



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**TESIS**

**“IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN LA  
GLICOSILACIÓN ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DE  
LA PROTEÍNA E5 Y A LA INFECCIÓN POR EL VPH”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**M.C. DENISSE IRASEMA CISNEROS RAMÍREZ**

**DIRECTORES DE TESIS**

**D.C. VERÓNICA VALLEJO RUIZ  
D.C. YGNACIO MARTÍNEZ LAGUNA**

**PUEBLA, PUE. A MARZO DE 2021**

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
<b>1.1. Cáncer cervicouterino</b> .....	3
<b>1.2. Clasificación y epidemiología del Virus del Papiloma Humano</b> .....	4
<b>1.3. Estructura del genoma del VPH</b> .....	7
<b>1.4. Ciclo replicativo del VPH</b> .....	11
<b>1.5. Oncoproteínas E6 y E7 del VPH</b> .....	14
<b>1.5.1. Oncoproteína E6</b> .....	14
<b>1.5.2. Oncoproteína E7</b> .....	15
<b>1.6. Oncoproteína E5 y sus blancos celulares</b> .....	17
<b>1.7. Glicosilación alterada y cáncer</b> .....	17
<b>1.8. Antecedentes</b> .....	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	22
III. HIPÓTESIS.....	23
IV. OBJETIVOS.....	23
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	23
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
V. ESQUEMA DE TRABAJO.....	25
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
<b>Cultivo de líneas celulares</b> .....	26
<b>Microarreglos de expresión</b> .....	26
<b>Análisis de glicogenes</b> .....	27
<b>Redes de interacción proteína-proteína</b> .....	27
<b>Expresión del gen E5 y de glicogenes alterados por RT-PCR cuantitativa</b> .....	28
Ensayos citoquímicos.....	29
Análisis estadístico.....	30
VII. RESULTADOS.....	31
<b>Expresión de E5 VPH 16</b> .....	31

<b>E5 del VPH 16 modifica la expresión de glicogenes.....</b>	<b>32</b>
<b>Redes de interacción de proteínas de glicogenes alterados por E5 VPH 16.</b> .....	<b>35</b>
<b>E5 VPH 16 aumenta la expresión de <i>ST3GAL3</i> y <i>ST6GAL1</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>La oncoproteína E5 del VPH 16 no modifica de manera significativa la</b> <b>expresión de ácido siálico .....</b>	<b>40</b>
VIII. DISCUSIÓN.....	43
IX. CONCLUSIÓN .....	56
X. PERSPECTIVAS .....	57
XI. REFERENCIAS.....	58
XII. ANEXO .....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización del genoma del VPH 16 .....	9
<b>Figura 2.</b> Ciclo replicativo del VPH.....	13
<b>Figura 3.</b> Western blot con tinción de lectina .....	21
<b>Figura 4.</b> Expresión del gen E5 en células CasKi y en queratinocitos transfectados de manera estable con el gen <i>E5</i> (HaCat-E5).....	31
<b>Figura 5.</b> Red de interacción de proteínas codificadas por glicogenes con aumento de expresión. ....	37
<b>Figura 6.</b> Red de interacción de proteínas codificadas por glicogenes que disminuyen su expresión .....	38
<b>Figura 7.</b> E5 del VPH 16 incrementa los niveles de ARNm de los genes <i>ST3GAL3</i> y <i>ST6GAL1</i> .....	39
<b>Figura 8.</b> Expresión de ácido siálico en enlace $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ en las líneas celulares HaCat-pMSG y HaCat E5.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas del VPH y funciones asociadas .....	10
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real.....	28
<b>Tabla 3.</b> Glicogenes que modifican su expresión en presencia de E5.....	33
<b>Tabla 4.</b> Glicogenes que aumentan su expresión en presencia de la oncoproteína E5 del VPH 16.....	34
<b>Tabla 5.</b> Glicogenes que disminuyen su expresión en presencia de la oncoproteína E5 del VPH 16.....	35

Puebla, Pue. a 19 de marzo 2021.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la alumna **Denisse Irasema Cisneros Ramírez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Identificación de cambios en la glicosilación asociado a la expresión de la proteína E5 y a la infección por el VPH”**

A nuestro juicio, la alumna **Denisse Irasema Cisneros Ramírez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”



D.C. María Lilia Cedillo Ramírez



D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia



D.C. Patricia Lozano Zarain



D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta



D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

## **APOYOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS**

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Los apoyos recibidos durante la realización de esta tesis son:

Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de CVU **362029**

Beca del IMSS, con número de matrícula **98227564**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios.** Por todas las bendiciones que me ha dado, entre ellas a mis padres, mi esposo, mis hijas, amigos y por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

**A mi madre.** Por su amor y apoyo incondicional, así como la confianza que ha depositado en mí. Además, de enseñarme lo fuerte que puede ser una mujer por sus hijos.

**A mi esposo José Juan e hijas Martha y Regina.** Por el amor, apoyo, paciencia y confianza que tuvieron conmigo.

**A mis amigos y compañeros de laboratorio, así como a los investigadores, químicos y técnicos,** que me apoyaron moral y experimentalmente durante la realización de esta tesis.

**A mis asesores de tesis,** la Dra. Verónica Vallejo Ruíz y el Dr. Ygnacio Martínez Laguna, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por compartir sus conocimientos, por el apoyo y guía que tuve durante todo el recorrido del doctorado, publicación y titulación.

**A mi comité revisor.** Dra. Patricia Lozano, Dra. Rosa Rocha, Dra. Nora Rosas, Dra. Sandra Carmona, Dra. Lilia Cedillo; por el apoyo y todas las aportaciones que contribuyeron a la mejoría de mi formación académica y a la realización de esta tesis.



## RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto cáncer más común en la mujer a nivel mundial y representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres de 15 a 44 años en México. El virus del papiloma humano (VPH) es el agente etiológico del CaCu. Los tipos de VPH 16 y 18 son responsables de alrededor del 70% de todos los casos de cáncer de cuello uterino en el mundo. Los genes *E5*, *E6* y *E7* se consideran oncogenes virales ya que se ha demostrado inducen la inmortalización y la transformación celular.

La oncoproteína E5 del VPH16 es una proteína membranal localizada en aparato de Golgi, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Dentro de sus funciones está su participación en la evasión del virus a la respuesta inmune.

Durante la transformación maligna existen cambios en la expresión de glicanos, se ha relacionado con cambios en funciones celulares asociadas al fenotipo maligno, como mayor capacidad de invasión y metástasis.

En nuestro grupo de investigación se ha encontrado que la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 se relaciona con cambios en la expresión de glicogenes.

En este estudio se evaluó el efecto sobre la expresión de glicogenes de la oncoproteína E5 del VPH 16, en una línea celular de queratinocitos transfectada de manera estable. Los genes alterados se evaluaron mediante un microarreglo de expresión y algunos de ellos se validaron por RT-PCR cuantitativa. El análisis de los microarreglos de expresión mostró alteraciones en la expresión de ciertos glicogenes, encontrando un incremento en *ST6GAL1*, *ST3GAL3*, *CHST2* y *MANBA*, y una disminución en *UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* y *UGT1A10*. Mediante análisis *in silico* se identificaron vías de glicosilación alteradas en presencia de E5, encontrando alteración en la síntesis de glicanos sialilados, queratán sulfato y glicosaminoglicanos. Este es el primer estudio que reporta el efecto de E5 del VPH 16 sobre la expresión de glicogenes.



# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una enfermedad en la cual las células del cuello uterino se vuelven anormales y comienzan a crecer de manera incontrolable. El cuello uterino está formado por dos tipos de epitelios, el epitelio escamoso estratificado y el epitelio columnar simple mucosecretor. El carcinoma de células escamosas se origina como su nombre lo dice en el epitelio escamoso y es la forma histológica más común de tumor cervical, representando más del 90% de los cánceres que se originan en este sitio. Aproximadamente el 6% de los tumores cervicales son adenocarcinomas y se originan en el epitelio columnar y menos del 2% corresponden a carcinomas adenoescamosos (mixtos) (Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, Bosch FX & S, 2017; Šarenac & Mikov, 2019). Además, existen otros tipo de carcinomas y sarcomas cervicales que presentan una baja frecuencia (Šarenac & Mikov, 2019).

Con aproximadamente 570,000 casos y 311,000 muertes en el año 2018, el CaCu es la cuarta neoplasia maligna femenina más común en todo el mundo (Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, 2018; Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, 2018), ocupando el segundo lugar en incidencia y mortalidad después del cáncer de mama en entornos de índice de desarrollo humano más bajos (Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, 2018; Globocan 2018).

Existen diversos factores de riesgo para desarrollar CaCu, entre ellos, inicio temprano de vida sexual, múltiples parejas sexuales o parejas de alto riesgo, inmunosupresión (VIH), (Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, 2018; López, A y Lizano, 2006), múltiples embarazos, embarazos en adolescencia, tabaquismo, malos hábitos alimenticios (Kumar, 2016), uso prolongado de anticonceptivos, edad, predisposición genética y la infección persistente con virus del papiloma humano

(VPH) de alto riesgo (López, A y Lizano, 2006), siendo esta última, la principal causa de CaCu, presente en la mayoría ( 99.7%) de los casos (Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, 2018; López, A y Lizano, 2006). La presencia de la infección por VPH de alto riesgo no es suficiente para inmortalizar y transformar las células epiteliales del huésped; alteraciones genéticas y epigenéticas son necesarias para el desarrollo de la carcinogénesis (Saavedra, Brebi, & Roa, 2012).

El riesgo relativo de desarrollar CaCu es aproximadamente un 65% más alto en mujeres con un hallazgo positivo de VPH en comparación con aquellas con un hallazgo negativo y también se estableció que en mujeres con infección persistente por VPH, existe un mayor riesgo de progresión de la enfermedad encontrando con frecuencia una neoplasia intraepitelial cervical II o III (NIC II y NICIII) en un período de 2 años en relación con mujeres con un hallazgo negativo de un VPH (Šarenac & Mikov, 2019).

## **1.2. Clasificación y epidemiología del Virus del Papiloma Humano**

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*. Estos virus infectan epitelios secos y húmedos (Bernard, 2005; Lazarczyk, Cassonnet, Pons, Jacob, & Favre, 2009; Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006). Su clasificación está basada en la comparación de secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto (ORF, *Open Reading Frame*) del gen L1 que codifica para la proteína mayor de la cápside viral. Se considera un nuevo genotipo cuando la identidad de la secuencia es menor al 90%. Los subtipos o variantes tienen una identidad de nucleótidos de entre 90-98% o más del 98%, respectivamente (De Villiers, Fauquet, Broker, Bernard, & Zur Hausen, 2004; Hans-Ulrich Bernard, Robert D. Burk, Zígui Chen & Harald zur Hausen, 2010; Lazarczyk *et al.*, 2009; Mok, Wong, Lu, Munger, & Nagymanyoki, 2018). Un sistema de clasificación alternativo está basado en la secuencia de nucleótidos de los marcos de lectura abiertos (ORF open reading frame) de E1 y E2. Además, los VPH también se clasifican de acuerdo con sus tropismos de tejido

(cutáneo o mucoso) y de acuerdo con sus potenciales oncogénicos (Lazarczyk *et al.*, 2009).

En la actualidad, se han identificado más de 200 genotipos de VPH y se agrupan filogenéticamente en diferentes géneros (S. V. Graham, 2017; Lazarczyk *et al.*, 2009; Mok *et al.*, 2018). Se han definido evolutivamente cinco grupos de genotipos de VPH:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\nu$ . De éstos, el grupo más grande es el  $\alpha$ , que contiene 64 genotipos, los cuales infectan principalmente los epitelios de la mucosa (S. V. Graham, 2017; Hans-Ulrich Bernard, Robert D. Burk, Zigu Chen & Harald zur Hausen, 2010). Más de 40 genotipos son capaces de infectar el tracto anogenital. Estos genotipos de VPH se clasifican en dos grupos según su potencial oncogénico. Los VPH de bajo riesgo (VPH 6 y VPH 11) están relacionados con verrugas genitales y los VPH de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82) causan neoplasias intraepiteliales que puede progresar a carcinoma (S. V. Graham, 2017; Mok *et al.*, 2018; zur Hausen, 2002). Los VPH del grupo  $\beta$  (VPH 5, 8, 17, 20, 24, 36 y 38) infectan principalmente epitelios cutáneos. La infección con estos genotipos así como la radiación UV, se han asociado a carcinomas de células escamosas no melanoma, que representa el cáncer humano más común. Los VPH de los tres grupos restantes ( $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\nu$ ) normalmente solo causan enfermedades benignas (S. V. Graham, 2017).

El VPH 16 causa aproximadamente el 55% de los cánceres de cuello uterino, el VPH 18 el 15% de los casos y el resto son causados por otros VPH de alto riesgo (S. V. Graham, 2017). Mientras que el VPH 18 es un genotipo fuertemente asociado con el adenocarcinoma de cuello uterino, el VPH 16 está relacionado con carcinoma de células escamosas (Woodman, Collins, & Young, 2007). En México, se han reportado a los genotipos VPH 16 y 18, como los más prevalentes en pacientes con CaCu, seguidos de otros genotipos como VPH 45, 58, 52, entre otros (Aguilar-Lemarro A, Jave-Suarez LF, 2015; Flores-Miramontes *et al.*, 2015; Illades-Aguilar *et al.*, 2009). Siendo, el VPH 16 el más frecuente, en CaCu, lesiones pre-neoplásicas y en muestras con citologías normales.

Las infecciones genitales por VPH son particularmente frecuentes en personas jóvenes sexualmente activas (Mok *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayoría de las mujeres infectadas eliminan la infección (6-12 meses) por mecanismos inmunológicos, reduciendo la progresión al CaCu (Lizano-soberón, Marcela, 2009; zur Hausen, 2002). Es importante mencionar, que en la actualidad, el VPH está asociado con cánceres en sitios anatómicos distintos de la región anogenital, como la boca y garganta (S. V. Graham, 2017; Ryu, 2017), amígdala, la base de la lengua y la faringe, además de relacionarse con cáncer de cabeza y cuello, próstata, colon, vejiga, esófago y mama (S. V. Graham, 2017).

La infección inicial con VPH de alto riesgo causa lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LEIBG), la lesión puede permanecer en bajo grado, retroceder o progresar a lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LEIAG). Esta última etapa puede persistir o progresar a carcinoma (Mcmurray, Nguyen, Westbrook, & Mcance, 2001; K. J. Park & Soslow, 2009; zur Hausen, 2002).

Los cambios premalignos y malignos en el cuello uterino pueden estar asociados con diferentes factores de riesgo. En una exposición más prolongada y frecuente a estos factores, la posibilidad de cambios patológicos del desarrollo en el cuello uterino es mayor. Por ejemplo, en el cáncer de cuello uterino, la mutación p53 es poco común pero el VPH está presente en más del 99% de los tumores (Šarenac & Mikov, 2019).

Las etapas pre-neoplásicas y el CaCu se pueden detectar mediante citología y análisis colposcópicos (Ryu, 2017; zur Hausen, 2002). La prueba de Papanicolaou sirve para detectar lesiones asociadas al VPH en el cuello uterino, lo que ha reducido drásticamente la incidencia y las tasas de mortalidad de la enfermedad (Mok *et al.*, 2018). Las células coilocíticas encontradas en los frotis cervicales de pacientes con lesiones displásicas representan el cambio citopatológico de una infección por VPH (zur Hausen, 2009). Además de la prueba de Papanicolaou de

tejidos cervicales, las pruebas moleculares para identificar el genoma viral permiten un diagnóstico temprano del CaCu (Torres-Poveda *et al.*, 2020).

Investigaciones recientes muestran que una mujer que da positivo a infección por VPH en dos ocasiones después de 6 y 12 meses tiene tendencia a desarrollar lesiones precancerosas del cuello uterino. En el cuello del útero, así como en los demás órganos genitales no hay aparición repentina de una lesión cancerosa, cambios graduales en las células epiteliales se van produciendo a través del tiempo. La biopsia de la lesión y su análisis histopatológico dan finalmente el diagnóstico confirmatorio. Los marcadores tumorales de los últimos años también toman su lugar en el diagnóstico de cáncer de cuello uterino (Šarenac & Mikov, 2019).

En la actualidad, la prevención primaria eficaz del CaCu es la vacunación contra el VPH. Estas vacunas profilácticas consisten en proteínas L1 del VPH recombinante que se autoensamblan en partículas similares a virus (VLP). Las vacunas bivalentes (VPH 16 y 18) y cuadrivalentes (VPH 6, 11, 16 y 18) contra el VPH han demostrado tener más del 90% de eficacia en la prevención de las infecciones por los VPH 16 y 18. Además, desde 2018 se está implementando una vacuna nonavalente (VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58) (Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, 2018; Huh *et al.*, 2017). Debido a que estas vacunas desencadenan respuestas inmunes humorales e inhiben la entrada viral, no se predice que afecten las infecciones por VPH que ya están activas al momento de la vacunación (Mok *et al.*, 2018).

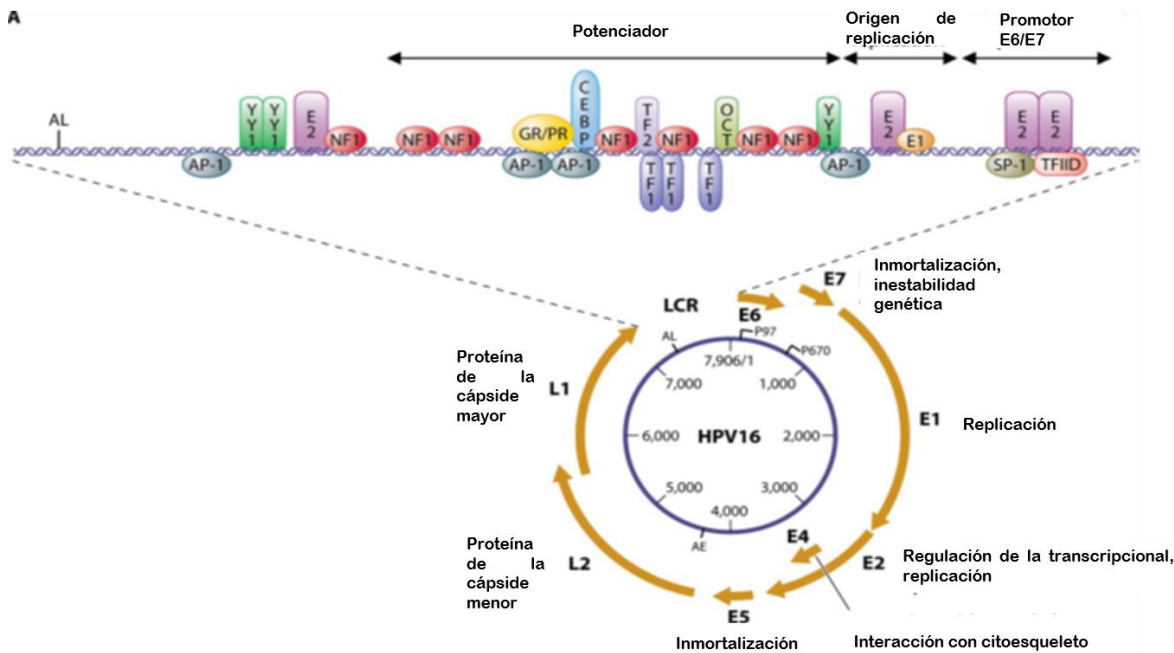
### **1.3. Estructura del genoma del VPH**

Los VPH, son pequeños virus de 55 nm de diámetro, sin envoltura y con cápside icosaédrica. Su genoma consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 8 kb. El genoma del VPH se divide en tres regiones: una región regulatoria río arriba o región larga de control (URR, *upstream regulatory region* o LCR, *long control región*) que abarca aproximadamente el 10% del

genoma; una región temprana (E, *Early*), que ocupa más del 50% del genoma y una región tardía (L, *Late*), que abarca casi el 40% del genoma (Hausen, 1996; Lazarczyk *et al.*, 2009; Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006). Las tres regiones en todos los VPHs están separadas por dos sitios de poliadenilación (pA): sitios pA (AE) temprano y pA (AL) tardío (Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006) (figura 1). El genoma del VPH 16 contiene dos promotores principales, el P97 que se encuentra río arriba del marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) de E6, responsable de casi toda la expresión génica temprana y que es activo en células basales no diferenciadas y P670, un promotor tardío que se encuentra dentro del ORF de E7, activo en queratinocitos diferenciados y responsable de la expresión de genes tardíos (Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006).

La LCR, se localiza río arriba de la región E, no tiene función codificante, pero contiene secuencias regulatorias que actúan en *cis* y que participan en el control de la replicación y la transcripción de los genes virales, en ella se encuentra el origen de replicación, el promotor temprano (P<sub>E</sub>), el promotor tardío (P<sub>L</sub>), y un elemento regulatorio tardío que participa en el control post-transcripcional (LRE, *late regulatory element*) (S. V. Graham, 2017; Lazarczyk *et al.*, 2009; Ryu, 2017). El extremo 5' de la LCR contiene sitios de terminación y poliadenilación para los transcritos tardíos. El extremo 3' contiene un único sitio de unión a E1, que corresponde al origen de replicación y secuencias reconocidas por la proteína viral E2 y factores de transcripción que definen el promotor que regula la expresión de E6 y E7. Dentro de los múltiples sitios de unión de factores de transcripción celulares se encuentran AP-1, cEBP, YY1, Oct-1, TEF-1, TEF-2 TFIID, Sp1, NF-1, KRF-1 y receptor de glucocorticoides y receptor de progesterona (GR / PR), (Lazarczyk *et al.*, 2009) (figura 1).





**Figura 1. Organización del genoma del VPH 16.** Se muestra la región de expresión temprana (E), los genes que contiene y la función celular de cada uno de ellos, se muestra la región de expresión tardía (L), los genes estructurales que contiene. La región LCR se muestra amplificada, señalando los sitios de unión a factores de transcripción tanto celulares como virales y el origen de replicación (Lazarczyk *et al.*, 2009).

La región L, codifica las dos proteínas estructurales, L1 y L2, que se expresan en células que experimentan diferenciación terminal. Ambas forman la cápside viral, donde L1 es la principal proteína estructural y L2 es la proteína secundaria (Lazarczyk *et al.*, 2009; Ryu, 2017; Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker, 2006). El genoma viral está protegido por una cápside icosaédrica que comprende 360 copias de la proteína L1, organizada en 72 capsómeros pentaméricos, que probablemente tienen una copia de L2 en el centro (S. V. Graham, 2017).

La región temprana contiene 6 ORFs que codifican para las proteínas tempranas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, implicadas en la regulación de la replicación y expresión del genoma viral (Tabla 1).

**Tabla 1. Proteínas del VPH y funciones asociadas**

<b>Proteína viral</b>	<b>Función en el ciclo viral</b>	<b>Actividades</b>	<b>Proteínas blanco</b>
<b>E1</b>	Replicación del genoma viral	Actividad de unión al ADN, actividad helicasa, ATPasa	RPA, topoisomerasa, polimerasa $\alpha$ -primasa
<b>E2</b>	Transcripción de genes virales Replicación y mantenimiento del genoma viral	Transactivación/transrepresión, actividad de unión al ADN, segregación del ADN en células mitóticas	Brd4, ChIR1
<b>E4</b>	Desconocido	Destrucción de la red de queratina, inducción del arresto de G <sub>2</sub> M del ciclo celular	Citoqueratina 8/18
<b>E5</b>	Involucrado en la proliferación y/o inhibición de apoptosis.	Afectación de la vía de señalización celular	EGFR, PDGFR, ATPasa-V, MHC1, receptor TRAIL, receptor FAS
<b>E6</b>	Reactivación de los mecanismos de replicación celular Proliferación, immortalización, inhibición de apoptosis Mantenimiento del genoma viral	Interacción con varias proteínas celulares	p53, ADA3, p300/CBP, E6AP, SP1, c-Myc, NFX1-91, TERT, FAK, FADD, caspasa 8, BAX, BAK, IRF3, proteínas con dominio PDZ
<b>E7</b>	Reactivación de los mecanismos de replicación celular Proliferación, inestabilidad genómica, inhibición de apoptosis Mantenimiento del genoma viral	Interacción con varias proteínas celulares	RB, p107, p130, HDAC, E2F6, p21, p27, ciclina CDK, ATM, ATR, tubulina gamma
<b>L1</b>	Proteína de la cápside mayor	-	-
<b>L2</b>	Proteína de la cápside menor Mantiene el ADN viral episomal	-	-

Se muestra la función en la que están involucradas, así como las proteínas celulares con las que interaccionan (Kajitani, Satsuka, Kawate, & Sakai, 2012).

#### 1.4. Ciclo replicativo del VPH

La infección con el VPH se ve facilitada por la presencia de superficies epiteliales erosionadas. Las infecciones anogenitales se transmiten principalmente por contacto sexual (Hausen, 1996; zur Hausen, 2002). El ciclo de vida del VPH depende de la maquinaria de replicación de las células hospederas y la diferenciación del epitelio escamoso del cérvix. En primer lugar, como la diferenciación de los epitelios estratificados se asocia con una continua renovación celular y la descamación de queratinocitos terminales diferenciados, el mantenimiento del virus dentro del tejido requiere la infección de las células epiteliales basales (Kajitani *et al.*, 2012; Lazarczyk *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2012; zur Hausen, 2002).

El VPH puede acceder a las células epiteliales basales en división mediante microabrasiones en el epitelio, adhiriéndose a las células a través de moléculas comunes de la superficie celular, como los proteoglicanos de sulfato de heparano y la integrina  $\alpha 6$ , esta unión induce un cambio conformacional en la cápside viral, lo que le permite unirse al receptor celular. La entrada del virus es a través de endocitosis calveolar o mediada por clatrina (S. V. Graham, 2010).

Tan pronto como el queratinocito de la mucosa se ha infectado con VPH-16, el genoma viral migra al núcleo celular. La maquinaria de transcripción celular activa la transcripción del promotor temprano específico del epitelio, p97 (Johansson & Schwartz, 2013).

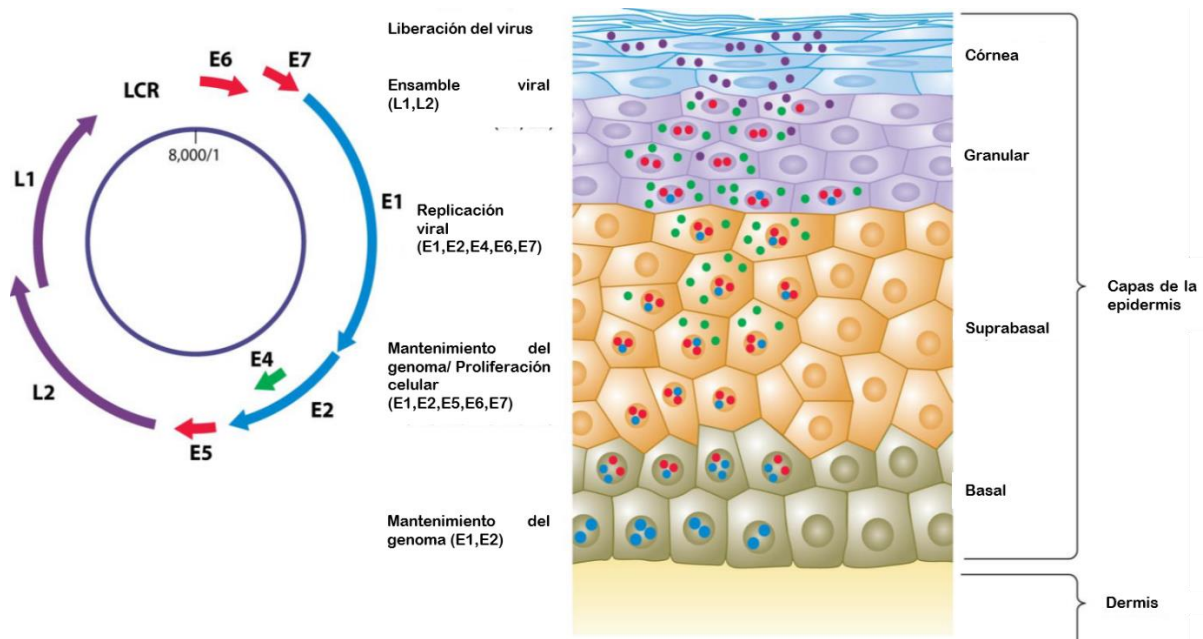
La expresión de los genes del VPH está estrechamente regulada y ligada a la diferenciación epitelial. El ciclo comienza cuando las partículas virales infectan las células de la capa basal del epitelio. En la capa basal del epitelio, el genoma viral permanece estable en forma de un episoma con un bajo número de copias, haciendo el reservorio del virus. Las células infectadas de la capa basal pueden dividirse y comenzar su diferenciación mientras migran hacia las capas superficiales, al diferenciarse las células pierden su capacidad de división. Algunos genomas virales permanecen en las células de la capa basal, autoreplicándose y manteniendo la infección. En las capas externas del epitelio, el ADN viral es

empaquetado en las cápsides y el linaje es liberado para el nuevo ciclo replicativo (Kajitani *et al.*, 2012; Saavedra *et al.*, 2012).

Las proteínas E1 y E2 del VPH se expresan en las células de la capa basal, participando en la replicación del genoma viral, junto con las polimerasas celulares. La proteína E2 también participa en la segregación de genomas virales durante la división de células madre o basales. El virus tiene que hacer frente a la pérdida del potencial de proliferación de las células diferenciadas. Una vez que salen de la capa basal, las células epiteliales dejan de proliferar e inician un programa de diferenciación terminal. Por otro lado, la expresión de algunos de los genes virales requiere factores de transcripción, que surgen sólo en queratinocitos diferenciados. Por lo tanto, aunque el VPH necesita división celular, también requiere una diferenciación retardada, lo que genera un entorno con condiciones que aseguren la replicación del ADN del VPH en la capa suprabasal y granular (Saavedra *et al.*, 2012).

La proteína E7 es crucial para el mantenimiento de la proliferación en las capas superiores del epitelio con la cooperación de E6. Además, E7 promueve la progresión de la fase S en células diferenciadas, mientras que la proteína E6 participa en la prevención de la apoptosis, que puede inducirse en respuesta a una entrada de fase S no programada. Esto probablemente sea el resultado de un equilibrio entre factores que controlan el ciclo celular (inhibidores de quinasa dependiente de ciclina) y virales (E7). Aparentemente, el equilibrio entre estos factores se mantiene en la mayoría de las células y la división celular puede iniciarse solo en algunas de ellas. A diferencia de las lesiones benignas, cuando el epitelio presenta una progresión al cáncer, las células en división se vuelven comunes en las capas suprabasales, lo que podría representar una consecuencia de la desregulación de la normalidad. Esto podría ser resultado de la pérdida de un "regulador negativo", como lo es E2, lo que genera un aumento en la expresión de E6 y E7. La integración del ADN del VPH en el genoma del hospedero interrumpe el ORF E1 o E2, mientras que los ORF E6 y E7 permanecen intactos. Dado que la proteína E2 reprime la expresión de los genes E6 y E7, la pérdida del ORF E2 en la

integración del ADN viral promueve la síntesis de las proteínas E6 y E7, probablemente contribuyendo así a desarrollo del cáncer(Lazarczyk *et al.*, 2009). Como resultado, la estratificación celular normal se altera, con células nucleadas y en división que se encuentran tanto en la capa suprabasal como en la superior.



**Figura 2. Ciclo replicativo del VPH.** Se muestran las diferentes capas del epitelio escamoso de cérvix. La expresión de los genes virales a través de la diferenciación del epitelio y su función (Lazarczyk *et al.*, 2009).

## 1.5. Oncoproteínas E6 y E7 del VPH

Los VPH de alto riesgo difieren de los de bajo riesgo, principalmente por las propiedades biológicas de las proteínas E6 y E7, que desempeñan un papel central en el proceso de transformación maligna (Lazarczyk *et al.*, 2009). Actualmente, se sabe que E6 y E7 también están vinculadas a varias proteínas involucradas en los procesos de adhesión celular, apoptosis, ciclo celular, reparación del ADN, metabolismo, traducción y señales de transcripción (Saavedra *et al.*, 2012). Las proteínas E6 y E7 contribuyen a la progresión tumoral (zur Hausen, 2002).

### 1.5.1. Oncoproteína E6

E6 del VPH 16 es una proteína de 151 aminoácidos, contiene dos dedos de zinc formados por dos pares de motivos CXXC, importantes para sus funciones. Similar a E7, carece de actividades enzimáticas intrínsecas y de unión específica a ADN. Su principal blanco celular es el supresor tumoral p53, que detecta el estrés celular y desencadena la detención en G1 del ciclo celular y/o la apoptosis. E6 se une a la ubiquitina ligasa celular E6AP (proteína asociada a E6), lo que lleva a un cambio conformacional de E6 que permite la formación del complejo trimérico E6/E6AP/p53, que dirige a la degradación proteolítica de p53 mediada por ubiquitina (Hoppe-Seyler, Bossler, Braun, Herrmann, & Hoppe-Seyler, 2018; Martínez-zapien *et al.*, 2016; Mok *et al.*, 2018; Tomaić, 2016). Además de su actividad anti-apoptótica mediante la inactivación de p53, E6 tiene blancos celulares pro-apoptóticos como Bak, altamente expresada en capas epiteliales superficiales (Tomaić, 2016).

La oncoproteína E6 del VPH de alto riesgo, participa en la desregulación de la maquinaria de la replicación del ADN celular (Tomaić, 2016). E6 del VPH-16 induce la actividad de la telomerasa en células epiteliales primarias a través de la transactivación transcripcional de la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT (Tomaić, 2016; Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, 2001). E6 también

interactúa con otros componentes de la maquinaria apoptótica del huésped, como el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF R1) (Tomaić, 2016).

### **1.5.2. Oncoproteína E7**

E7 del VPH es una proteína de 98 aminoácidos que tiene un dominio C-terminal de unión a zinc, cuya integridad estructural es crítica para su actividad (Tomaić, 2016). Contiene señales de importación y de exportación nuclear y se ha detectado tanto en el núcleo como en el citoplasma. Carece de actividades enzimáticas intrínsecas conocidas, no se asocia con secuencias específicas de ADN y funciona al asociarse y modificar complejos de proteínas reguladoras celulares del hospedero (Hoppe-Seyler *et al.*, 2018; Mok *et al.*, 2018). La proteína E7 se une a pRb con alta afinidad y bloquea la regulación del ciclo celular impulsado por este factor (Lazarczyk *et al.*, 2009). pRb tiene un papel crítico en la regulación del ciclo celular, controlando la transición de la fase G1 a S (Tomaić, 2016). Por tanto, la liberación de los factores de transcripción E2F de su complejo con pRb inducida por E7, resulta en la síntesis de genes celulares implicados en la replicación del ADN celular y finalmente en la progresión hacia la fase S (Lazarczyk *et al.*, 2009).

Las proteínas E7 de todos los tipos de VPH se unen a los miembros de la familia Rb, pero las proteínas E7 de alto riesgo lo hacen con una afinidad mucho mayor. La unión eficiente de Rb por E7 puede conducir a la inhibición del crecimiento celular y a la apoptosis a través de una vía dependiente de p53. Como resultado, las proteínas E6 de alto riesgo han evolucionado para dirigirse al supresor tumoral p53 para la degradación, evitando la inhibición del crecimiento celular tanto en células no diferenciadas como diferenciadas (Moody & Laimins, 2010).

La proteína E7 también interactúa con p16, p21, p107 y p130, proteínas importantes en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, a través de sus interacciones con diferentes moléculas (Lazarczyk *et al.*,

2009; Tomaić, 2016). E7 también actúa con otras proteínas tales como deacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27 (Chung & Gillison, 2009; Lizano-soberón, Marcela, 2009). Además, la proteína E7 puede modificar rápidamente el control normal de la duplicación del centrosoma, lo que resulta en la formación de números anormales de centrosomas y centriolos, lo que conduce a aberraciones en el número de cromosomas, en particular a la aneuploidía (S. Duensing *et al.*, 2000; Lazarczyk *et al.*, 2009).

Tanto E6 como E7 de VPH 16 pueden inducir de manera independiente anomalías mitóticas y daño al ADN en queratinocitos. Ambas proteínas cooperan para aumentar las anomalías en la división celular cuando ambos oncogenes son coexpresados (Stefan Duensing & Münger, 2002; Yugawa, Takashi and Kiyono, 2009). Esto por medio de una serie de alteraciones epigenéticas ocurridas tanto en el genoma viral como en el genoma de la célula hospedera. Se ha demostrado que la hipermetilación anormal de promotor dirige al silenciamiento o disminución de la expresión de genes involucrados en la supresión tumoral así como de genes involucrados en diferentes vías regulatorias, tales como la apoptosis, control de ciclo celular y reparación de ADN (Saavedra *et al.*, 2012).

La capacidad de las oncoproteínas E6 y E7 de alto riesgo para activar a la telomerasa e inhibir los supresores de tumores *TP53* y *RB1* es suficiente para conducir a una proliferación descontrolada e inmortalización celular prolongadas, pero la adquisición de mutaciones adicionales del genoma del hospedero es necesaria para la progresión maligna (Mok *et al.*, 2018).



## 1.6. Oncoproteína E5 y sus blancos celulares

El gen E5, de aproximadamente 230-250 pb, codifica para una proteína de 90 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa, altamente hidrofóbica, que se asocia a las membranas del aparato de Golgi, retículo endoplasmático y núcleo. Se sabe que E5 presenta propiedades oncogénicas débiles, pudiendo aumentar la transformación celular mediada por E7. Además, se ha sugerido que actúa como oncogen porque modula la activación del receptor EGF (factor de crecimiento epidérmico) de manera dependiente e independiente del ligando (Greco *et al.*, 2011) y tiene la capacidad de unirse e inactivar a la subunidad de 16kDa de la ATPasa vacuolar, inhibiendo la acidificación de los endosomas (Oetke, Auvinen, Pawlita, & Alonso, 2000; Pedroza-Saavedra, Lam, Esquivel-Guadarrama, & Gutierrez-Xicotencatl, 2010; Venuti *et al.*, 2011).

## 1.7. Glicosilación alterada y cáncer

La glicosilación, es una de las modificaciones post-traduccionales más frecuentes de las proteínas y lípidos, estas modificaciones son catalizadas por una gran familia de enzimas denominadas glicosiltransferasas, que son denominadas con base en el azúcar que transfieren, por ejemplo: las fucosiltransferasas transfieren fucosa, las galactosiltransferasas transfieren galactosa, las sialiltransferasas transfieren ácido siálico (Dall'olio, 1996; Reis, Osorio, Silva, Gomes, & David, 2010).

Existen dos tipos principales de glicosilación: la O-glicosilación en la que los azúcares se unen al grupo hidroxilo de la serina o treonina y la N-glicosilación, en la que los azúcares se unen al nitrógeno amídico de la asparagina (Dall'olio, 1996; Hao, Ren, & Xie, 2010; Reis *et al.*, 2010; P. Wang, 2005).

Los glicoconjugados de la superficie celular son fundamentales para la transformación oncogénica, facilitando la migración de células tumorales y la metástasis por la afectación de las interacciones célula-célula y matriz-célula. La mayoría de los modelos de glicosilación periférica/ terminal son polimórficos en

humanos y constituyen los grupos sanguíneos, entre los cuales son conocidos los sistemas ABO, secretor, Lewis, T, Tn y P (Solórzano *et al.*, 2012).

La glicosilación aberrante ha sido reconocida por más de 30 años como una característica del cáncer (Drake *et al.*, 2010; Powlesland *et al.*, 2009). En algunas neoplasias, hay frecuentes alteraciones en la estructura de los glicoconjugados de la superficie celular debido a la biosíntesis incompleta, con o sin acumulación de precursores, síntesis de neo-glicoconjugados, grandes ramificaciones y glicanos altamente sialilados y la re-expresión de antígenos glicosídicos del tipo fetal (Dall'olio, 1996; Solórzano *et al.*, 2012).

Se ha reportado una sobreexpresión de los antígenos sialilados: sialil-Tn, sialil-T, sialil-Lea-, y sialil-Lex, en la superficie de células cancerosas (P. Wang, 2005). Se ha reportado que sialil-Lewisa y sialil-Lewisx están involucrados en el desarrollo de metástasis de tumores de páncreas, colon y adenocarcinoma pulmonar (Ugorski & Laskowska, 2002).

Los cambios en la O-glicosilación en la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) han sido identificados a través del uso de lectinas que muestran diferentes patrones de reconocimiento, resaltando la importancia de estas estructuras en la progresión del cáncer. Por ejemplo, la lectina MEA muestra una alta capacidad para reconocer específicamente tejidos de cáncer cervical, pero no tejido cervical sano (Solórzano *et al.*, 2012).

Aunque múltiples factores contribuyen a una glicosilación aberrante en cáncer, uno de los mecanismos principales es la expresión diferencial de genes de glicosiltransferasas y glicosidasas, cuyos productos están involucrados en la síntesis y catabolismo de glicanos (Ghazarian *et al.* 2011). La sobreexpresión de *GALNT6* y *GALNT14* se ha reportado en carcinoma de mama y gástrico; y la sobreexpresión de *ST3GAL3* en líneas celulares de cáncer pancreático. Así también, la actividad de  $\alpha$ -L-fucosidasa tiene relación con metástasis de carcinoma hepatocelular (Meany & Chan, 2011).

En CaCu, un incremento en los niveles de ARNm de sialiltransferasas ST3Gal III y ST6Gal I ha sido relacionado con mayor invasión (P. H. Wang *et al.*, 2001). Por lo tanto, se ha sugerido que los niveles de expresión de estos genes podrían ser usados como biomarcadores (Meany & Chan, 2011).

## 1.8. Antecedentes

Estudios previos en nuestro grupo de investigación, han mostrado cambios en la glicosilación y a nivel de transcritos de glicogenes en líneas celulares que contienen el genoma del VPH y en tejido con lesiones premalignas y cáncer cervical.

En el año 2010, se reportó un incremento de expresión de ácido siálico unido al enlace  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$  en lesiones premalignas de cérvix (López, D, Reyes, J, Santos, G, Zenteno, & Vallejo, V, 2010). También se identificó un incremento en la expresión de sLex en raspados cervicales en relación al grado de neoplasia (Velázquez-N, Santos, G, Jiménez, Reyes, J & Vallejo, V, 2012). Estos resultados muestran que los cambios en la glicosilación ocurren durante la transformación temprana y no son exclusivos del cáncer.

Los niveles de ARNm de los genes de las sialiltransferasas ST3Gal III, ST3Gal IV y ST6Gal I se reportaron incrementados en lesiones premalignas de cérvix con respecto a tejido sano (López, D. *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que el transcrito de la variante V1 del gen *ST3GAL4* disminuye su expresión en tejidos con lesiones premalignas y cáncer cervical con respecto a tejido normal (Roa-De la Cruz *et al.*, 2018).

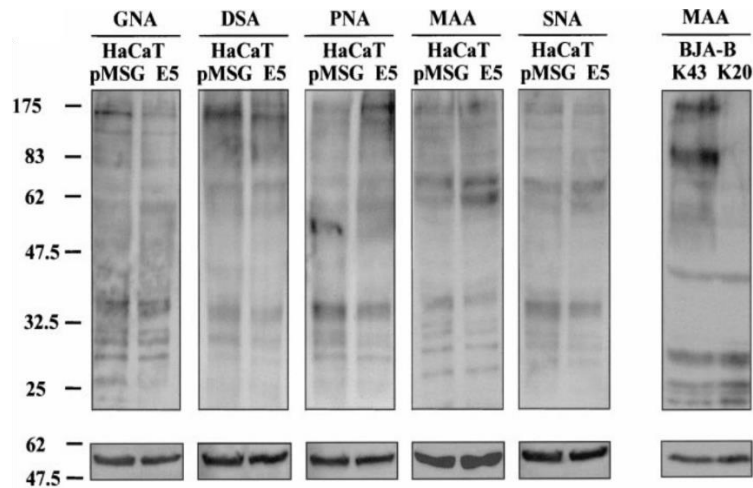
Considerando que el agente etiológico del CaCu, es la persistencia de infección con VPHs de alto riesgo (Saavedra *et al.*, 2012), es importante investigar el papel de éstas infecciones virales sobre los cambios a nivel de glicosilación identificados en CaCu.

Resultados del grupo mostraron que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 pueden aumentar la actividad de promotores de genes de sialiltransferasas, encontrando que la oncoproteína E6 incrementa la actividad del promotor P1 del gen *ST6GAL1* y del promotor B3 del gen *ST3GAL4* (Ordoñez-Nuñez , 2015; Mendez-Flores, 2019).

Además, se reportó el efecto de la oncoproteína E6 sobre la expresión del antígeno sLex en una transfección transitoria en una línea celular de cáncer cervical, encontrando un incremento en la expresión del antígeno sLex, sugiriendo que la expresión de E6 podría estar modificando la glicosilación celular (Velázquez, N 2009).

En un estudio más reciente realizado en la línea celular HeLa, que proviene de un adenocarcinoma de cérvix, se evaluó el efecto del silenciamiento de E6 y E7 sobre los niveles de ARNm de los transcritos de glicogenes. Los resultados muestran un incremento en los transcritos de 9 glicogenes: *ALG14*, *FUT4*, *MAN2A1*, *DPY19L1*, *XXYL1*, *IDUA*, *UGT2B17*, *POFUT1*, *UGCGL1* y una disminución en 7 glicogenes: *PIGV*, *GALNT1*, *C1GALT1C1*, *FCMD*, *MANBAL*, *B4GALT2* y *UGT8*. Estos resultados mostraron alteración en glicogenes involucrados en la glicosilación de Notch 1 como es el caso de *POFUT1*, y en la síntesis de antígenos tumorales como el Tn en el que están involucrados los glicogenes *GALNT1* y *C1GALT1C1*. Lo anterior resalta la importancia del papel de las oncoproteínas virales sobre la glicosilación celular (Aco-tlachi *et al.*, 2018).

Por tanto, considerando que la oncoproteína E5 del VPH, se expresa de manera temprana en el ciclo viral, que se encuentra anclada a la membrana del aparato de Golgi, organelo donde se lleva a cabo la glicosilación y que no existen reportes sobre su papel a nivel de la glicosilación salvo un estudio que reporta un ligero aumento de la sialilación en presencia de la oncoproteína E5 (Figura 3) (Oetke *et al.*, 2000), es de interés evaluar su papel sobre los cambios en el nivel de expresión de glicogenes y posibles rutas de glicosilación afectadas.



**Figura 3. Western blot con tinción de lectinas.** En el extremo derecho de BJA-B se muestran las subclonas K43 (hipersialiladas) y K20 (hiposialiladas). En la fila inferior, la tinción con anticuerpo anti-β-tubulina demuestra la presencia de cantidades similares de proteína. A la izquierda se da la masa molecular en kDa. Lectinas: GNA= *Galanthus nivalis*; DSA= *Datura stramonium*; PNA= *Peanut agglutinin*; MAA= *Maackia amurensis*; SNA= *Sambucus nigra* (Oetke et al., 2000).

## II. JUSTIFICACIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, el CaCu es la segunda mayor causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo.

En previos estudios se ha reportado que en lesiones premalignas de bajo y alto grado, así como en CaCu, existen modificaciones a nivel de glicosilación, así como cambios en la expresión de genes que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de las estructuras alteradas. Dado que algunos de estos cambios han sido detectados en etapas premalignas, se ha sugerido que podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Por otro lado, la infección con VPH de alto riesgo es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, por lo que identificar cambios a nivel de la glicosilación asociados a la presencia del virus permitiría identificar cambios tempranos de la transformación maligna del cérvix asociados a la infección viral.

Estudios *“in vitro”* han mostrado que la oncoproteína E6 del VPH 16 tiene un efecto sobre la glicosilación. Además, se ha reportado que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 18 modifican la expresión de transcritos de diversos glicogenes.

Considerando que la oncoproteína E5 se expresa de manera importante en lesiones precursoras, identificar los cambios generados por esta proteína a nivel de glicosilación, podrían servir para identificar blancos diagnósticos, para la detección temprana de la enfermedad.

### **III. HIPÓTESIS**

La oncoproteína E5 modifica la expresión de glicogenes y glicanos en queratinocitos.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar los cambios en la glicosilación asociados a la expresión de la proteína E5 de VPH16

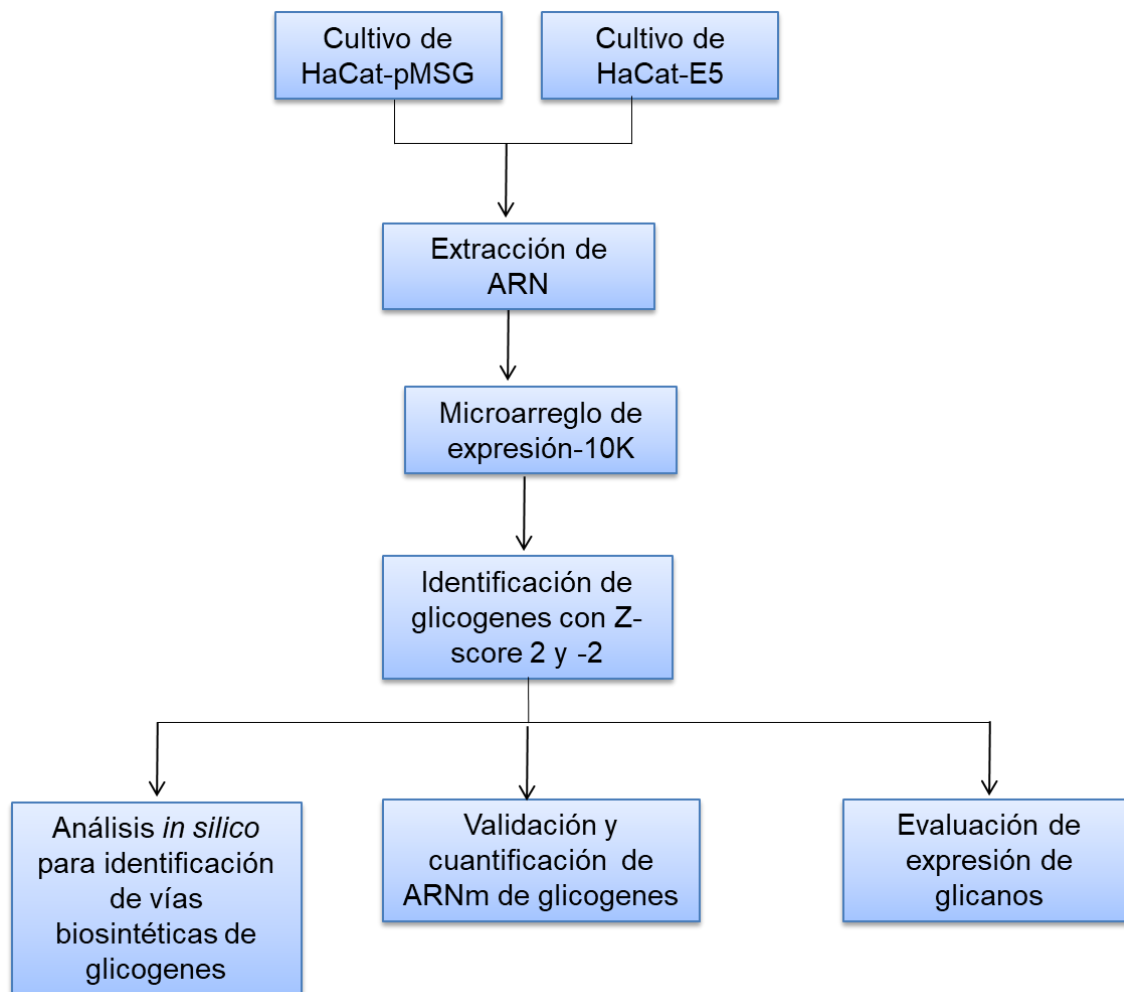
#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar glicogenes que modifican su expresión por efecto de E5 de VPH 16.
2. Cuantificar los niveles de expresión de glicogenes en presencia de E5 de VPH 16.
3. Identificar vías de glicosilación que se alteran en presencia de E5 de VPH 16.
4. Evaluar cambios en la expresión de glicanos en presencia de E5 de VPH 16.





## V. ESQUEMA DE TRABAJO



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivo de líneas celulares

La línea celular de queratinocitos inmortalizados humanos (HaCat) transfectada de manera estable con el vector vacío pMSG (HaCat-pMSG) corresponde a la línea control y la experimental fue transfectada con el marco de lectura del gen E5 del VPH 16 (HaCat-E5), líneas donadas por Ángel Alonso, del German Cancer Research Centre, University of Heidelberg, Germany y la línea de origen cervical que contiene integrado el genoma del VPH 16 (CaSki), fue donada por Adriana Lemarroy, del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Guadalajara, Jalisco. Las células HaCat fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y las células CaSki en medio RPMI 1640, ambos medios suplementados con 10% de suero bovino fetal (SBF) y con antibiótico estreptomina 100 µg/ml, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y a una temperatura de 37°C. Una vez que los cultivos llegaban a confluencia (cobertura total del área de cultivo por las células), las células fueron lavadas dos veces con buffer de fosfatos (PBS, NaCl 130 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM) estéril y divididas utilizando una mezcla de tripsina (0.025%) y EDTA (0,02%; Sigma-A ldrich; Merck KGaA).

### Microarreglos de expresión

Para los ensayos de microarreglos de expresión a partir de un cultivo celular con una confluencia del 80-90% en placas cultivo p100 se realizó la extracción de ARN de la línea control HaCat-pMSG y la línea problema HaCat-E5 con el kit ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System. La integridad del ARN fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El grado de pureza y la concentración fue obtenida leyendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm con el nanofotómetro IMPLN.

La pureza fue determinada obteniendo la relación de absorbancia A260/280, considerando el valor 1.9/2.0 como aceptable.

El ARN extraído fue precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. 30 µg de ARN de cada línea fue enviado a la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para la realización del CHIP de 10K. Para la elaboración del microarreglo 10 µg de cada ARN fueron usados para la síntesis de ADNc usando el kit First-Strand cDNA labelling kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), incorporando ya sea dUTP-Alexa555 o dUTP-Alexa647. La adquisición de las imágenes así como la cuantificación se realizaron con el programa GenePix 4100A. El análisis de los genes alterados fue realizado con el programa GenArise que se desarrolló en la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>).

Los genes incrementados y disminuidos incluidos en el estudio presentaron un valor de corte de z-score de 2 y -2 (los cambios de expresión cambian en función de la muestra problema).

### **Análisis de glicogenes**

Para la identificación de los glicogenes alterados, primero se consultaron las bases de datos GlycoGene database (<http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/ggdb/>) y del Consortium for Functional Glycomics-CAZy databases (disponible <http://www.cazy.org/CAZY/>). Considerando para el análisis un total de 336 glicogenes.

### **Redes de interacción proteína-proteína**

Para identificar posibles rutas de glicosilación alteradas, se realizaron análisis de interacción proteína-proteína, para ello, los glicogenes que presentaron disminución

o aumento en su expresión en la línea celular HaCat-E5 fueron sometidos a un análisis bioinformático en STRING database (<http://string-db.org/>).

### **Expresión del gen E5 y de glicogenes alterados por RT-PCR cuantitativa**

La extracción de ARN total de las líneas celulares (CasKi, HaCaT-pMSG y HaCaT-E5) se realizó utilizando el kit NucleoSpin® RNA II (MACHEREY- NAGEL) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La pureza y la concentración del ARN extraído se determinó como se mencionó previamente.

La síntesis de ADNc de cada línea celular se realizó usando *random primers* de acuerdo a las indicaciones del fabricante RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) a las concentraciones finales correspondientes. Previo a la cuantificación de E5 y de los glicogenes seleccionados *ST3GAL3* y *ST6GAL1*, se realizaron curvas de amplificación con las siguientes concentraciones: 10, 1, 0.1, 0.01, y 0.001 ng/μl. Como gen endógeno se utilizó *HPRT*. Considerando los resultados obtenidos en las curvas de amplificación se seleccionó la mejor concentración, la cual debe encontrarse dentro del rango donde la eficiencia de amplificación tanto del gen endógeno como del experimental es cercana al 100%.

Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 10 μl conteniendo 5 μl de 2X Maxima SYBR-Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y 0.5 μl de 10 mM de oligonucleótido sentido y oligonucleótido antisentido. La secuencia de los oligonucleótidos, el tamaño del amplicón se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-PCR en tiempo real.**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Amplicón (pb)</b>	<b>Temperatura de alineamiento (°C)</b>
<b>HPRT-F</b>	CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT	150	60

<b>HPRT-R</b>	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC		
<b>HPV16 E5-F</b>	CGCTGCTTTTGTCTGTGTCT	146	55
<b>HPV16 E5-R</b>	GCGTGCATGTGTATGTATTAATAAAA		
<b>ST3GAL3-F</b>	CATGTGAAGATGGGACTCTTGG	118	57
<b>ST3GAL3-R</b>	CCTCCCACTGGAGTAAGTGTAG		
<b>ST6GAL1-F</b>	TATCGTAAGCTGCACCCCAATC	372	60
<b>ST6GAL1-R</b>	TTAGCAGTGAATGGTCCGGAAG		

Las reacciones fueron llevadas a cabo en el equipo StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). El programa de amplificación fue el siguiente: 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, con una temperatura de alineamiento para E5 de 55°C, para *ST3GAL3* de 57°C y para *ST6GAL1* de 57°C durante 30 segundos, con una extensión a 70°C durante 30 segundos.

Los cambios en el nivel de expresión fueron determinados por cuantificación relativa empleando el método comparativo CT:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **Ensayos citoquímicos**

Para los ensayos citoquímicos fueron sembradas 80,000 células HaCat-pMSG y HaCat-E5 en placas de 24 pozos que contenían cubreobjetos. Una vez adheridas se realizaron tres lavados con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 2 %,

durante 10 min, después se retiró el paraformaldehído y se realizaron 3 lavados con buffer PBS 1X. Se realizó un bloqueo con el kit Casein solution (Vector Labs), siguiendo las instrucciones del fabricante, durante 40 min en cámara húmeda. Se retiró el exceso la solución bloqueante y se adicionaron las lectinas biotiniladas *Maackia amurensis* (B1265 Vector labs) y *Sambucus nigra* (B-1305 Vector labs), se incubaron en cámara húmeda por 60 minutos y posteriormente se realizaron tres lavados con bufer PBS 1X . Se colocó una solución de ficoeritrina-estreptavidina en una dilución de 1:100 en PBS 1X (SA 5207 Vector labs) y se incubó en cámara húmeda durante 20 minutos en ausencia de luz. Se realizaron tres lavados y se realizó la tinción de los núcleos con el colorante fluorescente Hoesch (dilución 1:1000 en PBS) y se incubó en cámara húmeda durante 20 min en ausencia de luz. Se realizaron tres lavados con PBS, se retiró el cubreobjetos de cada uno de los pozos, se montaron en un portaobjetos empleando el medio Vectashield Mounting Medium (H-1000 Vector, Labs) y se sellaron con barniz de uñas transparente. Las laminillas fueron observadas en el microscopio de fluorescencia (Zeiss), tomando cinco fotografías de distintos campos de la laminilla. La intensidad media de fluorescencia fue determinada en 100 células de cada fotografía utilizando el software ZEN blue 2.

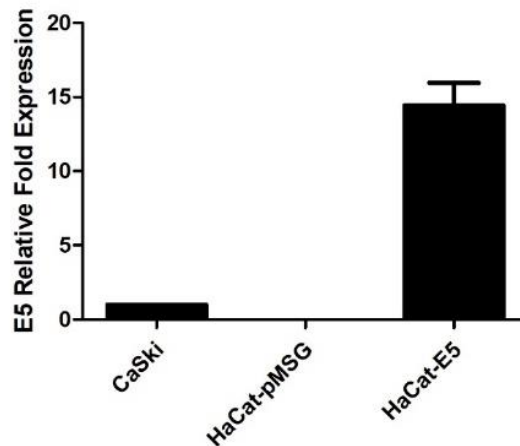
### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados de RT-PCR en tiempo real fue realizado utilizando el programa GraphPad, la diferencia entre la expresión génica fue determinada con la prueba t de Student, considerando un intervalo de confianza del 95%, considerando estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## VII. RESULTADOS

### Expresión de E5 VPH 16

A partir de las líneas celulares CaSki, HaCat-pMSG y HaCat-E5 se realizó una cuantificación relativa por tiempo real para determinar el nivel de expresión de transcritos de E5. En la figura 4 se muestra que la línea HaCat-pMSG, no expresa E5 debido a que contiene únicamente el vector vacío, sin ningún ORF y haciendo la comparación entre las líneas que contienen el ORF de E5, se puede observar que el nivel de expresión de E5 en la línea celular HaCaT-E5 es 14 veces mayor con respecto a la línea celular CaSki.



**Figura 3. Expresión del gen E5 en células CaSki y en queratinocitos.** El nivel de expresión de E5 en las células HaCat-E5 es 14.4 veces mayor que en la línea celular CaSki. n=3. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar.

## **E5 del VPH 16 modifica la expresión de glicogenes**

Con el objetivo de conocer si E5 de VPH 16 modificaba la expresión de glicogenes, se evaluó en un modelo *in vitro* utilizando dos líneas celulares HaCat-pMSG (control) y HaCat-E5 (problema). Para ello se realizó un Microarreglo de expresión de ARN que incluyó 10000 genes. Los datos analizados del microarreglo de expresión fueron registrados en la base de datos NCBI Gene Expression Omnibus con número de acceso GSE118776.

El análisis de expresión de transcritos se realizó utilizando el software GenArise, obteniendo una lista de genes con un valor de z-score mayor o igual a 2 y menor o igual a -2.

De los genes alterados seleccionamos únicamente a los glicogenes, para ello obtuvimos previamente la lista de glicogenes reportados a la fecha en las bases de datos CAZy y GGdb, obteniendo un total de 336 glicogenes. Se identificaron cuatro glicogenes que aumentaron su expresión (*ST3GAL3*, *ST6GAL1*, *CHST2* y *MANBA*) y 4 glicogenes que la disminuyeron (*UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* y *UGT1A10*). Todos los genes incrementados tuvieron un valor de z-score igual o mayor de 2, salvo el gen *ST6GAL1* que tuvo un valor de 1.8 y que fue incluido en el análisis dado que ha sido reportado alterado en CaCu y en los antecedentes del grupo de trabajo reportan un incremento en los niveles de ARNm de dicho gen en lesiones premalignas. Todos los genes con disminución en su expresión tuvieron un valor de z-score igual o menor a -2 (Tabla 3).



**Tabla 3. Glicogenes que modifican su expresión en presencia de E5 del VPH 16.**

Gen	Enzima	Valor de z-score
ST3GAL3	ST3 beta galactósido $\alpha$ 2,3 sialiltransferasa 3	2.3
ST6GAL1	ST6 beta galactósido $\alpha$ 2,6 sialiltransferasa 1	1.8
CHST2	Carbohidrato (N-acetilglucosamina-6-O) sulfotransferasa 2	2.3
MANBA	Beta A manosidasa lisosomal	2
UGT1A10	UDP glucuronosiltransferasa 1 familia, polipéptido A10	-2
UGT2B15	UDP glucuronosittransferasa 2 familia, polipéptido B15	-2.6
GALNT11	Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 11	-2.3
NDST2	N-desacetilasa/N-sulfotransferasa (heparan glucosaminil) 2	-2.1

Se muestra el nombre de los genes que incrementan o disminuyen su expresión, la enzima que codifican y el valor de z-score.

Una vez obtenida la lista de glicogenes alterados se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar si alguno de ellos había sido reportado con cambios en su expresión en CaCu o en otros tipos de cáncer. Los estudios que reportan cambios en la expresión en algunos de los glicogenes identificados se muestran en las Tablas 4 y 5. Se consideraron estudios que muestran tanto cambios en los niveles de transcritos, como de proteínas o de actividad enzimática. Adicionalmente se buscó la actividad enzimática que realiza cada una de las enzimas.

**Tabla 4. Glicogenes que aumentan su expresión en presencia de la oncoproteína E5 del VPH 16.**

Gen	Función enzimática	Expresión alterada en cáncer
<b>ST3GAL3</b>	Cataliza la transferencia de ácido siálico a partir del CMP-ácido siálico a la galactosa	Aumento en los niveles de ARNm en CaCu se relaciona con metástasis a nódulo linfático (P. H. Wang <i>et al.</i> , 2002) (Wang, 2002) Altos niveles de actividad enzimática en cáncer gástrico, relación con recurrencia (Gretschel, 2003) Aumento en los niveles de ARNm en cáncer de ductos biliares (Jin, 2004)
<b>CHST2</b>	Cataliza la sulfatación de N-acetil glucosamin, y puede participar en la biosíntesis del antígeno 6-sulfosialil Lewis X.	Alta concentración en suero de pacientes con cáncer de ovario, CaCu (Seko, 2009)
<b>MANBA</b>	Exoglicosidasa que participa en el catabolismo de oligosacáridos de N-glicoproteínas. Exoglicosidasa que corta el enlace de un residuo de manosa unido a oligosacáridos de N-glicoproteínas	Incremento en los niveles de ARNm en tejido de esófago con displasia y con carcinoma escamoso (Neetu Sud, 2004)
<b>ST6GAL1</b>	Cataliza la transferencia de ácido siálico del CMP-ácido siálico a sustratos que contienen galactosa.	Incremento de ARN en carcinoma escamoso de cervix, (Wang, 2001; Wang, 2002). Altos niveles de actividad enzimática en cáncer gástrico (Gretschel, 2003). Aumento en los niveles de ARNm en carcinoma de ductos biliares extrahepático (Jin, 2004)

**Genes:** *ST3GAL3*= ST3 beta galactósido  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasa 3; *CHST2*= Carbohidrato (N-acetilglucosamina-6-O) sulfotransferasa 2; *MANBA*= Beta A manosidasa lisosomal; *ST6GAL1*=ST6 beta galactósido  $\alpha$ 2,6 sialiltransferasa 1.

Se muestra la función de la enzima que codifican así como los tipos de cáncer en los que se ha reportado la alteración en su expresión o actividad.

**Tabla 5. Glicogenes que disminuyen su expresión en presencia de la oncoproteína E5 del VPH 16.**

<b>Gen</b>	<b>Función enzimática</b>	<b>Expresión alterada en cáncer</b>
<b><i>UGT2B15</i></b>	Cataliza la glucuronidación de estrógenos y andrógenos endógenos. Participa en el metabolismo y eliminación de compuestos tóxicos, tanto endógenos como de origen xenobiótico.	Incremento en los niveles de ARNm y proteína en células de cáncer de mama (Harrington <i>et al.</i> 2006). Alta expresión de ARNm y proteína en células de cáncer de próstata (Chouinard, Barbier, & Bélanger, 2007) .
<b><i>GALNT11</i></b>	Cataliza el inicio de la O-glicosilación de proteínas y participa en O-glicosilación de Notch1.	Incremento en los niveles de ARNm en leucemia linfocítica crónica (LCC) comparado con células B de donadores sanos (Libisch, 2014)
<b><i>NDST2</i></b>	Enzima con funciones duales: participa en el procesamiento de polímeros de glucosamina y de heparina. Cataliza tanto la N-desacetilación y la N-sulfatación de glucosamina de los glicosaminoglicanos de heparan sulfato.	Niveles de ARNm moderados o incrementados en cancer hepatocelular (Tátrai, 2010)
<b><i>UGT1A10</i></b>	Enzima de la vía de glucuronidación que transforma moléculas lipofílicas pequeñas en moléculas solubles en agua y metabolitos excretables, tales como esteroides, bilirrubinas, hormonas y drogas.	Incremento en los niveles de expresión en células de cáncer de pulmón (Oguri, 2004).

**Genes:** *UGT2B15*= UDP glucuronositransferasa 2 familia, polipéptide B15; *GALNT11*= Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 11; *NDST2*= N-desacetilasa/N-sulfotransferase (heparan glucosaminil) 2; *UGT1A10*= UDP glucuronosiltransferasa 1 familia, polipéptido A10.

Se muestra la función de la enzima que codifican así como los tipos de cáncer en los que se ha reportado la alteración en su expresión o actividad.

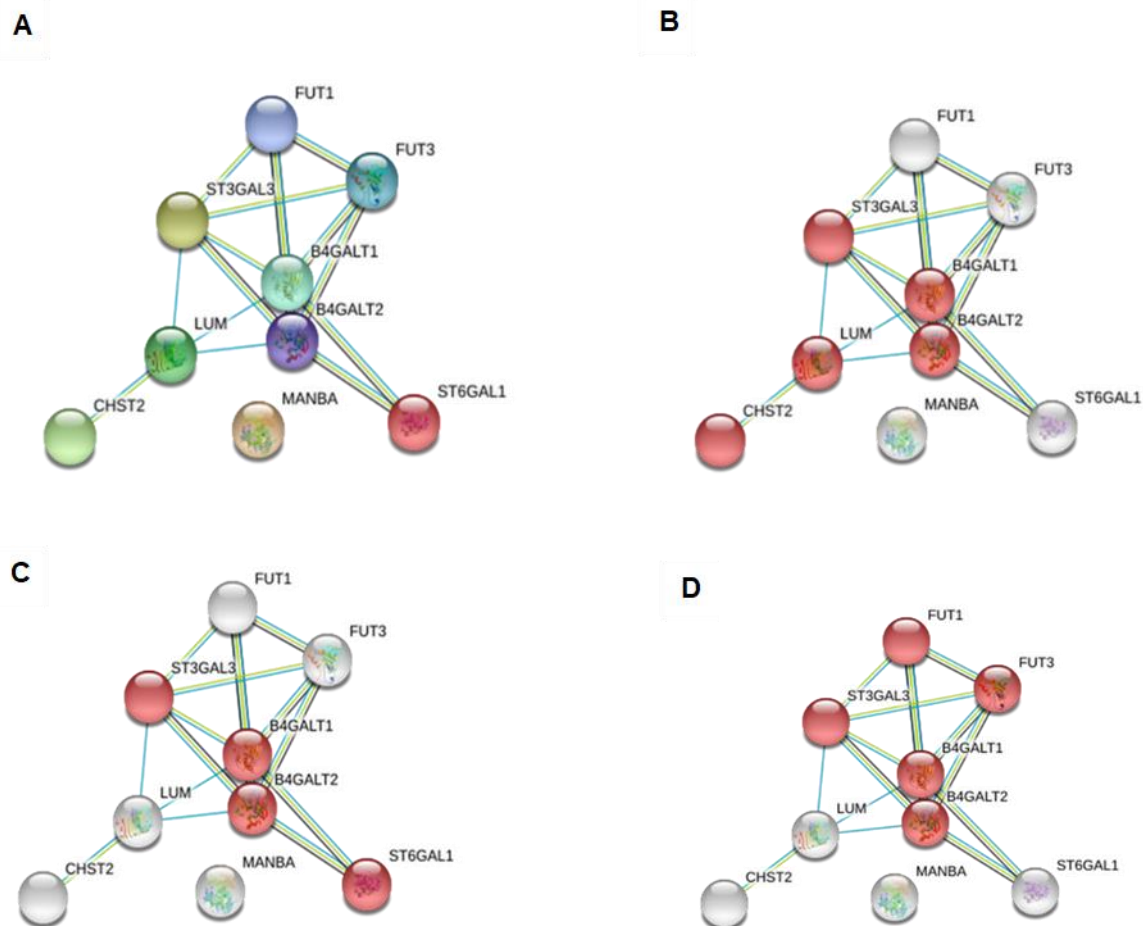
## **Redes de interacción de proteínas de glicogenes alterados por E5 VPH 16.**

Con el fin de predecir interacciones entre las proteínas codificadas por los glicogenes alterados por la oncoproteína E5 y conocer su participación en diferentes vías biosintéticas relacionadas a procesos de glicosilación, se utilizó la base de

datos STRING que predice interacciones proteína-proteína, que puede ser por asociación física o funcional.

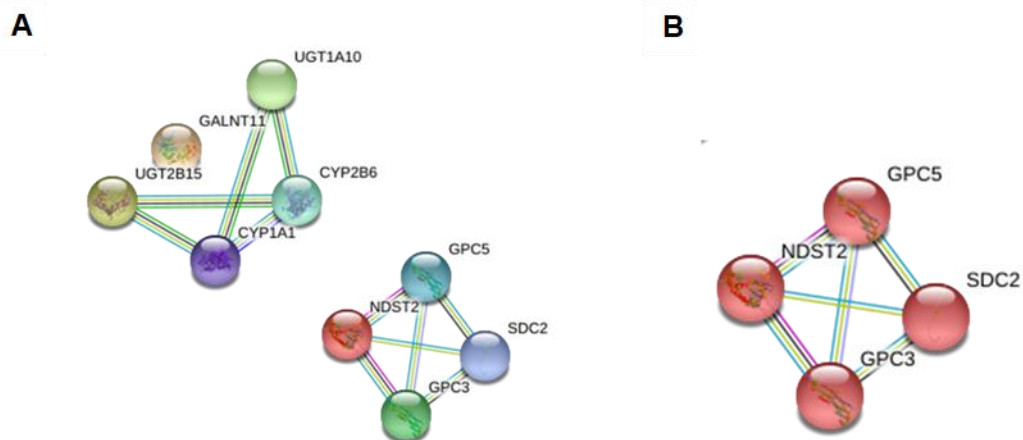
Para ello, se realizaron las predicciones con el nivel más alto de confianza, considerando 5 proteínas adicionales a las codificadas por los genes alterados (principales proteínas con mayor relación), incluyendo de manera independiente dos grupos. El primer grupo incluyó las proteínas codificadas por glicogenes que se encontraban incrementados *ST3GAL3*, *CHST2*, *MANBA* y *ST6GAL1* (Figura 5) y el segundo grupo incluyó las proteínas codificadas por glicogenes cuya expresión se encontraba disminuida *UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* y *UGT1A10* (Figura 5).

La predicción de los productos de los glicogenes que aumentan su expresión, muestra una red única, en la que todas las proteínas presentes interactúan entre ellas según *databases curated*, excepto *MANBA* (Figura 5A). El análisis del grupo 1, permitió identificar diferentes vías de glicosilación. Los glicogenes *ST3GAL3*, *CHST2*, *LUM*, *B4GALT1* y *B4GALT2* participan en la biosíntesis de glicosaminoglicanos, específicamente de queratán sulfato (Figura 5B), los productos de los genes *ST3GAL3*, *ST6GAL1*, *B4GALT1* y *B4GALT2* participan en la *N*-glicosilación (Figura 5C) y los productos de los glicogenes *ST3GAL3*, *FUT1*, *FUT3*, *B4GALT1* y *B4GALT2* participan en la biosíntesis de glicoesfingolípidos de la serie de lacto y neolactos (Figura 5D). **Es importante señalar que más de las enzimas pueden participar en diferentes vías de glicosilación.**



**Figura 4. Red de interacción de proteínas codificadas por glicogenes con aumento de expresión.** De acuerdo a la predicción de interacción proteína-proteína con la base de datos STRING. A) Se muestran los productos de los glicogenes *ST3GAL3*, *FUT1*, *FUT3*, *B4GALT1* y *B4GALT2* y cinco proteínas adicionales con las que interaccionan. B) Biosíntesis de queratán sulfato. C) Productos de *ST3GAL3*, *ST6GAL1*, *B4GALT1* y *B4GALT2* están asociadas a la biosíntesis de N-glicanos. D) Biosíntesis de glicoesfingolípidos. Las proteínas relacionadas en alguna vía biosintética en común son marcadas como esferas rojas.

En la predicción de interacciones proteína-proteína de los productos de los glicogenes que disminuyen su expresión, considerando en el análisis 5 proteínas adicionales, se puede observar que se forman dos redes de interacción (Figura 6A). En la primera red de la figura se observa la interacción entre los productos de *UGT2B15*, *GALNT11*, *UGT1A10*, *CYP1A1* y *CYP2B6*, esta asociación está basada en co-expresión, *databases curated* y *textmining*. Sin embargo, a pesar de estar relacionados, no tienen una vía biosintética en común. En la parte inferior se observa la interacción de los productos de *NDST2*, *GPC3*, *GPC5* y *SDC2*, la relación de este grupo de proteínas está basado en *databases curated* y *textmining*. Además, *NDST2*, *GPC3* y *GPC5* tienen una asociación determinada experimentalmente. En conjunto esta red de proteínas tienen como vía en común el proceso biosintético de glicosaminoglicanos (Figura 6B).

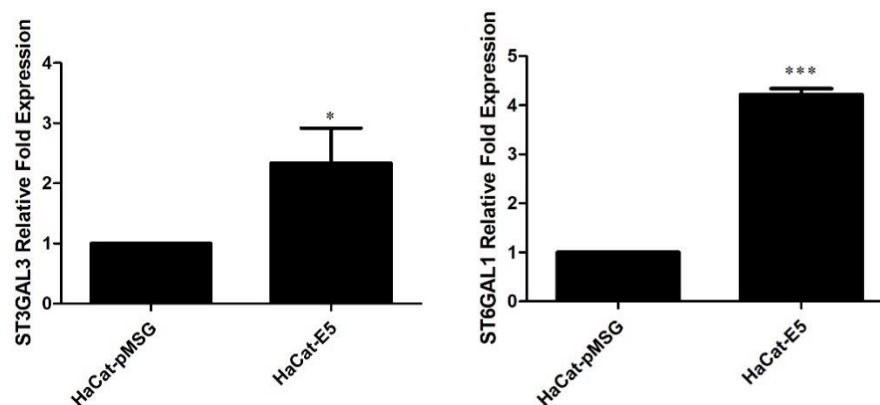


**Figura 5. Red de interacción de proteínas codificadas por glicogenes que disminuyen su expresión.** De acuerdo a la predicción de interacción proteína-proteína con la base de datos STRING, se muestran las interacciones conocidas de las proteínas incluidas basadas en *textmining* y *curated database*. A) Los productos de los genes *NDST2*, *GPC3* y *GPC5* tienen una asociación determinada experimentalmente (línea rosa) y; B) están relacionados en el proceso biosintético de glicosaminoglicanos (esferas rojas).

## E5 VPH 16 aumenta la expresión de *ST3GAL3* y *ST6GAL1*

En este trabajo, nos enfocamos en los genes que codifican para sialiltransferasas ST3Gal III y ST6Gal I que transfieren ácido siálico, un monosacárido reportado alterado en cáncer cervical en enlace  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6, respectivamente.

Para validar los resultados obtenidos en el Microarreglo de expresión, se evaluó la expresión de transcritos de *ST3GAL3* y *ST6GAL1* en HaCat-pMSG y HaCat-E5 por RT-PCR en tiempo real, mediante cuantificaciones relativas de los niveles de expresión. Obteniendo un aumento de expresión de ARNm de *ST3GAL3* de 2.3 veces y un aumento de *ST6GAL1* de 4.2 veces en presencia de E5 del VPH 16 con respecto a la línea control (Figura 7). Resultados que coinciden con el incremento observado en el análisis del microarreglo de expresión. Lo que nos indica que E5 VPH 16 es capaz de aumentar significativamente la expresión de dichos transcritos.



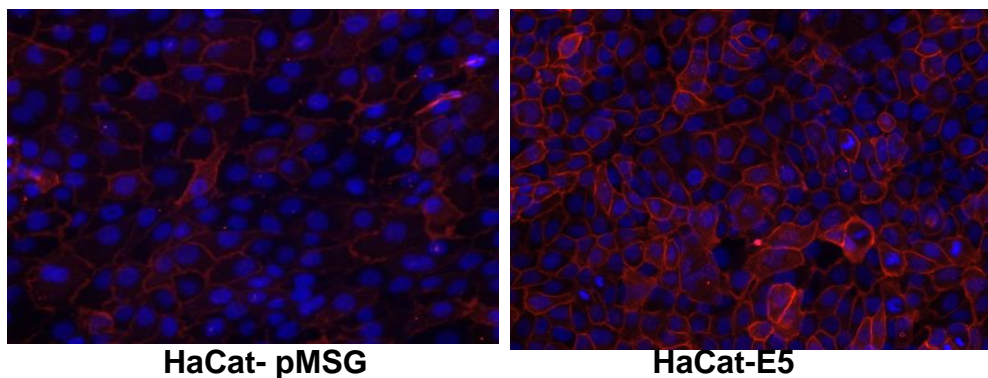
**Figura 6. E5 del VPH 16 incrementa los niveles de ARNm de los genes *ST3GAL3* y *ST6GAL1*.** A) El nivel de ARNm de *ST3GAL3* incrementó 2.3 veces en presencia de la oncoproteína E5. B) El nivel del ARNm de *ST6GAL1* incrementó 4.2 veces en presencia de E5. Los resultados presentados corresponden a una n=3. Las barras representan la media  $\pm$  DE. \* indica el valor de  $P < 0.05$  y \*\*\* indican el valor de  $P < 0.0001$  determinados por una prueba t-student no pareada.

### **La oncoproteína E5 del VPH 16 no modifica de manera significativa la expresión de ácido siálico**

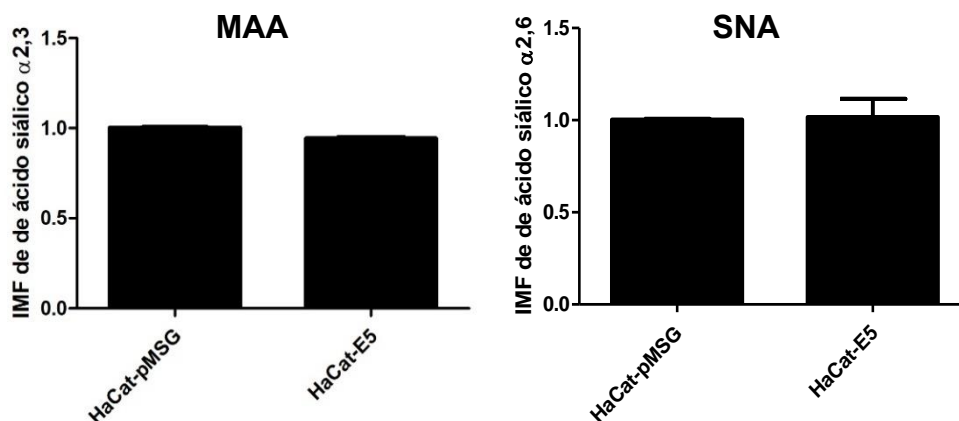
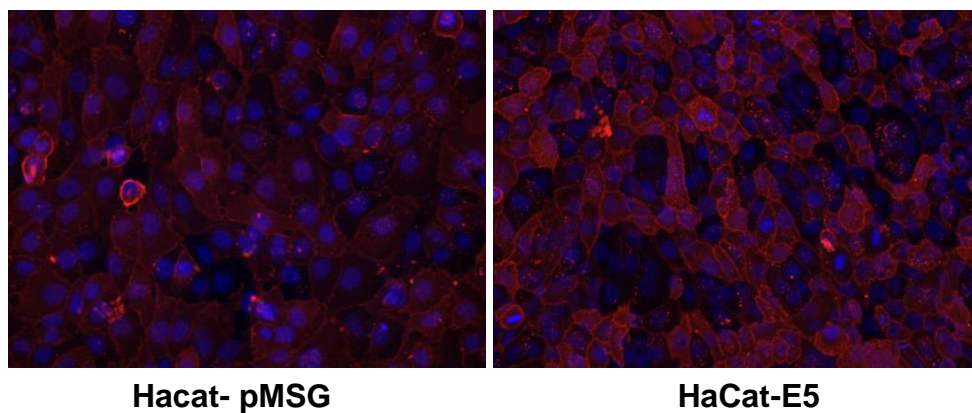
Para evaluar los niveles de ácido siálico en enlace  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 en la línea celular HaCat-pMSG y HaCat-E5, se realizaron ensayos citoquímicos empleando las lectinas biotiniladas *Maackia amurensis* y *Sambucus nigra*, la unión de las lectinas fue reconocida utilizando avidina acoplada a ficoeritrina. Los microfotografías muestran un ligero incremento en los niveles de ácido siálico en ambos tipos de enlace, visualizados por la fluorescencia roja (Figura 8). Sin embargo, los análisis de cuantificación de la intensidad de fluorescencia no mostraron diferencia entre ambas líneas celulares.



*Mackia amurensis* (MAA)-  $\alpha$ 2,3- Ácido siálico



*Sambucus nigra*(SNA)-  $\alpha$ 2,6- Ácido siálico



**Figura 7. Expresión de ácido siálico en enlace  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$  2,6 en las líneas celulares HaCat-pMSG y HaCat E5.** En el panel superior se muestra el reconocimiento de ácido siálico en enlace  $\alpha$ 2,3 por la lectina *Maackia amurensis* y en el panel inferior el reconocimiento de ácido siálico en enlace  $\alpha$ 2,6 por la lectina *Sambucus nigra*. Las intensidades de fluorescencia fueron cuantificadas y graficadas.



## VIII. DISCUSIÓN

La expresión alterada de glicanos y glicoconjugados está asociada con cáncer. Esto resulta de la expresión alterada de los glicogenes o enzimas que participan en el proceso de glicosilación (glicotransferasa o glicosidasa), el cambio de localización de las enzimas en el aparato de Golgi así como de la disponibilidad de los sustratos aceptores y donadores (Pinho & Reis, 2015; Rodrigues *et al.*, 2018).

Dentro de las alteraciones en la glicosilación que ocurren durante la transformación maligna, la sialilación alterada de glicanos es una de las más frecuentes en diferentes tipos de cáncer (Magalhães *et al.* 2017). En tejido de cáncer también se ha observado un aumento de la actividad de las sialiltransferasas (Harduin-lepers, Colomb, Foulquier, Groux-, & Delannoy, 2012), provocando una sobreexpresión de antígenos sialilados como sialil Tn, sialil T, sialil Lea y sialil Lex (Harduin-lepers *et al.* 2012; Wang 2005). En CaCu y displasias cervicales se han reportado diferencias significativas de expresión de sLea, sLex, sLey y T con respecto a epitelio normal (Engelstaedter *et al.* 2012). Además, en lesiones premalignas se ha reportado el aumento de expresión de ácido siálico en enlaces  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 (López *et al.* 2010; Serrano *et al.* 2012) y del antígeno sLex (Velázquez *et al.* 2012). Datos que concuerdan con un aumento de los transcritos de los genes *ST3GAL3* y *ST6GAL1* tanto en lesiones premailgnas (López *et al.* 2009) como en cáncer cervical (Wang *et al.* 2001, 2002). Sin embargo, a la fecha se desconocen los mecanismos o factores que pueden estar favoreciendo un incremento en la expresión de estos glicogenes. La infección persistente con el VPH podría tener un efecto sobre los cambios a nivel de glicosilación reportados en el epitelio cervical. Recientemente el grupo de trabajo reportó que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 18 modifican la expresión de glicogenes (Aco *et al.* 2018). Sin embargo se desconoce si la oncoproteína E5 podría tener un efecto sobre la expresión de glicogenes.

La oncoproteína E5 se expresa en etapas tempranas de la infección por el VPH y tiene diferentes proteínas blanco para ejercer su potencial oncogénico (Venuti *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que E5 del VPH 16 altera genes involucrados en la presentación antigénica, señalización mitogénica, adhesión

celular, proliferación celular, diferenciación y motilidad en queratinocitos inmortalizados (Kivi, Greco, Auvinen, & Auvinen, 2008), procesos que pueden ser modificados por la alteración en la glicosilación. Sin embargo, no hay reportes sobre la oncoproteína E5 y su efecto sobre cambios en la glicosilación. Solo hay un reporte que indica que E5 del VPH 16 aumenta ligeramente la expresión de ácido siálico, sin embargo, en este estudio no se evalúa la expresión de glicogenes, y el modelo utiliza una incubación con dexametasona para inducir la expresión de E5 lo que podría modificar el patrón de glicosilación. Por tanto, el presente trabajo es el primer reporte que muestra la evidencia de que E5 VPH 16 es capaz de modificar la expresión de diversos glicogenes, incluyendo genes que codifican para sialiltransferasas.

En este trabajo, de acuerdo al análisis de resultados del microarreglo de expresión de queratinocitos humanos transfectados de manera estable con E5 del VPH 16, se identificaron 8 glicogenes alterados. Los glicogenes que aumentaron su expresión en presencia de E5 fueron *ST3GAL3*, *CHST2*, *MANBA* y *ST6GAL1* y; los glicogenes que disminuyeron su expresión fueron *UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* y *UGT1A10*. Todos estos genes se han reportado alterados a nivel de ARNm y/o proteína en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el CaCu.

Un aumento de expresión del ARNm del gen *CHST2*, se ha observado en cáncer de mama, esofágico y en osteosarcoma (Chen *et al.*, 2011; Potapenko *et al.*, 2010; Warnecke-eberz, Metzger, Hölscher, & Drebber, 2015) y a nivel de proteína, se ha reportado aumentado en cáncer de ovario y de cervix (Seko *et al.*, 2009). Por otro lado, el gen *MANBA* se ha visto aumentado a nivel del ARNm en cáncer esofágico (Sud, Sharma, Ray, Chattopadhyay, & Ralhan, 2004). Además, se han identificado polimorfismos en este gen que lo asocian con riesgo de desarrollar cáncer colorectal (Gao *et al.*, 2008). Sin embargo, la alteración de expresión de *MANBA* no se ha reportado en CaCu. Por tanto, esta sería la primera evidencia que sugiere que *MANBA* podría estar alterado desde etapas previas al CaCu, por efecto de la oncoproteína E5 del VPH de alto riesgo.

De los genes que codifican para sialiltransferasas  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$  encontramos un aumento de expresión de *ST3GAL3* y *ST6GAL1* en el microarreglo de expresión,

resultado que coincidió con lo obtenido por RT-PCR en tiempo real, donde se observó un aumento significativo de los transcritos de ambos genes.

Se ha reportado un aumento en la expresión del ARNm o proteína de *ST3GAL3*, en diferentes tipos de cáncer, incluyendo carcinoma cervical, gástrico, biliar, colorectal, glioblastoma, carcinoma renal y pulmonar (Gretschel *et al.* 2003; Petretti *et al.* 2000; Wang *et al.* 2002; Jin *et al.* 2004). Además, en el grupo de trabajo, se identificó también un aumento en la expresión de *ST3GAL3*, en un microarreglo de expresión de biopsias de CaCu con respecto a tejido sano (Morán, I. *et al.* 2013, datos no publicados). Sin embargo, también se ha observado una expresión disminuida de este gen, en carcinoma invasivo de mama, adenocarcinoma de colon y en cáncer de ovario (Ashkani and Naidoo 2016; Wang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2001). Por tanto, la alteración en la expresión de *ST3GAL3* podría depender del origen del cáncer.

En el caso de *ST6GAL1*, al igual que en nuestros resultados, se ha observado una expresión aumentada del ARNm o proteína en carcinoma cervical (Wang *et al.* 2001, 2002), carcinoma gástrico y biliar (Gretschel *et al.* 2003; Jin *et al.* 2004), carcinoma de colon o colorectal (Petretti *et al.* 2000; Swindall *et al.* 2013; Vázquez *et al.* 2005), ovario y pancreático (Schultz *et al.* 2016; Wang *et al.* 2005). Sin embargo, aunque en carcinoma colorectal se ha visto un aumento en la actividad de la ST6Gal I (Vázquez *et al.* 2005), inversamente se ha observado mayor expresión del ARNm en tumores no metastásicos con respecto a tumores metastásicos de cáncer colorectal (S. Zhang *et al.*, 2017). Por tanto, la expresión de transcrito o proteína del gen *ST6GAL1*, puede variar en un mismo tejido, en este caso, de acuerdo a la progresión de la enfermedad.

Interesantemente, los transcritos de los genes *ST3GAL3* y *ST6GAL1*, se han reportado aumentados de acuerdo al grado de lesión escamosa intraepitelial de cérvix (López-Morales *et al.*, 2009). En relación a esto, el grupo de trabajo, reportó un aumento de ácido siálico en enlace  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$  en lesiones premalignas de biopsias de cérvix (López-Morales *et al.*, 2010), lo que indicaría una posible correlación entre el aumento de transcritos de estos genes con el aumento de la actividad de ST3Gal III y ST6Gal I, sialiltransferasas, que transfieren ácido siálico

en enlace  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6, respectivamente. Lo que nos muestra que desde etapas previas al cáncer cervical, se presentan cambios de expresión no solo a nivel de transcritos, si no también de estructuras glicánicas. Con esto se podría sugerir a la oncoproteína E5 del VPH de alto riesgo como candidato responsable de estas alteraciones. En los resultados obtenidos a partir de un microarreglo de expresión realizado en células HeLa que expresan E6 y E7 del VPH 18, no se encontró la expresión alterada de los genes *ST3GAL3* y *ST6GAL1* (Aco *et al.* 2018).

Considerando que E5 se expresa en etapas tempranas de la infección por VPH, y que su expresión se observa tanto a nivel de transcrito como de proteína en lesiones premalignas y CaCu (Lorenzon *et al.* 2011; Chang *et al.* 2001). Además, que en los reportes antes mencionados, no se relacionan los cambios de expresión a nivel de transcritos, sialilación o antígenos sialilados con la presencia y el genotipo del VPH, pero considerando que el VPH es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, se podrían atribuir dichos cambios a la presencia del virus, específicamente por alguna de sus oncoproteínas. El grupo de trabajo encontró un aumento en la expresión de sLex en presencia de la oncoproteína E6 (Velázquez-Márquez, 2009). Además, en otro experimento el grupo observó un aumento en la actividad del promotor P1 de *ST6GAL1* por efecto de E6 del VPH-16 (Méndez-Flores 2019).

Por tanto, se logra observar cambios de expresión a nivel de transcritos, así como alteración en la sialilación y expresión de antígenos sialilados en etapas previas al cáncer cervical, estos cambios podrían ser resultado de la expresión de la oncoproteína E5 y podrían observarse desde lesiones premalignas o incluso antes de que se presenten cambios a nivel celular observados mediante citologías cervicales.

Dentro de los genes que disminuyeron su expresión en presencia de E5 está *UGT2B15* el cual solo tiene un reporte de disminución de expresión de su proteína en cáncer de próstata (Pâquet *et al.*, 2012). Además, se han identificado polimorfismos en este gen, que se relacionan con mayor riesgo de cáncer de próstata (Park *et al.* 2004). Por otro lado, el ARNm de *GALNT11*, como en nuestro caso, se ha visto disminuido en cáncer de mama (Potapenko *et al.*, 2010). Pero,

también se ha visto un aumento de transcrito en leucemia linfocítica crónica (Libisch *et al.*, 2014). Para el caso del gen *NDST2*, un único reporte muestra un aumento del ARNm en cáncer hepatocelular (Tátrai *et al.*, 2010), resultado contrario al nuestro. Por último, *UGT1A10*, se ha reportado con una expresión disminuida en cáncer de mama (Starlard *et al.* 2008), pero incrementada en cáncer gástrico (Cengiz *et al.*, 2015). Ninguno de los genes encontrados disminuidos en este trabajo han sido reportados en CaCu. Por tanto, nuestros resultados sugieren que estos glicogenes podrían estar disminuidos desde etapas tempranas de la infección, resultado de la expresión de E5.

Por otro lado, también se identificaron vías biosintéticas de glicanos que podrían estar afectadas por la modificación de la expresión de los glicogenes. De acuerdo a las predicciones de interacción de proteínas codificadas por los glicogenes aumentados, se encontró que los genes *ST3GAL3* y *CHST2* participan en la biosíntesis de queratán sulfato y de glicoesfingolípidos. Además, *ST3GAL3* junto con *ST6GAL1* se relacionan con la vía de *N*-glicosilación.

El queratán sulfato junto con heparan sulfato, sulfato de condroitina, y hialuronano pertenecen a los glicosaminoglicanos, una familia de glicanos altamente sulfatados (F. Zhang, Zhang, & Linhardt, 2010). Proteínas unidas a queratán sulfato pueden encontrarse en la superficie celular e intracelularmente (Funderburgh, 2010). Miembros de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SRLP), entre ellos, lumican, interaccionan con proteínas de matriz extracelular, citocinas y factores de crecimiento, que regulan la proliferación celular, señalización celular y ensamble de matriz (Caterson and Melrose, 2018). Lumican ha sido relacionado con apoptosis, migración, invasión y angiogénesis (Karamanou *et al.* 2018; Nikitovic *et al.* 2008, 2014). Se ha reportado aumento de expresión de su ARNm en líneas celulares de melanoma maligno metastásico (Sifaki *et al.*, 2006). También se ha detectado la expresión de ARNm y proteína en líneas celulares y tejido de cáncer colorectal (Lu *et al.* 2002), así como en carcinoma de mama (Leygue *et al.* 1998, 2000) y en líneas celulares y tejido de cáncer pancreático (Ishiwata *et al.* 2007; Lu *et al.* 2002). Además, la expresión de lumican se ha reportado en líneas celulares y tejido de cáncer cervical. De las líneas celulares evaluadas, CaSki presenta mayor

expresión de ARNm y proteína (Naito *et al.*, 2002). Considerando que ésta línea expresa el oncogen E5 del VPH 16, la oncoproteína E5 podría estar modificando la expresión de lumican. Por otro lado, se ha visto que la sobreexpresión de lumican en células epiteliales de córnea incrementa la proliferación y migración, así como el aumento de niveles de integrinas  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  mediante la regulación de ERK 1/2 (Seomun & Joo, 2008), vía de señalización que es activada por E5 del VPH 16 en queratinocitos por un proceso independiente de EGFR (Crusius, Rodriguez, & Alonso, 2000). Por tanto, se sugiere que E5 podría afectar la expresión de lumican mediante la vía ERK 1/2.

La vía de glicosfingolípidos es otra vía biosintética posiblemente afectada por la alteración de *ST3GAL3* y *ST6GAL1*, de acuerdo a las redes de interacción. Los glicosfingolípidos son un subtipo de glicolípidos de membrana de superficie celular, importantes en la mediación de interacciones célula-célula y modulación de vías de transducción de señal (Hakomori, 2008; Zhuo *et al.* 2018). Participan en procesos como crecimiento celular, diferenciación y embriogénesis (Krengel and Bousquet 2014; Fredman *et al.* 2003), así como en apoptosis, proliferación celular, endocitosis, transporte celular, migración celular y senescencia (D'Angelo *et al.* 2013; Patwardhan *et al.* 2011). Sin embargo, también se ha relacionado a los glicosfingolípidos con diferentes tipos de cáncer, debido a su expresión aberrante, así como a la alteración de su función y de enzimas relacionadas (Fredman *et al.*, 2003; Krengel & Bousquet, 2014; Zhuo *et al.*, 2018). Por ejemplo, CA 19-9 es usado como marcador tumoral de cáncer pancreático. Sus niveles séricos están correlacionados con el gangliósido sLea presente en células tumorales de cáncer pancreático (Hamanaka and Suzuki 1996; Jiang *et al.* 2013). También, fucosil GM1 es un gangliósido que se expresa en líneas celulares y tejido de cáncer de pulmón (Yoshida *et al.* 2001; Brezicka *et al.* 2000). Su precursor GM1, se ha reportado aumentado en la superficie de células ectocervicales que expresan E5 del VPH 16 (Suprynowicz *et al.*, 2008). Es importante mencionar que los gangliósidos se caracterizan por tener al menos un residuo de ácido siálico en su estructura (Krengel & Bousquet, 2014), y aunque solo existe un reporte donde se relaciona a E5 del



VPH 16 con un ligero aumento no significativo de ácido siálico en queratinocitos (Oetke *et al.*, 2000), el aumento de GM1 podría ser el producto de una alteración en alguna enzima involucrada en su biosíntesis.

Diversos antígenos asociados a tumores corresponden a glicoesfingolípidos (D'Angelo *et al.*, 2013; S Hakomori, 1998). Por ejemplo, el antígeno ST2H (isómero de sLex y sLea), es un fucosilgangliósido reportado en células de cáncer pancreático, así como en tejido de cáncer de colon, siendo una de las enzimas responsables de su biosíntesis la ST6Gal I (Korekane *et al.*, 2010, 2007). Los antígenos de glicoesfingolípidos sLex y sLea se han encontrado altamente acumulados en tejido de cáncer colorrectal, gástrico y de pulmón (Sen-itiroh Hakomori, 2008). Por tanto, sLex y sLea son considerados antígenos asociados a tumores, que se unen a receptores de la superficie de células endoteliales, E y P-selectina, un paso importante en el proceso de metástasis (S. I. Hakomori & Zhang, 1997). Por tanto, los antígenos tumorales están asociados con transformación maligna y capacidad metastásica (Ho, Hsu, Huang, Kadomatsu, & Nakagawara, 2016), debido a que son reconocidos por la E-selectina de células endoteliales (Takada *et al.*, 1993; Ugorski & Laskowska, 2002). La expresión de E-selectina a menudo aumenta en la superficie de vasos endoteliales en el sitio proximal o en la metástasis tumoral, y en conjunto con sus ligandos sialilados promueven la extravasación de células tumorales (Barthel, Gavino, Descheny, & Dimitroff, 2007). Fucosiltransferasas y sialiltransferasas participan en la síntesis de antígenos tumorales. La enzima ST3Gal III transfiere ácido siálico en enlace  $\alpha 2,3$  y está involucrada en la síntesis de los antígenos Lewis sialilados, sLex y sLea (Kitagawa and Paulson 1993;Harduin-Lepers *et al.* 2001), presentes en *N*- y *O*- glicoproteínas (mucinas) y en glicoesfingolípidos (Dall'Olio *et al.* 2012; Hakomori and Zhang, 1997), expresados en la superficie de leucocitos y células tumorales (Barthel *et al.* 2007). La sulfotransferasa CHST2, cataliza la sulfatación de sLex dando lugar a su variante 6-sulfosialil Lewis-x (6-sulfo sLex), la cual se ha reportado que sirve como ligando de L, P y E-selectina (Ohmori *et al.*, 2000; Pratt & Bertozzi, 2004). Además de expresarse inversamente a sLex en tejido de cáncer colorrectal (Izawa *et al.*, 2000).

En células tumorales pancreáticas se sugiere que el incremento de niveles de estructuras Lewis sialiladas podría estar relacionado a un aumento de actividad de  $\alpha$ 2,3 sialiltransferasas más que a sus niveles de ARNm (Peracaula *et al.*, 2005). También, se ha mostrado una correlación del aumento de expresión de ST3Gal III y sLex, lo que permite a las células de carcinoma pancreático una mayor adhesión a E-selectina, una alta capacidad de migración y un alto potencial metastásico (Pérez-Garay *et al.*, 2010). En cáncer de mama, la expresión de ST3Gal III aumenta la expresión de sLex, lo que le permite a las células cancerosas mayor adhesión a E-selectina, mayor migración y capacidad de invasión, así como el aumento de expresión de moléculas relacionadas a la invasión como integrina  $\beta$ 1, COX-2, MMP-9 y MMP-2 (Cui *et al.*, 2016). COX-2 se ha visto aumentada a nivel de transcrito y proteína por la presencia de E5 del VPH 16 (Kim *et al.*, 2009). En cáncer cervical, la expresión de los antígenos sLea, sLex y su variante 6-sulfo sLex se ha visto aumentada (Engelstaedter *et al.* 2012; Seko *et al.* 2009). Sin embargo, desde las lesiones premalignas cervicales se puede observar un incremento de sLex (Kolben *et al.*, 2016; Velázquez-Márquez *et al.*, 2012). Lo que nos sugiere que el cambio de expresión de este antígeno, comienza desde etapas previas al cáncer, al igual que los niveles de transcritos de *ST3GAL3*, como ya se ha mencionado previamente.

En conjunto, se ha reportado también que E5 del VPH 16 afecta la expresión de genes involucrados en presentación de antígeno, señalización mitogénica, adhesión celular, proliferación celular, diferenciación y motilidad en queratinocitos inmortalizados (Kivi *et al.*, 2008). Así también, se ha visto que la oncoproteína altera la expresión de los miR-146a, miR-324-5p y miR-203, que tienen como blancos a genes involucrados en adhesión celular y ciclo celular; regulación de muerte celular y adhesión celular y; unión celular, migración y movilidad celular, respectivamente (Greco *et al.*, 2011). Específicamente, el miR-146a se ha visto alterado en tejido de CaCu, promoviendo la proliferación celular (X. Wang *et al.*, 2008). Aunque estos reportes no tienen el enfoque de relacionar procesos de transformación maligna con glicogenes o glicanos alterados, el cambio de expresión de los glicogenes y sus

proteínas codificadas, involucradas en la biosíntesis de estructuras glicánicas en cáncer cervical y en lesiones premalignas, podrían ser provocadas por efecto de E5 VPH de alto riesgo.

La *N*-glicosilación fue otra vía alterada por los glicogenes sobreexpresados, *ST3GAL3* y *ST6GAL1*. Los *N*-glicanos son usualmente procesados durante el transporte intracelular de glicoproteínas. La adición final de galactosa y ácido siálico completa las estructuras de *N*-glicanos tipo complejos biantenarios o complejos ramificados (Nakayama, Nakamura, Tsuji, Itoh, & Kurosaka, 2013).

La ST6Gal I es una sialiltransferasa que cataliza la sialilación  $\alpha 2,6$  en *N*-glicanos y que se ha visto alterada en diferentes tipos de cáncer (J. Lu & Gu, 2015). Esta enzima se ha relacionado con la hipersialilación  $\alpha 2,6$  de la integrina  $\beta 1$ , lo que favorece la migración de células epiteliales de colon mediante colágeno I, lo que contribuye a un fenotipo migratorio e invasivo de células tumorales de colon (Seales *et al.*, 2005). También se ha visto que la ST6Gal I participa en la sialilación del EGFR, lo que induce quimioresistencia en células de carcinoma colorrectal (J. J. Park *et al.*, 2012). Además, este receptor se propone como posible biomarcador de cáncer cervical, debido a su expresión en un 50-70% de casos de células de carcinoma escamoso (Soonthornthum *et al.*, 2011). Considerando estos datos junto con el reporte de que E5 del VPH 16 aumenta la expresión del EGFR (Tomakidi, Cheng, Kohl, Komposch, & Alonso, 2000), podría sugerirse que el oncogen E5 aumenta la proliferación celular desde lesiones premalignas.

Por otro lado, la enzima ST6Gal I participa en la síntesis de CDw75, antígeno presente en la superficie de linfocitos B (Bast *et al.*, 1992) y en leucemia linfocítica crónica de células B (Guy & Andrew, 1991). En tumores de cáncer colorrectal se ha reportado un aumento de la actividad de ST6Gal I, que a su vez provoca el aumento de expresión del antígeno CDw75 (Costa-Nogueira, Villar-Portela, Cuevas, Gil-Martín, & Fernández-Briera, 2009). Este antígeno se encuentra presente principalmente en *N*-glicoproteínas. Recientemente, en tejido de cáncer colorrectal, se reportaron diversas proteínas glicosiladas, que contienen CDw75 (Mariño-Crespo, Fernández-Briera, & Gil-Martín, 2018).

Otro antígeno sintetizado por ST6Gal I, como ya se había mencionado, es el antígeno ST2H, reportado en cáncer de colon (Korekane *et al.*, 2010, 2007). Además, como también ya se mencionó, la ST3Gal III participa en la síntesis de los antígenos sLex y sLea (Kitagawa and Paulson 1993;Harduin-Lepers *et al.* 2001).

Por lo tanto, al aumento de transcritos de *ST3GAL3* y *ST6GAL1*, podría estar relacionado con el aumento de actividad de las sialiltransferasas que catalizan enlaces  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$  provocando a su vez un aumento de expresión de los antígenos antes mencionados, desde etapas previas al cáncer.

Por último, las vías biosintéticas afectadas por la disminución de los glicogenes *UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* y *UGT1A10*, es la vía de metabolismo de drogas, donde participan las enzimas *UGT2B15* y *UGT1A10* y la vía biosintética de glicosaminoglicanos, donde *NDST2* está relacionada.

*UGT2B15* y *UGT1A10* pertenecen a la familia de UDP-glucuronosiltransferasas, responsables de la desintoxicación de compuestos endógenos y exógenos, incluyendo bilirrubinas, ácidos grasos, hormonas esteroides y drogas (Mackenzie *et al.* 2005; Rowland *et al.* 2013). El metabolismo de esteroides está considerado como un factor de transformación neoplásica para desarrollar cáncer de mama y de próstata (Tukey & Strassburg, 2000).

*UGT2B15* es expresada en hígado, riñón, glándula mamaria, útero y próstata (Bélanger, Pelletier, Labrie, Barbier, & Chouinard, 2003). En líneas celulares de cáncer de mama, se ha observado que el estradiol (E2) provoca un aumento de expresión de ARNm, proteína y actividad enzimática de *UGT2B15* (Harrington *et al.* 2006). También, en líneas celulares de cáncer de próstata positivas al receptor de andrógeno y en tumores de cáncer de próstata, grado  $\geq 8$  en la escala de Gleason y en tejido metastásico, hay una mayor expresión del transcrito de *UGT2B15* (Margaillan Guillaume, Lévesque Erick, 2016; Wijayakumara, Hu, Meech, McKinnon, & Mackenzie, 2015). Sin embargo, en otro estudio, se reportó una disminución de la proteína *UGT2B15* en tejido de cáncer de próstata con valores elevados en la escala de Gleason (Pâquet *et al.*, 2012). Además, se ha visto que la presencia de polimorfismos en *UGT2B15* está asociado con riesgo de cáncer de próstata (Hu *et al.*, 2016; J. Park *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2013). También, se han

reportado polimorfismos de UGT2B15 que se asocian con un aumento en la recurrencia de cáncer de mama de pacientes tratadas con tamoxifen (Nowell *et al.*, 2005), lo que podría sugerir una asociación entre la presencia de polimorfismos con quimioresistencia al fármaco.

Por otro lado, UGT1A10 se expresa en el tracto gastrointestinal (Bélanger *et al.*, 2003) y se ha reportado aumento en los niveles de ARNm en tumores de cáncer de estómago (Cengiz *et al.*, 2015) y en líneas celulares de cáncer de pulmón con resistencia a los antineoplásicos CPT-11/SN-38 (Oguri *et al.*, 2004). Sin embargo, en carcinoma de mama se ha visto una disminución de transcritos de UGT1A10 (Starlard-davenport *et al.*, 2008). También, se han reportado polimorfismos que podrían asociarse como el factor de riesgo para cáncer orofaríngeo (Elahi, Abul, Bendaly *et al.*, 2003). Estos resultados, resaltan la importancia que tienen las alteraciones en la expresión de las UDP-glucuronosiltransferasas, así como la presencia de los diferentes polimorfismos, que pueden asociarse con el riesgo de desarrollar cáncer y con quimioresistencia a diferentes fármacos antineoplásicos. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se relaciona una mayor expresión de UGTs con cáncer, contrario a lo que obtuvimos en nuestros resultados. Es relevante mencionar que no se han reportado cambios de expresión de estas enzimas en tejido cervical, y considerando que en presencia de E5 del VPH 16 se alteran UGT2B15 y UGT1A10, esto podría ser de utilidad en el seguimiento de lesiones premalignas y CaCu. Sin embargo, se tendrían que hacer los análisis correspondientes en células o tejido de pacientes sanas e infectadas con el virus.

Por otro lado, aunque *GALNT11*, no se relaciona en ninguna vía biosintética con el resto de los genes disminuidos, es importante mencionar que se ha reportado una disminución de su transcrito en cáncer de mama (Potapenko *et al.*, 2010). Y, contradictorio a nuestro resultado, se ha observado una alta expresión del ARNm, relacionada con alteraciones específicas en la O-glicosilación de células de leucemia linfocítica crónica (Libisch *et al.*, 2014). Además, variaciones en su número de copias se ha relacionado con mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (Villacis *et al.*, 2016). También, cabe señalar que en *Xenopus tropicalis*, *GALNT11* activa la señalización de NOTCH (Boskovski *et al.*, 2013), vía relacionada con CaCu

(Aster, Jon C, Pear, Warren S and Blacklow, 2017; Maliekal, Bajaj, Giri, Subramanyam, & Krishna, 2008; Rong, Feng, & Ye, 2017; Sun *et al.*, 2016).

Por último, el gen *NDST2*, que se relaciona con la vía de glicosaminoglicanos, ha sido reportado en un modelo murino, en el cual su sobreexpresión aumenta la cantidad de heparan sulfato (Deligny *et al.*, 2016), un glicosaminoglicano, que tiene un papel clave en la infección del VPH 16 (Giroglou *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2014; Surviladze *et al.* 2015).

Con esto, se puede ver que la mayoría de los glicogenes disminuidos en presencia de E5 se han reportado en algún tipo de cáncer. Sin embargo, no existen reportes de algunos de ellos alterados en CaCu. Por tanto, estos glicogenes podrían alterarse desde etapas previas al cáncer y durante la enfermedad.

Por otro lado, todas las alteraciones a nivel de transcritos provocadas por el oncogen *E5* del VPH 16, reportadas en este trabajo, podrían ser observadas desde etapas tempranas de la infección y en lesiones premalignas. Sin embargo, aún faltan estudios para evaluar cambios de expresión de estructuras glicánicas en líneas celulares que expresen E5 y así también, evaluar en muestras de cérvix con presencia de VPH y/o con lesiones premalignas, el nivel de expresión de los glicogenes y estructuras glicánicas relacionadas. Con respecto a este tipo de análisis, evaluamos en nuestro modelo la expresión de ácido sialico en enlace  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ , sin embargo, los análisis de cuantificación de la fluorescencia no mostraron diferencias entre la línea celular control y la línea celular que expresa E5.

Finalmente el cambio de expresión de glicogenes por la proteína E5 podría ser resultado de un mecanismo indirecto de regulación transcripcional. El mecanismo a través del cuál modifica la expresión de genes aún no ha sido dilucidado, sin embargo, un estudio muestra que la oncoproteína E5 potencia la expresión del ARNm COX-2 y este efecto lo ejerce a través de los sitios de unión NF $\kappa$ B y AP-1 presentes en el promotor de dicho gen (Su, K. *et al.*, 2009), los autores sugieren que este efecto podría ser resultado de la interacción de E5 con algunos factores de transcripción o con proteínas reguladoras de vías de señalización que activan ciertos genes. Sin embargo, aún falta mucho por investigar.



## IX. CONCLUSIÓN

En este trabajo se encontró que la oncoproteína E5 del VPH 16 modifica la expresión de diversos glicogenes, entre ellos, genes que codifican para sialiltransferasas, enzimas alteradas en diferentes tipos de cáncer incluyendo CaCu y en sus etapas previas. Cabe destacar que el cambio de expresión de los transcritos de *ST3GAL3* y *ST6GAL1*, podría afectar la síntesis de antígenos sialilados desde etapas tempranas de la infección, lo que favorecería la progresión a CaCu, dando la capacidad a las células cancerosas de mayor migración y metástasis, como se reporta en otros tipos de cáncer. Los cambios tempranos provocados por la oncoproteína E5 podrían servir como marcadores para el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Este es el primer reporte sobre el efecto de E5 en la expresión de glicogenes. Lo que resalta la importancia de la infección con el VPH y los cambios a nivel de glicosilación que ocurren durante la transformación maligna.



## X. PERSPECTIVAS

Los resultados generados en este trabajo abren diversas líneas de investigación que aportarán mayor información sobre las alteraciones de la glicosilación en CaCu así como del papel de la infección viral sobre dicha alteraciones.

Por lo que se plantea

- 1) Evaluar los niveles de expresión de transcritos de los genes alterados por E5 en muestras de pacientes
- 2) Evaluar la expresión de los antígenos glicosilados tanto en muestras de pacientes como en ensayos *in vitro*.
- 3) Realizar ensayos funcionales para evaluar el efecto de E5, y los cambios de glicosilación sobre la capacidad de adhesión, migración e invasión.
- 4) Profundizar en el estudio de los posibles mecanismos que participan en los cambios de expresión de glicogenes por la oncoproteína E5.

## XI. REFERENCIAS

- Aco-tlachi, M., Carreño-lópez, R., Martínez-morales, P. L., Maycotte, P., Aguilar-lemarroy, A., Jave-suárez, L. F., ... Reyes-leyva, J. (2018). *Glycogene expression profiles based on microarray data from cervical carcinoma HeLa cells with partially silenced E6 and E7 HPV oncogenes*. 1–12.
- Aguilar-Lemarroy A, Jave-Suarez LF, R.-Z. A. et al. (2015). Human Papillomavirus Infections in Mexican Women With Normal Cytology, Precancerous Lesions, and Cervical Cancer: Type-Specific Prevalence and HPV Coinfections. *Journal of Medical Virology*, 87(5), 871–884. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Ashkani, J., & Naidoo, K. J. (2016). Glycosyltransferase Gene Expression Profiles Classify Cancer Types and Propose Prognostic Subtypes. *Scientific Reports*, 6(May), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep26451>
- Aster, Jon C, Pear, Warren S and Blacklow, S. C. (2017). HHS Public Access. *Annu Rev Pathol.*, 12, 245–275. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30265-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30265-0).Cost-effectiveness
- Barthel, S. R., Gavino, J. D., Descheny, L., & Dimitroff, C. J. (2007). *Cancer. October*, 11(11), 1473–1491. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.11.1473>.Targeting
- Bast, B. J. E. G., Zhou, L. J., Freeman, G. J., Colley, K. J., Ernst, T. J., Munro, J. M., & Tedder, T. F. (1992). The HB-6, CDw75, and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface carbohydrate determinants generated by the ??-galactoside ??2,6-sialyltransferase. *Journal of Cell Biology*, 116(2), 423–435.
- Bélanger, A., Pelletier, G., Labrie, F., Barbier, O., & Chouinard, S. (2003). Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14(10), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2003.10.005>
- Bernard, H. U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, 32(SUPPL.), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.021>
- Boskovski, M. T., Yuan, S., Pedersen, N. B., Goth, C. K., Makova, S., Clausen, H., ... Khokha, M. K. (2013). The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type and laterality. *Nature*, 504(7480), 456–459. <https://doi.org/10.1038/nature12723>
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, J. A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries Freddie. *CA Cancer J Clin*, 68(11), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brezicka, T., Bergman, B., Olling, S., & Fredman, P. (2000). Reactivity of monoclonal antibodies with ganglioside antigens in human small cell lung cancer tissues. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 28(1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(99\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(99)00107-5)
- Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J,

- Bosch FX, de S., & S. (2017). Human Papillomavirus and Related Diseases Report. *ICO HPV Information Centre*, (July).
- Caterson, B., & Melrose, J. (2018). Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology*, 28(4), 182–206. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy003>
- Cengiz, B., Yumrutas, O., Bozgeyik, E., Borazan, E., Igci, Y. Z., Bozgeyik, I., & Oztuzcu, S. (2015). Differential expression of the UGT1A family of genes in stomach cancer tissues. *Tumor Biology*, 36(8), 5831–5837. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3253-1>
- Chen, X., Yang, T. T., Qiu, X. C., Ji, Z. G., Li, C. X., Long, H., ... Fan, Q. Y. (2011). Gene expression profiles of human osteosarcoma cell sublines with different pulmonary metastatic potentials. *Cancer Biology and Therapy*, 11(2), 287–292. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.2.13966>
- Chouinard, S., Barbier, O., & Bélanger, A. (2007). UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (UGT2B15) and UGT2B17 enzymes are major determinants of the androgen response in prostate cancer LNCaP cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33466–33474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703370200>
- Chung, C. H., & Gillison, M. L. (2009). Human papillomavirus in head and neck cancer: Its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical Cancer Research*, 15(22), 6758–6762. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0784>
- Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, D. L. (2018). Cervical cancer. *Lancet*, 393(10167), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- Costa-Nogueira, C., Villar-Portela, S., Cuevas, E., Gil-Martín, E., & Fernández-Briera, A. (2009). Synthesis and expression of CDw75 antigen in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, 9, 431. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-431>
- Crusius, K., Rodriguez, I., & Alonso, A. (2000). The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes*, 20(1), 65–69. <https://doi.org/10.1023/A:1008112207824>
- Cui, H. X., Wang, H., Wang, Y., Song, J., Tian, H., Xia, C., & Shen, Y. (2016). ST3Gal III modulates breast cancer cell adhesion and invasion by altering the expression of invasion-related molecules. *Oncology Reports*, 36(6), 3317–3324. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5180>
- D'Angelo, G., Capasso, S., Sticco, L., & Russo, D. (2013). Glycosphingolipids: Synthesis and functions. *FEBS Journal*, 280(24), 6338–6353. <https://doi.org/10.1111/febs.12559>
- Dall'olio, F. (1996). Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *Clinical Molecular Pathology*, 49(3), M126-35. <https://doi.org/10.1136/mp.49.3.M126>
- Dall'Olio Fabio, Malagolini Trinchera, Marco, C. M. (2012). Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Frontiers in Bioscience*, 17, 670–699.
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Deligny, A., Dierker, T., Dagälv, A., Lundequist, A., Eriksson, I., Nairn, A. V., ... Kjellén, L. (2016). NDST2 (N-deacetylase/N-sulfotransferase-2) enzyme

- regulates heparan sulfate chain length. *Journal of Biological Chemistry*, 291(36), 18600–18607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.744433>
- Drake, P. M., Cho, W., Li, B., Prakobphol, A., Anderson, N. L., Regnier, F. E., ... Susan, J. (2010). *Discovery Equation*. 56(2), 223–236. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.136333>. Sweetening
- Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S. -o., Gonzalez, S., ... Munger, K. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10002–10007. <https://doi.org/10.1073/pnas.170093297>
- Duensing, Stefan, & Münger, K. (2002). The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Independently Induce Numerical and Structural Chromosome Instability The Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncoproteins Independently Induce. *Cancer Research*, 62(15), 7075–7082. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90409-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8)
- Elahi, Abul, Bendaly, J., Zheng, Z., Ph, D., Muscat, J. E., Ph, D., Schantz, S. P., ... Ph, D. (2003). Detection of UGT1A10 Polymorphisms and Their Association with Orolaryngeal Carcinoma Risk. *Cancer*, 98(4), 872–880. <https://doi.org/10.1002/cncr.11587>
- Etienne Leygue, Linda Snell, Helmut Dotzlaw, Kate Hole, Tamara Hiller-Hitchcock, P. J. R., & Peter H. Watson, and L. C. M. (1998). Expression of Lumican in Human Breast Carcinoma. *CANCER RESEARCH*, 58, 1348–1352. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.4.2979>
- Flores-Miramontes, M. G., Torres-Reyes, L. A., Aguilar-Lemarroy, A., Vallejo-Ruiz, V., Piña-Sánchez, P., Cortés-Gutiérrez, E., ... Jave-Suárez, L. F. (2015). Prevalencia de genotipos de VPH en México y en el mundo detectados mediante Linear Array HPV genotypes prevalence in México and worldwide detected by Linear Array. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53(2), 122–130.
- Fredman, P., Hedberg, K., & Brezicka, T. (2003). Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 17(3), 155–167. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749752>
- Funderburgh, J. L. (2010). *NIH Public Access*. 54(4), 187–194. <https://doi.org/10.1080/15216540214932>. Keratan
- Gao, J., Arberman, G., He, L., Qiao, F., Zhang, Z., Zhao, Z., ... Sun, X. F. (2008). MANBA polymorphism was related to increased risk of colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. *Acta Oncologica*, 47(3), 372–378. <https://doi.org/10.1080/02841860701644052>
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 75(3), 1565–1570. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1565>
- Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science*, 131(17), 2201–2221. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>
- Graham, S. V. (2010). Human papillomavirus: Gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future*

- Microbiology*, 5(10), 1493–1506. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.107>
- Greco, D., Kivi, N., Qian, K., Leivonen, S. K., Auvinen, P., & Auvinen, E. (2011). Human papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs. *PLoS ONE*, 6(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021646>
- Gretschel, S., Haensch, W., Schlag, P. M., & Kimmner, W. (2003). Clinical relevance of sialyltransferases ST6GAL-I and ST3GAL-III in gastric cancer. *Oncology*, 65(2), 139–145. <https://doi.org/10.1159/000072339>
- Guy, K., & Andrew, J. M. (1991). Expression of the CDw75 (beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase) antigen on normal blood cells and in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 74(2), 206–214.
- Hakomori, S. I., & Zhang, Y. (1997). Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. *Chemistry and Biology*, 4(2), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90253-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90253-2)
- Hakomori, S. (1998). Cancer-associated glycosphingolipid antigens: their structure, organization, and function. *Acta Anat.*, 161(206), 79–90. <https://doi.org/aan61079> [pii]
- Hakomori, Sen-itiroh. (2008). NIH Public Access Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: Recollections and future trends. *NIH Public Access*, 1780(3), 325–346. <https://doi.org/10.1021/ja064902x>. Brilliant
- Hamanaka, Y., Hamanaka, S., & Suzuki, M. (1996). Sialyl Lewis(a) ganglioside in pancreatic cancer tissue correlates with the serum CA 19-9 level. *Pancreas*, 13(2), 160–165. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8829184>
- Hans-Ulrich Bernard, Robert D. Burk, Zigui Chen, K. van D., & Harald zur Hausen, and E.-M. de V. (2010). *Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments*. 401(1), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>. Classification
- Hao, P., Ren, Y., & Xie, Y. (2010). An improved protocol for N-glycosylation analysis of gel-separated sialylated glycoproteins by MALDI-TOF/ TOF. *PLoS ONE*, 5(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015096>
- Harduin-lepers, A., Colomb, F., Foulquier, F., Groux-, S., & Delannoy, P. (2012). *Sialyltransferases functions in cancers*. (10), 499–515.
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83(8), 727–737. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01301-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01301-3)
- Harrington, W. R., Sengupta, S., & Katzenellenbogen, B. S. (2006). Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Endocrinology*, 147(8), 3843–3850. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0358>
- Hausen, H. zur. (1996). Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1288(2), F55–F78. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(96\)00020-0](https://doi.org/10.1016/0304-419X(96)00020-0)
- Ho, W. L., Hsu, W. M., Huang, M. C., Kadomatsu, K., & Nakagawara, A. (2016). Protein glycosylation in cancers and its potential therapeutic applications in neuroblastoma. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0334-6>
- Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J. A., Herrmann, A. L., & Hoppe-Seyler, F. (2018). The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and

- Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology*, 26(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.007>
- Hu, D. G., Mackenzie, P. I., Mckinnon, R. A., Meech, R., Gui, D., Mackenzie, P. I., ... Meech, R. (2016). *Genetic polymorphisms of human UDP-glucuronosyltransferase ( UGT ) genes and cancer risk*. 2532(February). <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1131292>
- Huh, W. K., Joura, E. A., Giuliano, A. R., Iversen, O. E., de Andrade, R. P., Ault, K. A., ... Luxembourg, A. (2017). Final efficacy, immunogenicity, and safety analyses of a nine-valent human papillomavirus vaccine in women aged 16–26 years: a randomised, double-blind trial. *The Lancet*, 390(10108), 2143–2159. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31821-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31821-4)
- Illades-Aguilar, B., Cortés-Malagón, E. M., Antonio-Véjar, V., Zamudio-López, N., Alarcón-Romero, L. del C., Fernández-Tilapa, G., ... Leyva-Vázquez, M. A. (2009). Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detection and Prevention*, 32(4), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.cdp.2008.09.001>
- Ishiwata, T., Cho, K., Kawahara, K., Yamamoto, T., Fujiwara, Y., Uchida, E., ... Naito, Z. (2007). Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. *Oncology Reports*, 18(3), 537–543.
- Izawa, M., Kumamoto, K., Mitsuoka, C., Lewis, S., Expression, X., & Colorectal, H. (2000). *Expression of Sialyl 6-Sulfo Lewis X Is Inversely Correlated with Conventional Sialyl Lewis X Expression in Human Colorectal Cancer Expression of Sialyl 6-Sulfo Lewis X Is Inversely Correlated with Conventional*. 159, 1410–1416.
- Jiang, Y., DiVittore, N. A., Young, M. M., Jia, Z., Xie, K., Ritty, T. M., ... Fox, T. E. (2013). Altered sphingolipid metabolism in patients with metastatic pancreatic cancer. *Biomolecules*, 3(3), 435–448. <https://doi.org/10.3390/biom3030435>
- Jin XL, Zheng SS, Wang BS, C. H. (2004). *Correlation of glycosyltransferases mRNA expression in extrahepatic bile duct carcinoma with clinical pathological characteristics* (pp. 292–295). pp. 292–295.
- Johansson, C., & Schwartz, S. (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 239–251. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2984>
- Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., & Sakai, H. (2012). Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00152>
- Karamanou, K., Perrot, G., Maquart, F. X., & Brézillon, S. (2018). Lumican as a multivalent effector in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.02.011>
- Kim, S. H., Oh, J. M., No, J. H., Bang, Y. J., Juhn, Y. S., & Song, Y. S. (2009). Involvement of NF-κB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*, 30(5), 753–757. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp066>
- kitagawa1993.pdf*. (n.d.).
- Kivi, N., Greco, D., Auvinen, P., & Auvinen, E. (2008). Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5

- protein expression. *Oncogene*, 27(18), 2532–2541. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210916>
- Kolben, T. M., Kraft, F., Kolben, T., Goess, C., Semmlinger, A., Dannecker, C., ... Jeschke, U. (2016). *Expression of Sialyl Lewis a , Sialyl Lewis x , cervical dysplasia*.
- Korekane, H., Matsumoto, A., Ota, F., Hasegawa, T., Misonou, Y., Shida, K., ... Taniguchi, N. (2010). Involvement of ST6Gal i in the biosynthesis of a unique human colon cancer biomarker candidate,  $\alpha$ 2,6-sialylated blood group type 2H (ST2H) antigen. *Journal of Biochemistry*, 148(3), 359–370. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq077>
- Korekane, H., Tsuji, S., Noura, S., Ohue, M., Sasaki, Y., Imaoka, S., & Miyamoto, Y. (2007). Novel fucogangliosides found in human colon adenocarcinoma tissues by means of glycomic analysis. *Analytical Biochemistry*, 364(1), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.01.034>
- Krengel, U., & Bousquet, P. A. (2014). Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00325>
- Kumar Annandita , Jacob Taylor , Abbanx Cynthia Y., and M. P. I. (2014). Intermediate heparan sulfate binding during HPV 16 infection in HaCaTs. *HHS Public Access*, 21(5), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.037>.Reactivity
- Kumar, N. (2016). Cervical Cancer; a Nightmare for Womanhood: Review of Recent Advances Naina. *Womens Health & Gynecology*, 2(2), 30–34. Retrieved from <http://sciononline.org/open-access/cervical-cancer-a-nightmare-for-womanhood-review-of-recent-advances.pdf>
- Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y., & Favre, M. (2009). The EVER Proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 348–370. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00033-08>
- Leygue, E., Snell, L., Dotzlaw, H., Troup, S., Hiller-Hitchcock, T., Murphy, L. C., ... Watson, P. H. (2000). Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *The Journal of Pathology*, 192(3), 313–320. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(200011\)192:3<313::AID-PATH694>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1096-9896(200011)192:3<313::AID-PATH694>3.0.CO;2-B)
- Libisch, M. G., Casás, M., Chiribao, M. L., Moreno, P., Cayota, A., Osinaga, E., ... Robello, C. (2014). GALNT11 as a new molecular marker in chronic lymphocytic leukemia. *Gene*, 533(1), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.052>
- Lizano-soberón, Marcela, A. C. G. Y. A. C. P. (2009). Lizano et al, *Cancerología 4* (2009): 205-216. *Instituto Nacional de Cancerología*, 4, 205–216. Retrieved from <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementod/documentosPortada/1272302572.pdf>
- López-Morales, D., Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Zenteno, E., & Vallejo-Ruiz, V. (2010). Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic Pathology*, 5(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-5-74>
- López-Morales, D., Velázquez-Márquez, N., Valenzuela, O., Santos-López, G.,

- Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2009). Enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia. *Investigacion Clinica*, *50*(1), 45–53. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e31819d8a5c>
- López, A y Lizano, M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología*, *1*, 31–55. Retrieved from <http://www.incan.edu.mx/i/revista/articulos/articulo2.pdf>
- Lu, J., & Gu, J. (2015). Significance of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase 1 in cancers. *Molecules*, *20*(5), 7509–7527. <https://doi.org/10.3390/molecules20057509>
- Lu, Y. P., Ishiwata, T., Kawahara, K., Watanabe, M., Naito, Z., Moriyama, Y., ... Asano, G. (2002). Expression of lumican in human colorectal cancer cells. *Pathology International*, *52*(8), 519–526. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.2002.01384.x>
- Mackenzie, P. I., Bock, K. W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S. I., Iyanagi, T., ... Nebert, D. W. (2005). Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics*, *15*(10), 677–685. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000173483.13689.56>
- Magalhães, Ana, H. O. D. and C. A. R. (2017). *Aberrant Glycosylation in Cancer: A Novel Molecular Mechanism*. 733–735. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.012>
- Maliekal, T. T., Bajaj, J., Giri, V., Subramanyam, D., & Krishna, S. (2008). The role of Notch signaling in human cervical cancer: Implications for solid tumors. *Oncogene*, *27*(38), 5110–5114. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.224>
- Margaillan Guillaume, Lévesque Erick, G. C. (2016). of Inactivating Glucuronosyltransferases by microRNAs in Prostate Cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, *155*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.09.021>
- Mariño-Crespo, Ó., Fernández-Briera, A., & Gil-Martín, E. (2018). Identification of proteins with the CDw75 epitope in human colorectal cancer. *Oncology Letters*, *15*(1), 580–587. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7336>
- Martinez-zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Forster, A., Cousido-siah, A., ... Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV- mediated degradation of p53 Denise. *Nature*, *529*(7587), 541–545. <https://doi.org/10.1038/nature16481>.Structure
- Mcmurray, H. R., Nguyen, D., Westbrook, T. F., & Mcance, D. J. (2001). Biology of human papillomaviruses. *International Journal of Experimental Pathology*, *82*(1), 15–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2001.00177.x>
- Meany, D. L., & Chan, D. W. (2011). Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clinical Proteomics*, *8*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-8-7>
- Mok, S. C., Wong, K. K., Lu, K. H., Munger, K., & Nagymanyoki, Z. (2018). Molecular basis of gynecologic diseases. In *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease* (Second Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802761-5.00023-7>
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, *10*(8), 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>



- Naito, Z., Ishiwata, T., Kurban, G., Teduka, K., Kawamoto, Y., Kawahara, K., & Sugisaki, Y. (2002). Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. *International Journal of Oncology*, *20*(5), 943–948.
- Nakayama, Y., Nakamura, N., Tsuji, D., Itoh, K., & Kurosaka, A. (2013). *Genetic Diseases Associated with Protein Glycosylation Disorders in Mammals and oligosaccharides and can be categorized into several subclasses, ac y attached to the amino acid ( Fig . 1 ). Among them , O -GalNAc and O -Xyl n mucins and addition , novel .*
- Nikitovic, D., Katonis, P., Tsatsakis, A., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2008). Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life*, *60*(12), 818–823. <https://doi.org/10.1002/iub.131>
- Nikitovic, D., Papoutsidakis, A., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2014). Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biology*, *35*, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.09.003>
- Nowell, S. A., Ahn, J., Rae, J. M., Scheys, J. O., Trovato, A., Sweeney, C., ... Ambrosone, C. B. (2005). Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, *91*(3), 249–258. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-7751-x>
- Oetke, C., Auvinen, E., Pawlita, M., & Alonso, A. (2000). Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Archives of Virology*, *145*(10), 2183–2191. <https://doi.org/10.1007/s007050070048>
- Oguri, T., Takahashi, T., Miyazaki, M., Isobe, T., Kohno, N., Mackenzie, P. I., & Fujiwara, Y. (2004). UGT1A10 is responsible for SN-38 glucuronidation and its expression in human lung cancers. *Anticancer Research*, *24*(5 A), 2893–2896.
- Ohmori, K., Kanda, K., Mitsuoka, C., Kanamori, A., Kurata-Miura, K., Sasaki, K., ... Kannagi, R. (2000). P- and E-selectins recognize sialyl 6-sulfo Lewis X, the recently identified L-selectin ligand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *278*(1), 90–96. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3768>
- Pâquet, S., Fazli, L., Grosse, L., Verreault, M., Tétu, B., Rennie, P. S., ... Barbier, O. (2012). Differential expression of the androgen-conjugating UGT2B15 and UGT2B17 enzymes in prostate tumor cells during cancer progression. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(3), 428–432. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2064>
- Park, J., Chen, L. A. N., Shade, K., Lazarus, P., Seigne, J., Patterson, S., ... Pow-sang, J. (2004). *ASP85TYR POLYMORPHISM IN THE UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE ( UGT ) 2B15 GENE AND THE RISK OF PROSTATE CANCER.* *171*(June), 2484–2488. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000117748.44313.43>
- Park, J. J., Yi, J. Y., Jin, Y. B., Lee, Y. J., Lee, J. S., Lee, Y. S., ... Lee, M. (2012). Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, *83*(7), 849–857. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.007>
- Park, K. J., & Soslow, R. A. (2009). Current concepts in cervical pathology. *Archives*

- of Pathology and Laboratory Medicine*, 133(5), 729–738. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.5.729>
- Patwardhan, Gauri A. and Liu, Y.-Y. (2011). Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *NIH Public Access*, 50(1), 104–114. <https://doi.org/10.1021/nl061786n>. Core-Shell
- Pedroza-Saavedra, A., Lam, E. W. F., Esquivel-Guadarrama, F., & Gutierrez-Xicotencatl, L. (2010). The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27Kip1. *Virology*, 400(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.01.009>
- Peracaula, R., Tabarés, G., López-Ferrer, A., Brossmer, R., De Bolós, C., & De Llorens, R. (2005). Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells. *Glycoconjugate Journal*, 22(3), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s10719-005-0734-2>
- Pérez-Garay, M., Arteta, B., Pagés, L., de Llorens, R., de Bolós, C., Vidal-Vanaclocha, F., & Peracaula, R. (2010). A2,3-Sialyltransferase St3Gal Iii Modulates Pancreatic Cancer Cell Motility and Adhesion in Vitro and Enhances Its Metastatic Potential in Vivo. *PLoS ONE*, 5(9), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012524>
- Petretti, T., Kemmner, W., Schulze, B., & Schlag, P. M. (2000a). *Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases*. 359–366.
- Petretti, T., Kemmner, W., Schulze, B., & Schlag, P. M. (2000b). Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. *Gut*, 46(3), 359–366. <https://doi.org/10.1136/gut.46.3.359>
- Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>
- Potapenko, I. O., Haakensen, V. D., Lüders, T., Helland, Å., Bukholm, I., Sørli, T., ... Børresen-Dale, A. L. (2010). Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology*, 4(2), 98–118. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.12.001>
- Powlesland, A. S., Hitchen, P. G., Parry, S., Graham, S. A., Barrio, M. M., Elola, M. T., ... Taylor, M. E. (2009). Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology*, 19(8), 899–909. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp065>
- Pratt, M. R., & Bertozzi, C. R. (2004). Syntheses of 6-sulfo sialyl lewis X glycans corresponding to the L-selectin ligand “sulfoadhesin.” *Organic Letters*, 6(14), 2345–2348. <https://doi.org/10.1021/ol0493195>
- Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., & David, L. (2010). Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology*, 63(4), 322–329. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.071035>
- Roa-De la Cruz, L., Martínez-Morales, P., Morán-Cruz, I., Milflores-Flores, L., Rosas-Murrieta, N., González-Ramírez, C., ... Vallejo-Ruiz, V. (2018). Expression analysis of ST3GAL4 transcripts in cervical cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 18(1), 617–621. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8938>

- Rodrigues, J. G., Balmaña, M., Macedo, J. A., Poças, J., Fernandes, Â., M, J. C., ... Gomes, J. (2018). *Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis*. (March). <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.007>
- Rong, C., Feng, Y., & Ye, Z. (2017). Notch is a critical regulator in cervical cancer by regulating numb splicing. *Oncology Letters*, 13(4), 2465–2470. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5683>
- Rowland, A., Miners, J. O., & Mackenzie, P. I. (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(6), 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019>
- Ryu, W.-S. (2017). Papillomaviruses. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, 97–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00007-2>
- Saavedra, K. P., Brebi, P. M., & Roa, J. C. S. (2012). Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. *Clinical Epigenetics*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-13>
- Šarenac, T., & Mikov, M. (2019). Cervical cancer, different treatments and importance of bile acids as therapeutic agents in this disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10(JUN), 1–29. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00484>
- Schultz Matthew J, Holdbrooks Andrew T, Chakraborty Asmi, Grizzle William E, L. C. N., J, B. D., Conner Michael G, Arend Rebecca C, Yoon Karina J, Klug Christopher A, Bullard Daniel C, K. R. A., Oliver Patsy G, O. A. K., K, Y. B., & L, B. S. (2016). *HHS Public Access*. 76(13), 3978–3988. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2834>.The
- Seales, E. C., Jurado, G. A., Brunson, B. A., Wakefield, J. K., Frost, A. R., & Bellis, S. L. (2005). Hypersialylation of ?? 1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Research*, 65(11), 4645–4652. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3117>
- Seko, A., Kataoka, F., Aoki, D., Sakamoto, M., Nakamura, T., Hatae, M., ... Yamashita, K. (2009). N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 as a tumor marker for uterine cervical and corpus cancer. *Glycoconjugate Journal*, 26(8), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9227-4>
- Seomun, Y., & Joo, C. K. (2008). Lumican induces human corneal epithelial cell migration and integrin expression via ERK 1/2 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.014>
- Serrano-Berrones, M. A., López Velázquez, J. L., & Serrano Berrones, J. R. (2012). Expresión de ácidos siálicos en el cáncer cervicouterino. Estudio de una población del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos. *Rev Esp Méd Quir*, 17(2), 115–118.
- Sifaki, M., Assouti, M., Nikitovic, D., Krasagakis, K., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2006). Lumican, a small leucine-rich proteoglycan substituted with keratan sulfate chains is expressed and secreted by human melanoma cells and not normal melanocytes. *IUBMB Life*, 58(10), 606–610. <https://doi.org/10.1080/15216540600951605>
- Solórzano, C., Mayoral, M. Á., Carlos, M. de los A., Berumen, J., Guevara, J.,

- Chávez, F. R., ... Zenteno, E. (2012). Overexpression of glycosylated proteins in cervical cancer recognized by the *Machaerocereus eruca* agglutinin. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(3), 398–406. <https://doi.org/10.5603/FHC.2012.0054>
- Soonthornthum, T., Arias-pulido, H., Joste, N., Lomo, L., Muller, C., Rutledge, T., & Verschraegen, C. (2011). Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. *Annals of Oncology*, 22(10), 2166–2178. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq723>
- Starlard-davenport, A., Lyn-cook, B., & Radominska-pandya, A. (2008). Identification of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 in non-malignant and malignant human breast tissues. 3, 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.01.019>
- Sud, N., Sharma, R., Ray, R., Chattopadhyay, T., & Ralhan, R. (2004). Differential expression of beta mannosidase in human esophageal cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 112(5), 905–907. <https://doi.org/10.1002/ijc.20469>
- Sun, L., Liu, M., Sun, G.-C., Yang, X., Qian, Q., Feng, S., ... Coy, D. H. (2016). Notch Signaling Activation in Cervical Cancer Cells Induces Cell Growth Arrest with the Involvement of the Nuclear Receptor NR4A2. *Journal of Cancer*, 7(11), 1388–1395. <https://doi.org/10.7150/jca.15274>
- Suprynowicz, F. A., Disbrow, G. L., Krawczyk, E., Simic, V., Lantzky, K., & Schlegel, R. (2008). HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene*, 27(8), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210725>
- Surviladze, Z., Sterkand, R. T., & Ozbun, M. A. (2015). Interaction of human papillomavirus type 16 particles with heparan sulfate and syndecan-1 molecules in the keratinocyte extracellular matrix plays an active role in infection. *Journal of General Virology*, 96(8), 2232–2241. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000147>
- Swindall, A. F., Londoño-Joshi, A., Schultz, M., Fineberg, N., Buchsbaum, D., & Bellis, S. (2013). NIH Public Access. *Cancer Research*, 73(7), 2368–2378. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3424.ST6Gal-I>
- Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., & Kannagi, R. (1993). Contribution of carbohydrate antigens sialyl lewis A and sialyl lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res.*, 53(2), 354–361. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/53/2/354.short>
- Tátrai, P., Egedi, K., Somorácz, Á., Van Kuppevelt, T. H., Ten Dam, G., Lyon, M., ... Kovalszky, I. (2010). Quantitative and qualitative alterations of heparan sulfate in fibrogenic liver diseases and hepatocellular cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(5), 429–441. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955161>
- Tomaić, V. (2016). Functional roles of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced malignancies at diverse anatomical sites. *Cancers*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/cancers8100095>
- Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G., & Alonso, A. (2000). Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *European Journal of Cell Biology*, 79(6), 407–412. <https://doi.org/10.1007/s004410000231>

- Torres-Poveda, K., Piña-Sánchez, P., Vallejo-Ruiz, V., Lizano, M., Cruz-Valdez, A., Juárez-Sánchez, P., ... Manzo-Merino, J. (2020). Molecular Markers for the Diagnosis of High-Risk Human Papillomavirus Infection and Triage of Human Papillomavirus-Positive Women. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, 72(4), 198–212. <https://doi.org/10.24875/RIC.20000058>
- Tukey, R. H., & Strassburg, C. P. (2000). *H UMAN UDP-G LUCURONOSYLTRANSFERASES: Metabolism , Expression , and Disease*. 581–616.
- Ugorski, M., & Laskowska, A. (2002). Sialyl Lewis a: A tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochimica Polonica*, 49(2), 303–311.
- Vázquez-martín Cristina, Gil-martín Emilio, Fernández-briera, A. (2005). *Elevation of ST6Gal I Activity in Human Colorectal Cancer*. 436–444. <https://doi.org/10.1159/000089999>
- Velázquez-Márquez, N., Santos-López, G., Jiménez-Aranda, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2012). Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions. *Journal of Biosciences*, 37(6), 999–1004. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9261-z>
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, S. R. (2001). Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. *Journal of Virology*, 75(9), 4467–4472. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4467>
- Venuti, A., Paolini, F., Nasir, L., Corteggio, A., Roperto, S., Campo, M. S., & Borzacchiello, G. (2011). Papillomavirus E5: The smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer*, 10(1), 140. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-140>
- Vidal, A. C., Tucker, C., Schildkraut, J. M., Richardson, R. M., McPhail, M., Freedland, S. J., ... Grant, D. J. (2013). Novel associations of UDP-glucuronosyltransferase 2B gene variants with prostate cancer risk in a multiethnic study. *BMC Cancer*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-556>
- Villacis, R. A. R., Miranda, P. M., Gomy, I., Santos, E. M. M., Carraro, D. M., Achatz, M. I., ... Rogatto, S. R. (2016). Contribution of rare germline copy number variations and common susceptibility loci in Lynch syndrome patients negative for mutations in the mismatch repair genes. *International Journal of Cancer Contribution*, 138, 1928–1935. <https://doi.org/10.1002/ijc.29948>
- Wang, P. (2005). Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. *Journal of Cancer Molecules*, 1, 73–81. Retrieved from [http://www.mupnet.com/JOCM 1\(2\) 73.htm](http://www.mupnet.com/JOCM 1(2) 73.htm)
- Wang, P. H., Feng Li, Y., Juang, C. M., Lee, Y. R., Chao, H. T., Tsai, Y. C., & Yuan, C. C. (2001). Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecologic Oncology*, 83(1), 121–127. <https://doi.org/10.1006/gyno.2001.6358>
- Wang, P. H., Li, Y. F., Juang, C. M., Lee, Y. R., Chao, H. T., Ng, H. T., ... Yuan, C. C. (2002). Expression of sialyltransferase family members in cervix squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Gynecologic Oncology*, 86(1), 45–52. <https://doi.org/10.1006/gyno.2002.6714>
- Wang, P., Lee, W., Juang, C., Yang, Y., & Lo, W. (2005). *Altered mRNA expressions*

- of sialyltransferases in ovarian cancers. 99, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.07.016>
- Wang, X., Tang, S., Le, S. Y., Lu, R., Rader, J. S., Meyers, C., & Zheng, Z. M. (2008). Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS ONE*, 3(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002557>
- Warnecke-eberz, U., Metzger, R., Hölscher, A. H., & Drebber, U. (2015). Diagnostic marker signature for esophageal cancer from transcriptome analysis. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4400-4>
- Wijayakumara, D. D., Hu, D. G., Meech, R., McKinnon, R. A., & Mackenzie, P. I. (2015). Regulation of Human UGT2B15 and UGT2B17 by miR-376c in Prostate Cancer Cell Lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3), 417–425. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.226118>
- Woodman, C. B. J., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*, 7(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>
- Yoshida, S., Fukumoto, S., & Kawaguchi, H. (2001). *Ganglioside G D2 in Small Cell Lung Cancer Cell Lines: Enhancement of Cell Proliferation and Mediation of Apoptosis Ganglioside G D2 in Small Cell Lung Cancer Cell Lines: Enhancement of Cell*. 4244–4252.
- Yugawa, Takashi and Kiyono, T. (2009). Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Reviews in Medical Virology*, 19(2), 97–113. <https://doi.org/10.1002/rmv.605>
- Zhang, F., Zhang, Z., & Linhardt, R. J. (2010). Glycosaminoglycans. *Handbook of Glycomics*, 59–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373600-0.00003-2>
- Zhang, S., Lu, J., Xu, Z., Zou, X., Sun, X., Xu, Y., ... Zhang, Y. (2017). Differential expression of ST6GAL1 in the tumor progression of colorectal cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(4), 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.167>
- Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker. (2006). *POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION*. 2286–2302.
- Zhuo, D., Li, X., & Guan, F. (2018). Biological roles of aberrantly expressed glycosphingolipids and related enzymes in human cancer development and progression. *Frontiers in Physiology*, 9(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00466>
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 342–350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>
- zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>

## **XII. ANEXO**

## Glycogene expression profiles from a HaCaT cell line stably transfected with HPV16 E5 oncogene

DENISSE CISNEROS-RAMÍREZ<sup>1,2</sup>, YGNACIO MARTÍNEZ-LAGUNA<sup>3</sup>, PATRICIA MARTÍNEZ-MORALES<sup>4</sup>,  
ADRIANA AGUILAR-LEMARROY<sup>5</sup>, LUIS FELIPE JAVE-SUÁREZ<sup>5</sup>, GERARDO SANTOS-LÓPEZ<sup>1</sup>,  
JULIO REYES-LEYVA<sup>1</sup> and VERÓNICA VALLEJO-RUIZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology, East Biomedical Research Center, Mexican Institute of Social Security, Metepec 74360;

<sup>2</sup>Graduate Program in Microbiological Sciences, Institute of Sciences; <sup>3</sup>Research Center of Microbiological Sciences, Institute of Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla, Puebla 72592;

<sup>4</sup>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Metepec 74360;

<sup>5</sup>West Biomedical Research Center, Mexican Institute of Social Security, Guadalajara 44290, Mexico

Received July 15, 2020; Accepted September 29, 2020

DOI: 10.3892/mmr.2020.11630

**Abstract.** The altered expression of glycan antigens has been reported during cervix transformation, demonstrating increased mRNA levels of certain glycogenes. Human papillomavirus (HPV) is the aetiological agent of cervical cancer. High risk HPV E5 is considered an oncogene and has been implicated in cell transformation. E6 and E7 HPV oncoproteins modify the expression of certain glycogenes. The role of the E5 HPV protein in glycogene expression changes has not yet been reported. The aim of the present study was to determine the effects of HPV16 E5 oncoprotein on glycogene expression. For these, a microarray assay was performed using the HaCaT cell line and altered glycogenes were identified. The mRNA levels of certain glycogenes were determined via reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). Using *in silico* analysis, the present study identified that glycosylation pathways were altered by E5. Microarray analysis revealed alterations in certain glycogenes, including the upregulation of *ST6GAL1*, *ST3GAL3*, *CHST2* and *MANBA*, and the down-regulation of *UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* and *UGT1A10*. Increased mRNA levels were confirmed via RT-qPCR for sialyltransferases genes. Additionally, *in silico* analysis was performed to identify glycosylation networks altered in the presence of the E5 oncoprotein. The analysis revealed that E5 could modify glycan sialylation, the *N*-glycosylation pathway, keratan sulfate and glycosaminoglycan synthesis. To the best

of our knowledge, the current study was the first to determine the role of the HPV16 E5 oncoprotein in glycogene expression changes. The results indicated that increased sialyltransferase mRNA levels reported in pre-malignant and malignant cervical tissues could be the result of E5 oncoprotein expression. The results provide a possible role of HPV infection on glycosylation changes reported during cervix transformation.

### Introduction

Human papillomavirus (HPV) is the aetiological agent of cervical cancer (CC) (1). HPV16 is the most prevalent genotype and is responsible for greater than 50% of CC cases worldwide (2,3). The oncogenic potential of HPV is attributed to the following three viral proteins: E5, E6 and E7. E6 and E7, the best characterized viral proteins, promote cell transformation by several mechanisms; for example, they destabilize and induce the degradation of the tumour suppressor proteins p53 and pRB, respectively (4). Meanwhile, E5, a transmembrane protein present in the Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and nuclear envelope (5), has several roles in cell transformation. For example, E5 can force cells through the cell cycle and promote the evasion of the immune response (6). Additionally, E5 can modify gene expression; HPV16 E5 induces the expression of prostaglandin E2 receptor by stimulating the binding of the cAMP-response element binding protein (CREB) to its promoter, which activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) and increases *C-FOS* and *C-JUN* transcription (7,8). Moreover, E5 increases the expression of genes related to cell adhesion, cell motility, and mitogenic signaling, suggesting that the protein plays an important role in the events associated with cellular transformation (9).

Altered glycosylation is another characteristic of cancer cells (10), and it can be caused by the altered expression of different glycosyltransferases that can lead to changes in glycan structures. Increased mRNA levels of some sialyltransferases have been reported in different cancer types (11). Specifically, CC and premalignant lesions display increased mRNA levels of

---

**Correspondence to:** Dr Verónica Vallejo-Ruiz, Laboratory of Molecular Biology, East Biomedical Research Center, Mexican Institute of Social Security, Km 4.5 Carretera Federal, s/n Atlixco-Metepec, Metepec 74360, Mexico  
E-mail: veronica\_vallejo@yahoo.com

**Key words:** human papillomavirus 16, E5 oncoprotein, human papillomavirus, glycogene, glycosylation, microarray expression



the sialyltransferases *ST3GAL3* and *ST6GAL1* (12,13), which are related to increased expression of sialic acid (14,15) and of sialylated antigens such as sTn and sLe(x) (16-18). Studies in the HeLa cell line show that E6/E7 HPV18 oncogene knockdown modified glycogene expression, some of which participate in the synthesis of *O*-glycans such as sTn (19). These results suggest that viral infection could modify glycogene expression and the glycosylation of the cervical epithelium.

The objective of this work was to identify glycogenes that displayed modified expression patterns in the presence of the HPV16 E5 oncoprotein. The results showed that the HPV16 E5 oncoprotein could increase the expression of the sialyltransferases *ST3GAL3* and *ST6GAL1*, which have been reported to be altered in premalignant and malignant cervical tissues. The network interaction constructed with the altered glycogenes in the presence of E5 showed that not only the glycan sialylation but also some glycan structures, such keratan sulphate and glycosaminoglycans, could also be altered.

### Materials and methods

**Cell culture.** The HaCaT cell line from human skin keratinocytes stably transfected with the HPV16 E5 oncogene (HaCaT-E5) (20) or the vector pMSG (HaCaT-pMSG) (kindly donated by Dr. A. Alonso from German Cancer Research Centre, University of Heidelberg, Germany) was cultured and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing Earle's salts and L-glutamine (DMEM; Sigma-Aldrich; Merck KGaA) and supplemented with 10% foetal bovine serum (Biowest), 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich; Merck KGaA). The CasKi cell line from a squamous CC (kindly donated by Dr A. Aguilar-Lemarroy from Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS) was cultured and maintained in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) containing L-glutamine and supplemented with 10% foetal bovine serum, and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich; Merck KGaA). Cells were maintained at 37°C with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium was replaced every two days. Sub-confluent cells were harvested using a mixture of trypsin (0.025%) and EDTA (0.02%; Sigma-Aldrich; Merck KGaA) and were washed with phosphate-buffered saline.

**Microarray expression assay.** The microarray expression assay was performed at the Cellular Physiology Institute of UNAM. The microarray contained 10,000 gene-specific oligonucleotide probes representing the best-annotated genes from human. For the probe preparation, total RNA from HaCaT/E5 and HaCaT/pGSM monocultures was obtained with the ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega Corporation) and 10 µg of each RNA was used for cDNA synthesis incorporating dUTP-Alexa555 or dUTP-Alexa647 and employing the First-Strand cDNA labelling kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Acquisition and quantification of the array images were performed in GenePix 4100A with its accompanying software GenePix from Molecular Devices. Microarray data analysis was performed with the free software GenArise developed at the Computing Unit of Cellular Physiology Institute of UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). The software identifies differentially

expressed genes by calculating an intensity-dependent z-score. The elements with a z-score >2 standard deviations would be the significantly differentially expressed genes. The analysed data were submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus (access no. GSE118776).

**Expression analysis of E5 and glycogenes.** Total RNA from CasKi, HaCaT-E5 and HaCaT-pMSG monocultures was obtained with the NucleoSpin II RNA kit (Macherey-Nagel).

To determine the amplification efficiencies of E5, *ST3GAL3* and *ST6GAL1*, standard curves were performed with the following RNA concentrations: 10, 1, 0.1, 0.01, and 0.001 ng/µl. *HPRT* was used as an endogenous gene. Based on these curves we determined the better concentration to perform the relative quantification assays, considering that these genes have different expression levels. cDNA was synthesized using random primers and the RevertAid First-Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.). qPCR reactions were performed in a final volume of 10 µl with the following components: 5 µl of 2X Maxima SYBR-Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 0.5 µl of 10 mM forward and reverse primers (Table I). The reactions were performed with a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), and the cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, an annealing temperature for 30 sec, and 70°C for 30 sec. For HPV16 E5, the Tms for HPV16 E5, *ST3GAL3* and *ST6GAL1* were 55°C, 57°C and 60°C, respectively.

Relative quantification was performed using the comparative CT method as follows: 2<sup>-ΔΔCT</sup>. The qPCR reaction was performed on a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The final 10 µl reaction volume included 1 µl of cDNA template (E5 VPH16-0.5 ng/µl; *ST3GAL3*-10 ng/µl, or *ST6GAL1*-3 ng/µl), 5 µl of 2X Maxima SYBR-Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 0.5 µl of forward and reverse primers (0.5 µM final concentration) and 3 µl of RNase free water. qPCR was performed under with following conditions: 95°C 10 min, followed 40 cycles of 95°C for 30 sec, the annealing temperature for 30 sec (60°C for *ST6GAL1* and 57°C for *ST3GAL3*) and 70°C for 30 sec. The gene transcript levels were analysed and normalised to *HPRT* expression.

**Identification of glycogenes.** For the analysis of the glycogenes in the microarray displaying altered expression, we considered 336 glycogenes reported to date using the GlycoGene database (<http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/ggdb/>), the Consortium for Functional Glycomics-CAZy database (<http://www.cazy.org/CAZY/>) and the published reports on glycogenes not included in the databases, including *DPY19L1* (21) and *MANBAL* (22). We identified glycogenes displaying altered expression in the microarray as those with a z-score >2.

**Protein-protein interaction network.** The downregulated or upregulated set of glycogenes in the HaCaT-E5 cells were submitted separately, to the STRING database (<http://string-db.org/>). The following parameter were applied for the analysis: text mining, experiments, databases, co-expression,

Table I. Sequences of the oligonucleotides used in the reverse transcription-quantitative PCR assays.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Length (bp) Product
HPRT	CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC	150
HPV16 E5	CGCTGCTTTTGTCTGTGTCT	GCGTGCATGTGTATGTATTAATAA	146
ST3GAL3	CATGTGAAGATGGGACTCTTGG	CCTCCCACTGGAGTAAGTGTAG	118
ST6GAL1	TATCGTAAGCTGCACCCCAATC	TTAGCAGTGAATGGTCCGGAAG	372

HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HPV, human papilloma virus; ST3GAL3, ST3  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase 3; ST6GAL1,  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1; bp, base pair.

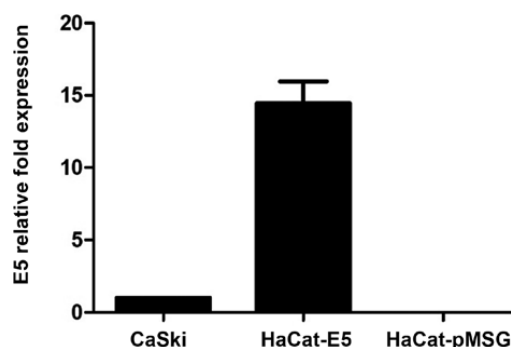


Figure 1. Human papillomavirus-16 E5 mRNA expression. E5 mRNA expression was 14.4 times higher in HaCaT-E5 cells compared with CasKi cells. HaCaT-pMSG was used as a negative control. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=3).

neighbourhood, gene fusion and co-occurrence as interaction sources, no more than 5 interactors, minimum interaction score of 0.9 as confidence level, and a protein-protein enrichment P-value at least  $\leq 0.05$  and FDR at least  $< 0.05$ .

**Statistical analysis.** Statistical analysis of the qPCR results was performed using the GraphPad program. The Student's t-test was performed. A P-value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

**E5 oncogene expression by RT-qPCR.** RT-qPCR was performed to quantify E5 mRNA expression levels from HaCaT-E5 cells, as a positive control it was used mRNA of CasKi cells (a cell line that contains HPV16-integrated genomes and expresses E5) and as a negative control was used mRNA of HaCaT-pMSG. Fig. 1 shows the relative expression of E5, showing that E5 expression is greater in HaCaT-E5 than in CasKi cells.

**Glycogene expression altered by the E5 oncoprotein.** From a total of 336 glycogenes reported to date, we searched those altered in the HaCaT-E5 microarray with respect to HaCaT-pMSG. We identified four upregulated glycogenes, including *ST3GAL3*, *CHST2* and *MANBA* with a z-score  $> 2$  and *ST6GAL1* with a z-score of 1.8. The latter was included

because of its importance in CC. We also identified four down-regulated glycogenes, including *GALNT11*, *NDST2*, *UGT2B15* and *UGT1A10* with a z-score  $< 2$ . The microarray data analysed herein are included in the NCBI Gene Expression Omnibus Database (accession no. GSE118776) and in the article text.

**E5 increased the expression of the sialyltransferases *ST3GAL3* and *ST6GAL1*.** Because the microarray results showed that the presence of E5 can lead to an increase in sialyltransferases expression, we evaluated the mRNA levels of *ST3GAL3* and *ST6GAL1* by RT-qPCR in HaCaT-E5 and HaCaT-pMSG cells. *ST3GAL3* and *ST6GAL1* mRNA levels were increased in HaCaT-E5 cells (Fig. 2).

We next analysed literature data for E5-modified glycogenes that also have been previously reported as altered in cancerous tissues [Tables II and III; (11,12,22-45)]. First, we analysed the upregulated genes. As previously described, *ST3GAL3* and *ST6GAL1* were increased in CC and premalignant lesions; in contrast, *CHST2* and *MANBA* have not been reported in CC, but display altered expression in other cancer types. The results showed that the four glycogenes are aberrantly expressed in several types of cancer and have clinical relevance (Table II).

We next compared the downregulated glycogenes in HaCaT-E5 cells with those reported in cancerous tissues. The four glycogenes have been reported in cancer. *GALNT11* is overexpressed in chronic lymphocytic leukaemia (CLL), and *UGT2B15* is downregulated in prostate cancer, but none of the downregulated glycogenes have been previously reported to be altered in CC (Table III).

**E5 and glycosylation pathways.** To identify possible functional associations among the enzymes identified as altered glycogenes under E5 regulation, we analysed the data with STRING software to generate predicted protein-protein interactions with a higher confidence level (0.9). For the analysis, we considered the altered glycogenes and five additional proteins with the goal of identifying possible glycosylation pathways.

For the upregulated glycogenes (*ST3GAL3*, *CHST2*, *MANBA* and *ST6GAL1*), the results displayed an interacting network with eight proteins where *MANBA* did not interact with any protein but participates in N-glycosylation (Fig. 3A). Specifically, we identified the keratan sulfate biosynthesis pathway, which includes *CHST2* and *ST3GAL3* (Fig. 3B); the N-glycosylation pathway, in which both the sialyltransferase genes are involved in the sialylation of N-glycans (Fig. 3C); and

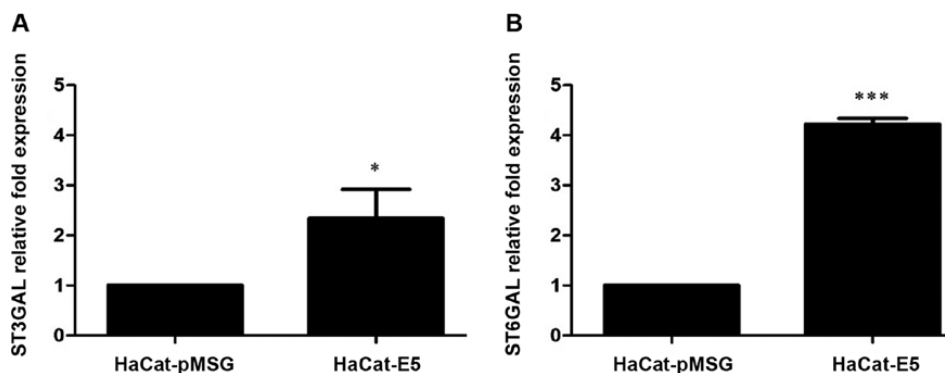


Figure 2. Expression levels of sialyltransferases genes. (A) mRNA levels of *ST3GAL3* in HaCaT-pMSG and HaCaT-E5 cells determined by RT-qPCR. (B) mRNA levels of *ST6GAL1* in HaCaT-pMSG and HaCaT-E5 cells determined by RT-qPCR. The mRNA levels of sialyltransferases genes were increased in presence of E5. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate assays. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ . RT-qPCR, reverse transcription-quantitative PCR.

the glycosphingolipid biosynthesis pathway, where *ST3GAL3* participates with fucosyltransferases and galactosyltransferases (Fig. 3D).

For the downregulated glycogenes (*UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* and *UGT1A10*), the interaction analysis showed two different networks, among which *GALNT11* was excluded from the first network and *NDST2* establishes a separate network (Fig. 4A). The analysis showed that the latter is involved in glycosaminoglycan biosynthesis (Fig. 4B).

## Discussion

Aberrant glycosylation is a characteristic of tumour cells. Changes in glycan structures in cancer have been related with altered glycogene expression (46). Increased sialylation is one of the most frequent alterations in cancer (47). Increased activity of sialyltransferases, enzymes that transfer sialic acid to glycoconjugates, has been reported during tumour transformation (11,48). Increased  $\alpha 2,3$  and  $\alpha 2,6$  sialic acid levels have been reported in premalignant lesions from the cervical epithelium (14). Increased expression of the sialylated antigens sLe(a) and sLe(x) have also been reported in CC and premalignant lesions (17,18). These findings could be the result of enhanced *ST3GAL3* and *ST6GAL1* (sialyltransferase genes) mRNA levels, which have been previously reported during cervical transformation (12,13). HPV is the aetiological agent of CC, and the HPV genome encodes three oncoproteins, E5, E6 and E7 (4); however, their roles in altering glycogene expression have been poorly investigated. Our research group is interested in the role of HPV infection and its relationship with glycogene expression changes in the cervical epithelium. Our group recently reported that the oncoproteins E6 and E7 from HPV18 modify the expression of some glycogenes, some of which participate in the glycosylation of the Notch receptor and *O*-glycosylation type mucin (19). However, similar reports focused on the E5 oncoprotein do not exist. E5 is a protein expressed during the early stages of viral infection, and this protein has different targets in the cell that promote cellular transformation (6,49).

With the aim of determining whether E5 modifies the expression of some glycogenes, we performed an expression

microarray on the HaCaT cell line stably transfected with the HPV16 E5 oncoprotein. We identified four upregulated glycogenes (*CHST2*, *MANBA*, *ST3GAL3* and *ST6GAL1*) and four downregulated glycogenes (*UGT2B15*, *GALNT11*, *NDST2* and *UGT1A10*). All these genes have been reported to be altered in cancer either at the transcript or protein level (Tables II and III).

Increased *CHST2* mRNA levels have been reported in osteosarcoma and breast and oesophageal cancer (33-35), while increased protein levels have been reported in ovarian cancer and CC (36). With regards to the glycogene *MANBA*, increased mRNA levels have only been reported in oesophageal cancer (37). Interestingly, of the four upregulated glycogenes, two correspond to the sialyltransferases genes *ST3GAL3* and *ST6GAL1*. *ST3GAL3* expression has been reported as altered in different cancer types, such as gastric, bile, colon, kidney, lung, breast, and ovarian cancers and glioblastoma (11,23-27). Increased *ST6GAL1* mRNA and protein expression has been reported in gastric and biliary cancers (24,27), colon and colorectal cancers (25,29,31), and ovarian and pancreatic cancers (11,30). Here, we showed that the mRNA levels of the *ST6GAL1* and *ST3GAL3* genes can be increased by the presence of E5; interestingly, both mRNA levels are increased in premalignant and malignant tissues in the cervical epithelium (12,13). However, whether these phenotypes could be a consequence of HPV infection remains unclear. Additionally, the upregulation of these genes agrees with the increased levels of sialic acid reported for CC and with the increased levels of  $\alpha 2,3$  and  $\alpha 2,6$  sialic acid in premalignant lesions in the cervix (14). These results suggest that the sialyltransferase expression changes that occur in the early stages of cervical cell transformation could be related to HPV infection and due to E5, but not E6 or E7, activity (19). Nevertheless, this hypothesis requires more investigation. With respect to E5 and sialylation, a previous study found no important changes in the sialylation status of keratinocytes in the presence of HPV16 E5 (50), however, in this study the authors analysed the expression of different monosaccharides and disaccharides, using a panel of seven lectins, but they did not perform glycogene expression analysis. Additionally, as they use an inducible vector, they

Table II. Upregulated glycogenes in HaCaT-E5 cells.

Gene/enzyme	Enzyme function	Alteration of mRNA/enzyme in cancer		Clinical relevance
		mRNA	Enzyme	
<i>ST3GAL3</i> / <i>ST3</i> $\beta$ -galactoside $\alpha$ 2,3-sialyltransferase 3	Transfers sialic acid from CMP-sialic acid to the structure Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3/4GlcNAc- and is involved in the synthesis of sialyl Lewis(x) (NeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 (Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4) GlcNAc-).	Upregulation in cervical cancer (12), breast cancer (23), extrahepatic bile duct carcinoma (24), colorectal carcinoma (25), glioblastoma, renal clear cell carcinoma and lung squamous carcinoma (26). Downregulation in breast invasive carcinoma, colon adenocarcinoma (26) and ovarian cancers (11).	High levels of enzyme activity in the tumor tissue correlated with secondary local tumor recurrence in gastric cancer (27).	In cervical carcinoma the overexpression of mRNA is associated with lymph node metastases (12). In breast cancer, high expression of mRNA is associated with poor prognosis (23).
<i>ST6GAL1</i> / <i>ST6</i> $\beta$ -galactoside $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1	Transfers sialic acid from CMP-sialic acid to the Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc structure on glycoproteins.	Upregulation in squamous cell carcinoma (12), breast cancer (23), extrahepatic bile duct carcinoma (24), ovarian cancer (11), and colorectal carcinoma and non-metastatic colorectal tumors (28).	Increased enzyme expression in colon tumors (28), ovarian and pancreatic carcinomas (29,30). Increased enzyme activity in gastric and colorectal cancer (27,31).	In breast cancer, high expression of mRNA is associated with poor prognosis (23). In pancreatic ductal adenocarcinoma promotes chemoresistance to gemcitabine (32).
<i>CHST2</i> /carbohydrate sulfotransferase 2	Sulfotransferase that utilizes 3'-phospho-5'-adenylyl sulfate as donor to catalyze the transfer of sulfate to position 6 of non-reducing GlcNAc within keratan-like structures on N-glycans and mucin-associated glycans.	Upregulation in breast cancer (33), osteosarcoma (34) and esophageal cancer (35).	Increased enzyme expression in metastatic osteosarcoma (34). Increased enzyme in uterine cervical and corpus cancer (36).	In osteosarcoma, weak protein expression is associated with improved survival (34).
<i>MANBA</i> / $\beta$ -mannosidase	Exoglycosidase that cleaves the single $\beta$ -linked mannose residue from the non-reducing end of N-glycoproteins oligosaccharides.	Upregulation in dysplastic esophageal tissues and esophageal squamous cell carcinoma (37).	No reports	Candidate for molecular target for early detection of esophageal cancer (37).

*ST3GAL3*, *ST3*  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase 3; *ST6GAL1*,  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1; bp, base pair.

Table III. Downregulated glycogenes in HaCaT-E5 cells.

Gene/enzyme	Enzyme function	Alteration of mRNA/enzyme in cancer		Clinical relevance
		mRNA	Enzyme	
<i>UGT2B15</i> /UDP glucuronosyltransferase family 2 member B15	An enzyme of the glucuronidation pathway, involved in the metabolism and elimination of toxic compounds. Serves a role in the regulation of estrogens and androgens.	Upregulation in castration resistant prostate cancer (38). Upregulation in gastric cancer (39).	Upregulation of expression in gastric cancer (39). Low level of expression in aggressive prostate tumors and undetectable expression in prostate cancer with lymph node metastasis (40).	In gastric cancer, patients with higher UGT2B15 mRNA expression have poor prognosis (39).
<i>GALNT11</i> /polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11	Catalyzes the initiation of protein O-linked glycosylation and is involved in left/right asymmetry by mediating O-glycosylation of NOTCH1.	Upregulation in chronic lymphocytic leukemia (41).	No reports.	<i>GALNT11</i> expression is associated with prognosis of chronic lymphocytic leukemia (41).
<i>NDST2</i> /N-deacetylase and N-sulfotransferase 2	Enzyme with dual functions: Participates in processing glucosamine and heparin polymers, including N-deacetylation and N-sulfation.	Moderately upregulated in hepatocellular cancer (42). Decreased levels in II, III and IV stages of glioma (43).	No reports.	No reports.
<i>UGT1A10</i> /UDP glucuronosyltransferase family 1 member A10	An enzyme of the glucuronidation pathway that transforms small lipophilic molecules, such as steroids, bilirubin, hormones and drugs, into water-soluble, excretable metabolites.	Upregulated in stomach cancer (44). Downregulated in breast cancer (45).	Downregulated in breast cancer (45).	No reports.

ST3GAL3, ST3  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase 3; ST6GAL1,  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1; bp, base pair.

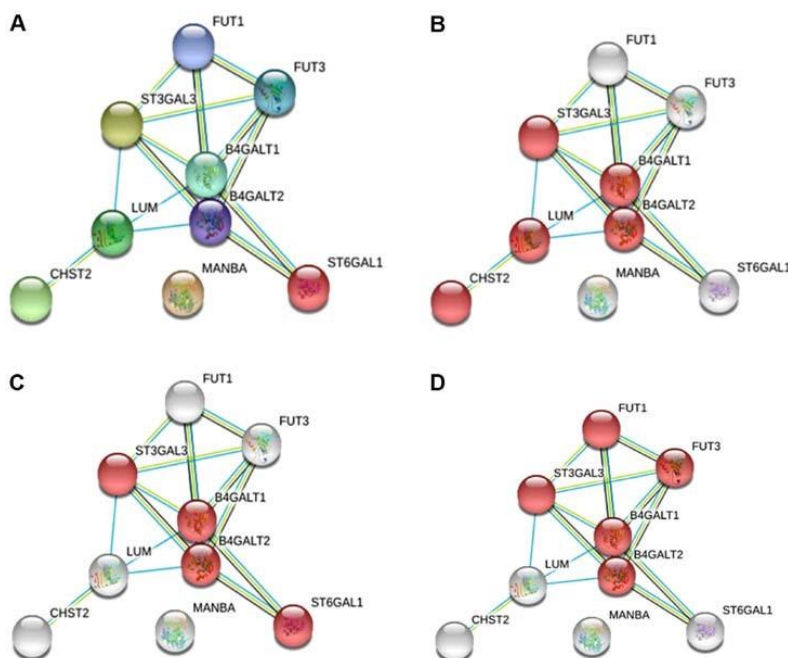


Figure 3. Protein-protein interaction network of the upregulated glycoenzymes. (A) Network of upregulated glycoenzymes with five additional proteins that interacted with the altered glycoenzymes. (B) The red network indicates proteins that participate in the keratan sulfate biosynthetic process. (C) The red network indicates the proteins that participate in *N*-glycosylation. (D) The red network indicates the proteins that participate in glycosphingolipid biosynthesis.

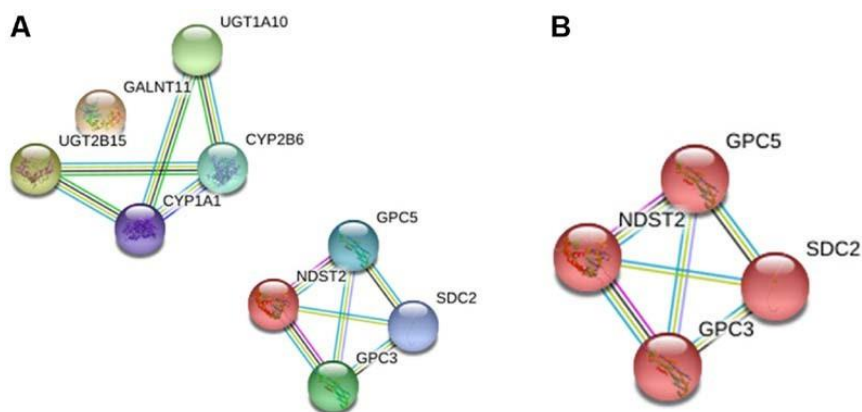


Figure 4. Protein-protein interaction network of the downregulated glycoenzymes. (A) Network of downregulated glycoenzymes including five additional proteins that interacted with the altered glycoenzymes. (B) The red network indicates proteins that participate in glycosaminoglycan biosynthesis.

incubated the transfected cells with dexamethasone to increase the expression of E5, so the glycosylation pattern could be influenced by the effect of this molecule, as has been reported in different studies where the dexamethasone increase the sialyltransferases expression (51,52).

Regarding the downregulated genes in the presence of HPV16 E5, *GALNT11* has been reported as diminished in breast cancer (33) and increased in chronic lymphocytic leukaemia, and it was proposed to be implicated in *O*-glycosylation changes in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells (41). *NDST2* has demonstrated increased mRNA levels in hepatocellular

cancer (42). It was also interesting to find expression changes in two *UGT* genes (*UGT2B15* and *UGT1A10*) that encode uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases as these enzymes play important roles in the biotransformation of drugs, xenobiotics, and toxic compounds (44). Expression changes in *UGT* genes could modify the response to some cancer drugs. *UGT2B15* has been reported as diminished in prostate cancer (40), and *UGT1A10* has been reported as downregulated in breast cancer (45) but upregulated in gastric cancer (44). These *UGT* genes have not been previously reported as altered in CC; thus, it could be interesting to analyse their expression status and

the response of patients to treatment when their expression is altered.

Additionally, we also identified possible glycosylation pathways altered in the presence of E5 by analysing protein-protein interactions. We identified keratan sulfate and glycosphingolipid synthesis as including the involvement of the glycoses *ST3GAL3*, *ST6GAL1* and *CHST2*. Keratan sulfate belongs to the family of glycosaminoglycans, which participates in the regulation of cellular functions in epithelial and mesenchymal tissues (53).

The glycoses *ST3GAL3* and *ST6GAL1* are involved in sialylation of glycosphingolipid. These glycolipids can be located in the cellular membrane, participate in cell-cell interactions and modulate transduction pathways, cell growth, apoptosis, cell proliferation, endocytosis, cell migration, senescence and embryogenesis (54,55). The aberrant expression of glycosphingolipids and the enzymes that participate in their biosynthesis has been reported in different cancer types (56). The expression of the ganglioside GM1 has been reported as being increased in ectocervix cells expressing VPH16 E5; gangliosides are expressed at high levels on tumour cells and inhibit cytotoxic T lymphocytes (56). Our results support these findings, demonstrating that E5 could be modifying ganglioside synthesis.

The glycoses present in the *N*-glycosylation pathway are *ST3GAL3* and *ST6GAL1*. Changes in sialic acid expression have been reported for different cancer types including CC, as was mentioned previously (11). Increased expression of sialylated antigens such as sLe(x) and sLe(a) has been reported in premalignant lesions and CC, and the enzyme ST3Gal III participates in the synthesis of both of these antigens (17,18,57). sLe(x) antigens can be modified by the enzyme sulfotransferase CHST2 to produce 6-sulfosialyl Lewis-x (6-sulfo sLex), which can be a ligand of L-, P- and E-selectin (58). Moreover, ST6Gal I catalyses the  $\alpha$ 2,6 sialylation of *N*-glycans, and its expression is increased in different types of cancer (59). ST6Gal I had been implicated in the hypersialylation of the cell membrane protein  $\beta$ 1 integrin in tumour cells, which leads to increased migration capacity (60). ST6Gal I also participates in the sialylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) (61), which showed increased expression due to HPV16 E5 (62).

For the downregulated genes, the network interactions implicated in a glycosylation pathway involved only one glycosene. Fig. 4 shows a network of four proteins implicated in glycosaminoglycan biosynthesis, but only one glycosene, *NDST2*, was present in this network. The upregulation of *NDST2* has been related to an increase in heparan sulfate (63).

For the glycoses downregulated in the presence of E5, there are no reports focused on CC; thus, it would be important to evaluate their expression and roles in cervical transformation.

The results of this study provide important information related to glycoses that modify their expression in the presence of the HPV-16 E5 protein. The expression microarray generated large amounts of information on the genes that were altered, but the results must be validated. The study presents some limitations, it is important to confirm that the expression of the gene is related with the expression level of its corresponding protein, additionally, the study was performed in a cell line, so the role of the HPV infection and the expression of the other viral proteins could be participating in the glycosylation changes, so the effect of E5 could be affected by other

factors. Therefore, the results must be confirmed with more *in vitro* experiments, followed by the evaluation of glycosene expression in different stages in cervical neoplasias positive for HPV16, as some of the altered glycosenes have not been previously reported in premalignant and malignant tissues. Also, it could be of interest to evaluate if the protein E5 from different viral genotypes, plays a different role in the glycosylation changes. Studying the effects of E5 of high and low risks HPV, will certainly provide relevant additional information of the effects of this viral infection.

The expression of the HPV16 E5 protein in HaCaT cells increased *ST3GAL3* and *ST6GAL1* mRNA levels, suggesting that the E5 protein could participate in the glycosylation changes found during cervical transformation in the cervical epithelium infected with HPV, especially those related to increased  $\alpha$ 2,3 and  $\alpha$ 2,6 sialylation, which have been reported as enhanced in premalignant lesions and CC. Additionally, E5 could participate in *UGT* gene expression changes implicated in treatment response. Changes in *UGT* gene expression have not been previously reported; thus, it would be interesting to analyse their levels in CC samples as well as to examine the correlation of these changes with responses to treatment.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Lorena Chávez González, Dr Simón Guzmán León, Dr José Luis Santillán Torres and Dr Jorge Ramírez for their technical assistance with microarray determinations. The authors would also like to thank Mr. Gerardo Coello, Mr. Gustavo Corral and Ms. Ana Patricia Gómez for their assistance with the genArise software. All the previously mentioned individuals are affiliated to the Cellular Physiology Institute of National Autonomous University of Mexico.

#### Funding

The current study was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant no. SALUD-2017-01-290068). JRL has a fellowship from the Fundación IMSS (grant no. 8066205). DCR was supported by a Ph.D. fellowship from CONACYT (grant no. 242745) and IMSS (grant no. 98227564). Funding was also provided by the Programa Cátedras CONACYT 2016 (grant no. 485) and Fondo Redes Temáticas de Investigación CONACYT (grant no. 253596).

#### Availability of data and materials

The datasets generated and analysed during the current study are available in the repository NCBI Gene Expression Omnibus database, (accession no. GSE118776; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE118776>).

#### Authors' contributions

DCR performed molecular biology experiments, *in silico* analysis, data analysis and revised the manuscript. YML participated in data analysis and critically revised the manuscript. PMM participated in the *in silico* and data analyses, and critically revised the manuscript. AAL analysed the data and critically revised the manuscript. LFJS participated in the

*in silico* analysis and critically revised the manuscript. GSL participated in the molecular biology experiments, analysed the data and revised the manuscript. JRL designed the current study, analysed the data and critically revised the manuscript. VVR conceived and designed the current study, coordinated the study and drafted the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Patient consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### References

- zur Hausen H: Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 384: 260-265, 2009.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R and Clifford GM: Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer* 121: 621-632, 2007.
- Aguilar-Lemarroy A, Vallejo-Ruiz V, Cortés-Gutiérrez EI, Salgado-Bernabé ME, Ramos-González NP, Ortega-Cervantes L, Arias-Flores R, Medina-Díaz IM, Hernández-Garza F, Santos-López G, *et al*: IMSS Research Network on HPV: Human papillomavirus infections in Mexican women with normal cytology, precancerous lesions, and cervical cancer: Type-specific prevalence and HPV coinfections. *J Med Virol* 87: 871-884, 2015.
- Münger K and Howley PM: Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89: 213-228, 2002.
- Conrad M, Bubb VJ and Schlegel R: The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* 67: 6170-6178, 1993.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS and Borzacchiello G: Papillomavirus E5: The smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 10: 140, 2011.
- Chen SL, Huang CH, Tsai TC, Lu KY and Tsao YP: The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol* 141: 791-800, 1996.
- Chen SL, Lin YK, Li LY, Tsao YP, Lo HY, Wang WB and Tsai TC: E5 proteins of human papillomavirus types 11 and 16 transactivate the c-fos promoter through the NF1 binding element. *J Virol* 70: 8558-8563, 1996.
- Kivi N, Greco D, Auvinen P and Auvinen E: Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27: 2532-2541, 2008.
- Varki A, Kannagi R, Toole B and Stanley P: Glycosylation Changes in Cancer. In: *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, *et al* (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2017.
- Wang PH: Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. *J Cancer Mol* 1: 73-81, 2005.
- Wang PH, Li YF, Juang CM, Lee YR, Chao HT, Ng HT, Tsai YC and Yuan CC: Expression of sialyltransferase family members in cervix squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Gynecol Oncol* 86: 45-52, 2002.
- López-Morales D, Velázquez-Márquez N, Valenzuela O, Santos-López G, Reyes-Leyva J and Vallejo-Ruiz V: Enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia. *Invest Clin* 50: 45-53, 2009.
- López-Morales D, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Zenteno E and Vallejo-Ruiz V: Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagn Pathol* 5: 74, 2010.
- Roy A and Chakraborty S: Detection of cancer cervix by estimation of sialic acid. *J Indian Med Assoc* 103: 589-590, 2005.
- Terasawa K, Furumoto H, Kamada M and Aono T: Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer Res* 56: 2229-2232, 1996.
- Engelstaedter V, Fluegel B, Kunze S, Mayr D, Friese K, Jeschke U and Bergauer F: Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis X, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer. *Histol Histopathol* 27: 507-514, 2012.
- Velázquez-Márquez N, Santos-López G, Jiménez-Aranda L, Reyes-Leyva J and Vallejo-Ruiz V: Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions. *J Biosci* 37: 999-1004, 2012.
- Aco-Tlachi M, Carreño-López R, Martínez-Morales PL, Maycotte P, Aguilar-Lemarroy A, Jave-Suárez LF, Santos-López G, Reyes-Leyva J and Vallejo-Ruiz V: Glycogene expression profiles based on microarray data from cervical carcinoma HeLa cells with partially silenced E6 and E7 HPV oncogenes. *Infect Agent Cancer* 13: 25, 2018.
- Kabsch K and Alonso A: The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* 76: 12162-12172, 2002.
- Buettner FF, Ashikov A, Tiemann B, Lehle L and Bakker H: *C. elegans* DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol Cell* 50: 295-302, 2013.
- Milde-Langosch K, Karn T, Schmidt M, zu Eulenburg C, Oliveira-Ferrer L, Wirtz RM, Schumacher U, Witzel I, Schütze D and Müller V: Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 145: 295-305, 2014.
- Recchi MA, Hebbbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP and Delannoy P: Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Res* 58: 4066-4070, 1998.
- Jin XL, Zheng SS, Wang BS and Chen HL: Correlation of glycosyltransferases mRNA expression in extrahepatic bile duct carcinoma



1. Chen X, Yang TT, Qiu XC, Ji ZG, Li CX, Long H, Zhou Y, Ma BA, Ma Q, Zhang X, *et al*: Gene expression profiles of human osteosarcoma cell sublines with different pulmonary metastatic potentials. *Cancer Biol Ther* 11: 287-292, 2011.
2. Warnecke-Eberz U, Metzger R, Hölscher AH, Drebber U and Bollschweiler E: Diagnostic marker signature for esophageal cancer from transcriptome analysis. *Tumour Biol* 37: 6349-6358, 2016.
3. Seko A, Kataoka F, Aoki D, Sakamoto M, Nakamura T, Hatae M, Yonezawa S and Yamashita K: N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 as a tumor marker for uterine cervical and corpus cancer. *Glycoconj J* 26: 1065-1073, 2009.
4. Sud N, Sharma R, Ray R, Chattopadhyay T and Ralhan R: Differential expression of beta mannosidase in human esophageal cancer. *Int J Cancer* 112: 905-907, 2004.
5. Pfeiffer MJ, Smit FP, Sedelaar JP and Schalken JA: Steroidogenic enzymes and stem cell markers are upregulated during androgen deprivation in prostate cancer. *Mol Med* 17: 657-664, 2011.
6. Chen X, Li D, Wang N, Yang M, Liao A, Wang S, Hu G, Zeng B, Yao Y, Liu D, *et al*: Bioinformatic analysis suggests that UGT2B15 activates the Hippo YAP signaling pathway leading to the pathogenesis of gastric cancer. *Oncol Rep* 40: 1855-1862, 2018.
7. Pâquet S, Fazli L, Grosse L, Verreault M, Têtu B, Rennie PS, Bélanger A and Barbier O: Differential expression of the androgen-conjugating UGT2B15 and UGT2B17 enzymes in prostate tumor cells during cancer progression. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E428-E432, 2012.
8. Libisch MG, Casás M, Chiribao M, Moreno P, Cayota A, Osinaga E, Oppezzo P and Robello C: GALNT11 as a new molecular marker in chronic lymphocytic leukemia. *Gene* 533: 270-279, 2014.
9. Tátrai P, Egedi K, Somorácz A, van Kuppevelt TH, Ten Dam G, Lyon M, Deakin JA, Kiss A, Schaff Z and Kovalszky I: Quantitative and qualitative alterations of heparan sulfate in fibrogenic liver diseases and hepatocellular cancer. *J Histochem Cytochem* 58: 429-441, 2010.
10. Ushakov VS, Tsidulko AY, de La Bourdonnaye G, Kazanskaya GM, Volkov AM, Kiselev RS, Kobozev VV, Kostromskaya DV, Gaytan AS, Krivoschapkin AL, *et al*: Heparan sulfate biosynthetic system is inhibited in human glioma due to EXT1/2 and HS6ST1/2 down-regulation. *Int J Mol Sci* 18: E2301, 2017.
11. Cengiz B, Yumrutas O, Bozgeyik E, Borazan E, Igcı YZ, Bozgeyik I and Oztuzcu S: Differential expression of the UGT1A family of genes in stomach cancer tissues. *Tumour Biol* 36: 5831-5837, 2015.
12. Starlard-Davenport A, Lyn-Cook B and Radomska-Pandya A: Identification of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 in non-malignant and malignant human breast tissues. *Steroids* 73: 611-620, 2008.
13. Pinho SS and Reis CA: Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 15: 540-555, 2015.
14. Magalhães A, Duarte HO and Reis CA: Aberrant glycosylation in cancer: A novel molecular mechanism controlling metastasis. *Cancer Cell* 31: 733-735, 2017.
15. Harduin-Lepers A, Krzewinski-Recchi MA, Colomb F, Foulquier F, Groux-Degroote S and Delannoy P: Sialyltransferase functions in cancers. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 499-515, 2012.
16. Estêvão D, Costa NR, Gil da Costa RM and Medeiros R: Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862: 153-162, 2019.
17. Oetke C, Auvinen E, Pawlita M and Alonso A: Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. *Arch Virol* 145: 2183-2191, 2000.
18. Vandamme V, Pierce A, Verbert A and Delannoy P: Transcriptional induction of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone. *Eur J Biochem* 211: 135-140, 1993.
19. Coughlan CM, Burger PG, Berger EG and Breen KC: The biochemical consequences of alpha2,6(N) sialyltransferase induction by dexamethasone on sialoglycoprotein expression in the rat H411e hepatoma cell line. *FEBS Lett* 413: 389-393, 1997.
20. Catterson B and Melrose J: Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology* 28: 182-206, 2018.
21. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L and Russo D: Glycosphingolipids: Synthesis and functions. *FEBS J* 280: 6338-6353, 2013.
22. Zhuo D, Li X and Guan F: Biological roles of aberrantly expressed glycosphingolipids and related enzymes in human cancer development and progression. *Front Physiol* 9: 466, 2018.
23. Supryniewicz FA, Disbrow GL, Krawczyk E, Simic V, Lantzyk K and Schlegel R: HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. *Oncogene* 27: 1071-1078, 2008.
24. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S and Delannoy P: The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83: 727-737, 2001.
25. Ohmori K, Kanda K, Mitsuoka C, Kanamori A, Kurata-Miura K, Sasaki K, Nishi T, Tamatani T and Kannagi R: P- and E-selectins recognize sialyl 6-sulfo Lewis X, the recently identified L-selectin ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 90-96, 2000.
26. Lu J and Gu J: Significance of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase 1 in cancers. *Molecules* 20: 7509-7527, 2015.
27. Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR and Bellis SL: Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* 65: 4645-4652, 2005.
28. Park JJ, Yi JY, Jin YB, Lee YJ, Lee JS, Lee YS, Ko YG and Lee M: Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 83: 849-857, 2012.
29. Tomakidi P, Cheng H, Kohl A, Komposch G and Alonso A: Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 79: 407-412, 2000.
30. Deligny A, Dierker T, Dagälv A, Lundquist A, Eriksson I, Nairn AV, Moremen KW, Merry CLR and Kjellén L: NDST2 (N-Deacetylase/N-Sulfotransferase-2) enzyme regulates heparan sulfate chain length. *J Biol Chem* 291: 18600-18607, 2016.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License.