BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL CÁNCER

ANÁLISIS DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS METILTRANSFERASAS DE M6A METTL3, METTL14, METTL16 Y DE LAS PROTEÍNAS LECTORAS YTHDF1-3, YTHDC1-2 EN LA LINEA CELULAR MCF-7 SENSIBLE Y RESISTENTE AL TAMOXIFENO Y EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN BIOMEDICINA PRESENTA

JOANA BARBOSA GÓMEZ (201509544)

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. MARTA ELENA HERNÁNDEZ CABALLERO

PUEBLA DE ZARAGOZA SEPTIEMBRE, 2022

Índice

1. Resumen ... 4
2. Introducción ... 6
3. Antecedentes ... 8
3.1 Antecedentes generales ... 8
3.1.1 Epigenética y epitranscriptómica ... 8
3.1.2 Características, clasificación y tratamiento del cáncer de mama ... 10
3.1.3 Línea celular MCF-7 ... 15
3.2 Antecedentes específicos ... 16
3.2.1 Tamoxifeno como tratamiento del cáncer de mama ... 16
3.2.2 Resistencia a terapia hormonal ... 18
3.2.3 m6a y su relación con la resistencia al tamoxifeno ... 19
3.2.4 Regulación de m6A: enzimas escritoras, borradoras y lectoras ... 19
3.2.5 Enzimas escritoras METTL3, METTL14 y METTL16 y su papel en el cáncer ... 21
3.2.6 Proteínas lectoras YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 y YTHDC2 y su relación con diferentes tipos de cánceres ... 24
4. Justificación ... 28
5. Planteamiento del problema ... 29
6. Hipótesis Científica ... 29
7. Objetivos ... 30
7.1 Objetivo General ... 30
7.2 Objetivos Particulares ... 30
8. Material y métodos ... 31
8.1 Estrategia de trabajo ... 31
Extracción de RNA ... 34
Electroforesis de ARN en gel de agarosa ... 34
Cuantificación del ARN ... 35
Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) ... 35
Diseño de primers ... 36
PCR convencional ... 37

PCR en tiempo real 38
Análisis de datos 38
9. Resultados 39
Extracción de RNA 39
Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)... 40
PCR convencional 41
PCR en tiempo real 42
Comparación de la expresión de los genes escritores y reguladores en las líneas celulares derivadas de MCF-7 44
Análisis de los niveles de expresión de METL3, METTL14, METTL16, YTHDF1-3 y YTHDC1-2 en pacientes con cáncer de mama. 45
Relación de la sobrevivencia con la expresión de los genes reguladores de m6A. 48
10. Discusión 50
11. Conclusiones 53
12. Bibliografía. 54

1. Resumen

El cáncer de mama posee una gran diversidad genética, epigenética y fenotípica. La N6-metiladenosina (m6A) en el ARNm ha surgido como una modificación epitranscriptómica fundamental, que además del destino celular controla la supervivencia y desarrollo del cáncer. La alteración de los genes escritores, borradores y lectores que componen la maquinaria molecular encargada de la regulación de m6a contribuyen al desarrollo de la neoplasia. El tamoxifeno se ha utilizado por varios años como un tratamiento efectivo contra el cáncer de mama con receptores de estrógeno positivos, sin embargo, la creciente resistencia al fármaco se ha convertido en uno de los principales obstáculos para esta terapia. El objetivo de este trabajo es analizar los cambios de expresión de las metiltransferasas y proteínas lectoras de m6a en la línea celular MCF-7 sensible y resistente al tamoxifeno y en pacientes con cáncer de mama.

Se analizó la expresión de las metiltransferasas (METTL3, METTL14, METTL16) y de las proteínas lectoras de m6a (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, YTHDC2) en la línea celular MCF-7 sensible y resistente al tamoxifeno y en pacientes con cáncer de mama mediante el uso de datos de las bases *Gene Expression Omnibus* (GEO) y *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) respectivamente. Se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos por medio del programa R (versión 4.0.3) con la interfase RStudio, al igual que para el análisis de supervivencia.

Los resultados en el análisis de la comparación de las líneas celulares derivadas de MCF-7 (LCC0,1,2,9, TAMR1,4,7 y 8) no mostraron ninguna diferencia entre estas. En cambio, los resultados del análisis de expresión en las pacientes mostraron diferencias significativas en la expresión de las metiltransferasas METTL3, METTL14 y METTL16 entre los subtipos, excepto en el caso del subtipo normal-like. En contraste, en el análisis de los niveles de expresión de las proteínas lectoras, YTHDF1 tuvo diferencias significativas entre todos los subtipos en el caso de YTHDF2 solo hubo diferencias significativas entre el subtipo basal y los subtipos luminales A y B, mientras que YTHDF3 presentó diferencias entre los subtipos

basal, luminal A y B y normal-like. Las lectoras YTHDC1 y 2 presentaron una expresión similar a METTL3 y 14. En el análisis de sobrevivencia, los resultados mostraron una alta expresión de YTHDF1 en los subtipos luminal A y luminal B y una alta expresión de YTHDC1 en el subtipo luminal A, todos ellos relacionados con una disminución en la probabilidad de sobrevivencia de las pacientes.

En conclusión, aunque no hubo evidencia de un desequilibrio de expresión de los genes escritores y lectores en las líneas celulares sensible y resistente al tamoxifeno, no se descarta la idea de que algunos de estos genes se encuentren involucrados en los mecanismos que conllevan a la resistencia del tamoxifeno, pues los datos obtenidos en varios estudios han mostrado que existe una relación entre su expresión y la interferencia en algunas vías de señalización involucradas en la quimioresistencia y esto puede verse afectado también por el subtipo de cáncer. La continuación de investigación de estos genes escritores y lectores y su relación con la resistencia a tratamientos resulta importante ya que, en un futuro, la comprensión de su regulación molecular podría servir como herramienta diagnóstica y terapéutica para el cáncer de mama.

2. Introducción

El reciente descubrimiento de la importancia que tienen las modificaciones químicas del ARN, al regular la expresión de genes y procesos biológicos, ha dado lugar al surgimiento de la epitranscriptómica como disciplina (1).

La modificación m6A (N6-metiladenosina) del ARNm ha resultado de gran interés en la investigación debido a su relevancia en diferentes procesos vitales, influyendo en la maduración, transcripción, traducción, y metabolismo del ARN. Esta metilación de la adenosina en la posición N6 del ARNm es dinámica, reversible y se encuentra regulada por un grupo de proteínas denominadas: escritoras (metiltransferasas), borradoras (desmetilasas) y lectoras (reconocen las modificaciones m6A); las alteraciones en los niveles de m6a están relacionadas con la desestabilización de la expresión de genes y procesos celulares claves para un correcto funcionamiento dando como resultado la iniciación y progresión tumoral (2).

Las metiltransferasas METTL3, METTL14 y METTL16 se encargan de insertar, mediante un complejo escritor altamente especifico formado de varias subunidades, la modificación química m6A al ARNm; mientras que las proteínas de unión YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 y YTHDC2 juegan el rol de reconocer los transcritos de ARNm modificados con N6-metiladenosina y decidir su destino (3). Diversos estudios han indicado que la desregulación de los niveles de expresión de los genes escritores, borradores y lectores están implicados en diversos tipos de canceres humanos mediante el incremento de la expresión de oncogenes, el aumento de la proliferación y supervivencia de las células cancerígenas, además de la iniciación, progresión y metástasis tumoral (4).

Se ha reportado que METTL3 y METTL14 muestran funciones oncogénicas en el hepatocarcinoma, cáncer de mama, y glioblastoma, además, METTL3 ha sido relacionado con un mal pronóstico para los pacientes de hepatocarcinoma. Con respecto a METTL16, un estudió mostró que se encuentra sobreexpresado en el adenocarcinoma de colon. Por otro lado, se ha encontrado que el lector YTHDF2

juega un rol pro-tumorogénico en el hepatocarcinoma celular, en el cáncer de páncreas y en la leucemia mieloide aguda, mostrando una sobreexpresión en la mayoría de casos, YTHDF1 actúa como un oncogén en el cáncer de mama, cáncer colorrectal y en el hepatocarcinoma, YTHDF3 se ha presentado con una expresión baja en el cáncer colorrectal mientras que YTHDC1 muestra una alta expresión en el adenocarcinoma de cólon, por último, YTHDC2 exhibe un rol esencial en el crecimiento y proliferación de las células del hepatocarcinoma celular (3–7).

Estos genes reguladores también se han visto involucrados en la resistencia de medicamentos utilizados en las quimioterapias, como, el caso del tamoxifeno el cual ha sido utilizado para tratar al cáncer de mama con receptores de estrógenos positivos durante un largo periodo (8). Un estudio observó que la vía epitranscriptómica mediada por m6A contribuyó a la quimio-resistencia y radio-resistencia a través del escritor METTL3 en células de cáncer pancreático (9).

Las investigaciones sobre las desregulaciones de expresión de las metiltransferasas y de las proteínas de reconocimiento de m6A han abierto especulaciones sobre la posibilidad de utilizar como blancos terapéuticos a estos grupos de proteínas reguladoras de m6A, sin embargo, aún permanece el desconcierto de cómo participan y cuáles son los mecanismos por los que los escritores y lectores de m6A se vuelven tumorogénicos. Es por ello que, el presente estudios se enfoca en el análisis de expresión de las metiltransferasas y de las proteínas lectoras de m6A, utilizando los datos de líneas celulares sensibles y resistentes al tamoxifeno obtenidos de la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO), con el fin de encontrar resultados que contribuyan a la comprensión de la implicación de estos genes reguladores en la resistencia al tamoxifeno.

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Epigenética y epitranscriptómica

El interés en el campo de la epigenética ha aumentado rápidamente durante la última década, y el término se ha vuelto más identificable en la investigación biomédica, campos científicos fuera de las ciencias moleculares, como la ecología y la fisiología, e incluso en la cultura general. Una creciente evidencia respalda el papel que tiene la epigenética en la susceptibilidad a enfermedades. La interacción con el medio ambiente puede ejercer una gran influencia sobre la salud y la enfermedad de los seres humanos mediada por mecanismos epigenéticos de expresión génica (1).

La epigenética implica el estudio de una amplia variedad de fenómenos biológicos como la diferenciación y el desarrollo celular, el metabolismo, las enfermedades, la variabilidad fenotípica, la herencia, la evolución y los comportamientos. La comprensión de qué es la epigenética ha evolucionado desde que Conrad H. Waddington la definió a finales de la década de 1930. Durante su historia, a lo largo de los avances de la biología molecular, del desarrollo y la evolución, la epigenética se ha convertido en una noción multifacética con diferentes significados, dependiendo de la disciplina biológica en la que se utilice (10).

La concepción moderna de la epigenética en la biología molecular y celular tiene sus raíces en los años sesenta y setenta, cuando un conjunto de avances de investigación, tanto teóricos como experimentales, ocurrieron en este campo de estudio. En 1975, Riggs y Holliday, independientemente el uno del otro, ofrecieron por primera vez una solución molecular al problema del desarrollo con sus trabajos pioneros. Ambos tenían la misma hipótesis: la metilación del ADN influye en la expresión génica, mientras que su estabilidad mitótica explica la diferenciación y el desarrollo celular. Tanto Riggs como Holliday predijeron la existencia de enzimas específicas que agregan grupos metilo a la secuencia de ADN, ya sea a una región característica o interactuando con otras proteínas. En la actualidad, la definición de

la epigenética en biología molecular y celular de Nanney, Riggs y Holliday ha recibido una serie de reformulaciones más o menos equivalentes durante las dos últimas décadas y, sin dejar de coexistir con ella, ha surgido así un significado más flexible e inclusivo de lo que es la epigenética a nivel molecular: el conjunto de estudios de esta rama se aplican a las alteraciones de la actividad génica que no se deben a cambios en la secuencia del ADN, sino a otras alteraciones moleculares. Los mecanismos tales como modificaciones químicas de las histonas, cambios en la estructura de la cromatina y acciones de los ARN no codificantes. En consecuencia, cualquier variación fenotípica que no sea atribuible a la variación genética (secuencia de ADN) sino a cualquier otra modificación molecular de la cromatina podría considerarse, en términos generales, como epigenética. Esta definición más amplia tiende a ser adoptada por aquellos investigadores que estudian cómo la diferenciación celular y la embriogénesis están reguladas epigenéticamente (11).

Durante mucho tiempo se prestó poca atención a las modificaciones del ARN; el descubrimiento de marcas en el ARN se remonta a las décadas de 1960 y 1970, pero se pensó que se limitaban a los ARNt y ARNr, y la investigación se centró en las marcas epigenéticas en el ADN. El descubrimiento de que las marcas químicas ocurren en todas las especies de ARN, junto con informes de escritores y borradores que agregan y eliminan estas marcas de manera dinámica, generó un renovado interés en las modificaciones del ARN (12).

Recientemente, se ha dado un interés considerable al estudio de las modificaciones de ARN que ocurren dinámicamente tanto en aquellos que codifican proteínas como en los no codificantes. Esto, a su vez, ha conducido gradualmente a la emocionante exploración de la nueva frontera de la “epitranscriptómica”, revelando un campo adicional y más fino de complejidad en la regulación genética. La aplicación de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento ha brindado la oportunidad sin precedentes de revelar millones de modificaciones de ARN en genes humanos, como las que resultan de la metilación (p. Ej., m6A, m1A, m5C, hm5C, 2'OMe),

pseudouridilación y desaminación, contando hasta la fecha más de 140 formas diferentes de cambios en el ARN (13).

El control adecuado del epitranscriptoma es clave para diversos aspectos de la expresión génica, las funciones celulares y el desarrollo, y su alteración puede provocar enfermedades. Se sabe desde hace mucho tiempo que las modificaciones del ARN son más frecuentes y diversas en su naturaleza química que las modificaciones del ADN; además, la mayoría de las modificaciones de ARN están muy conservadas. Ahora, podemos abordar la pregunta de cómo las modificaciones de nucleósidos afectan la expresión génica e influyen en el comportamiento celular (14).

Los mapas de modificación de ARN y la intercomunicación entre ellos han comenzado a desarrollar el papel de las modificaciones como interruptores de señalización, abriendo la noción de un código epitranscriptómico como impulsor del destino postranscripcional del ARN (15). Cada vez está más claro que el epitranscriptoma y sus enzimas modificadoras forman una constelación compleja que tiene funciones muy diversas. Los cambios del ARN postranscripcional dan lugar a controles adicionales de la expresión génica, actuando como mecanismos poderosos que eventualmente afectan la síntesis de proteínas (16).

3.1.2 Características, clasificación y tratamiento del cáncer de mama

El cáncer de mama generalmente se considera un tipo de cáncer muy heterogéneo, que abarca distintos perfiles fenotípicos y morfológicos y, por lo tanto, posee comportamientos clínicos muy diferentes. Clínicamente, los cánceres de mama se caracterizan en tres tipos básicos según sus propiedades inmunohistoquímicas (estado hormonal). Estos son: los cánceres de mama con receptores hormonales positivos, HER2 positivos (se refiere al cáncer de mama que es positivo al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) y los triple negativos. Los receptores de hormonas positivos son los cánceres de mama con receptores de estrógeno positivos (ER+) o con receptores de progesterona positivos (PR+). Aproximadamente el 85% de todos los cánceres de mama son receptores de

hormonas positivos. Los cánceres de mama con receptores hormonales positivos se pueden dividir en dos subtipos: luminal A y luminal B. Los tumores luminal A tienden a ser ER+ y/o PR+, y HER2 negativos (HER2-). Los tumores luminales B tienden a ser ER+ y/o PR+ y HER2 +. Los cánceres de mama triple negativos, también llamados subtipos basales, se refieren a cualquier cáncer de mama que no exprese los genes del receptor de estrógeno, receptor de progesterona o receptor HER2. Los cánceres de mama triple negativos representan alrededor del 15% de toda la población con cáncer de mama (17).

Los cánceres de mama luminal tienen una alta posibilidad de ser tumores de RE positivos e incluyen cánceres de tipo especial, como carcinomas tubulares, cribiformes, lobulillares y mucinosos. Los cánceres luminales forman un espectro continuo que se puede dividir arbitrariamente en dos subgrupos según la expresión de genes relacionados con la proliferación. Los tumores luminales A son típicamente de bajo grado con un pronóstico excelente, tienen ER/PR positivos y HER2 negativos, con alta expresión de genes relacionados con ER y baja expresión de genes que corresponden a la proliferación. En contraste, los tumores luminales B son de mayor grado con peor pronóstico y pueden ser PR negativo y/o HER2 positivo con alta expresión de genes relacionados con la proliferación (18).

Las tecnologías de alto rendimiento han proporcionado pruebas directas de la heterogeneidad de los cánceres de mama a nivel molecular y han dado lugar a cambios en los paradigmas de la biología del cáncer de mama. Los estudios de perfil de expresión génica global clasificaron los cánceres de mama en cinco subtipos intrínsecos por agrupamiento jerárquico: luminal A, luminal B, sobreexpresión de HER2, cáncer de mama basal (BLBC) y tumores de tipo normal. La expresión de ER estratifica los cánceres de mama en 2 grupos distintos: ER + y ER−. Los subtipos luminales A y B son cánceres con ER positivos, mientras que los tumores con sobreexpresión de HER2, BLBC y de tipo normal fueron ER-. Estos diferentes subtipos intrínsecos revelaron diferencias en la incidencia, características clínicas y patológicas y, en gran medida, se superpusieron con las clasificaciones clínicas e histopatológicas establecidas. Los subgrupos luminales A y B se

caracterizan por tener perfiles de expresión génica que se asemejan a las células epiteliales luminales normales de la mama y otros genes asociados con la activación del RE. El cáncer luminal A es el subtipo molecular más común, que representa del 40% al 50% de los cánceres de mama invasivos. Los cánceres luminales A son de bajo grado, con el mejor pronóstico entre todos los subtipos intrínsecos. Los cánceres luminal B tienden a ser de mayor grado y tienen un peor pronóstico que el luminal A debido a que muestran menor expresión de genes relacionados con ER, pero mayor expresión en genes relacionados con la proliferación y expresión variable de genes relacionados con HER2 que los cánceres luminal A. Clínicamente, es probable que el grupo luminal A se beneficie de la terapia hormonal sola, mientras que los tumores luminal B pueden ser candidatos para quimioterapia adicional (18).

La comprensión de la naturaleza compleja y la biología del cáncer de mama ha permitido a los equipos multidisciplinarios tomar mejores decisiones con respecto al tratamiento. La detección del cáncer de mama en una etapa temprana ha mejorado los resultados de supervivencia. La identificación de los subtipos de cáncer de mama que responden mejor al tratamiento es crucial para seleccionar candidatos adecuados (19).

La terapia para el manejo del cáncer ha progresado sustancialmente en los últimos años con una reducción en la intensidad de esta, tanto para la terapia de localización regional como para la sistémica; evitar el sobretratamiento, pero también el subtratamiento se ha convertido en un enfoque importante. Los conceptos de terapia siguen una intención curativa y deben decidirse en un entorno multidisciplinario, teniendo en cuenta el subtipo molecular y la carga tumoral de la localización (20).

El cáncer de mama se puede tratar con cirugía, radiación o medicamentos (quimioterapia y terapia hormonal). Muchos oncólogos usan una o más de estas combinaciones, según el tipo y la ubicación del cáncer, si la enfermedad se ha propagado y tomando en cuenta el estado de salud general de la paciente (21).

Para el cáncer de mama no metastásico, los objetivos principales de la terapia son erradicar el tumor de la mama y los ganglios linfáticos regionales y prevenir la recurrencia metastásica. La terapia local para el cáncer de mama no metastásico consiste en la resección quirúrgica y la extracción de muestras o extirpación de los ganglios linfáticos axilares, teniendo en cuenta la radiación posoperatoria. La terapia sistémica puede ser preoperatoria (neoadyuvante), posoperatoria (adyuvante) o ambas. El subtipo de cáncer de mama guía la terapia sistémica estándar administrada, que consiste en terapia endocrina para todos los tumores HR+ (receptores hormonales positivos) y en algunas ocasiones se combina con quimioterapia, terapia con anticuerpos dirigidos contra HER2, más quimioterapia para todos los tumores HER2+, y quimioterapia para el cáncer de mama triple negativo. Para el cáncer de mama metastásico, los objetivos terapéuticos son prolongar la vida y aliviar los síntomas. Actualmente, el cáncer de mama metastásico sigue siendo incurable en prácticamente todas las pacientes afectadas. Las mismas categorías básicas de terapia sistémica se utilizan en el cáncer de mama metastásico que en los enfoques neoadyuvante/adyuvante. Las modalidades de terapia local (cirugía y radiación) se usan típicamente como paliativo solo en la enfermedad metastásica (22)

La radioterapia se puede utilizar para tratar el cáncer de mama de dos formas: primaria o adyuvante. La radiación primaria es el uso único de radiación para tratar el cáncer de mama. La radioterapia adyuvante utiliza radiación con cirugía, quimioterapia o ambas para tratar un posible cáncer residual. Si el paciente está recibiendo quimioterapia, generalmente esta se administra antes de que comience el tratamiento con radiación. La radioterapia se practica exponiendo un área específica del cuerpo, en este caso la mama y el torso, a radiación de alta energía para destruir las células cancerosas, mientras que al mismo tiempo se limita la exposición a la radiación a otras partes del cuerpo de la paciente (21).

La quimioterapia adyuvante después de la cirugía definitiva generalmente se recomienda para pacientes con enfermedad con alto riesgo de recurrencia. Es la única terapia sistémica con eficacia demostrada en el cáncer de mama triple

negativo y un complemento importante de la terapia endocrina o la terapia dirigida para HER2 en pacientes con cáncer de mama HR+/HER2− o HER2+, respectivamente. Los regímenes de quimioterapia dependen del subtipo de receptor; la mayoría contendrá una antraciclina y un taxano. Para el cáncer con HER2+, deben administrarse trastuzumab y pertuzumab simultáneamente con el taxano. Específicamente, el uso de antraciclina parece ser más importante en pacientes con los ganglios linfáticos más comprometidos y con el cáncer triple negativo. Para las pacientes con enfermedad de alto riesgo, la terapia citotóxica debe incluir tanto una antraciclina como un taxano. Para enfermedades de bajo riesgo, las antraciclinas se omiten con mayor frecuencia. La decisión de utilizar quimioterapia debe basarse en un equilibrio entre el beneficio potencial de supervivencia con las comorbilidades de la paciente y el riesgo de complicaciones (23).

El tratamiento hormonal en el cáncer de mama está dirigido a pacientes cuyos tumores expresan receptores hormonales (HR+), de estrógenos (ER+), de progestrona (PR+) o de ambos. La terapia hormonal puede administrarse en enfermedades neoadyuvantes, adyuvantes y metastásicas. El receptor de estrógeno, con las dos isoformas α y β, tiene un papel en el desarrollo del epitelio de la glándula mamaria normal, pero también en el desarrollo del cáncer de mama (aproximadamente el 70% de los cánceres de mama sobreexpresan ER). La terapia hormonal tiene como objetivo prevenir la interacción entre los estrógenos y las vías dependientes de estos para estimular las células neoplásicas. Se puede realizar a través de: Bloqueo de la producción de estrógenos (inhibición ovárica quirúrgica, radiológica, química o por la aromatasa) o por Bloqueo de la acción de los estrógenos sobre las células tumorales por medio de SERM (Moduladores selectivos del receptor de estrógenos) que actúan como agonistas, antagonistas o ambos, de estrógenos, dependiendo del objetivo tisular (tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno) o SERD (reguladores descendentes selectivos del receptor de estrógeno) que inhiben la actividad de ER (fulvestrant, antagonista de ER sin efectos agonistas de estrógenos) (24).

3.1.3 Línea celular MCF-7

Las líneas celulares son un elemento clave para el diagnóstico molecular en el cáncer de mama, ya que pueden utilizarse ampliamente en muchos aspectos de la investigación de laboratorio y, en particular, como modelos *in vitro* en la investigación del cáncer. En cuanto al cáncer de mama, las células MCF-7 representan un candidato muy importante, ya que se utilizan de forma ubicua en la investigación de experimentos con células de cáncer de mama positivas al receptor de estrógeno (ER) y muchas subclonas, que se han establecido, representan diferentes clases de tumores RE positivos con diferentes niveles de expresión de receptores nucleares. Esta línea celular es una de las pocas que expresa niveles sustanciales de RE que imita la mayoría de los cánceres de mama humanos invasivos que expresan ER (25).

Las células MCF-7 han servido como modelo para el estudio de la respuesta estrogénica tanto *in vitro* como *in vivo*. Las investigaciones de resistencia hormonal también han sido instruidas fundamentalmente por el uso de células MCF-7. Los estudios *in vitro* que utilizaron la falta de estrógenos o la exposición crónica a antiestrógenos llevaron al aislamiento de variantes de células MCF-7 resistentes a hormonas, que pueden ser ER positivas o ER negativas. La eliminación de estrógeno inicialmente ralentiza el crecimiento celular, pero con el tiempo se reanuda el crecimiento y varios laboratorios han generado células privadas de estrógeno a largo plazo (LTED). Santen demostró que estas células expresan altos niveles de RE y se vuelven hipersensibles a la estimulación estrogénica. Estos estudios, combinados con los de otros grupos que desarrollaron sus propios derivados de MCF-7 LTED, han identificado cambios epigenéticos y transcriptómicos que conducen a alteraciones en la señalización del factor de crecimiento. Es importante destacar que, mientras que las células MCF-7 LTED que se obtienen a partir del crecimiento masivo de células MCF-7 privadas de estrógeno son ER positivas, la clonación de células individuales que pueden crecer en ausencia de estrógeno identificó clonas ER positivas y ER negativas, destacando la

tremenda heterogeneidad que caracteriza a los cánceres de mama clínicos en su conjunto, así como a esta línea celular (26).

A pesar de las limitaciones de la investigación sobre líneas celulares de cáncer establecidas, los descubrimientos de la línea celular MCF-7 han alterado fundamentalmente el curso de la investigación del cáncer de mama y han contribuido a mejorar los resultados de las pacientes (26).

3.2 Antecedentes específicos

3.2.1 Tamoxifeno como tratamiento del cáncer de mama

El tamoxifeno, trans-1-(4-β-dimetilaminoetoxifenil)-1,2-difenilbut-1-eno, es el fármaco más utilizado para el tratamiento del cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo. El tamoxifeno se considera un fármaco pionero debido a su uso omnipresente tanto en el tratamiento como en la quimioprevención del cáncer de mama y también para la investigación sobre nuevos moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERM). El tamoxifeno carece de efectos secundarios importantes en la mayoría de las pacientes. Actualmente, el tamoxifeno se utiliza para el tratamiento de todas las etapas del cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo (ER+) en mujeres pre y posmenopáusicas, además del tratamiento hormonal para el cáncer de mama masculino también, se utiliza para el tratamiento del carcinoma ductal *in situ* y para la prevención del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad. Inicialmente, el tamoxifeno se conocía como un antiestrógeno que reducía los efectos inducidos por el estrógeno al bloquear sus receptores en los tejidos mamarios. Posteriormente, una investigación farmacológica rigurosa proporcionó evidencia de que el tamoxifeno actúa como agonista a los receptores de estrógeno en otros tejidos corporales como el endometrio, el hígado y los huesos y, por lo tanto, condujo al desarrollo de un nuevo grupo de fármacos, los moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM). El perfil farmacológico del tamoxifeno indica que es un profármaco y su actividad anticancerígena se produce a través de su metabolito activo, el 4-hidroxi tamoxifeno y su análogo desmetilico endoxifeno (27).

El tamoxifeno es un modulador selectivo del receptor de estrógeno que inhibe el crecimiento y promueve la apoptosis en los tumores con receptor de estrógeno positivo. El mecanismo de acción se basa en la inhibición competitiva de la unión del estrógeno a su receptor, que es fundamental para su actividad en las células del cáncer de mama. El tamoxifeno conduce a una disminución del factor de crecimiento tumoral α y del factor de crecimiento similar a la insulina 1, y a un aumento de la globulina transportadora de hormonas sexuales. El aumento de la globulina fijadora de hormonas sexuales limita la cantidad de estradiol disponible libremente. Estos cambios reducen los niveles de factores que estimulan el crecimiento tumoral. También se ha demostrado que el tamoxifeno induce la apoptosis en células positivas al receptor de estrógeno. Esta acción se piensa que es el resultado de la inhibición de la proteína cinasa C, que evita la síntesis de ADN. Las teorías alternativas para el efecto apoptótico del tamoxifeno provienen del aumento de aproximadamente tres veces en los niveles de iones de calcio intracelulares y mitocondriales después de la administración o la inducción del factor de crecimiento tumoral β (28).

Las muertes relacionadas con el cáncer de mama han ido disminuyendo debido a la aplicación de terapias sistémicas. Principalmente, la terapia endocrina, como el tamoxifeno, la cual mejora la supervivencia de las pacientes positivas al receptor de estrógeno (RE+). Sin embargo, la resistencia a los medicamentos, en particular al tamoxifeno, sigue siendo un desafío importante. Se ha demostrado que no solo la exposición crónica al tamoxifeno induce resistencia, sino que la privación de estrógenos también puede hacerlo. Existen dos líneas celulares resistentes al tamoxifeno, células privadas de estrógeno a largo plazo (LTED) y células que han adquirido resistencia debido a la exposición prolongada al tamoxifeno (Tam-R) (8).

3.2.2 Resistencia a terapia hormonal

Los tumores resistentes a hormonas pueden clasificarse como: 1. Tumores con resistencia primaria a hormonas; 2. Tumores con resistencia hormonal adquirida que se desarrollaron después del curso de la terapia endocrina. La resistencia hormonal primaria o adquirida puede estar asociada con la pérdida de receptores de estrógeno (tumores ERα-negativos independientes de hormonas), así como con la desregulación de ERα (tumores ERα positivos independientes de hormonas) causada por varios factores, incluida la activación de ERα independiente de ligando, desequilibrio entre activadores y represores del receptor, estimulación de vías independientes de hormonas, etc. En total, se pueden observar los siguientes mecanismos de resistencia hormonal: activación independiente del ligando de la vía de señalización ERα; disminución de la expresión de ERα y sus co-activadores; modificaciones epigenéticas de ESR1 (ERα) y genes dependientes de estrógenos (metilación/desacetilación); mutaciones en los dominios de activación funcional ERα; desequilibrio de activadores y supresores de ERα; expresión de la variante truncada de ERα (36 kDa), que puede apoyar la resistencia al tamoxifeno; activación de vías de señalización independientes de estrógenos: vías de señalización del factor de crecimiento (EGFR, HER2/Neo, etc.), vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), cascadas de MAP-cinasa, vías de NF-κB y mTOR; trastornos en la regulación de las proteínas que controlan la transición epitelial-mesénquima (SNAIL1, MTA3, E-cadherina); desregulación de metaloproteinasas de matriz; hipersensibilidad celular a los estrógenos. El mecanismo más frecuente de resistencia hormonal se basa en el bloqueo de la señalización del receptor de estrógenos (ablación de estrógenos, tratamiento antiestrógeno) y la activación de la señalización mitogénica independiente de hormonas, incluidas las tirosinas cinasas receptoras, las proteínas reguladoras del ciclo celular, la cascada de PI3K/Akt, etc. (29).

3.2.3 m6a y su relación con la resistencia al tamoxifeno

La N6-metiladenosina (m6A) es la modificación interna prevalente en el ARNm, y esta metilación ha surgido como un mecanismo regulador crucial y dinámico que controla la expresión génica en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Además, la vía epitranscriptómica mediada por m6A ha demostrado contribuir a la quimio resistencia y a la radio resistencia. Un estudio reciente mostró que los niveles de proteína del adenilato cinasa 4 (AK4) y el escritor de m6A METTL3 son significativamente más altos en las células MCF-7 resistentes al tamoxifeno (TamR) que en las células parentales. Las células TamR MCF-7 también exhiben un aumento de metilación en múltiples sitios de motivos consenso de m6A en la región 5 'no traducida (5' UTR) del ARNm de AK4, y la reducción genética de METTL3 en las células TamR MCF-7 condujo a una disminución del nivel de proteína AK4 y resistencia atenuada al tamoxifeno (9).

3.2.4 Regulación de m6A: enzimas escritoras, borradoras y lectoras

La evidencia creciente muestra que la N6-metiladenosina (m6A) es el tipo más abundante de modificación del ARNm en eucariotas. La modificación del ARN m6A, describe una metilación en la posición N6 de la adenosina, y es la modificación interna más abundante en el ARNm de eucariotas. Además, se presenta principalmente en las regiones no traducidas (UTR) 5 'o 3', cerca de los codones de paro y dentro de los exones largos internos, revelando que puede estar involucrada en la activación/desactivación de genes y/o en la regulación de la unión de proteínas vinculadas con las funciones biológicas posteriores. El descubrimiento constante de enzimas que regulan la modificación de m6A nos permitirá comprender mejor todo el proceso de metilación del ARN por m6A. El proceso de modificación de m6A es dinámico y reversible, y está regulado principalmente por tres tipos de enzimas: metiltransferasas ("escritoras"), desmetilasas ("borradoras") y proteínas de unión a m6A ("lectoras") (figura 1). Como sugieren sus nombres, agregan, eliminan y reconocen a m6A respectivamente. Recientemente, muchos estudios han encontrado que la expresión aberrante de las enzimas reguladoras de m6A están

asociadas con enfermedades humanas, particularmente en cánceres (30).

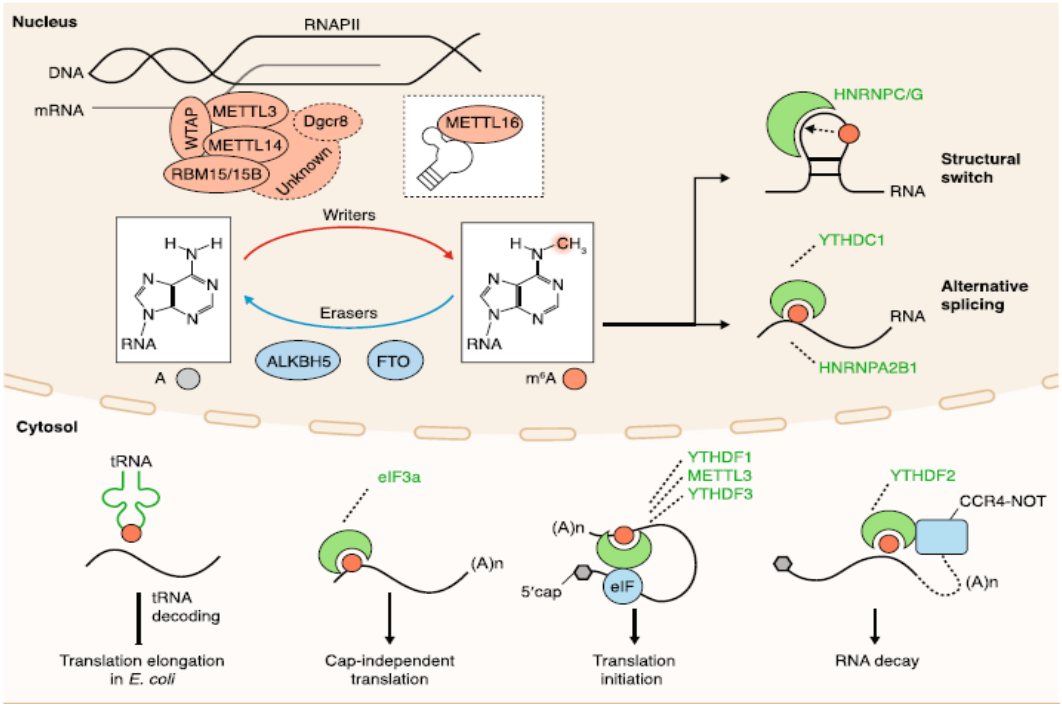


Figura 1. La maquinaria m6A. Los escritores, lectores, borradores y componentes celulares de eucariotas que interactúan con m6A y el ARN que lo contiene. A adenosina, homólogo 5 de ALKBH5 AlkB, factor de iniciación eucariota 3 eIF3, proteína asociada a la obesidad y masa grasa FTO, ribonucleoproteína C nuclear heterogénea de HNRNPC; N6-metiladenosina m6A, METTL3 metiltransferasa tipo 3, RNAPII ARN polimerasa II, dominio YTHDC1 YTH que contiene 1, dominio YTH de la familia 1 de YTHDF1. Tomado de (16).

Las metiltransferasas m6A del ARN constan de proteínas "escritoras" que incluyen: METTL3, METTL5, METTL14, METTL16 y sus cofactores que abarcan a la proteína asociada al tumor de Wilms 1 (WTAP), a la proteína de motivo de unión al ARN 15 (RBM15/15B), al tipo protooncogén Cbl 1 (CBLL1; también conocido como HAKAI), al tipo CCCH con dedos de zinc (ZC3H13) y al asociado a metiltransferasa m6A similar a Vir (VIRMA; también conocido como KIAA1429) (2).

3.2.5 Enzimas escritoras METTL3, METTL14 y METTL16 y su papel en el cáncer

METTL3 juega un papel fundamental en todas las etapas del ciclo de vida del ARN que involucra m6A, incluido el empalme previo al ARNm, la exportación nuclear, la regulación de la traducción, la desintegración del ARNm y el procesamiento de miARNs. Con la ayuda de otros componentes "escritores", el proceso catalítico de METTL3 modifica la mayoría de los sitios m6A y se ha considerado la vía m6A más común, especialmente en el ARNm. Se ha demostrado que METTL3 está desregulado en diversas neoplasias malignas humanas y está involucrado en muchos aspectos de la carcinogénesis (figura 2). La expresión de METTL3 se asoció con procesos biológicos como la adipogénesis, la vía mTOR y las especies reactivas de oxígeno. En la mayoría de las investigaciones sobre el cáncer, se ha encontrado que METTL3 está regulado positivamente y desempeña un papel oncogénico acompañado de un aumento de los niveles de m6A en comparación con los tejidos o líneas celulares normales. METTL3 está implicado en muchos aspectos de la progresión de las células cancerosas humanas, lo que ha llevado a muchos investigadores a explorar su posible mecanismo molecular. Los resultados de los estudios sobre las principales vías de METTL3 en varios cánceres se muestran en la Figura 2 (31). Particularmente, en una investigación reciente, se encontró la expresión de METTL3 significativamente regulada al alza en el tejido y las células del cáncer de mama, además, el nivel de m6A en el tejido del cáncer de mama también se mostró aumentado en comparación con los controles normales. Lo anterior demostró la función reguladora que posee METTL3 para modular la proliferación y la apoptosis en el cáncer de mama (32).

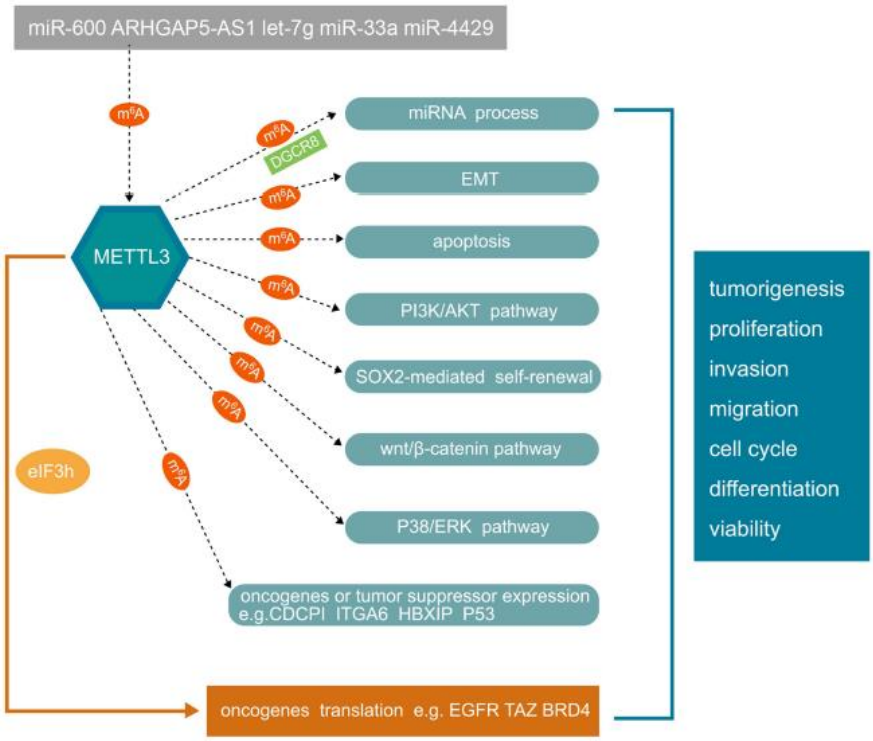


Figura 2. Los mecanismos de METTL3 implicados en la progresión del cáncer humano. Los ARN no codificantes pueden regular la expresión de METTL3. Por el contrario, METTL3 puede regular el proceso de miARN vía m6A. METTL3 juega un papel importante en la tumorogénesis, la proliferación de células tumorales, la invasión, la migración, el ciclo celular, la diferenciación de las células madre y la viabilidad de una manera dependiente de m6A. Los mecanismos subyacentes incluyen las vías EMT, apoptosis, PI3K/AKT, autorrenovación mediada por SOX2, wnt/b-catenina y P38/ERK. Además, METTL3 también puede regular la expresión de oncogenes o supresores de tumores de una manera dependiente de m6A. METTL3 también puede regular directamente la traducción de oncogenes independientemente de m6A reclutando eIF3h. METTL3, metiltransferasa tipo 3; EMT, transición epitelio-mesénquima; PI3K, fosfatidilinositol-3-cinasa; SOX2, factor de transcripción SRY-box 2; ERK, MAP cinasa regulada extracelular; CDCP1, dominio CUB que contiene proteína 1; ITGA6, subunidad alfa 6 de integrina; HBXIP, proteína que interactúa con la hepatitis B X de mamíferos; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; BRD4, bromodominio que contiene 4. Tomado de (31).

El complejo de metiltransferasas que comprende la metiltransferasa tipo 3 (METTL3) y la metiltransferasa tipo 14 (METTL14) cataliza eficazmente la transferencia de grupos metilo. METTL14 sirve como soporte estructural para METTL3, y juntos forman el complejo central de la metiltransferasa que induce la

modificación de m6A sinérgicamente (33). Diferentes estudios sugieren que la desregulación de las enzimas METTL3 y METTL14 contribuyen a la carcinogénesis humana. METTL3 se incrementó notablemente en el carcinoma hepatocelular (HCC) y, en consecuencia, promovió la proliferación y metástasis de HCC mediante el silenciamiento del supresor de tumores SOCS2. METTL3 también se elevó en otros tumores sólidos como el cáncer de mama, cáncer de páncreas y promovió el crecimiento, la invasión y la resistencia a los medicamentos de las células cancerosas. Por el contrario, METTL14 fue regulada a la baja en el HCC y resultó en una disminución del nivel de m6A y mejoró la capacidad metastásica de las células de HCC. En un estudio METTL3 y METTL14 mostraron efectos opuestos en la regulación del HCC. Sin embargo, como METTL3 y METTL14 tienen que formar un heterodímero para inducir la metilación de m6A, parece ser contradictorio que dos componentes de un complejo funcional demuestren efectos definitivamente opuestos sobre la progresión de las células cancerosas. Debido a lo anterior, Se ha especulado que METTL3 y METTL14 podrían preferir objetivos diferentes y conducir a diversas vías río abajo. METTL14 podría apuntar a diferentes sitios m6A en comparación con METTL3, lo que conduce a diversas interacciones con proteínas lectoras y distintas reacciones posteriores (34).

La enzima METTL16 puede regular la estabilidad y el empalme del ARNm y sus sitios de unión no se superponen con los de los complejos de metilación METTL3/METTL14, lo que sugiere que funciona de forma independiente (35). Además, METTL16 podría funcionar sola y catalizar m6A en el snRNA U6 (Componente de ARN nuclear pequeño no codificante de U6) y regular la tumorogénesis dirigiéndose a pre-mRNAs y ncRNAs. Varios escritores, como METTL3/16, son enzimas multifuncionales con actividades no catalíticas prominentes. En ausencia de un cofactor enzimático, los escritores de m6A funcionan como lectores y se unen a sustratos no modificados de manera constitutiva, lo que desencadena funciones no catalíticas (36). Un estudio mostró que el escritor METTL16 presentó una baja expresión en el adenocarcinoma rectal y se relacionó con un mal pronóstico de supervivencia (5).

3.2.6 Proteínas lectoras YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 y YTHDC2 y su relación con diferentes tipos de cánceres

La caracterización de los lectores de m6A ha proporcionado información valiosa sobre los mecanismos moleculares de la regulación génica postranscripcional mediada por m6A. La N6-metiladenosina regula la expresión génica a través de los "lectores", un grupo de varias proteínas que pueden reconocer la modificación de m6A. Las proteínas de la familia del dominio YTH de homología YT521-B altamente conservadas incluyen YTHDF1, YTHDF2 e YTHDF3 en el citoplasma, y el dominio YTH que contiene en el núcleo (YTHDC1) (6).

El reconocimiento y la unión de los sitios de ARNm de m6A por YTHDF2 e YTHDF3 dan como resultado la translocación de ARNm de grupos traducibles a sitios de descomposición de ARNm para la degradación de ARNm. Específicamente, los dominios YTH del extremo C de YTHDF2 y YTHDF3 se unen a los sitios m6A con un motivo central GC conservado, mientras que los dominios del extremo N son responsables de que el complejo proteína-ARNm se reubique en los sitios de desintegración del ARN, y la caída de YTHDF2 y YTHDF3 conduce a un aumento considerable de los ARNm modificados por m6A en las células. YTHDF1 promueve la traducción del ARNm metilado en m6A, YTHDF2 acelera la descomposición del ARNm metilado en m6A y YTHDF3, junto con YTHDF1 e YTHDF2, mejora notablemente el metabolismo del ARNm metilado en m6A en el citoplasma. YTHDF2 es la proteína que contiene el dominio YTH más ampliamente estudiada en el cáncer entre las YTHDF y las YTHDC. La homología de secuencia significativa entre YTHDF1 e YTHDF2 indica que pueden desempeñar un papel similar en la oncogénesis y la progresión. Generalmente, YTHDF2 juega un papel pro-tumorogénico en varios cánceres (figura 3). YTHDF2 se sobreexpresa en un amplio espectro de LMA (leucemia mieloide aguda) humana y es necesario para el inicio de la enfermedad y la propagación de la LMA humana y de ratón. En el cáncer de próstata, la regulación a la baja de YTHDF2, que generalmente está regulada al alza tanto en células cancerosas como en tejidos, inhibe significativamente la proliferación y migración celular al aumentar los niveles de m6A del ARN diana. Un

estudio encontró que tanto los niveles de ARNm como de proteínas de YTHDF2 eran más altos en los tejidos del cáncer de páncreas que en los tejidos normales de los pacientes, lo que indica que podría desempeñar un papel oncogénico en el cáncer de páncreas (4,6).

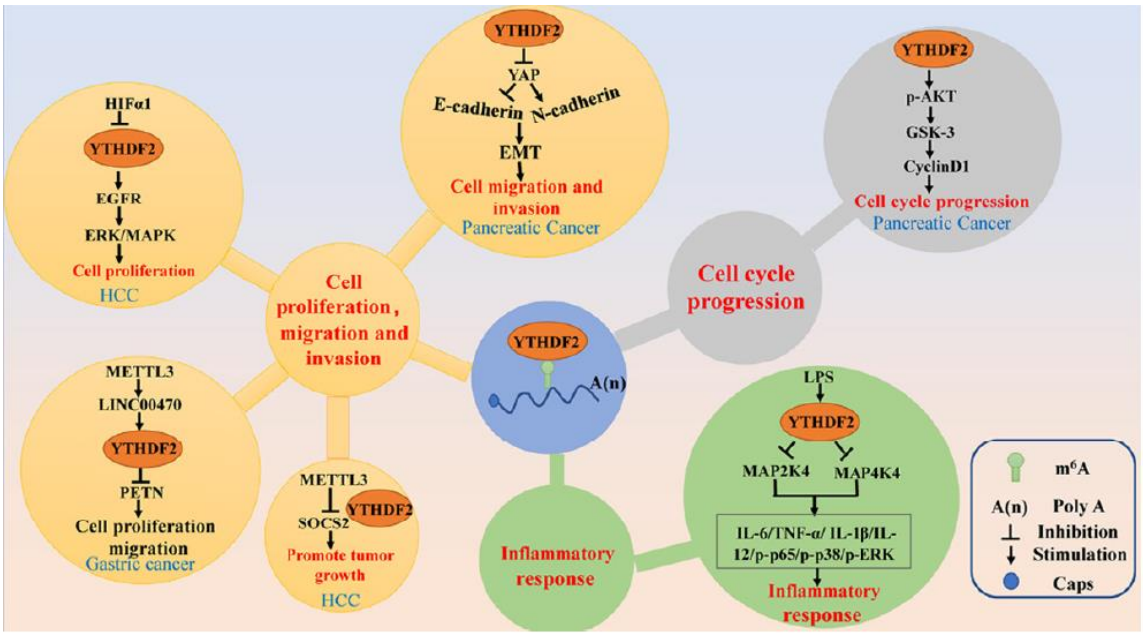


Figura 3. Las principales vías de señal de YTHDF2 en cánceres humanos. YTHDF2 regula la progresión del ciclo celular del cáncer, la proliferación celular, la migración y la invasión, y la respuesta inflamatoria a través de diferentes vías de señal. Tomado de (7).

El lector YTHDC1 se une a pre-ARNm modificados con m6A, recluta el factor de empalme SRSF3, pero bloquea SRSF10, promoviendo así la inclusión de exones, el empalme y la exportación de ARNm del núcleo al citoplasma. Aunque la eliminación de YTHDC1 no altera significativamente la distribución de transcripciones no objetivo, puede afectar el transporte del ARNm maduro desde el núcleo hasta el citoplasma. Por otra parte, YTHDC2 puede unirse preferentemente a los transcritos que contienen m6A, lo que da como resultado la disminución de la abundancia de ARNm y la mejora de la eficiencia de la traducción a través de la interacción con las maquinarias de inicio y desintegración de la traducción. La expresión de YTHDC1, particularmente el componente de corte y empalme alternativos se ha detectado en un panel de líneas celulares de próstata y no en las líneas celulares benignas de próstata, lo que indica que YTHDC1 puede actuar

como un oncogén en el cáncer de próstata. Además, YTHDC1 se expresa abundantemente en el adenocarcinoma de cólon, pero no en el adenocarcinoma de recto, lo que sugiere que YTHDC1 podría expresarse de manera diferencial en varios cánceres durante la heterogeneidad tumoral. Con respecto a YTHDC2, la creciente evidencia muestra que YTHDC2 también induce efectos tumorogénicos. Además, juega un papel esencial en el crecimiento y proliferación de las células de HCC y su expresión en hepatocitos podría ser inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF)-α (Figura 4). Además, YTHDC2 participa con frecuencia en la susceptibilidad al adenocarcinoma de páncreas. También, se ha visto que YTHDC2 está asociado con la progresión del cáncer de colon y contribuye a la metástasis del tumor de colon al promover la traducción de HIF-1α (4,7).

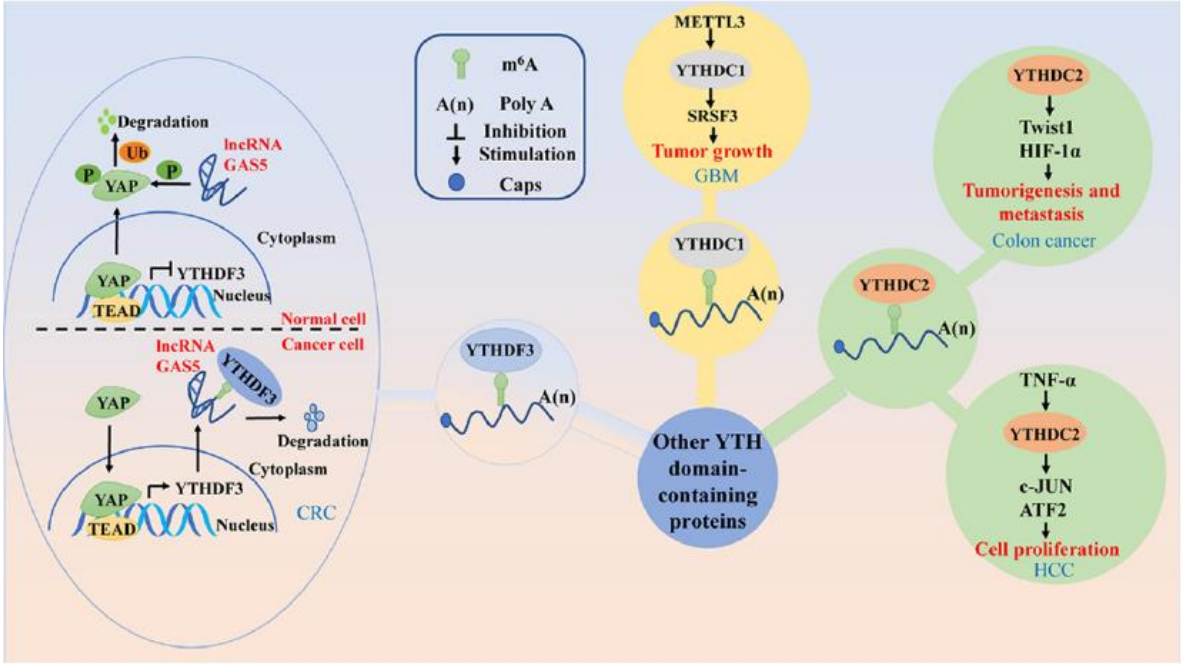


Figura 4. Las principales vías de señalización de otras proteínas que contienen el dominio YTH en cánceres humanos. YTHDF3 desempeña diferentes funciones en las células normales y las células cancerosas mediante diferentes mecanismos. YTHDC1 induce el crecimiento tumoral y YTHDC2 regula la proliferación de células cancerosas, tumorogénesis y metástasis en cánceres humanos. Tomado de (7).

Recientemente, se ha encontrado que las proteínas que contienen el dominio YTH juegan un papel importante en el proceso de modificación postranscripcional, por lo tanto, modulan la expresión de genes implicados en el cáncer y otros procesos,

incluida la progresión del ciclo celular, la proliferación celular, la migración y la invasión, la inflamación, la inmunidad y la autofagia. En el cáncer de páncreas, YTHDF2 promueve la proliferación celular, pero inhibe la migración e invasión celular. YTHDF3 está regulado a la baja en el cáncer colorrectal (CCR). Muchos estudios han demostrado que la proteína del dominio YTH juega un papel importante en la progresión del cáncer humano. Las evidencias de estudios sugieren que YTHDF1 actúa como un oncogén regulando diferentes vías de señalización en varios cánceres, como el CCR, el HCC, el cáncer de mama, el carcinoma de células de Merkel y el carcinoma de células no pequeñas en cáncer de pulmón. Casi todas las proteínas de la familia YTH actúan como oncogenes en varios tipos de cáncer, excepto YTHDF2 que está regulado negativamente en el HCC y YTHDC2 está regulado negativamente en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Por ejemplo, YTHDF2 no sólo promueve la proliferación de células cancerosas y la metástasis, sino que también actúa como un supresor de tumores para inhibir la proliferación celular. Además, YTHDF2 reprime la proliferación y el crecimiento de las células tumorales mediante la unión directa con el sitio de modificación m6A de EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico) 3'-UTR para promover la descomposición del ARNm de EGFR en las células de HCC (7).

La identificación y caracterización de los lectores de m6A ha despejado el camino para comprender el papel de las modificaciones de m6A en diversos procesos biológicos. Los efectos mediados por las proteínas lectoras han demostrado que desempeñan funciones importantes en la modulación de la expresión génica durante el desarrollo temprano, la diferenciación, la respuesta inmunitaria, la respuesta al estrés y la progresión de la enfermedad (3).

4. Justificación

El cáncer de mama es una de las principales neoplasias malignas diagnosticadas y es la principal causa de muerte asociada a cáncer entre las mujeres a nivel mundial. En la última década se ha prestado un gran interés al campo de la epigenética y su relación con enfermedades como el cáncer y, gracias a la identificación de las modificaciones químicas en todas las especies de ARN, se abrió paso al surgimiento de la epitranscriptómica. Dentro de este campo, se ha revelado que la modificación m6A (N6-metiladenosina) es la más abundante y conservada en las células eucariotas. Este proceso de modificación de m6A es dinámico y reversible siendo regulado por unas enzimas denominadas “escritoras” (metiltransferasas), “borradoras” (desmetilasas) y “lectoras” (proteínas de unión a m6A). Las metiltransferasas METTL3, METTL14 y METTL16 se encargan de agregar grupos metilo en la posición N6 de la adenosina del ARNm, el lector YTHDC1 se encarga de la regulación génica dentro del núcleo y, las proteínas lectoras YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 y YTHDC2, de la regulación génica postranscripcional al reconocer la modificación m6A. Una gran cantidad de estudios han mostrado que este grupo de enzimas se encuentran implicadas en diversos tipos de cáncer y que una expresión desregulada de estos genes puede provocar un aumento en la proliferación celular, una disminución de la apoptosis, aumentar la capacidad migratoria de las células malignas e incluso estar involucrados en la resistencia a algunos medicamentos utilizados como tratamiento contra el cáncer. La utilización del tamoxifeno como tratamiento contra el cáncer de mama en todas las etapas y con receptor de estrógeno positivo, ha demostrado disminuir las muertes de las pacientes mejorando su supervivencia. Además, la terapia hormonal con tamoxifeno también se emplea para la prevención del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar esta neoplasia maligna.

5. Planteamiento del problema

La resistencia hormonal al tamoxifeno representa un desafío importante para el tratamiento exitoso de las pacientes con cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo. Aunque algunos estudios han mostrado por ejemplo que, el gen METTL3 está involucrado en la resistencia al tamoxifeno en células MCF-7, aún no se conoce con exactitud de qué forma la alteración en sus niveles de expresión puede regular la resistencia al tratamiento (9). La escasez de información sobre este tema obstaculiza una mejor compresión sobre la relación que pueden tener los mecanismos de expresión de las proteínas escritoras y lectoras en la resistencia a tratamientos, en este caso al tamoxifeno, contra el cáncer de mama. Actualmente, la información sobre la resistencia al tamoxifeno relacionada con las metiltransferasas y proteínas lectoras de m6A es limitada. Es por ello que, este trabajo se enfoca en el análisis de los niveles de expresión de los genes escritores METTL3, METTL14, METTL16 y de las proteínas reguladoras YTHDF1-3 y YTHDC1-2 en una línea resistente al tamoxifeno generada a partir de la linea MCF-7 y en pacientes con cáncer de mama, para comprender si existe una posible relación entre la expresión de estos genes y la resistencia al tamoxifeno.

6. Hipótesis Científica

La expresión de las metiltransferasas de m6A METTL3, METTL14, METTL16 y de las proteínas lectoras YTHDF1-3, YTHDC1-2 en la línea celular MCF-7 será diferente entre las variantes sensible y resistente al tamoxifeno y en las pacientes con cáncer.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Analizar los cambios en la expresión de las metiltransferasas de m6A METTL3, METTL14, METTL16 y de las proteínas lectoras YTHDF1-3, YTHDC1-2 en la línea celular MCF-7 sensible y resistente al tamoxifeno y en pacientes con cáncer de mama.

7.2 Objetivos Particulares

1. Dominar las técnicas básicas de biología molecular: diseño de oligonucleótidos, extracción de RNA, PCR y RT-PCR.
2. Obtener los datos correspondientes a la línea celular MCF-7 sensible y resistente a tamoxifeno de la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO).
3. Obtener los datos correspondientes a pacientes con cáncer de mama de la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).
4. Analizar los niveles de expresión de los genes METTL3, METTL14, METTL16, YTHDF1-3 y YTHDC1-2 en la línea celular MCF-7 y en las pacientes con cáncer de mama por subtipo molecular de cáncer de mama.
5. Analizar si hay cambios en la expresión relacionados con la resistencia al tamoxifeno y compararlo con los resultados en las pacientes con cáncer de mama.
6. Analizar la supervivencia con respecto a la expresión de cada gen en las pacientes por subtipo de cáncer de mama.

8. Material y métodos

8.1 Estrategia de trabajo

El trabajo de investigación en cuestión se llevó a cabo siguiendo una serie de pasos que permitieron alcanzar los objetivos establecidos.

La primera parte se centró en el aprendizaje de las técnicas básicas de biología molecular con base en lo descrito en el libro “Molecular cloning: a laboratory manual. 4ta ed.” (38). Las técnicas se realizaron de acuerdo al siguiente orden:

- Extracción de ARN

  Este paso consistió en aprender a extraer el ARN de las células sanguíneas y de cultivo celular siguiendo el protocolo establecido en los reactivos utilizados.
- Electroforesis en gel de agarosa

  Para realizar esta actividad fue necesario conocer la concentración a la cual se debía encontrar el gel de agarosa, además, saber cuáles son los lineamientos que se tienen que establecer para correr una muestra de ARN o ADN en la cámara de electroforesis y que pueda ser visualizada en un transiluminador UV.
- Cuantificación de ARN

  Para llevar a cabo una RT-PCR es necesario conocer primero la concentración y la pureza del ARN extraído, y estos parámetros se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000, el cual debe ser configurado por medio de un software para obtener resultados congruentes con las muestras medidas.
- RT-PCR

  Para realizar esta técnica fue necesario conocer cuáles eran los reactivos que se utilizarían (en este caso se obtuvieron del kit SuperScript RT), aprender a configurar el termociclador y hacer los cálculos pertinentes para obtener la cantidad de ARN que se utilizaría en la reacción. Una vez

establecido lo anterior fue posible realizar una RT-PCR para la obtención de un ADNc,

- Diseño de primers

  Antes de diseñar lo oligos se obtuvo información sobre los genes y sus características para poder obtener los productos deseados. Al tener la información necesaria, se utilizaron herramientas proporcionadas por plataformas digitales como NCBI, primer-Blast, OligoAnalizer y Ensembl para conseguir los primers de los genes METTL3, METTL14 y METTL16.

- PCR convencional

  A cada primer se le realizó una estandarización por medio de una PCR convencional para verificar si fueron correctamente diseñados y una vez corroborada la información por medio de una electroforesis en gel de agarosa y un transiluminador UV, se llevaron a cabo dos reacciones (positivo y negativo) más en cada oligo para comprobar que no existiera contaminación en la muestra.

- PCR en tiempo real

  Por último, se efectuó una PCR cuantitativa en el gen METTL14. Para hacer la PCR se requirió configurar el instrumento Applied Biosystems y el protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del kit PowerUp SYBR Green Master Mix.

Obtención de los datos de las pacientes y la línea celular.

La siguiente parte consistió en el análisis de los datos de las muestras de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y de las líneas celulares derivadas de MCF-7 resistentes al tamoxifeno. Los archivos se descargaron de las plataformas digitales TCGA y GEO respectivamente. Después, se inspeccionaron los archivos por medio de Excel para verificar que los datos cumplieran con los criterios previamente establecidos (criterios de inclusión, exclusión y de eliminación).

Obtención de datos de línea celular

Se utilizaron los datos del modelo de línea celular LCC que se derivó de MCF-7 y desarrolló resistencia al tamoxifeno, este modelo incluye a LCC0 (dependiente de estrógeno y sensible al tamoxifeno), LCC1 (independiente de estrógeno y sensible al tamoxifeno), LCC2 (derivado de LCC1 con tratamiento con tamoxifeno en dosis pequeñas aumentadas, independiente de estrógeno y resistente al tamoxifeno) y LCC9 (derivado de LCC1 con aumento del tratamiento con fluvestrant en dosis pequeñas, estrógeno independiente y resistencia cruzada tanto al fluvestrant como al tamoxifeno). El otro es el modelo de línea celular TAMR que también se derivó de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y desarrolló cuatro sublíneas resistentes al tamoxifeno: MCF-7/TAMR-1 (TAMR-1), MCF-7/TAMR-4 (TAMR-4), MCF-7/TAMR-7 (TAMR-7) y MCF-7/TAMR-8 (TAMR-8) las cuales se derivaron de colonias distintas que emergieron en cultivos de células MCF-7/S0.5 tratadas con tamoxifeno 1 µM.

Obtención de datos de pacientes con cáncer de mama

Datos de pacientes femeninas con cáncer de mama obtenidos de la base de datos TCGA. Los datos deben mostrar el subtipo molecular del cáncer de mama, la proliferación, apoptosis, estado de la paciente (viva o muerta) y el seguimiento (en días). Se eliminaron los datos de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama que no eran pacientes femeninas. Los datos de las pacientes y de las líneas celulares derivadas de MCF-7 deben presentar la expresión de los genes METTL3, METTL14, METTL16, YTHDF1-3 y YTHDC1-2.
Se descartaron aquellos datos de pacientes y de las líneas celulares derivadas de MCF-7 que presentaron anomalías como falta de información sobre la cantidad de expresión de alguno de los genes anteriormente descritos, si no se especificaba el subtipo molecular, el estado de la paciente y el seguimiento.

Se montaron las siguientes técnicas de biología molecular: extracción y cuantificación del ARN de la línea celular MDA-231, RT-PCR, diseño de primers, PCR convencional, PCR en tiempo real y electroforesis en gel de agarosa.

Extracción de RNA

1. Eliminar el medio de cultivo y añadir 0.750 ml de Trizol directamente a la placa de cultivo para lisar las células. A continuación, pipetear el lisado para homogeneizar.
2. Incubar la muestra durante 5 minutos para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas.
3. Agregar 0.200 ml de cloroformo y agitar hasta que el contenido se torne de un color rosa claro y dejar reposar durante 3 minutos.
4. Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 12.000 × g a 4 ° C.
5. Con una micropipeta transferir la fase acuosa que contiene el ARN a un nuevo microtubo.
6. Añadir 0.500 ml de isopropanol a la fase acuosa y dejar incubar la muestra durante 1 hora a -4°C.
7. Centrifugar la muestra durante 10 minutos a 12,000x g a 4°C. El precipitado de ARN total forma un punto blanco similar a un gel en la parte inferior del tubo.
8. Descartar el sobrenadante con una micropipeta.
9. Agregar 1 ml de etanol al 75% a la muestra.
10. Agitar la muestra brevemente y después centrifugar durante 5 minutos a 7,500x g a 4°C.
11. Descartar el sobrenadante y repetir los pasos 9 y 10.
12. Retirar por completo el etanol de la muestra utilizando una micropipeta.
13. Dejar secar la muestra durante 5 minutos.
14. Hidratar el ARN con 30 microlitros de agua libre de ARNasas.

Electroforesis de ARN en gel de agarosa

La electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa constituye una herramienta importante de la biología molecular para caracterizar, identificar y aislar ADN y ARN.

La electroforesis en gel de agarosa se emplea para visualizar la integridad del ADN genómico y para evaluar la presencia e integridad de las diferentes especies del ARN.

Preparación un gel de agarosa al 1X utilizar:

1. Disolver la agarosa en un buffer de TBE y fundirlo, dejar enfriar para que se polimerice el contenido, proseguir añadiendo la muestra (ARN) y buffer de carga.
2. Después, establecer el voltaje a 90 mV y dejar correr la muestra durante 40 minutos, finalmente, visualizar el gel en un transiluminador UV.

Cuantificación del ARN

Se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 1000 para realizar la cuantificación de la muestra. El sistema permite cuantificar y evaluar rápida y fácilmente la pureza de muestras como las proteínas y los ácidos nucleicos.

Los parámetros establecidos para considerar pura una muestra de ARN son:

En la relación de absorbancia de la muestra a 260 nm y 280 nm el resultado arrojado debe ser de 2 para una pureza óptima, aunque se considera como una pureza aceptable si el resultado es >1.7.

En la relación de absorbancia de la muestra a 260 y 230 nm el resultado arrojado debe ser de 1.8 a 2.2.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

La síntesis de ADNc se llevó a cabo con el kit SuperScript RT (Life Technologies, USA).

1. Agregar los siguientes reactivos a un tubo para PCR:

Primer tubo	
Primer	1 microlitro
ARN	3.84 microlitros
dNTP Mix	2 microlitros
Agua DEPC	5.16 microlitros
Total	12 microlitros

2. Calentar la mezcla del primer tubo en un termociclador a 65 ° C durante 5 minutos y se dejar enfriar en hielo. Centrifugar el contenido brevemente y añadir los siguientes reactivos:

Segundo tubo master mix	
Buffer 5x	4 microlitros
DTT (0.1M)	1 microlitro
RNAsa out	1 microlitro
Agua DEPC	1 microlitro
Enzima	1 microlitro
Total	8 microlitros

1. Después, agregar el master mix, mezclar perfectamente y reanudar el proceso en el termociclador.
2. Al finalizar, se obtendrán 20 microlitros de cDNA listo para utilizarse en reacciones de PCR.

Diseño de primers

Los primers para los genes METTL3, METTL14 Y METTL16 se diseñaron utilizando el software primer-BLAST.

PCR convencional

Se realizaron tres pruebas de PCR convencional para estandarizar cada primer (METTL3, METTL14 y METTL16) con cDNA de la línea celular MCF-7. El protocolo que se llevó a cabo es el establecido en el manual de “Invitrogen Taq DNA Polymerase”.

1. Agregar los siguientes componentes a un microtubo estéril sobre hielo:

Componentes	**1 reacción**	**3 reacciones**
10x Buffer	2 µl	6 µl
10 mM dNTP mixture	0.4 µl	0.8 µl
50 mM MgCl2	0.8 µl	2.4 µl
Primer mix (10 µM cada uno)	0.4 µl	1.2 µl
cDNA	1 µl	3 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl	0.6 µl
Agua DEPC	15.2 µl	30.4 µl
Total	20 µl	60 µl

2. Incubar los tubos en un termociclador a 94 °C durante 3 minutos para desnaturalizar el cDNA.
3. Establecer 35 ciclos de amplificación por PCR de la siguiente manera:

Desnaturalización a 94 °C durante 45 s

Alineamiento a 56 °C, 58 °C y 60 °C durante 30 s

Extensión a 72 ° C durante 1 min 30 s

4. Incubar la reacción durante 10 min más a 72 °C y mantener a 4 ° C.
5. Al finalizar los productos de amplificación serán analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados en un transiluminador UV.

PCR en tiempo real

Las reacciones de METTL3, METTL14 Y METTL16 se realizaron siguiendo el protocolo establecido en el “PowerUp SYBR Green Master Mix User Guide”.

Preparación de la reacción de PCR

1. Utilizar los siguientes reactivos para 3 reacciones de METTL14:

Componentes	**Vol. 1 reacción**	**Vol. 3 reacciones**
PowerUp SYBR Green Master Mix (2X)	5 µl	15 µl
Primers	0.2 µl	0.6 µl
cDNA	0.5 µl	1.5 µl
Agua DEPC	4.3 µl	12.9 µl
Total	10 µl	30 l

Análisis de datos

El análisis de los datos obtenidos de las bases de datos se realizó con el programa R (versión 4.0.3) con la interfase RStudio. Se llevó a cabo la estadística descriptiva para analizar la expresión de METTL3, METTL14, METTL16, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 y YTHDC2 en los subtipos LumA, LumB, Her2, Basal y Normal-like de la siguiente manera:

A los resultados de las variables se les calculó la media, mediana, mínimo, máximo, el primer y tercer cuartil y la desviación estándar. La hipótesis de normalidad de las distribuciones de datos se realizó con la prueba de Shapiro-Wilk. Se aplicó el modelo lineal general a las medianas y con los resultados obtenidos se determinó la sobredispersión de los datos. Se llevó a cabo una ANOVA para determinar la significancia estadística y para ajustar el nivel de confianza se utilizó la prueba de

Tukey, α <0.05 se consideró estadísticamente significativa.

Para el análisis de supervivencia de las muestras se utilizó una curva ROC tiempo-dependiente. Se calculó la variable de supervivencia para cada subtipo de cáncer de mama, se llevó a cabo la obtención del mínimo, máximo, primer y tercer cuartil, media, mediana y la desviación estándar de los datos para después aplicar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Se realizó la prueba no paramétrica Log-Rank para comparar las dos curvas de supervivencia correspondientes a las diferentes expresiones (alto y bajo) de las proteínas lectoras y metiltransferasas. Y, al final, se aplicó la prueba “chi” cuadrada para obtener el valor de “p”, una p <0.05 se consideró estadísticamente significativa.

A los datos de las líneas celulares (LCC y TAMR) se les obtuvo la media, mediana y desviación estándar. Para la comparación de los niveles de cada gen en las líneas celulares se llevó a cabo la prueba de U de Mann-Whitney debido a que los datos no presentaron una distribución normal. p <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

9. Resultados

Extracción de RNA

El RNA de la línea celular MCF-7 fue obtenido siguiendo el protocolo de extracción de RNA descrito en el manual de uso del TRIzol. El RNA se corrió en un gel de agarosa al 1X, en una cámara de electroforesis a un voltaje de 90mV durante 40 minutos. Al final, el gel fue visualizado en un transiluminador donde fue posible observar las 3 bandas características de una correcta integridad del RNA (Figura 5). Las bandas de ARN 28s, 18s y 5s se muestran nítidas indicando que el ARN se encuentra intacto.

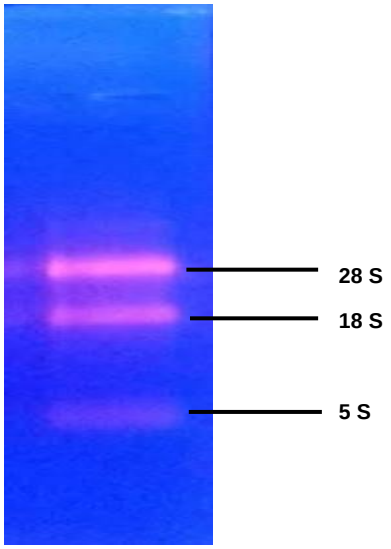


Figura 5. RNA total donde podemos ver la existencia de 3 bandas. lo cual nos indicó que la muestra posee una integridad adecuada.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Los resultados de los primers elegidos para METTL3, METTL14 y METTL16 fueron los siguientes:

Primer	**Secuencia 5→3**	**Longitud**	**Tamaño del primer**
F-METTL3	AATACTACAACAGCCAAGGAAC	169pb	20pb
R-METTL3	GAGCAGTCACCTAAAGACTCAT		20pb
F-METTL14	CGGGGACTTCATTCATGCTA	200pb	20pb
R-METTL14	TGCTATTTGTAAGCGTTGGTC		21pb
F-METTL16	ACAGAAGACACTCCTGATGG	150pb	20pb
R-METTL16	TTAACAGAACTAGGCGGAGG		20pb

PCR convencional

Se realizaron tres pruebas de PCR convencional para estandarizar cada primer (METTL3, METTL14 y METTL16) con cDNA de la línea celular MCF-7.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de PCR para los diferentes oligos:

METTL14

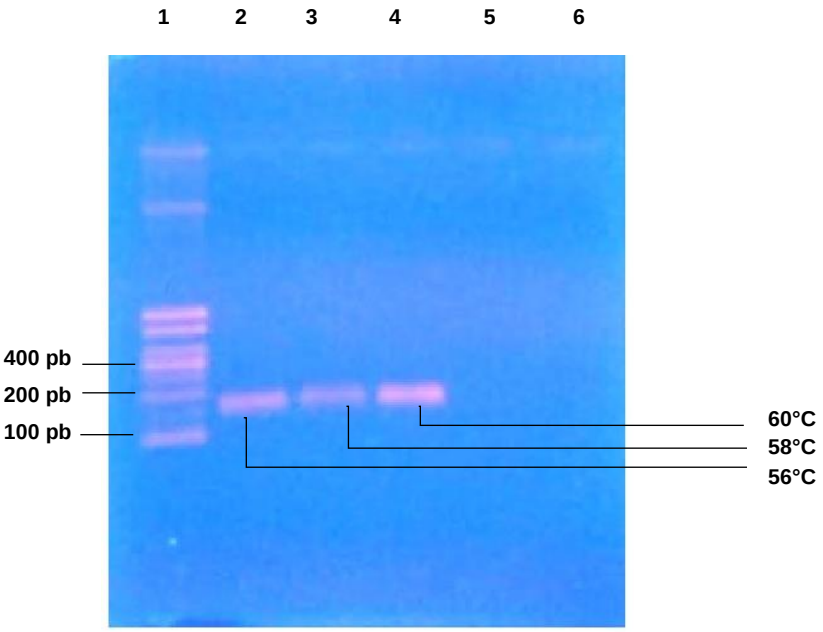


Figura 6. Estandarización de la temperatura óptima para METTL14, se observó que la temperatura óptima para los primers fue de 60°C.

METTL16

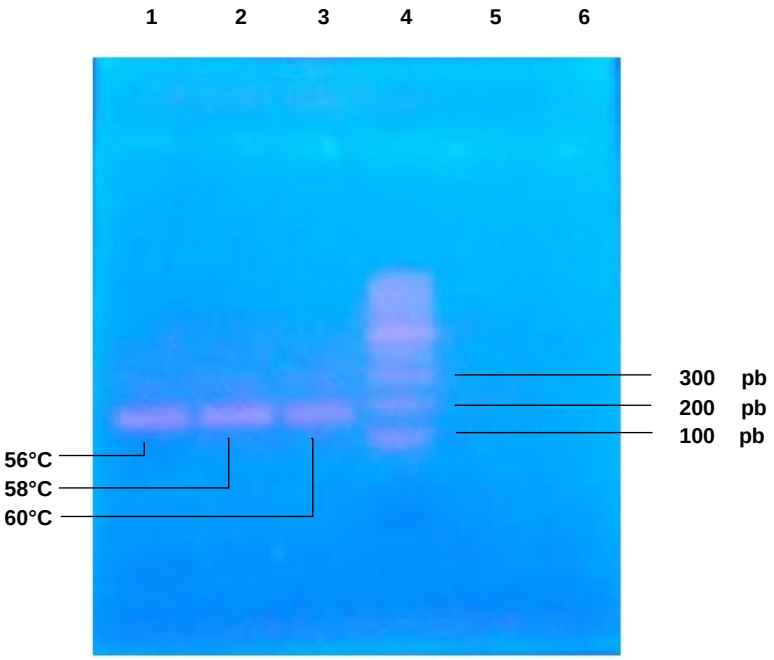


Figura 7. Estandarización de la temperatura óptima para METTL16, se observó que la temperatura óptima para los primers fue de 58°C.

PCR en tiempo real

Las reacciones de METTL3, METTL14 y METTL16 se realizaron siguiendo el protocolo establecido en el “powerup SYBR green master mix user guide” y los resultados obtenidos se visualizaron en el “stepOne software v2.3”. En la reacción de qPCR de METTL14 se introdujeron tres muestras de prueba con un control negativo. En la figura 8 se muestran los resultados de la reacción; el valor de Ct (Threshold cycle) de dos de las muestras se encuentra en 33.7, indicando la presencia del blanco, a diferencia del negativo el cual posee un Ct sin datos confirmando la ausencia de contaminación.

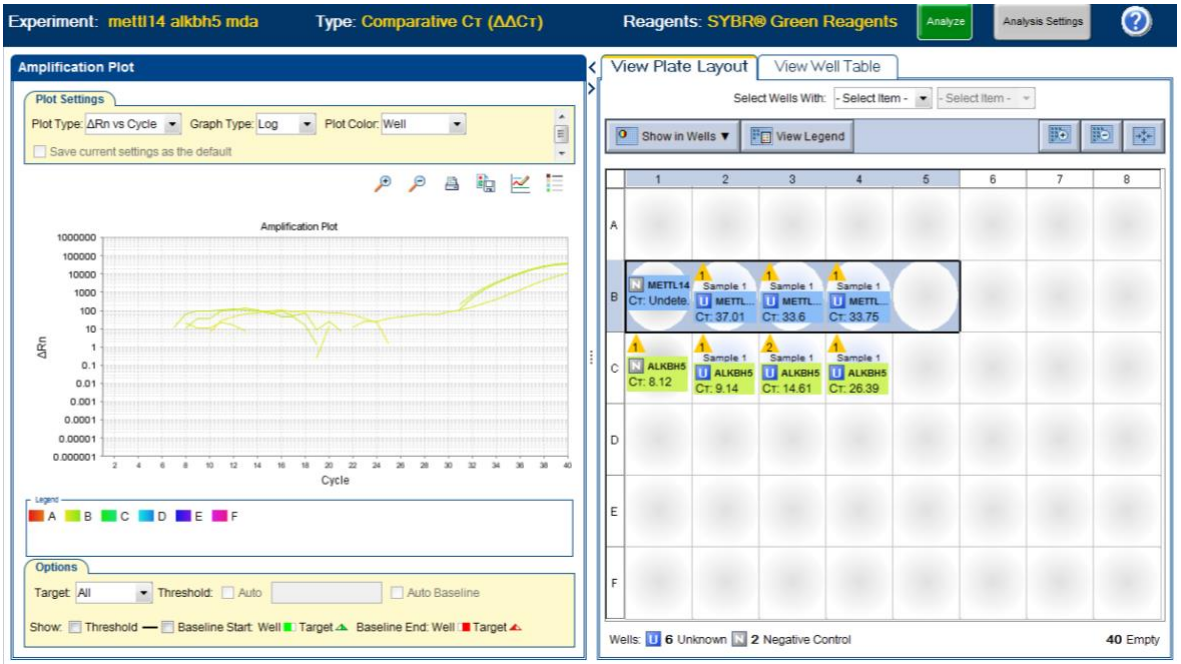


Figura 8. Corrida de PCR en tiempo real, podemos observar que el gen METTL14 muestra 3 valores de Ct: 37.1, 33.6 y 33.75 para cada muestra.

Con respecto a la figura 9, el análisis de la curva de fusión nos muestra la presencia de un solo pico de amplificación corroborando la inexistencia de productos ajenos a METTL14.

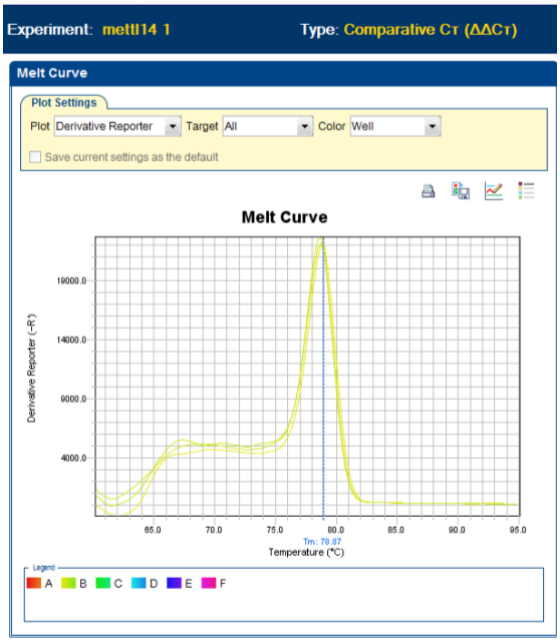


Figura 9. En la imagen se muestra la curva de fusión y se puede ver que hay un solo pico, lo cual

indica la especificidad de la amplificación.

Comparación de la expresión de los genes escritores y reguladores en las líneas celulares derivadas de MCF-7

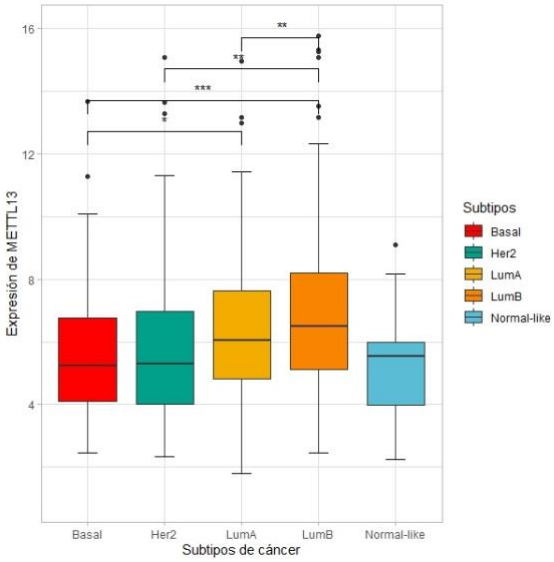
Se utilizó la prueba U de Mann- Whitney para comprobar la existencia de las posibles diferencias de expresión de las metiltransferasas METTL3, METTL14, METTL16 y las proteínas lectoras YTHDF1-3 y YTHDC1-2 entre la línea celular MCF-7 (sensible al tamoxifeno) y las líneas celulares TAMR 1, TAMR 4, TAMR 7, TAMR 8 y LCC 0, LCC 1, LCC 2, LCC 9 (resistentes al tamoxifeno). Los resultados de las pruebas en las líneas celulares TAMR-1 y TAMR-7 no mostraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de los genes escritores y lectores, ya que los valores obtenidos de p fueron los siguientes: P= 1 y P= 0.60 respectivamente (Tabla 6). Por otra parte, cabe señalar que no se presentaron los resultados de las sublíneas LCC0, LCC1, LCC2, LCC9, TAMR-4 y TAMR-8 debido a que estas muestras arrojaron valores negativos impidiendo de esa manera realizar las pruebas de comparación.

Resultados de la comparación entre líneas celulares

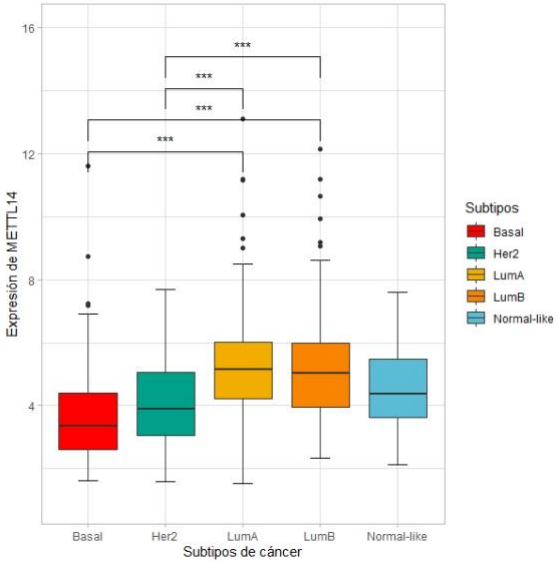
Líneas celulares comparadas				**Estadístico de prueba**	
Sensible al tamoxifeno		**Resistente al tamoxifeno**			
MCF-7S0.5	Media ± DE 16.64 ± 7.22	TAMR-1	Media ± DE 16.82 ± 9.16 Mediana 12.62	U 384	P 1
	Mediana 16.68	TAMR-7	Media ± DE 15.47 ± 7.75 Mediana 14.84	U 280	P 0.60

Análisis de los niveles de expresión de METL3, METTL14, METTL16, YTHDF1-3 y YTHDC1-2 en pacientes con cáncer de mama.

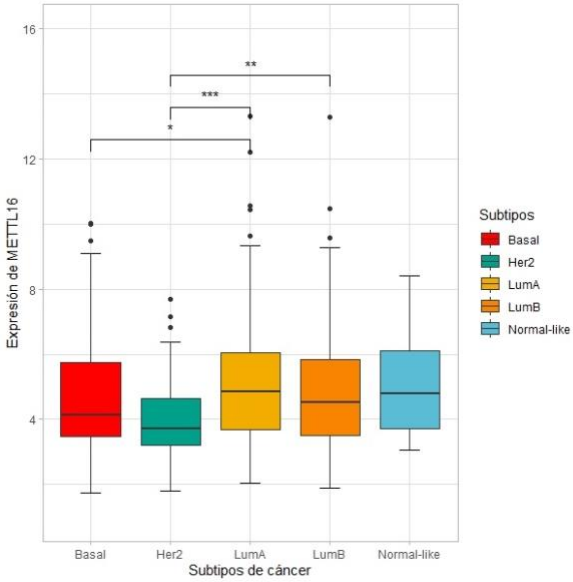
Se analizaron 743 muestras de pacientes obtenidas de una base de datos, de las cuales, 365 muestras corresponden al subtipo luminal A, 165 al luminal B, 128 al subtipo basal, 67 al subtipo Her2 y 17 al tipo normal-like. Los resultados de los niveles de expresión de los genes encargados de reconocer y metilar al ARNm (METTL3, METTL14 y METTL16) muestran diferencias significativas en cada subtipo. El escritor METTL3 presenta una mayor expresión en LumB con respecto al subtipo Lum A, Her2 y Basal (Fig. 6 A). Los niveles de expresión de METTL14 son más altos en LumB y LumA que en los subtipos Her2 y basal (Fig. 6 B). Con respecto a METTL16, la expresión es mayor en el subtipo LumA en comparación con Her2 y el subtipo basal (Fig. 6 C). Asimismo, el análisis de los niveles de expresión de los genes encargados de la regulación génica postranscripcional exhibe diferencias en relación con el subtipo. La expresión del lector YTHDF1 presento diferencias significativas entre todos los subtipos, siendo mayor en Lum B (Fig. 6 D). El lector YTHDF2 presenta una mayor expresión en el subtipo basal en comparación con Lum A y Lum B (Fig. 6 E). En cuanto a YTHDF3, muestra un mayor nivel de expresión en LumB que en LumA, basal y en el normal-like (Fig. 6 F). Los genes lectores YTHDC1 y YTHDC2 en Lum B y Lum A tuvieron mayor expresión con respecto a los subtipos basal y Her2 (Fig. 6 G-H) de forma similar que en las escritoras METTL3 y METTL14 (Fig. 6 A-B). De las 5 lectoras analizadas (YTHDF1-3 y YTHDC1-2) solo en dos (YTHDF1 y YTHDF3) se encontraron diferencias significativas de expresión con respecto al subtipo normal-like.


Expresión de METTL13
Subtipos de cáncer
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like
Subtipos
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like

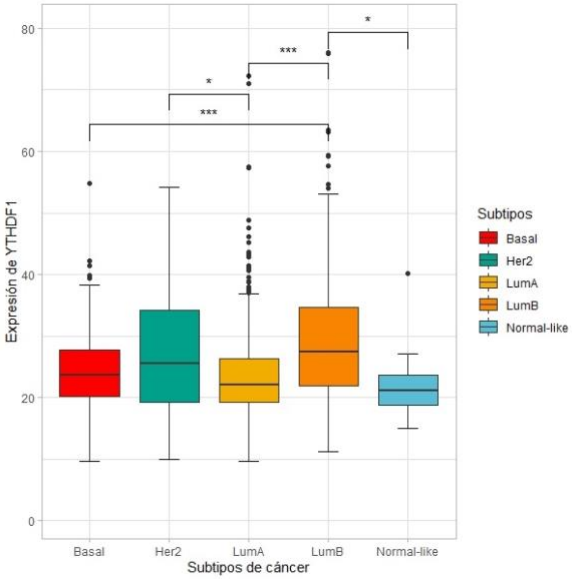
A


Expresión de METTL14
Subtipos de cáncer
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like
Subtipos
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like

B


Expresión de METTL16
Subtipos de cáncer
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like
Subtipos
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like

C


Expresión de YTHDF1
Subtipos de cáncer
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like
Subtipos
Basal
Her2
LumA
LumB
Normal-like

D

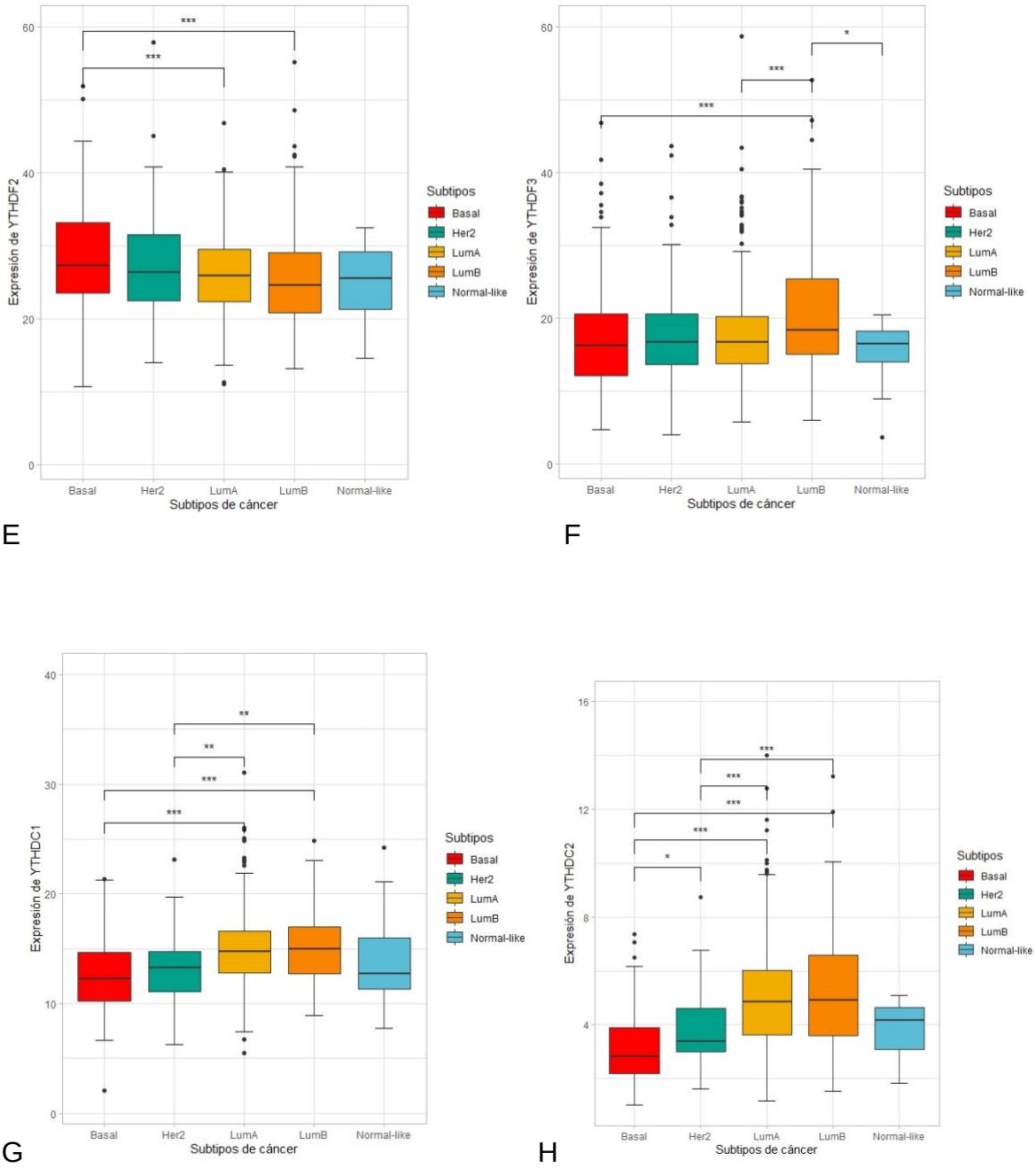
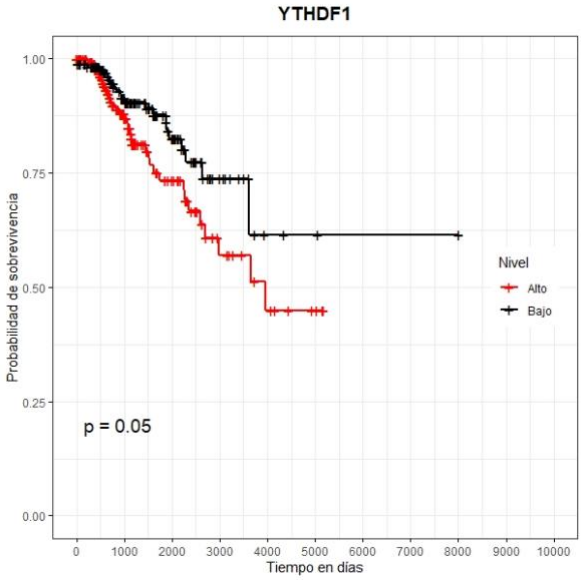
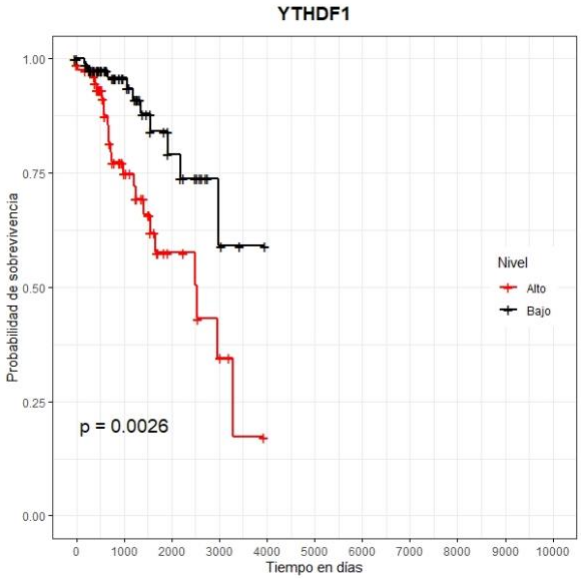


Fig.6 Expresión de las metiltransferasas de m6A (METTL3, METTL14, METTL16) y las proteínas lectoras (YTHDF1-3 y YTHDC1-2) en los diferentes subtipos de cáncer de mama. **A)** Lum B muestra una mayor expresión de METTL3. **B)** La expresión de METTL14 es significativamente mayor en Lum A y Lum B. **C)** La expresión de METTL16 se muestra más alta en Lum A. **D)** La expresión de YTHDF1 es mayor en Lum B que en el resto de los subtipos. **E)** La expresión de YTHDF2 en el subtipo basal es mayor con respecto a los subtipos Lum A y B. **F)** YTHDF3 muestra una mayor expresión en Lum B que el resto de los subtipos. **G)** La expresión de YTHDC1 en Lum B y Lum A es más alta. **H)** El lector YTHDC2 muestra una mayor expresión en Lum B y Lum A. p <0.001'***', p< 0.01'**', p<0.05'*'

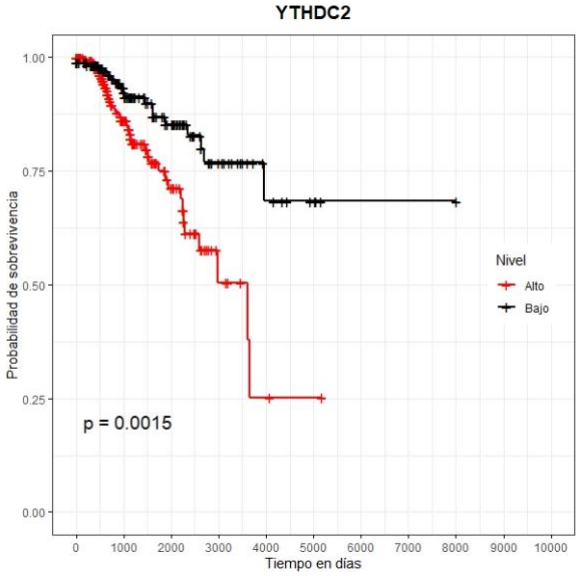
Relación de la sobrevivencia con la expresión de los genes reguladores de m6A.



A) Lum A



B) Lum B



C) Lum A

Fig.7 Análisis de la probabilidad de la sobrevivencia en los diferentes subtipos de cáncer de mama. **A)** La probabilidad de supervivencia disminuye significativamente si existe un alto nivel de YTHDF1 en el subtipo Lum A. **B)** La probabilidad de supervivencia disminuye significativamente si existe un alto nivel de YTHDF1 en el subtipo Lum B. **C)** En el subtipo Lum A se observa un alto nivel de YTHDC1 indicando una baja probabilidad de sobrevivencia.

De todas las muestras de los diferentes subtipos (Lum A, Lum B, basal, Her2, normal-like) solo se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia con relación a la expresión de dos genes reguladores, YTHDF1 y YTHDC2, en los subtipos luminal A y luminal B.

10. Discusión

El cáncer de mama es una de las neoplasias malignas diagnosticadas con mayor frecuencia y es la principal causa de muerte asociada al cáncer entre las mujeres de todo el mundo (20). Esta neoplasia maligna presenta una gran diversidad genética, epigenética y fenotípica, la cual proporciona un alto grado de complejidad al intentar descifrar los mecanismos y las vías involucradas en los procesos de desregulación que conducen al desarrollo de la enfermedad (18). El concepto "epitranscriptoma" se introdujo como resultado del descubrimiento de la presencia de marcas químicas en las especies de ARN. Con el tiempo, y gracias al desarrollo de nuevas tecnologías que permitieron realizar mapeos en el transcriptoma de las modificaciones químicas, en este caso de mA6, se descubrió que esta alteración está involucrada en un conjunto diverso de funciones de transcripción, empalme, exportación nuclear, traducción y estabilidad del ARNm (12), (13), (14). Diversas investigaciones han develado que la modificación m6A presente en el ARNm se encuentra implicada funcionalmente en varios procesos biológicos, incluida la carcinogénesis (30), (2), (31). Por lo tanto, resulta importante descubrir que genes encargados del proceso de regulación de m6A se ven afectados por la alteración de sus niveles de expresión en las enfermedades, particularmente en el cáncer de mama.

Este trabajo de investigación estuvo enfocado en el análisis de los cambios en la expresión de las metiltransferasas de m6A METTL3, METTL14, METTL16 y de las proteínas lectoras YTHDF1-3, YTHDC1-2 en la línea celular MCF-7 sensible y resistente al tamoxifeno y en pacientes con cáncer de mama utilizando bases de datos de acceso libre (GEO y TCGA).

Con base a los resultados obtenidos en el análisis de la comparación de las líneas celulares derivadas de MCF-7 (LCC0,1,2,9, TAMR1,4,7 y 8) los resultados no mostraron ninguna diferencia entre estas, sugiriendo que de alguna manera las modificaciones llevadas a cabo para la obtención de las diferentes sublíneas celulares, no afectan a las metiltransferasas ni a las proteínas de unión a m6a. Cabe

mencionar que algunos genes resultaron afectados tras la modificación de los modelos celulares (TAMR y LCC) entre ellos se mostró una mayor expresión de SOX2 y alteraciones de otros miembros de la familia de genes SOX, disminución de la expresión de PGR, PTEN, TP53, EZH2, SMAD3, TGF-β1, DNMT1, APOBEC3B, FOXO3 y FOXO4, además, una mayor expresión de CDH1, APOBEC3H, FOXA1, TET2, TET3, TDG, MBD4, DNMT3a y DNMT3b (37).

En cuanto al análisis de expresión en las pacientes, se encontraron diferencias de expresión de cada gen con respecto al subtipo molecular de cáncer de mama. Hubo una mayor expresión de las metiltransferasas METTL3, METTL14 y METTL16 en los subtipos Luminal B y Luminal A, además de que estas enzimas escritoras exhibieron bajos niveles de expresiones en el subtipo basal. Diversos estudios han demostrado que existe una desregulación en los niveles de expresión de los genes encargados de la metilación de m6A en diferentes tipos de canceres, por ejemplo: METTL3 ha mostrado sobreexpresión en el carcinoma hepatocelular (HCC), en el cáncer de páncreas, en el cáncer cervical y en el cáncer de mama, con respecto a las células normales, dando como resultado un aumento de la proliferación, la promoción del crecimiento, la invasión tumoral, la resistencia a los medicamentos y en algunas ocasiones a la metástasis; METTL14, en contraste de METTL3, ha presentado una disminución significativa en cuanto a expresión en el HCC mejorando la capacidad metastásica del tumor. En otro trabajo, se descubrió que la disminución de la expresión de METTL14 está relacionada con la progresión del cáncer de mama (2,31–34); METTL16 ha mostrado diferentes niveles de expresión de acuerdo con el tipo de cáncer del que se trate, como en el caso del adenocarcinoma de colon (COAD), en el cual, los resultados mostraron la existencia de una expresión abundante de esta enzima escritora, en cambio en el adenocarcinoma rectal (READ), se presentó una baja expresión de METTL16 y se relacionó con un mal pronóstico de supervivencia de los pacientes. Por otra parte, un estudio reciente indicó que se aprecia una sobreexpresión de METTL16 en pacientes con cáncer de mama afectando su pronóstico de supervivencia (4–6,35,36).

Por otro lado, diversos estudios han señalado el papel significativo de las proteínas con dominio YTH en la progresión de los cánceres humanos (2,3,7). Tal es el caso del escritor YTHDF2, el cual exhibe un papel pro-tumorogénico en diferentes tipos de cáncer; se encuentra sobreexpresado en la leucemia mieloide aguda ayudando a dar inicio y propagación de la enfermedad, en el cáncer de páncreas promueve la proliferación celular y se ha mostrado que YTHDF2 está estrechamente relacionado con la malignidad de HCC. Con respecto a YTHDF1, hay evidencia de que este gen regula diferentes vías de señalización en distintas neoplasias como en el cáncer colorrectal, en el HCC y en el cáncer de mama, presentando una sobreexpresión en todos los casos asociándose con un mal pronóstico para los pacientes ya que este gen promueve la proliferación celular, la disminución de la apoptosis y la capacidad invasiva de las células cancerosas. En contraste con YTHDF1, el lector YTHDF3 manifiesta patrones de baja expresión en el cáncer colorrectal, sin embargo, en el cáncer germinal testicular y en el cáncer de mama se muestra con altos niveles de expresión los cuales están relacionados con un resultado negativo en cuanto al desarrollo de la neoplasia. El gen YTHDC1 se ha visto implicado en el adenocarcinoma de colon induciendo el crecimiento tumoral, y mostrando altos niveles de expresión, asimismo, el lector YTHDC2 presenta patrones elevados de expresión en el cáncer de colon, en el HCC, y en el adenocarcinoma de páncreas mostrando un aumento en la metástasis, crecimiento y proliferación celular (4,6,7). Así como la literatura previa nos advierte el papel oncogén de estas proteínas lectoras, los resultados adquiridos en este trabajo con respecto al análisis de las curvas ROC tiempo dependientes, fue posible observar que una alta expresión de YTHDF1 en el subtipo luminal A y luminal B influyó negativamente en la supervivencia de las pacientes (figura 7 A-B), además, una tercera lectora, YTHDC1, se vio implicada en la disminución significativa de la probabilidad de supervivencia de las pacientes con subtipo luminal A, mostrando una alta expresión (figura 7 C).

11. Conclusiones

A pesar de la relación existente, mostrada en la literatura, de algunas metiltransferasas y proteínas lectoras de m6a en la resistencia al tamoxifeno, la hipótesis establecida en este trabajo no se pudo probar debido a que los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de los genes escritores y lectores de la línea celular sensible y resistente al tamoxifeno. Sin embargo, no se descarta la idea de que algunos de estos genes se encuentren involucrados en los mecanismos que conllevan a la resistencia del tamoxifeno, pues los datos obtenidos en varios estudios han mostrado que existe una relación entre su expresión y la interferencia en algunas vías de señalización involucradas en la quimioresistencia. Además, la información obtenida en este trabajo abre paso a varias preguntas, como lo son el poder conocer que factores o mecanismos se ven implicados para que exista o no una expresión de estos genes, también sería importante saber cuáles de los genes alterados en estos modelos de resistencia (PGR, PTEN, TP53, EZH2, FOXA1, TET2, TET3, etc.) interactúan con las metiltransferasas y proteínas lectoras de m6a.

12. Bibliografía.

1. Stotz K, Griffiths P. Epigenetics: ambiguities and implications. Hist Philos Life Sci. 1 de diciembre de 2016;38(4).

2. Zhou Z, Lv J, Yu H, Han J, Yang X, Feng D, et al. Mechanism of RNA modification N6-methyladenosine in human cancer. Mol Cancer. Diciembre de 2020;19(1):104.

3. Seo KW, Kleiner RE. Mechanisms of epitranscriptomic gene regulation. Biopolymers. Octubre de 2020; Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bip.23403

4. Lan Q, Liu PY, Haase J, Bell JL, Hüttelmaier S, Liu T. The Critical Role of RNA m ^{6} A Methylation in Cancer. Cancer Res. 1 de abril de 2019;79(7):1285–92.

5. Liu X, Liu L, Dong Z, Li J, Yu Y, Chen X, et al. Expression patterns and prognostic value of m6A-related genes in colorectal cancer. Am J Transl Res. 15 de julio de 2019;11(7):3972–91.

6. Liu ZX, Li LM, Sun HL, Liu SM. Link Between m6A Modification and Cancers. Front Bioeng Biotechnol. 13 de julio de 2018;6:89.

7. Liu S, Li G, Li Q, Zhang Q, Zhuo L, Chen X, et al. The roles and mechanisms of YTH domain-containing proteins in cancer development and progression. Am J Cancer Res. 1 de abril de 2020; 10(4): 1068–1084.

8. Mansouri S, Farahmand L, Hosseinzade A, Eslami S Z, Majidzadeh-A K. Estrogen can restore Tamoxifen sensitivity in breast cancer cells amidst the complex network of resistance. Biomed Pharmacother. Septiembre de 2017;93:1320–5.

9. Liu X, Gonzalez G, Dai X, Miao W, Yuan J, Huang M, et al. Adenylate Kinase 4 Modulates the Resistance of Breast Cancer Cells to Tamoxifen through an m6A-Based Epitranscriptomic Mechanism. Mol Ther. 2 de diciembre de 2020;28(12):2593–604.

10. Deans C, Maggert KA. What Do You Mean, “Epigenetic”? Genetics. Abril de 2015;199(4):887–96.

11. Nicoglou A, Merlin F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. Stud Hist Philos Sci Part C Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. Diciembre de 2017;66:73–82.

12. Method of the Year 2016: Epitranscriptome analysis. Nat Methods. Enero de 2017;14(1):1–1.

13. Nigita G, Acunzo M, Cho WCS, Croce CM. Editorial: Epitranscriptomics: The Novel RNA Frontier. Front Bioeng Biotechnol. 4 de diciembre de 2018;6:191.

14. Frye M, Jaffrey SR, Pan T, Rechavi G, Suzuki T. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? Nat Rev Genet. Junio de 2016;17(6):365–72.

15. Kadumuri RV, Janga SC. Epitranscriptomic Code and Its Alterations in Human Disease. Trends Mol Med. Octubre de 2018;24(10):886–903.

16. Hsu PJ, Shi H, He C. Epitranscriptomic influences on development and disease. Genome Biol. Diciembre de 2017;18(1):197.

17. Tang Y, Wang Y, Kiani MF, Wang B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. Clin Breast Cancer. Octubre de 2016;16(5):335–43.

18. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. Adv Anat Pathol. Enero de 2020 ;27(1):27-35.

19. Warrier S, Tapia G, Goltsman D, Beith J. An Update in Breast Cancer Screening and Management. Womens Health. Marzo de 2016;12(2):229–39.

20. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. The Lancet. Marzo de 2017;389(10074):1134–50.

21. Peart O. Breast Intervention and Breast Cancer Treatment Options. Radiol Technol. Mayo de 2015;86(5):535M-558M.

22. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. JAMA. 22 de enero de 2019;321(3):288.

23. McDonald ES, Clark AS, Tchou J, Zhang P, Freedman GM. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. J Nucl Med. 1 de febrero de 2016;57(Supplement_1):9S-16S.

24. Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone Therapy in Breast Cancer. Chirurgia (Bucur). 2017;112(4):413.

25. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. ANTICANCER Res. 2015;8.

26. Lee A V., Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells - Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. Vol. 107, Journal of the National Cancer Institute. Oxford University Press. 2015.

27. Shagufta, Ahmad I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. Eur J Med Chem. Enero de 2018;143:515–31.

28. Radin DP, Patel P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic

actions in estrogen receptor-negative cancers. Eur J Pharmacol. Junio de 2016;781:173–80.

29. Semina SE, Scherbakov AM, Kovalev SV, Shevchenko VE, Krasil'nikov MA. Horizontal Transfer of Tamoxifen Resistance in MCF-7 Cell Derivates: Proteome Study. Cancer Invest. 14 de septiembre de 2017;35(8):506–18.

30. Shen H, Lan Y, Zhao Y, Shi Y, Jin J, Xie W. The emerging roles of N6-methyladenosine RNA methylation in human cancers. Biomark Res. Diciembre de 2020;8(1):24.

31. Zheng W, Dong X, Zhao Y, Wang S, Jiang H, Zhang M, et al. Multiple Functions and Mechanisms Underlying the Role of METTL3 in Human Cancers. Front Oncol. 12 de diciembre de 2019;9:1403.

32. Wang H, Xu B, Shi J. N6-methyladenosine METTL3 promotes the breast cancer progression via targeting Bcl-2. Gene. Enero de 2020;722:144076.

33. Wang X, Feng J, Xue Y, Guan Z, Zhang D, Liu Z, et al. Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. Nature. 23 de junio de 2016;534(7608):575–8.

34. Yang X, Zhang S, He C, Xue P, Zhang L, He Z, et al. METTL14 suppresses proliferation and metastasis of colorectal cancer by down-regulating oncogenic long non-coding RNA XIST. Mol Cancer. Diciembre de 2020;19(1):46.

35. Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, Ebina M, Muto A, Sato Y, et al. S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N6-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. Cell Rep. Diciembre de 2017;21(12):3354–63.

36. Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter OV, Xie Y, Tu BP, et al. The U6 snRNA m 6 A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. Cell. Mayo de 2017;169(5):824-835.e14.

37. Li J, Lin X, Zhu S, Teng F, Huang F, Li N, et al. Integrative Analysis of Tamoxifen-resistant Cell Line Models Based on Sequencing Genomes, Transcriptomes and Epigenomes [dataset]. Aarhus University. 1 de junio del 2018. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55343.

38. Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 4ta ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2012. 2000p.