



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS.**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE SIALILTRANSFERASAS EN LÍNEAS  
CÉLULARES DE CÁNCER CÉRVICOUTERINO UTILIZANDO RETINOIDES Y  
ESTEROIDES”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**DOLORES LÓPEZ MORALES**

**TUTORES**

**DR. EDGAR ZENTENO GALINDO - FACULTAD DE MEDICINA**

**DRA EN Cs. VERÓNICA VALLEJO RUIZ -**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

México D. F. Noviembre, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

DEDICATORIAS .....	3
AGRADECIMIENTOS .....	4
RESUMEN .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	12
CAPÍTULO 1. ....	14
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO EN LESIONES INTRAEPITELIALES DE CÉRVIX.....	14
JUSTIFICACIÓN .....	17
RESULTADOS .....	17
PUBLICACIÓN .....	17
INCREASED EXPRESSION OF SIALIC ACID IN CERVICAL BIOPSIES WITH SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS .....	17
DISCUSIÓN .....	23
CONCLUSIONES.....	26
CAPITULO 2. ....	27
EXPRESIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO MEDIADA POR RETINOIDES Y SUS EFECTOS SOBRE LA ADHESIÓN EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO .....	27
JUSTIFICACIÓN .....	30
RESULTADOS .....	30
ESCRITO ENVIADO A PUBLICACIÓN .....	30
RETINOIC ACID EFFECT ON ALPHA 2,6 SIALYLATION OF CERVICAL CARCINOMA CELL LINE .....	30
DISCUSIÓN .....	53
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	58

## DEDICATORIAS

*Para Sofi, Pausi y Diego: mi compromiso más grande, la razón para ser mejor cada día*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACyT y al IMSS ya que el presente trabajo de investigación se desarrolló con los fondos de los proyectos:

SALUD-2005-13918 de CONACyT

FP-2003/031 del IMSS

De forma particular agradezco el apoyo recibido como becaria de CONACyT y becaria de investigación del IMSS con número de registro 166975 y 99221999, respectivamente.

Agradezco profundamente a mis tutores, los Doctores Verónica Vallejo Ruíz y Edgar Zenteno Galindo, por todas sus enseñanzas, su apoyo incondicional y su paciencia.

Al Doctor Julio Reyes Leyva, por su apoyo y comentarios en la redacción de los artículos científicos, así como todo el apoyo en el desarrollo de las técnicas

Al los doctores Ricardo Lascurain Ledesma y Alejandro Zentella Dehesa como parte del comité tutorial, por sus acertados comentarios y el apoyo recibido

Agradezco a mis padres Lolita y Rogelio por su ejemplo de esfuerzo y trabajo por mostrarme que lo importante de la vida es el amor y la familia.

A Moni por su apoyo incondicional, por ser ejemplo de nobleza y dedicación

A Roge por su cariño y ejemplo de competitividad y calidad en el hacer

A Cris por sus enseñanzas, por compartir conmigo todas las herramientas que conoce para que yo pueda ser una mejor persona y profesionalista, por el tiempo y el amor compartido

A todos aquellos que dedicaron horas de su tiempo para cuidar a mis pequeños con amor y dedicación y hacer posible este logro: Hugo, Elvis, Elvira, Bertha, Zula, Mau, Lucha, Ninas, otra vez mamá, papá, Moni

A toda mi familia por creer que puedo lograrlo

GRACIAS!

## RESUMEN

Se han descrito diversas alteraciones en la glicosilación durante la transformación neoplásica. El incremento de ácido siálico (Sia) en la superficie celular se ha reportado como una alteración frecuente que correlaciona con la progresión tumoral y las propiedades invasivas de las células alteradas, por lo que la detección de Sia se ha propuesto como un marcador temprano asociado al desarrollo neoplásico. Estudios previos sugieren que el incremento de Sia es el resultado de la desregulación de los mecanismos de expresión de las STs ya que hay una correlación entre el aumento de Sia en la superficie celular y el aumento en la expresión de los ARNm de las STs, sin embargo se desconocen los mecanismos que regulan la expresión de ST.

En este estudio analizamos las alteraciones en el nivel de expresión y en la distribución de ácido siálico con enlace  $\alpha$ 2,3 o  $\alpha$ 2,6 asociado al grado de lesión neoplásica en etapas previas al desarrollo de cáncer cervicouterino, así como los efectos mediados por retinoides sobre el cambio de expresión de ácido siálico y la adhesión en líneas celulares de CaCu. Analizamos si el cambio de expresión de ácido siálico sobre la adhesión de líneas celulares de CaCu mediadas por retinoides se debe a cambios en los niveles de expresión del ARNm de las sialiltransferasas encargadas de su síntesis



## LISTA DE ABREVIATURAS

Antígeno embrionario de etapa específica-1	SSEA-1
Ácido(s) siálico(s)	Sia
Ácido neuramínico	Neu5Ac
Ácido 2-ceto-3-desoxinonónico	Kdn
Sialiltransferasa	ST
Galactosa	Gal
Ácido retinóico	AR
Cáncer cervicouterino	CaCu
Virus de papiloma humano	VPH
Lesión escamosa intraepitelial	LEI
Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado	LEIBG (HSIL*)
Lesión escamosa intraepitelial de alto grado	LEIAG (LGSIL*)
Neoplasia intraepitelial cervical	NIC (CIN*)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Carcinoma hepatocelular	HCC
Ácido siálico total en suero	TSA*
Lectina Maackia Amurensis	MAA
Lectina Sambucus Nigra	SNA
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF $\alpha$ *
Interleucina	IL
Matriz extracelular	MEC
Laminina	LN
Fibronectina	FN
Colágena	CN

## INTRODUCCIÓN.

Todas las células en la naturaleza presentan en su superficie celular estructuras glicosiladas complejas que regulan diversos procesos, unidos a lípidos y/o a proteínas, estos complejos constituyen una parte importante de la masa y variación estructural de los glicoconjugados (Ohtsubo y Marth, 2006). El patrón específico de los oligosacáridos expresados en cada célula cambia dinámicamente en respuesta a estímulos de diferenciación y activación celular de manera que las estructuras presentes reflejan simultáneamente especificidad intrínseca a la especie, al tipo celular y relativa a la ontogenia del organismo (Varki, 1998; Yarema y Bertozzi, 2001). En vertebrados, los glicoconjugados son determinantes en la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular. De manera importante se ha reconocido la participación de oligosacáridos complejos en fenómenos de adhesión y migración celular. Regulando la función de integrinas y su unión a moléculas de matriz extracelular, así como el tráfico de linfocitos en el sistema inmune (Janik et al., 2010; Sperandio et al., 2009).

Se ha identificado la expresión espacio-temporal específica de glicoconjugados como es la expresión antígeno embrionario de etapa específica-1 (SSEA-1), que posteriormente se identificó como la estructura sialil-Lewis<sup>x</sup> y se expresa en la fase de preimplantación en etapas tempranas de desarrollo embrionario en vertebrados (Muramatsu, 1988; Liu et al., 2004). En la activación de linfocitos T mediada por anti-CD3 ocurre un recambio de estructuras oligosacáridicas unidas por enlaces de tipo O-glicosídico (O-glicanos), de manera que los linfocitos en reposo expresan el disialoterasacárido NeuNAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3(NeuNAc  $\alpha$ 2-6)Gal-NAc-Ser/Thr, en tanto que las células T activadas portan exclusivamente la estructura más compleja NeuNAc  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3(NeuNAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc  $\beta$ 1-6)GalNAc-Ser/Thr (Piller et al., 1988; Fukuda, 1991). Esta expresión regulada en tiempo y espacio sitúa a los glicanos complejos como biomarcadores de utilidad en la identificación de fenómenos celulares específicos.

Los patrones de expresión de glicoconjugados también se modifican en procesos patológicos (Lowe y Marth, 2003; Hakomori, 2004). Desde el siglo pasado se identificaron las alteraciones de la glicosilación como una característica universal

asociada a la transformación neoplásica. Los cambios que acompañan el desarrollo de cáncer son específicos y uno de los frecuentemente reportados es el aumento en la expresión de ácido siálico (Sia) (Hakomori, 1989; Kim y Varki, 1997; Dennis et al., 1999; Brockhausen, 1999).

Los ácidos siálicos (Sia) son monosacáridos ácidos de nueve carbonos derivados del ácido neuramínico (Neu5Ac) y del ácido 2-ceto-3-desoxinonónico (Kdn) y ocupan posiciones terminales de glicoconjugados en vertebrados. Las sustituciones que presentan en los carbonos C-4, C-5, C-7, C-8 y C-9 por grupos O- Acetil, O- Metil, O-Lactil, O- Sulfato o grupos fosfato, así como las diferentes uniones en enlace  $\alpha$ 2,3,  $\alpha$ 2,6, y  $\alpha$ 2,8 a otros monosacáridos, aumentan la variabilidad estructural y contribuyen a la especificidad funcional de los Sia (Traving y Schauer, 1998; Varki y Schauer, 2009). La diversidad en el tipo de enlace de sialoglicanos se genera por la actividad de enzimas sialiltransferasas (STs) específicas. Las STs son glicosiltransferasas de transmembrana tipo II, presentan secuencias conservadas llamadas motivos sialil, que les confieren diferente especificidad por el sustrato donador que reconocen y por el sustrato aceptor sobre el que transfieren el Neu5Ac-CMP activado. En humanos se han clonado 20 STs, que contribuyen a generar la diversidad de estructuras sialiladas (Harduin-Lepers et al., 2001).

Desde la década de los 70's, se identificó al aumento de ácido siálico en suero como un marcador asociado al desarrollo neoplásico. Los niveles de ácido siálico correlacionan con la patología y la progresión de los tumores y se ha sugerido la cuantificación de éste marcador durante el seguimiento de los pacientes en tratamiento (Hogan-Ryan et al., 1980; Feijoo-Carnero et al., 2004). El incremento de ácido siálico con enlace  $\alpha$ 2,3 en cáncer gástrico correlaciona con profundidad de la invasión y el desarrollo de metástasis a nódulos linfáticos (Wang et al., 2009). En cáncer de cavidad oral, los niveles de Sia en enlace  $\alpha$ 2,3 son elevados en tejido tumoral y se mantienen elevados en el suero de pacientes que no responden al tratamiento anti-neoplásico (Shah et al., 2008). La expresión de Sia  $\alpha$ 2,6 en cáncer de colon se ha asociado con un mal pronóstico y el desarrollo de metástasis a nódulos linfáticos (Inagaki et al., 2007).

El aumento de Sia  $\alpha$ 2,6 se ha reportado como una alteración frecuente en cáncer de colon, cáncer oral, hepatocarcinoma, cáncer de glándula tiroides, carcinoma

escamoso de cabeza y cuello (Dall'Olio y Trerè, 1993; Shah et al., 2008; Dall'Olio et al., 2004; Babál et al., 2006; Chovanec et al., 2004). Éste ácido siálico se encuentra unido a galactosa (Gal) y forma el antígeno  $\alpha$ 2,6 sialil-lactosamina y se expresa principalmente en oligosacáridos unidos proteínas por enlaces de tipo N-glicosídico (N-glicanos). Estudios *in vitro* indican que el aumento en la expresión de cadenas de  $\alpha$ 2,6sialil-lactosamina afectan las propiedades de adhesión de las células tumorales, causando una disminución en las interacciones célula-célula y promoviendo la adhesión a moléculas de matriz extracelular (Deman et al., 1995, Lin et al., 2002).

La alteración de la expresión de sialoglicanos se correlaciona con alteraciones en la expresión de las enzimas sialiltransferasas (STs) que catalizan la transferencia del monosacárido activado a las terminales más externas en las cadenas oligosacáridicas de glicoconjugados (Dall'Olio y Chiricolo, 2001). La relevancia del estudio de las alteraciones de ácido siálico y de la expresión de STs en cáncer se debe a que ha mostrado poseer un valor diagnóstico-pronóstico (Dwek y Brooks 2004; Jefferis, 2009). En cáncer de seno los niveles de expresión de las enzimas ST3Gal III, ST3Gal IV y ST6Gal I correlacionan positivamente con la talla del tumor y la invasión a nódulos axilares (Recchi et al., 1998). Debido a lo anterior, los sialoglicanos expresados en cáncer se postulan como blancos para ser utilizados como herramientas en el diagnóstico y la terapia contra el cáncer.

Se han realizado diversos ensayos tratando de regular la expresión de ácido siálico ya sea afectando directamente la adición de Sia utilizando ácido retinóico (AR) (Georgopoulou et al., 2000) o afectando la expresión de siali-transferasas utilizando anti-inflamatorios esteroideos (Vallejo et al., 2000). En este estudio se analizaron las alteraciones en los niveles de expresión de ácido siálico en lesiones preneoplásicas de cérvix y los efectos *in vitro* en la expresión de ácido siálico por retinoides sobre la adhesión e invasión de líneas celulares de cáncer cervicouterino.

## HIPÓTESIS

En lesiones preneoplásicas del epitelio cervical existe incremento en los niveles de expresión de ácido siálico relacionado con el grado de alteración.

Los retinoides modifican la expresión de ácido siálico en líneas celulares tumorales de cérvix alterando su adhesión

## OBJETIVOS

Determinar si en tejido cervical existen alteraciones en el nivel de expresión y en la distribución de ácido siálico con enlace  $\alpha$ 2,3 o  $\alpha$ 2,6 asociado al grado de lesión neoplásica en etapas previas al desarrollo de cáncer cervicouterino.

Analizar los efectos mediados por retinoides sobre el cambio de expresión de ácido siálico y la adhesión en líneas celulares de CaCu.

Analizar si el cambio de expresión de ácido siálico sobre la adhesión de líneas celulares de CaCu mediadas por retinoides se debe a cambios en los niveles de expresión del ARNm de las sialiltransferasas encargadas de su síntesis.

Los resultados de este trabajo y la metodología están descritos en dos capítulos que presentan dos artículos:

Capítulo 1. PUBLICACIÓN. INCREASED EXPRESSION OF SIALIC ACID IN CERVICAL BIOPSIES WITH SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS

López-Morales D, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Zenteno E, Vallejo-Ruiz. 2010. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic Pathology*, 5:74

<http://www.diagnosticpathology.org/content/5/1/74>

Capítulo 2. RETINOIC ACID EFFECT ON ALPHA 2,6 SIALYLATION OF CERVICAL CARCINOMA CELL LINE. En preparación para ser enviado a

## CAPÍTULO 1.

### ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO EN LESIONES INTRAEPITELIALES DE CÉRVIX

El cáncer cervicouterino representa la primera causa de muerte en la población femenina en nuestro país. La participación de factores externos es determinante para el desarrollo y la progresión de la enfermedad, como es el caso de las infecciones por el virus de papiloma humano (VPH) que se ha detectado DNA 99.7% de las muestras en biopsias de lesiones invasoras con predominancia de los tipos virales 16 y 18 (Eiben et, al., 2003). El cáncer cervical invasor se desarrolla a partir de lesiones precursoras denominadas lesión escamosa intraepitelial cervical (LEI). Las lesiones escamosas intraepiteliales se caracterizan por una proliferación y maduración celular anormal con atipia nuclear. Existen tres clasificaciones histológicas intercambiables y de uso actual para reportar las alteraciones microscópicas que comprenden las LEIs (Tabla 1). En nuestro estudio tomamos la clasificación de lesiones escamosas de alto y bajo grado que incluyen a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC), en grados 1,2 y 3. Se ha reportado que la clasificación es propensa a una alta variabilidad dependiendo del observador (Ismail et al., 1989, Robertson et al., 1989a; Stoler&Schiffman, 2001). En la clasificación NIC, la concordancia es alta en NIC3 y baja entre lesiones de bajo grado (Stoler y Schiffman, 2001). Sin embargo y a pesar de la baja reproducibilidad en el diagnóstico la separación de las categorías correlaciona con el grado de progresión y regresión de las lesiones (Mitchell et al., 1998). Actualmente, ni los estudios ultraestructurales o estudios inmunohistoquímicos contribuyen grandemente al diagnóstico de rutina de las LEIs. El 60 % de las lesiones de bajo grado (LEIBG) presentan remisión espontánea y muy baja tasa de progresión a carcinoma, sin embargo el 38 % de las lesiones de alto grado (LEIAG) son recurrentes y de éstas del 16 al 36 % progresan a cáncer invasor.

**Tabla 1. Equivalencia de la terminología para referirse a lesiones al desarrollo de cáncer cérvicouterino (Franco et al., 2001)**

Displasia	Terminología NIC	Terminología LEI (sistema Bethesda)
Displasia leve, atipia coilocítica	NIC I	LEIBG
Displasia moderada	NIC II	LEIAG
Displasia severa	NIC III	
Carcinoma in situ		

En cáncer, la detección de las alteraciones en la expresión de ácido siálico con enlaces  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ , se ha facilitado con el uso de lectinas. Esto ha permitido establecer el significado de las alteraciones en la expresión de ácido siálico (Sia) y el curso de la enfermedad. Así, se ha establecido que hay un incremento de Sia  $\alpha 2,3$  en cáncer de seno, en cáncer gástrico que se relaciona con aspectos clínico-patológicos como el grado de avance de la enfermedad y con la conducta invasora de las células tumorales. En cáncer gástrico el aumento de oligosacáridos con ácido siálico  $\alpha 2,3$ - correlaciona con profundidad de la invasión y el desarrollo de metástasis a nódulos linfáticos (Wang et al., 2009). En cáncer de cavidad oral los niveles de Sia  $\alpha 2,3$  son elevados en tejido tumoral y se mantienen elevados en el suero de pacientes que no responden al tratamiento (Shah et al., 2008).

La expresión de antígenos sialilados se ha detectado en diversos tipos de cáncer (Tabla 2). Dentro de los tipos de cáncer con origen ginecológico, el antígeno sialil Le<sup>x</sup> se detecta en cáncer de ovario de manera previa a la resección del tumor y su expresión desaparece 2 semanas posteriores a la misma (Iwanari et al., 1990). El antígeno sialil Tn, que se expresa levemente en epitelio cervical normal, se sobreexpresa en carcinoma escamoso de cérvix. En este reporte encuentran un cambio en la distribución del epítipo sialil Tn, ya que en las lesiones primarias se observó una tinción central en el grupo de células anormales que se vuelve periférica en lesiones metastásicas, sin cambios en el nivel de reactividad entre lesiones primarias y metastásicas (Ogawa et al., 1992). Roy y Chakraborty en 2005 reportaron el aumento gradual en los niveles de expresión de Sia en relación con el



proceso patológico: displasia severa, carcinoma preinvasor y carcinoma invasor. No existen otros reportes directamente relacionados con la expresión de sialoglicanos en tejido de pacientes con cáncer cervical, aunque si se han reportado alteraciones en los niveles de ARNm de las sialiltransferasas encargadas de la síntesis de oligosacáridos sialilados. Wang y colaboradores, reportan el aumento de ARNm de las sialiltransferasas ST6Gal I y ST3Gal III, en cáncer cervical y observan que existe una asociación con el aumento de expresión y la invasión a nódulos linfáticos (Wang et al., 2001 y 2002)

TABLA 2. ANTÍGENOS SIALILADOS ASOCIADOS A CÁNCER	
Nombre	Estructura
Sialil-Lewis <sup>x</sup>	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\beta$ 1,3)GlcNAc-R
Sialil Lewis <sup>a</sup>	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc-R
Sialil-Tn	NeuAc $\alpha$ 2,6GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
Sialil T	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
$\alpha$ 2,6 Sialil-lactosamina	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1-3(4)GlcNAc-R

Existen pocos estudios que reporten alteraciones en los niveles de Sia en lesiones que preceden al desarrollo de cáncer. En tejido hepático el estudio de la expresión de Sialil Tn y ácido siálico en  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 en nódulos preneoplásicos y en diferentes etapas de carcinoma hepatocelular (HCC) mostró que la expresión de oligosacáridos sialilados correlaciona con el desarrollo de la enfermedad, sin embargo están ausentes en los nódulos preneoplásicos de hígado (Cao et al., 1999). Joshi y Patil (2010) realizan un estudio comparativo de los niveles de TSA en suero y encuentran una elevación en los niveles de TSA en tejido premaligno oral y en diferentes etapas de cáncer oral con respecto a individuos sanos. Nosotros analizamos lesiones que preceden al desarrollo de carcinoma escamoso del epitelio cervical para determinar si presentan alteraciones en la expresión de ácido siálico con dos tipos de enlace  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6.

## **JUSTIFICACIÓN**

Aunque existe un programa de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), mediante la prueba de Papanicolaou (Pap), desde 1974 en México, en 2007 el CaCu se reportó como la principal causa de muerte en mujeres de 25 a 44 años de edad (Estadísticas demográficas INEGI, 2007). La detección por citología cervical presenta algunos inconvenientes, tal como baja sensibilidad en la detección temprana, ya que cerca del 40% de los casos no se identifica por este medio (Gutiérrez-Delgado et al., 2008). La utilización de otro tipo de marcadores tempranos de carácter cuanti-cualitativos puede favorecer la detección temprana del CaCu y brindar una herramienta con carácter pronóstico para las LEIs. En ese sentido dado que en algunos tipos de cáncer las alteraciones de ácido siálico se presentan como un evento temprano asociado a la transformación oncogénica, la detección de alteraciones en los niveles de expresión de ácido siálico en lesiones que preceden al cáncer cervical, podrían ser de utilidad como herramienta de detección temprana. Por estas razones es importante analizar si existen cambios en la expresión de ácido siálico en etapas iniciales de transformación oncogénica en lesiones preneoplásicas de cérvix que puedan ser indicadores pronósticos de utilidad en el diagnóstico de ésta enfermedad.

## **RESULTADOS**

### **PUBLICACIÓN**

#### **INCREASED EXPRESSION OF SIALIC ACID IN CERVICAL BIOPSIES WITH SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS**

Este trabajo permitió la publicación del siguiente artículo



RESEARCH

Open Access

## Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions

Colores Anselmo-Gómez<sup>1,2</sup>, Julio Nevés-Leyva<sup>1</sup>, Gerardo Santos-López<sup>1</sup>, Edgar Zenteno<sup>1</sup>, Verónica Vallejo-Ruiz<sup>1\*</sup>

### Abstract

**Background:** Sialic acids have been observed during oncogenic transformation. Sialic acid oligosaccharides of glycoproteins and glycolipids have been implicated in tumor adhesion and metastasis. In the cervical cancer, high levels of sialic acid have been reported in the patients group and an increase of total sialic acid concentration has been reported in the cervix of squamous intraepithelial lesions. This study investigates the change in expression and distribution of α2,3-linked sialic acid and α2,6-linked sialic acid in low and high squamous intraepithelial lesions and in normal tissue.

**Methods:** Immunohistochemistry was used to examine the expression and distribution of sialic acid in different grades of cervical neoplasia. We applied lectin histochemistry method, which interacts with α2,3-linked sialic acid and α2,6-linked sialic acid in the cervix.

**Results:** The histochemical analysis showed that α2,3-linked sialic acid and α2,6-linked sialic acid increases in intensity and distribution in accordance with the grade of squamous intraepithelial lesions (SIL). These results are in concordance with a previous study that reports increased sialic acid levels of three sialyltransferases.

**Conclusions:** These results show that there is a change in sialylation in cervical tissue before cancer development and may play an important role in cellular transformation. These findings provide the basis for more detailed studies of the possible role of cell surface glycoproteins in cervical cancer and in cervical transformation.

### Background

It is well known that tumor, genesis and metastasis are frequently associated with altered structure and expression of oligosaccharides on cell surface glycoproteins and glycolipids [1-6]. Sialylated glycoproteins expression has been shown to change during development, differentiation, and disease and oncogenic transformation. A general increase in sialylation of cell surface glycoproteins of carcinoma cells has been detected [7]. These changes in sialylation are related to invasion and metastasis [8-11].

Different studies in serum from patients with cervical cancer showed that sialic acid is increased even in the early stages of carcinoma, and levels of these glycoaminoacids to very normal levels after radiotherapy [12,13]. Total sialic acid concentration of cervical tissue

has been analyzed. Results showed a slight elevation in benign, inflammatory lesions, moderate elevation in severe dysplasia and progressive carcinoma and high elevation in invasive cervical carcinoma [14]. Sialic acids are widely distributed in nature, as terminal sugars of oligosaccharides attached to proteins, lipids. Sialic acids are linked to galactose via α2,3 or α2,6-linkage or linked via α2,6-linkage to galactosamine or N-acetylglucosamine. Sialic acids may be linked to the C6 position of another sialic acid residue [15]. The biosynthesis of sialylated oligosaccharide synthesis is controlled by a family of enzymes named sialyltransferases [16]. A correlation between sialic acid and sialyltransferase expression has been detected [16]. Altered expression of sialyltransferase in different cancers is well documented [17,20]. Increased expression of S19Gal III and S16Gal I was correlated with poor prognosis and lymph node metastasis in cervical cancer [21,22]. In a previous study, our group investigated the sialyltransferase expression in cervical intraepithelial lesions and normal tissue. Increased expression of S19Gal III, S19Gal IV and

\* Correspondence: [colores@unam.mx](mailto:colores@unam.mx)

<sup>1</sup>Departamento de Diagnóstico Patológico, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Secretaría de Salud, México, D.F., México  
Full list of author information is available at the end of the article



SHL) correlated with the grade of squamous intraepithelial lesion (SIL) [23].

In the present study we have performed lectin histochemistry in order to determine the level of expression and the distribution of sialic acid and sialic acid in normal tissue and in low- and high-grade cervical intraepithelial lesions in order to determine the changes in sialylation at early stages of transformation in cervical neoplasia.

## Materials and methods

### Reagents

*Sialidase* (Sigma) (SNA specific for Neu5Ac2/6 to 6-GalNAc6Sialidase conjugates (GNA, specific for Neu5Ac2/6Gal) and agglutinins biotinylated were purchased from Vector Laboratories, CA, USA) and used at a concentration of 1:1,000. Signal amplification was realized with the TSA biotin reagent kit from MEN Telo Sciences (Boston, MA, USA).

### Tissues

A retrospective study was carried out using material from the tissue collection at the Clinics of Gynecology, Hospital General Regional No. 36 and Hospital General de Zulia, No. 5, Mérida, Mexico. Institute of Social Security. Samples of normal cervix were obtained from uterus of patients who had undergone total hysterectomy due to uterine tumors. The biopsies were fixed in 4% phosphate-buffered formaldehyde and embedded in paraffin according to a standard protocol [24]. All samples were obtained according to the guidelines of the Human Ethics Committee of our Institution. This study involved 28 specimens classified by a pathologist according to the Bethesda System in cervical low SIL (LSIL) or high SIL (HSIL).

### Lectin histochemistry

Paraffin sections (3 µm) were cut and placed on poly-L-lysine coated glass slides. The sections were deparaffinized following published reactions [24]. Sections were incubated in methanol containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min to block the activity of endogenous peroxidase. Hereafter, every step was followed by washing three times with 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl. Slides were rehydrated with blocking buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl) and 0.5% bovine serum albumin (upplied in kit) for 30 min at room temperature. Sections were incubated with 5 µg/ml biotin conjugated lectins SNA and MAA for 1 h at room temperature. After rinsing, sections were incubated with nonserumish peroxidase-conjugated streptavidin for 30 min at room temperature. Biotin signal amplification was performed for 16 min at room temperature using biotinylated streptavidin. Sections were incubated one more time with biotin-streptavidin

antibodies-conjugated streptavidin for 30 min. Colorized reaction product was obtained with 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride.

To confirm lectin specificity, enzymatic desialylation was performed by incubating tissue sections with neuraminidase from *C. perfringens* (50 units/ml in 50 mM phosphate buffer, 0.05 M CaCl<sub>2</sub> 0.1 M CaCl<sub>2</sub> for 50 min at 37°C. Negative controls of the technique were performed in samples processed without lectin. Sections were observed in an Olympus microscope (Olympus, Tokyo, Japan), and the images were processed with the Microsoft program (Microsoft Imaging Co., Downingtown, PA, USA).

The intensity of carbohydrate expression was quantitatively classified into five groups on the basis of the intensity of positive cells: 0 (negative); 1, 2, 3 and 4 (very low, low, moderate and high expression) and was correlated with biological diagnosis. We also evaluated the distribution of expression in the different epithelial layers. The expression was recorded in the basal, parabasal, intermediate and superficial layers in order to be able to differentiate the layers or percentage of the epithelium when we could not differentiate the layers.

## Results

In the present study we analyzed a total of 28 biopsies: 9 cases of LSIL, 9 cases of HSIL and 5 biopsies with HPV and *exfoliated*.

### Sialic Acid Expression

In order to determine the change in expression of sialic acid and sialic acid related to neoplastic transformation of the cervical epithelium, we performed an immunohistochemistry assay with MAA and SNA.

#### LSIL, Sialic Acid Expression

Four out of five normal biopsies showed expression of sialic acid. The higher expression was detected in the basal layer and only two samples with very low expression were detected in the medium and superficial layers (Table 1).

In all samples from the group with LSIL, sialic acid in sialic acid expression was detected. They showed one and medium expression in the basal layer. For the intermediate and superficial layers, the expression was detected in three and five samples, respectively with very low or low expression (Table 1).

Sialic acid expression in LSIL. Linkage was detected in all LSIL samples analyzed (8/8) with a variable intensity of expression in the basal cells (0-4). The expression increased in the medium and superficial layers that extended in most cases to 66% or the total of the epithelium, in the layers with loss of cellular differentiation, the reaction intensity was higher with respect to areas with cellular differentiation (Table 1). The percent



**Table 1** 02.3 Staic acid expression and distribution in samples with normal LSIL and HSIL

Normal	Basal	Intermediate	Superficial
0	2	0	2
10	1	0	2
20	—	1	—
30	1	0	1
40	2	1	1
total number	—	04	04

LSIL	0	1	2	3
1	—	0	0	1
3	2	0	0	1
11	2	0	0	3
19	1	0	0	2
25	—	2	2	1
30	1	2	2	—
40	—	0	0	—
43	2	1	1	2
48	2	1	1	—
total number	07	04	04	06

HSIL	0	1	2
1	1	1	—
8	1	2	—
10	2	1	—
12	1	0	2
17	—	1	—
22	1	0	0
30	—	2	—
40	1	1	—
total number	07	07	02

LSIL, high-grade cervical intraepithelial neoplasia (LSIL), low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; 0, low intensity; 1, moderate intensity; 2, high intensity; the number normally was contained in the different layers of the epithelium based on mentioned Fig. 1 of each



**Figure 1** 02.4 Staic acid expression in cervical samples with normal (A), LSIL (B) and HSIL (C) (magnification  $\times 400$ ). Staic acid expression was significantly increased in HSIL (B) and HSIL (C) (magnification  $\times 400$ )

pattern of 2.2.6 staic acid expression showed an increased expression and distribution in the samples with HSIL with respect to cervical epithelium (Figure 1).

#### 02.6 Staic Acid Expression

0.2.6 Staic acid was detected in all normal samples (only 0.2.6). One sample showed expression in the basal layer. All samples showed expression in the middle layers with variable intensity of expression. Four out of five samples showed expression in the superficial layers (Table 2).

In all LSIL samples, 0.2.6 staic acid was detected. It was distributed in the intermediate and superficial layers. Expression in the basal and intermediate layers was very low and few with increased expression in the superficial layer (Table 2).

All samples with HSIL diagnosis showed a medium expression of 0.2.6 staic acid, with a deviation in all of them in the intermediate and superficial layer (0.2.6). In only two samples, expression in the basal cells were not detected (Table 2).

The general pattern of 0.2.6 staic acid expression showed an increase in intensity of expression and distribution in HSIL samples, 0.2.6 Staic acid expression was not detected in basal cells, with one exception (Figure 2).

#### Discussion

Cervicovaginitis on the cell surface play important roles in the regulation of cell proliferation, cell adhesion, cancer metastasis, tissue differentiation and apoptosis [26]. In particular, stratification of squamous has been suggested to be a very important process during cervical intraepithelial neoplasia and progression, and staic acid is often responsible for tumor-associated angiogenicity [27–29]. Several studies of cervical staic acid have been observed to analyze the cervical staic acid in patients serum. The result showed that the level of staic acid is increased in patients with cervical cancer and five level return to normal after therapy. The level staic acid decline in patients who respond well to treatment and show an increase in patients with recurrence of cancer

**Table 2**  $\alpha 2,6$  Sialic acid expression and distribution in samples with normal, LSIL, and HSIL

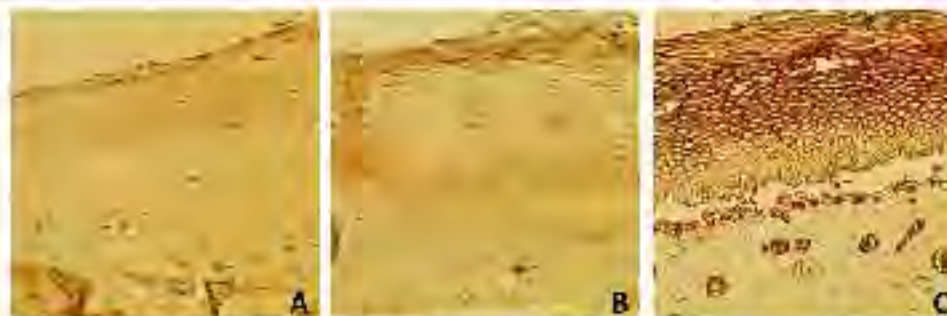
S. no.	Normal		
	Basal	Intermediate	Superficial
1	0	3	0
2	0	1	0
3	0	1	0
4	0	1	0
5	0	1	0
Mean intensity	0	2.0	0
<hr/>			
<b>LSIL</b>			
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	0	0	0
29	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0
32	0	0	0
33	0	0	0
34	0	0	0
35	0	0	0
36	0	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	0	0	0
40	0	0	0
41	0	0	0
42	0	0	0
43	0	0	0
44	0	0	0
45	0	0	0
46	0	0	0
47	0	0	0
48	0	0	0
49	0	0	0
50	0	0	0
51	0	0	0
52	0	0	0
53	0	0	0
54	0	0	0
55	0	0	0
56	0	0	0
57	0	0	0
58	0	0	0
59	0	0	0
60	0	0	0
61	0	0	0
62	0	0	0
63	0	0	0
64	0	0	0
65	0	0	0
66	0	0	0
67	0	0	0
68	0	0	0
69	0	0	0
70	0	0	0
71	0	0	0
72	0	0	0
73	0	0	0
74	0	0	0
75	0	0	0
76	0	0	0
77	0	0	0
78	0	0	0
79	0	0	0
80	0	0	0
81	0	0	0
82	0	0	0
83	0	0	0
84	0	0	0
85	0	0	0
86	0	0	0
87	0	0	0
88	0	0	0
89	0	0	0
90	0	0	0
91	0	0	0
92	0	0	0
93	0	0	0
94	0	0	0
95	0	0	0
96	0	0	0
97	0	0	0
98	0	0	0
99	0	0	0
100	0	0	0
Mean intensity	0	0.0	0.0

LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion. Lesion grading was performed as follows: 0, absent; 1, very low intensity; 2, low intensity; 3, moderate intensity; and 4, high intensity. The reaction intensity was evaluated in the different layers of the epithelium (basal, intermediate and superficial).

even prior to any clinical evidence [12,25]. The change in sialic acid expression in premalignant lesions has been scarcely studied. Roy and Chakraborty reported a slight elevation in benign lesions, moderate elevation in severe dysplasia and an invasive carcinoma and higher elevation in invasive carcinoma of the cervix of this monosaccharide [17]. The present study describes the change of  $\alpha 2,3$  and  $\alpha 2,6$  sialic acid expression in cervical intraepithelial neoplasia. An increased expression of sialic acid was detected in both types of linkages related with the grade of cervical neoplasia in most of the studied samples.  $\alpha 2,3$  Sialic acid expression in normal samples was detected in the basal layer, increasing distribution to the intermediate layers in LSIL. In some HSIL, it was detected in all layers.  $\alpha 2,6$  sialic acid expression was not detected in the basal layer but was detected in the medium and superficial layers and in the same way that  $\alpha 2,3$  sialic acid in HSIL is expressed in all layers. It is important to note that there exists a co-expression of both types of sialic acid linkages in the squamous intraepithelial lesions. The increased sialylation detected may play an important role in cell-cell interactions, changing the structure of the epithelium and losing definition of the different layers. The change in sialic acid expression has been established in mice studies with a change in the expression of sialyltransferase genes [7,29,30]. In cervical cancer, an increase in mRNA levels of sialyltransferases ST3Gal III and ST6Gal I related with invasion has been detected [22]. A previous study from our group found an increase in the mRNA levels of the sialyltransferases ST6Gal I, ST3Gal III and ST3Gal IV in premalignant lesions of the cervix [13]. The results obtained in the present study may be as a result of increased expression of certain sialyltransferase genes.

**Conclusion**

Neoplastic transformation in the human cervical epithelium was accompanied by increased expression of  $\alpha 2,6$  and  $\alpha 2,3$  sialic acids. These results show that the change in sialylation occurs before cancer development and may



**Figure 2**  $\alpha 2,6$  Sialic acid expression in cervical samples with normal (A), LSIL (B) and HSIL (C) diagnosis. (A) Normal cervix (B) LSIL (C) HSIL (H&E, 40x).





## DISCUSIÓN

El desarrollo neoplásico es gradual y requiere de la acumulación de alteraciones celulares que modifican los procesos de proliferación y diferenciación celular. Conforme la célula se altera, adquiere propiedades adicionales como la independencia de sustrato y la habilidad de formar metástasis. Una de las mejores estrategias para prevenir el desarrollo de cáncer es la detección en etapas tempranas de la enfermedad. Para ello es crucial la identificación de marcadores tempranos específicos que permitan identificar alteraciones que pueden llevar al desarrollo de la enfermedad. El aumento en los niveles de expresión de Sia se ha reportado en diferentes tipos de cáncer. El ácido siálico con enlace  $\alpha 2,3$  aumenta en cáncer de seno y en cáncer gástrico (Recchi et al., 1998; Wang et al., 2009). El incremento de ácido siálico con enlace Sia $\alpha 2,6$  se ha reportado en cáncer de colon, cáncer oral, hepatocarcinoma, cáncer de glándula tiroides, carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Dall'Olio y Trerè, 1993; Shah et al., 2008; Dall'Olio et al., 2004; Babál et al., 2006; Chovanec et al., 2004). Sin embargo, existen pocos reportes que den seguimiento de las alteraciones en los niveles de expresión de Sia durante el desarrollo neoplásico. En nuestro estudio encontramos un aumento en la expresión de Sia con enlace  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$  que se hace evidente en las lesiones de alto grado. En nuestros resultados observamos que la intensidad media de reactividad con MAA en el estrato intermedio, se modifica de 0.4 en tejido normal a 1.1 en LEIAG (HSIL); en tanto que la reactividad con SNA en el estrato basal aumenta de 0.6 en muestras normales a 1.8 en HSIL y de 1.4 en tejido normal a 2.6 en HSIL, en la zona superficial del epitelio (López-Morales et al., 2010). Roy y Chacraborty (2005) reportaron previamente una ligera elevación en el contenido de Sia total en lesiones inflamatorias benignas en tejido de cérvix, un aumento moderado en displasia severa y carcinoma preinvasor y un incremento mayor en carcinoma cervical invasor. Nuestro estudio confirma que existe una alteración en la expresión de Sia que acompaña el desarrollo neoplásico en CaCu.

De manera muy importante encontramos que las lesiones preneoplásicas presentan de una redistribución de Sia en el epitelio cervical: en el epitelio normal la reactividad con MAA específica para Sia  $\alpha 2,3$  se distribuye en el estrato medio en tanto que en las lesiones intraepiteliales de alto grado hay un aumento en la distribución hacia la zona apical llegando a abarcar el 66% del epitelio. La reactividad con SNA específica para Sia  $\alpha 2,6$  se mantiene el estrato intermedio en muestras de epitelio normal en tanto que en las lesiones de bajo y alto se incrementa la reactividad con SNA, la cual se detecta tanto en el



estrato intermedio como en la región apical. Ogawa (1992) reporta un aumento y redistribución del antígeno Sialil Tn en cáncer de cérvix con una fuerte expresión en lesiones primarias comparado con el tejido normal en donde apenas es detectable y se observa un importante cambio en el patrón de distribución de Sialil Tn con una tinción central en las lesiones primarias y una tinción periférica en lesiones metastásicas. Estas observaciones al igual que nuestro estudio sugieren que sólo el aumento en la expresión celular local del Sia se asocia con las alteraciones neoplásicas, sino que la redistribución en el epitelio cervical puede ser también un indicador del proceso de transformación neoplásica. Las implicaciones funcionales de este cambio en la distribución en el tejido no fueron evaluadas, sin embargo es reconocido que un aumento en el contenido de ácido siálico disminuye las interacciones homotípicas entre las células (Lee et al., 2012; Zhuo y Bellis, 2011). Al respecto, el manejo experimental de las biopsias de alto grado resultó más difícil por la disgregación que presentó el epitelio durante el procedimiento histoquímico con las lectinas (observación personal). El uso de otros marcadores de adhesión en futuros estudios pudiera revelar aspectos importantes de las consecuencias funcionales de la sobreexpresión de ácido siálico en CaCu.

A pesar de la consistencia de las observaciones en la elevación de ácido siálico en cáncer, estudios en cáncer de colon, reportan heterogeneidad en la reactividad con SNA así como de la actividad y/o expresión de ST6Gal I entre diferentes pacientes (Dall'Olio et al., 2000). Nosotros también observamos cierta heterogeneidad como es el caso de la muestra 34 con diagnóstico de epitelio normal en donde se observó una reactividad elevada con MAA en la región basal. Es posible que esas diferencias pudieran revelar polimorfismos particulares que pudieran afectar el desarrollo de la enfermedad.

Algunos reportes indican que el aumento en la expresión de Sia no es exclusiva de la transformación oncogénica ya que se ha observado que los niveles de TSA en suero también representan una medida de riesgo para la progresión de enfermedades cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólico y aterosclerosis (SüerGökmen et al., 2006; Nayaky Bhaktha, 2005; Browning et al., 2004; Lindberg et al., 1999). Sin embargo las observaciones experimentales indican la correlación positiva entre el aumento de Sia y la progresión tumoral, al respecto es importante resaltar que en dichos estudios se obtienen resultados directamente del tejido alterado en donde las funciones de Sia son específicas. La elevación de Sia en suero puede ser reflejo de que diversos elementos de

respuesta de fase aguda que son liberados al plasma son glicoproteínas, algunas altamente sialiladas, esta es una respuesta generalizada ante alteraciones homeostáticas causadas por infecciones, daño tisular, desórdenes inmunológicos y cáncer (Sarrats et., al., 2010; Robotti et., al., 2010; Cray et., al. 2009). Así mismo la enzima responsable de la síntesis del antígeno  $\alpha 2,6$  sialilactosamina responde a IL-6 (Dalziel, 1999), lo que puede explicar este aumento en otras patologías.

Debido a la asociación que existe entre el desarrollo de cáncer cervicouterino y la infección por virus de papiloma humano (VPH) falta aún determinar la posible relación entre las alteraciones de la glicosilación en CaCu y la infección por VPH, pudiendo ser un factor en la diferenciación de las lesiones premalignas con mayor riesgo de progresar a lesiones invasoras, provocado posiblemente por la persistencia de factores que activan procesos inflamatorios tales como las citocinas  $TNF\alpha$ , IL 1 y 6 entre otros, como se ha demostrado en procesos neurodegenerativos (Dalziel, 1999; Diaz et al., 2012) y en tumores pulmonares (Colomb et al., 2012). Nuestro trabajo sienta un precedente y manifiesta la necesidad de la utilización de otros marcadores de manera rutinaria en la detección del CaCu así mismo es importante la realización de estudios de seguimiento a largo plazo y con un mayor número de pacientes para determinar si los niveles de Sia son una herramientas de detección temprana y un indicador pronóstico para casos con alta probabilidad de reincidencia o de una evolución desfavorable. Así de incorporarse la detección de Sia a la par de la citología vaginal en la detección temprana de CaCu, las lesiones negativas a la citología pero con alteraciones en la expresión o en el enlace de ácido siálico, deberán tener un seguimiento cuidadoso. Este procedimiento disminuiría el número de casos de cáncer cervical o bien podría ser una herramienta de control en aquellos casos que se filtran como falsos negativos a la citología vaginal.

## CONCLUSIONES

En lesiones intraepiteliales cervicales que preceden a la transformación neoplásica se detecta un aumento gradual de ácido siálico con respecto al tejido normal

En las LEIAG el aumento de ácido siálico con enlace  $\alpha 2, 6$  se manifiesta en una redistribución de la expresión, observado por una mayor reactividad con la lectina SNA, a lo largo de los diferentes estratos del epitelio cervical.

En LEIBG el estrato basal del epitelio cervical presenta una baja reactividad de ácido siálico con enlace  $\alpha 2,6$ , con SNA que aumenta en intensidad en las LEIAGs con respecto al tejido normal.

El aumento de la sialilación  $\alpha 2,3$  en LEIAG se observa con una mayor reactividad con la lectina MAA en el estrato medio y superficial.

## CAPITULO 2.

### EXPRESIÓN DE ÁCIDO SIÁLICO MEDIADA POR RETINOIDES Y SUS EFECTOS SOBRE LA ADHESIÓN EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICOUTERINO

Existe la observación generalizada de que los niveles de oligosacáridos sialilados correlacionan con de los niveles de expresión de las sialil-transferasas (ST) que participan en la síntesis. El antígeno  $\alpha$ 2,6 sialil lactosamina es sintetizado por las enzimas ST6Gal I y ST6Gal II, sin embargo es reconocido que la STGal I es la enzima que contribuye a la presencia de esta estructura en, prácticamente, todos los tejidos de vertebrados (Takashima et al., 2003; Kitagawa y Paulson, 1994) ya que la ST6Gal II tiene una expresión altamente restringida a tejido nervioso (Krzewinski-Recchi et al., 2003).

Algunos estudios sobre las alteraciones de la expresión de sialilación con enlace  $\alpha$ 2,6 (Sia  $\alpha$ 2,6) indican correlación positiva entre la expresión de la ST6Gal I y la expresión de Sia  $\alpha$ 2,6. En cáncer colorectal, alrededor del 90% de los casos la actividad de la sialiltransferasa ST6Gal I se encuentra incrementada. La expresión elevada de la ST6Gal I se acompaña de una alta reactividad tisular con la lectina SNA y son indicadores de un mal pronóstico de sobrevivencia de apenas 5 años (Dall'Olio et al., 1989; 2001; Gangopadhyay et al., 1998). El incremento de la ST6Gal I es mayor en células metastásicas que en tumores primarios (Gessner et al., 1993). En cáncer de seno se ha reportado el incremento de la ST6Gal I y del antígeno CDw75, así como la expresión elevada del mensajero de la ST6Gal I, en este tipo de cáncer correlaciona con un diagnóstico histológico grado III (Recchi et al., 1998). En hepatocarcinoma aunque la expresión del ARNm de la ST6Gal I es heterogénea, con frecuencia los niveles más elevados de expresión se observan en pacientes con tumores con grado histopatológico 2; también se observa un mayor incremento en la reactividad con la lectina SNA, así como acumulación de glicoconjugados  $\alpha$ 2,6-sialilados; la observación de que en el desarrollo de cirrosis no se altera la expresión de la ST6Gal I ni la sialilación en  $\alpha$ 2,6 de glicoproteínas de superficie, indica que la alteración de la Sia  $\alpha$ 2,6 es un fenómeno asociado a la transformación neoplásica (Dall'Olio et al., 2004).

Dado que las moléculas que participan en fenómenos de adhesión celular son proteínas altamente glicosiladas, se ha propuesto que cambios en los patrones de glicosilación

modifican las propiedades de adhesión celular. Estudios in vitro sugieren que las alteraciones de la sialilación  $\alpha$ 2,6 en cáncer tienen relevancia funcional sobre las propiedades de adhesión de las células tumorales y que el incremento del ácido siálico favorece fenómenos de invasión e incrementa las propiedades metastásicas. La disminución en los niveles de Sia en la superficie celular mediada por el inhibidor de sialiltransferasa KI-8110, se acompaña de un decremento en la habilidad metastática en líneas celulares de cáncer de colon murino (Kijima-Suda y cols., 1986;). En células MDA-MB-435 de carcinoma mamario el aumento inducido por la transfección de la sialiltransferasa ST6Gal I, da como resultado un incremento en Sia de la superficie celular y una disminución en la adhesión célula-célula, acompañado de un incremento en la capacidad invasora de éstas células (Lin et al., 2002). En una variante celular de tumor de Ehrlich capaz de adherirse al sustrato, existe un incremento en la actividad de la sialiltransferasa que une con enlace  $\alpha$ 2,6, a diferencia de otras variantes que crecen en suspensión, en donde la actividad de ésta enzima es de 2 a 5 veces menor (Mostafapour et al., 1993).

Se ha propuesto que los fenómenos de invasión promovidos por el aumento de la sialilación  $\alpha$ 2,6 ocurre por vía de la regulación de integrinas. En la línea celular de colon humano SW948, carente de la ST6Gal I, la transfección con el cDNA de la enzima aumentó la adherencia celular a fibronectina y colágena tipo IV pero no a ácido hialurónico. El tratamiento con neuraminidasa redujo la unión a fibronectina y colágena IV y causó una acumulación y distribución focal de beta 1 integrinas en la superficie celular y una diferente distribución de las fibras de actina (Chiricolo, et al., 2006).

La expresión de sialiltransferasas está regulada en espacio y tiempo y los datos experimentales sugieren que esta regulación se da principalmente a nivel de regulación transcripcional de los genes de sialiltransferasas que participan en la síntesis (Svensson et al., 1990; Wang et al., 1993; Taniguchi 2000). También se ha observado que los cambios en los niveles de expresión del gen SIAT I, que codifica para la ST6Gal I, se deben a la regulación específica de isoformas de los transcritos del gen, sin embargo, los mecanismos particulares que regulan estos fenómenos son en gran parte desconocidos (Seales et al., 2003; Dalziel et al., 2004).

Se sabe que la expresión de la ST6Gal I es inhibida por n-butilato y los ésteres de forbol, en la línea celular HepG2 y en células de colon, respectivamente (Shah et al., 1992; Li et

al., 1998). En condiciones normales la expresión de la ST6Gal I es fuertemente inducida en hígado como proteína de fase aguda y en células endoteliales humanas es inducida por citocinas (Dalziel et al., 1999; Hanasaki et al., 1994;) y en intestino la expresión de la ST6Gal I es inducida por glucocorticoides (Wang et al., 1990).

A pesar de la clara relación entre los niveles de  $\alpha$ 2,6sialilación y los niveles de expresión de la ST6Gal I, se desconocen las vías de señalización que regulan su expresión. Los retinoides tienen la habilidad de inhibir o revertir el proceso de carcinogénesis debido a que inhiben la proliferación celular e inducen diferenciación celular (Zhu, et al., 1999; Miller et al., 1998) y se han utilizado solos o en combinación con otros agentes para el tratamiento de cánceres humanos (Lippman et al., 1996). En cáncer cervicouterino el AR se ha empleado acompañado de otras técnicas terapéuticas como es la radiación en el tratamiento para revertir la transformación neoplásica (Tillmanns et al., 2005). Los retinoides constituyen un grupo amplio de derivados naturales y sintéticos de la vitamina A. Estas sustancias participan en diferentes fenómenos celulares y se sabe que controlan el crecimiento normal, la diferenciación y la apoptosis durante el desarrollo embrionario y en los tejidos epiteliales el resto de la vida (Nagy et al., 1998). Sus efectos son mediados principalmente por la unión a receptores los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (RNs) que median los efectos de muchos componentes incluyendo hormonas esteroideas y tiroideas, vitamina D, prostaglandinas y drogas que activan la proliferación peroxisomal (Mangelsdorf et al., 1995).

Se conocen pocas moléculas que pueden afectar la expresión de la ST6Gal I, dentro de las cuales se sabe que algunas hormonas esteroideas como la dexametasona inducen la expresión del ARNm que codifica para esta enzima en fibroblastos de rata (Vandamme et al., 1993) y se sabe que en hígado e intestino en humanos la expresión de la ST6Gal I está regulada por glucocorticoides (Wang et al., 1989, 1990). El ácido retinoico se reportó como un inductor de la actividad de sialiltransferasas en células normales y transformadas de origen murino; el aumento en la actividad de STs mediada por retinoides origina un aumento en la sialilación de proteínas específicas (Moskal et al., 1987; Lotan et al.; 1984; 1988).

El interés de este estudio se centra conocer los efectos de retinoides sobre la expresión de la ST6Gal I, los niveles de ácido siálico  $\alpha$ 2,6 unido y las propiedades de adhesión en líneas celulares tumorales de cáncer cervicouterino

## **JUSTIFICACIÓN**

En algunos tipos de cáncer, la transformación neoplásica se acompaña de un aumento en la expresión del antígeno  $\alpha 2, 6$ -sialil lactosamina que correlaciona con el aumento en la expresión de la sialiltransferasa ST6Gal I. Estas alteraciones están relacionadas con el aumento en la capacidad invasora de las células tumorales ya que el aumento de ácido siálico modifica las propiedades de adhesión de las células tumorales. Por otro lado es aceptado que regulación en la expresión de la ST6Gal I ocurre principalmente a nivel transcripcional, sin embargo se desconocen las vías de señalización involucradas en la regulación de la expresión de la ST6Gal I. En cáncer cervicouterino se ha reportado el aumento de la ST6Gal I y su correlación con las características invasoras de los tumores. Ya que es bien sabido que los retinoides son importantes en la regulación de la expresión genética y se han utilizado en la terapia contra algunos tipos de cáncer incluyendo el cáncer cervicouterino, es importante estudiar si estos agentes reguladores de la transcripción genética, ejercen un efecto sobre la expresión de la ST6Gal I, así como sobre la expresión de ácido siálico y las propiedades de adhesión e invasión de las células tumorales.

## **RESULTADOS**

### **ESCRITO ENVIADO A PUBLICACIÓN**

Este trabajo permitió la generación del siguiente escrito enviado para su publicación

### **RETINOIC ACID EFFECT ON ALPHA 2,6 SIALYLATION OF CERVICAL CARCINOMA CELL LINE**

## **Retinoic acid effect on alpha 2,6 sialylation of cervical carcinoma cell line**

Dolores López-Morales<sup>a,b</sup>, Gerardo Santos-López<sup>a</sup>, Jesús Hernández<sup>c</sup>, Julio Reyes-Leyva<sup>a</sup>,  
Edgar Zenteno-Galindo<sup>b</sup>, Verónica Vallejo-Ruiz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Virología, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Km 4.5 Carretera Federal Atlixco-Metepec, Atlixco, Puebla. 74360 México

<sup>b</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. P.O. Box 70159, 04510 México.

<sup>c</sup>Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo 83000, Sonora, México.

Running title: Sialylation of carcinoma cells

\*Corresponding author

Tel/Fax: ±52 24 44 44 01 22

E-mail address: [veronica\\_vallejo@yahoo.com](mailto:veronica_vallejo@yahoo.com); veronica.vallejor@imss.gob.mx.



## **Abstract**

*Aims:* Retinoic acid (RA) inhibits the proliferation and increase sialylation and sialyltransferase activity in certain cell lines. Modifications of cellular glycosylation are common changes in malignancy. Increased sialylation has been related to grade, invasion and metastasis. Increased  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) gene and sialic acid expression have been detected in cervical cancer. The purpose of this study was to determine the effect of all-trans retinoic acid on the transcription of ST6Gal I gene,  $\alpha$ 2,6 sialic acid expression, cellular adhesion and invasion of cervical carcinoma cells.

*Main methods:* SiHa cells were incubated with RA. Sialic acid expression was analyzed by the  $\alpha$ 2,6 sialic acid specific *Sambucus nigra* agglutinin through cytochemistry and flow cytometry. ST6 Gal I transcription level was evaluated by RT-PCR. Cellular adhesion on collagen, fibronectin and laminin was determined. Cell invasion ability was evaluated by extracellular matrix material in Transwell invasion chambers.

*Key findings:* RA enhanced ST6Gal I gene and  $\alpha$ 2,6 sialic acid expression. Cellular adhesion to collagen, fibronectin and laminin was increased as well; moreover, RA at 50  $\mu$ M increased ( $p < 0.05$ ) invasive activity.

*Significance:* Our results shows that RA increased adhesion and invasiveness of cervical carcinoma SiHa cells and this could be a consequence of changes in surface sialylation.

**Key Words:** Retinoic acid, ST6Gal I, Sialic acid, Transcriptional regulation, Cervical cancer.

## Introduction

Alteration in cell surface carbohydrates is one of the most important changes occurring in malignant cells (Dennis et al. 1999; Kim and Varki 1997). The increasing expressions in some types of sialic acids and their different kind of linkages are relevant to cancer progression since a high level of sialylation has been associated with tumor development and invasive potential of tumor cells (Inagaki et al. 2007; Schneider et al. 2001). Although several sialylated structures have been described in cancer, the increase of  $\alpha$ 2,6 sialylation of lactosamine (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) is one of the most frequent changes reported in malignant cells (Dall'Olio 2000).

These changes in sialylated glycans are supported by the altered transcription of sialyltransferases, enzymes that transfer sialic acid to glycoconjugated structures (Harduin-Lepers et al. 2001). Changes in sialyltransferases expression have been observed in cancer tissues (Recchi et al. 1998; Senda et al. 2007; Wang et al. 2005). Furthermore, the sialyltransferase ST6Gal I, the enzyme responsible for the synthesis of the Sia6LacNAc antigen is one of the most frequently up-regulated sialyltransferase in human cancer (Dall'Olio et al. 2004; Poon et al. 2005; Raval et al. 2003). In cervical carcinoma with lymph node metastases, ST3Gal III and ST6Gal I showed increased expression as compared to those without metastases, ST6Gal I has been related with poor prognostic factors, such as deep stromal invasion, lymph or vascular space involvement (Wang et al. 2001; Wang et al. 2002). Even more, up-regulation of ST6Gal I has been observed in precancerous phases (CIN I, CIN II and CIN III), and this indicate that deregulation of ST6Gal I occurs early during neoplastic transformation (López-Morales et al. 2009). Increase of Sia6LacNAc expression on the membrane cell modifies cellular adhesion since

ST6Gal I cDNA transfection increases binding of cells to extracellular matrix (ECM) proteins and direct relation between sialic acid expression and metastatic capability of the cells has been found (Lin et al. 2002). Natural and synthetic compounds structurally related to retinol (vitamin A) are essential for cell growth, differentiation, and cell death (Gudas 1994; Lotan 1996). These compounds can mediate their actions through the retinoids and retinoid nuclear receptors (RAR and RXR). Direct effects result from modulation of the transcriptional activity of genes, which contain RA response elements recognized by trans-acting nuclear RA receptors (Gudas 1994). RA effect on sialyltransferase activity and sialylation of cell surface glycoproteins has been studied in different cell lines (Georgopoulou and Breen 2000; Lotan et al. 1988; Reboul et al. 1990; Seidenfaden and Hildebrandt 2001; Taniguchi et al. 2000). At the transcriptional level, the RA effect has been analyzed in polysialyltransferases: a decrease in the mRNA level of ST8SiaII and a drastic increase of ST8Sia IV have been observed in SH-SY5Y and LAN-5 cells (Seidenfaden and Hildebrandt 2001). In the glioblastoma cell line RA enhanced transcription of hST8Sia III gene (Kim et al. 2006). To date the effect of RA on ST6Gal I transcription and sialic acid expression on cervical cancer cells has not been evaluated. In this paper we analyzed the effect of RA on the transcriptional level of the ST6Gal I and the  $\alpha$ 2,6 sialic acid expression in SiHa cells, and adhesion and invasion capacity of these cells.

## **Materials and Methods**

### Reagents

Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) and extracellular matrix proteins were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA), fetal calf serum (FCS) was purchased from Gibco Life Technologies (Glasgow, UK). The RNA Purification kit was obtained from Promega Corporation, (Madison, WI, USA) and the RT-PCR kit from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), streptavidin-horseradish peroxidase and diaminobenzidine (DAB) were from Vector Labs (Burlingame, CA, USA). Streptavidin-Cy5 was from Pharmingen (San Diego, CA, USA).

#### Cell culture

Human cervical cancer cell line SiHa was cultured in DMEM, supplemented with 7% heat inactivated FCS, 10U/ml penicillin and 10  $\mu$ M/ml streptomycin. Cultures were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cell cultures in a subconfluent state were detached employing trypsin solution (0.25% in Hank solution). For experimental purposes, cells were plated on culture dishes, glass coverlips or on polycarbonate filters.

#### Retinoic acid treatment

Before treatment cells were incubated in medium without FCS during 24 hours for cell synchronization. After that RA was added to the cultures at different final concentrations (2.5 to 100  $\mu$ M); ethanol (vehicle) was added to the control medium and incubated. The maximum final ethanol content in the medium was 0.1%.

#### RNA extraction

For sialyltransferase mRNA analysis,  $6.0 \times 10^5$  cells were seeded in 35 mm culture dishes. After incubation for 3 h with RA, total RNA was extracted using RNeasy Total RNA

Isolation System kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. RNA was eluted in RNAase-free water and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. RNA concentration and quality were determined spectrophotometrically and by agarose gel electrophoresis.

#### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ST6Gal I, ST3Gal III and ST3Gal IV mRNA were amplified using previously reported primers (Recchi et al. 1998). In order to quantify expression of STs mRNA, relative expression of STs mRNA was compared with a housekeeping gene cyclophilin (Yasojima et al. 1998). RNAs were subjected to reverse transcription and polymerase chain reaction using the SuperScript One Step RT-PCR Kit (Invitrogen). The RT-PCR mixture consisted of 0.5  $\mu\text{l}$  RT/Platinum Taq mix, 12.5  $\mu\text{l}$  2X reaction mix, 0.8  $\mu\text{g}$  RNA template, and 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer and distilled water added to a final volume of 25  $\mu\text{l}$ . Samples were overlaid with two drops of mineral oil (Sigma Chemical Corp., St Louis, MO). Reactions were run in a PTC-100<sup>TM</sup> thermal cycler (MJ Reseach, Watertown, MA) using the following conditions: 55 $^{\circ}\text{C}$  for 30 min, 1 min at 94 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min at 58 $^{\circ}\text{C}$  and 1.5 min at 72 $^{\circ}\text{C}$ , 30 cycles for the ST3Gal III and ST3Gal IV, and 35 cycles for ST6Gal I as previously reported [15]. In all experiments, negative control reactions were done by replacing total RNA template with sterile water. Aliquots (10  $\mu\text{l}$ ) of RT-PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel equilibrated in Tris-borate-EDTA (TBE), stained with ethidium bromide (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), observed on a UV transilluminator, and photographed using a Kodak DC290 Zoom Digital Camera.

#### Semiquantitative analysis of mRNA expression

To quantify RT-PCR products, image analysis was performed using the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The density of each ST band was compared with that of cyclophilin, and the ratio (density units of ST band/density units of cyclophilin) was calculated. mRNA level was determined in two independent experiments with two repetitions each and the average was obtained.

#### Lectin cytochemistry

Cells were seeded at  $6.0 \times 10^5$  in cover slides placed in 35 mm Petri dishes and treated with RA for 3 h. Then cells were fixed with 0.1% paraformaldehyde during 10 min. After that cells were incubated in methanol containing 0.3%  $H_2O_2$  for 30 min to block the activity of endogenous peroxidase. Each step was followed by washing three times with TN (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl). Cells were incubated with blocking buffer (0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% blocking reagent, supplied in kit) for 30 min. Cells were incubated with 1  $\mu$ g/ml biotin-conjugated SNA for 1 h. After this, cells were incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin for 30 min. Reactions were developed with 0.01% diaminobenzidine/ $H_2O_2$  (DAB). Cells were counterstained with hematoxylin.

Enzymatic desialylation was performed by incubating tissue sections with neuraminidase from *Clostridium perfringens* (50mU/ml in 50mM citrate pH 6.0, 0.9% NaCl, 0.1%  $CaCl_2$ ) for 30 min at 37°C.

#### Flow cytometry analysis

After RA treatment cells were detached with EDTA (0.5%), harvested and washed once with PBS. Cells ( $5 \times 10^5$ ) were incubated with biotin labeled SNA diluted in phosphate buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide (PBA)

at 25°C for 30 min and washed twice with ice-cold PBA. Afterward cells were incubated with streptavidin-Cy5 (dilution 1:500; Pharmingen) for 30 min in the dark. Cells were washed twice with cold PBA, resuspended in 100 µl FACS Flow buffer and analyzed in an Excalibur Bectin and Dickinson Cell sorter apparatus (FACs Mountain View, CA). At least 10 000 events were acquired and the results were expressed as the percentage of SNA-positive cells.

#### Cell adhesion assay

Ninety-six-well plates were coated, overnight at 4°C with laminin, fibronectin, collagen or SNA lectin, 5 µg/ml in PBS buffer (100 µl well), blocked with 1% BSA/PBS for 2hr at room temperature (200 µl/well) and washed twice with PBS. Cells detached with EDTA (0.05% in PBS) were seeded in 96-well plates ( $2.5 \times 10^4$  cell/well) in 100 µl of DMEM and incubated with RA (25 to 100 µM) for 1h at 37°C. The cells were washed gently twice with cold PBS and the remaining adhered cells were fixed with 1% formaldehyde and subsequently stained with 1% crystal violet solution and solubilized with 0.1% Triton. Absorbance of the solution dye was measured at 540 nm using a microplate spectrophotometer (Diagnostics Pasteur LP400). Values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three experiments.

#### Cell invasion assay

Transwell invasion chambers containing polycarbonate filters (8 µM, Costar Corp. Cambridge MA) were coated on the upper surface with 100 µl of ECM gel diluted in DMEM. (Sigma). Cells were suspended in serum-free DMEM and loaded on the upper chamber ( $1 \times 10^5$ ). The lower chamber contained DMEM and 20% of FSC, RA was added

at 50  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ . Cells were incubated 42 h at 37°C, noninvading cells and the ECC gel were mechanically removed using cotton swabs, and the microporous membrane containing the cells that had invaded it, was fixed 10 min in 10% paraformaldehyde, stained with Wright solution and counted under a light microscope at a magnification of 200X. The numbers of cells in six randomly chosen fields were determined for each filter, and the counts were expressed as the means  $\pm$  SD. The assay was done in duplicate.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). An unpaired t test was used to evaluate the significant differences between groups with a p value  $<0.05$ .

## Results

### RA modified sialyltransferases mRNA levels

The effects of RA on the transcriptional level of ST6Gal I, ST3Gal III and ST3Gal IV were determined by RT-PCR. The PCR products were analyzed by densitometry, and the ratio of STs/cyclophilin was calculated for all experimental conditions. RA at concentration of 2.5  $\mu\text{M}$  did not showed effect on the transcriptional level of any of the sialyltransferases; at 20  $\mu\text{M}$  RA increased 0.6 fold only the ST6Gal I mRNA (data not shown). The maximal effect was observed at 50  $\mu\text{M}$  whereas at 100  $\mu\text{M}$  not additional increase of transcriptional level of the ST6Gal I was observed. For control SiHa cells, the ST6Gal I densitometry mean value was of 0.41; for cells incubated with 50  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  of RA the ST6Gal I mean



value was 1.03 and 0.95, respectively. The results show that RA at 50 and 100  $\mu\text{M}$  enhanced 1.5 and 1.3 fold, respectively, the ST6Gal I mRNA within 3 h (Fig. 1a). The increase in ST6Gal I mRNA showed statistical significance ( $p < 0.05$ ) at both RA concentrations when compared with control samples. For ST3Gal III and ST3Gal IV, no RA effect on the transcriptional level was found (Fig. 1b and 1c). When we incubated HeLa cells (cervical adenocarcinoma) with RA we did not find any effect on the transcriptional level of ST6Gal I (data not shown).

#### Sialic acid expression

To determine the effect of RA on  $\alpha 2,6$  sialic acid expression, SiHa cells were incubated with RA at 50 and 100  $\mu\text{M}$  for 3 h. Sialic acid expression was determined with SNA lectin through cytochemistry assays. Result showed both concentration of RA increased the expression of  $\alpha 2,6$  sialic acid (Fig. 2a-c).

In order to confirm the increased expression of  $\alpha 2,6$  sialic acid, SiHa cells were incubated with RA at a 50  $\mu\text{M}$  concentration for 3 h, and a flow cytometry assay was performed with SNA. This assay confirmed that  $\alpha 2,6$  sialic acid expression increased the percentage of positive cells after incubation with retinoic acid ( $10.93 \pm 1.93$ ) as compared with ethanol treated cells ( $4.56 \pm 2.3$ ) (Fig. 3a and 3b).

#### Adhesion assays

To determine if the increase in  $\alpha 2,6$  sialic acid expression due RA modifies the cellular adhesion to ECM, adhesion assays were performed on SiHa cells incubated with RA (50  $\mu\text{M}$  as optimal concentration). The ECM laminin, fibronectin and collagen as well as the

SNA lectin were used. After incubation with RA, SiHa cells increased adhesion to fibronectin, laminin and collagen in 26, 32 and 27%, and to SNA lectin in 53% with respect to control cells (Fig. 4). The increase obtained for all molecules was statistically significant ( $p < 0.05$ ).

#### Invasion assays

RA effect on the invasive activity of SiHa cells was assayed by the Transwell method with ECM coated filters. The results showed an increased in the invasive activity of SiHa cells after incubation with RA at 50  $\mu\text{M}$  ( $56.5 \pm 10.6$ ) with respect to cells treated with ethanol ( $28 \pm 1.41$ ) used a control (Fig. 5).

#### **Discussion**

Retinoids are important regulators of epithelial cell differentiation (Helm et al. 2007). The effects of RA are mediated through binding to RARs and RXRs. In cervical cancer tissue an increased sialylation related with the pathological process has been found (Roy and Chakraborty 2005). The ST3Gal III and ST6Gal I mRNA were found significantly increased in cervical cancers with lympho-vascular space involvement (Wang et al. 2002). This transcriptional deregulation has been observed in cervical premalignant tissue (López-Morales et al. 2009). These findings suggest that the transcriptional regulation of sialyltransferase genes is altered during malignant transformation. To gain a full understanding of the roles of sialylation in malignant transformation, it is important to define the mechanisms regulating transcriptional level of sialyltransferases and their cognate sialylated structures involved in invasion and metastasis.

In this work we showed that RA at concentrations of 50 and 100  $\mu\text{M}$  increased the ST6Gal I gene expression in SiHa cells, but did not modify ST3Gal III and ST3Gal IV genes expression. In HeLa cells, we did not detect changes in the sialyltransferases gene expression analyzed. The RA effect on STs genes expression has been analyzed mostly in cases with cell differentiation, with variable results, depending on the cell type and the ST studied. RA effect on the transcriptional level of STs has been studied more for  $\alpha 2,8$  STs (Seidenfaden and Hildebrandt 2001; Kim et al. 2006). During neuronal differentiation of murine Neuro2A cells induced with RA, the ST8Sia III mRNA expression increased 1.4 to 1.7-fold (Sato et al., 2002). In a glioblastoma cell line, U-87MG, induction of hST8Sia III by RA is regulated at the transcriptional level in a dose- and time-dependent manner via a direct RA binding site in the promoter gene region of hST8Sia III (Kim et al. 2006). Frequently, opposed effects have been obtained for related STs that compete for the same substrate in neuroblastoma cells; whereas a decrease in mRNA level of ST8SiaII is observed, an increase is observed for ST8Sia IV after 6 days of incubation with 10  $\mu\text{M}$  of all-trans RA (Seidenfaden and Hildebrandt 2001). Differentiation of HL-cells with RA showed a decrease of ST6Gal I and ST3Gal IV mRNA after 1 day of incubation (Taniguchi et al. 2000).

In the present study the time course of ST6Gal I transcripts induction by RA in SiHa cells was of 3 h, indicating that this gene is induced like other known as early or primary genes (La Rosa and Gudas 1988; Murphy et al. 1988). Their activation results from the interaction of a dimeric complex with their promoters (Gudas 1990; Hu and Gudas 1990). Secondary or late genes are induced after a long time (1 or more days) (Gudas 1990).

Altogether our results might be reflecting the specific cell response to RA and the specific mechanism that regulates sialyltransferase expression in a cell type specific manner. More

detailed studies may provide answers to the significance of early ST6Gal I induction in response to RA in SiHa cells.

After incubation with RA we observed an increased  $\alpha$ 2,6 sialylation of SiHa cells; this result agrees with the enhanced ST6Gal I mRNA. It is generally accepted that the biosynthesis of a given sialylated structure is regulated mainly by the expression of the cognate sialyltransferase (Lin et al. 2002). In our study, besides the increased expression of ST6Gal I RNA and  $\alpha$ 2,6 sialic acid, we obtained an enhanced cell adhesion to laminin, fibronectin and collagen IV after incubation with RA. These molecules are part of the extracellular matrix and they play an important role in cell-extracellular matrix interactions. In a general way, the increased adhesion to MEC proteins reduces homotypic cell interactions and enhances cell motility and invasion.

It is well documented that sialylated oligosaccharides are involved in cellular adhesion, migration and metastasis of tumor cells (Collard et al. 1986; Morgenthaler et al. 1990). In vitro transfection assays indicated that expression of ST6Gal I in human cell lines of breast and colon cancer increases the cell adhesion to matrix extracellular proteins such as laminin, fibronectin and collagen, at the same time increasing cell motility and metastatic potential of cancer cells (Lin et al. 2002; Chiricolo et al. 2006).

In our study RA also increased invasion of SiHa cells, this result is related to the enhanced sialylation and ST6Gal I gene expression, as well as the observed higher adhesion.

Increases in Sia6LacNAc levels have been correlated with enhanced cell motility and invasiveness in vitro (Hedlund et al. 2008; Seales et al. 2005). Introduction of antisense oligonucleotides of ST6Gal-I cDNA into colon and breast cancer cells reduced the invasive cell properties (Lin et al. 2002; Zhu et al. 2001). Identification of mechanisms by which

ST6Gal I expression is regulated could be used to modify its expression pattern during neoplastic transformation; in our system, RA enhanced ST6 Gal I gene expression, and this correlated with increased  $\alpha$ 2,6 sialylation of SiHa cells.

### **Conclusion**

RA increased  $\alpha$ 2,6 sialylation, ST6Gal I gene transcription and enhanced the cellular adhesion to ECM and the invasion properties of SiHa cells; thus the use of RA in the treatment of cervical neoplasia must be evaluated. Our results open new perspectives in the search of factors that modify cell surface  $\alpha$ 2,6 sialylation and its effects.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from Instituto Mexicano del Seguro Social (FP-2003/031, IMSS-2004-102 and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) SALUD-2005-C01-13918, Mexico. López Morales has a scholarship from CONACYT and from IMSS.

Conflict of interest: No conflict of interest to declare.

## References

- Chiricolo M, Malagolini N, Bonfiglioli S, Dall'Olio F. Phenotypic changes induced by expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase I in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology* 16 (2), 146-154, 2006.
- Collard JG, Schijven JF, Bikker A, La Riviere G, Bolscher JG, Roos E. Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas. *Cancer Research* 46 (7), 3521-3527, 1986.
- Dall'Olio F. The sialyl-alpha2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconjugate Journal* 17 (10), 669-676, 2000.
- Dall'Olio F, Chiricolo M, D'Errico A, Gruppioni E, Altimari A, Fiorentino M, Grigioni WF. Expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase and of alpha2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis. *Glycobiology* 14 (1), 39-49, 2004.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473 (1), 21-34, 1999.
- Georgopoulou N, Breen KC. Retinoic acid induction of sialyltransferase activity in neuroblastoma cells of differing sialylation potentials. *Glycoconjugate Journal* 17 (11), 781-786, 2000.
- Gudas LJ. Molecular mechanisms of retinoid action. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2 (4), 319-320, 1990.
- Gudas LJ. Retinoids and vertebrate development. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (22), 15399-15402, 1994.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83 (1), 727-737, 2001.
- Hedlund M, Ng E, Varki A, Varki NM. Alpha 2-6-linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. *Cancer Research* 68 (2) 388-394, 2008.
- Helm CW, Lorenz DJ, Meyer NJ, Rising WR, Wulff JL. Retinoids for preventing the progression of cervical intra-epithelial neoplasia. *Cochrane Database of System Reviews* CD003296, 2007.
- Hu L, Gudas LJ. Cyclic AMP analogs and retinoic acid influence the expression of retinoic acid receptor alpha, beta, and gamma mRNAs in F9 teratocarcinoma cells. *Molecular and Cell Biology* 10 (1), 391-396, 1990.
- Inagaki Y, Tang W, Guo Q, Kokudo N, Sugawara Y, Karako H, Konishi T, Nakata M, Nagawa H, Makuuchi M. Sialoglycoconjugate expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph node tissues. *Hepatogastroenterology* 54 (73), 53-57, 2007.
- Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate Journal* 14 (5), 569-576, 1997.
- Kim SJ, Choi HJ, Jin UH, Lee YC, Kim CH. Transcriptional regulation of the human Sia-alpha2,3-Gal-beta1,4-GlcNAc-R:alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia III) by retinoic acid in human glioblastoma tumor cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* 1759 (10), 451-457, 2006.
- LaRosa GJ, Gudas LJ. An early effect of retinoic acid: cloning of an mRNA (Era-1) exhibiting rapid and protein synthesis-independent induction during teratocarcinoma stem cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 85 (2), 329-333, 1988.

- Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 276 (1), 101-110, 2002.
- López-Morales D, Velázquez-Márquez N, Valenzuela O, Santos-López G, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Enhanced sialyltransferases transcription in cervical intraepithelial neoplasia. *Investigacion Clinica* 50 (1), 45-53, 2009.
- Lotan R, Lotan D, Amos B. Enhancement of sialyltransferase in two melanoma cell lines that are growth-inhibited by retinoic acid results in increased sialylation of different cell-surface glycoproteins. *Experimental Cell Research* 177 (2), 284-294, 1988.
- Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention. *The FASEB Journal* 10 (9), 1031-1039, 1996.
- Morgenthaler J, Kemmner W, Brossmer R. Sialic acid dependent cell adhesion to collagen IV correlates with in vivo tumorigenicity of the human colon carcinoma sublines HCT116, HCT116a and HCT116b. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 171 (2), 860-866, 1990.
- Murphy SP, Garbern J, Odenwald WF, Lazzarini RA, Linney E. Differential expression of the homeobox gene Hox-1.3 in F9 embryonal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 85 (15), 5587-5591, 1988.
- Poon TC, Chiu CH, Lai PB, Mok TS, Zee B, Chan AT, Sung JJ, Johnson PJ. Correlation and prognostic significance of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase and serum monosialylated alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 11 (42), 6701-6706, 2005.
- Raval GN, Patel DD, Parekh LJ, Patel JB, Shah MH, Patel PS. Evaluation of serum sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in oral cavity cancer. *Oral Diseases* 9 (3), 119-128, 2003.
- Reboul P, Broquet P, George P, Louisot P. Effect of retinoic acid on two glycosyltransferase activities in C6 cultured glioma cells. *The International Journal of Biochemistry* 22 (8), 889-893, 1990.
- Recchi MA, Hebbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP, Delannoy P. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Research* 58 (18), 4066-4070, 1998.
- Recchi MA, Harduin-Lepers A, Boilly-Marer Y, Verbert A, Delannoy P. Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells. *Glycoconjugate Journal* 15 (1), 19-27, 1998.
- Roy A, Chakraborty S. Detection of cancer cervix by estimation of sialic acid. *Journal of the Indian Medical Association* 103 (11), 589-590, 2005.
- Sato C, Matsuda T, Kitajima K. Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (47), 45299-45305, 2002.
- Schneider F, Kemmner W, Haensch W, Franke G, Gretschel S, Karsten U, Schlag PM. Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha2,6-sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Research* 61 (11), 4605-4611, 2001.
- Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer

- progression by up-regulating cell motility. *Cancer Research* 65 (11), 4645-4652, 2005.
- Seidenfaden R, Hildebrandt H. Retinoic acid-induced changes in polysialyltransferase mRNA expression and NCAM polysialylation in human neuroblastoma cells. *Journal of Neurobiology* 46 (1), 11-28, 2001.
- Senda M, Ito A, Tsuchida A, Hagiwara T, Kaneda T, Nakamura Y, Kasama K, Kiso M, Yoshikawa K, Katagiri Y, Ono Y, Ogiso M, Urano T, Furukawa K, Oshima S. Identification and expression of a sialyltransferase responsible for the synthesis of disialylgalactosylgloboside in normal and malignant kidney cells: downregulation of ST6GalNAc VI in renal cancers. *The Biochemical Journal* 402 (3), 459-470, 2007.
- Taniguchi A, Hasegawa Y, Higai K, Matsumoto K. Transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene during differentiation of the HL-60 cell line. *Glycobiology* 10 (6), 623-628, 2000.
- Wang PH, Li YF, Juang CM, Lee YR, Chao HT, Tsai YC, Yuan CC. Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecologic Oncology* 83 (1), 121-127, 2001.
- Wang PH, Li YF, Juang CM, Lee YR, Chao HT, Ng HT, Tsai YC, Yuan CC. Expression of sialyltransferase family members in cervix squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Gynecologic Oncology* 86 (1), 45-52, 2002.
- Wang PH, Lee WL, Juang CM, Yang YH, Lo WH, Lai CR, Hsieh SL, Yuan CC. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. *Gynecologic Oncology* 99 (3), 631-639, 2005.
- Yasojima K, Kilgore KS, Washington RA, Lucchesi BR, McGeer PL. Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circulation Research* 82 (11), 1224-1230, 1998.
- Zhu Y, Srivatana U, Ullah A, Gagneja H, Berenson CS, Lance P. Suppression of a sialyltransferase by antisense DNA reduces invasiveness of human colon cancer cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1536 (2-3), 148-160, 2001.



## Figure captions

**Fig. 1. RT-PCR analysis of STs mRNA of SiHa cells.** SiHa cells were treated with 50 $\mu$ M and 100  $\mu$ M of RA during 3 h. Cell control cultures were incubated with ethanol (vehicle) and mRNA levels were evaluated by RT-PCR. Results show a PCR product ratio of STs/cyclophilin. Values represent the means  $\pm$  SD from three independent experiments, \* represents significant differences analyzed by Student's t test, ( $p < 0.05$ ). Gels show RT-PCR products for each sialyltransferase and cyclophilin that were run in 1% agarose gel with ethidium bromide. a) ST6Gal I analysis, b) ST3 Gal III analysis and c) correspond to ST3Gal IV analysis.

**Fig. 2. Cytochemistry of SiHa cells for  $\alpha$ 2,6 sialic acid expression.** SiHa cells were incubated with RA for 3 h,  $\alpha$ 2,6 sialic acid expression was detected with biotin labelled SNA lectin, by SA-HRP technique, revealed with DAB, counterstained with hematoxylin, and observed optically at 100X magnification. (a) Control SiHa cells (b) SiHa cells treated with RA 50 $\mu$ M, and (c) 100 $\mu$ M.

**Fig. 3. Flow-cytometric analysis for  $\alpha$ 2,6 sialic acid expression. A.** SiHa cells were incubated 3 h with ethanol (a); or RA 50 $\mu$ M (b). Cell suspension was incubated with FITC-SNA lectin and 10 000 cells were analyzed. **B.** Percentage of positive cells incubated with ethanol or RA 50  $\mu$ M and detected with SNA lectin.

**Fig. 4. Adhesion assays of SiHa cells to ECM and SNA lectin.** SiHa cells were plated onto tissue culture dishes coated with either fibronectin (FN), laminin (LN), collagen (CN) or *Sambucus nigra* lectin (SNA). Cell adhesion was measured in absence (T) or presence of 50 $\mu$ M RA. Adhered cells were measured colorimetrically by crystal violet staining as described in Materials and Methods. Values are expressed as mean  $\pm$  SD of three experiments (\*p value <0.05).

**Fig. 5. In vitro invasion assay of SiHa.** Cells were incubated with 50  $\mu$ M RA during 42 h and assayed for the invasive activity. Invasive cells were counted under a microscope. Bars depict means  $\pm$ SD of duplicate experiments.

Fig. 1

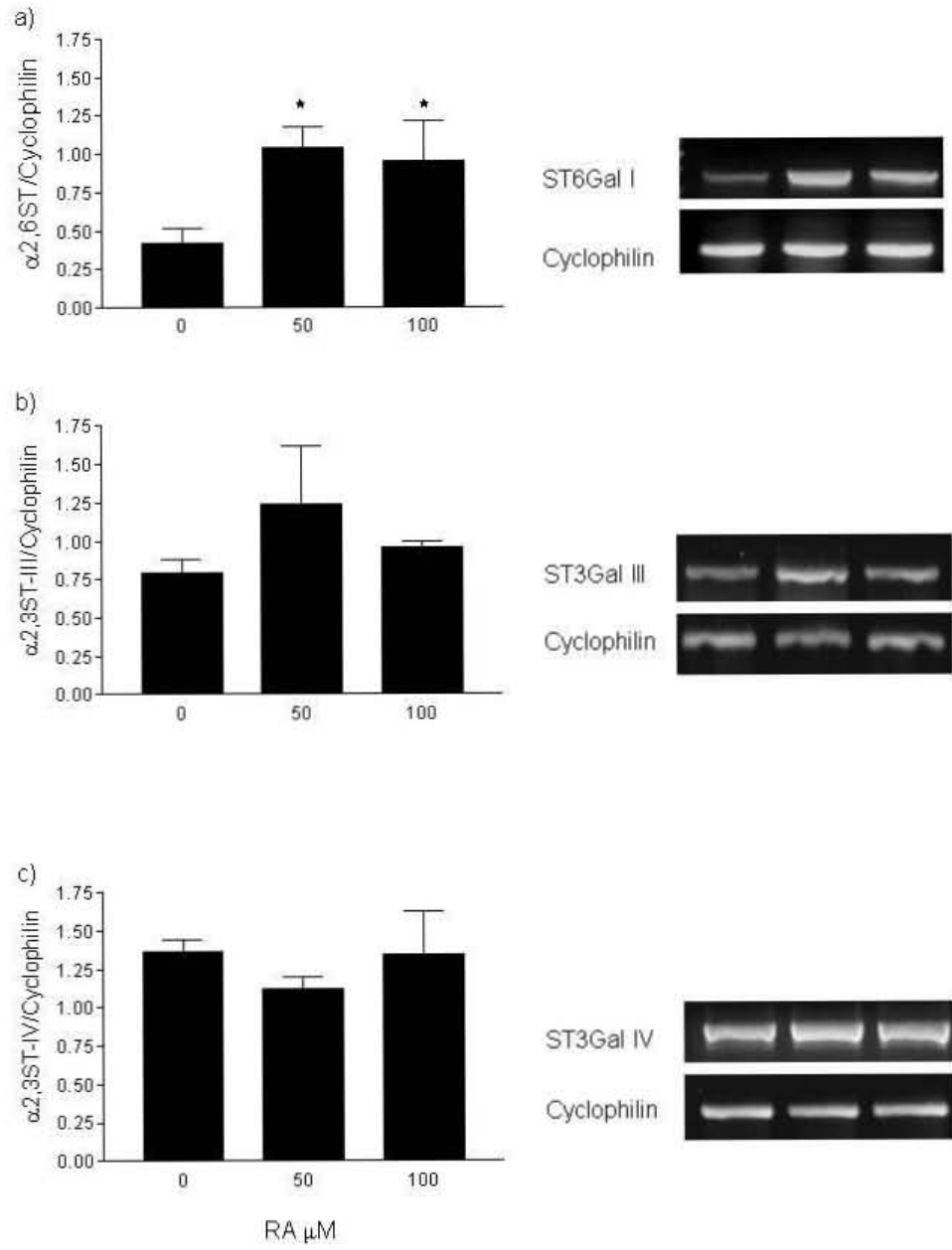


Figure 2

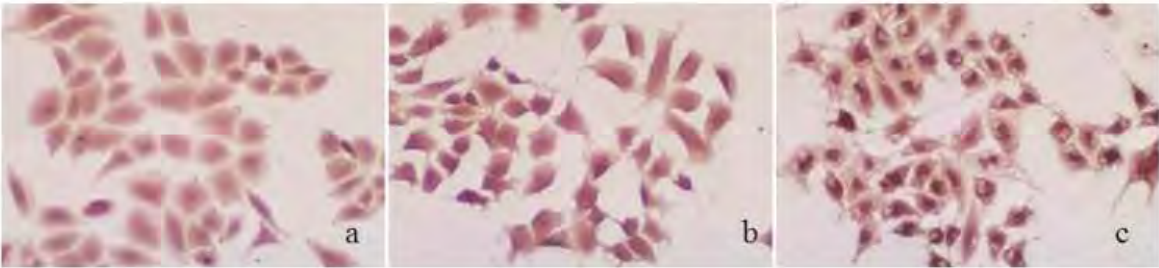


Figure 3

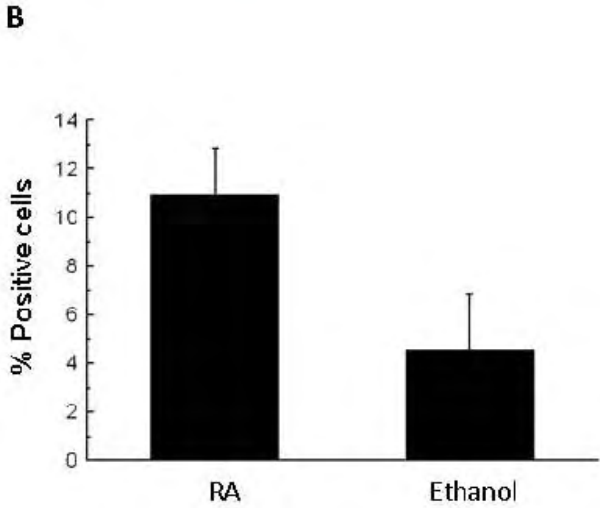
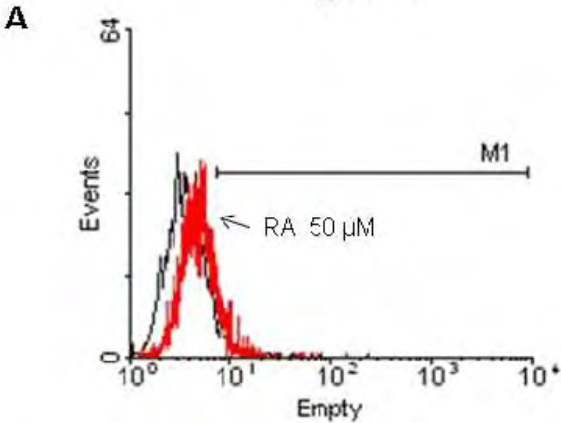


Figure 4

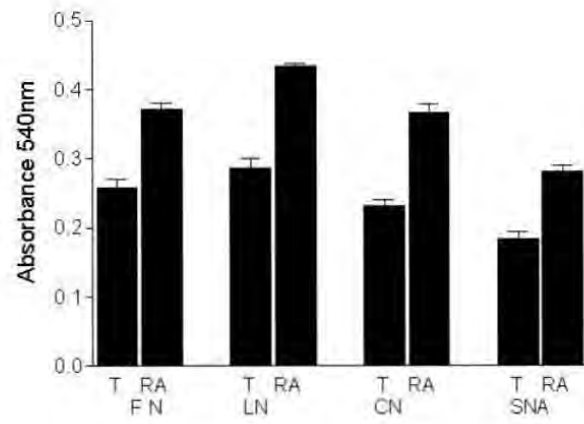
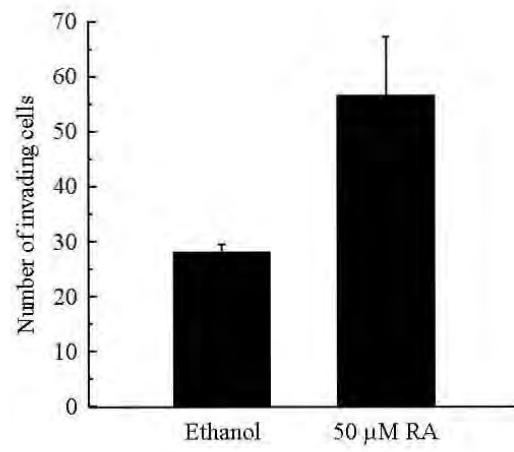


Figure 5



## DISCUSIÓN

Los niveles de expresión de las sialiltransferasas son mantenidos por mecanismos de regulación transcripcional que dirigen la expresión de diferentes isoformas del ARNm de manera tejido específica y que dan lugar a la misma proteína (Lo y Lau, 1996; 1999; Xu et al., 2003). Son pocas las moléculas que se conocen que afectan la expresión de la ST6Gal I: en hígado e intestino humano la expresión de la ST6Gal I está regulada por glucocorticoides (Wang et al., 1989, 1990) y en fibroblastos de rata la dexametasona induce la expresión del ARNm de la ST6Gal I (Vandamme et al., 1993).

Debido a que los retinoides son reguladores importantes del crecimiento y diferenciación epitelial, en este trabajo nosotros utilizamos ácido retinóico (AR) para identificar su efecto en la expresión de la ST6Gal I. Encontramos que el AR induce la transcripción de la ST6Gal I en células SiHa cuando son tratadas a dosis de 50 y 100  $\mu$ M. Esta inducción es específica sobre el mensajero de la ST6Gal I y no modifica los niveles de expresión de otras sialiltransferasas como son la ST3Gal III y ST3Gal IV. Aunque previamente se identificó al AR como un inductor de la actividad de sialiltrasferasas en células normales y transformadas de origen murino, dichos estudios no permiten aclarar si el aumento en la actividad se debe a un aumento en la cantidad de enzima presente, ni la enzima específica (Moskal et al., 1987; Lotan et al.; 1984; 1988).

De manera interesante identificamos la posibilidad de que la inducción de la ST6Gal I por AR sea específica para el tipo celular, pues en la línea celular de adenocarcinoma de cervix HeLa, el AR no modifica los niveles de expresión de los mensajeros de las STs estudiadas. Esto se explica en base a la especificidad con que se expresan el antígeno sialil-lactosamina en diferentes tejidos (Dall'Olio, 2000). En nuestro estudio las células Siha tienen un origen de carcinoma escamoso epitelial, en tanto que las HeLa provienen de un adenocarcinoma. Otros reportes presentan diferencias en la expresión en función de la ST y el tejido estudiado, por ejemplo: en células leucémicas el tratamiento con AR causa un decremento del ARNm de la ST6Gal I y una inducción de la ST3Gal IV después de un día de incubación con AR (Taniguchi et al., 1999).

Algunos trabajos de investigación han explorado la expresión de genes de STs, durante la diferenciación inducida por AR y han obtenido resultados variables, en función del tipo celular y de la ST estudiada, tal como fueron reportados en nuestro trabajo. En células de origen murino Neuro2A, se ha observado una inducción del ARNm de la ST8Sia III

durante diferenciación dependiente de AR, los niveles de expresión se incrementan de 1.4 a 1.7 veces con respecto al control (Lui et al., 1997). En la línea celular de glioblastoma U-87MG la hST8Sia III es regulada por AR vía un sitio de unión para RAR en la región promotora del gen, la inducción del ARNm ocurre en forma dosis dependiente (Kim et al., 2006). También se observan resultados opuestos para otras STs que compiten por el mismo sustrato, por ejemplo se ha observado simultáneamente una regulación negativa sobre los niveles del ARNm de la ST8Sia II y positiva sobre la ST8Sia IV en células de neuroblastoma después de 6 días de tratamiento con 10  $\mu$ M de all- trans AR (Seidenfaden y Hildebrandt, 2001). En células leucémicas el tratamiento con AR causa un decremento del ARNm de la ST6Gal I y una inducción de la ST3Gal IV después de un día de incubación con AR. Nuestros resultados indican que la inducción de la ST6Gal I por AR es específica para esta enzima y que en las condiciones ensayadas el AR no tiene efecto, sobre la inducción de otras ST como la ST3Gal III y ST3Gal IV las cuales son STs que compiten por el sustrato aceptor con la ST6Gal I pero que forman un enlace  $\alpha$ 2,3-, lo que refleja la especificidad en la regulación de la expresión de  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 sialoglicanos.

En el presente estudio observamos el aumento del ARNm de la ST6Gal I por AR, a tan sólo 3 horas de tratamiento en células de carcinoma escamoso de cérvix SiHa. Este resultados sugiere una respuesta rápida cómo la de los genes clasificados como genes de respuesta temprana que se inducen transitoriamente en las primeras 24 horas del estímulo y en ausencia de la síntesis de novo de otras proteínas (Sng et al., 2004). A diferencia de muchos estudios que analizan los efectos después de 48 horas de tratamiento, en parte porque el AR se utiliza como un inductor de fenómenos de diferenciación, nosotros decidimos medir la respuesta a tiempos cortos debido a que en nuestros estudios preliminares de inducción a las 6, 12 y 24 horas de tratamiento con AR observamos un incremento en los niveles del ARNm a las 6 horas (datos no mostrados). Cuando analizamos tiempos más cortos nos dimos cuenta que el ARNm se inducía de manera constante desde las 2 horas de tratamiento. A pesar de que el mecanismo por el cual el AR ejerce su efecto sobre la expresión de la ST6Gal I no fue explorado, es probable que el efecto observado sea mediado como en los genes de respuesta temprana por la activación de vías de señalización y la unión de factores de transcripción sin la necesidad de la síntesis de novo (Thomson et al., 1999). También es posible que la inducción de la ST6Gal I sea regulada por un mecanismo indirecto debido a la acción de factores de transcripción como AP-2 el cual se sabe que es inducido por AR (Lüscher et

al., 1989), dado que en la región promotora del gen SIAT 1 existen secuencias consenso para la unión de AP-2, aunque su funcionalidad no ha sido explorada (Svensson et al., 1990; Xu et al., 2003; Milflores-Flores et al., 2012)

En nuestro estudio cuando incubamos células SiHa con AR observamos un aumento en los niveles de Sia en la superficie celular. Esto es relevante en términos de que el aumento de Sia en cáncer correlaciona positivamente con los niveles de expresión de las STs que participan en la síntesis de sialoglicanos (Dall'Olio et al.; 2001; 2004; Gangopadhyay et al., 1998; Recchi et al., 1998; Burchell et al., 1999; Taniguchi et al., 2001; Gretschel et al., 2003). Nuestras observaciones corroboran la correlación positiva entre el aumento en la expresión del ARNm de la ST6Gal I y el aumento en la  $\alpha$ 2,6 sialilación y aportan nueva información sobre las moléculas que afectan la expresión de STs.

Uno de los aspectos más relevantes de la biología celular y molecular, es identificar la relación que existe entre las estructuras a nivel molecular y las funciones o procesos específicos en los que están involucradas. En nuestro estudio observamos que el tratamiento de células SiHa con AR aumenta la adhesión celular a laminina, fibronectina y colágena IV, esta observación es importante puesto que se ha propuesto que oligosacáridos sialilados están involucrados en la migración y metástasis de las células tumorales (Collard et al. 1986; Morgenthaler et al. 1990). Nuestro estudio indica que la unión es mediada por Sia $\alpha$ 2,6 puesto que cuando se realiza el ensayo de adhesión con la lectina SNA también observamos un aumento en la unión con respecto a las células no tratadas. Nuestros resultados concuerdan con las observaciones de Lin y colaboradores (2002) y de Chiricolo y colaboradores (2006) los cuales reportan que en células de carcinoma mamario y en la línea celular de colon humano SW948, el aumento en la expresión de la ST6Gal I aumenta la adhesión a moléculas de matriz extracelular tales como laminina, fibronectina y colágena.

En nuestro estudio también reportamos un aumento en la capacidad de invasión de las células SiHa tratadas con AR en un modelo de invasión de membrana basal. Nuestro resultado sugiere que el aumento en el número de células que atraviesan la membrana hacia el matrigel, es reflejo de un aumento en la motilidad celular favorecida por el aumento de Sia  $\alpha$ 2,6, esto en base a los reportes de Seales (2003, 2005) que indican que en células de adenocarcinoma de colon y de cáncer de ovario hipersialilación de  $\beta$ 1-



Integrinas y contribuye a la progresión tumoral al promover la motilidad celular aumentando la migración haptotáctica hacia colágeno y laminina que son componentes de la matriz extracelular (MEC).

Nuestras observaciones plantean interrogantes sobre el papel de los retinoides en tanto que planteamos un ejemplo desfavorable con su aplicación. Al respecto. Los efectos adversos de AR y otras vitaminas ya han sido reportados: Robinson y colaboradores (2012) reportan un efecto morfológico adverso en un modelo de cultivo embrionario completo. También se han reportado efectos adversos de la administración de tocoferol (vitamina E) durante la regeneración hepática (Sánchez-Sevilla, et al., 2012). Adicionalmente se deben tomar en cuenta el modelo experimental y la vía de administración del AR ya que Van Neerven y colaboradores (2010) reportan efectos diferenciales del AR en un modelo de daño de espina dorsal, de manera que cuando se administra localmente el AR no tiene efecto sobre la expresión de citocinas proinflamatorias, en cambio se observa una reducción del ARNm de citocinas cuando se administra sistémicamente.

Dada la utilización del AR en terapias contra el cáncer, se requiere de un análisis más profundo de los efectos globales del AR de manera que se puedan establecer los riesgos y beneficios de la utilización de este agente de manera terapéutica. Al margen de esta disyuntiva, los estudios sobre los mecanismos por medio de los cuales el AR regula la expresión de la ST6Gal I contribuirían a la comprensión sobre la participación de ácido siálico en la transformación neoplásica y en un plazo mayor permitirían desarrollar estrategias para modificar su patrón de expresión en cáncer previniendo fenómenos de invasión y metástasis. En nuestro sistema, el AR ocasiona un incremento en los niveles del ARNm de la ST6Gal I y del antígeno  $\alpha$ 2,6 Sialil-lactosamina en células SiHa. Este aumento en la sialilación favorece también el incremento en la adhesión de las células tumorales hacia moléculas de adhesión de MEC y la motilidad celular como se manifiesta en los ensayos de invasión realizados. Nuestros resultados abren nuevas perspectivas en la investigación de los factores que modifican la sialilación con enlaces  $\alpha$ 2,6 en la superficie celular y sus efectos en la conducta de adhesión de las células.

## CONCLUSIONES

- La expresión del ARNm de la ST6Gal I en la línea celular SiHa derivada de cáncer cervicouterino es inducida por AR
- En la línea celular de carcinoma escamoso de cérvix SiHa el AR no modifica los niveles de ARNm de las STs ST3Gal III y ST3Gal IV
- La inducción del ARNm de la ST6Gal I mediada por AR, correlaciona con el aumento del antígeno  $\alpha$ 2,6 sialil-lactosamina
- El AR aumenta la adhesión de las células tumorales a moléculas de matriz extracelular FN, LN y CN
- El AR aumenta la invasión de las células SiHa en un modelo de invasión de membrana basal

## BIBLIOGRAFÍA

- Babál P, Janega P, Cerná A, Kholová I, Brabencová E. 2006. Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. *Acta Histochem.* 108:133-140
- Browning LM, Jebb SA, Mishra GD, Cooke JH, O'Connell MA, Crook MA, Krebs JD. 2004. Elevated sialic acid, but not CRP, predicts features of the metabolic syndrome independently of BMI in women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28:1004-1010
- Cao Y, Karsten U, Otto G, Bannasch P. 1999. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Arch.* 434:503-509
- Chiricolo M, Malagolini N, Bonfiglioli S, Dall'Olio F. 2006. Phenotypic changes induced by expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase I in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology.* 16, 146-154.
- Chovanec M, Plizák J, Betka J, Brabec J, Kodet R, Smetana K Jr. 2004. Comparative analysis of alpha2,3/2,6-linked N-acetylneuraminic acid and cytokeratin expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2:297-301
- Colomb F, Krzewinski-Recchi MA, El Machhour F, Mensier E, Jaillard S, Steenackers A, Harduin-Lepers A, Lafitte JJ, Delannoy P, Groux-Degroote S. 2012. TNF regulates sialyl-Lewisx and 6-sulfo-sialyl-Lewisx expression in human lung through up-regulation of ST3GAL4 transcript isoform BX. *Biochimie.* 94:2045-2053
- Cray C, Zaias J, Altman NH. 2009. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med.* ;59:517-526.
- Dall'Olio F, Chiricolo M, D'Errico A, Gruppioni E, Altimari A, Fiorentino M, Grigioni WF. 2004. Expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase and of alpha2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis. *Glycobiology.* vol 1:39-49.

- Dall'Olio F, Chiricolo M. 2001. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J.* 11-12:841-850. Review.
- Dall'Olio F, Malagolini N, di Stefano G, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F. 1989. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer.*44:434-439.
- Dall'Olio F, Trerè D. 1993. Expression of alpha 2,6-sialylated sugar chains in normal and neoplastic colon tissues. Detection by digoxigenin-conjugated *Sambucus nigra* agglutinin. *Eur J Histochem.* 37:257-265
- Dall'Olio F. 2000. The sialyl-alpha2,6-lactosaminy-structure: biosynthesis and functional role. *Glycoconjugate J* 17: 669-676.
- Dalziel M, Lemaire S, Ewing J, Kobayashi L, Lau JT. 1999. Hepatic acute phase induction of murine beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) is IL-6 dependent and mediated by elevation of exon H-containing class of transcripts. *Glycobiology.* 9:1003-1008.
- Deman JJ, Van Larebeke NA, Bruyneel EA, Bracke ME, Vermeulen SJ, Vennekens KM, Mareel MM. 1995. Removal of sialic acid from the surface of human MCF-7 mammary cancer cells abolishes E-cadherin-dependent cell-cell adhesion in an aggregation assay. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31: 633-639.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. 1999. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1473:, 21-34
- Diaz A, Limon D, Chávez R, Zenteno E, Guevara J. 2012. A $\beta$ 25-35 injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *J Alzheimers Dis.*30:505-522.
- Dwek MV, Brooks SA. 2004. Harnessing changes in cellular glycosylation in new cancer treatment strategies. *Curr Cancer Drug Targets.*4:425-442.
- Eiben GL, da Silva DM, Fausch SC, Le Poole IC, Nishimura MI, Kast WM.2003. Cervical cancer vaccines: recent advances in HPV research. *Viral Immunol* 16: 111-121
- Feijoo-Carnero C Rodríguez-Berrocal FJ, Páez de la Cadena M, Ayude D, de Carlos A, Martínez-Zorzano VS. 2004. Clinical significance of preoperative serum sialic acid

- levels in colorectal cancer: utility in the detection of patients at high risk of tumor recurrence. *Int J Biol Markers*. 19: 38-45
- Fukuda M. 1991. Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy. *Glycobiology*.;1: 347-56.
- Gangopadhyay A, Perera SP, Thomas P. 1988. Differential expression of alpha2,6-sialyltransferase in colon tumors recognized by a monoclonal antibody. *Hybridoma*. r;17:117-123.
- Georgopoulou N, Breen KC. 2000. Retinoic acid induction of sialyltransferase activity in neuroblastoma cells of differing sialylation potentials. *Glycoconj J*.17:781-786.
- Gessner P, Riedl S, Quentmaier A, Kemmner W. 1993. Enhanced activity of CMP-neuAc:Gal beta 1-4GlcNAc:alpha 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. *Cancer Lett*. 75: 143-149.
- Gutiérrez-Delgado C, Báez-Mendoza C, González-Pier E, Prieto-De la Rosa A, Witlen R. 2008. Relación costo-efectividad de las intervenciones preventivas contra el cáncer cervical en mujeres mexicanas. *Salud Publica Mex*. 50:107-118
- Hakomori S. 1989. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*.52: 257-331. .
- Hakomori S. 2004. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj J*.21: 125-137.
- Hanasaki K, Varki A, Stamenkovic I, Bevilacqua MP. 1994 Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J Biol Chem*. 269: 10637-10643.
- Hanasaki K, Varki A, Stamenkovic I, Bevilacqua MP. 1994. Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J Biol Chem*. 269:10637-10643.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie*. 83:727-737.

- Hogan-Ryan A, Fennelly JJ, Jones M, Cantwell B, Duffy MJ. 1980. Serum sialic acid and CEA concentrations in human breast cancer. *Br J Cancer*. 41: 587-592.
- Inagaki Y, Tang W, Guo Q, Kokudo N, Sugawara Y, Karako H, Konishi T, Nakata M, Nagawa H, Makuuchi M. 2007. Sialoglycoconjugate expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph node tissues. *Hepatogastroenterology* 54 : 53-57.
- Ismail, S.M., Colclough, A.B., Dinnen, J.S., Eakins, D., Evans, D.M., Gradwell, E., O'Sullivan, J.P., Summerell, J.M. & Newcombe, R.G. 1989. Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ*, 298: 707-710
- Iwanari O, Miyako J, Date Y, Nakayama S, Kijima S, Moriyama M, Karino K, Endoh J, Kitao M. 1990. Clinical evaluations of the tumor marker sialyl SSEA-1 antigen for clinical gynecological disease. *Gynecol Obstet Invest.*;29:214-218.
- Janik ME, Lityńska A, Vereecken P. 2010. Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 1800:545-555.
- Jefferis R. 2009. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 8:226-234.
- Joshi M, Patil R. 2010. Estimation and comparative study of serum total sialic acid levels as tumor markers in oral cancer and precancer. *J Cancer Res Ther*. 6:263-623.
- Kijima-Suda I, Miyamoto Y, Toyoshima S, Itoh M, Osawa T. 1986. Inhibition of experimental pulmonary metastasis of mouse colon adenocarcinoma 26 sublines by a sialic acid:nucleoside conjugate having sialyltransferase inhibiting activity. *Cancer Res*. 46:858-862.
- Kim SJ, Choi HJ, Jin UH, Lee YC, Kim CH. 2006. Transcriptional regulation of the human Sia-alpha2,3-Gal-beta1,4-GlcNAc-R:alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia III) by retinoic acid in human glioblastoma tumor cell line. *Biochim Biophys Acta*. 1759:451-457.
- Kim YJ, Varki A. 1997. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate J*. 14: 569-576.

- Kitagawa H, Mattei MG, Paulson JC. 1996. Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal beta 1,3GalNAc/Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem.* 271:931-938.
- Krzewinski-Recchi MA, Julien S, Juliant S, Teinturier-Lelièvre M, Samyn-Petit B, Montiel MD, Mir AM, Cerutti M, Harduin-Lepers A, Delannoy P. 2003. Identification and functional expression of a second human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal II. *Eur J Biochem.* 270: 950-961.
- Lee M, Lee HJ, Seo WD, Park KH, Lee YS. 2009. Sialylation of integrin beta1 is involved in radiation-induced adhesion and migration in human colon cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 76:1528-1536.
- Li M, Vemulapalli R, Ullah A, Izu L, Duffey ME, Lance P. 1998. Downregulation of a human colonic sialyltransferase by a secondary bile acid and a phorbol ester. *Am J Physiol.* 274: G599-606.
- Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. 2002. Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 276: 101-110.
- Lindberg G, Råstam L, Nilsson-Ehle P, Lundblad A, Ranstam J, Folsom AR, Burke GL. 1999. Serum sialic acid and sialoglycoproteins in asymptomatic carotid artery atherosclerosis. ARIC Investigators. *Atherosclerosis Risk in Communities. Atherosclerosis.* 146:65-69.
- Lippman SM, Kalvakolanu DV, Lotan R. 1996. Retinoids and interferons in non-melanoma skin cancer. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1: 219-222.
- Liu H, Kojima N, Kurosawa N, Tsuji S. 1997. Regulated expression system for GD3 synthase cDNA and induction of differentiation in Neuro2a cells. *Glycobiology.* 7: 1067-1076.
- Liu S, Liu H, Tang S, Pan Y, Ji K, Ning H, Wang S, Qi Z, Li L. 2004. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 expression during early stages of human embryogenesis. *Oncol Rep.* ;12: 1251-6.

- Lo NW, Lau JT. 1996. Novel heterogeneity exists in the 5'-untranslated region of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase mRNAs in the human B-lymphoblastoid cell line, louckes. *Biochem Biophys Res Commun.* 228:380-385.
- López-Morales D, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Zenteno E, Vallejo-Ruiz. 2010. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic Path.*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: 45-53
- Lotan R, Lotan D, Amos B. 1998. Enhancement of sialyltransferase in two melanoma cell lines that are growth-inhibited by retinoic acid results in increased sialylation of different cell-surface glycoproteins. *Exp Cell Res.* 177: 284-294.
- Lotan R.1996. Retinoids in cancer chemoprevention. *The FASEB Journal* 10:1031-1039
- Lowe JB, Marth JD. 2003. A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* 72:643–691
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. 1995.The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 83(6):835-859.
- Milflores-Flores L, Millán-Pérez L, Santos-López G, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. 2012.Characterization of P1 promoter activity of the beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase I gene (siat 1) in cervical and hepatic cancer cell lines. *J Biosci.*37:259-267.
- Miller WH Jr. 1998. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer.* 83: 1471-182.
- Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. 1998. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 91: 626-631.



- Moskal JR, Lockney MW, Marvel CC, Trosko JE, Sweeley CC. 1987. Effect of retinoic acid and phorbol-12-myristate-13-acetate on glycosyltransferase activities in normal and transformed cells. *Cancer Res.* 47:787-790.
- Mostafapour MK, Goldstein IJ. 1993. Cultured Ehrlich ascites tumor cells show increased N-linked alpha 2,6-sialyltransferase activity. *Arch Biochem Biophys.* 303:255-259.
- Muramatsu T. 1988. Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. *J Biol Chem.* 263: 15146-15150.
- Nagy L, Thomazy VA, Heyman RA, Davies PJ. 1998. Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues. *Cell Death Differ.* ;5:11-19.
- Nayak SB, Bhaktha G. 2005. Relationship between sialic acid and metabolic variables in Indian type 2 diabetic patients. *Lipids Health Dis.* 4:15-19.
- Ogawa H, Inoue M, Tanizawa O, Miyamoto M, Sakurai M. 1992. Altered expression of sialyl-Tn, Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Histochemistry.* 97:311-317.
- Ohtsubo K, Marth JD. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* ;126: 855-867.
- Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. 1988. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem.* 263: 15146-15150.
- Recchi MA, Harduin-Lepers A, Boilly-Marer Y, Verbert A, Delannoy P. 1998. Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells. *Glycoconjugate JI* 15: 19-27.
- Robertson, A.J., Reid, G.S., Stoker, C.A., Bissett, C., Waugh, N., Fenton, I., Rowan, J. & Halkerston, R. 1989. Evaluation of a call programme for cervical cytology screening in women aged 50–60. *BMJ.* 299: 163–166
- Robotti A, Natale M, Albo AG, Lis K, Perga S, Marnetto F, Gilli F, Bertolotto A. 2010. Acute-phase proteins investigation based on lectins affinity capture prior to 2-DE separation: application to serum from multiple sclerosis patients. *Electrophoresis.* 31:2882-2893.

- Roy A, Chakraborty S. 2005. Detection of cancer cervix by estimation of sialic acid. *Journal of the Indian Med Ass* 103: 589-590.
- Sánchez-Sevilla L, Mendieta-Condado E, Hernández-Muñoz R. 2012. High dosing of  $\alpha$ -tocopherol inhibits rat liver regeneration by modifying signal transducer and activator of transcription protein expression and its correlation with cell redox state and retinoid metabolism. *Exp Biol Med (Maywood)*. 237:811-821.
- Sarrats A, Saldova R, Pla E, Fort E, Harvey DJ, Struwe WB, de Llorens R, Rudd PM, Peracaula R. 2010. Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis *Proteomics Clin Appl*. 4: 432-448.
- Seales EC, Jurado GA, Singhal A, Bellis SL. 2003. Ras oncogene directs expression of a differentially sialylated, functionally altered beta1 integrin. *Oncogene*. Oct 16;22(46):7137-45
- Seidenfaden R, Hildebrandt H. 2001. Retinoic acid-induced changes in polysialyltransferase mRNA expression and NCAM polysialylation in human neuroblastoma cells. *J Neurobiol*. 46: 11-28
- Shah MH, Telang SD, Shah PM, Patel PS. 2008. Tissue and serum alpha 2-3- and alpha 2-6-linkage specific sialylation changes in oral carcinogenesis. *Glycoconj J*. 25: 279-290.
- Shah S, Lance P, Smith TJ, Berenson CS, Cohen SA, Horvath PJ, Lau JT, Baumann H. 1992. n-butyrate reduces the expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase in Hep G2 cells. *J Biol Chem*. May 25;267(15):10652-8.
- Sng JC, Taniura H, Yoneda Y. 2004 A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull*. 27(5):606-12.
- Sperandio M, Gleissner CA, Ley K. 2009. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev*. 230:97-113.
- Stoler, M.H. & Schiffman, M. 2001 Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*, 285: 1500–1505

- Süer Gökmen S, Kazezoğlu C, Sunar B, Özçelik F, Güngör O, Yorulmaz F, Gülen S. Relationship between serum sialic acids, sialic acid-rich inflammation-sensitive proteins and cell damage in patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(2):199-206.
- Svensson EC, Conley PB, Paulson JC. 1992. Regulated expression of alpha 2,6-sialyltransferase by the liver-enriched transcription factors HNF-1, DBP, and LAP. *J Biol Chem.* 267:3466-72.
- Takashima S, Tsuji S, Tsujimoto M. 2003 Comparison of the enzymatic properties of mouse beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II. *J Biochem.* 134: 287-296.
- Taniguchi A, Hasegawa Y, Higai K, Matsumoto K. 1999. Down-regulation of human Galbeta1,3GalNAc/Galbeta1,4GlcNAc alpha2,3-sialyltransferase (hST3Gal IV) gene during differentiation of the HL-60 cell line. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2:197-201.
- Taniguchi A, Hasegawa Y, Higai K, Matsumoto K. 2000. Transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene during differentiation of the HL-60 cell line. *Glycobiology* 10: 623-628,
- Thomson S, Mahadevan LC, Clayton AL. 1999. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol.* 10(2):205-214.
- Tillmanns TD, Kamelle SA, Guruswamy S, Gould NS, Rutledge TL, Benbrook DM. 2005. Sensitization of cervical cancer cell lines to low-dose radiation by retinoic acid does not require functional p53. *Gynecol Oncol.* 97:142-50.
- Traving C, Schauer R. 1998. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci.* 54:1330-1349.
- Vallejo V, Reyes-Leyva J, Hernández J, Ramírez H, Delannoy P, Zenteno E. 2000. Differential expression of sialic acid on porcine organs during the maturation process. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*;126:415-424
- Van Neerven S, Mey J, Joosten EA, Steinbusch HW, van Kleef M, Marcus MA, Deumens R. 2010. Systemic but not local administration of retinoic acid reduces early

- transcript levels of pro-inflammatory cytokines after experimental spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 485:21-5.
- Vandamme V, Pierce A, Verbert A, Delannoy P. 1993. Transcriptional induction of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone. *Eur J Biochem.* 211:135-140.
- Varki A, Schauer R. Sialic acids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. 2009. *Essentials of Glycobiology*. Chapter 14. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Varki A. 1998. Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* 8:34-40.
- Wang FL, Cui SX, Sun LP, Qu XJ, Xie YY, Zhou L, Mu YL, Tang W, Wang YS. High expression of alpha 2, 3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. *Cancer Detect Prev.* 2009;32(5-6):437-43. Epub 2009 Feb 18
- Wang PH, Li YF, Juang CM, Lee YR, Chao HT, Ng HT, Tsai YC, Yuan CC. Expression of sialyltransferase family members in cervix squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Gynecologic Oncology* 86 (1), 45-52, 2002.
- Wang PH, Li YF, Juang CM, Lee YR, Chao HT, Tsai YC, Yuan CC. 2001. Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix. *Gynecologic Oncology* 83: 121-127.
- Wang X, Vertino A, Eddy RL, Byers MG, Jani-Sait SN, Shows TB, Lau JT. 1993. Chromosome mapping and organization of the human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. Differential and cell-type specific usage of upstream exon sequences in B-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem.* 268:4355-61
- Wang XC, Smith TJ, Lau JT. Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 1990 Oct 15;265(29):17849-53

- Xu L, Kurusu Y, Takizawa K, Tanaka J, Matsumoto K, Taniguchi A. 2003. Transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene in colon adenocarcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* ;307:1070-4.
- Yarema KJ, Goon S, Bertozzi CR. 2001. Metabolic selection of glycosylation defects in human cells. *Nat Biotechnol.* 19: 553-8.
- Zhu WY, Jones CS, Amin S, Matsukuma K, Haque M, Vuligonda V, Chandraratna RA, De Luca LM. 1999. Retinoic acid increases tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 59: 85-90.
- Zhuo Y, Bellis SL. 2011. Emerging role of alpha2,6-sialic acid as a negative regulator of galectin binding and function. *J Biol Chem.* 286:5935-41.