



**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 reguladores de m6A en  
los subtipos moleculares de cáncer de mama y su relación con  
la supervivencia”**

Tesis para obtener el grado de:

**Licenciado en Biomedicina**

Presenta:

**Edgar Iván Galarce Sosa**

Directora:

**D.C. Marta Elena Hernández Caballero**

Puebla de Zaragoza, México, diciembre de 2020

## Índice

<b>1</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Introducción. ....</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Antecedentes Generales .....</b>	<b>3</b>
3.1.1	Epitranscriptómica. ....	3
3.1.1.1	Las modificaciones en el ARN, una nueva información genética; el transcriptoma.....	4
3.1.2	Cáncer de mama. ....	7
3.1.2.1	Subtipos moleculares.....	10
<b>3.2</b>	<b>Antecedentes Específicos.....</b>	<b>14</b>
3.2.1	El Epitranscriptoma y el Cáncer.....	14
3.2.2	N6-metiladenosina (m6A) la molécula que cambio el panorama del transcriptoma. ....	16
3.2.2.1	El complejo de Metiltransferasas, las proteínas reguladoras encargadas de agregar la marca m6A.....	17
3.2.2.2	Desmetilasas, las proteínas encargadas de borrar a m6A.....	20
3.2.3	Las proteínas asociadas de m6A y control de la expresión génica en cáncer de mama. ....	21
<b>4</b>	<b>Planteamiento del Problema. ....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivo General.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1</b>	<b>Métodos. ....</b>	<b>25</b>
6.1.1	Técnicas básicas de biología molecular: diseño de oligonucleótidos, extracción de ARN, PCR y qRT-PCR.....	25
6.1.2	Búsqueda de los datos correspondientes a cada gen a través de la plataforma MEXPRESS. ....	28
6.1.3	Análisis de los niveles de expresión por subtipo molecular de cáncer de mama en cada uno de los genes reguladores de m6A. ....	28

6.1.4	Análisis de la supervivencia con relación a la expresión de cada gen y el subtipo molecular de cáncer de mama.....	29
<b>7</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>30</b>
<b>7.1</b>	<b>Técnicas Básicas de Biología Molecular. ....</b>	<b>30</b>
7.1.1	Extracción de ARN. ....	30
7.1.2	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional.....	30
7.1.3	PCR en tiempo real. ....	31
<b>7.2</b>	<b>Análisis de los niveles de expresión por subtipo molecular de cáncer de mama en cada uno de los genes reguladores de m6A. ....</b>	<b>32</b>
<b>7.3</b>	<b>Análisis de la supervivencia con respecto a la relación entre la expresión de cada gen y el subtipo molecular de cáncer de mama. ....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>Bibliografía. ....</b>	<b>52</b>

## Índice de Figuras y Tablas.

<b>Figura 1. Niveles de regulación de la expresión génica. ....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2. Origen anatómico e histológico del cáncer de mama.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama. ....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 4. Adición de m6A en el núcleo.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5. Extracción de ARN de la línea celular MDA-MB-231 con TRIzol. ...</b>	<b>30</b>
<b>Figura 6. PCR convencional en gradiente de los genes FTO y ALKBH5.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 7. Curva Melting de la qRT-PCR del gen ALKBH5.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 8. Niveles de expresión de los genes reguladores de m6A por subtipo molecular de cáncer de mama. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 9. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia relacionada con la expresión y el subtipo molecular de cáncer de mama. ....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 1. Características clínico-patológicas de las pacientes. ....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 2. Niveles de expresión de los genes reguladores de m6A por subtipo molecular de cáncer.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 3. Supervivencia por subtipo molecular de cáncer de mama y expresión de los genes reguladores de m6A. ....</b>	<b>40</b>

## **1 Resumen.**

La marca epitranscriptómica N6 -metiladenosina (m6A) es la forma más común de modificación del ARNm y la evidencia acumulada indica que tiene un papel importante en la progresión del cáncer y la metástasis; sin embargo, se sabe poco sobre su papel en el carcinoma invasivo mamario. En este trabajo se evaluaron los cambios de expresión de genes reguladores de la marca m6A en pacientes con cáncer de mama por subtipo molecular y su relación con la supervivencia, como una forma indirecta de analizar el efecto de m6A en cáncer de mama. En este trabajo, se incluyeron un total de 396 datos de pacientes con cáncer de mama obtenidos de la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). A partir de los datos de expresión se analizó la asociación de los genes reguladores de m6A con los subtipos moleculares y con la supervivencia. El análisis bioinformático se realizó con el software R Version 4.0.2, con la interfase RStudio y las librerías “multcomp” para el modelo lineal generalizado (GLM) y la prueba de Tukey, y los paquetes “ROCR” y “survival” para la supervivencia. Los resultados mostraron que los reguladores de m6A tienen diferencias variables en los niveles de expresión en los subtipos moleculares de cáncer de mama. Sin embargo, al analizar su relación con la supervivencia, solo dos de los componentes del complejo asociado a la metilación (MACOM) se encontraron relacionados, RBM15 en el subtipo Basal-like y RBM15B en el subtipo Her-2. Aún no se sabe con certeza como es que RBM15/RBM15B afecta los niveles de m6A, pero participa en la ubicación del complejo en regiones ricas en uracilo. Al modificar significativamente los niveles de m6A podría llevar a alteraciones en los ARNs mensajeros y de esa forma contribuir a la muerte por cáncer.

## **2 Introducción.**

En las últimas dos décadas, la investigación sobre alteraciones genéticas en enfermedades humanas se ha centrado en gran medida en los eventos de modificación del ADN e histonas. Siendo la epigenética la rama que abarca este estudio sobre las modificaciones químicas del ADN y las proteínas histonas, las cuales alteran la expresión génica sin cambiar la secuencia de nucleótidos subyacente (Morena et al., 2018).

Principalmente la metilación del ADN y las modificaciones de las colas de histonas se han estudiado a detalle, y se sabe que son mecanismos reguladores genéticos globales. Estas alteraciones desempeñan un papel importante en la regulación de los genes, las modificaciones de la cromatina y la integridad del genoma. La metilación del ADN en los di-nucleótidos CpG en promotores, regiones no traducidas y primeros exones, son modificaciones epigenéticas ampliamente estudiadas en enfermedades humanas como el cáncer (He, 2010).

Además de la metilación del ADN, la metilación de las histonas en los residuos de lisina, junto con otras modificaciones postraduccionales como la acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, también desempeñan funciones importantes en la expresión de genes y el mantenimiento de la estructura de la cromatina. Pero actualmente no basta con solo estudiar y diferenciar estas modificaciones epigenéticas del ADN y sus proteínas asociadas, sino que, investigaciones más recientes se han encargado de analizar las modificaciones postranscripcionales análogas a los cambios químicos de nucleótidos específicos en el ARN.

En el presente trabajo, el objetivo fue analizar los niveles de expresión de los genes cruciales en la adición y la eliminación de la marca epitranscriptómica m6A y su efecto en la supervivencia en los subtipos moleculares de cáncer de mamá.

Para entender si hay una relación entre la sub o sobre expresión de los genes pertenecientes al complejo metiltransferasa y proteínas asociadas, como las proteínas desmetilasas, dependiendo del subtipo molecular se realizaron análisis bioinformáticos de los perfiles de expresión génica y las características clínicas en datos de pacientes disponibles en la plataforma TCGA, ya que la información bibliográfica indica que algunos genes están asociados con la tumorigénesis y el pronóstico del cáncer de mama. De este modo, es útil evaluar si existe un patrón de expresión para los subtipos de cáncer, lo que podría conducir a un seguimiento ajustado por subtipo específico de cáncer de mama.

### **3 Antecedentes.**

#### **3.1 Antecedentes Generales**

##### **3.1.1 Epitranscriptómica.**

Las marcas de metilo en el ARN forman un sistema de mecanismos de control postranscripcional que permiten el ajuste fino de la expresión génica al modificar la forma en que el ARN interactúa con otros componentes de la célula. Si bien muchas especies de ARN dependen de sus grupos metilo para su estructura y función, la metilación del ARN mensajero (ARNm) y del ARN largo no codificante (ARNlnc) parece poseer un nivel de dinamismo que permite el ajuste preciso en los genes codificantes de proteínas y los procesos celulares (Romano et al., 2018). Por lo cual, la ciencia que ha surgido para especializarse en el estudio de estos cambios químicos en el ARN en años recientes es la Epitranscriptómica, un concepto emergente en la regulación de la expresión génica, que investiga las modificaciones que pueden sufrir los diferentes tipos de ARN, su repercusión en la regulación genética y otros procesos celulares. Ha tomado cierta relevancia debido a los hallazgos en el campo de la genómica, y por cómo estas modificaciones constituyen un código epitranscriptómico. Para muchos es una nueva frontera para identificar la importancia biológica del ARN en el ajuste, modificación y regulación de la expresión génica, además que se ha probado que tales cambios bioquímicos en el ARN pueden servir como biomarcadores de diagnóstico, con un gran potencial para la intervención terapéutica (Basanta et al., 2016).

Durante décadas, se prestó poca atención a las modificaciones del ARN. El descubrimiento de marcas en el ARN se remonta a los años sesenta y setenta, pero se pensaba que se limitaban a los ARNt (transferencia) y los ARNr (ribosomal), y la investigación se centraba en las marcas epigenéticas del ADN. No fue, sino hasta el descubrimiento de nuevas marcas químicas en todas las especies de ARN, que junto con informes de proteínas escritoras y borradoras que agregan y eliminan dinámicamente estas marcas, que se produjo un interés en las modificaciones del ARN ("Method of the Year 2016: Epitranscriptome Analysis," 2016).

Si bien, las modificaciones de los tipos de ARNs han sido bien documentadas por más de 50 años, además de los residuos canónicos A, C, G y U, se descubrieron nucleótidos modificados en abundantes ARN celulares desde 1960 (Roundtree et al., 2017), junto con sus posibles funciones en el procesamiento del ARN en transcritos de mamíferos y el mecanismo a través del cual podrían actuar los ARNs, pero el cómo controlan exactamente los procesos celulares, sigue bajo análisis (Chandola et al., 2015).

Estos descubrimientos fueron en aumento, gracias a los creadores de mapas y a la secuenciación de nueva generación del ARN, se encontraron una sorprendente variedad de modificaciones en él, con un papel aparentemente crítico, pero aún poco conocido, en la regulación de genes (Eisenstein, 2016). Se podría decir que, una modificación afecta a muchas etapas diferentes del ciclo de vida del ARN (N. Liu & Pan, 2016), y que la epitranscriptómica, como tal representa un cambio funcionalmente relevante para el transcriptoma.

### **3.1.1.1 Las modificaciones en el ARN, una nueva información genética; el transcriptoma.**

Las investigaciones recientes y la evolución de los métodos de detección han llevado a la identificación de varias modificaciones químicas dinámicas en los ARN que se ha demostrado modulan su actividad y, por lo tanto, pueden considerarse "interruptores". Sin embargo, estos interruptores están controlados por enzimas que producen las modificaciones ("escritores"), complejos que reconocen el cambio y se unen al nuevo motivo modificado ("lectores"), y enzimas que pueden eliminar la base modificada y regresar el ARN a la estructura original ("borradores") (Dinescu et al., 2019; T. Wang et al., 2020). La existencia de borradores (desmetilasas) y la interacción entre escritores y borradores (por ejemplo, metilación-desmetilación), significa que las modificaciones químicas son dinámicas y reversibles, y las enzimas que gobiernan estos interruptores están altamente conservadas. Hasta la fecha, se han documentado más de 160 modificaciones químicas en el ARN, de las cuales más de la mitad se encontraron involucradas en enfermedades humanas, incluido el cáncer (Dinescu et al., 2019; Dominissini et al., 2012; Yang et al., 2018).

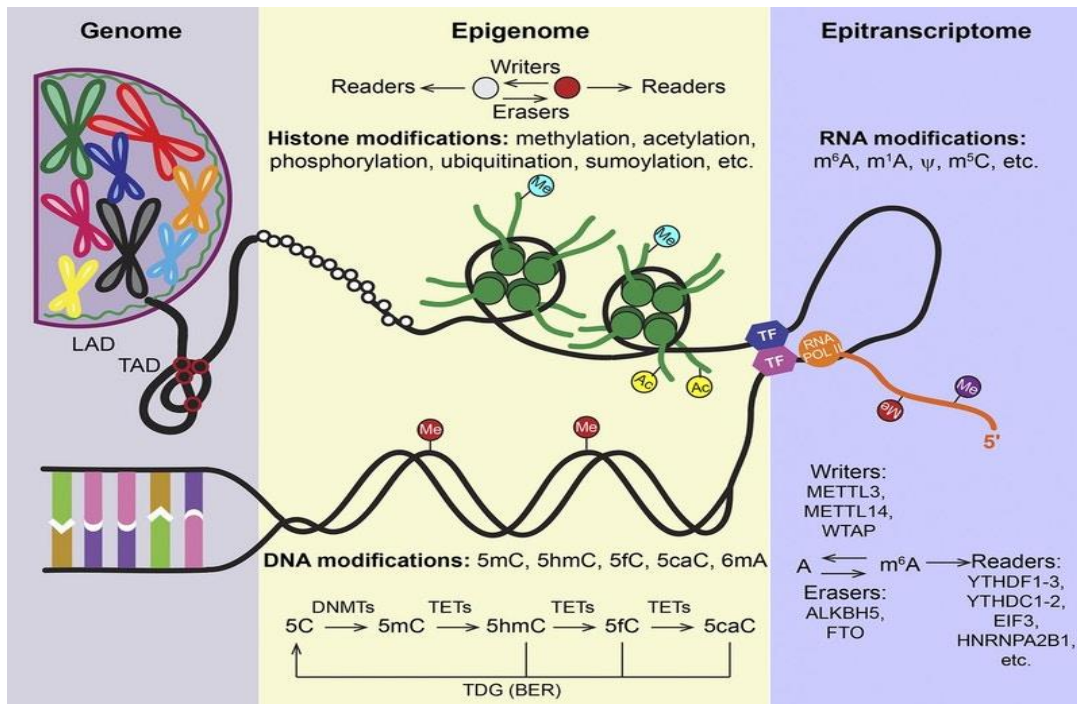
Aunque la presencia de regiones metiladas se describió en el ARN hace casi 40 años, junto con sus posibles funciones en el procesamiento del ARN en transcritos de mamíferos, el mecanismo exacto a través del cual los ARN metilados actúan y controlan los procesos celulares, está en exploración (Chandola et al., 2015).

Una modificación particular, la N6-Metiladenosina (m6A), se ha caracterizado como una de las modificaciones internas más abundantes en los ARNm de mamíferos desde su descubrimiento en la década de 1970 (Desrosiers et al., 1974; Meyer & Jaffrey, 2014). Descubrimientos recientes de la ubicación, función y mecanismo molecular de m6A demostraron que esta modificación es reversible, se somete a un control dinámico y regula varios pasos del ciclo de vida del ARN, incluido el empalme del ARN, su degradación y el procesamiento del pre-microARN (pre-miARN), y traducción de proteínas (Niu et al., 2013).

En los últimos años, se han logrado importantes avances en la regulación de la expresión génica lo que lleva al campo emergente de la epitranscriptómica (X. Li et al., 2016). Estos avances sustanciales han ayudado en la comprensión de la naturaleza y el papel de las modificaciones, al igual que, el modo en que se añaden, eliminan e interpretan (Schwartz, 2016; Yang et al., 2018). Por lo que, se dice que esto constituye un nuevo nivel de información genética (Saletore et al., 2012), el epigenoma del ARN (He, 2010), o el transcriptoma (Saletore et al., 2012).

El transcriptoma son todas aquellas modificaciones de ARN postranscripcionales que se ha visto, pueden ser dinámicas y pueden tener funciones más allá del ajuste fino de la estructura y función del ARN (He, 2010; Saletore et al., 2012).

Por lo tanto, estas marcas químicas del ARN se han convertido en participantes emergentes en el campo de la regulación postranscripcional de la expresión génica, y están atrayendo un grado comparable de interés de investigación al de las modificaciones de ADN e histonas en los campos de la genómica y la epigenética (Figura 1) (Helm & Motorin, 2017). Hasta ahora se está comprendiendo el verdadero potencial de algunas de las modificaciones como consecuencia de un salto en la tecnología de detección, principalmente asociado con la secuenciación de alto rendimiento (du Toit, 2016).



**Figura 1. Niveles de regulación de la expresión génica.**

**Genoma:** Los cromosomas están regulados por su ubicación en el núcleo, tanto entre sí, como con respecto a la lámina nuclear. Asimismo, los cromosomas se encuentran regulados estructuralmente por los dominios asociados topológicamente (TAD) y los dominios asociados a la lámina (LAD). **Epigenoma:** la regulación génica se produce a través de modificaciones dinámicas en las histonas. La mayor parte de la metilación del ADN ocurre en forma de 5mC por las metiltransferasas de ADN (DNMT), la cual es reversible mediante la reparación por escisión de bases dependiente de la timina ADN glicosilasa (TDG)(BER). **Epitranscriptoma:** las marcas químicas en el ARN regulan el destino de la transcripción a través de proteínas específicas (“Escritoras, “Borradoras” y “Lectoras”). Se conoce que hay cientos de modificaciones en el ARNm, pero m6A es la más prevalente (Yoon et al., 2018).

El interés en el estudio del epitranscriptómica en los últimos años se debe a dos avances importantes. En primer lugar, los enfoques bioquímicos combinados con la secuenciación de ARN han permitido mapear ciertas modificaciones de ARN de manera transcriptómica. Los protocolos iniciales para el mapeo de m6A en todo el transcriptoma se lograron utilizando un anticuerpo anti-m6A para inmunoprecipitar fragmentos de ARN metilados, seguido de la secuenciación del ARN (Dominissini et al., 2012; Meyer & Jaffrey, 2017). El segundo avance vino con el uso de una secuenciación de alto rendimiento que proporcionó mapas de sitios

de modificación de todo el transcriptoma tanto en ARNm como en el ARNlnc con una resolución de ~200 nucleótidos (Dominissini et al., 2012).

Cuando empezó a progresar la información en las bases de datos de secuencias y el mapeo de todo el transcriptoma, fueron reveladas diferentes modificaciones químicas reversibles y dinámicas de las bases de nitrógeno de las moléculas de ARN, que estaban presentes en los ARN codificantes y no codificantes después de la transcripción, las cuales se demostró estaban involucradas e influían en la estructura, el metabolismo y función del ARN; dando como resultado la expansión de la variedad del transcriptoma (Morena et al., 2018).

Pero lo que en verdad hizo que el interés se reaviviera en estos cambios en el ARN fue el descubrimiento de la Proteína asociada a la obesidad y masa grasa (FTO) (Jia et al., 2011), por parte del genetista Chuan He y colaboradores (2010), la primera desmetilasa de m6A, lo cual nos decía que la modificación del ARN era reversible, dando la pauta a la investigación y abriendo espacio al interés en estos cambios químicos. Pasando esto, los investigadores de la epitranscriptómica se entusiasmaron con la dirección que ésta tomaba en el campo (Chi, 2017). Fue el renacimiento de la epitranscriptómica.

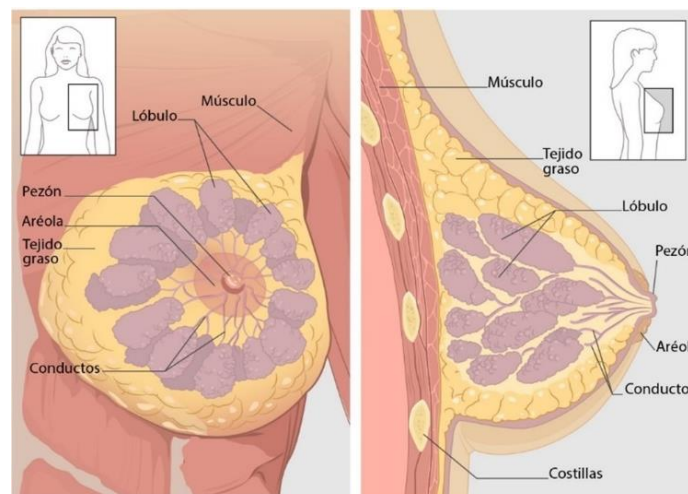
La comprensión de estas vías de modificación del ARN y sus funciones pueden permitir a los investigadores identificar nuevos procesos de regulación génica a nivel del ARN (He, 2010). Ahora se tienen datos y pruebas que muestran que las modificaciones dinámicas de los ARN desempeñan funciones reguladoras esenciales durante los eventos de procesamiento del ARN, y por lo tanto, afectan la expresión génica, así como las funciones celulares, y en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Dominissini & Rechavi, 2018).

### **3.1.2 Cáncer de mama.**

El cáncer se define como un conjunto de padecimientos y no solo como una enfermedad, es de origen multifactorial, recae en la proliferación celular descontrolada sobrepasando la cantidad celular normal, debido a cambios anómalos en los genes que regulan el crecimiento celular; por ello, las células adquieren la capacidad de dividirse sin ningún tipo de control, lo que produce un

tumor, alterando así las actividades fisiológicas, dificultando de este modo el funcionamiento del órgano o el tejido implicado (American Cancer Society, 2019; NIH, 2020; WHO, 2018).

Ahora bien, el cáncer de mama hace referencia a un tumor maligno que se ha desarrollado a partir de células mamarias. Generalmente, el cáncer de mama se origina en las células de los lobulillos, las cuales son las glándulas productoras de leche o en los conductos, que son las vías que transportan la leche al pezón (Figura 2) (American Cancer Society, 2019; CDS, 2019). Al pasar el tiempo, las células cancerosas pueden invadir el tejido mamario adyacente sano, por medio de los vasos sanguíneos y linfáticos, llegando así a los ganglios linfáticos axilares, hasta la invasión de las células cancerosas más allá del mioepitelio y finalmente hasta la metástasis (American Cancer Society, 2019; NCI, 2018).



**Figura 2. Origen anatómico e histológico del cáncer de mama.**

La mayoría de los cánceres de mama surgen de los lóbulos o de los conductos de la mama. En algunos casos, el tumor infiltra la piel o componentes de la pared torácica como los músculos pectorales. Las células tumorales también son capaces de convertir el microambiente en un estado favorable al tumor para promover su crecimiento y expansión (CDS, 2019; Feng et al., 2018).

Actualmente, según la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) en el Global Cancer Observatory (GCO) menciona que el cáncer de mama es el cáncer más frecuente entre las mujeres, afectando a 2.1 millones de mujeres cada año y causa la mayor cantidad de muertes relacionadas con el cáncer entre las mujeres (Bray et al., 2018;

GLOBOCAN, 2018), además se estima que 627,000 mujeres murieron de cáncer de mama, es decir, aproximadamente el 15% de todas las muertes por cáncer entre mujeres (WHO, 2018).

En México, en 2016 se registró la tasa más alta, con 16 defunciones por cada 100,000 mujeres de 20 años o más (Instituto Nacional de Estadística y Geografía., 2018). En 2018 se presentaron 314,499 defunciones femeninas: 44,164 son causadas por tumores malignos, y de estas, 7,257 por cáncer de mama. Además, en 2019, por cada 100,000 mujeres de 20 años o más se reportaron 35.24 casos nuevos (Instituto Nacional de Estadística y Geografía., 2020).

El cáncer de mama se divide en *in situ* (ductal y lobulillar) e invasivo. Hay más de 21 subtipos de carcinoma de mama invasivo descritos por la WHO (WHO, 2018). El más frecuente es el carcinoma invasivo de tipo no especial (NST), también conocido como carcinoma ductal invasivo (IDC) NST, que comprende del 40 al 75% de los casos. El IDC NST es un diagnóstico de exclusión, definido por la WHO como un tumor que no presenta suficientes características morfológicas para ser clasificado en uno de los tipos histológicos especiales (Hanby & Walker, 2004; Weigelt et al., 2008). Los restantes tipos de tumores son tipos "especiales" morfológicamente distintos. Algunos de los tipos especiales de cáncer de mama están asociados con firmas genéticas y comportamiento clínico específicos, además de la morfología característica, por lo que la categorización histológica correcta proporciona información pronóstica y predictiva importante (Vuong et al., 2014; Weigelt et al., 2008).

Asimismo, los estudios de perfiles de expresión génica establecieron una clasificación molecular ampliamente aplicada de los cánceres de mama, que se determinan por características transcriptómicas distintas y, lo más importante, los resultados de las pacientes (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001). Sin embargo, este subtipo molecular, se ha desarrollado sobre la base de los perfiles de expresión génica de IDC NST en gran parte (Perou et al., 2000).

Al ser el cáncer de mama un trastorno heterogéneo en su histopatología, respuesta terapéutica y patrones metastásicos, proporcionan una gran cantidad de componentes para su estudio y pronóstico. Varios factores como el grado histológico, el tipo y tamaño del tumor, la metástasis en los ganglios linfáticos, el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), y el estado de proliferación (Ki67), influyen en el diagnóstico y la respuesta al tratamiento (Al-thoubaity, 2020; Engstrøm et al., 2013; Maajani et al., 2019).

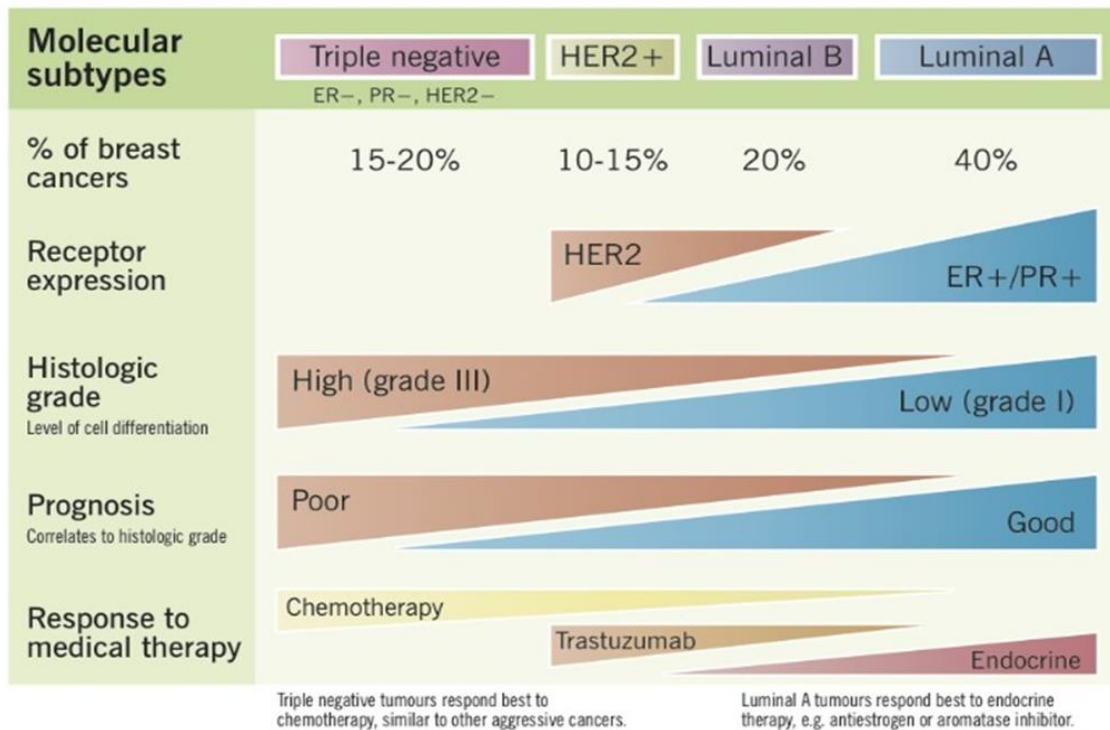
### **3.1.2.1 Subtipos moleculares.**

Inicialmente fueron Perou y colaboradores que por primera vez describieron cuatro subtipos moleculares: Luminal, positivo para HER2, Basal-like y Normal-like (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001).

En publicaciones de los últimos años, estos subtipos han ido variando con algunas modificaciones basadas en el cambio de los análisis de expresión génica que utilizan la tecnología de microarrays de ADNc por los sistemas basados en la expresión génica, como el índice de grado de expresión génica (GGI). Además, se han agregado subdivisiones dentro de la clasificación molecular debido a nuevos procedimientos que hicieron más eficiente la subtipificación como los marcadores de inmunohistoquímica (IHC) y la hibridación *in situ* (ISH) como sustitutos de los análisis de expresión génica. Así como también, se ha demostrado que los subtipos moleculares también difieren en su respuesta al tratamiento y el resultado (Dai et al., 2015; Engstrøm et al., 2013).

Fue en el Consenso de St. Gallen 2011, donde los subtipos moleculares de cáncer de mama se clasificaron en Luminal A (ER+/PR+/HER2-/bajo Ki-67); Luminal B (ER+ /PR+/HER2-/+/alto Ki-67); positivo para HER2 (ER-/PR-/HER2+) y cánceres de mama triple negativos (TNBC) (ER-/PR-/HER2-) (Deng et al., 2019; Goldhirsch et al., 2011). Se encontró que el subtipo basal-like también denominado TNBC era positivo para la expresión del marcador basal (CK5/6) (Figura 3) (Al-thoubaity, 2020; Amjad et al., 2020). Tal clasificación está respaldada por el programa Cancer

Genome Atlas (TCGA) a través del análisis de ARNm, ARNmi, ADN y perfiles epigenéticos (Koboldt et al., 2012).



**Figura 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama.**

Clasificación tradicional de los subtipos moleculares de cáncer de mama y las características descriptivas clínico-patológicas del comportamiento por subtipo específico. Receptor de estrógeno (ER), Receptor de progesterona (PR), Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Wong et al., 2016).

De este modo la clasificación tradicional del cáncer de mama ha utilizado la morfología tumoral y la evaluación de la expresión del receptor de ER, PR y HER2. Las firmas de expresión (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001) reflejan principalmente la clasificación de tumores basada en estos marcadores junto con la proliferación, con subtipos luminales que muestran expresión de ER y/o PR, el subtipo positivo para HER2 y el basal-like, que suelen ser negativos para los tres receptores (triple negativo). Esto ahora se refleja en la agrupación de estadios pronósticos del sistema TNM que utiliza información clínica y patológica, incluido el tamaño del tumor (T), el estado de los ganglios linfáticos regionales (N) y la diseminación a sitios metastásicos distantes (M) y recientemente ha incorporado

estadio anatómico, grado, estado del receptor ER/PR y HER2, y puntuación de recurrencia Oncotype Dx (8ª edición del manual de estadificación del cáncer del American Joint Committee on Cancer) (Giuliano et al., 2017).

De los subtipos moleculares podemos agregar lo siguiente:

### **Luminal A.**

*Frecuencia:* 30 a 40% de todos los cánceres de mama invasivos. *Perfiles de expresión génica (GEP):* mutaciones PIK3CA, mutaciones MAP3KI, alta expresión de ESR1, alta expresión de XBP1, mutaciones GATA3, mutaciones FOXA1; ganancia de 1q, 8q, pérdida de 8p, 16q. *Morfología:* Grado 1 o 2; la mayoría son NST bien diferenciados, carcinomas lobulillares clásicos, carcinomas tubulares, mucinosos, neuroendocrinos y cribiformes (Vuong et al., 2014). *Perfil inmunohistoquímico (IHC):* ER positivo, PR de alta expresión ( $\geq 20\%$ ), HER2 negativo y Ki-67 bajo (Subik et al., 2010). Varios estudios mostraron que un Ki-67 del 14% era el punto de corte para separar los subtipos de luminal A y B (Cheang et al., 2009).

### **Luminal B (HER2 negativo).**

*Frecuencia:* 20% a 30% de todos los cánceres de mama invasivos. *GEP:* mutaciones de TP53, mutaciones de PIK3CA, amplificación de ciclina D1, amplificación de MDM2, pérdida de ATM, inestabilidad genómica mejorada, amplificaciones focales (p. Ej., 8p12, 11q13). *Morfología:* Grado 2 o 3; cánceres menos diferenciados, sobre todo carcinomas ductales invasivos NST y también algunos carcinomas micropapilares invasivos (Vuong et al., 2014). *Perfil inmunohistoquímico:* ER positivo, menor expresión de PR ( $< 20\%$ ) (Goldhirsch et al., 2011), HER2 negativo y mayor nivel de índice de marcaje Ki67 ( $> 14$  o  $20\%$ ) (Cheang et al., 2009). Se puede decir entonces que los cánceres de mama luminal A y luminal B tienen perfiles genéticos específicos que conducen a la proliferación oncogénica.

### **HER 2.**

*Frecuencia:* 12% a 20% de todos los cánceres de mama invasivos. *GEP:* amplificación HER2, mutaciones TP53, mutaciones PIK3CA, alta expresión de FGFR4, alta expresión de EGFR, mutaciones APOBEC, amplificación de ciclina D1,

alta inestabilidad genómica (Perou et al., 2000; Vuong et al., 2014). *Morfología:* Grado 2 o 3; carcinoma infiltrante NST, carcinomas lobulillares apocrinos y pleomórficos (Vuong et al., 2014). *Clasificación:* en el estudio de Fountzilias y colaboradores se demostró que el estado del receptor hormonal afecta la supervivencia, la diseminación metastásica y la respuesta al tratamiento. Igualmente se esclareció que la inmunohistoquímica de los tumores HER2-positivos se pueden dividir en dos subtipos: HER2-enriquecido (ER y/o PR-negativo/positivo para HER2) y el subtipo HER2/luminal (ER y/o PR-positivo, HER2 positivo); y dividido en dos fenotipos basados en la expresión de PR: ER positivo-PR positivo-HER2 positivo y ER positivo-PR negativo-HER2 positivo (Fountzilias et al., 2012; Fragomeni et al., 2018).

### **Basal-like (TNBC).**

*Frecuencia:* entre 15-20% de todos los cánceres de mama invasivos. *GEP:* Mutaciones TP53, pérdida de RB1, pérdida de BRCA1, alta expresión de proteínas de reparación del ADN, activación de FOXM1, alta inestabilidad genómica, amplificaciones focales (p. Ej., 8q24). *Morfología:* Grado 3; IC-NST, medular, metaplásico, adenoide quístico y secretor. *Perfil inmunohistoquímico:* ausencia de expresión de ER, PR y HER2 (Fragomeni et al., 2018; Vuong et al., 2014). *Clasificación:* Los subtipos moleculares más comunes y mejor caracterizados de TNBC son basal-like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), inmunomodulador (IM), mesenquimatoso (M), semejante al troncal mesenquimal (MSL) y receptor de andrógenos luminal (LAR) (Lehmann et al., 2011). Siendo así esta categoría de cáncer de mama morfológica, genética y clínicamente heterogénea.

Adicionalmente los subtipos de cáncer de mama se han adoptado como una pauta terapéutica diferente y un pronóstico específico. Sin embargo, la acumulación de evidencias ha respaldado la hipótesis de que estos subtipos de cáncer de mama comparten genes similares sobre expresados o reprimidos, al igual que vías de señalización comunes (Dey et al., 2017). Estos genes y sus respectivas vías de señalización podrían estar implicados en la tumorigénesis y progresión del cáncer de mama (Deng et al., 2019).

El perfil molecular de todo el genoma puede revelar cambios moleculares en la tumorigénesis y la progresión y ha demostrado ser una forma altamente eficiente de identificar genes clave (G. Li et al., 2016). De igual forma el desarrollo de ensayos adicionales de alto contenido de información centrados en anomalías en la metilación del ADN, la expresión de proteínas, microARNs y ARNm, brindan más oportunidades para caracterizar de manera más completa la arquitectura molecular del cáncer de mama (Koboldt et al., 2012).

### **3.2 Antecedentes Específicos.**

#### **3.2.1 El Epitranscriptoma y el Cáncer.**

Diversos son los estudios previos que han investigado de manera extensa la biología celular del cáncer, en materia del control genético; resultado de la información genética en el ADN, modificaciones en histonas, regulaciones dinámicas de proteínas y las vías de señalización que determinan el destino de moléculas intermediaras. Tales hallazgos han guiado a la aceptación de conclusiones conceptuales sobre si el cáncer es fundamentalmente una enfermedad genética (Konno et al., 2019; Wishart, 2015). Puesto que se tiene bien documentado que las alteraciones en el patrón de metilación del ADN y/o la pérdida de marcadores específicos de acetilación/metilación de histonas están relacionadas con varias características distintivas del cáncer, como la resistencia a los fármacos, el tamaño del tumor, la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la metástasis.

Ahora bien, los mecanismos epigenéticos ya se tienen bien fundamentados y descrito, pero no hace más de 10 años que la epitranscriptómica ha tomado un papel protagónico en el ámbito de la investigación del cáncer, debido a la influencia de la regulación postranscripcional de la expresión génica a través de modificaciones químicas del ARN (Akar et al., 2019).

Aunque las modificaciones del ARN son diversas, se conoce la importancia fisiológica de solo unas pocas, especialmente en la tumorigénesis. Pero se ha demostrado que estas modificaciones son dinámicas y reversibles como las alteraciones epigenéticas, lo que implica que su importancia biológica en la terapia del cáncer es comparable con las modificaciones del ADN y las histonas (B. Zhao

et al., 2016). Por lo tanto, la epigenética del ARN se ha convertido en un área de investigación atractiva debido al descubrimiento de sus características dirigibles en la terapia del cáncer.

Es así como la marca N6-metiladenosina es la modificación más común en los ARNm eucariotas y a su vez es la más estudiada en la investigación del cáncer (Desrosiers et al., 1974; L. Liu et al., 2020). La evidencia acumulada reciente sugiere que ha sido un actor clave en las características distintivas relacionadas con el cáncer, incluido el origen del cáncer, EMT y resistencia a los medicamentos (Akar et al., 2019; C. Zhang, Zhi, et al., 2016).

Dado el importante papel de m6A en la pluripotencialidad y la diferenciación (Geula et al., 2015), su asociación con la progresión del cáncer no es una sorpresa. Descrito como “Una modificación antigua con una función epigenética novedosa” (Niu et al., 2013), m6A promueve la traducción de varios productos oncogénicos. Por ejemplo, un estudio reciente mostró que la m6A desmetilasa FTO tiene un papel crucial en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) al acelerar la leucemogénesis (Z. Li et al., 2017). Además, esta modificación del ARN promueve la traducción de productos génicos importantes para la patogénesis del cáncer como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y el coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (*TAZ*, también conocido como *WWTR1*) por su asociación con ribosomas (Santaliz et al., 2014). Más recientemente, la modificación m6A se ha relacionado con la generación de células madre cancerosas (CSC) de mama (Ben-Porath et al., 2008; Lin et al., 2016). La pérdida de m6A puede promover la traducción de *NANOG*, lo que a su vez permite que las células cancerosas vuelvan a un estado funcional similar al de las células madre pluripotentes (Ben-Porath et al., 2008). Por lo tanto, m6A podría probarse como biomarcador clínico para la generación de CSC y la progresión del cáncer.

Es así como muchos estudios han demostrado que la modificación de m6A juega un papel importante en varios cánceres, a menudo a través de las acciones de los escritores que catalizan las modificaciones de m6A, al igual que las acciones de los lectores que reconocen esta marca y de este modo controlan el destino del ARNm,

o bien, la modificación puede estar a cargo de los borradores que eliminan m6A, de tal modo que la regulación de genes importantes asociados a vías relacionadas con la tumorigénesis y la EMT, puede verse afectada, regulando a la alza la expresión de oncogenes o regulando a la baja la expresión de genes supresores de tumores (T. Wang et al., 2020).

### **3.2.2 N6-metiladenosina (m6A) la molécula que cambio el panorama del transcriptoma.**

El problema con m6A es que no solo cubre el ARNm como se pensaba al principio, sino también se ha encontrado en prácticamente todas las formas del ARN, abarcando así todos los dominios de la vida, marcando incluso los virus con su presencia (Chi, 2017). En 2010, el genetista Chuan He de la Universidad de Chicago, Illinois, propuso que estas etiquetas químicas podrían ser reversibles e importantes reguladores de la expresión génica. No mucho después, su grupo demostró el primer borrador de estas marcas en el ARNm, una enzima llamada FTO (Dioxigenasa dependiente de alfa cetoglutarato, proteína asociada a la obesidad y masa grasa) (Jia et al., 2011). Ese descubrimiento significó que m6A no era solo una marca pasiva: las células lo controlaban activamente. Y este hecho se produjo casi al mismo tiempo que los enfoques globales, aprovechando el poder de la secuenciación de nueva generación, que hicieron posible el mapeo de m6A y otras modificaciones en todo el transcriptoma (Chi, 2017; He, 2010). La modificación m6A, significó una estrella en ascenso en el campo de la epitranscriptómica y, es la modificación más generalizada encontrada en los transcritos (Huang & Yin, 2018). La cual fue descubierta por primera vez en 1974 en ARNm de células cancerosas (Desrosiers et al., 1974).

Fue así que la inmunoprecipitación de ARN metilado específico de m6A (m6A-Seq) permitió la primera demostración de que aproximadamente el 25% de los transcritos basados en esta marca, además que demostró que la modificación m6A se enriquece alrededor de los codones de paro, en los extremos 5' y 3' de regiones no traducidas (UTR) y dentro de exones internos largos (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). Los sitios m6A son conservados evolutivamente, encontrándose

motivos de consenso GAC y AAC en aproximadamente el 90% de todos los sitios m6A (Lan et al., 2019).

La marca m6A es una base modificada que se sabe desde hace tiempo que está presente en los ARN no codificantes, el ARNr, el ARN poliadenilado (poliA) y al menos en ARNm de mamíferos. Sin embargo, nuestra comprensión de la prevalencia de esta modificación ha sido fundamentalmente redefinida (Meyer & Jaffrey, 2017), m6A es la modificación interna más abundante en el ARNm eucariótico (N. Liu & Pan, 2016), reconocida como la primera modificación de ARNm reversible confirmada con metiltransferasas, desmetilasas y proteínas de unión (efectoras). Hasta la fecha, m6A es catalizada por un complejo de metiltransferasa (MTasa) compuesto por varias proteínas, dos m6A-desmetilasas y varias m6A-proteínas de unión se han identificado en mamíferos (T. Wang et al., 2020; B. Zhao et al., 2016).

Se ha demostrado que las modificaciones dinámicas m6A del ARNm están estrechamente relacionadas con la diferenciación y la reprogramación de las células madre, la respuesta al choque térmico, la respuesta al daño del ADN, el desarrollo sexual y la regulación del ciclo circadiano (Lewis et al., 2017; Zeng et al., 2018), cánceres humanos (Zeng et al., 2018). De igual forma, las funciones propuestas para la modificación de m6A incluyen la tumorigénesis, la hematopoyesis, la replicación de virus, la adipogénesis, el empalme de ARNm, exportación, estabilidad, la respuesta y tolerancia inmune (Niu et al., 2013; Yang et al., 2018; Y. Zhao et al., 2020).

### **3.2.2.1 El complejo de Metiltransferasas, las proteínas reguladoras encargadas de agregar la marca m6A.**

Las investigaciones iniciales sobre la identidad de las proteínas responsables de la formación de m6A fueron facilitadas por el desarrollo de un ensayo de metilación *in vitro* a finales de los 80's (Narayan & Rottman, 1988). En este ensayo de metilación *in vitro*, Rottman y sus colegas probaron la actividad de metilación de diversas fracciones nucleares separadas por cromatografía en columna y aislaron una

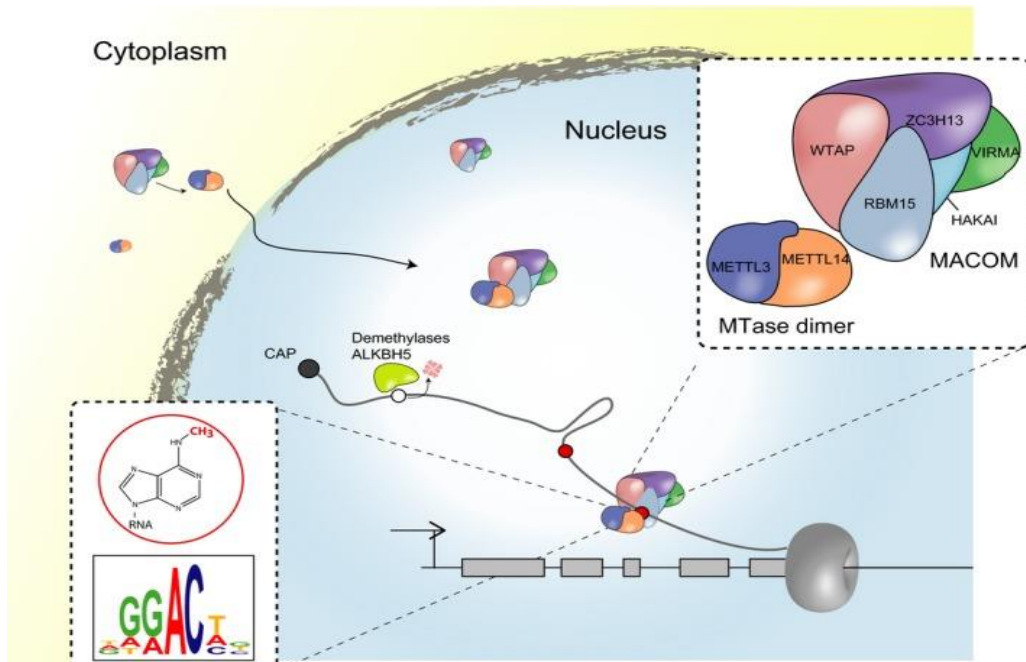
fracción de 70 kDa que tenía actividad de unión a S -adenosilmetionina (SAM). Posteriormente con su purificación y clonación se identificó la secuencia para la metiltransferasa de m6A, originalmente denominada MT-A70, ahora se conoce como METTL3 (Bokar et al., 1997). De esta manera se daría pauta al descubrimiento del complejo MTasa y sus proteínas asociadas. El cual está formado por la Metiltransferasa like 3 (METTL3) (Bokar et al., 1997), Metiltransferasa like 14 (METTL14) (J. Liu et al., 2014; Ping et al., 2014; Schwartz et al., 2014; Y. Wang et al., 2014), proteína asociada al tumor 1 de Wilms (WTAP) (Agarwala et al., 2012), proteína asociada a metiltransferasa m6A like Vir (VIRMA/KIAA1429) (Schwartz et al., 2014), HAKAI (fotooncogén Cbl like-1, también denominado CBLL-1) (Růžička et al., 2017), el motivo de unión al ARN 15 y su parólogo RBM15B (Patil et al., 2016), y la proteína 13 que contiene el dominio CCCH con dedo de zinc (ZC3H13) (Guo et al., 2018; Wen et al., 2018).

El complejo típico MTasa m6A consiste principalmente en METTL3, METTL14 y WTAP. METTL3 es la unidad central con actividad de metiltransferasa, que usa como sustrato a S-adenosilmetionina (SAM) y de esa forma media la metilación del ARN en el núcleo (Lin et al., 2016; J. Liu et al., 2014). Sin embargo, METTL14 no es una subunidad para catalizar directamente la transferencia del grupo metilo, funciona como una plataforma de unión de ARN para formar un heterodímero altamente estable con METTL3, activando alostéricamente y mejorando la actividad catalítica de METTL3 (J. Liu et al., 2014; Y. Wang et al., 2014). Curiosamente WTAP, interactúa con METTL3 y METTL14 para modular los niveles de m6A en los transcritos (Ping et al., 2014). Carece de dominios de metiltransferasa, WTAP no muestra actividad catalítica de m6A, pero regula la modificación o efectos en la actividad del complejo METTL3-METTL14. Y la eliminación de WTAP provoca la pérdida de la localización de METTL3 y METTL14 de estos puntos y la pérdida de la formación de m6A en el ARNm (J. Liu et al., 2014; Ping et al., 2014).

De igual modo, hay muchos factores reguladores que se unen al complejo MTasa, como VIRMA/KIAA1429, encargada de reclutar los componentes del núcleo catalítico (METTL3/METTL14/WTAP) para guiar a la región selectiva de metilación y puede servir como un andamio para mantener juntos a WTAP/HAKAI/ZC3H13

creando un soporte adecuado para acomodar METTL3/METTL14 principalmente a través de WTAP para guiar la modificación de m6A en UTR3' alrededor del codón de paro (J. Liu et al., 2014, 2018). También se encuentra RBM15/RBM15B que dirigen la metilación de residuos de adenosina tanto en los ARNm como en el ARNinc XIST (transcripción específica del cromosoma X inactivo), que media la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento génico durante el desarrollo. Además, se unen a las regiones enriquecidas con uridina y así reclutan los complejos WTAP/METTL3 para metilar los motivos DRACH cercanos. Comprenden tres dominios de motivos de reconocimiento de ARN (RRM-RNA recognition motifs), siendo los sitios de unión a RBM15/RBM15B significativamente mayores en las ubicaciones adyacentes a sitios de metilación de m6A (Patil et al., 2016). Aunado a estos factores también está el recientemente agregado HAKAI/CBL1 descrito como la ubiquitina-ligasa E3 que se une a la E-cadherina. Hakai, interactúa con otras subunidades del complejo de metiltransferasa m6A en plantas (Růžička et al., 2017). La regulación que desencadena Hakai en plantas condujo a un nivel reducido de m6A, pero su papel directo dentro del complejo MTasa aún no se ha dilucidado. Y, por último, tenemos a ZC3H13 el cual es requerido para anclar los componentes del subcomplejo, como VIRMA, en el núcleo. Además de que sirve como adaptador entre RBM15 y WTAP para promover la colocación de m6A en el ARNm (Guo et al., 2018; Wen et al., 2018).

De acuerdo con Horiuchi y col. que examinaron el “interactoma” de WTAP en el contexto del empalme y la regulación del ciclo celular (2013), describieron que las proteínas mencionadas en ese artículo (WTAP, VIRMA, RBM15/RBM15B, HAKAI y ZC3H13) forman un complejo estable que ahora se conoce como MACOM (complejo asociado a metilación apreciable en la Figura 4) (Knuckles et al., 2018). El MACOM interactúa débilmente con el dímero de METTL3 y METTL14 (Knuckles et al., 2018; J. Liu et al., 2014), no obstante, es indispensable para la funcionalidad correcta de m6A en el ARNm (Knuckles & Bühler, 2018).



**Figura 4. Adición de m6A en el núcleo.**

La colocación de la marca epitranscriptómica m6A está acoplada a la transcripción y está catalizada por un dímero MTasa (METTL3 y METTL14). El motivo de consenso metilado por METTL3 es DRACH (donde D=A, G o U; R = A o G; H = A, C o U). El MACOM compuesto de WTAP, VIRMA, RBM15/RBM15B, HAKAI y ZC3H13 es esencial para adición y estabilidad de m6A. Así mismo se encuentran las proteínas nucleares que tienen actividad desmetilasa incluyendo ALKBH5 y FTO (Knuckles & Bühler, 2018).

### 3.2.2.2 Desmetilasas, las proteínas encargadas de borrar a m6A.

Dos enzimas borradoras bien conocidas, proteína 5 homóloga de reparación de alquilación (ALKBH5) y FTO, están involucradas en la mediación de la reversión de la metilación (Figura 4) (Jia et al., 2011; Zheng et al., 2013).

En 2011, Jia y colaboradores., encontraron que FTO desmetila m6A tanto en el ADN como en el ARN *in vivo*. La eliminación de FTO induce un aumento significativo en los niveles totales de m6A del ARN poliadenilado. A medida que FTO oxida a m6A, genera N6-hidroximetiladenosina (hm6A) como producto intermedio, y N6-formiladenosina (f6A) como otro producto oxidado (Yang et al., 2018). La función potencial de estos intermedios lábiles oxidados necesita una mayor exploración. Curiosamente, un estudio reciente demostró que FTO también muestra actividad de

desmetilasa hacia N6-dimetiladenosina (m6Am) que se encuentra exclusivamente en el primer nucleótido codificado después de la estructura del cap-7-metilguanosina de un gran número de ARNm y reduce la estabilidad de m6A que contiene el ARNm *in vivo* (Mauer et al., 2017), lo que sugiere que FTO podría funcionar en múltiples sustratos. Por lo tanto, se necesitan más estudios para revelar la relevancia funcional de diferentes sustratos de FTO.

La desmetilasa ALKBH5 puede funcionar en un contexto específico de secuencia, ya que muestra una preferencia por m6A dentro de su secuencia consenso en lugar de otros nucleótidos metilados en el ARN monocatenario. ALKBH5 se localiza en el núcleo y su eliminación conduce a una reducción global de los ARNs poliA en este compartimento celular, lo que sugiere un papel en la regulación de la exportación nuclear de ARNm (Zheng et al., 2013), por igual, regula el empalme y la estabilidad de los ARNm en los núcleos de los espermatozoides y las espermátidas redondas al eliminar el m6A de los pre-ARNm y permite la producción de ARNm que contienen UTR3' más largos (Tang et al., 2017).

### **3.2.3 Las proteínas asociadas de m6A y control de la expresión génica en cáncer de mama.**

Como se mencionó anteriormente, la marca m6A se ha correlacionado recientemente con una serie de cambios fenotípicos en una variedad de cánceres, incluido el cáncer de mama, y se ha demostrado que m6A tiene un significado funcional en el cáncer, pero siguen existiendo conexiones incompletas entre las modificaciones de m6A y los fenotipos de las células cancerosas (Fry et al., 2018).

Hasta la fecha las publicaciones totalmente concluyentes acerca del papel activo de m6A y sus proteínas reguladoras en el cáncer de mama son pocas, pero son líneas de investigación que llevan años de estudios y se encuentran bien fundamentadas (T. Wang et al., 2020; Y. Zhao et al., 2020). Tenemos que Wang y col. hallaron que METTL3 se encuentra regulando positivamente el tejido y las células del cáncer de mama, donde promueve la modificación de m6A en el UTR3' del ARNm de células B/linfoma 2 (BCL-2). *In vivo* e *in vitro*, la caída de METTL3 podría disminuir el nivel de metilación, reducir la proliferación, acelerar la apoptosis e inhibir el crecimiento

tumoral. De igual forma, encontraron que Bcl-2 actuó como el objetivo de METTL3, regulando así la proliferación y apoptosis del cáncer de mama (H. Wang et al., 2020).

En un estudio realizado por Yi Nui y colaboradores, demostraron que la FTO se encuentra regulada al alza en el cáncer de mama humano. El alto nivel de FTO se asoció con tasas de supervivencia significativamente más bajas en pacientes con cáncer de mama. Además, FTO promovió la proliferación de células cancerosas, la formación de colonias y la metástasis *in vitro* e *in vivo*. Aunado a esto, identificaron que el gen promotor de la apoptosis BCL2 que interactúa con la proteína 3 (BNIP3), un gen pro-apoptosis, es un objetivo río abajo de m6A, mediada por FTO. Epigenéticamente, FTO media la desmetilación de m6A en el UTR3' del ARNm de BNIP3 e induce su degradación a través de un mecanismo independiente de YTHDF2. BNIP3 actúa como supresor de tumores y se correlaciona negativamente con la expresión de FTO en pacientes con cáncer de mama. BNIP3 redujo drásticamente el crecimiento tumoral dependiente de FTO y la metástasis (Niu et al., 2019).

Un informe interesante sugirió un circuito de retroalimentación positiva potencial entre la proteína de interacción X de la hepatitis B de mamíferos (HBXIP) y METTL3, donde los altos niveles de expresión de HBXIP modulan a METTL3 inhibiendo el ARNm let-7g, que regula negativamente la expresión de METTL3 dirigiéndose a su UTR3'. Asimismo, el aumento de METTL3 regula al alza la expresión de HBXIP a través de modificaciones de ARNm de m6A. Este bucle de retroalimentación positiva de HBXIP/let-7g/METTL3, conduce a una proliferación celular acelerada en el cáncer de mama. Por otro lado, una disminución en la modificación de m6A también promueve la tumorigénesis en cáncer de mama (Cai et al., 2018).

Una de las investigaciones más completas e interesantes, es la enfocada en la hipoxia y su influencia sobre el cáncer de mama y los mediadores proteicos m6A. La cual viene de la premisa que los tumores pueden superar rápidamente su suministro de sangre durante la progresión del cáncer y, por lo tanto, deben adaptarse a condiciones hipóxicas. Las células de cáncer de mama hipóxicas se

adaptan a estas condiciones a través de la angiogénesis mediada por el factor inducible por hipoxia (HIF). HIF no solo aumenta la vascularización adyacente al tumor, sino que también promueve la metástasis de las células (Gilkes & Semenza, 2013). Interesantemente, ALKBH5, también está controlada por HIF (Thalhammer et al., 2011). Es así como recientemente se informó que una disminución regulada por HIF induce la sobreexpresión de ALKBH5 y/o ZNF217 lo que conduce a la inhibición de la metilación de los ARNm *NANOG* y *KLF4* marcadores de pluripotencia (C. Zhang, Zhi, et al., 2016). El aumento de la expresión de los ARNm de *NANOG* y *KLF4* mediante la inhibición de la modificación de m6A promueve entonces la pluripotencia y la especificación de las células madre en varias líneas celulares de cáncer de mama establecidas (C. Zhang, Samanta, et al., 2016a; C. Zhang, Zhi, et al., 2016). Otro informe también mostró que los niveles de m6A aumentados por la sobreexpresión de METTL14 o la caída de ALKBH5 inhibieron el crecimiento de células cancerosas mamarias y la metástasis (Wu et al., 2019).

Con base en estos antecedentes que demuestran, la importancia del transcriptoma en el estudio del cáncer de mama y la influencia que tiene la marca m6A en el destino de diversos ARNm, teniendo en cuenta las múltiples proteínas que la reconocen y la regulación estricta que ejercen sobre la expresión génica.

#### **4 Planteamiento del Problema.**

A nivel mundial hay alrededor de 2,1 millones de casos de cáncer de mama diagnosticados en mujeres según cifras del 2018 lo que representa casi 1 de cada 4 casos de cáncer entre las mujeres. Es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en la gran mayoría de los países (154 de 185) y es también la principal causa de muerte por cáncer en más de 100 países (Bray et al., 2018). Desafortunadamente en México, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte de mujeres y cada año se detectan más de 23 mil casos nuevos (Instituto Nacional de Estadística y Geografía., 2018).

Actualmente la Epitranscriptómica tiene un papel importante en la determinación de diferentes factores que desencadenan enfermedades dependientes de la regulación genética, una de ellas es el cáncer. Las alteraciones que presenten los reguladores

de m6A pueden estar implicadas en distintos cánceres, entre los más relevantes está el carcinoma invasivo mamario, uno de los cánceres con mayor incidencia (Niu et al., 2013; Y. Zhao et al., 2020).

La evidencia acumulada recientemente sugiere que el epitranscriptoma ha sido un jugador clave en las características distintivas relacionadas con el cáncer, incluida la progresividad del cáncer, la EMT (transición epitelio-mesenquima) y la resistencia a los medicamentos (Lan et al., 2019; H. Wang et al., 2020; Wu et al., 2019).

Por lo que planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿Habrà alguna diferencia entre los niveles de expresión de los componentes del complejo de metiltransferasas y de las proteínas desmetilasas, en los subtipos de cáncer de mama y con respecto a la supervivencia?

## **5 Objetivos.**

### **5.1 Objetivo General.**

Evaluar los niveles de expresión de los componentes del complejo de metiltransferasas y de las proteínas borradoras de m6A en pacientes con cáncer de mama por subtipo molecular y su relación con la supervivencia.

### **5.2 Objetivos Específicos.**

1. Aplicar las técnicas básicas de biología molecular: diseño de oligonucleótidos, extracción de ARN, PCR y qRT-PCR.
2. Obtener los datos correspondientes a los genes METTL3, METTL14, WTAP, VIRMA, RBM15, RBM15B, CBLL-1 y ZC3H13, ALKBH5 y FTO.
3. Analizar los niveles de expresión por subtipo molecular de cáncer de mama en cada uno de los genes reguladores de m6A.
4. Analizar la supervivencia con respecto a la expresión de cada gen por subtipo de cáncer de mama.

## 6 Materiales y Métodos.

### 6.1 Métodos.

#### 6.1.1 Técnicas básicas de biología molecular: diseño de oligonucleótidos, extracción de ARN, PCR y qRT-PCR.

El aprendizaje de las técnicas de biología molecular se realizó con la finalidad de comprender como se obtiene el material necesario para el análisis de los niveles de expresión de un gen, así como para familiarizarse con los procedimientos detrás de la obtención de los resultados en las bases de datos de las pacientes con cáncer de mama.

A continuación, se describen las técnicas realizadas:

#### Diseño de oligonucleótidos.

En el portal National Center for Biotechnology Information (NCBI) se diseñaron iniciadores para FTO y ALKBH5 usando la sección Primer-BLAST.

	Iniciador	Secuencia (5'-3')	Longitud	Tm	CG%	Tamaño
<b>FTO</b>	Sentido	ATGGCTCAACTGGAAGCACT	20	59.60	50.00	132
	Antisentido	AGTGAGCGAGGCAAGGATG	19	59.78	57.89	
<b>ALKBH5</b>	Sentido	GTTCAAGCCTATTCGGGTGT	20	57.89	50	196
	Antisentido	GCTCAGGGACTTTGTTTCCA	20	58.02	50	

Una vez adquiridos fueron hidratados y cuantificados en un espectrofotómetro NanoDrop T100 ThermoFisher.

#### Lisis de eritrocitos con RCLB.

Procedimiento anterior a la extracción de RNA con TRIzol. Por medio de venopunción se extrajeron 3 ml de sangre, se depositó en un tubo de 15 ml, se le agregaron 9 mL de RCLB en una proporción 3:1. Después se incubaron con agitación suave por 5 min o hasta que el color cambió a un rojo intenso traslucido. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 500 rpm, descartando el sobrenadante para luego repetir el proceso, agregando 3 ml de RCLB.

Se realizó el lavado con 2 mL de PBS 1x, fue transferido el contenido a tubos de 1.5 ml, se incubo por 2 min y se centrifugo por 4min a 1200 rpm, descartando el sobrenadante, y fue repetido este proceso una vez más para obtener leucocitos libres de eritrocitos.

### **Extracción de ARN con TRIzol.**

Se agregaron 0.5 ml del reactivo TRIzol™ para lisar los leucocitos, pipeteando para homogeneizar, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, enseguida se adicionaron 100 µl de cloroformo, se agito vigorosamente y se incubó por 3 min, se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm a 4°C, después fue transferida la fase acuosa que contiene el RNA a un nuevo tubo sin mezclarla con las demás fases.

Para el proceso de precipitación de RNA se añadieron 0.5 ml de isopropanol a la fase acuosa, se incubó por 10 min, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. En el lavado fue re suspendida la pastilla en 1 ml de etanol al 75%. Posteriormente se mezcló y centrifugó durante 5 min a 7500 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante, se repitió el lavado en dos ocasiones. Para dejar secar la pastilla de RNA por 5-10 min (acostado, sin corriente de aire). Al Solubilizar el RNA fue re suspendida la pastilla en 30 µL de agua libre de RNasa o agua estéril. Para finalmente ser almacenado a -70 ° C.

### **Electroforesis en gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa con buffer TBE 1x al 2% y fue vertido en la cámara de electroforesis previamente lavada con NaOH 3N. Se colocaron 5 µl de muestra por pozo mezclada con 2 µl de buffer de carga y 1 µl de sybergreen. Se cargaron 5 ml de marcador de peso y se corrió durante 30 minutos a 90 voltios. Posteriormente se observó el gel en el transiluminador. A continuación, fue cuantificado en un espectrofotómetro ThermoFisher NanoDrop 1000 3.7.1.

### **Síntesis de cDNA por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).**

En un microtubo graduado de 0.2 ml, fueron combinados los siguientes reactivos:

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Oligo dT	1 µL
ARN (1000 ng/ul)	X µL
Mix dNTP's 10 mM	2 µL
Agua DEPC	Aforar a 12 µL

Fueron incubados a 65°C por 5 min para la desnaturalización del RNA y el Oligo.

Se preparó en otro tubo la mezcla de lo siguiente;

<b>Componente</b>	<b>Reacción 1x</b>
Buffer 5x de síntesis de ADNc	4 µL
DTT (0.1 M)	1 µL
RNAsoout™ (40 U/µL)	1 µL
Agua libre De RNAsa	1 µL
Thermoscript™ RT (15 U/µL)	1 µL*

Se agregaron 8µL de mezcla a cada tubo de la primera mezcla. El tubo se colocó en el termociclador precalentado a la temperatura de síntesis de ADNc con el tiempo y temperatura específicos para la reacción, terminando con la incubación a 85°C durante 5 min.

### Reacción de PCR.

En un tubo de 0.2 ml, fueron combinados los siguientes componentes.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen por reacción</b>	<b>Volumen total para X reacciones</b>
Agua	-	15.6 µL	Depende de la cantidad reacciones a realizar.
Buffer 10x	1x	2 µL	
dNTP's 10 mM	0.2 mM	0.4 µL	
Mg <sup>2+</sup> 50 mM	1.5 mM	0.6 µL	
Taq	-	0.2 µL	
Oligo 20 µM c/u	0.2 µM	0.2 µL	
cDNA	-	1 µL	
TOTAL	-	20 µL	

Después el tubo fue colocado en el termociclador y fue incubado de la siguiente manera en 35 ciclos a diferentes temperaturas para encontrar la Tm optima:

- 94 °C durante 5 min.
- 94 °C durante 15 s.
- 56, 58, 60 °C durante 30 s.
- 72 °C durante 20 s.
- 72 °C durante 5 min.

### PCR en tiempo real

En un microtubo especial para PCR en tiempo real, fueron combinados los siguientes componentes.

<b>Componentes</b>	<b>Reacción 1x</b>
Agua	4.3 µL

Mix 2x	5	μL
Oligo 20 μM	0.2	μL
cDNA	0.5	μL
Total	10	μL

Consecuentemente el microtubo fue colocado en el termociclador y fue incubado de la siguiente manera, 40 ciclos a las Tm optimas.

	Tm	Tiempo
Activación UDG	50 °C	2 min
Dual-Lock DNA Polimerase	95 °C	2 min
Desnaturalización	95 °C	15 seg
Alineación.	55-60 °C	15 seg
Extensión.	72 °C	1 min

### 6.1.2 Búsqueda de los datos correspondientes a cada gen a través de la plataforma MEXPRESS.

1. Se llevo a cabo la búsqueda de los genes: METTL3, METTL14, WTAP, VIRMA, RBM15, RBM15B, CBLL1 y ZC3H13, FTO y ALKBH5, por medio del portal MEXPRESS (*MEXPRESS*, n.d.; Rhizobium, 2013), depurados de la base de datos TCGA. Aplicando los filtros específicos para cáncer de mama, además solo fueron seleccionados datos de pacientes del género femenino.
2. Enseguida se descargaron las bases de datos como un archivo de texto, para ser trabajadas en Excel, facilitando así la organización de las tablas de datos de cada uno de los genes.

### 6.1.3 Análisis de los niveles de expresión por subtipo molecular de cáncer de mama en cada uno de los genes reguladores de m6A.

1. Para un primer análisis, a partir de las tablas de datos obtenidas en el paso anterior, estos datos fueron organizados y filtrados de manera manual, con base en los criterios de selección de la muestra.
2. Posteriormente se obtuvieron diez tablas de datos, una por cada uno de los genes de interés. Con lo cual se procedió a verificar que todas las tablas de datos contaran con la misma información (código de la paciente, edad, estatus del receptor a estrógenos, estatus del receptor a progesterona, tipo histológico, estado del tumor, evento de supervivencia, supervivencia,

subtipo molecular del cáncer), la única información que debía variar era la expresión de los genes, ya que se trata de genes distintos. En consecuencia, se realizó una única tabla que contenía todos los datos de las pacientes, y los niveles de expresión de los 10 genes asociados a m6A.

3. Posteriormente se cambió el formato de libro de trabajo de Excel a un archivo CVS, para ser usado con la interfase RStudio con la que se analizaron los datos.
4. Por otra parte, se estructuraron los comandos para la utilización de las librerías con la interfase RStudio, para las respectivas pruebas estadísticas.
5. Se determinó cuales eran los genes, con diferencias en la expresión, con respecto a los 5 subtipos moleculares de cáncer de mama. Finalmente se analizaron las gráficas y datos obtenidos.

#### **6.1.4 Análisis de la supervivencia con relación a la expresión de cada gen y el subtipo molecular de cáncer de mama.**

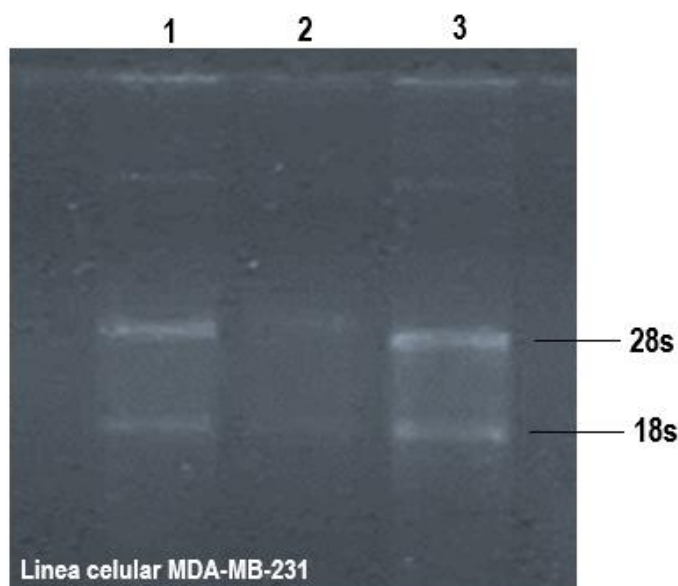
1. A partir de las tablas que contenían la información obtenidas de MEXPRESS se realizaron los pasos 2 y 3 del procedimiento anterior.
2. Posteriormente, de la tabla que contenía todos los datos de las pacientes, y los niveles de expresión de los 10 genes asociados a m6A, se realizaron 4 tablas, una por cada uno de los subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B, Her-2 y Basal-like), donde se mostraba un numero para identificar al paciente, supervivencia (días), evento de supervivencia (Vivo o muerto) y la expresión de los 10 genes de interés.
3. Se aplico el paso 3 del procedimiento anteriormente mencionado, para cada una de las tablas “subtipo” de acuerdo con el subtipo molecular. De esta manera, se estructuraron los comandos para la utilización de la librería “multcomp”, igualmente se ejecutaron las librerías “ROCR” y “survival” para evaluar la supervivencia tomando en cuenta la expresión de gen y subtipo molecular.
4. Asimismo, se identificaron las expresiones de los genes que afectan de manera estadísticamente significativa a la supervivencia. Finalmente se analizaron las gráficas y los datos obtenidos.

## 7 Resultados.

### 7.1 Técnicas Básicas de Biología Molecular.

#### 7.1.1 Extracción de ARN.

Se realizó la extracción de ARN con Trizol, obtenido de la línea celular celular MDA-MB-231, una de las líneas celulares utilizada para estudiar el cáncer de mama. Una vez extraído el ARN se corrió en un gel de agarosa al 1%, para visualizar su integridad, de igual modo se verificó la pureza y concentración con el espectrofotómetro NanoDrop T100 ThermoFisher (Figura 5).



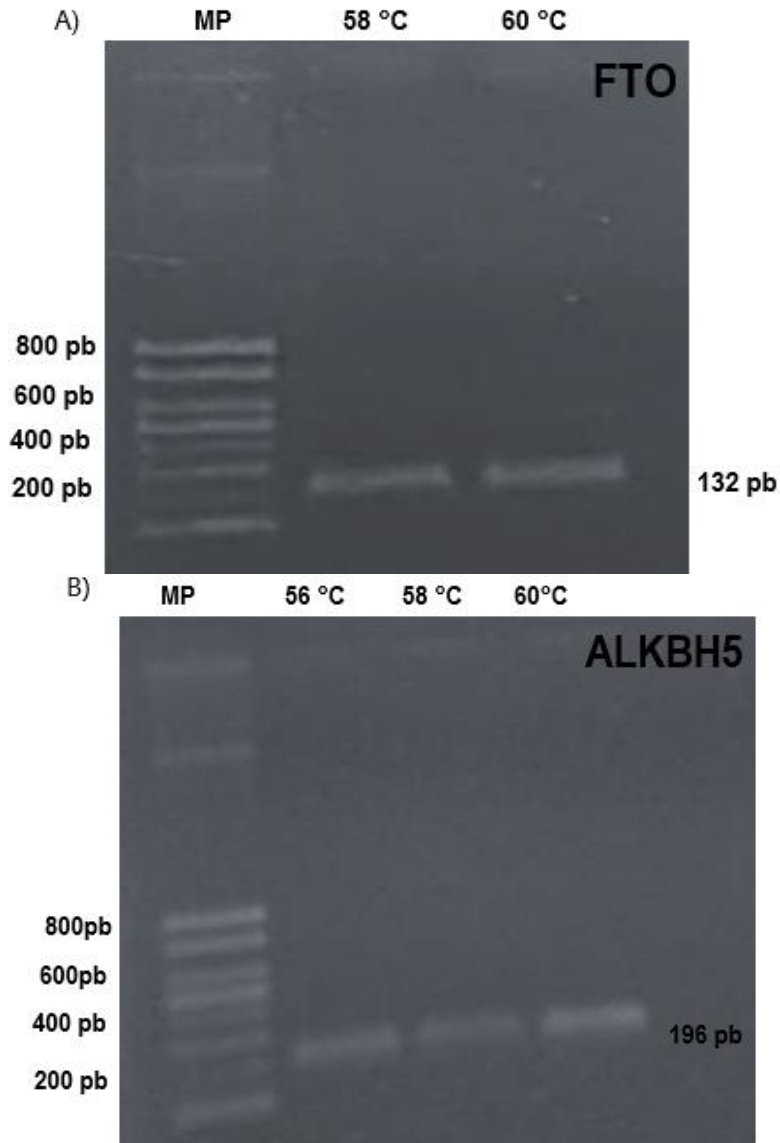
**Figura 5. Extracción de ARN de la línea celular MDA-MB-231 con TRIzol.**

En el gel se observan tres columnas (1, 2, y 3) correspondientes a ARNs de la línea celular MDA-MB-231. En la columna 1 y 3 se puede apreciar las bandas correspondientes a las subunidades 28s y 18s.

#### 7.1.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional.

Se llevó a cabo una PCR convencional en gradiente para los genes FTO y ALKBH5 utilizando ADNc obtenido por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) a partir de ARN extraído de la línea celular MDA-MB-231. Así mismo, se estandarizó la Temperatura ( $T_m$ ) ideal para la reacción, probando a 56 °C, 58°C y 60°C para ALKBH5, mientras que para FTO solo se estandarizó a 58 °C y 60 °C (Figura 6).

En ambos casos para FTO y ALKBH5 la  $T_m$  optima fue de 60°C.



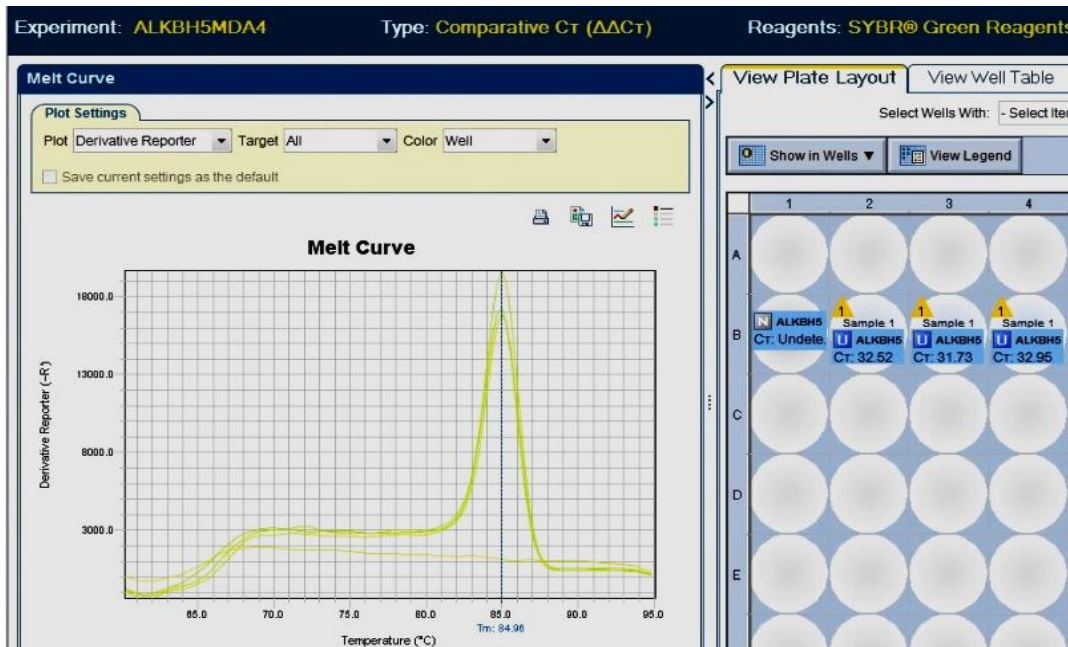
**Figura 6. PCR convencional en gradiente de los genes FTO y ALKBH5.**

**A.** Gel de agarosa que muestra los productos de PCR de FTO, con sus respectivas  $T_m$ . **B.** Se observan los productos de PCR de ALKBH5, con las  $T_m$  a la cuales se trabajó en la estandarización. Marcador de Peso molecular (MP), Pares de bases (pb).

### 7.1.3 PCR en tiempo real.

Una vez establecida la  $T_m$  óptima de 60 °C se procedió a realizar una PCR en tiempo real (qRT-PCR) para el gen ALKBH5, mediante el Sistema de PCR en tiempo real StepOne™ de ThermoFisher utilizando la mezcla maestra SYBR™ Green, llevándose a cabo por triplicado más un control negativo, obteniendo una reacción

libre de cualquier contaminación, solo amplificó el producto de interés (Figura 7). Se utilizó ADNc obtenido de la extracción de ARN de la línea celular MDA-MB-231.



**Figura 7. Curva Melting de la qRT-PCR del gen ALKBH5.**

Se muestra la amplificación del producto de ALKBH5 por triplicado y se observa la curva melting sin amplificación en el control, ni ninguna otra banda presente en la curva correspondiente al gen.

## **7.2 Análisis de los niveles de expresión por subtipo molecular de cáncer de mama en cada uno de los genes reguladores de m6A.**

El análisis de las características de las muestras de tejido proveniente de pacientes con cáncer de mama de la base de datos del TCGA (n=396), se resume en la Tabla 1, la estadística descriptiva se obtuvo con el programa RStudio.

Los niveles de expresión de algunos de los genes encargados de agregar la modificación m6A tuvieron diferencias significativas en algunos subtipos. Los niveles de expresión del complejo MTasa m6A (METTL3, METTL14 y WTAP) y del MACOM (complejo asociado a metilación) en los genes VIRMA, RBM15 y ZC3H13 tuvieron un contraste entre la sub y sobreexpresión que presentaron en los 5 subtipos moleculares (Figura 8), mientras que en los genes CBLL1 y RBM15B no hubo resultados significativos (Tabla 2).

Por el contrario, en el caso de los niveles de los "borradores" de m6A, solo FTO mostró diferencias significativas con respecto a la expresión dependiendo del subtipo molecular. En tanto ALKBH5 no mostro cambios en los distintos subtipos.

**Tabla 1. Características clínico-patológicas de las pacientes.**

<i>Características clínico-patológicas</i>	<i>n= 396</i>
<b>Edad/Años</b>	
<i>Mínimo</i>	26
<i>Media</i>	57.24
<i>Máximo</i>	89
<b>Estatus de RE</b>	
<i>Positivo</i>	309
<i>Negativo</i>	87
<b>Estatus de PR</b>	
<i>Positivo</i>	266
<i>Negativo</i>	130
<b>Tipo histológico</b>	
<i>Carcinoma ductal infiltrante</i>	356
<i>Carcinoma lobular infiltrante</i>	36
<i>Carcinoma medular</i>	1
<i>Carcinoma mucinoso</i>	3
<b>Estado del tumor</b>	
<i>Estado 1</i>	75
<i>Estado 2</i>	222
<i>Estado 3</i>	90
<i>Estados 4</i>	9
<b>Evento OS</b>	
<i>Muerto</i>	69
<i>Vivo</i>	327
<b>OS/Días</b>	
<i>Mínimo</i>	5
<i>Media</i>	1379
<i>Máximo</i>	8556
<b>Subtipo Molecular</b>	
<i>Luminal A</i>	175
<i>Luminal B</i>	104
<i>Her-2</i>	45
<i>Basal-like</i>	69
<i>Normal-like</i>	3

Receptor de estrógeno (ER), Receptor de progesterona (PR), Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), Supervivencia (OS).

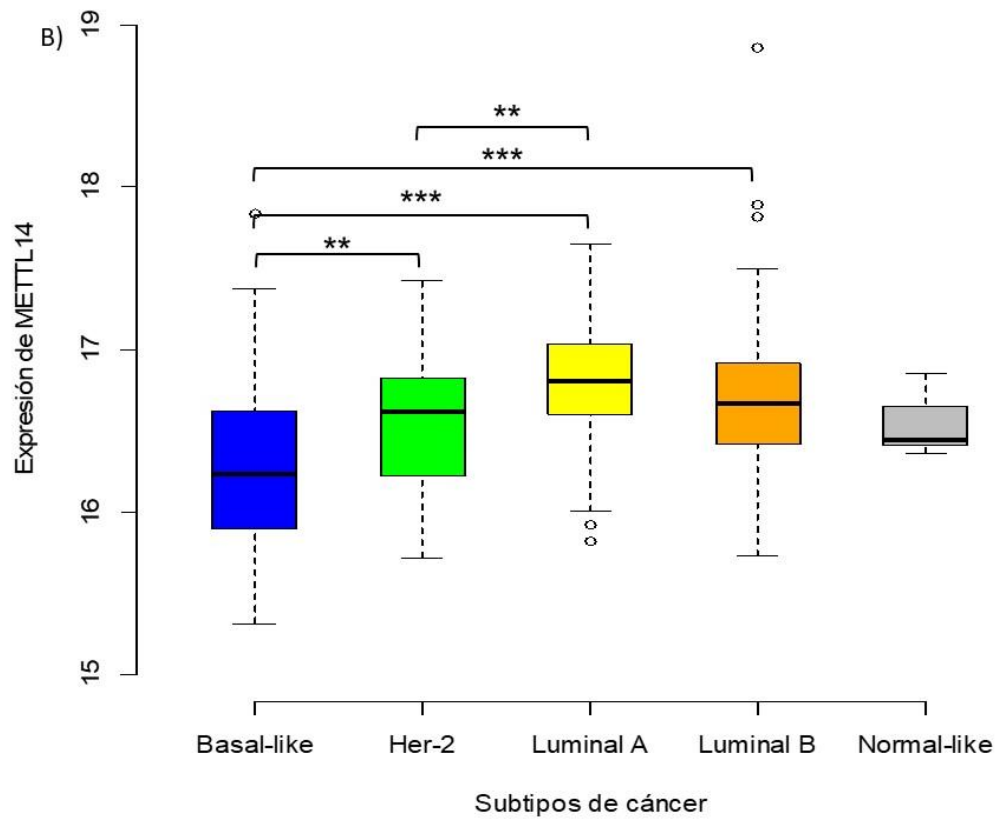
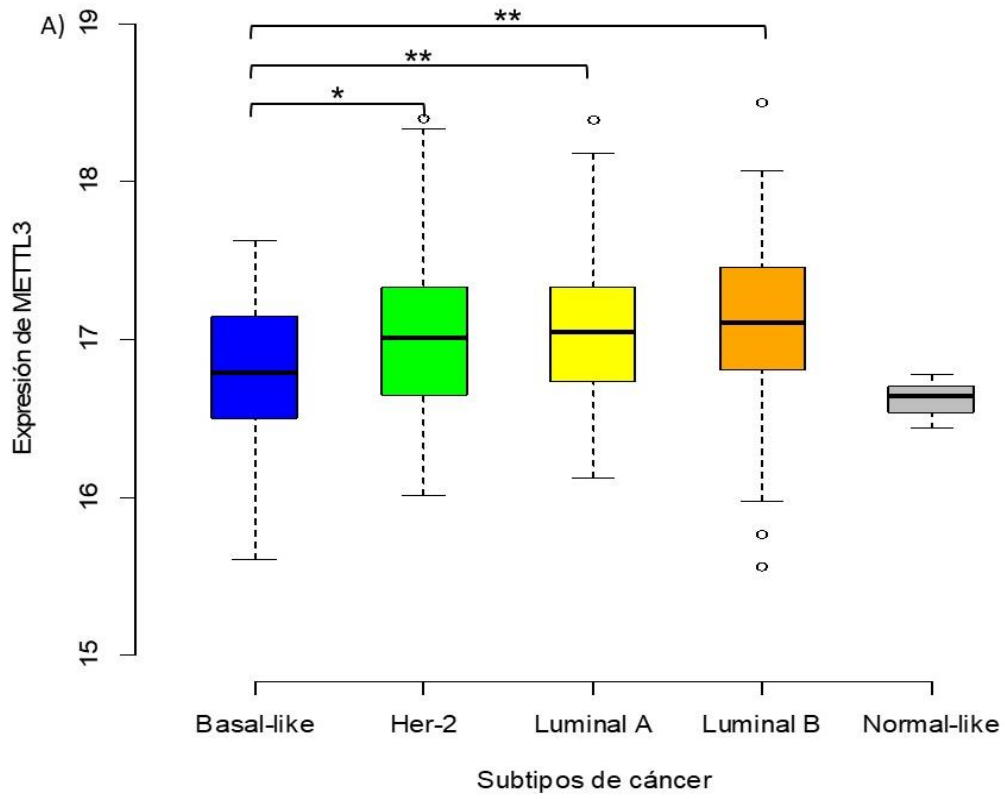
**Tabla 2. Niveles de expresión de los genes reguladores de m6A por subtipo molecular de cáncer.**

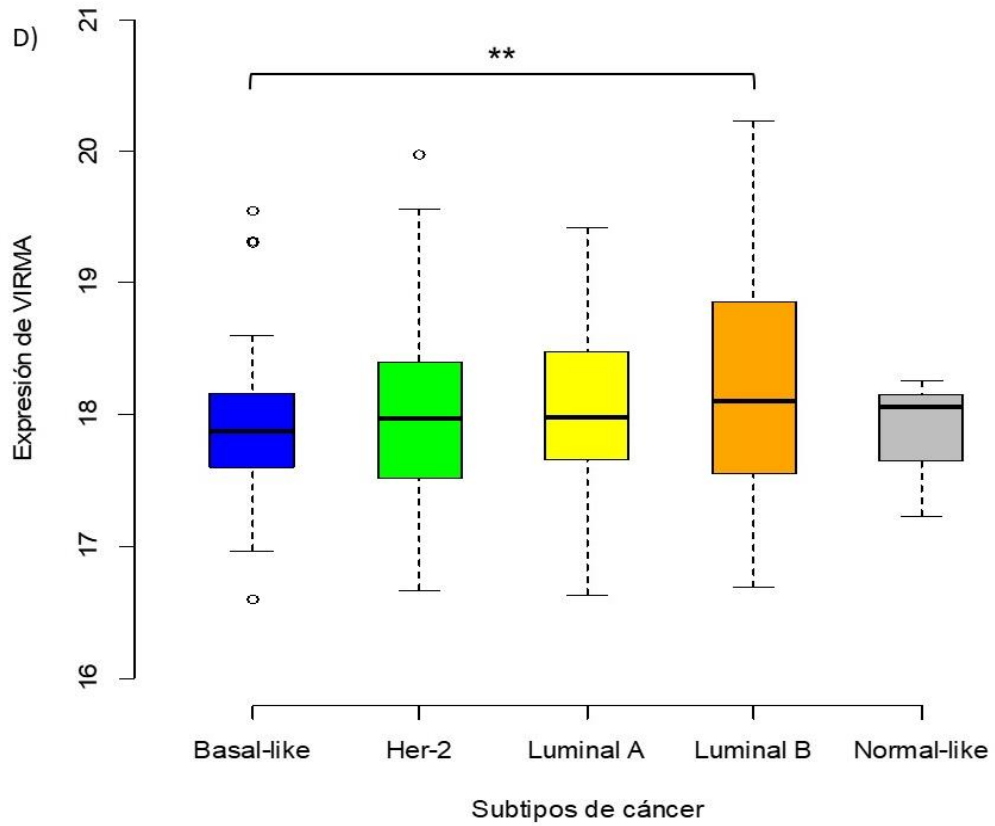
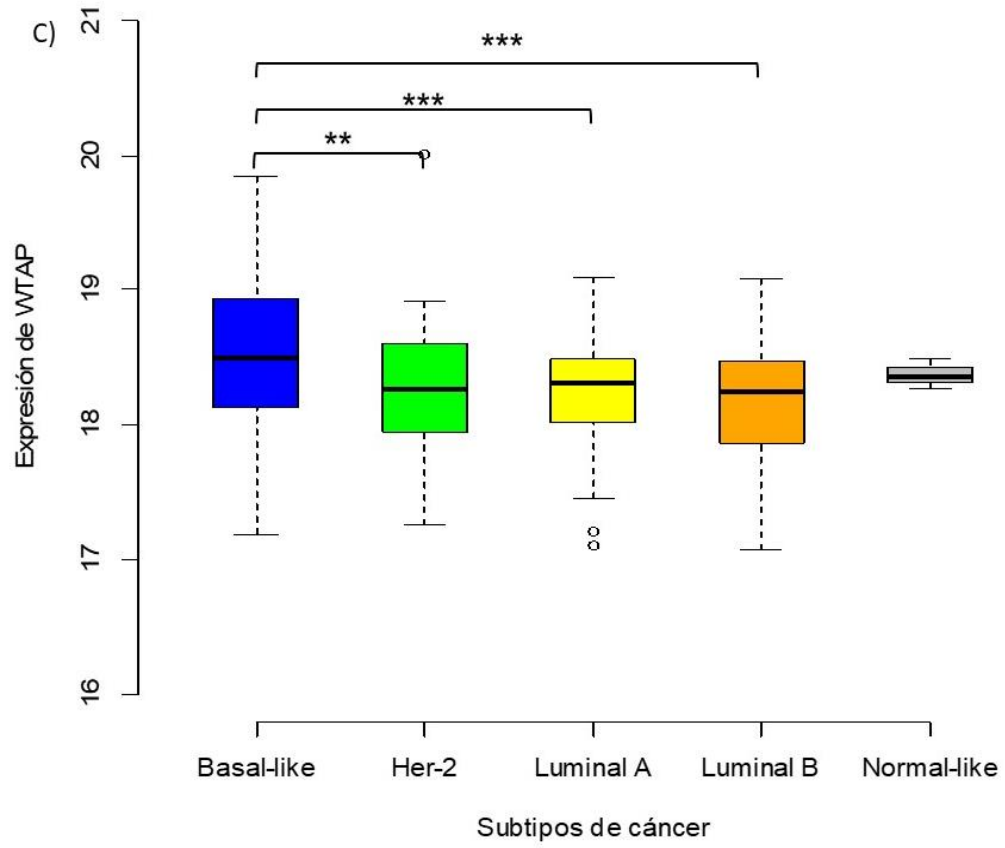
GEN	Luminal A			Luminal B			Her-2			Basal-like			Normal-like		
	Me	$\bar{x}$	$\sigma$	Me	$\bar{x}$	$\sigma$	Me	$\bar{x}$	$\sigma$	Me	$\bar{x}$	$\sigma$	Me	$\bar{x}$	$\sigma$
<b><i>METTL3</i></b>	17.04	17.04	0.443	17.11	17.11	0.516	17.01	17.09	0.598	16.79	16.82	0.467	16.64	16.62	0.169
<b><i>METTL14</i></b>	16.81	16.80	0.332	16.67	16.70	0.444	16.62	16.54	0.414	16.24	16.25	0.497	16.45	16.56	0.261
<b><i>WTAP</i></b>	18.31	18.25	0.338	18.25	18.18	0.387	18.27	18.26	0.494	18.50	18.54	0.529	18.36	18.37	0.113
<b><i>VIRMA</i></b>	17.98	18.07	0.564	18.11	18.22	0.797	17.97	18.02	0.739	17.88	17.89	0.49	18.06	17.85	0.541
<b><i>RBM15</i></b>	15.88	15.88	0.333	15.99	16.04	0.359	16.09	16.06	0.302	16.46	16.43	0.367	16.08	16.05	0.184
<b><i>RBM15B</i></b>	18.29	18.28	0.309	18.23	18.20	0.39	18.21	18.29	0.392	18.16	18.17	0.406	18.03	18.03	0.18
<b><i>ZC3H13</i></b>	17.89	17.87	0.459	17.71	17.70	0.588	17.59	17.67	0.426	17.44	17.48	0.488	17.76	17.76	0.198
<b><i>CBLL1</i></b>	17.44	17.44	0.358	17.36	17.33	0.435	17.26	17.30	0.351	17.33	17.34	0.407	17.10	17.30	0.485
<b><i>FTO</i></b>	17.03	17.08	0.766	16.63	16.73	0.73	16.55	16.64	0.641	16.54	16.70	0.823	17.12	17.12	0.29
<b><i>ALKBH5</i></b>	19.42	19.45	0.357	19.41	19.48	0.473	19.30	19.37	0.474	19.34	19.42	0.426	19.26	19.37	0.271

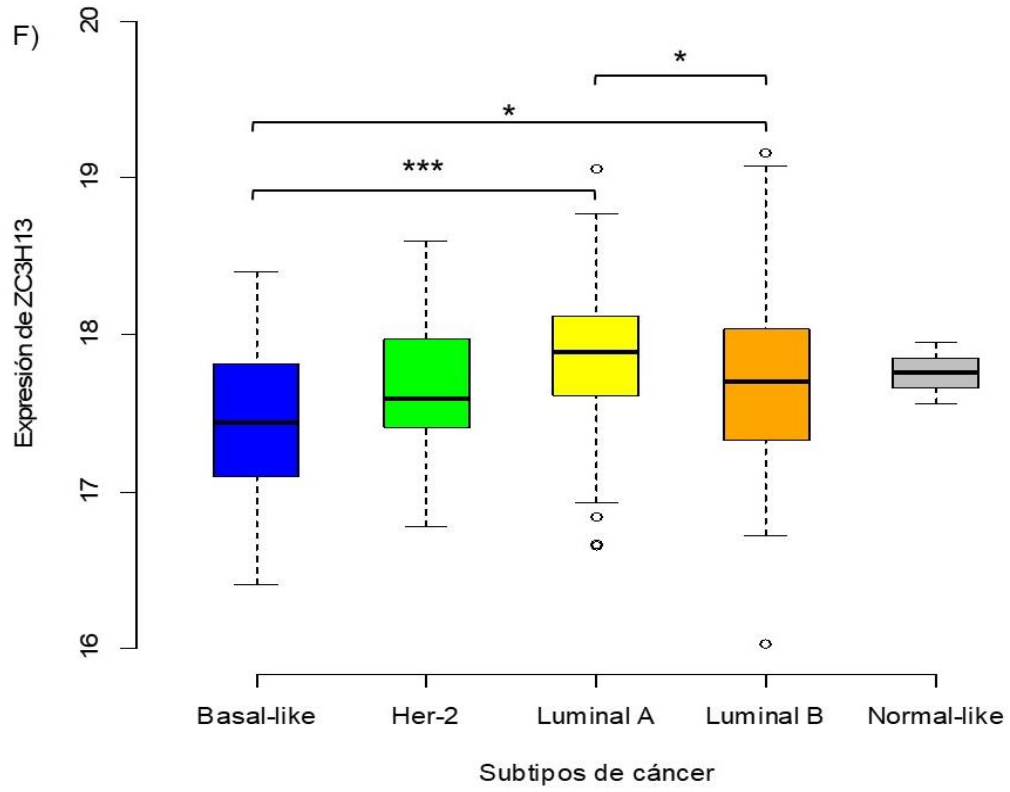
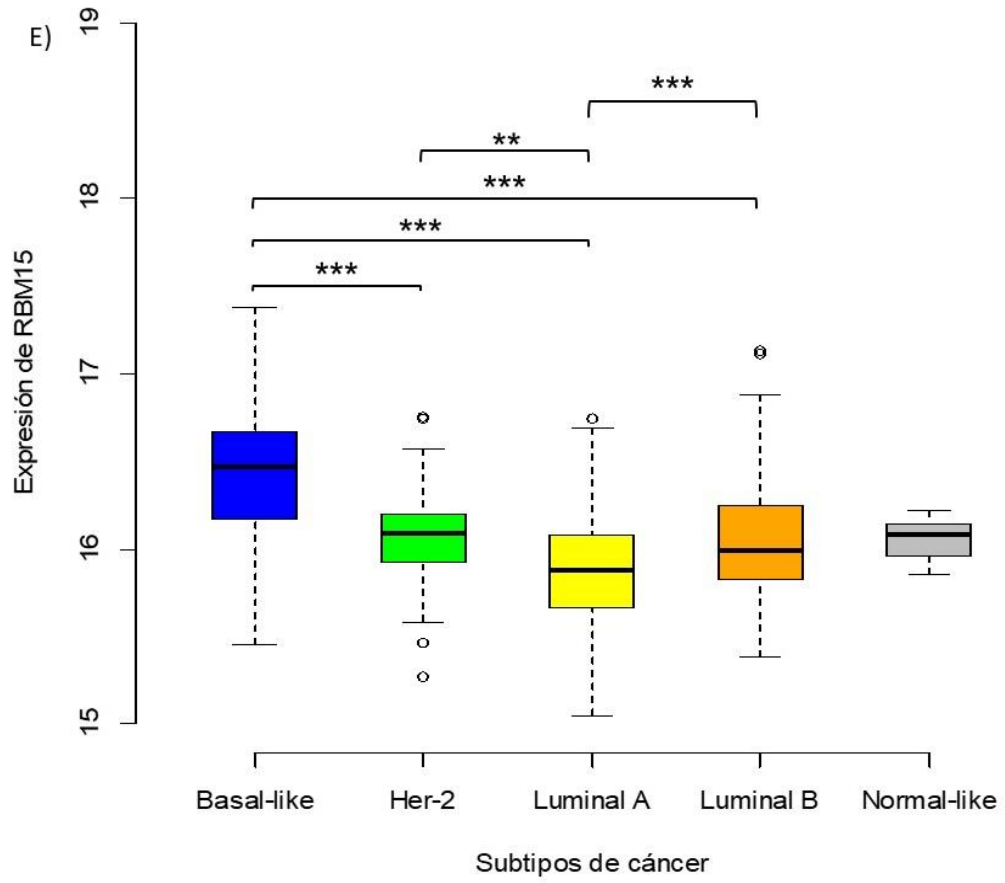
Mediana (Me), Media ( $\bar{x}$ ), Desviación estándar ( $\sigma$ ).

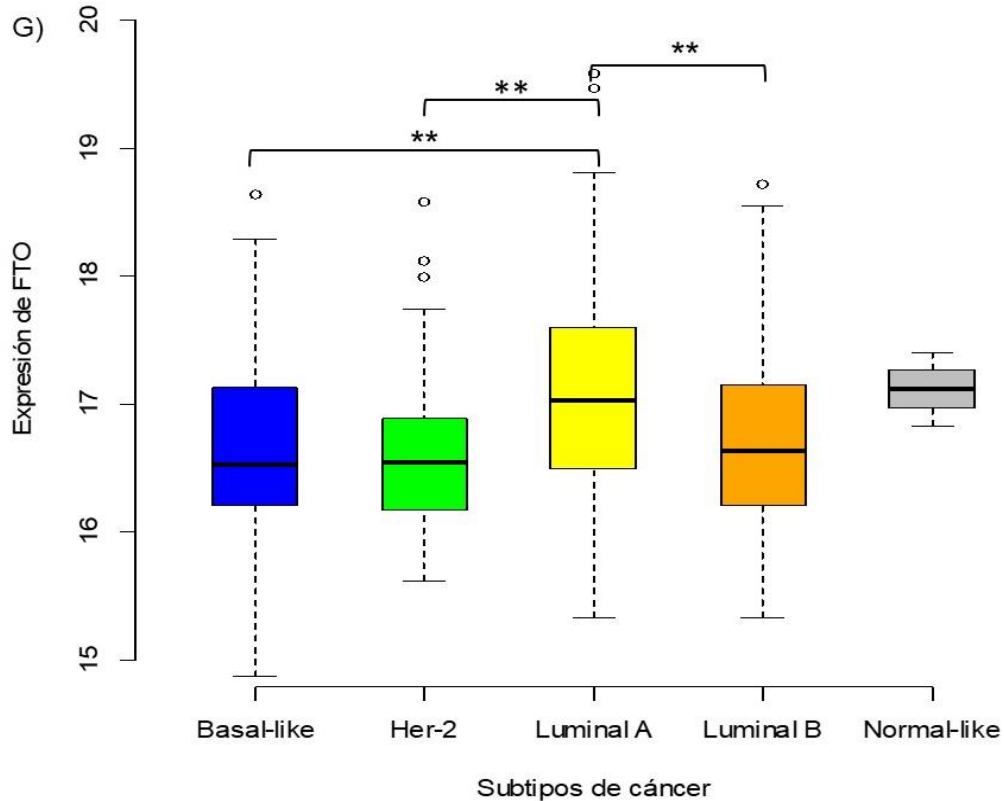
METTTL3 presentó diferencias en la expresión en los subtipos luminal A y B en comparación con el subtipo Basal-like ( $p < 0.01$ ) y en Her-2 presentó mayor expresión que el subtipo Basal-like ( $p < 0.05$ ) (Figura 8A). METTTL14 fue el segundo gen que tuvo mayores diferencias entre subtipos, como se observa en la Figura 8B, siendo la expresión más alta en el subtipo Luminal A. Mientras que la expresión de WTAP fue más alta en los subtipos Basal-like, donde el subtipo Basal-like tuvo diferencias en el nivel de expresión con el subtipo Her-2 ( $p < 0.01$ ) y con los subtipos Luminal A y B ( $p < 0.001$ ) (Figura 8C).

Por el contrario, la expresión de VIRMA fue más baja en el subtipo Basal-like, mostrando solo una diferencia entre los subtipos Basal-like y Luminal B ( $p < 0.01$ ) (Figura 8D). En lo que respecta a RBM15, la expresión fue alta en el subtipo Basal-like y fue el gen con mayores diferencias entre subtipos, como se puede apreciar en la Figura 8E y el gen ZC3H13 tuvo una expresión alta en los subtipos Luminal A y Normal-like, así mismo se encontró diferencia entre el subtipo Basal-like y los subtipos Luminal A ( $p < 0.001$ ) y Luminal B ( $p < 0.05$ ), por igual se presentó diferencia entre el nivel de expresión de los dos subtipos Luminales ( $p < 0.05$ ) (Figura 8F). Por otro lado, el nivel de expresión de la desmetilasa FTO fue alto en el subtipo Normal-like y Luminal A, además, hubo diferencias entre el subtipo Basal-like y los subtipos Her-2, Luminal A y B ( $p < 0.01$ ) como se puede ver en la Figura 8G.









**Figura 8. Niveles de expresión de los genes reguladores de m6A por subtipo molecular de cáncer de mama.**

**A.** Expresión de METT3, **B.** Expresión de METTL14, **C.** Expresión de WTAP, **D.** Expresión de VIRMA, **E.** Expresión de RBM15, **F.** Expresión de ZC3H13 y **G.** Expresión de FTO. Cada una de las **Figuras A-G** muestran las respectivas diferencias en los niveles de expresión entre los 5 subtipos moleculares analizados, así como cuales subtipos se encuentran más o menos expresados. ( $P < 0.05$  \*;  $P < 0.01$  \*\*;  $P < 0.001$  \*\*\*).

### 7.3 Análisis de la supervivencia con respecto a la relación entre la expresión de cada gen y el subtipo molecular de cáncer de mama.

Para el análisis de supervivencia solo se usaron 393 datos, de los 5 subtipos solo se incluyeron 4 (Basal-like con 69 datos de pacientes, Her2-enriched con 45, Luminal A con 175 y Luminal B con 104), ya que en el subtipo Normal-like solo hubo 3 datos se optó por no incluirlo en el análisis para no sobreestimar el resultado.

Los análisis de supervivencia demostraron que los niveles de expresión de los genes reguladores de m6A (METTL3, METTL14, WTAP, VIRMA, CBLL1 y ZC3H13 FTO y ALKBH5) son un factor de riesgo independiente para la supervivencia.

Los resultados de la probabilidad de supervivencia por subtipo molecular con respecto a los niveles de expresión se muestran en la Tabla 3.

Como se puede observar en la Tabla 3 solo RBM15 y RBM15B fueron significativos en su nivel de expresión con respecto a la supervivencia. La expresión de RBM15 en el subtipo Basal-like (P=0.04), donde se observa que una baja expresión en ese subtipo está relacionada con una mayor probabilidad de supervivencia como se presenta en la Figura 9A. De igual modo la expresión del gen RBM15B en el subtipo molecular Her-2 (P=0.02), muestra que una expresión más baja está ligada a una mayor probabilidad de sobrevivir en ese subtipo (Figura 9B).

**Tabla 3. Supervivencia por subtipo molecular de cáncer de mama y expresión de los genes reguladores de m6A.**

Gen	Luminal A	Luminal B	Her-2	Basal like
<i>METTL3</i>	0.1	0.2	0.2	0.3
<i>METTL14</i>	0.8	0.2	0.4	0.1
<i>WTAP</i>	0.6	0.06	0.2	0.2
<i>VIRMA</i>	0.8	0.3	0.3	0.3
<i>RBM15</i>	0.4	0.3	0.3	<b>0.04</b>
<i>RBM15B</i>	0.1	0.3	<b>0.02</b>	0.3
<i>CBLL1</i>	0.3	0.5	0.1	0.8
<i>ZC3H13</i>	0.07	0.7	0.1	0.4
<i>FTO</i>	0.5	0.4	0.3	0.07
<i>ALKBH5</i>	0.3	0.9	0.7	0.9

(P < 0.05; P < 0.01; P < 0.001).

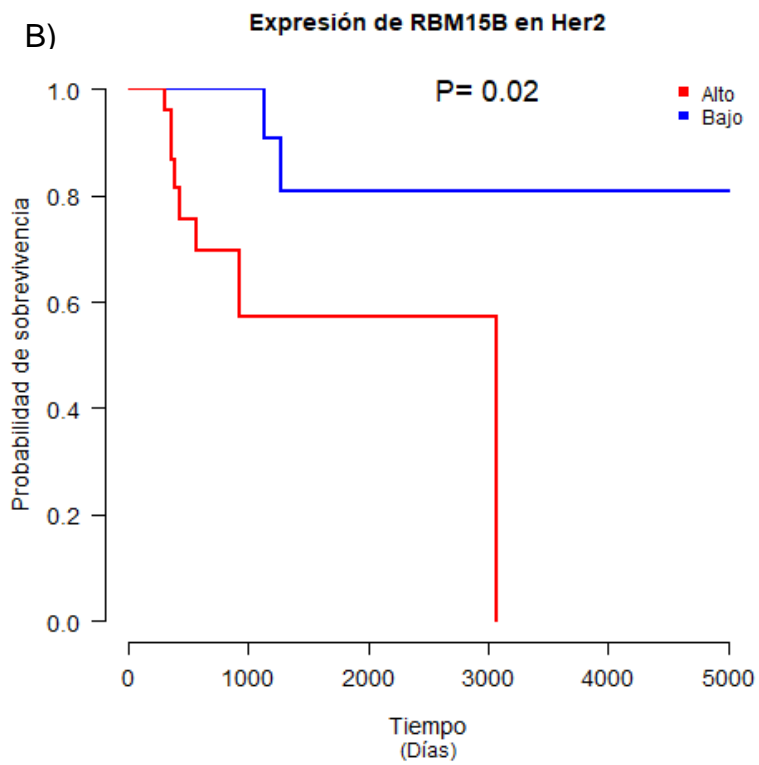
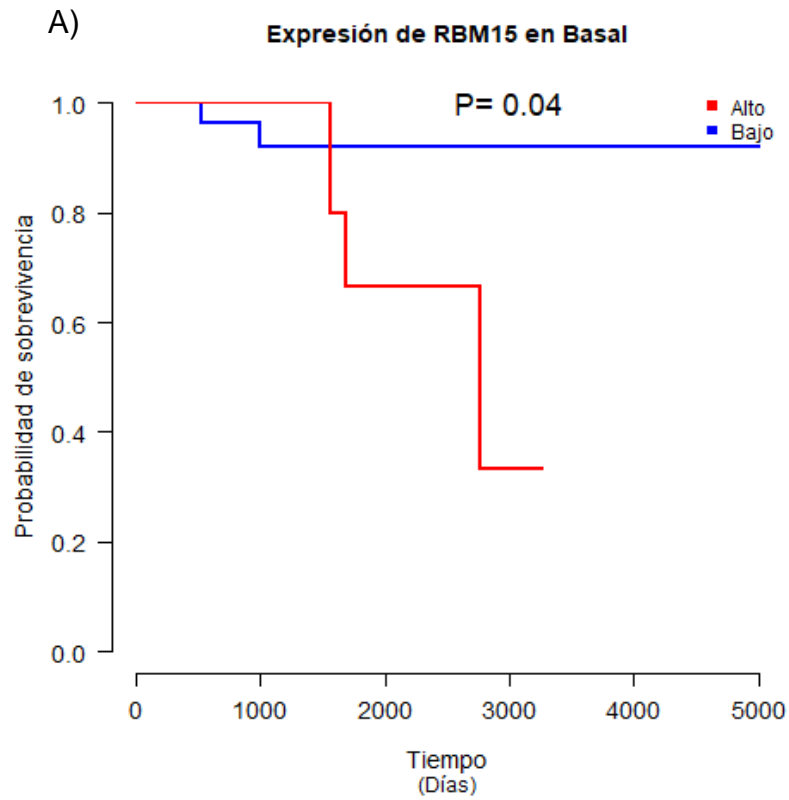


Figura 9. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia relacionada con la expresión y el subtipo molecular de cáncer de mama.

Se muestra la asociación significativa con la supervivencia en días, por parte de los dos genes reguladores de m6A con respecto a los subtipos moleculares, en las pacientes con cáncer de mama. **A.** Probabilidad de supervivencia ligada al nivel de expresión de RBM15 en el subtipo Basal-like, donde se observa que, a un mayor nivel de expresión, la probabilidad de supervivencia baja. **B.** Probabilidad de supervivencia dependiendo del nivel de expresión de RBM15B en el subtipo Her-2, observándose que, a un nivel de expresión alto, es menor la probabilidad de supervivencia.

## **8 Discusión.**

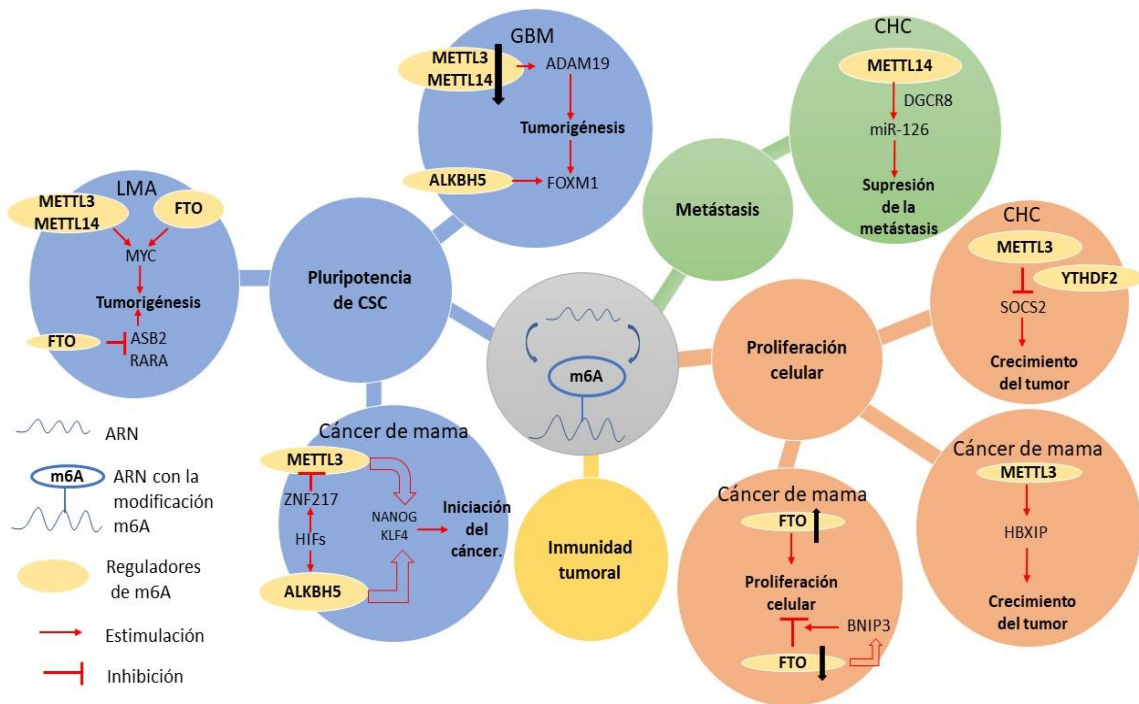
El cáncer de mama es el cáncer más frecuente entre las mujeres, afectando a 2.1 millones de mujeres cada año y causando la mayor cantidad de muertes relacionadas con el cáncer entre las mujeres (GLOBOCAN, 2018). Debido a la heterogeneidad, la enfermedad presenta mutaciones somáticas únicas y desregulación genética. Por lo tanto, la predicción y el seguimiento de la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad deben examinarse exhaustivamente con tecnologías como la secuenciación de nueva generación, así como el uso de herramientas bioinformáticas. Recientemente, la molécula m6A ha atraído la atención, porque está implicada funcionalmente en varios procesos biológicos, incluida la carcinogénesis (T. Wang et al., 2020). Por lo tanto, es necesario explorar las funciones y los mecanismos moleculares subyacentes de m6A y sus proteínas reguladoras en el cáncer de mama.

En este trabajo se realizaron diferentes técnicas básicas de biología molecular con la finalidad de aprender el procesamiento de las muestras biológicas y la obtención del ARN, y con ello comprender cómo es que se obtienen los resultados del TCGA. En este caso se utilizaron cultivos celulares de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama y se trabajó con los genes de las desmetilasas de m6A FTO y ALKBH5. De este modo se cumplió con el objetivo de aprender las técnicas que se utilizan para la extracción del material genético y su posterior análisis de expresión.

Ahora bien, estudios anteriores han revelado el papel fundamental de los reguladores de m6A, se ha descubierto que la marca m6A en el ARN tiene diversas funciones reguladoras biológicas en el inicio y la progresión del cáncer y la expresión desregulada de la metilación del ARN está estrechamente asociada con

varios tipos de cánceres (Pan et al., 2018). En particular los estudios se han enfocado en METTL3, METTL14, FTO y ALKBH5 principalmente (Figura 10).

Por ejemplo, tenemos que se ha descrito que la subexpresión o eliminación de METTL3 y METTL14 en el glioblastoma podría tener un papel en la promoción del crecimiento y la tumorigénesis de las células madre de glioblastoma (GSC) (Cui et al., 2017). De forma similar, la sobreexpresión de FTO tiende a mostrar un papel oncogénico en la leucemia mieloide aguda (Z. Li et al., 2017), aparte de esto, de acuerdo a otro estudio, FTO se encuentra regulada al alza en el cáncer de mama, y el alto nivel de expresión de FTO promueve la proliferación de células cancerosas, la formación de colonias y la metástasis (Niu et al., 2019). En otros trabajos de investigación se ha indicado que ALKBH5 mantiene la tumorigenicidad y la proliferación de células madre de cáncer de mama y de glioblastoma (C. Zhang, Samanta, et al., 2016b; C. Zhang, Zhi, et al., 2016; S. Zhang et al., 2017). De igual modo, de acuerdo con Fry y colaboradores establecen que la regulación a la baja de METTL3 y METTL14, o bien la sobreexpresión de ALKBH5 para disminuir los niveles de m6A en células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas y en células transformadas con un fenotipo oncogénico, disminuyó la proliferación y la migración (Fry et al., 2018). Igualmente, METTL14 fue reportado como supresor de tumores para glioblastoma (Cui et al., 2017) y en carcinoma hepatocelular (Ma et al., 2017). A su vez, ALKBH5 se describe como oncogén para glioblastoma (S. Zhang et al., 2017) y cáncer de mama (C. Zhang, Samanta, et al., 2016b). Por igual, para METTL3 se ha dilucidado que su regulación positiva con frecuencia, contribuye a la progresión del carcinoma hepatocelular (Chen et al., 2018), incluso, datos concluyentes indican que METTL3 aumenta la expresión de HBXIP formando un circuito de retroalimentación positiva, lo que conduce a una proliferación celular acelerada en el cáncer de mama (Cai et al., 2018).



**Figura 10. Múltiples funciones de la metilación del ARN m6A en el cáncer.**

La metilación m6A del ARN ejerce múltiples funciones en la iniciación y progresión del cáncer. El círculo en medio representa el proceso reversible de metilación del ARN de m6A, que juega un papel fundamental en la modulación de la pluripotencialidad de las células madre cancerosas (CSC), la proliferación, la metástasis y la inmunidad tumoral. Los distintos mecanismos a través de los cuales la metilación m6A de ARN ejerce estos cuatro aspectos en varios tipos de cánceres, no solo en el cáncer de mama como se muestra en la imagen. Glioblastoma (GBM), Leucemia mieloide aguda (LMA), Carcinoma Hepatocelular (CHC), Desintegrina A y metalopeptidasa dominio 19 (ADAM19), proteína de caja forkhead M1 (FOXM1), mielocitomatosis (MYC), supresor de la caja de señalización de citocinas-2 (ASB2) y el receptor alfa del ácido retinoico (RARA), factor inducible por hipoxia (HIF), proteína 217 del dedo de zinc (ZNF217), factor 4 similar a Kruppel (KLF4), supresor de señalización de citocinas-2 (SOCS2), proteína de interacción X del virus de la hepatitis B oncoproteína (HBXIP) y BCL2 que interactúa con la proteína 3 (BNIP3).

Con lo anterior podemos decir que la relación que hay entre el epitranscriptoma y el cáncer, se ha centrado únicamente en el complejo MTasa y en las dos desmetilasas. Así pues, se les ha prestado poca importancia a las proteínas que forman parte del complejo asociado a metilación (MACOM).

En lo que concierne al análisis en el cual se evaluaron las diferencia que hay entre el nivel de expresión de los reguladores de m6A con respecto al subtipo molecular,

encontramos que METTL3 se expresa de forma diferencial entre subtipos, con una mayor expresión en el subtipo Luminal B y la menor expresión en el subtipo Basal-like. Es interesante que el subtipo Basal-like es uno de los más agresivos (Tan et al., 2008), por lo que, la menor presencia del componente principal del complejo de metiltransferasas podría afectar los niveles de m6A en los ARNs mensajeros y con esto ocasionar una desregulación de su destino, ya que esta marca es un determinante de lo que le ocurrirá al ARNm en el citoplasma (Lin et al., 2016), de igual manera, se ha comprobado que el MACOM actúa dependiendo del nivel de expresión de METTL3, en especial RBM15 y WTAP, de este modo METTL3 regula la sinergia con la cual el “interactoma” llevará a cabo la colocación de m6A, además se ha señalado que la regulación a la baja de METTL3 resulta en una caída sustancial de los niveles de m6A en el ARNm, similar a lo observado cuando se elimina RBM15 y RBM15B, se reducen notablemente los niveles de m6A en el ARNm y ARN poliA, lo que respaldaría la idea de que la unión de RBM15/15B recluta a METTL3 y determina los motivos DRACH (D=A, G o U; R = A o G; H = A, C o U) para iniciar la adición de m6A, lo que le confiere a la interacción RBM15/15/METTL3 una gran relevancia (Knuckles et al., 2018; Patil et al., 2016). Asimismo, la otra metiltransferasa METTL14 se expresó de manera diferencial entre los subtipos moleculares, observándose una expresión regulada al alza en los subtipos Luminal A y B, y con una expresión menor en el subtipo Basal-like. Lo que nos podría indicar, que al ser un complejo que ejecuta sinérgicamente la función de colocar la marca m6A (J. Liu et al., 2014), el nivel de expresión de las dos metiltransferasas es similar en su comportamiento con respecto a los subtipos moleculares.

Por otro lado, el nivel de expresión WTAP fue lo contrario al de las metiltransferasas, ya que la expresión más alta se mostró en el subtipo Basal-like y la expresión más baja en el Luminal B. Tomando en cuenta esto, podríamos deducir, que este comportamiento de la expresión tiene que ver con la estrecha interacción que WTAP tiene con METTL3 (Ping et al., 2014). Ya que se ha afirmado que la expresión de METTL3 puede regular la expresión de WTAP en múltiples niveles mediante mecanismos directos e indirectos que incluyen la traducción y la estabilidad del ARNm. Más aun, se ha mostrado que la regulación positiva de WTAP tiene un

efecto oncogénico, pero solo en presencia de un METTL3 funcional (Sorci et al., 2018), sin embargo, no se ha comprobado si WTAP puede tener funciones reguladoras independientes del complejo de modificación m6A que pudieran contribuir en un papel oncogénico.

Mientras que, solo algunos genes integrantes del MACOM mostraron diferenciales en la expresión entre los subtipos moleculares, en el caso del nivel de expresión de VIRMA solo mostro una diferencia entre subtipos, siendo su mayor expresión, la vista en el subtipo Luminal A y la menor en el subtipo Her-2. Asimismo, se ha propuesto que VIRMA está relacionado íntimamente con el complejo MTasa (METTL3/14/WTAP), mediando la metilación del ARNm cerca del codón de terminación en la región 3' no traducida (UTR), donde desempeña un papel en la poliadenilación alternativa (J. Liu et al., 2018).

Con respecto al nivel de expresión de RBM15 resultó ser el que mayor diferencias tuvo entre los subtipos, de hecho, hubo contrastes relevantes entre los dos subtipos Luminales, algo inusual, ya que las características de estos dos subtipos son similares en algunos aspectos génicos (Al-thoubaity, 2020), la mayor expresión se mostró en el subtipo Basal-Like al igual que WTAP y la expresión menor en el subtipo Luminal A. De esta forma, se ha demostrado que RBM15 y su parólogo RBM15B interactúan con METTL3 de una manera dependiente de WTAP (Patil et al., 2016), así que, esta información podría indicar que hay una relación entre las expresiones reguladas positiva y negativamente en subtipos específicos. De forma similar, habría que enfatizar que RBM15 aparte de presentar contrastes en la expresión entre los subtipos moleculares, también demostró tener influencia sobre la supervivencia, siendo el único gen de los diez analizados que mostró resultados significativos en los dos análisis. Ahora bien, en relación con el nivel de expresión de ZC3H13, de manera similar a lo obtenido en METTL14, se observó una expresión más alta en el subtipo Luminal A y la expresión más baja el subtipo Basal-Like. Algo a destacar es que se ha propuesto que ZC3H13 actúa como una proteína adaptadora entre WTAP y RBM15 en el complejo de metiltransferasas (Knuckles et al., 2018).

De cierta forma los genes que componen al MACOM tienen como principal prioridad reclutar a los intermediarios en la colocación de m6A, coordinar y regular su actividad, así como delimitar la organización que deben tomar en las cercanías de los motivos DRACH, es decir, influyen en los procesos centrales asociados a la modificación de m6A, así como en el metabolismo y destino del ARNm (Knuckles & Bühler, 2018; T. Wang et al., 2020). Por lo cual, se puede apreciar que sus expresiones varían entre subtipos, pero comparten un patrón de expresión dependiendo de la afinidad que tengan con alguno de los otros genes del complejo MTasa en subtipos moleculares específicos. Sin embargo, no hay un estudio verdaderamente concluyente que describa su papel oncogénico en el cáncer de mama, por lo que, su relación con este cáncer podría estar relacionado con esta sinergia que tiene la maquinaria escritora de m6A, y su desregulación en conjunto podría estar implicada de alguna forma en la progresión del cáncer de mama, siendo importante más investigación que pueda sustentar lo propuesto.

Entonces este trabajo aporta datos sobre los cambios que existen en los niveles de expresión de esos genes en los subtipos moleculares, así como en que subtipos estos genes se expresan más y en cuales menos, pudiendo aportar así un punto de partida para analizar la función de la adición de m6A, a través de una estrategia directa para conocer los cambios en los niveles de esta marca en los ARNs mensajeros.

En el caso de las desmetilasas, ALKBH5 no mostró tener diferencias significativas en los niveles de expresión con respecto a los 5 subtipos moleculares, de este modo, podíamos inferir que el nivel de expresión de ALKBH5 no se ve afectado en ninguno de los subtipos moleculares de cáncer de mama. Resulta interesante que no haya ningún contraste en la expresión, ya que de acuerdo a diversos estudios, se ha demostrado que ALKBH5 en presencia de condiciones hipóxicas (Gilkes & Semenza, 2013; Thalhammer et al., 2011), tal y como se desarrolla en el ambiente tumoral, lleva a la sobreexpresión de ALKBH5 disminuyendo de este modo los niveles de m6A. Estos estudios muestran que la hipoxia está relacionada con una mayor formación de células madre de cáncer de mama directamente a través de la

regulación positiva de ALKBH5 o indirectamente a través de la vía del complejo ZNF217/METTTL3-METTTL14. Consecuentemente la disminución del nivel de m6A en el ARNm de NANOG da como resultado la regulación positiva de la expresión de NANOG, que es un factor de transcripción clave asociado con la pluripotencia (C. Zhang, Samanta, et al., 2016a; C. Zhang, Zhi, et al., 2016). Con estos antecedentes se esperaba encontrar diferencias en su expresión en este trabajo.

Por otro lado, FTO se ha visto que tiene un papel ya comprobado en la tumorigénesis de la leucemia mieloide aguda (Z. Li et al., 2017). Solo pocos estudios han obtenidos datos realmente concluyentes acerca de su función oncogénica en cáncer de mama (Niu et al., 2019), de este modo, el nivel de expresión de FTO también tuvo contrastes entre los subtipos moleculares, viéndose una expresión más alta en los subtipos Luminal A y Normal-like y una expresión menor en el subtipo Luminal B, siendo así, el único gen que mostro un dato relevante con respecto a subtipo Normal-like, de cierta forma esto estaría indicando una heterogeneidad en su expresión dependiendo del subtipo.

Podríamos con esto, señalar que el complejo multiproteico de escritores y las enzimas borradoras responden al contexto celular y las señales ambientales, y varían sus niveles de expresión dependiendo del subtipo molecular de cáncer de mama, y así, influenciar los niveles de m6A, provocando la alteración de genes implicados en el ciclo celular o bien manteniendo la estabilidad del metabolismo del ARNm. De modo que, un desencadenante pro-oncogénico/estrés (por ejemplo, hipoxia), resulta en la alteración de la expresión/actividad de la maquinaria de proteínas reguladores de m6A y con ello, puede conducir a la alteración de los niveles de expresión, lo que podría provocar la actividad de genes diana ligados a la proliferación, lo que resulta en el crecimiento del tumor y progresión (Panneerdoss et al., 2018).

A su vez, cabe destacar que en los subtipos moleculares Luminal A y Luminal B, se mostró un nivel de expresión más alto en los genes METTL3, METTL14, VIRMA, ZC3H13 y FTO. En contraste con lo observado en el subtipo Basal-like, en donde la expresión de los genes de las dos metiltransferasas y ZC3H13 fue la más baja.

Además, el subtipo Basal-like presento diferencias marcadas en el nivel de expresión de todos los genes con datos significativos, con respecto a todos los demás subtipos, excepto por el subtipo Normal-like.

Igualmente podríamos agregar que, de acuerdo con lo observado en la base de datos de las pacientes, los tipos histológicos ductal infiltrante y lobular infiltrante, así como los subtipos moleculares Luminal A y Luminal B son los más prevalentes. También habría que remarcar que los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados se vieron sobreexpresados o subexpresados con mayor frecuencia en los subtipos moleculares Luminal A y Basal-like, algo que resulta interesante puesto que, se ha descrito que el subtipo molecular más común son los tumores Luminales A, seguidos de los tumores Basales. Además, se ha encontrado que los tumores luminales A y Basales están estrechamente relacionados con una mayor frecuencia de carcinomas lobulillares y ductales (Al-thoubaity, 2020).

En lo que respecta al análisis de supervivencia ninguno de los reguladores de m6A exceptuando a RBM15 en el subtipo Basal-like y a su parólogo RBM15B en el subtipo Her-2, fueron los únicos genes que mostraron que los niveles de expresión influyen en la supervivencia, en este caso las curvas Kaplan Meier demuestran que a una alta expresión de estos genes hay menor probabilidad de supervivencia, incluso podríamos inferir, que podría haber una acción por parte de RBM15 o RBM15B al encontrarse desregulado su nivel de expresión y de este modo, se vería alterada la unión a las regiones enriquecidas con uridina y el reclutamiento del complejo MTasa para metilar los motivos DRACH cercanos, además que se ha comprobado que la desregulación de RBM15 y RBM15B, altera el silenciamiento génico mediado por XIST (transcrito específico inactivo de ARN largo no codificante X), de esta manera, esto genes toman una relevancia en la regulación del silenciamiento transcripcional dependiente de m6A (Patil et al., 2016). Cabe señalar que no hay ninguna publicación que demuestre algo parecido con respecto a lo encontrado en los genes RBM15/RBM15B.

De hecho, hay un trabajo que evalúa la supervivencia y otros aspectos relacionados al nivel de expresión del ARNm de las desmetilasas y metiltransferasas de m6A e

informan que METTL3, METTL14, WTAP y FTO regulados a la baja están asociados a un mal pronóstico en cáncer de mama, pero a diferencia de nuestro estudio, Wu y colaboradores realizaron en este apartado un metaanálisis en el cual evalúan las bases de datos de Breast Cancer Gene-Expression Miner v4.5 (bc-GenExMiner v4.5), donde la metodología fue diferente, ya que, manejaron una base de información para cada gen con diferentes cantidades de datos (con un rango que iba desde 1846 a 3825) (Wu et al., 2019), esta podría ser la razón, por la cual hay una diferencia en lo encontrado.

Por otro lado, está un estudio sumamente interesante que podría darnos la pauta para explicar esta relación de RBM15/RBM15B con la baja supervivencia, cuando estos se encuentran regulados positivamente, Shahriyari y colaboradores (2019) encontraron que el gen supresor de tumores BAP1 (gen de la proteína 1 asociada a BRCA1) está altamente correlacionado de manera positiva con la expresión de RBM15B en el carcinoma de mama invasivo y adenocarcinoma de colon. Es decir, este gen está ubicado muy cerca de la región supresora de tumores de BAP1 (3p21) que comúnmente se altera en el cáncer de mama (Angeloni, 2007). RBM15B posee una similitud notable con RBM15, en secuencia y organización de dominios, por lo que, también se le podría aplicar lo propuesto a RBM15B. Igualmente, es importante tener en cuenta que los subtipos HER2 positivos y Basal-like se asocian con una mayor frecuencia de tumores de gran tamaño y carcinomas poco diferenciados, así como con una manifestación más agresiva del cáncer (Al-thoubaity, 2020).

Así que, con base en los resultados, podemos indicar que los intermediarios proteicos de m6A no tienen una influencia directa en la supervivencia en el cáncer de mama, de acuerdo con expresión y subtipo molecular. Siendo así, el medir y monitorear las alteraciones en los niveles expresión de RBM15/RBM15B en los subtipos Basal-like y Her-2 respectivamente, pueden ser de ayuda para el pronóstico de la supervivencia global.

Los hallazgos realizados con este análisis bioestadístico nos permitieron obtener una visión general de las características biológicas y clínicas asociadas con la maquinaria que regula a m6A, y es aquí donde radica su importancia, ya que no se

ha realizado un trabajo similar, que tome en cuenta la relevancia que puede tener el MACOM como un intermediario en la estabilidad y equilibrio de los niveles de m6A en el ARNm. Así pues, estos genes reguladores podrían establecer pautas determinadas, según sea la desregulación en el nivel de expresión del gen y el subtipo molecular de cáncer de mama específicos.

Hacen falta estudios que permitan investigar más a fondo a estos reguladores proteicos, y como tal a la marca epitranscriptómica m6A, los cuales se asocian estrechamente con la progresión del cáncer en general. Por lo tanto, los estudios futuros ya no solo estarán basados en la epigenética, sino que contarán con las aportaciones de la epitranscriptómica, para poder comprender cada vez más, esta compleja regulación del proceso tumoral y el fenotipo maligno del cáncer de mama, y con ello, llegar a la implementación de nuevas alternativas terapéuticas.

## **9 Conclusiones.**

Las plataformas que proveen información de características clínico-patológica y genéticas de pacientes con cáncer, como la base de datos TCGA, permiten hacer análisis que de otra forma no serían posibles para quien no tiene acceso a la secuenciación de genoma completo.

Los niveles de expresión de los genes reguladores de m6A tienen diferencias significativas, al menos en la mayoría de ellos, con respecto al subtipo molecular de cáncer de mama, además de que los niveles de expresión de algunos genes del complejo MTasa y MACOM comparten un patrón en su regulación, ya sea a la baja o al alza, en algunos subtipos.

Por otra parte, al parecer la mayoría de los genes que integran la maquinaria de m6A no tiene influencia en el pronóstico, puesto que el nivel de expresión y el subtipo molecular según los datos obtenidos, no están ligados a una mayor o menor probabilidad de supervivencia. Solo dos genes mostraron relación, RBM15 en el subtipo Basal-like y RBM15B en el subtipo Her-2. Por lo tanto, determinar cómo estos genes y la vía específica que sigue el ARNm con la marca m6A, influyen en

la tumorigénesis, así como, averiguar cuál es el mecanismo molecular adyacente, es un desafío, pero sería sumamente interesante dilucidarlo *in vitro* e *in vivo*.

Los genes RBM15/RBM15B, parecen tener una implicación relevante en la supervivencia y mal pronóstico. Orientar la investigación hacia esta relación aportará información para establecer un punto de partida para abordar los mecanismos subyacentes de las modificaciones de m6A y sus genes reguladores en el cáncer de mamá.

## 10 Bibliografía.

Agarwala, S. D., Blitzblau, H. G., Hochwagen, A., & Fink, G. R. (2012). RNA methylation by the MIS complex regulates a cell fate decision in yeast. *PLoS Genetics*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002732>

Akar, R. O., Selvi, S., Ulukaya, E., & Aztopal, N. (2019). Key actors in cancer therapy: Epigenetic modifiers. In *Turkish Journal of Biology* (Vol. 43, Issue 3, pp. 155–170). Scientific and Technical Research Council of Turkey. <https://doi.org/10.3906/biy-1903-39>

Al-thoubaity, F. K. (2020). Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, 49, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2019.11.021>

American Cancer Society, I. (2019). *¿Qué es el cáncer de mamá?* [https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer\\_de\\_mama/que\\_es\\_cancer\\_mama](https://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/que_es_cancer_mama)

Amjad, E., Asnaashari, S., Sokouti, B., & Dastmalchi, S. (2020). Systems biology comprehensive analysis on breast cancer for identification of key gene modules and genes associated with TNM-based clinical stages. *Scientific Reports*, 10(1), 10816. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67643-w>

Angeloni, D. (2007). Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. In *Briefings in Functional*

*Genomics and Proteomics* (Vol. 6, Issue 1, pp. 19–39). Brief Funct Genomic Proteomic. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elm007>

Basanta, M., Temple, S., Ansari, S. A., D'Amico, A., & Agris, P. F. (2016). Attomole quantification and global profile of RNA modifications: Epitranscriptome of human neural stem cells. *Nucleic Acids Research*, *44*(3). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv971>

Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., & Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, *40*(5), 499–507. <https://doi.org/10.1038/ng.127>

Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G., & Rottman, F. M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, *3*(11), 1233–1247. [/pmc/articles/PMC1369564/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1369564/)

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Cai, X., Wang, X., Cao, C., Gao, Y., Zhang, S., Yang, Z., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, W., & Ye, L. (2018). HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g. *Cancer Letters*, *415*, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.018>

CDS. (2019). *¿Qué es el cáncer de mama?* |Center for Disease Control. [https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic\\_info/what-is-breast-cancer.htm](https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm)

Chandola, U., Das, R., & Panda, B. (2015). Role of the N6-methyladenosine RNA mark in gene regulation and its implications on development and disease. *Briefings in Functional Genomics*. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elu039>

- Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(10), 736–750. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>
- Chen, M., Wei, L., Law, C. T., Tsang, F. H. C., Shen, J., Cheng, C. L. H., Tsang, L. H., Ho, D. W. H., Chiu, D. K. C., Lee, J. M. F., Wong, C. C. L., Ng, I. O. L., & Wong, C. M. (2018). RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology*, *67*(6), 2254–2270. <https://doi.org/10.1002/hep.29683>
- Chi, K. R. (2017). The RNA code comes into focus. *Nature*, *542*, 503. <http://dx.doi.org/10.1038/542503a>
- Cui, Q., Shi, H., Ye, P., Li, L., Qu, Q., Sun, G., Sun, G., Lu, Z., Huang, Y., Yang, C. G., Riggs, A. D., He, C., & Shi, Y. (2017). m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Reports*, *18*(11), 2622–2634. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.059>
- Dai, X., Li, Y., Bai, Z., & Tang, X. Q. (2015). Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers. *Scientific Reports*, *5*(1), 14499. <https://doi.org/10.1038/srep14499>
- Deng, J. L., Xu, Y. H., & Wang, G. (2019). Identification of potential crucial genes and key pathways in breast cancer using bioinformatic analysis. *Frontiers in Genetics*, *10*(JUL), 695. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00695>
- Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(10), 3971–3975. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4372599>
- Dey, N., De, P., & Leyland-Jones, B. (2017). PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast

- cancers: From tumor cell signaling to clinical trials. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 175, pp. 91–106). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.037>
- Dinescu, S., Ignat, S., Lazar, A. D., Constantin, C., Neagu, M., & Costache, M. (2019). Epitranscriptomic signatures in lncRNAs and their possible roles in cancer. In *Genes* (Vol. 10, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes10010052>
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, *485*, 201. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11112>
- Dominissini, D., & Rechavi, G. (2018). Epitranscriptome regulation. *Nature Structural & Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0140-7>
- du Toit, A. (2016). Expanding the mRNA epitranscriptome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*, 201. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.35>
- Eisenstein, M. (2016). Epitranscriptomics: mixed messages. *Nature Methods*, *14*, 15. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.4125>
- Engstrøm, M. J., Opdahl, S., Hagen, A. I., Romundstad, P. R., Akslen, L. A., Haugen, O. A., Vatten, L. J., & Bofin, A. M. (2013). Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, *140*(3), 463–473. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2647-2>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. In *Genes and Diseases* (Vol. 5, Issue 2, pp. 77–106). Chongqing

yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo.  
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

Fountzilas, G., Dafni, U., Bobos, M., Batistatou, A., Kotoula, V., Trihia, H., Malamou-Mitsi, V., Miliaras, S., Chrisafi, S., Papadopoulos, S., Sotiropoulou, M., Filippidis, T., Gogas, H., Koletsa, T., Bafaloukos, D., Televantou, D., Kalogeras, K. T., Pectasides, D., Skarlos, D. V., ... Dimopoulos, M. A. (2012). Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037946>

Fragomeni, S. M., Sciallis, A., & Jeruss, J. S. (2018). Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. In *Surgical Oncology Clinics of North America* (Vol. 27, Issue 1, pp. 95–120). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

Fry, N. J., Law, B. A., Ilkayeva, O. R., Carraway, K. R., Holley, C. L., & Mansfield, K. D. (2018). N6-methyladenosine contributes to cellular phenotype in a genetically-defined model of breast cancer progression. *Oncotarget*, 9(58), 31231–31243. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25782>

Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A. F., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y. S., Ben-Haim, M. S., Eyal, E., Yunger, S., Pinto, Y., Jaitin, D. A., Viukov, S., Rais, Y., Krupalnik, V., Chomsky, E., ... Hanna, J. H. (2015). m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 347(6225), 1002–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1261417>

Gilkes, D. M., & Semenza, G. L. (2013). Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. In *Future Oncology* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1623–1636). NIH Public Access. <https://doi.org/10.2217/fon.13.92>

Giuliano, A. E., Connolly, J. L., Edge, S. B., Mittendorf, E. A., Rugo, H. S., Solin, L. J., Weaver, D. L., Winchester, D. J., & Hortobagyi, G. N. (2017). Breast Cancer-

Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(4), 290–303. <https://doi.org/10.3322/caac.21393>

GLOBOCAN. (2018). *Cancer Today*. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0&population\\_group\\_globocan\\_id=](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=)

Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., & Senn, H. J. (2011). Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Annals of Oncology*, 22(8), 1736–1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>

Guo, J., Tang, H. W., Li, J., Perrimon, N., & Yan, D. (2018). Xio is a component of the *Drosophila* sex determination pathway and RNA N6-methyladenosine methyltransferase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(14), 3674–3679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720945115>

Hanby, A. M., & Walker, C. (2004). Tavassoli FA, Devilee P: Pathology and Genetics: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. WHO Classification of Tumours series - volume IV. Lyon, France: IARC Press: 2003. 250pp. ISBN 92 832 2412 4. *Breast Cancer Research*, 6(3), 133. <https://doi.org/10.1186/bcr788>

He, C. (2010). Grand Challenge Commentary: RNA epigenetics? *Nature Chemical Biology*, 6, 863. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.482>

Helm, M., & Motorin, Y. (2017). Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nature Reviews Genetics*, 18, 275.

<http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.169>

Horiuchi, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Ohashi, R., Naito, M., Kodama, T., & Hamakubo, T. (2013). Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 33292–33302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.500397>

Huang, J., & Yin, P. (2018). Structural Insights into N6-methyladenosine (m6A) Modification in the Transcriptome. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.03.001>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). “ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)” DATOS NACIONALES.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Cancerma20.pdf>

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y. G., & He, C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>

Knuckles, P., & Bühler, M. (2018). Adenosine methylation as a molecular imprint defining the fate of RNA. In *FEBS Letters* (Vol. 592, Issue 17, pp. 2845–2859). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13107>

Knuckles, P., Lence, T., Haussmann, I. U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S. H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., Andrade-Navarro, M. A., Biggiogera, M., Helm, M., Soller, M., Bühler, M., & Roignant, J. Y. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor

- RbM15/spenito to the m6 a machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes and Development*, 32(5–6), 415–429. <https://doi.org/10.1101/gad.309146.117>
- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J. E., ... Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Konno, M., Taniguchi, M., & Ishii, H. (2019). Significant epitranscriptomes in heterogeneous cancer. In *Cancer Science* (Vol. 110, Issue 8, pp. 2318–2327). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cas.14095>
- Lan, Q., Liu, P. Y., Haase, J., Bell, J. L., Huttelmaier, S., & Liu, T. (2019). The critical role of RNA M6A methylation in cancer. In *Cancer Research* (Vol. 79, Issue 7, pp. 1285–1292). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2965>
- Lehmann, B. D., Shyr, Y., Pietenpol, J. A., Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014.2750>
- Lewis, C. J. T., Pan, T., & Kalsotra, A. (2017). RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.163>
- Li, G., Liu, Y., Liu, C., Su, Z., Ren, S., Wang, Y., Deng, T., Huang, D., Tian, Y., & Qiu, Y. (2016). Genome-wide analyses of long noncoding RNA expression profiles correlated with radioresistance in nasopharyngeal carcinoma via next-generation deep sequencing. *BMC Cancer*, 16(1), 719. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2755-6>

- Li, X., Xiong, X., & Yi, C. (2016). Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. *Nature Methods*, 14, 23. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.4110>
- Li, Z., Weng, H., Su, R., Weng, X., Zuo, Z., Li, C., Huang, H., Nachtergaele, S., Dong, L., Hu, C., Qin, X., Tang, L., Wang, Y., Hong, G. M., Huang, H., Wang, X., Chen, P., Gurbuxani, S., Arnovitz, S., ... Chen, J. (2017). FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N6-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell*, 31(1), 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.017>
- Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., & Gregory, R. I. (2016). The m6A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Molecular Cell*, 62(3), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.021>
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
- Liu, J., Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X., Ma, H., Wang, F., Wang, X., Shen, B., Wang, Y., Feng, X., & He, C. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discovery*, 4(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0019-0>
- Liu, L., Wang, Y., Wu, J., Liu, J., Qin, Z., & Fan, H. (2020). N6-Methyladenosine: A Potential Breakthrough for Human Cancer. In *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (Vol. 19, pp. 804–813). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.013>
- Liu, N., & Pan, T. (2016). N6-methyladenosine–encoded epitranscriptomics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23, 98. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3162>
- Ma, J. Z., Yang, F., Zhou, C. C., Liu, F., Yuan, J. H., Wang, F., Wang, T. T., Xu, Q. G., Zhou, W. P., & Sun, S. H. (2017). METTL14 suppresses the metastatic

potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing. *Hepatology*, 65(2), 529–543. <https://doi.org/10.1002/hep.28885>

Maajani, K., Jalali, A., Alipour, S., Khodadost, M., Tohidinik, H. R., & Yazdani, K. (2019). The Global and Regional Survival Rate of Women With Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. In *Clinical Breast Cancer* (Vol. 19, Issue 3, pp. 165–177). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2019.01.006>

Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A. V, Deepak, P., Gross, S., Elemento, O., Debart, F., Kiledjian, M., & Samie, R. (2017). *Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability*. 541(7637), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature21022>.Reversible

Method of the Year 2016: Epitranscriptome analysis. (2016). *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4142>

MEXPRESS. (n.d.). Retrieved September 3, 2020, from <https://mexpress.be/>

Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2014). The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 313. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3785>

Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2017). Rethinking m 6 A Readers, Writers, and Erasers . *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), 319–342. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060758>

Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 149(7), 1635–1646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>

Morena, F., Argentati, C., Bazzucchi, M., Emiliani, C., & Martino, S. (2018). Above the epitranscriptome: RNA modifications and stem cell identity. In *Genes*. <https://doi.org/10.3390/genes9070329>

- Narayan, P., & Rottman, F. M. (1988). An in vitro system for accurate methylation of internal adenosine residues in messenger RNA. *Science*, 242(4882), 1159–1162. <https://doi.org/10.1126/science.3187541>
- NCI. (2018). *¿Qué es el cáncer? - National Cancer Institute*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- NIH. (2020). *Female Breast Cancer — Cancer Stat Facts*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>
- Niu, Y., Lin, Z., Wan, A., Chen, H., Liang, H., Sun, L., Wang, Y., Li, X., Xiong, X., Wei, B., Wu, X., & Wan, G. (2019). RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3. *Molecular Cancer*, 18(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1004-4>
- Niu, Zhao, X., Wu, Y. S., Li, M. M., Wang, X. J., & Yang, Y. G. (2013). N6-methyladenosine (m6A) in RNA: An Old Modification with A Novel Epigenetic Function. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* (Vol. 11, Issue 1, pp. 8–17). <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.12.002>
- Pan, Y., Ma, P., Liu, Y., Li, W., & Shu, Y. (2018). Multiple functions of m6A RNA methylation in cancer. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1–11). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0590-8>
- Panneerdoss, S., Eedunuri, V. K., Yadav, P., Timilsina, S., Rajamanickam, S., Viswanadhapalli, S., Abdelfattah, N., Onyeagucha, B. C., Cui, X., Lai, Z., Mohammad, T. A., Gupta, Y. K., Huang, T. H. M., Huang, Y., Chen, Y., & Rao, M. K. (2018). Cross-talk among writers, readers, and erasers of m6A regulates cancer growth and progression. *Science Advances*, 4(10), 8263. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar8263>
- Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). M6 A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>

- Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschlkov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W. J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y. S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X. M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W. P., Zhu, X. F., ... Yang, Y. G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, *24*(2), 177–189. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>
- Rhizobium, G. E. (2013). Complete Genome Sequence of the Sesbania Symbiont and Rice. *Nucleic Acids Research*, *1*(1256879), 13–14. <https://doi.org/10.1093/nar>
- Romano, G., Veneziano, D., Nigita, G., & Nana-Sinkam, S. P. (2018). RNA methylation in ncRNA: Classes, detection, and molecular associations. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 9, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00243>
- Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., & He, C. (2017). Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.045>
- Růžička, K., Zhang, M., Campilho, A., Bodi, Z., Kashif, M., Saleh, M., Eeckhout, D., El-Showk, S., Li, H., Zhong, S., Jaeger, G. De, Mongan, N. P., Hejátko, J., Helariutta, Y., & Fray, R. G. (2017). Identification of factors required for m6A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytologist*, *215*(1), 157–172. <https://doi.org/10.1111/nph.14586>
- Saletore, Y., Meyer, K., Korlach, J., Vilfan, I. D., Jaffrey, S., & Mason, C. E. (2012). *The birth of the Epitranscriptome: deciphering the function of RNA*

modifications. <http://genomebiology.com/2012/13/10/175>

Santaliz, L. E., Xie, X., Old, M., Teknos, T. N., & Pan, Q. (2014). Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. In *International Journal of Cancer* (Vol. 135, Issue 12, pp. 2741–2748). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ijc.28690>

Schwartz, S. (2016). Cracking the epitranscriptome. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.054502.115>

Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., Sanjana, N. E., Freinkman, E., Pacold, M. E., Satija, R., Mikkelsen, T. S., Hacohen, N., Zhang, F., Carr, S. A., Lander, E. S., & Regev, A. (2014). Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Reports*, 8(1), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>

Shahriyari, L., Abdel-Rahman, M., & Cebulla, C. (2019). BAP1 expression is prognostic in breast and uveal melanoma but not colon cancer and is highly positively correlated with RBM15B and USP19. *PLoS ONE*, 14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211507>

Sorci, M., Ianniello, Z., Cruciani, S., Larivera, S., Ginistrelli, L. C., Capuano, E., Marchioni, M., Fazi, F., & Fatica, A. (2018). METTL3 regulates WTAP protein homeostasis. *Cell Death & Disease*, 9(8), 796. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0843-z>

Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

- Subik, K., Lee, J. F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M. C., Bonfiglio, T., Hicks, D. G., & Tang, P. (2010). The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4(1), 35–41. <https://doi.org/10.1177/117822341000400004>
- Tan, D. S. P., Marchió, C., Jones, R. L., Savage, K., Smith, I. E., Dowsett, M., & Reis-Filho, J. S. (2008). Triple negative breast cancer: Molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111(1), 27–44. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9756-8>
- Tang, C., Klukovich, R., Peng, H., Wang, Z., Yu, T., Zhang, Y., & Zheng, H. (2017). *ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717794115>
- Thalhammer, A., Bencokova, Z., Poole, R., Loenarz, C., Adam, J., O'Flaherty, L., Schödel, J., Mole, D., Giaslakiotis, K., Schofield, C. J., Hammond, E. M., Ratcliffe, P. J., & Pollard, P. J. (2011). Human AlkB homologue 5 is a nuclear 2-oxoglutarate dependent oxygenase and a direct target of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *PLoS ONE*, 6(1), 16210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016210>
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. In *Virchows Archiv* (Vol. 465, Issue 1, pp. 1–14). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>
- Wang, H., Xu, B., & Shi, J. (2020). N6-methyladenosine METTL3 promotes the breast cancer progression via targeting Bcl-2. *Gene*, 722, 144076. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144076>
- Wang, T., Kong, S., Tao, M., & Ju, S. (2020). The potential role of RNA N6-methyladenosine in Cancer progression. In *Molecular Cancer* (Vol. 19, Issue 1).

BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01204-7>

Wang, Y., Li, Y., Toth, J. I., Petroski, M. D., Zhang, Z., & Zhao, J. C. (2014). N6 - methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 16(2), 191–198. <https://doi.org/10.1038/ncb2902>

Weigelt, B., Horlings, H. M., Kreike, B., Hayes, M. M., Hauptmann, M., Wessels, L. F. A., De Jong, D., Van De Vijver, M. J., Van't Veer, L. J., & Peterse, J. L. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *Journal of Pathology*, 216(2), 141–150. <https://doi.org/10.1002/path.2407>

Wen, J., Lv, R., Ma, H., Shen, H., He, C., Wang, J., Jiao, F., Liu, H., Yang, P., Tan, L., Lan, F., Shi, Y. G., He, C., Shi, Y., & Diao, J. (2018). Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m6A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular Cell*, 69(6), 1028-1038.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.015>

WHO. (2018). Breast cancer. WHO. <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>

Wishart, D. S. (2015). Is Cancer a Genetic Disease or a Metabolic Disease? In *EBioMedicine* (Vol. 2, Issue 6, pp. 478–479). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.05.022>

Wong, E., Chaudhry, S., & Rossi, M. (2016). Breast cancer | McMaster Pathophysiology Review. In *McMaster University*. <http://www.pathophys.org/breast-cancer/>

Wu, L., Wu, D., Ning, J., Liu, W., & Zhang, D. (2019). Changes of N6-methyladenosine modulators promote breast cancer progression. *BMC Cancer*, 19(1), 326. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5538-z>

Yang, Y., Hsu, P. J., Chen, Y. S., & Yang, Y. G. (2018). Dynamic transcriptomic m6A

decoration: Writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. In *Cell Research* (Vol. 28, Issue 6, pp. 616–624). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0040-8>

Yoon, K. J., Vissers, C., Ming, G. Li, & Song, H. (2018). Epigenetics and epitranscriptomics in temporal patterning of cortical neural progenitor competence. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 217, Issue 6, pp. 1901–1914). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802117>

Zeng, Y., Wang, S., Gao, S., Soares, F., Ahmed, M., Guo, H., Wang, M., Hua, J. T., Guan, J., Moran, M. F., Tsao, M. S., & He, H. H. (2018). Refined RIP-seq protocol for epitranscriptome analysis with low input materials. *PLOS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006092>

Zhang, C., Samanta, D., Lu, H., Bullen, J. W., Zhang, H., Chen, I., He, X., & Semenza, G. L. (2016a). Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(14), E2047–E2056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602883113>

Zhang, C., Samanta, D., Lu, H., Bullen, J. W., Zhang, H., Chen, I., He, X., & Semenza, G. L. (2016b). Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m6A-demethylation of NANOG mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(14), E2047–E2056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602883113>

Zhang, C., Zhi, W. I., Lu, H., Samanta, D., Chen, I., Gabrielson, E., & Semenza, G. L. (2016). Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217-and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(40), 64527–64542. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11743>

- Zhang, S., Zhao, B. S., Zhou, A., Lin, K., Zheng, S., Lu, Z., Chen, Y., Sulman, E. P., Xie, K., Böglér, O., Majumder, S., He, C., & Huang, S. (2017). m6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program. *Cancer Cell*, 31(4), 591-606.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.013>
- Zhao, B., Roundtree, I. A., & He, C. (2016). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 1, pp. 31–42). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.132>
- Zhao, Y., Shi, Y., Shen, H., & Xie, W. (2020). M6A-binding proteins: The emerging crucial performers in epigenetics. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00872-8>
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., Vågbø, C. B., Shi, Y., Wang, W. L., Song, S. H., Lu, Z., Bosmans, R. P. G., Dai, Q., Hao, Y. J., Yang, X., Zhao, W. M., Tong, W. M., Wang, X. J., Bogdan, F., ... He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>