (2013) ‘The Papillomavirus E2 proteins’, *Virology*, 445(1–2), pp. 57–79. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006.

McCabe, M. T., Davis, J. N. and Day, M. L. (2005) ‘Regulation of DNA Methyltransferase 1 by the pRb / E2F1 Pathway’. *Cancer Research* 2(19), pp. 3624–3633. doi:http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2158.

Mclaughlin-Drubin, M. E. and Münger, K. (2010) ‘The human papillomavirus E7 oncoprotein’, *Virology*, 384(2), pp. 335–344. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.006.

McMurray, H. R. and McMance, D. J. (2003) ‘Human Papillomavirus Type 16 E6 Activates TERT Gene Transcription through Induction of c-Myc and Release of USF-Mediated Repression Human Papillomavirus Type 16 E6 Activates TERT Gene Transcription through Induction of c-Myc and Release of USF-Mediated Re’, *Journal of Virology*, 77(18), pp. 9852–9861. doi: 10.1128/JVI.77.18.9852.

Medeiros, A., Berois, N., Incerti, M. and Osinaga, E. (2013) ‘A Tn antigen binding lectin from Myrsine coriacea displays toxicity in human cancer cell lines’, *Journal of Natural Medicines*, 67, pp. 247–254. doi: 10.1007/s11418-012-0671-x.

Mersakova, S., Nachajova, M., Szepe, P., Kasajova, P. S. and Halasova, E. (2016) ‘DNA methylation and detection of cervical cancer and precancerous lesions using molecular methods’, *Tumor Biology*, 37(1), pp. 23–27. doi: 10.1007/s13277-015-4197-1.

Milde-Langosch, K., Karn, T., Schmidt, M., Eulenburg, C., Oliveira-Ferrer, L., Wirtz, R. M., Schumacher, U., Witzel, I., Schütze, D. and Müller, V. (2014) ‘Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer’, *Breast Cancer Research and Treatment*, 145(2), pp. 295–305. doi: 10.1007/s10549-014-2949-z.

Moloney, D. J., Shair, L. H., Lu, F. M., Xia, J., Locke, R., Matta, K. L. and Haltiwanger, R. S. (2000) ‘Mammalian Notch1 Is Modified with Two Unusual Forms of O -Linked Glycosylation Found on Epidermal Growth Factor-like Modules’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), pp. 9604–9611.

Morán Cruz, M. I. (2014) ‘Identificación de cambios en la expresión de genes de glicosilación en muestras de cérvix con diferente grado de neoplasia y cáncer’ Maestría en Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Moremen, K. W., Tiemeyer, M. and Nairn, A. V (2012) ‘Vertebrate protein glycosylation : diversity , synthesis and function’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), pp. 448–462. doi: 10.1038/nrm3383.

Morin, G., Fradet-Turcotte, A., Di Lello, P., Bergeron-Labrecque, F., Omichinski, J. G. and Archambault, J. (2011) ‘A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication’, *Journal of Virology*, 85(11), pp. 5287–5300. doi: 10.1128/JVI.01829-10.

Moro-rodríguez, E. and Álvarez-fernández, E. (2008) ‘Losses of expression of the antigens A , Le a and Le x and over-expression of Le y in carcinomas and HG-SIL of the uterine cervix’, *Diagnostic Pathology*, 13, pp. 1–13. doi: 10.1186/1746-1596-3-38.

Nairn, A. V, York, W. S., Harris, K., Hall, E. M., Pierce, J. M. and Moremen, K. W. (2008) ‘Regulation of Glycan Structures in Animal Tissues’, J*ournal of Biological Chemistry*, 283(25), pp. 17298–17313. doi:

10.1074/jbc.M801964200.

Nakamura, A., Nakajima, M., Yamanaka, H., Fujiwara, R. and Yokoi ,T. (2008) '*Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in Human Normal Tissues and Various Cell Lines*' *Short communication*, doi: 10.1124/dmd.108.021428.

Naoi, Y., Kishi, K., Tanei, T. and Tsunashima, R. (2011) 'Development of 95-gene classifier as a powerful predictor of recurrences in node-negative and ER-positive breast cancer patients', *Breast Cancer Research and Treatment*, 128, pp. 633–641. doi: 10.1007/s10549-010-1145-z.

Numa, F., Tsunaga, N., Michioka, T., Nawata, S. and Ogata, H. (1995) 'Tissue Expression of Sialyl Tn Antigen in Gynecologic', *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 21(4), pp. 385–389.

Oetke, C., Auvinen, E., Pawlita, M. and Alonso, A. (2000) 'Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation Brief Report', *Archives of Viology*, pp. 2183–2191.

Ogretmen, B. and Hannun, Y. A. (2004) 'Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment.', *Nature Reviews Cancer*, 4(8), pp. 604–616. doi: 10.1038/nrc1411.

Ong, C., Chan, S., Campo, M. S., Fujinaga, K., Mavromara-nazos, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S., Meulen, J., Villa, L. L. and Bernardi, H. (1993) 'Evolution of Human Papillomavirus Type 18 : an Ancient Phylogenetic Root in Africa and Intratype Diversity Reflect Coevolution with Human Ethnic Groups', *Journal of virology*, 67(11), pp. 6424–6431.

Oudes, A. J., Roach, J. C., Walashek, L. S., Eichner, L. J., True, L. D., Vessella, R. L. and Liu, A. Y. (2005) 'Application of affymetrix array and massively parallel signature sequencing for identification of genes involved in prostate cancer progression', *BMC Cancer*, 5, p. 86. doi: 10.1186/1471-2407-5-86.

Owczarek, T. B., Suchanski, J., Pula, B., Kmiecik, A. M., Chadalski, M., Jethon, A., Dziegiel, P. and Ugorski, M. (2013) 'Galactosylceramide Affects Tumorigenic and Metastatic Properties of Breast Cancer Cells as an Anti-Apoptotic Molecule', *Plos One*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0084191.

Peng, R. Q., Wan, H. Y., Li, H. F., Liu, M., Li, X. and Tang, H. (2012) 'MicroRNA-214 suppresses growth and invasiveness of cervical cancer cells by targeting UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7', *Journal of Biological Chemistry,* 287(17), pp. 14301–14309. doi: 10.1074/jbc.M111.337642.

Petretti, T., Kemmner, W., Schulze, B. and Schlag, P. M. (2000) 'Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases.', *Gut*, 46, pp. 359–366. doi: 10.1136/gut.46.3.359.

Petretti, T., Schulze, B., Schlag, P. M. and Kemmner, W. (1999) 'Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human gastric carcinomas', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, pp. 209–218.

Pim, D., Bergant, M., Boon, S. S., Ganti, K., Kranjec, C., Massimi, P., Banks, L., Subbaiah, V. K., Thomas, M. and Tomaic, V. (2012) 'Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting', *FEBS Journal*, 279, pp. 3530–3537. doi: 10.1111/j.17424658.2012.08709.x.

Pinho, S. S. and Reis, C. A. (2015) 'Glycosylation in cancer : mechanisms and clinical implications', *Nature Reviews Cancer*, 16(August). doi: 10.1038/nrc3982.

Potapenko, I. O., Haakensen, V. D., Luders, T., Hellanda, S., Bukholm, I., Sørlie, T., Kristensen, V. N., Lingjærde, O. C. and Børresen-Dale, A. L. (2010) 'Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue ; possible role in diagnosis and progression', *Molecular Oncology*, 4, pp. 98–118.

doi: 10.1016/j.molonc.2009.12.001.

Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P. and Lambert, P. F. (2009) 'Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression', *PLoS Pathogens.*, 5(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1000318.

Qi, Z., Xu, X., Zhang, B., Li, Y., Liu, J., Chen, S., Chen, G. and Huo, X. (2010) 'Effect of simultaneous silencing of HPV-18 E6 and E7 on inducing apoptosis in HeLa cells', *Biochemistry and Cell Biology*, 704, pp. 697–704. doi: 10.1139/O10-005.

Radhakrishnan, P., Dabelsteen, S., Brus, F., Francavilla, C., Kopp, K. L., Yin, G., Chen, L., Song, H., Bak, M., Hlady, R. A., Peters, S. L. and Opavsky, R. (2014) 'Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features', *PNAS*, pp. E4066–E4075. doi: 10.1073/pnas.1406619111.

Rivera Juárez, M. A. (2013) 'Papel de la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano tipo 16 sobre la actividad del promotor B3 del gen *ST3Gal IV*, la expresión del antígeno tumoral sialil Lewis(x) y la adhesión a selectinas' Doctorado en Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Rosen, S. D. and Bertozzi, C. R. (1994) 'The selectins and their ligands', *Current Opinion in Cell Biology*, 6(5), pp. 663–673. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674(94)90092-2.

Rzechonek, A., Cygan, M., Blasiak, P., Muszczynska-bernhard, B., Bobek, V., Lubicz, M. and Adamiak, J. (2016) 'Expression of Ceramide Galactosyltransferase (UGT8) in Primary and Metastatic Lung Tissues of Non-Small- Cell Lung Cancer', *Advs Exp. Medicine, Biology - Neuroscience and Respiration*. doi: 10.1007/5584.

Sawey, E. T., Chanrion, M., Cai, C., Wu, G., Zhang, J., Zender, L., Zhao, A., Busuttil, R. W., Yee, H., Stein, L., French, D. M., Finn, R. S. and Lowe, S. W. (2011) 'Identification of a Therapeutic Strategy Targeting Amplified FGF19 in Liver Cancer by Oncogenomic Screening', *Cancer Cell*, 19(3), pp. 347–358. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.040.

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. and Howley, P. (1993) 'The HPV-16 E6 and EG-AP Complex Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of p53', *Cell*, 75, pp. 495–505.

Sethi, M. K., Buettner, F. F. R., Ashikov, A., Krylov, V. B., Takeuchi, H., Nifantiev, N. E., Haltiwanger, R. S., Gerardy-Schahn, R. and Bakker, H. (2012) 'Molecular cloning of a xylosyltransferase that transfers the second xylose to O-glucosylated epidermal growth factor repeats of notch', *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), pp. 2739–2748. doi: 10.1074/jbc.M111.302406.

Severino, P., Alvares, A. M., Jr, P. M., Okamoto, O. K., Nunes, F. D., Moreira-filho, C. A., Tajara, E. H., Genome, N. and Gencapo, P. (2008) 'Global gene expression profiling of oral cavity cancers suggests molecular heterogeneity within anatomic subsites', *BMC Research Notes*, 1, p. 113. doi: 10.1186/1756-0500-1-113.

Sewell, R., Ba, M., Dalziel, M., Gschmeissner, S., Karlsson, H., Noll, T., Clausen, H., Hansson, G. C., Burchell, J. and Taylor-papadimitriou, J. (2006) 'The ST6GalNAc-I Sialyltransferase Localizes throughout the Golgi and Is Responsible for the Synthesis of the Tumor- associated Sialyl-Tn O -Glycan in Human Breast Cancer', *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), pp. 3586–3594. doi: 10.1074/jbc.M511826200.

Shafti-keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K. and Kirnbauer, R. (2003) 'Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses', *Journal of virology*, 77(24), pp. 13125–13135. doi: 10.1128/JVI.77.24.13125.

Shimamura, T., Ito, H., Shibahara, J., Watanabe, A., Hippo, Y., Taniguchi, H., Chen, Y., Kashima, T., Ohtomo, T., Tanioka, F., Iwanari, H., Kodama, T., Kazui, T., Sugimura, H., Fukayama, M. and Aburatani, H.

(2005) 'Overexpression of MUC13 is associated with intestinal-type gastric cancer', *Cancer Science*, 96(5), pp. 265–273. doi: 10.1111/j.1349-7006.2005.00043.x.

Songock, W. K., Kim, S. M. and Bodily, J. M. (2017) 'The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription', *Virus Research*, 231, pp. 56–75. doi: 10.1016/j.virusres.2016.10.017.

Spanos, William C, Hoover, Andrew, Harris, George F Wu, S., Strand, G. L., Anderson, M. E., Klingelhutz, A. J., Hendriks, W., Bossler, A. D. and Lee, J. H. (2008) 'The PDZ Binding Motif of Human Papillomavirus Type 16 E6 Induces PTPN13 Loss , Which Allows Anchorage-Independent Growth and Synergizes with Ras for Invasive Growth', *Journal of Virology*, 82(5), pp. 2493–2500. doi: 10.1128/JVI.02188-07.

Stirewalt, D. L., Meshinchi, S., Kopecky, K. J., Fan, W., Pogosova-agadjanyan, E. L., Engel, J. H., Cronk, M. R., Dorcy, K. S., Mcquary, A. R., Hockenbery, D., Wood, B., Heimfeld, S. and Radich, J. P. (2008) 'Identification of Genes with Abnormal Expression Changes in Acute Myeloid Leukemia', *Genes, Cromosomes and Cancer*, 20, pp. 8–20. doi: 10.1002/gcc.

Stoler, M. H. (2004) 'The Pathology of Cervical Neoplasia', in Rohan, T. E. and Shah, K. V (eds) *Cercival Cancer: From Etiology to Prevention*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 3–59. doi: 10.1007/1-4020-2016-3_1.

Stowell, S. R., Ju, T. and Cummings, R. D. (2015) 'Protein Glycosylation in Cancer', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10, pp. 473–510. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040438.

Sun, L., Song, Y., Tong, T., Wu, L., Zhang, W. and Zhan, Q. (2009) 'Down-modulation of Notch1 expression in cervical cancer is associated with HPV-induced carcinogenesis', *Clinical Oncology and Cancer Research*, 6(6), pp. 401–405. doi: 10.1007/s11805-009-0401-7.

Sun, Y., Yang, X., Liu, M. and Tang, H. (2016) 'B4GALT3 up-regulation by miR-27a contributes to the oncogenic activity in human cervical cancer cells.', *Cancer letters*, 375(2), pp. 284–92. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.016.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguez, P., Doerks, T., Stark, M., Muller, J., Bork, P., Jensen, L. J. and Von Mering, C. (2011) 'The STRING database in 2011: Functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored', *Nucleic Acids Research*, 39, pp. 561–568. doi: 10.1093/nar/gkq973.

Tachibana, K., Nakamura, S., Wang, H., Iwasaki, H., Tachibana, K., Maebara, K., Cheng, L., Hirabayashi, J. and Narimatsu, H. (2006) 'Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: Quantitative analysis by frontal affinity chromatography', *Glycobiology*, 16(1), pp. 46–53. doi: 10.1093/glycob/cwj038.

Talora, C., Cialfi, S., Segatto, O., Morrone, S., Kim Choi, J., Frati, L., Dotto, G. P., Gulino, A. and Screpanti, I. (2005) 'Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways', *Experimental Cell Research*, 305(2), pp. 343–354. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.01.015.

Talora, C., Sgroi, D. C., Crum, C. P. and Paolo Dotto, G. (2002) 'Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation', *Genes and Development*, 16(17), pp. 2252–2263. doi: 10.1101/gad.988902.

Terasawa, K., Furumoto, H., Kamada, M. and Aono, T. (1996) 'Expression of Tn and Sialyl-Tn Antigens in the Neoplastia Transformation Uterine Cervical Epithelial Cells', *Cancer Research*, 56, pp. 2229–2232.

Thomas, M., Narayan, N., Pim, D., Tomaic, V., Massimi, P., Nagasaka, K., Kranjec, C., Gammoh, N. and Banks, L. (2008) 'Human papillomaviruses , cervical cancer and cell polarity', *Oncogene*, (27), pp. 7018–

7030. doi: 10.1038/onc.2008.351.

Titolo, S., Brault, K., Majewski, J., White, P. W. and Archambault, J. (2003) 'Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein.', *Journal of virology*, 77(9), pp. 5178–91. doi: 10.1128/JVI.77.9.5178-5191.2003.

Tomaić, V. (2016) 'Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites', *Cancers*, 8(10), p. 95. doi: 10.3390/cancers8100095.

Tommasino, M. (2013) 'The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis', *Seminars in Cancer Biology*, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.11.002.

Um, S. J., Rhyu, J. W., Kim, E. J., Jeon, K. C., Hwang, E. S. and Park, J. S. (2002) 'Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo', *Cancer Letters*, 179(2), pp. 205–212. doi: 10.1016/S0304-3835(01)00871-0.

Vande Pol, S. B. and Klingelhutz A. J. (2014) 'Papollomavirus E6 oncoproteins', *Virology*, 445(0), pp. 115–137. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026.Papillomavirus.

Vasudevan, D. and Haltiwanger, R. S. (2014) 'Novel roles for O-linked glycans in protein folding', *Glycoconjugate Journal*, 31(6), pp. 417–426. doi: 10.1007/s10719-014-9556-4.

Velázquez Márquez, N. (2009) 'Relación entre la expresión de los oncogenes E6 y E7 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 y el nivel de sialilación en células de carcinoma de cérvix' Doctorado en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Velázquez-Márquez, N., Santos-López, G., Jiménez-Aranda, L., Reyes-Leyva, J. and Vallejo-Ruiz, V. (2012) 'Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions', *Journal of Biosciences*, 37(December), pp. 999–1004. doi: 10.1007/s12038-012-9261-z.

Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S. and Borzacchiello, G. (2011) 'Papillomavirus E5 : the smallest oncoprotein with many functions', *Molecular Cancer*, pp. 1–18.

Vojta, A., Samar, I., Bo, L. and Zoldo, V. (2016) 'Glyco-genes change expression in cancer through aberrant methylation', *Biochimica et Biophysica Acta*. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.01.002.

Walsh, M. D., Young, J. P., Leggett, B. A., Williams, S. H., Jass, J. R. and McGuckin, M. A. (2007) 'The MUC13 cell surface mucin is highly expressed by human colorectal carcinomas', *Human Pathology*, 38(6), pp. 883–892. doi: 10.1016/j.humpath.2006.11.020.

Wang, P.-H., Li, Y. F., Juang, C.-M., Lee, Y.-R., Chao, H.-T., Ng, H.-T., Tsai, Y.-C. and Yuan, C.-C. (2002) 'Expression of Sialyltransferase Family Members in Cervix Squamous Cell Carcinoma Correlates with Lymph Node Metastasis', *Gynecologic Oncology*, 86(1), pp. 45–52. doi: 10.1006/gyno.2002.6714.

Wang, P. H., Li, Y. F., Juang, C. M., Lee, Y. R., Chao, H. T., Tsai, Y. C. and Yuan, C. C. (2001) 'Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix.', *Gynecologic oncology*, 83(1), pp. 121–127. doi: 10.1006/gyno.2001.6358.

Wang, R., Yu, C., Zhao, D., Wu, M. and Yang, Z. (2013) 'The mucin-type glycosylating enzyme polypeptide N- acetylgalactosaminyltransferase 14 promotes the migration of ovarian cancer by modifying mucin 13', *Oncology Reports*, 30(2), pp. 667–676. doi: 10.3892/or.2013.2493.

Wang, X., Meyers, C., Wang, H., Chow, L. T. and Zheng, Z. (2011) 'Construction of a Full Transcription Map of Human Papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection', *Journal of virology*, 85(16), pp. 8080–8092. doi: 10.1128/JVI.00670-11.

Wang, Y., Lee, G. F., Kelley, R. F. and Spellman, M. W. (1996) 'Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains', *Glycobiology*, 6(8), pp. 837–842. doi: 10.1093/glycob/6.8.837.

Wang, Y. W., Chang, H. S., Lin, C. H. and Yu, W. C. (2007) 'HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(2), pp. 402–412. doi: 10.1016/j.biocel.2006.09.006.

Xi, L. F., Koutsky, L. A., Hildesheim, A., Galloway, D. A., Wheeler, C. M., Winer, R. L., Ho, J. and Kiviat, N. B. (2007) 'Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, pp. 4–11. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0670.

Yamamoto, T., Kato, Y., Shibata, N., Sawada, T. and Osawa, M. (2008) 'A role of fukutin, a gene responsible for Fukuyama type congenital muscular dystrophy , in cancer cells: a possible role to suppress cell proliferation', *Intenational Journal of Experimental Pathology*, 89, pp. 332–341. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00599.x.

Yan, X., Lin, Y., Liu, S. and Yan, Q. (2015) 'Fucosyltransferase IV (FUT4) as an effective biomarker for the diagnosis of breast cancer', *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 70, pp. 299–304. doi: 10.1016/j.biopha.2014.12.048.

Yang, L., Wang, Y., Fang, M., Deng, D. and Zhang, Y. (2017) 'C3orf21 ablation promotes the proliferation of lung adenocarcinoma, and its mutation at the rs2131877 locus may serve as a susceptibility marker'. *Oncotarget*, 8:33422–31.

Yokota, S., Ogawara, K., Kimura, R., Shimizu, F. and Baba, T. (2013) 'Protein O -fucosyltransferase 1 : A potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer', *International Journal of Oncology*, 43, pp. 1864–1870. doi: 10.3892/ijo.2013.2110.

Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. (2007) 'Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells', *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), pp. 3732–3742. doi: 10.1128/MCB.02119-06.

Zhao, Y., Takahashi, M., Gu, J., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S. and Taniguchi, N. (2008) 'Functional roles of N -glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer', *Cancer Sci.*, 99(7), pp. 1304–1310. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00839.x.

Zheng, Z.-M. and Baker, C. C. (2006) 'Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11, pp. 2286–302. doi: 1971.

Zheng, Z. M. and Wang, X. (2011) 'Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809 (11–12), pp. 668–677. doi: 10.1016/j.bbagrm.2011.05.005.

13. ANEXOS

Glycogene expression profiles based on microarray data from cervical carcinoma HeLa cells with partially silenced E6 and E7 HPV oncogenes

Aco-Tlachi et al. Infectious Agents and Cancer (2018) 13:25
https://doi.org/10.1186/s13027-018-0197-2

Infectious Agents and Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

Glycogene expression profiles based on microarray data from cervical carcinoma HeLa cells with partially silenced E6 and E7 HPV oncogenes

Miguel Aco-Tlachi[1,2], Ricardo Carreño-López[2], Patricia L. Martínez-Morales[4], Paola Maycotte[4], Adriana Aguilar-Lemarroy[3], Luis Felipe Jave-Suárez[3], Gerardo Santos-López[1], Julio Reyes-Leyva[1] and Verónica Vallejo-Ruiz[1*]

Abstract

Background: Aberrant glycosylation is a characteristic of tumour cells. The expression of certain glycan structures has been associated with poor prognosis. In cervical carcinoma, changes in the expression levels of some glycogenes have been associated with lymph invasion. Human papillomavirus (HPV) infection is one of the most important factors underlying the development of cervical cancer. The HPV oncoproteins E6 and E7 have been implicated in cervical carcinogenesis and can modify the host gene expression profile. The roles of these oncoproteins in glycosylation changes have not been previously reported.

Methods: To determine the effect of the E6 and E7 oncoproteins on glycogene expression we partially silenced the E6 and E7 oncogenes in HeLa cells, we performed a microarray expression assay to identify altered glycogenes and quantified the mRNA levels of glycogenes by RT-qPCR. A protein-protein interaction network was constructed to identify potentially altered glycosylation pathways.

Results: The microarray analysis showed 9 glycogenes that were upregulated and 7 glycogenes that were downregulated in HeLa shE6/E7 cells. Some of these genes participate in glycosylation related to Notch proteins and O-glycans antigens.

Conclusions: Our results support that E6 and E7 oncoproteins could modify glycogene expression the products of which participate in the synthesis of structures implicated in proliferation, adhesion and apoptosis.

Keywords: Microarrays, Glycogene, Cervical cancer, HeLa cells, Human papillomavirus, E6 oncoprotein, E7 oncoprotein

Background

Glycosylation changes have been reported in cancer, and glycan structures are found in secreted proteins, membrane glycoproteins, and glycolipids. Glycans are involved in cellular adhesion, tumour proliferation, apoptosis, invasion, metastasis, angiogenesis and signal transduction [1].

In cervical cancer, the increased expression of some glycogenes such as ST6GAL1 and ST3GAL3, has been correlated with deep stromal invasion and lymph node metastasis [2]. The increased expression of sialyltransferases genes could be related to an overexpression of sialylated antigens such as sialyl-T, sialyl-Le(a), and sialyl-Le(x), identified in cervical neoplasia [3–5].

Polylactosamine (polyLacNAc) is a glycan structure expressed during development and carcinogenesis, and β1,3-N-acetylglucosaminyl transferases (β3GnTs) participate in its synthesis. In cervical tissue, the increased expression of β3GnT2 has been detected in cervical intraepithelial neoplasia 3 (CIN3), and polyLacNAc expression is higher in cancer tissue [6]. The gene regulation of glycogenes is very complex, and little information exists about the factors that modify their expression during cervical transformation.

* Correspondence: veronica_vallejo@yahoo.com; vero.vallejoruiz@gmail.com
[1]Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Km. 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec, Atlixco, C.P. 74360 Puebla, Mexico
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Cervical cancer tumours are associated with high-risk human papillomavirus infections. HPV-16 is the most prevalent high-risk HPV type, followed by HPV-18 and HPV-31 [7]. The HPV-18 type is the most prevalent genotype in cervical adenocarcinoma [8]. One of the key events of HPV-induced cervical cancer is the integration of the HPV genome into the host chromosome [9]. Expression of E6 and E7 genes is necessary for cell transformation induction and contributes to genome instability [10]. These viral oncoproteins have been implicated in the altered expression of different genes via different mechanisms. It has been reported that E6 can increase the expression of hTERT, the catalytic domain of telomerase, via transcription factor interactions, transcription repressor degradation, and chromatin structure modifications [11–13]. There are no reports about the roles of the E6 and E7 oncoproteins in glycosylation changes in the cervix.

The objective of this work was to identify glycogenes that modify their expression by partially silencing the HPV-18 E6 and E7 oncogenes in HeLa cells using microarray analysis.

Methods

Cell culture

HeLa cell line (VPH18+) from cervical cancer was used to perform the gene silencing. Cells were cultured and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing Earle's salts and L-glutamine (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA), and supplemented with 10% foetal bovine serum, and 100 μg/ml streptomycin (Sigma). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO2 atmosphere. The culture medium was replaced every two days. Subconfluent adherent cells were harvested using a mixture of trypsin (0.025%) and EDTA (0.02%; Sigma) and washed with phosphate-buffered saline.

Gene silencing and clonal selection

Gene silencing in HeLa parental cells was achieved by cloning the shRNA sequence 5'-CTAACACTGGGTTA TACAA-3′ into the pLVX-sh vector (pLVX-shE6/E7) (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA). The 19-nucleotide sequence targets the E6 and E7 bicistronic mRNA [14]. As a control, the sequence 5'-GACTTCATA AGGCGCATGC-3′ [15] was cloned into the pLVX-sh vector (pLVX-shControl). To obtain recombinant lentiviral particles carrying the respective constructs, Lenti-X 293 T cells were co-transfected with either pLVX-shControl or pLVX-shE6/E7 and Lenti-X HTX Packaging Mix (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA). Lentiviruses were harvested from the supernatant and filtered. The presence of viral particles in the filtrate was confirmed using the LentiX-Gostik kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA). Supernatants bearing lentivirus pLVX-shControl or pLVX-shE6/E7 were then used to transduce HeLa cells. Transduced cells were selected with puromycin and when the culture reached 60% confluence, the cells were trypsinized and diluted to obtain monoclonal cultures. Screening of several HeLa clones carrying either shcontrol or shE6/E7 was performed by RT-qPCR to select clones with no change in the expression levels of E6/E7 or the best degree of gene silencing compare with parental HeLa cells (data not shown).

RT-qPCR

Total RNA from shcontrol and shE6/E7 HeLa monocultures was obtained using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). In total, 500 ng of RNA was used to synthesize cDNA using random primers and the RevertAid First-Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

To show that the amplification efficiencies of the E6, E7, POFUT1, XXYLT1, DPY19L1, ALG14, UGT8, PIGV, and GALNT1 genes were optimal, standard curves were constructed with the following concentrations: 10, 1, 0.1, 0.01, and 0.001 ng/μL; HPRT was used as an endogenous gene. Each reaction was performed in a final volume of 10 μL comprising the following: 1 μL of cDNA template, 5 μL of 2X Maxima SYBER Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), and 0.5 μL of 10 mM forward and reverse primers for the E6, E7, POFUT1, XXYLT1, DPY19L1, ALG14, UGT8, PIGV, GALNT1 and HPRT genes (Table 1). The reactions were performed with a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA), and the conditions were as follows: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C 30 s, and 70 °C for 30 s.

To determine the mRNA levels the final reaction volume of 10 μL included 1 μL of cDNA template (0.5 ng/μL final concentration for the E6 and E7 genes and 0.1 ng/μL for the glycogenes), 5 μL of 2X Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific, California, USA), 0.5 μL of forward and reverse primers (0.5 μM final concentration) and 3 μL of RNase free water. RT-qPCR was performed under the following conditions: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 70 °C for 30 s. The transcript levels of E6, E7 and the glycogenes were normalized to those of HPRT.

Relative quantification was performed using the comparative CT method with the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. The qPCR reaction was performed using the StepOneReal-Time PCR System (Applied Biosytems, Foster, CA).

Western blot

Protein extraction was performed by mechanical lysis from non-treated, shcontrol and shE6/E7 monocultures at 90% confluence. Next, 50 μg protein samples of each total cell extract were separated by 12% SDS-PAGE to analyze p53, whereas 70 μg protein samples were separated

Table 1 Sequences of the oligonucleotides used in the RT-qPCR assays to quantify E6, E7 and glycogenes expression level

Name	Sequence	PCR Product
E6 Forward	5'GCGACCCTACAAGCTACCTGAT 3´	295 bp
E6 Reverse	5'GCACCGCAGGCACCTTAT 3´	
E7 Forward	5´ TGTCACGAGCAATTAAGCGACT 3´	215 bp
E7 Reverse	5´ CACACAAAGGACAGGGTGTTC 3'	
POFUT1 Forward	5'CAGCCCAGTTCCCCGTCCTA3´	190 bp
POFUT1 Reverse	5'GAGCCTGCAGTCCCGTCCTTC3´	
UGT8 Forward	5'AAACCAGCCAGCCCACTACCAG3´	93 bp
UGT8 Reverse	5'GACACCAGCTCCAAAAGACACCAA3´	
XXLYLT1 Forward	5'GTGCTGGCTTGGGAACCTACTA3´	230 bp
XXLYLT1 Reverse	5'GCGGAACTGCCAGAATGTGT3´	
DPY19L1 Forward	5'GAGAGTGTACCCGTGTAATGTG3´	134 bp
DPY19L1 Reverse	5'GAGTGCAATCAAGCTTCCTCTA3´	
PIGV Forward	5' CCTGGGCAACTTGGACATA 3'	95 bp
PIGV Reverse	5' GGGCTTCTCTAGGGTCTTATTG 3'	
ALG14 Forward	5' CCGGGAGTCTCTCAGTATCTT 3'	100 bp
ALG14 Reverse	5' TCTAGGTGAGTAGGCATTGGA 3'	
GALNT1 Forward	5' GGATAAAGCCACAGAAGAGGATAG 3'	94 bp
GALNT1 Reverse	5' CAGGGTGACGTTTCGAAGAA 3'	
HPRT Forward	5'CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT3´	136 bp
HPRT Reverse	5'CGAGCAAGACGTTCAGTCCTGTC3´	

by 15% SDS-PAGE to analyze E7. Samples were transferred to a polyvinylidene fluoride Immobilon-P membrane (Millipore, Darmstadt, Germany) and probed overnight at 4 °C with the antibodies anti-p53 (1:1000; Abcam ab1101), anti-E7 (1:1000; Abcam ab100953), and anti-β-actin (1:3000; Abcam ab8224). Signals were detected with an anti-HRP-conjugated secondary antibody (1:4000; Abcam ab97046) and developed with the ImmPACT™ DAB peroxidase substrate (Vector, Burlingame, CA. USA). Densitometric analysis was performed with ImageJ software.

Hybridization and microarray

Microarray analysis was performed at the Cellular Physiology Institute of UNAM as follows: total RNA from cell cultures was extracted with a Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Next, 10 μg of total RNA was used for cDNA synthesis incorporating dUTP-Alexa555 or dUTP-Alexa647 employing the First-Strand cDNA labelling kit (Invitrogen). Incorporation of the fluorophore was analyzed using the absorbance at 555 nm for Alexa555 (HeLa shE6/E7) and 650 nm for Alexa647 (HeLa shControl). Equal quantities of labelled cDNA were hybridized using UniHyb hybridization solution (TeleChem International INC) with a chip containing 35 K genes. Acquisition and quantification of array images were performed using the ScanArray 4000 instrument with its accompanying software ScanArray 4000 from Packard BioChips, USA. For each spot, the Alexa555 and Alexa647 density and background mean values were calculated with ArrayPro Analyzer software from Media Cybernetics. Microarray data analysis was performed with GenArise (free) software, developed in the Computing Unit of the Cellular Physiology Institute of UNAM (http://www.ifc.unam.mx/genarise/). GenArise carries out several transformations: background correction, normalization, intensity filter, replicates analysis and selection of differentially expressed genes. Analyzed data were submitted to the NCBI-Gene Expression Omnibus database (accession number GSE90930).

Analysis of biological processes

Altered genes were analyzed using DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) software (http://david.abcc.ncifcrf.gov/). Based on gene ontology (GO) [16], genes were classified according to their function in a biological process (BP), and a p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Identification of glycogenes

We identified 336 glycogenes reported to date using the GlycoGene database (https://acgg.asia/ggdb2/index?doc), Consortium for Functional Glycomics-CAZy database (http://www.cazy.org/) and the published reports of glycogenes not included in the databases: DPY19L1 gene, [17] and the MANBAL gene [18].

We selected genes with altered expression in the microarray corresponding to glycogenes.

Protein-protein interaction network

Predicted interaction network analysis was performed with Cytoscape 3.4.0 and the 'StringWSClient' plugin, considering a score of 0.4 as the confidence level.

Statistical analysis

Statistical analysis of the RT-qPCR results was performed using the Graph Pad programme. A One-way analysis of variance followed by Tukey's post-test was performed. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

E6 and E7 oncogenes expression by RT-qPCR

RT-qPCR was performed to quantify and compare the E6 and E7 mRNA expression levels in HeLa-non-treated, HeLa shcontrol and HeLa-shE6/E7 cells. The E6 mRNA expression level in HeLa shcontrol cells was like that in HeLa-non-treated cells. By contrast, E6 mRNA was decreased by 60% in HeLa shE6/E7 cells compared to that in HeLa-non-treated and HeLa shcontrol cells ($p < 00.1$)

(Fig. 1). Similar results were obtained after analyzing E7 mRNA levels; its expression was decreased by 50% in HeLa shE6/E7 cells compared to that in HeLa-non-treated and HeLa shcontrol cells ($p < 00.1$).

E6 and E7 proteins expression by western blot analysis

We analyzed the p53 and E7 protein expression levels by Western blot. First, we indirectly analyzed the expression of the E6 protein by evaluating the quantity of the p53 protein, since the oncoprotein induces p53 degradation and can thus serve as a marker of E6 expression. The latter was analyzed due to reports that E6 detection is difficult using Western blot in the HeLa cell line [19]. The p53 protein level was increased in HeLa-shE6/E7 cells by 1.5- fold compared to that in HeLa-non-treated and HeLa shcontrol cells ($p < 0.001$) (Fig. 2), suggesting a decrease in E6 protein expression. By contrast, we analyzed E7 expression by detecting the protein directly. As expected, E7 protein expression was decreased by 0.5-fold in HeLa-shE6/E7 cells compared to that in HeLa-non-treated ($p < 0.001$) and HeLa shcontrol cells ($p < 0.05$) (Fig. 2). In summary, these results show that HeLa shE6/E7 cells display downregulated E6 and E7 mRNA and protein expression.

Cell organization, signalling and adhesion are the most affected biological processes under E6 and E7 downregulation

To analyze genes under E6 and E7 regulation, we performed a complete genome microarray comparing transcripts within HeLa shE6/E7 cells and HeLa shcontrol cells. Using GeneArise software, we identified 1157 genes exhibiting altered expression profiles in HeLa shE6/E7 cells compared with the control. The results showed altered genes with a Z-score > 2 for upregulated genes and a Z-score < 2 for downregulated genes. Thus, we identified 544 upregulated genes and 613 downregulated genes in E6 and E7 compared with the control (accession number GSE90930).

With the aim of been able to associate the 1157 altered genes according to their function, we performed an analysis with DAVID software and GO. The 1157 altered genes were related to differentiation, cell organization, signalling, translation, immune response, adhesion and cell cycle. Importantly, the results show that most of the expression changes in HeLa shE6/E7 cells correspond to genes associated with cell organization, signalling and cell adhesion (Fig. 3).

Glycogene expression is altered by the E6 and E7 oncoproteins

Next, to identify glycogenes among the altered genes in the microarray, we first identified all the glycogenes reported to date, by searching the GlycoGene database, Consortium for Functional Glycomics-CAZy database and published reports. Among the 336 glycogenes included in the database, 9 genes were upregulated in HeLa shE6/E7 cells (Z score > 2), including ALG14, POFUT1, FUT4, MAN2A1, DPY19L1, C3orf21 (XXYLT1), UGT2B17, IDUA and UGCGL1. A total of 7 glycogenes were downregulated (Z score < 2), including GALNT1, B4GALT2, UGT8, MANBAL, PIGV, FCMD and C1GALT1C1.

Glycogene expression by qRT-PCR

Among the 16 glycogenes altered in the microarray assay, we evaluated 7 by RT-qPCR. The mRNA levels were evaluated for POFUT1, DPY19L1, XXYLT1, ALG14, UGT8, PIGV, and GALNT1 in HeLa shcontrol and HeLa-shE6/E7 cells. The POFUT1 and ALG14 mRNA levels were increased on HeLa shE6/E7 cells compared to those in HeLa

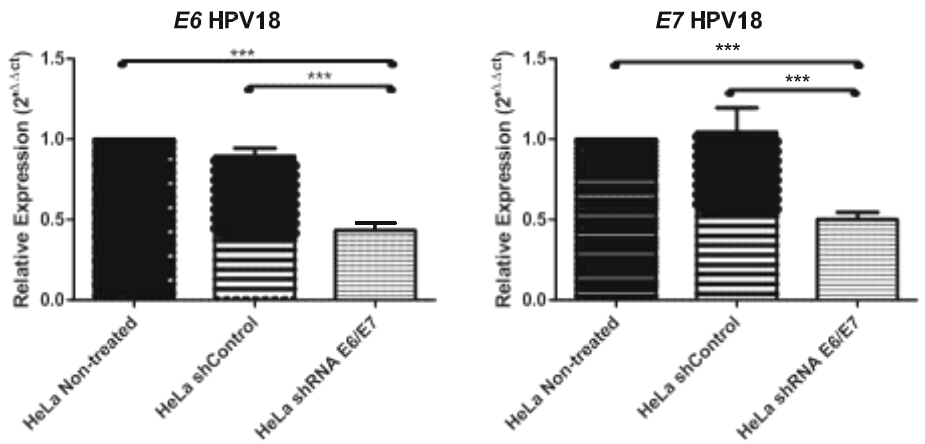


Fig. 1 Inhibition of HPV18 E6/E7 mRNA expression by shRNA E6/E7 in a HeLa cell line. HeLa cells were transfected with shRNA or shcontrol, and the relative expression of E6/E7 was determined by real-time PCR. The x-axis shows the different experiment groups; the y-axis shows the relative E6 and E7 mRNA expression, which was normalized to that in non-treated HeLa cells. Three independent experiments carried out in triplicate are shown, and the groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey test. ***$p < 0.001$

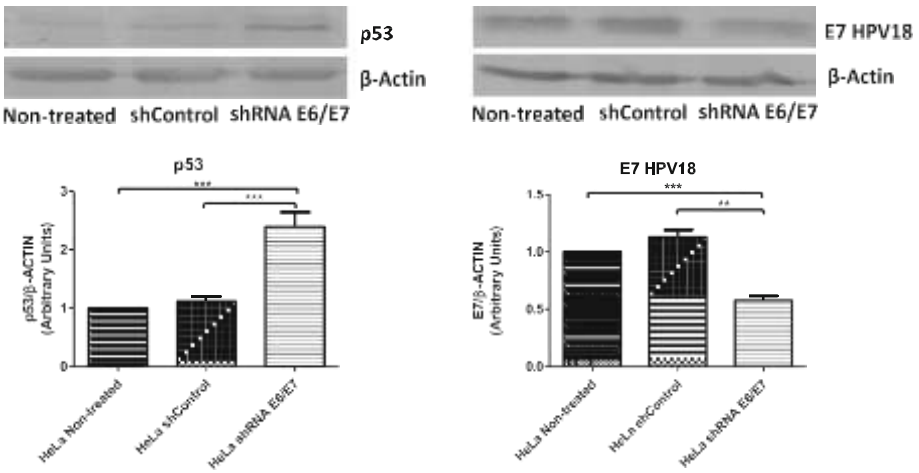


Fig. 2 Evaluation of p53, E7 and β-actin protein expression in a HeLa cell line. Extracts from HeLa non-treated cells, stably-transduced HeLa shcontrol cells and HeLa shE6/E7 cells were analyzed by Western blotting. The derived histograms show that the p53 protein expression was up-regulated, while E7 expression was down-regulated in HeLa shE6/E7 cells, compared to that in HeLa non-treated and HeLa shcontrol cells. Protein levels were normalized to those of β-actin. Scanning densitometry was used to quantify images for the bar graphs. Three independent experiments carried out in triplicate are shown and the groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey test ***$p < 0.001$, **$p < 0.05$

shcontrol cells ($p < 0.05$) (Fig. 4). DPY19L1 and XXLT1 showed increased mRNA levels in HeLa shE6/E7 cells, but they were not statistically significant (Fig. 4).

The glycogenes downregulated in the microarray, UGT8, PIGV, and GALNT1 were evaluated by RT-qPCR. Only UGT8 showed statistically significant decreased expression in HeLa shE6/E7 cells; PIGV showed decreased expression but it was not statistically significant, and GALNT1 did not showed expression changes (Fig. 5).

Next, we determined whether the glycogenes with altered expression in the microarray have been previously reported to have modified expression in cancerous tissues. Among the 9 upregulated genes, only POFUT1, FUT4, UGT2B17, and MAN2A1 have been reported to be altered in cancerous tissues. FUT4 is increased in leukaemia, gastric, breast and colorectal cancer; UGT2B17 is increased in endometrial cancer; POFUT1 is increased in glioblastomas and oral squamous cell carcinoma, and MAN2A1 is decreased in glioblastoma (Table 2).

Next, we compared the downregulated glycogenes in HeLa shE6/E7 cells with those reported in cancerous tissues. Only 4 glycogenes have been reported in cancer. GALNT1 is increased in bladder cancer, C1GALT1C1 is increased in colorectal cancer and UGT8 is increased in

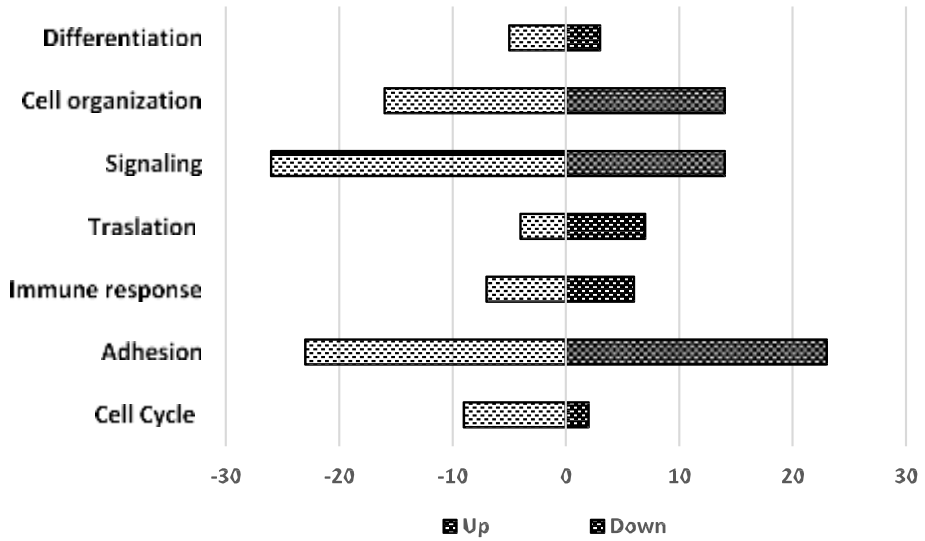


Fig. 3 Gene ontology-based biological process terms. Genes that were differentially expressed by the partial silencing of HPV18 E6 and E7 were grouped according to their biological processes. Both up- and downregulated genes are shown

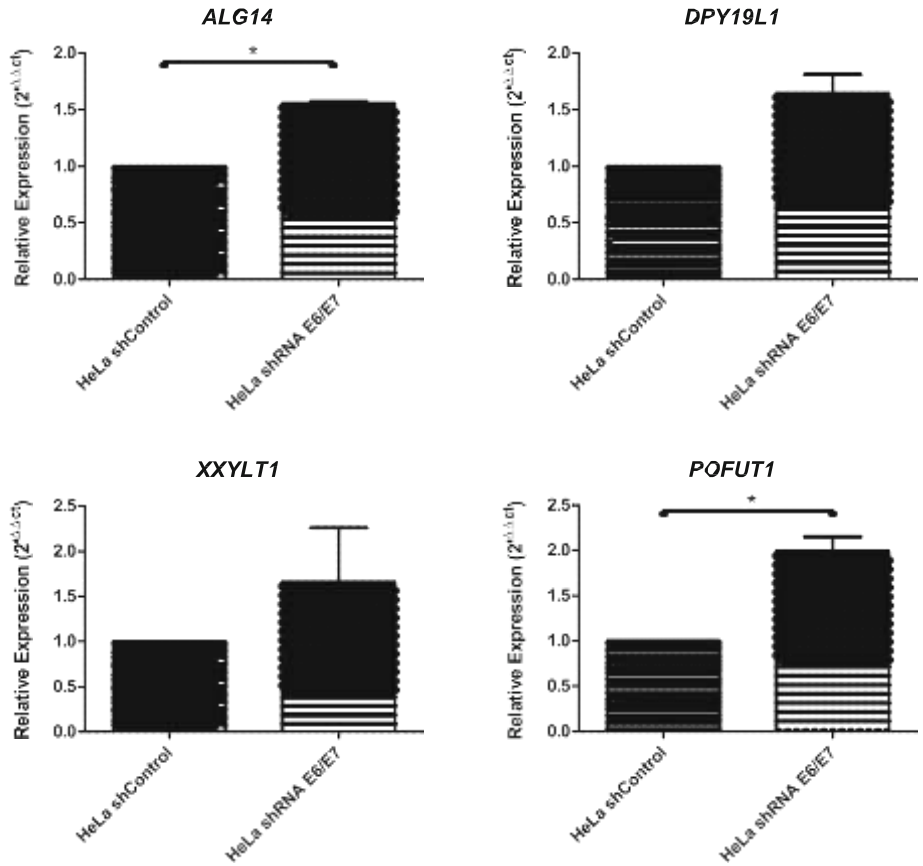


Fig. 4 Expression of POFUT1, DPY19L1, XXYLT1, and ALG14 in shcontrol and shE6/E7 HeLa cells. The mRNA expression levels were determined by RT-qPCR. The mean ± SD of three independent experiments carried out in triplicate assays is shown; $P < 0.05$

breast cancer. For B4GALT2 missense mutations, have been reported in colon cancer. The remaining glycogenes have not been reported to be altered in cancerous tissues (Table 3).

E6 and E7 activity may downregulate the notch glycosylation pathway and upregulate Tn and T antigens synthesis

To identify possible functional association among the enzymes coded by the altered glycogenes under E6 and E7 downregulation, we examined data with Cytoscape software to generate predicted protein-protein interactions. Analyses among all upregulated glycogenes revealed a network whithin 3 glycogenes: FUT4, POFUT1, and XXYLT1 (Fig. 6a). By contrast, analyses among downregulated genes showed an interaction only between GALNT1 and C1GALT1C1 (Fig. 6b). These results suggest that FUT4, POFUT1 and XXYLT1 as well as GALNT1 and C1GALT1C1 could be participating in the same glycosylation pathway.

Next, with the aim of investigating potential targets of the up- and downregulated glycogenes, an analysis was performed by text mining when considering 5 more proteins that could be interacting with the altered glycogenes. Thus, the network among upregulated glycogenes revealed a direct interaction between NOTCH1 and POFUT1 (Fig. 7).

Analysis among the downregulated genes revealed a direct interaction within GALNT1, C1GALT1C1 and MUC1 (Fig. 8), a protein that carries the Tn antigen, which is present in most of the cancers, including uterine cervical cancer cells [20–22].

Discussion

Glycosylation changes in cancer have been associated with immune modulation, cell-matrix interactions, cell invasion, metastasis, and angiogenesis [23], and some of these changes could be due to the dysregulation of glycogenes at the transcriptional level (25–28). In cervical neoplasia, an increased expression of the sialyltransferase genes ST6GAL1 and ST3GAL3 has been reported as well as increased sialic acid and the tumour antigens sLe(X), Tn

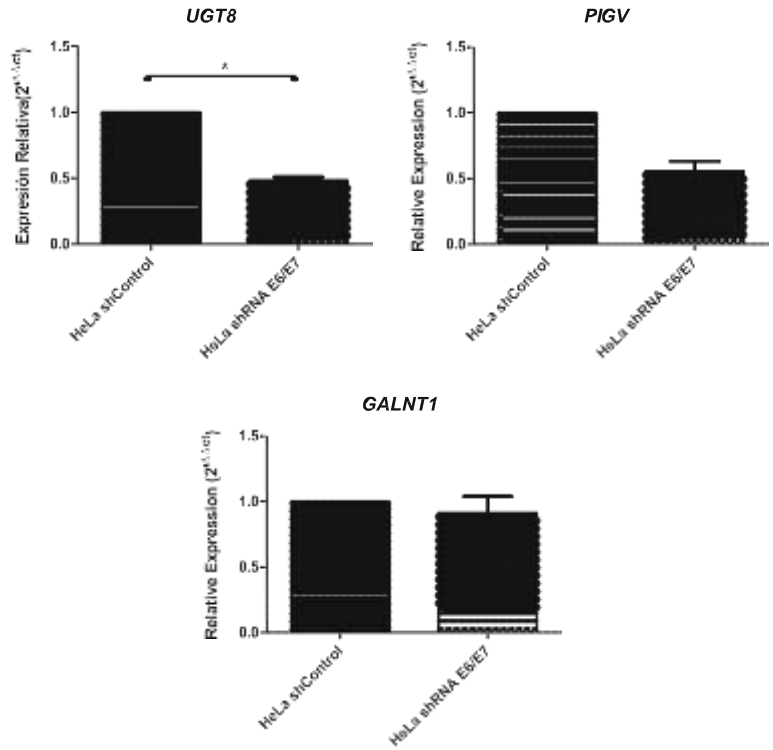


Fig. 5 Expression of UGT8, PIGV, and GALNT1 in shcontrol and shE6/E7 HeLa cells. The mRNA expression levels were determined by RT-qPCR. The mean ± SD of three independent experiments carried out in triplicate is shown; $P < 0.05$

and sTn [2, 4, 5, 24, 25]. The role of HPV infection in the glycosylation changes in cervical neoplasia has not been studied. The viral oncoproteins E6 and E7 play a role in cellular transformation and have been implicated in the altered expression of several genes. Notably, the E6 and E7 oncoproteins can modulate gene expression by different mechanisms. It has been reported that E6 can increase the expression of hTERT via transcription factor interactions, transcription repressor degradation, and chromatin structure modifications [11–13]. The role of viral oncoproteins in the glycosylation changes detected in cervical cancer could be due to changes in glycogene expression.

In the present study, we report the potential effects of the E6 and E7 oncogenes in the expression changes of glycogenes. Analysis of the microarray assay results of HeLa cells with partially silenced E6 and E7 oncogenes showed that the cells displayed altered expression of the glycogenes ALG14, POFUT1, FUT4, MAN2A1, DPY19L1, XXYLT1, UGT2B17, IDUA, UGCGL1, GALNT1, B4GALT2, UGT8, MANBAL, PIGV, FCMD, and C1GALT1C1. Specifically,the results suggest that the E6 and E7 oncoproteins upregulate the expression of of GALNT1, B4GALT2, UGT8, MAN BAL, PIGV, FCMD, and C1GALT1C1 whereas they downregulate ALG14, POFUT1, FUT4, MAN2A1, DPY19L1, XXYLT1, UGT2B17, IDUA, and UGCGL1. By RT-qPCR, we confirmed the downregulation of UGT8 and the upregulation of POFUT1 and ALG14 in HeLa shE6/E7 cells. We observed that the mRNA level changes were not statistically significant for XXYLT1, DPY19L1, and PIGV. Although these glycogenes have not yet reported to be altered in cervical cancer, some have been reported to be aberrantly expressed in other cancer types, suggesting that they could be implicated in cervical transformation. In this manner, MAN2A1 has been reported to be altered in glioblastoma [26], GALNT1 is altered in bladder cancer, C1GALT1C1 is altered in colorectal cancer [27], and UGT8 is altered in breast cancer [28]. By contrast, our results indicate that POFUT1, FUT4, and UGT2B17 are upregulated when E6 and E7 are knocked down, suggesting that the expression of these viral oncoproteins downregulates their expression. These results are contrary to reports on other cancer types, such as in leukaemia, glioblastoma, oral squamous cell carcinoma, gastric cancer, breast cancer, colorectal cancer, and endometrial cancer, wherein these genes are upregulated [26, 29–33]. These results indicate that the underlying mechanisms involved in their regulation are different depending on the type of cancer; for example, in human renal cell carcinoma, downregulation of ST3GAL4 is associated with malignant progression, while in gastric cancer, upregulation is associated with malignant behaviour [34, 35].

Table 2 Glycogenes upregulated in HeLa shE6/E7 cells

Gene/enzyme	Enzyme function	Gene alteration in cancer and oncogenic associated-effects
ALG14 UDP-N-Acetylglucosaminyltransferase Subunit	Associates with ALG13 and transfers a GlcNAc on GlcNAc-PP-Dol (second step of N-linked glycosylation)	Not reported
FUT4 Fucosyltransferase 4	Catalyzes the transfer of fucose (Fuc) residues from GDP-Fuc to [Fucα1 → 2Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → R] in α-1, 3 linkage	mRNA upregulated in acute myeloid leukaemia [54], gastric [30] and colorectal cancers [32]. Protein upregulated in breast cancer was associated with proliferation and metastasis [31]
MAN2A1 Mannosidase Alpha Class 2A Member 1	Hydrolyzes two peripheral mannosyl residues from Manαl--6(Manαl--3) Manαl--6(GlcNAcβ1--2Manα1--3) [Manβ1--4GlcNAcβ1--4GlcNAcβ1]-asparaginestructure	MAN2A1–FER tyrosine kinase fusion gene is expressed in liver tumours, oesophageal adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, prostate tumours, non-small cell lung tumours, and ovarian tumours [55].
DPY19L1 Dpy19 like 1 (C. elegans)	Participates in the C-mannosylation of tryptophan residues on target proteins.	Not reported
C3orf21 (XXYLT1) Xyloside Xylosyltransferase 1	Elongates the O-linked xylose-glucose disaccharide attached to EGF-like repeats (Notch proteins) by catalyzing the addition of the second xylose	Lower frequency of wild type genotype in the C3orf21 gene rs 2,131,877 locus in lung adenocarcinoma tissues [56]
IDUA Iduronidase, Alpha-L-	Cleaves α-linked iduronic acid residues from the nonreducing end of the glycosaminoglycans (GAGs), heparan sulfate, and dermatan sulfate	Not reported
UGT2B17 UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B17	Catalyzes the glucuronidation of steroids (detoxification)	mRNA upregulated in endometrial cancer [33]
POFUT1 Protein O-Fucosyltransferase 1	Catalyzes the reaction that attaches fucose through an O-glycosidic linkage to a conserved serine or threonine of EGF domains	mRNA upregulated in glioblastomas [26] Protein upregulated in oral squamous cell carcinoma [29]
UGCGL1 UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase 1	Reglucosylates single N-glycans near the misfolded part of the protein	Not reported

Table showing upregulated glycogenes, the names of the coded enzymes, their alteration in different cancer types and their oncogenic-associated-effects

Table 3 Glycogenes downregulated in HeLa shE6/E7 cells

Gene/enzyme	Enzyme function	Gene alteration in cancer and oncogenic- associated-effects
PIGV Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class V	Transfers the second mannose in the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor	Not reported
GALNT1 Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 1	Transfers N-acetylgalactosamine (GalNAc) to a serine or threonine residue O-glycosylation	mRNA upregulated in bladder cancer stem cells [57]
C1GALT1C1 C1GALT1 Specific Chaperone 1	Specific chaperone assisting the folding/stability of C1GALT1, for the generation of core 1 O-glycan T antigen	mRNA and protein upregulated in colorectal cancer [27]
FCMD Fukutin	Glycosyltransferase involved in the biosynthesis of α-dystroglycan (α-DG)	Not reported
MANBAL Mannosidase, beta A, lysosomal-like	Mannosidase beta-like	Not reported
B4GALT2 Beta-1,4-Galactosyltransferase 2	Transfers galactose to the terminal N-acetylglucosamine of complex-type N-glycans	Missense mutations in B4GALT2 gene in colon cancer with a predictive deleterious phenotype [58]
UGT8 Ceramide UDP-Galactosyltransferase	Catalyzes the transfer of galactose to ceramide (biosynthesis of GalCer)	mRNA and protein upregulated in breast [28] and increased protein expression in lung cancer [59]

Table showing downregulated glycogenes, the names of the coded enzymes and their alteration in different cancer types

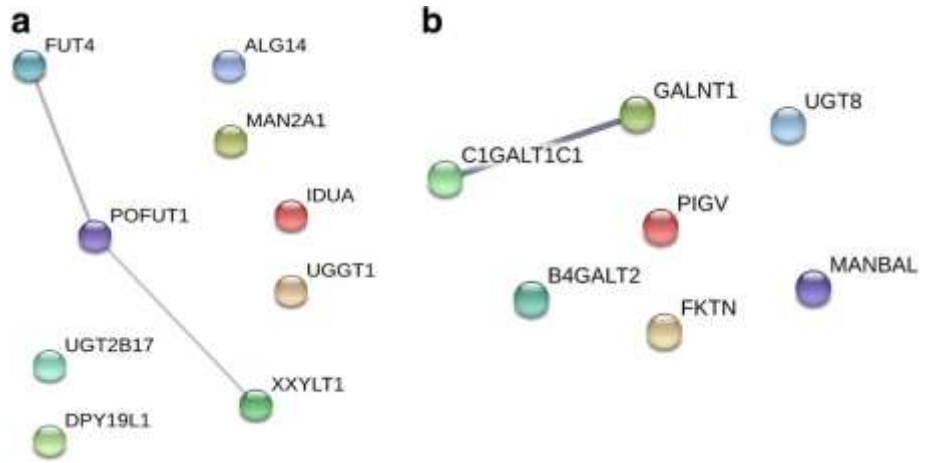


Fig. 6 The protein-protein interaction network built in STRING for the glycogenes altered by the partial silencing of E6 and E7. The glycogenes were loaded in a list, and the networks upregulated (a) and downregulated (b) glycogenes are shown. The thickness of the line refers to the level of interaction. The thickest line refers to a stronger interaction

The Human Protein Atlas database shows that the protein expression levels of Fut4, Man2A1 and Ugt2b17 are not increased in samples from patients with cervical cancer, and POFUT1 is detected at low and medium expression levels; these results agree with our results suggesting that the respective glycogenes are down-regulated in the presence of the E6/E7 oncoproteins. Moreover, GALNT1, and C1CAGLT1C, with higher expression in HeLa control cells, are reported to have medium and high expression levels in cervical cancer samples in this database, suggesting that viral oncoproteins could increase their expression in cervical cancer. Remarkably, in general, the data point to the same glycogene expression profile in cervical cancer.

In addition, functional bioinformatic analysis allowed us to elucidate the possible altered biosynthetic pathway considering the altered glycogenes and their potential targets. Thus, we identified that under higher E6 and E7 expression, the components of the Notch glycosylation pathway are downregulated, whereas the components of

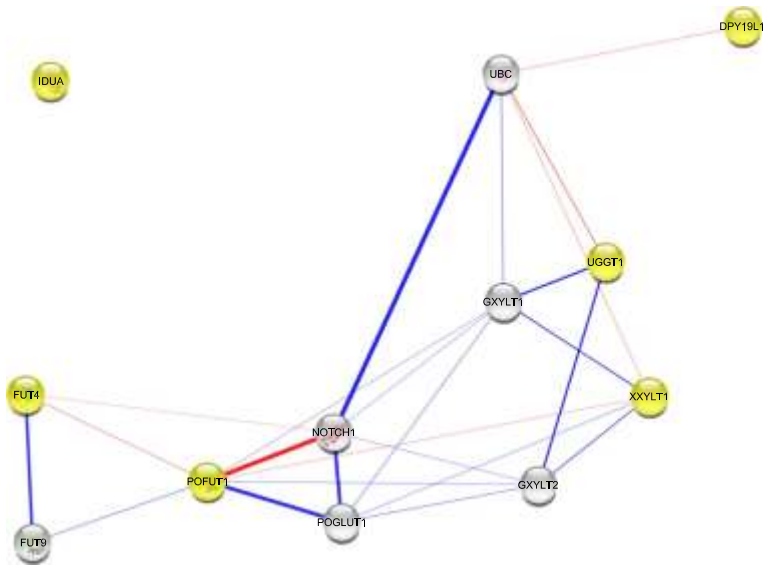


Fig. 7 The protein-protein interaction network built in Cytoscape for the altered glycogenes and five proteins with which they could interact. The glycogenes were loaded in a list, and the network of glycogenes upregulated in HeLa cells with partially silenced E6/E7 genes is shown. Glycogenes are shown in yellow, and the thickness of the line refers to the level of interaction. The thickest line refers to a stronger interaction. The red line refers to the interaction of the glycogene and the target protein to be glycosylated

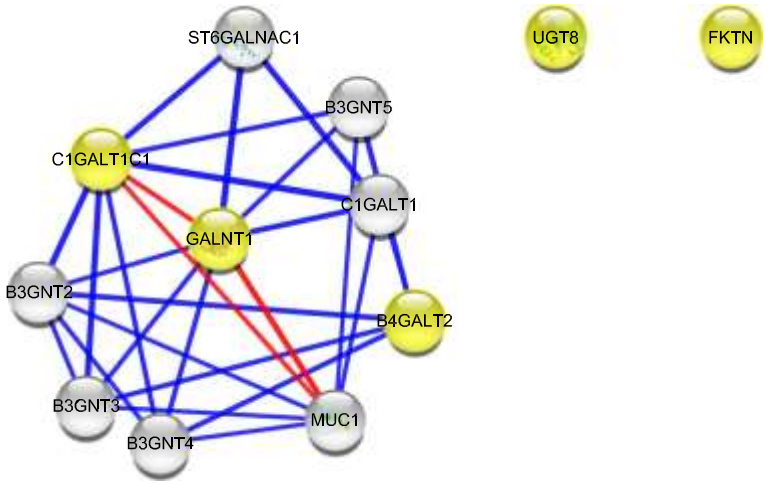


Fig. 8 The protein-protein interaction network built in Cytoscape for the altered glycogenes and five proteins with which they could interact. The glycogenes were loaded in a list, and the network of glycogenes downregulated in partially silenced HeLa cells is shown. Glycogenes are shown in yellow, and the thickness of the line refers to the level of interaction. The thickest line refers to a stronger interaction. The red line refers to the interaction of the glycogene and the target protein to be glycosylated

the synthesis of Tn and T antigens are upregulated. Interestingly, both mechanisms are aberrantly regulated in cancerous cell phenotypes [20, 36–38].

In the first case, analysis of the downregulated glycogenes under E6 and E7 activity and their potential targets showed a direct interaction within Pofut4 and Notch1. Pofut1 is an O-fucosyltranferase that modifies the extracellular EGF-like domains of Notch transmembrane proteins. The enzyme attaches a fucose via an O-glycosidic linkage to a conserved serine or threonine for proper protein folding [39]. Interestingly, defects in Notch receptor fucosylation by the deletion of POFUT1 have been implicated in the development of myeloid hyperplasia in adult mice. Moreover, POFUT1 deficiency provokes a slight decrease in Notch1 and Notch2 expression at the cell surface and abrogates the binding between Notch and its ligand Delta [40]. Additionally, evidence from Drosophila suggest that Pofut1 could exert a chaperone activity on the Notch protein. The absence of OFUT1 (Pofut1) leads to the decrease in Notch protein expression on the cell surface, whereas its overexpression increases the binding between Notch and its ligand [41]. Interestingly and consistent with this notion, the absence of OFUT1 leads to the retention of Notch in the endoplasmic reticulum [42]. In human cervical cancer, several reports indicate intracellular localization of the Notch1 protein [42–46]. Moreover, studies on cervical cancer showed that in a normal cervix, Notch-1 is more commonly membrane-localized than in a cancerous cervix [46]. Thus, our results could suggest that under downregulation of the enzyme Pofut1, the protein Notch1 could exhibit a decrease in its O-fucosylation pattern or in its presence at the cell membrane. Alteration of this particular glycogene could promote aberrant Notch signalling [47, 48].

In the second case, higher E6 and E7 expression, the glycogenes GALNT1 and C1GALT1C1 are upregulated. Since, GalNAc-T1 and C1GalT1 specific chaperone 1 participate in the Tn antigen O-glycosylation pathway [49, 50], the results suggest that E6 and E7 activity could promote Tn antigen biosynthesis by upregulating the expression of both enzymes. Mucin1 is a membrane-bound protein that participates in intracellular signalling and cell adhesion. The protein is O-glycosylated by several transferases, including GalNAc-T1 and the C1GalT1C1-C1GalT1 complex. Changes in this glycosylation process have been associated with different types of cancer [51]. Specifically, two tumour antigens expressed in carcinomas are Tn and sialyl-Tn; these structures are present in many mucin-type glycoproteins including Muc1 [49–51]. O-glycosylation that leads to Tn synthesis begins with the addition of an N-acetylgalactosamine to a Ser or Thr residue of the protein, catalyzed by GalNT1. Following Tn antigen formation, this new chain can serve as an acceptor for at least three other Golgi glycosyltransferases. The most common modification of the Tn antigen is the formation of the core 1 disaccharide (or T antigen) by the action of C1GalT1 (known as T-synthase), which requires the chaperone C1GalT1C1 (known as COSMC) for its activity. C1GalT1C1 resides in the endoplasmic reticulum and prevents the misfolding, aggregation, and proteasome-dependent degradation of newly synthesized T-synthase. In the absence of functional C1GalT1C1, the newly synthesized T-synthase is inactive and rapidly degraded. Loss of C1GalT1C1 function eliminates T-synthase activity and the consequential Tn antigen expression in several human tumours [50]. In summary, our results suggest an increase in Tn and T antigen synthesis in Mucin1 since the cells

displayed an upregulation of both the GalNT1 and C1GalT1C1 proteins. In cervical cancer, Tn and sTn antigens are expressed in invasive squamous cell carcinomas, but not in a normal squamous epithelium [24].

By contrast, GalNT1 can exhibit a mucin-independent function in cancer and be implicated in other pathways, such as EGFR signaling, by increasing EGFR degradation via decreasing of EGFR O-glycosylation [52]. Moreover, GalNT1 can mediate the O-glycosylation of Sonic Hedgehog to promote signal activation in bladder cancer stem cells [53]. In the case of C1GalT1C1, forced expression of the chaperone in colon cancer cell lines increases T antigen expression and enhances cell growth, migration, and invasion, and this phenotype is associated with the increased phosphorylation of ERK and AKT. By contrast, knocking down C1GalT1C1 decreases malignant behaviours and the signalling pathways, suggesting that the chaperone can promote malignant phenotypes of colon cancer cells, mainly via activation of the MEK/ERK and PI3K/Akt signalling pathways [27].

These reports suggest that the glycogenes altered in the microarray assay of HeLa cells with partially silenced E6 and E7 oncogenes, could play important roles in cervical transformation that have not yet been explored.

Conclusions

Partially silencing of the E6 and E7 HPV oncogenes could be implicated in important glycosylation pathways altered in cervical cancer. In the present study, glycosylation of the Notch receptor and O-glycosylation type mucin were identified. The identified genes implicated in these pathways have not been reported in cervical cancer.

The analysis of glycogenes altered by the HPV oncoproteins E6 and E7 is a valuable tool to identify possible glycogenes implicated in the cervical transformation process and to understand the role of HPV infection in glycosylation changes detected in cervical cancer.

Abbreviations

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; HPV: Human papillomavirus; polyLacNAc: Polylactosamine; β3GnTs: β1,3-N-acetylglucosaminyl transferases

Acknowledgements

We thank to Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, José Luis. Santillán Torres, and Jorge Ramírez for their technical assistance in the microarray determinations and Gerardo Coello, Gustavo Corral and Ana Patricia Gómez for their assistance with GenArise software.

Funding

This study was supported by the Instituto Mexicano del Seguro Social (grant no. FIS/IMSS/PROT/G14/1293). JRL has a fellowship from Fundación IMSS. MAT was supported by a Ph.D. fellowship from CONACYT (no. 242753), and from IMSS (98227565). Programa Cátedras CONACYT 2016 (no. 485) and Fondo Redes Temáticas de Investigación-CONACYT (253596).

Availability of data and materials

The microarray data analyzed herein are included in the NCBI- Gene Expression Omnibus database (accession number GSE90930) and in the article text.

Authors' contributions

MAT, GSL and JRL participated in the molecular biology experiments. MAT, RCL, PLMM, JRL and VVR participated in the in silico analysis. AAL and LJS participated in the gene silencing assay. MAT, PLMM and VVR participated in drafting the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

[1]Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Km. 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec, Atlixco, C.P. 74360 Puebla, Mexico. [2]Posgrado en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edificio 103-J Cd. Universitaria, Col. San Manuel, C.P. 72570 Puebla, Pue, Mexico. [3]Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Sierra Mojada 800, Col Independencia, C.P. 44340 Guadalajara, Jalisco, Mexico. [4]CONACYT- Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Km. 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec, Atlixco, C.P. 74360 Puebla, Mexico.

Received: 19 February 2018 Accepted: 9 July 2018
Published online: 20 July 2018

References

1. Pinho S, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nat Rev Cancer. 2015;15:540–55.
2. Wang PH, Li YF, Juang CM, Lee YR, Chao HT, Ng HT, et al. Expression of sialyltransferase family members in cervix squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. Gynecologyc Oncology. 2002;86:45–52.
3. Carrilho C, Cantel M, Gouveia P, David L. Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and sialosyl-T) and gp 230 mucin-like glycoprotein are cancdidate markers for neoplastic transformation of the human cervix. Virchows Arch. 2000;437:173–9.
4. Engelstaedter V, Fluegel B, Kunze S, Mayr D, Friese K, Jeschke U, et al. Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis a, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer. Histol Histopathol. 2012;27:507–14.
5. Velázquez-Márquez N, Santos-López G, Jiménez-Aranda L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions. J Biosci. 2012;37:999–1004.
6. Clark AT, Guimarães da Costa VM, Bandeira Costa L, Bezerra Cavalcanti CL, De Melo Rêgo MJ, Beltrão EI. Differential expression patterns of N-acetylglucosaminyl transferases and polylactosamines in uterine lesions. Eur J Histochem. 2014;58:2334.
7. zur Hausen H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002;2:342–50.
8. Dahlström LA, Ylitalo N, Sundström K, Palmgren J, Ploner A, Eloranta S, et al. Prospective study of human papillomavirus and risk of cervical adenocarcinoma. Int J Cancer. 2010;127:1923–30.
9. Zhao JW, Fang F, Guo Y, Zhu TL, Yu YY, Kong FF, et al. HPV16 integration probably contributes to cervical oncogenesis through interrupting tumor suppressor genes and inducing chromosome instability. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35:180.
10. Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. Cancer Lett. 2011;305:113–22.
11. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. Genes Dev. 2004;18:2269–82.

12. Wang S, Pang T, Gao M, Kang H, Ding W, Sun X, et al. HPV E6 induces eIF4E transcription to promote the proliferation and migration of cervical cancer. FEBS Lett. 2013;587:690–7.
13. Songock WK, Kim SM, Bodily JM. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. Virus Res. 2017;231:56–75.
14. Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. Oncogene. 2003;22:5938–45.
15. Qi Z, Xu X, Zhang B, Li Y, Liu J, Chen S, et al. Effect of simultaneous silencing of HPV-18 E6 and E7 on inducing apoptosis in HeLa cells. Biochem Cell Biol. 2010;88:697–704.
16. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;4:44–57.
17. Buettner FF, Ashikov A, Tiemann B, Lehle L, Bakker H. C. Elegans DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. Mol Cell. 2013;50:295–302.
18. Milde-Langosch K, Karn T, Schmidt M, zu Eulenburg C, Oliveira-Ferrer L, Wirtz RM, et al. Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2014;15:295–305.
19. Hall AHS, Alexander KA. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. J Virol. 2003;77:6066–9.
20. Hirao T, Sakamoto Y, Kamada M, Hamada S, Aono T. Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells. Cancer. 1993;72:154–9.
21. Kumar SR, Sauter ER, Quinn TP, Deutscher SL. Thomsen-Friedenreich and Tn antigens in nipple fluid: carbohydrate biomarkers for breast cancer detection. Clin Cancer Res. 2005;11:6868–71.
22. Danussi C, Coslovi A, Campa C, Mucignat MT, Spessotto P, Uggeri F, et al. A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. Glycobiology. 2009;19:1056–67.
23. Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. Oncotarget. 2016;7:35478–89.
24. Terasawa K, Furumoto H, Kamada M, Aono T. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. Cancer Res. 1996;56:2229–32.
25. López-Morales D, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Zenteno E, Vallejo-Ruiz V. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. Diagn Pathol. 2010;4:74.
26. Kroes RA, Dawson G, Moskal JR. Focused microarray analysis of glyco-gene expression in human glioblastomas. J Neurochem. 2007;103:14–24.
27. Huang J, Che M, Lin N, Hung JS, Huang YT, Lin WC, et al. The molecular chaperone Cosmc enhances malignant behaviors of colon cancer cells via activation of Akt and ERK. Mol Carcinog. 2014;71:62–71.
28. P D, Owczarek T, Plazuk E, Gomułkiewicz A, Majchrzak M, Podhorska-Okołów M. Ceramide galactosyltransferase (UGT8) is a molecular marker of breast cancer malignancy and lung metastases. Br J Cancer. 2010;103:524–31.
29. Yokota S, Ogawara K, Kimura R, Shimizu F, Baba T, Minakawa Y, et al. Protein O-fucosyltransferase 1: a potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer. Int J Oncol. 2013;43:1864–70.
30. Petretti T, Schulze B, Schlag PM, Kemmner W. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human gastric carcinomas. Biochim Biophys Acta. 1999;1428:209–28.
31. Yan X, Lin Y, Liu S, Yan Q. Fucosyltransferase IV (FUT4) as an effective biomarker for the diagnosis of breast cancer. Biomed Pharmacother. 2015;70:299–304.
32. Petretti T, Kemmner W, Schulze B, Schlag PM. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. Gut. 2000;46:359–66.
33. Hirata H, Hinoda Y, Zaman MS, Chen Y, Ueno K, Majid S, et al. Function of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 (UGT2B17) is involved in endometrial cancer. Carcinogenesis. 2010;31:1620–6.
34. Saito S, Yamashita S, Endoh M, Yamato T, Hoshi S, Ohyama C, et al. Clinical significance of ST3Gal IV expression in human renal cell carcinoma. Oncol Rep. 2002;9:1251–5.
35. Jun L, Yuanshu W, Yanying X, Zhongfa X, Jian Y, Fengling W, et al. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. Med Oncol. 2012;29:84–90.
36. Dang TP. Notch, apoptosis and Cancer. In: Reichrath J, Reichrath S, editors. Notch signaling in embryology and Cancer. US: Springer; 2012. p. 199–209.
37. Wei H, Cheng Z, Ouyang C, Zhang Y, Hu Y, Chen S, et al. Glycoprotein screening in colorectal cancer based on differentially expressed Tn antigen. Oncol Rep. 2016;36(3):1313–24.
38. Fu C, Zhao H, Wang Y, Cai H, Xiao Y, Zeng Y, et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. HLA. 2016;88(6):275–86.
39. Stahl M, Uemura K, Ge C, Shi S, Tashima Y, Stanley P. Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian notch signaling. J Biol Chem. 2008;283:13638–51.
40. Yao D, Huang Y, Huang X, Wang W, Yan Q, Wei L, Xin W, et al. Protein O-fucosyltransferase 1 (Pofut1) regulates lymphoid and myeloid homeostasis through modulation of notch receptor ligand interactions. Blood. 2011;117:5652–62.
41. Okajima T, Reddy B, Matsuda T, Irvine KD. Contributions of chaperone and glycosyltransferase activities of O-fucosyltransferase 1 to notch signaling. BMC Biol. 2008;6(1).
42. Vodovar N, Schweisguth F. Functions of O-fucosyltransferase in notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy? J Biol. 2008;7(2)
43. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. Proc Natl Acad Sci. 1995;92:6414–8.
44. Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna S. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. J Gen Virol. 1997;78:1095–101.
45. Ramdass B, Maliekal TT, Lakshmi S, Rehman M, Rema P, Nair P, et al. Coexpression of Notch1 and NF-kappaB signaling pathway components in human cervical cancer progression. Gynecolyc Oncology. 2007;104:352–61.
46. Song LL, Peng Y, Yun J, Rizzo P, Chaturvedi V, Weijzen S, et al. Notch-1 associates with IKKα and regulates IKK activity in cervical cancer cells. Oncogene. 2008;27:5833–44.
47. Maliekal TT, Bajaj J, Giri V, Subramanyam D, Krishna S. The role of notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors. Oncogene. 2008;27:5110–4.
48. Sun L, Liu M, Sun GC, Yang X, Qian Q, Feng S, et al. Notch signaling activation in cervical Cancer cells induces cell growth arrest with the involvement of the nuclear receptor NR4A2. J Cancer. 2016;7:1388–95.
49. Ju T, Otto VI, Cummings RD. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. Angew Chem Int Ed. 2011;50:1770–91.
50. Ju T, Aryal RP, Kudelka MR, Wang Y, Cummings RD. The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. Cancer Biomarkers. 2014;14:63–81.
51. Sousa AM, Grandgenett PM, David L, Almeida R, Hollingsworth MA, Santos-Silva F. Reflections on MUC1 glycoprotein: the hidden potential of isoforms in carcinogenesis. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 2016;124:913–24.
52. Huang MJ, Hu RH, Chou CH, Hsu CL, Liu YW, Huang J, et al. Knockdown of GALNT1 suppresses malignant phenotype of hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR signaling. Oncotarget. 2015;6:5650–65.
53. Li C, Du Y, Yang Z, He L, Wang Y, Hao L, et al. GALNT1-mediated glycosylation and activation of sonic hedgehog signaling maintains the self-renewal and tumor-initiating capacity of bladder cancer stem cells. Cancer Res. 2016;76:1273–83.
54. Stirewalt DL, Meshinchi S, Kopecky KJ, Fan W, Pogosova-Agadjanyan EL, Engel JH, et al. Identification of genes with abnormal expression changes in acute myeloid leukemia. Genes Chromosomes and Cancer. 2008;47:82–0.
55. Chen ZH, Yu YP, Tao J, Liu S, Tseng G, Nalesnik M, et al. MAN2A1-FER fusion gene is expressed by human liver and other tumor types and has oncogenic activity in mice. Gastroenterology. 2017;153:11203–2.
56. Yang L, Wang Y, Fang M, Deng D, Zhang Y. C3orf21 ablation promotes the proliferation of lung adenocarcinoma, and its mutation at the rs2131877 locus may serve as a susceptibility marker. Oncotarget. 2017;8:33422–31.
57. Ding M, Wang H, Wang J, Zhan H, Zuo YG, Yang DL, et al. ppGalNAc T1 as a potential novel marker for human bladder Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13:5653–72.
58. Venkitachalam S, Revoredo L, Varadan V, Fecteau RE, Ravi L, Lutterbaugh J, et al. Biochemical and functional characterization of glycosylation-associated mutational landscapes in colon cancer. Sci Rep. 2016;6:23642.
59. Rzechonek A, Cygan M, Blasiak P, Muszczynska-Bernhard B, Bobek V, Lubicz M, et al. Expression of Ceramide Galactosyltransferase (UGT8) in primary and metastatic lung tissues of non-small-cell lung Cancer. Adv Exp Med Biol. 2016;952:51–8.