



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la interacción proteica entre Musashi 2 y el Receptor de Estrógenos alfa en células de cáncer de mama.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José Emmanuel García Zamudio

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rocío Ángeles García Becerra
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alfonso León Del Río
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Greco Hernández Ramírez
Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México. Mayo, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca nacional (No.782608) para realizar mis estudios de posgrado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT IN208520 y IN208423, y al CONACYT CB-2015/256994 por los financiamientos otorgados para la realización del proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas por formarme como Maestro en Ciencias y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por ser la sede en donde se realizó el presente proyecto de investigación.

Al Programa de Investigación Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas, al Banco de Células, a la Unidad de Microscopía del Instituto y a sus responsables, el Biól. Salvador Ramírez Jiménez y el Dr. Miguel Tapia Rodríguez.

A los Doctores Alfonso León Del Río y Greco Hernández Ramírez por formar parte de mi comité tutor y orientarme en la realización de este trabajo.

A la Dra. Aliesha Araceli González Arenas y al Dr. Euclides Ávila Chávez por su colaboración en este proyecto.

A las Doctoras Silvia Anahí Valdés Rives y Marisol De La Fuente Granada por el apoyo metodológico y el procesamiento de las imágenes del microscopio confocal.

Al Biól. David Ordaz Rosado por su inigualable trabajo y apoyo.

A la LBT. Alitzin Pamela Cruz Cázares y Q.F.B. Karla Gisela Armendáriz Barrientos por ser un gran equipo de trabajo.

A la Dra. Rocío Ángeles García Becerra por aceptarme en su grupo de trabajo, por la enorme confianza y el excepcional apoyo moral e intelectual.

A los miembros del jurado de examen, por sus grandes aportes en la escritura de este trabajo.

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Cáncer	15
1.2 Epidemiología del cáncer	16
1.2.1 Estadísticas del cáncer de mama en México	18
1.3 Clasificación del cáncer de mama	18
1.3.1 Clasificación histológica	18
1.3.2 Clasificación molecular: subtipos intrínsecos	19
2. ANTECEDENTES	23
2.1 Receptor de Estrógenos	23
2.1.1 Estructura del Receptor de Estrógenos	23
2.1.2 Señalización del Receptor de Estrógenos alfa	25
2.2 Terapia hormonal	25
2.3 Receptor de Estrógenos alfa y Musashi 2	29
3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	32
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo General	34
5.2 Objetivos Particulares	34
6. MATERIAL Y MÉTODO	35
6.1 Reactivos	35
6.2 Líneas Celulares	35

6.3	Análisis bioinformático _____	36
6.4	Tratamientos _____	36
6.5	Extracción y cuantificación de proteínas _____	36
6.6	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida _____	37
6.7	Análisis de proteínas mediante Western blot _____	37
6.8	Descripción del vector para el silenciamiento de <i>MSI2</i> _____	38
6.9	Preparación de bacterias competentes _____	40
6.10	Transformación de bacterias competentes _____	40
6.11	Maxipreparación _____	41
6.12	Validación del ADN de los vectores lentivirales. _____	42
6.13	Transfección de células de cáncer de mama _____	42
6.14	Ensayo de ligación por proximidad _____	43
6.15	Análisis estadístico _____	44
7.	RESULTADOS _____	45
7.1	La expresión de <i>MSI2</i> aumenta en el subtipo de cáncer de mama RE positivo y su expresión génica correlaciona positivamente con el <i>ESR1</i> . _____	45
7.2	Las líneas celulares de cáncer de mama RE positivo tienen mayor expresión proteica de <i>MSI2</i> . _____	49
7.3	El Estradiol aumenta la expresión proteica de <i>MSI2</i> . _____	49
7.4	El silenciamiento de la expresión proteica de <i>MSI2</i> afecta la expresión de proteínas asociadas al subtipo luminal. _____	51
7.5	<i>MSI2</i> y el $RE\alpha$ interactúan físicamente en células de cáncer de mama. _____	55
7.6	El Estradiol, Fulvestrant y Tamoxifeno disminuyen las interacciones proteicas entre <i>MSI2</i> y el $RE\alpha$. _____	56
8.	DISCUSIÓN _____	60

9. CONCLUSIÓN	65
10. PERSPECTIVAS	66
11. REFERENCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sellos distintivos del cáncer.	16
Figura 2: Distribución de la incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo en 2020.	17
Figura 3: Clasificación molecular del cáncer de mama.....	22
Figura 4: Representación esquemática de la estructura del RE α y RE β	24
Figura 5: Efecto del Tamoxifeno y del Fulvestrant en la vía del Receptor de Estrógenos.	28
Figura 6: Representación esquemática de las isoformas de MSI2.....	30
Figura 7: Estructura general del Vector lentiviral pGFP-C-shRNALenti.....	39
Figura 8: La expresión génica de <i>MSI2</i> aumenta en tejido mamario cancerígeno comparado con el normal.....	46
Figura 9: La expresión de <i>MSI2</i> está asociada a los tumores RE positivo.	46
Figura 10: La expresión génica de <i>MSI2</i> está aumentada en el subtipo luminal B.	47
Figura 11: La expresión génica de <i>MSI2</i> correlaciona positivamente con la del <i>ESR1</i>	48
Figura 12: Las líneas celulares de cáncer de mama RE positivo expresan la proteína de MSI2.....	49
Figura 13: El estradiol aumenta la expresión proteica de MSI2.....	50
Figura 14: Validación de la identidad y purificación de los vectores virales shRNA MSI2.....	52
Figura 15: Incorporación del vector lentiviral shRNA MSI2 en células de cáncer de mama RE positivo.	53
Figura 16: El silenciamiento de la expresión proteica de MSI2 afecta la expresión del RE α , RE β y E-cadherina.	54
Figura 17: MSI2 y el RE α interactúan físicamente en células de cáncer de mama.	55
Figura 18: El Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant disminuyen las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α	57

Figura 19: Las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α se encuentran a nivel citoplasmático y nuclear y se modulan por los tratamientos..... **59**

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF-1	Función de activación 1
AF-2	Función de activación 2
ANOVA	Análisis de variancia
AP1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-seq	Secuenciación de ácidos ribonucleicos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
CMV	Citomegalovirus
CO₂	Dióxido de carbono
CoA	Coactivadores
CoR	Correpresores
DBD	Dominio de unión al ADN
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
eIF4G	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4 gamma
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
<i>ESR1</i>	ARN mensajero del Receptor de Estrógenos alfa
G0	Fase 0 del ciclo celular
GDC	Datos genómicos comunes
GFP	Proteína verde fluorescente
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IARC	Agencia Internacional para la investigación del Cáncer
IGF1R	Receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LBD	Dominio de unión al ligando
M	Molar
ml	Mililitros
mM	Milimolar

ms	Milisegundos
MSI2	Proteína de unión al ARN Musashi 2
MSI2	ARN mensajero de la proteína de unión al ARN Musashi 2
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABP	proteína de unión a poli-A
PBS	Tampón fosfato salino
PLA	Ensayo de Ligación por proximidad
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RBP	Proteínas de unión al ARN
RE	Receptor de Estrógenos
REα	Receptor de Estrógenos alfa
REβ	Receptor de Estrógenos beta
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RRM1	Motivo de reconocimiento a ARN 1
RRM2	Motivo de reconocimiento a ARN 1
SDS	Sulfato de dodecilo sódico
SERM	Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SFB	Suero fetal bovino
shRNA	ARN de horquilla corta
SP1	Proteína de especificidad 1
SV40	Virus vacuolado de simio 40
TCGA	Atlas del genoma del cáncer
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
μg	Microgramos
μl	Microlitros
$^{\circ}$C	Grados centígrados

El cáncer de mama es la neoplasia maligna que se diagnóstica con mayor frecuencia y es la principal causa de muerte por padecimientos oncológicos en mujeres. El Receptor de estrógenos α (RE α) juega un papel decisivo en la patogénesis, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad. Dependiendo del nivel de expresión de este receptor, los tumores mamarios pueden ser clasificados en RE negativo (HER2 positivo y triple negativo) y RE positivo (luminal A y B). Este último grupo cuenta con aproximadamente el 70% de los tumores mamarios. Un factor importante que contribuye al desarrollo del cáncer de mama son los estrógenos. La unión de estas hormonas al RE promueve el crecimiento y aumenta el potencial oncogénico de células de cáncer de mama con fenotipo RE positivo. En consecuencia, las terapias contra esta neoplasia tienen como objetivo reducir los niveles de estrógenos, bloquear la señalización a través del RE e inducir la desestabilización y la degradación del receptor. El Tamoxifeno y el Fulvestrant son las terapias antiestrogénicas más comunes y efectivas para pacientes con cáncer de mama RE positivo.

Por otra parte, la proteína de unión al RNA Musashi 2 (MSI2) está implicada en múltiples procesos biológicos relevantes como el inicio y la progresión del cáncer, la metástasis, el desarrollo de fenotipos cancerígenos más agresivos y la resistencia a la quimioterapia. De hecho, MSI2 tiene un papel regulatorio en diversas vías de señalización involucradas en la transición epitelio mesénquima. Específicamente, en el cáncer de mama, MSI2 se une a sitios específicos en el RNA del RE α , lo que conlleva a aumentar la estabilidad del receptor e incrementar la proliferación de las células.

Considerando lo anterior, en el presente trabajo decidimos determinar la interacción entre MSI2 y el RE α ; el efecto del estradiol y los anti-estrógenos en dicha interacción y en la expresión de MSI2 en células de cáncer de mama.

Nuestros análisis bioinformáticos usando bases de datos públicas demostraron que la expresión génica de *MSI2* aumentó significativamente en los tejidos tumorales primarios y metastásico comparado con el tejido mamario normal. Específicamente,

la expresión de *MSI2* está enriquecida en tumores RE positivo en contraste con los que carecen de este receptor. Además, de estos estudios se determinó que la expresión de *MSI2* correlaciona positivamente la expresión del gen del RE α (*ESR1*) en tumores luminales. Mediante análisis de Western blot se corroboró que la expresión de *MSI2* es mayor en líneas celulares de cáncer de mama RE positivo en comparación con las líneas que no expresan al receptor y que el Estradiol incrementa su expresión. Además, mediante el silenciamiento de la expresión de *MSI2*, se determinó que en ausencia de esta proteína se generó un abatimiento en la expresión proteica del RE α , RE β y E-cadherina. Por último, Con el uso de la técnica de ensayo de ligación por proximidad (PLA, por sus siglas en inglés) se determinó que *MSI2* y el RE α interactúan físicamente en células de cáncer de mama RE positivo. De manera interesante, esta interacción proteica disminuyó cuando las células son tratadas con Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant. Además, el Estradiol favoreció la ubicación nuclear del complejo proteico *MSI2* y RE α .

En conclusión, la expresión génica de *MSI2* esta enriquecida en tumores RE positivos y correlaciona con la expresión del *ESR1*. Las proteínas *MSI2* y el RE α interactúan directamente. El uso del Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant impactan en dicha interacción proteica. Además, el Estradiol incrementa los niveles proteicos de *MSI2* y la expresión del RE α , RE β y E-cadherina depende de la presencia de *MSI2*. Estos hallazgos contribuyen a la evidencia previa que denota a *MSI2* como un potente blanco terapéutico en el cáncer de mama con subtipo molecular RE positivo.

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy and is the leading cause of cancer death in women. The estrogen receptor α (ER α) plays a decisive role in this disease's pathogenesis, prognosis, and treatment. Depending on this receptor's expression level, mammary tumors can be classified as ER-negative (HER2-positive and triple-negative) and ER-positive (luminal A and B). This last group accounts for approximately 70% of mammary tumors. Estrogen is an essential factor that contributes to the development of breast cancer. The binding of this hormone to the ER promotes growth and increases the oncogenic potential of ER-positive breast cancer cells. Consequently, therapies against this neoplasm aim to reduce estrogen levels, block signaling through the ER, and induce receptor destabilization and degradation. Tamoxifen and Fulvestrant are the most common and effective anti-estrogen therapies for patients with ER-positive breast cancer.

On the other hand, the RNA-binding protein Musashi 2 (MSI2) is involved in multiple relevant biological processes, such as the initiation and progression of cancer, metastasis, the development of more aggressive cancer phenotypes, and resistance to chemotherapy. MSI2 has a regulatory role in various signaling pathways involved in epithelial-mesenchymal transition. Specifically, in breast cancer, MSI2 binds to specific sites on ER α RNA, leading to increased receptor stability and cell proliferation.

Considering the above, in the present work, we determined the interaction between MSI2 and ER α , the effect of Estradiol and anti-estrogens on said interaction, and the MSI2 expression in breast cancer cells.

Our bioinformatics analyses using public databases demonstrated that MSI2 gene expression was significantly increased in primary and metastatic tumor tissues compared to normal breast tissue. Specifically, MSI2 expression is enriched in ER-positive tumors in contrast to those lacking this receptor. Furthermore, these studies determined that MSI2 expression positively correlates with the ER α (ESR1) gene expression in luminal tumors. Western blot analysis confirmed that MSI2 expression is higher in ER-positive breast cancer cell lines than lines that do not express the receptor and that Estradiol increases its expression. In addition, by silencing the

expression of MSI2, it was determined that in the absence of this protein, a decrease in the protein expression of ER α , ER β , and E-cadherin was generated. Finally, the proximity ligation assay (PLA) technique determined that MSI2 and ER α physically interact in ER-positive breast cancer cells. Interestingly, this protein interaction was decreased when cells were treated with Estradiol, Tamoxifen, and Fulvestrant. In addition, Estradiol favored the nuclear location of the MSI2 and ER α protein complexes.

In conclusion, MSI2 gene expression is enriched in ER-positive tumors and correlates with ESR1 expression. The MSI2 and ER α proteins interact directly. Estradiol, Tamoxifen, and Fulvestrant have an impact on said protein interaction. Furthermore, Estradiol increases the protein levels of MSI2, and the expression of ER α , ER β , and E-cadherin depends on the presence of MSI2. These findings contribute to previous evidence indicating MSI2 as a potent therapeutic target in ER-positive breast cancer.

1.1 Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un conjunto de enfermedades que pueden tener su origen en cualquier órgano o tejido en donde células anormales crecen de manera descontrolada y adquieren la capacidad para invadir tejido circundante y propagarse a otros órganos distantes (1).

En el año 2000, Robert Weinberg y Douglas Hanahan propusieron que la mayoría de los cánceres compartían al menos seis características distintivas denominadas "Hallmarks" o sellos distintivos que permiten la transición de las células normales hacia estados tumorigénicos y altamente malignos (Figura 1). Estas características comprenden: proliferación sostenida, evasión de los mecanismos supresores de tumores, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, angiogénesis, invasión y metástasis (2).

Los sellos distintivos proporcionaron una base sólida para el entendimiento y el estudio de la biología del cáncer, estas seis características resistieron a la prueba del tiempo como componentes integrales de la maquinaria de los diferentes tipos de cáncer y por ello en 2011, los autores reafirmaron y nutrieron su propuesta inicial aportando dos nuevos sellos distintivos emergentes (reprogramación metabólica y evasión del sistema inmune) y dos características facilitadoras del desarrollo tumoral (inestabilidad genómica y el estado de inflamación promovido por el tumor) (3). Recientemente, la plasticidad fenotípica y la reprogramación epigenética se incluyeron como factores elementales del desarrollo del cáncer así como también se reconoce al microbioma y a las células senescentes como operadores principales en el desarrollo de los estados neoplásicos. En conjunto, estas características (Figura 1) nos permiten comprender y dimensionar los complejos mecanismos del desarrollo y progresión del cáncer para así aplicar este conocimiento a la terapéutica del cáncer (4).

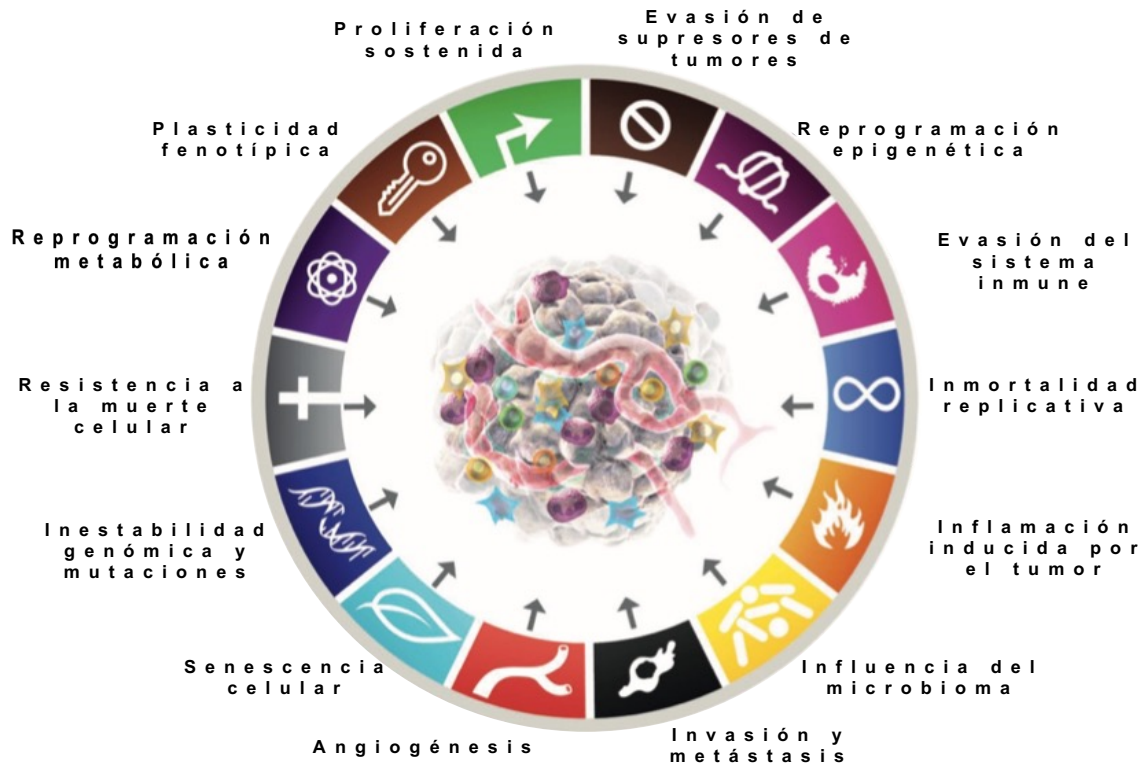


Figura 1: Sellos distintivos del cáncer. Se ilustran las características biológicas adquiridas por las células malignas que permiten la transición de las células normales hacia estados tumorigénicos y altamente malignos. Tomado y modificado de Hanahan, 2022.

1.2 Epidemiología del cáncer

El cáncer destaca como un problema de salud pública en el mundo, ya que se ubica como una de las principales causas de muerte y una enorme barrera para el incremento de la esperanza de vida global. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) estimó en su último reporte en 2020 que hasta ese año se diagnosticaron 19.3 millones de casos nuevos de cáncer y alrededor de 10 millones de decesos. En este sentido, el cáncer de mama se posicionó como la principal neoplasia maligna diagnosticada en todo el mundo, representando el 11.7% de todos los cánceres con un aproximado de 2.3 millones de casos nuevos. Con respecto a la mortalidad, el cáncer de mama se colocó en la quinta posición con un estimado cercano a las 685 mil muertes superado por el cáncer de pulmón que lidera hasta ahora las estadísticas mundiales (Figura 2) (5-7).

Debido a que en el 2020 se desató una pandemia generada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), virus responsable de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19), la información actual es limitada y se desconoce el alcance que tuvo la pandemia, pero dado a que la mayoría de la atención médica se centró en la atención de la COVID-19, los programas de detección y tratamiento del cáncer fueron pasados por alto, lo que se espera se traduzca en el aumento en la incidencia de cánceres en estadios avanzados y en los índices de mortalidad por la falta de atención médica (8-10).

Ambos Sexos

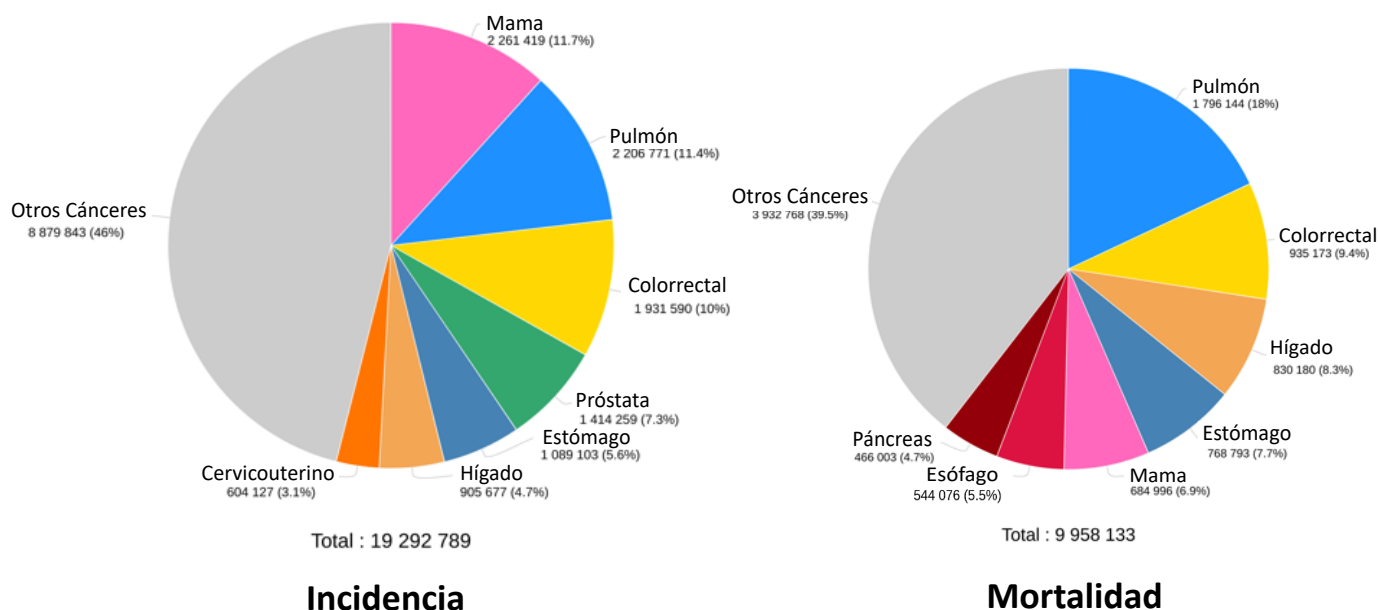


Figura 2: Distribución de la incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo en 2020. Se muestran el número de casos y muertes estimadas para ambos sexos a nivel mundial. Imagen tomada y modificada del Observatorio Global del Cáncer con datos del GLOBOCAN. Último acceso febrero 2023.

1.2.1 Estadísticas del cáncer de mama en México

En México el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que en el año 2019 se registraron 15, 286 nuevos casos de cáncer de mama en la población de 20 años y más; de los cuales sólo 167 casos corresponden a hombres y el resto a mujeres. Se ha observado que en las mujeres hay mayor presencia de tumores malignos conforme incrementa su edad, la tasa de incidencia entre las mujeres de 20 a 24 años se estima en 1.86 casos mientras que en las mujeres de 60 a 64 se incrementa hasta en 104.5 casos nuevos por cada 100 mil habitantes. Se reportaron 7 821 defunciones de mujeres por cáncer de mama, lo que representa el 17% de muertes por tumores malignos, colocando en primer lugar de mortalidad a este tipo de neoplasia maligna. En la clasificación por edad, la tasa de mortalidad en mujeres de 20 a 29 años es de 0.64 mientras que en mujeres mayores a 60 es de 49.08 muertes por cada 100 mil mujeres. De manera general, se puede observar que en México tanto la incidencia como la mortalidad se ven aumentadas conforme la edad de las mujeres; la mayoría de los casos detectados y las defunciones se concentran en mujeres mayores de 60 años (11).

1.3 Clasificación del cáncer de mama

Debido a que los cánceres originados en el tejido mamario son heterogéneos y muestran características variables, se han desarrollado diferentes esquemas de clasificación con la finalidad de proporcionar un diagnóstico certero y tratamiento adecuado. Los perfiles histológicos y los subtipos intrínsecos son los pilares de la caracterización (12, 13).

1.3.1 Clasificación histológica

A grandes rasgos el cáncer de mama puede clasificarse dependiendo del tejido en donde se inicie la neoplasia maligna. Las glándulas mamarias están conformadas por los lobulillos productores de leche y los conductos que conectan a estos lobulillos con el pezón. El cáncer ductal invasivo (originado en los conductos) posee una prevalencia del 70-80% mientras que el carcinoma lobulillar (inicia en los lobulillos) es el segundo más común con una prevalencia del 10% (12). El resto son

subtipos histológicos menos frecuentes, tales como el subtipo mucinoso, cribiforme, micropapilar, papilar, tubular, carcinomas medulares, metaplásicos y apocrinos (14, 15). Aún cuando la clasificación histológica se basa en una amplia gama de criterios, no permite reflejar completamente la heterogeneidad de los cánceres de mama (12) y es por ello por lo que a lo largo de los años se han buscado marcadores moleculares específicos para generar una clasificación más precisa y que integre la heterogeneidad tumoral.

1.3.2 Clasificación molecular: subtipos intrínsecos

A principios de la década de los 2000, Charles M. Perou y Therese Sørlie lograron la identificación y clasificación del cáncer de mama en 5 grupos (luminal A, luminal B, HER2 enriquecido, tumores de tipo basal-like y normal-like), esto dependiendo de la expresión génica global de múltiples tumores analizados. Los grupos identificados jerárquicamente fueron separados principalmente por la expresión de los receptores hormonales como el receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y de la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). De este modo, tenemos a los subtipos luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y los negativos a estos marcadores: cánceres de mama basal-like y normal-like (13, 16, 17). Más tarde, en el año 2013 se generó una nueva clasificación en la Conferencia Internacional de Cáncer de Mama de St. Gallen, en donde a partir del uso de marcadores moleculares como el RE, RP, HER2 y Ki67, se propusieron nuevos grupos: luminal A (RE/RP positivo, HER2 negativo y bajo Ki67), luminal B (RE/RP positivo, HER2 negativo y alto Ki67), luminal B HER2 positivo (RE/RP positivo, sobreexpresión de HER2 y alto Ki67), HER2 enriquecido (RE/RP negativo, sobreexpresión de HER2 y alto Ki67), triple negativo (RE/RP negativo, HER2 negativo y alto Ki67) y otros subtipos triple negativos con características específicas (18). Actualmente, esta clasificación (Figura 3) sigue en uso y con la ayuda de tecnologías de alto rendimiento han logrado proporcionar evidencia de la heterogeneidad de los cánceres de mama a nivel molecular (12).

1.3.2.1 Subtipos luminales

Los cánceres clasificados como luminales forman un espectro continuo de tumores cuyas células muestran perfiles genéticos similares a células epiteliales luminales normales de la mama; además, estos subgrupos se pueden dividir según la expresión de genes relacionados con la proliferación (13, 16).

El subtipo luminal A es el más común (60-70%) y se caracteriza por expresar niveles altos de RE, RP y bajos niveles de genes relacionados con la proliferación celular como Ki67. Los tumores clasificados como luminal A son comúnmente de bajo grado histológico por lo que poseen un excelente pronóstico (12, 13, 19, 20).

En el caso del subtipo luminal B es el segundo más común (10-20%), conserva alta expresión del RE, RP y nula expresión de genes asociados a HER2. Posee alta expresión del marcador de proliferación celular Ki67 y en general son tumores de alto grado histológico lo que se traduce en peor pronóstico que los tumores luminales A (20-22).

El subtipo luminal B HER2 es menos común (13-15%) y debido a que poseen la expresión de HER2, es el subgrupo luminal con mayor grado histológico y peor pronóstico. Mientras que las pacientes diagnosticadas con un tumor mamario luminal A pueden responder únicamente a la terapia hormonal, las pacientes con tumores luminal B suelen ser candidatas a quimioterapia y terapias dirigidas contra HER2 (20-22).

1.3.2.2 Subtipo HER2 enriquecido

El subtipo HER2 enriquecido es caracterizado por tener la sobre expresión de genes asociados con las vías de señalización de HER2. Este grupo se observa aproximadamente en el 15% de los pacientes y está asociado con mayor expresión de Ki67, grado histológico y peor pronóstico en comparación con los subtipos luminales. Los pacientes con tumores HER2 enriquecido pueden alcanzar una tasa de supervivencia a 10 en el 75% de los casos. Además, los pacientes son candidatos para recibir una terapia combinada de quimioterapéuticos y fármacos dirigidos contra HER2 como trastuzumab, pertuzumab o recientemente el uso de lapatinib y neratinib (16, 19, 20, 23).

1.3.2.3 Subtipo triple negativo

Los cánceres de mama triple negativos (CMTN) suelen ser de alto grado histológico caracterizados por la regulación al alza de genes específicos de células mamarias basales/mioepiteliales (16, 24). Los CMTN poseen nula expresión genética del RE, RP y HER2, acompañada de altos niveles de genes relacionados con la proliferación celular; por lo tanto, no son sensibles a la terapia endocrina o al tratamiento dirigido a HER2 (25). Estos tumores se caracterizan por generar enfermedad metastásica temprana y propensión a metástasis extraesquelético (26).

Ensayos de expresión génica han logrado identificar seis grupos moleculares que permiten subclasificar a los CMTN; estos son basal 1, basal 2, mesenquimatoso, troncal mesenquimatoso, inmunomodulador y luminal receptor de andrógenos (27). Sin embargo, debido al costo y las complejidades técnicas aún no existe un ensayo de diagnóstico establecido para la clasificación de estos cánceres en la práctica clínica. (12, 20). Aunado a esto, el CMTN representa al subtipo con peor pronóstico y puede presentar recaída dentro de los primeros 5 años posteriores al diagnóstico (28). Debido a la falta de blancos terapéuticos y la complejidad de este subtipo de cáncer de mama, las bases terapéuticas son la radioterapia, la mastectomía inespecífica y quimioterapia (29). Sin embargo, desde su aprobación, el uso de atezolizumab ha mostrado resultados positivos en la terapéutica contra el CMTN metastásico con alta expresión del ligando 1 de muerte programada (PD-L1). Así mismo, el pembrolizumab ha demostrado prometedores resultados en CMTN en estadios temprano y se busca su aprobación como una terapia adyuvante (30).

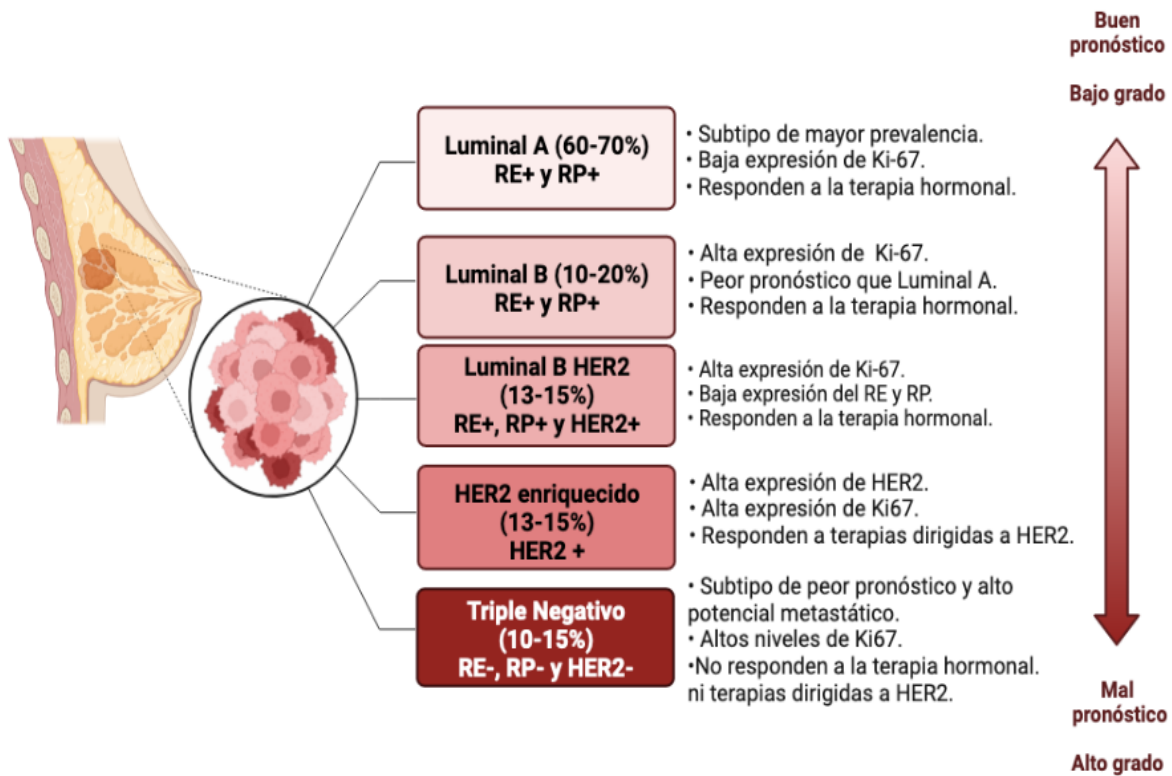


Figura 3: Clasificación molecular del cáncer de mama. El cáncer de mama se puede clasificar por la expresión de diferentes marcadores moleculares dando lugar a 5 grupos (luminal A, luminal B, luminal B HER2, HER2 enriquecido y triple negativo). Cada uno de estos subtipos cuentan con diferentes características que determinan el manejo terapéutico y reflejan la malignidad de los tumores.

2.1 Receptor de Estrógenos

En los tumores de mama positivos al RE, la señalización activa del receptor promueve la proliferación y; por lo tanto, es un objetivo farmacológico muy buscado y explotado. El RE pertenece a la clase de receptores hormonales nucleares, los cuales poseen la capacidad de unirse directamente al ADN, lo que les permite tener actividad transcripcional (31) participando en la regulación del desarrollo del sistema reproductivo femenino, mantenimiento de la masa ósea, también está involucrado en la protección del tejido cardiovascular y del sistema nervioso central (32, 33). Existen dos isoformas del RE (RE α y RE β), las cuales son codificadas por los genes *ESR1* y *ESR2* residentes en los cromosomas 6 y 14, respectivamente (34-36). Ambas isoformas participan en la regulación transcripcional de diferentes genes, pero solo el RE α se ha asociado con el inicio y la progresión del cáncer de mama regulando genes asociados con la supervivencia celular, proliferación y el crecimiento tumoral; por ejemplo, genes para el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (*IGF1R*), ciclina D1, factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*) y la proteína anti apoptótica BCL-2 (37-42). Por su parte, el papel del RE β en el cáncer de mama sigue siendo poco claro y controvertido (43), pero se cree que tiene propiedades anti proliferativas por lo que actúa como un antagonista de las funciones del RE α (39, 44).

2.1.1 Estructura del Receptor de Estrógenos

Ambos receptores tienen una arquitectura similar que se compone de seis dominios designados A-F (Figura 4) (45-47). Hacia el dominio N-terminal o A/B se encuentra la función de activación 1 (AF-1) encargada de la actividad transcripcional del receptor en ausencia de ligando (44, 48). El dominio C o dominio DBD (Dominio de unión al ADN, por sus siglas en inglés) está conformado por dos dedos de zinc que permiten la unión de los receptores con secuencias específicas en el ADN, este dominio presenta un alto grado de homología (97%) entre las dos isoformas (34, 49-

54). En la estructura del receptor también se encuentra una región bisagra (dominio D) que incluye una señal de localización nuclear (55, 56). De igual manera, existe un dominio de unión al ligando (dominio LBD, por sus siglas en inglés) que presenta un 59% de homología entre el RE α y el RE β (49, 50). Está conformado por una región de doce α hélices flexibles (H1-H12) que alberga la función de activación 2 (AF-2) responsable de la activación del receptor en presencia del ligando (57, 58). También, contiene una segunda señal de localización nuclear y un sitio de dimerización (59). Por último, en el C-terminal se encuentra el dominio F que modula tanto a AF-1 y AF-2, aunque su modulación no es necesaria para la activación transcripcional del receptor (44, 48, 58).

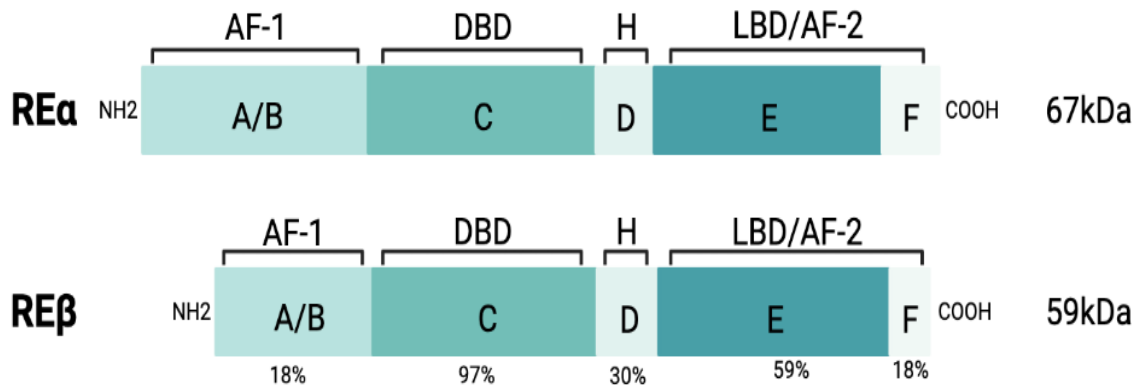


Figura 4: Representación esquemática de la estructura del RE α y RE β . En el dominio A/B se encuentra la función de activación 1 (AF-1). En el C se incluye el dominio de unión al ADN (DBD) y un sitio de dimerización. En el dominio D existe una señal de localización nuclear y una región bisagra (H). El dominio E/F presenta una segunda señal de localización nuclear, otro sitio de dimerización, el dominio de unión al ligando (LBD) y la función de activación 2 (AF2).

2.1.2 Señalización del Receptor de Estrógenos alfa

Existen tres principales estrógenos fisiológicos en las mujeres; Estrona, Estradiol (17β -estradiol) y el Estriol (60). El Estradiol es el estrógeno circulante dominante y es el responsable del crecimiento de muchos tumores mamarios (61). Cuando un estrógeno se une al RE α , el receptor sufre un cambio conformacional que resulta en la disociación de sus proteínas chaperonas y en su posterior homodimerización (44, 62). Además, la unión del Estradiol permite la activación del sitio AF-2 mediante cambios conformacionales en las α hélices (particularmente en la hélice H12) que revela el sitio de unión para los coactivadores (63, 64). El complejo (Estradiol-homodímero) se transloca al núcleo y se une a regiones específicas en el ADN denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE) que se encuentran en los promotores de genes regulados por el receptor. Por otro lado, mediante interacciones con la proteína activadora 1 (AP1) y con la proteína de especificidad 1 (SP1), el complejo (Estradiol-homodímero) puede regular la expresión de genes de regiones promotoras diferentes a ERE al interactuar con los sitios de unión de dichas proteínas (63, 64).

La completa regulación génica ocurre cuando el homodímero interactúa con los correguladores y se crea un complejo transcripcional en el ADN (65). Los correguladores influyen directamente en la expresión de los genes diana ya que pueden ser coactivadores o correpresores (66). Además de la vía de señalización mediada por el ligando, el RE α puede activarse por factores de crecimiento y proteínas cinasas que controlan el estado de fosforilación del RE α (67).

2.2 Terapia hormonal

El Tamoxifeno es considerado el tratamiento estándar de oro para cánceres de mama (68), desde su aprobación en 1977, ha sido utilizado en la práctica clínica y monopoliza la terapia anti estrogénica ya que actualmente se usa para el tratamiento de todas las etapas del cáncer de mama RE positivo en mujeres pre y post menopáusicas. Además, el Tamoxifeno es usado para el tratamiento del cáncer de mama masculino y para la prevención del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollar esta neoplasia maligna (69-73).

Inicialmente, el Tamoxifeno era considerado un antiestrogénico que reducía los efectos inducidos por los estrógenos al bloquear al RE α en los tejidos mamarios, pero más tarde se evidenció que el Tamoxifeno tenía una función agonista en otros órganos diferentes a la mama como el endometrio, hígado y huesos, lo que llevó a clasificar a esta y a otras moléculas como moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM, por sus siglas en inglés) (45, 74-78). Los estudios farmacológicos del Tamoxifeno sugieren que es metabolizado por diferentes enzimas del citocromo P450 (*CYP2D6* y *CYP3A4/3A5*) y da lugar a tres metabolitos activos: 4-hidroxitamoxifeno, N-desmetiltamoxifeno y 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno, también conocido como endoxifeno (79-81). De este modo, el Tamoxifeno es considerado un profármaco y su actividad anticancerígena es debida a su metabolito activo 4-hidroxitamoxifeno y su análogo desmetilado, endoxifeno (79, 81). El mecanismo de acción del Tamoxifeno es complejo, pero en resumen cuando el estrógeno se une al RE α permite que la H12 tape y selle al ligando dentro del LBD, lo que conduce a la apertura del sitio AF-2 y la unión del corregulador a través de motivos LXXLL. Por el contrario, cuando el Tamoxifeno se une al RE α , la cadena lateral del fármaco provoca un cambio conformacional entre las hélices 11 y 12 evitando que la H12 cubra al LBD. Este cambio permite que H12 alcance y obstruya el sitio de unión de los coactivadores en la región estática del sitio AF-2 mediante su propio motivo LXXML (82). Esto evita que las proteínas coactivadoras se unan y a su vez permite el reclutamiento de correpresores y la formación de un complejo transcripcional silenciador (83).

Se ha puntualizado que la expresión diferencial de los correguladores en el tipo de tejido, es una de las razones por las que el Tamoxifeno presenta actividades antagonistas en tejidos mamarios y agonistas en tejidos como el endometrio. Por ejemplo, se ha descrito que en el útero el coactivador (NCOA1, también conocido como SRC-1) altamente expresado es el responsable del efecto agonista del Tamoxifeno (84-86). Por otro lado, también se ha demostrado que la activación independiente de ligando mediada por el sitio AF-1, desempeña un papel importante en las acciones agonistas del Tamoxifeno en los tejidos endometriales (45). Aunque es cierto que el Tamoxifeno ha disminuido enormemente las tasas de mortalidad

por cáncer de mama en todo el mundo, el uso de este análogo está asociado con efectos secundarios como anomalías menstruales, fenómenos tromboembólicos y cáncer de útero (87, 88), por lo que generalmente se prescribe durante 5 años seguidos; sin embargo, hay estudios que demuestran que una terapia adyuvante de hasta 10 años es más beneficiosa para reducir la mortalidad y la recurrencia de la enfermedad (89).

Sin embargo, existe recurrencia de aproximadamente en el 30% de las pacientes con cáncer de mama temprano dentro de los 15 años posteriores al tratamiento con Tamoxifeno (90). Se ha detallado que existen factores genéticos que influyen en la variabilidad en la respuesta al Tamoxifeno como las variaciones en el gen *CYP2D6* (91, 92). Todas las enzimas en la vía metabólica del Tamoxifeno están codificadas por genes polimórficos, particularmente *CYP2D6* tiene más de 100 variantes distintas (93), por lo tanto, esta variabilidad genética da como resultado una enorme variación fenotípica que podría estar relacionada con la actividad metabólica y la efectividad del Tamoxifeno en las pacientes (94).

Debido a la resistencia a la terapia con Tamoxifeno que presentan algunos pacientes y que un gran porcentaje de estos cánceres continúan dependiendo de las vías de crecimiento mediadas por el RE; se condujo al descubrimiento de compuestos esteroideos con cadenas laterales largas con actividades antiestrogénicas en los tumores mamarios resistentes (95, 96). Particularmente, el Fulvestrant o es un análogo 7α -alquilsulfinilo del 17β -estradiol que inhibe de forma competitiva la unión del Estradiol al RE con una afinidad del 89% y superior a la del Tamoxifeno (2.5%), ambos en comparación con la del propio ligando. Este análogo es considerado el primer antagonista del RE con actividad antiestrogénica pura, debido a la falta de agonismo en todos los tejidos (97-103).

El Fulvestrant se une a los monómeros de los RE y evita su dimerización, lo cual impide la activación del receptor y bloquea su localización nuclear (104-106). Por último, el Fulvestrant unido al RE α genera un complejo inestable que promueve la degradación del receptor mediante la vía ubiquitina-proteasoma (107-112) (Figura 5).

Por lo tanto, el resultado global del Fulvestrant es un efecto antiestrogénico puro que bloquea la actividad de los genes regulados por los estrógenos asociados con la progresión, invasión, metástasis y angiogénesis en tumores mamarios (61, 100, 113-115).

Debido a los métodos de detección temprana, el cáncer de mama es diagnosticado en su mayoría en etapas tempranas. El régimen terapéutico implica, además de cirugía, terapia adyuvante. La terapia hormonal juega un papel importante; sin embargo, los pacientes pueden presentar resistencia *de novo* o adquirida durante el tratamiento y pueden generar una enfermedad más agresiva y metastásica (116) Por lo cual, el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos y métodos de detección temprana es imperativo.

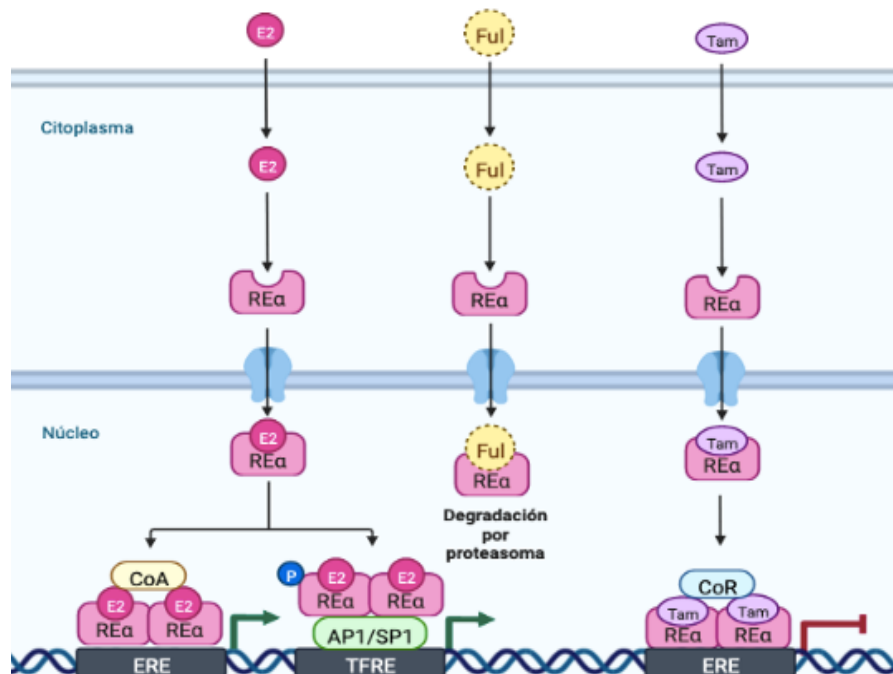


Figura 5: Efecto del Tamoxifeno y del Fulvestrant en la vía del Receptor de Estrógenos. El Estradiol (E2) se une con el REα lo que provoca su dimerización y translocación al núcleo, en donde a través de la interacción con coactivadores (CoA) se promueve la transcripción de genes diana mediante la unión directa a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) u otras regiones en los promotores como los elementos de respuesta a factores de transcripción (TFRE) mediado por la proteína de activación 1 (AP1) o la proteína de especificidad 1 (SP1). Por su parte, el Tamoxifeno (Tam) genera el reclutamiento de correpresores (CoR) que regulan a la baja la expresión de los genes diana, mientras que el Fulvestrant (Ful) impide la dimerización y la translocación al núcleo del REα, lo que promueve la degradación del receptor.

2.3 Receptor de Estrógenos alfa y Musashi 2

Actualmente se tiene gran conocimiento sobre el potencial oncológico del RE α , pero existen procesos regulatorios que aún no se entienden por completo. En este sentido, se ha descrito que la proteína de unión al ARN Musashi 2 (MSI2) posee efectos importantes sobre la expresión y regulación transcripcional del RE α (117). MSI2 pertenece a la familia de proteínas de unión al ARN (RBP), las cuales son un grupo de más de 1500 miembros (en humanos) (118) que tienen un papel fundamental en la estabilidad, empalme, eficiencia de traducción, localización celular, y en general, la coordinación del ciclo de vida de diferentes ARN mensajeros (119). El gen que codifica para la proteína de MSI2 se encuentra localizado en el cromosoma 17q22 (120) y produce 4 diferentes transcritos de ARN que resultan en 4 isoformas (MSI2a, MSI2b, MSI2c y MSI2d) (121). Todas las isoformas contienen una arquitectura molecular similar de regiones conservadas (Figura 6). Poseen dos motivos de reconocimiento de ARN (RRM1 y RRM2), los cuales se unen al extremo 3' UTR de los ARN diana. Se ha demostrado que RRM1 contribuye en mayor medida a la especificidad y energía de unión, mientras que RRM2 tiene un papel de apoyo (122). Estudios sugieren que la capacidad regulatoria de la traducción de MSI2 depende de cofactores adicionales debido a que la proteína no posee actividades enzimáticas, pero estos mecanismos aún no han sido bien descritos (123). Otro dominio, compartido entre las 4 isoformas, se encuentra ubicado en la mitad del C-terminal; esta región le permite a MSI2 interactuar con la proteína de unión a poli-A (PABP) interrumpiendo el inicio de la traducción al evitar que PABP interactúe con el factor de iniciación de la traducción eucariota 4 gamma (eIF4G) (124). En general, la evidencia sugiere que la regulación de la traducción de ARN mensajeros depende no solo de las isoformas de MSI2, sino de sus estados de fosforilación y el contexto celular (121, 125, 126).

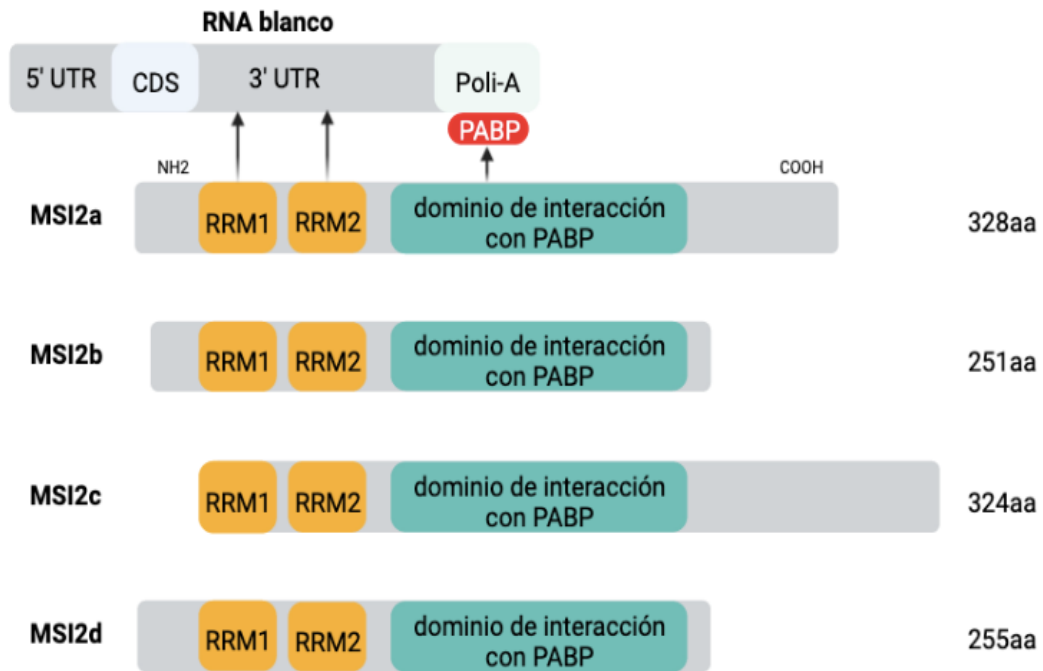


Figura 6: Representación esquemática de las isoformas de MSI2. Las 4 isoformas de MSI2 poseen una arquitectura similar de regiones altamente conservadas. Comparten dominios de reconocimiento al ARN (RRM1 y RRM2) que interactúan con sitios específicos de los ARNm diana. También comparten un dominio de interacción con la proteína de unión a la cola de Poli-A (PABP) relacionada con el control del inicio de la traducción de los mensajeros diana.

La expresión de MSI2 fue relacionada con el cáncer, cuando en 2010 se demostró que MSI2 juega un rol importante en la leucemia mielógena crónica al favorecer la progresión hacia una crisis blástica mediante la regulación negativa de la vía Numb (127). Posteriormente, se ha documentado que MSI2 se encuentra sobrepresado en una gran variedad de tumores, entre los que destacan los tumores en tejidos reproductivos como ovario (128, 129), cuello uterino (6, 130, 131) y mama (117, 121, 132, 133), entre otros.

Existe vasta evidencia que demuestra que MSI2 participa en la regulación de diferentes vías de señalización relacionadas con la transición epitelio mesénquima, lo cual relaciona a MSI2 con estadios avanzados en diversos tumores malignos (134). Sin embargo, se ha confirmado que la sobre expresión de MSI2 en el cáncer

de mama se encuentra relacionada con mayor supervivencia libre de recurrencia y supervivencia general en comparación con pacientes con bajos niveles de MSI2. En ese mismo estudio, se demostró también que MSI2 se une a sitios específicos del ARN mensajero del RE α aumentando su estabilidad; y que en células con MSI2 silenciado se generaba una caída en la expresión de este receptor y de genes estrógeno dependientes. Además, se demostró que MSI2 forma complejos proteicos con al menos 126 proteínas en células de cáncer de mama RE positivo; específicamente, ELAVL1 inmunoprecipitó con MSI2 (117).

ELAVL1 es una proteína de unión al ARN que participa en la estabilidad del factor de transcripción GATA3, un blanco del RE α , y se correlaciona con el pronóstico en pacientes con cáncer de mama, lo que indica que MSI2, además de su función como RBP, es capaz de interactuar con otras proteínas y así contribuir en la fisiopatología del cáncer de mama (135, 136).

Recientemente se demostró que el RE α interviene en el empalme alternativo de la proteína de unión al factor de transcripción X-box (XBP1); así como, la traducción del factor de iniciación de la traducción eucariota 4 gamma 2 (eIF4G2) y de la proteína antiapoptótica leucemia de células mieloides 1 (MCL1), implicados en la respuesta celular al estrés. Lo que indica que, al igual que MSI2, el RE α funciona como RBP (137).

Con respecto al RE α se ha demostrado que interactúa con alrededor de 150 proteínas entre las que se incluye a MSI2 (138). Cabe destacar que dichas interacciones fueron identificadas en complejos proteicos mediante análisis de inmunoprecipitación y espectrometría de masas. Sin embargo, la interacción directa entre MSI2 y RE α no ha sido estudiada.

3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En el cáncer de mama, el RE α es considerado como un indicador del estado epitelial y su expresión se asocia con buen pronóstico. Las terapias antiestrogénicas como el Tamoxifeno y el Fulvestrant se dirigen contra este receptor, estos antineoplásicos reducen significativamente la progresión de la enfermedad y su uso se relaciona con un impacto favorable en la supervivencia de las pacientes.

Por otra parte, MSI2 está sobreexpresado en tumores mamarios con fenotipo RE positivo e interactúa directamente con el ARN mensajero del RE α aumentando su estabilidad. El silenciamiento de MSI2 resulta en la disminución del RE α y la regulación de genes estrógeno dependientes. Algunos estudios sugieren que el RE α y MSI2 interactúan en complejos proteicos.

Sin embargo, la correlación en la expresión génica de ambas proteínas en tejidos neoplásicos, el papel de MSI2 en el mantenimiento del estado epitelial, su regulación por ligandos agonistas y antagonistas del RE, así como la posible interacción directa entre MSI2 y el RE α aún no ha sido completamente descrita. Por lo cual, profundizar en la relación entre MSI2 y el RE α ampliaría el conocimiento sobre los mecanismos y la importancia clínica de MSI2 en el cáncer de mama con fenotipo RE positivo.

Las proteínas MSI2 y el RE α interactúan físicamente en células de cáncer de mama RE positivo y dicha interacción se verá afectada por el uso del Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant.

5.1 Objetivo General

Determinar la interacción proteica entre *MSI2* y el $RE\alpha$ en células de cáncer de mama RE positivo.

5.2 Objetivos Particulares

- Comparar la expresión génica de *MSI2* en tejidos mamarios normales y tumorales.
- Comprobar la correlación entre la expresión génica de *MSI2* y del *ESR1* en tejidos mamarios cancerígenos.
- Caracterizar la expresión de *MSI2* en células de cáncer de mama con diferente subtipo molecular.
- Establecer el efecto del Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant en la expresión proteica de *MSI2* en células de cáncer de mama RE positivo.
- Generar líneas celulares estables con silenciamiento proteico de *MSI2* y evaluar el efecto de la ausencia de *MSI2* sobre la expresión del $RE\alpha$, $RE\beta$ y E-cadherina.
- Determinar la interacción física entre *MSI2* y $RE\alpha$ en la línea celular de cáncer de mama MCF7.
- Analizar el efecto del Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant en la interacción proteica de *MSI2* y el $RE\alpha$.

6.1 Reactivos

Los diferentes medios de cultivo, las enzimas de restricción EcoR1 (ER0271) y XbaI (ER0681), el anticuerpo secundario anti-ratón (62-6520, ZIMED) y la fluoresceína Faloidina (F432) se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EE. UU.). El suero bovino fetal (SFB) fue de HyClone Laboratories Inc. (Logan, UT, EE. UU.). De Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.) se obtuvieron: 17 β -Estradiol (E8865), Fulvestrant (14409), 4-Hidroxitamoxifeno (H6278), Sulforodamina B (230162), Duolink in Situ Red Starter Kit (DUO92101), Buffer de Carga de ADN 6X (11541575), marcador de peso molecular 1Kb (D0428) y el sustrato Inmobilon Western (WBKLS0500). De Santa cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, EE, UU.) se obtuvieron: Buffer RIPA (sc-24948A), Puromicina (sc-108071B), los anticuerpos monoclonales de ratón anti-MSI2 (sc-517212), anti-Actina (sc-47778), anti-RE α (sc-8002), anti-RE β (sc-6820) anti-E-cadherina (sc-8426) y el anticuerpo policlonal de conejo anti-RE α (sc-543). Para la extracción y purificación de los ADN plasmídicos se utilizó el kit Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System, obtenido de Promega (Madison, WI, EE, UU.). Por último, el reactivo para el ensayo de detección de proteínas (5000006) se obtuvo de Bio-Rad Laboratories Inc (Hercules, CA, EE. UU.) y los anticuerpos secundarios cabra anti-ratón (62-6520) y cabra anti-conejo (65-6120) se obtuvieron de Zymed.

6.2 Líneas Celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama con fenotipo luminal A (MCF7 y T-47D), luminal B (BT4T4 y MDA-MB-361), HER2 enriquecido (SKBR-3) y triple negativo (MDA-MB-231) se cultivaron siguiendo las indicaciones del proveedor ATCC (American Type Culture Collection) y fueron mantenidas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad.

6.3 Análisis bioinformático

Para determinar la expresión de MSI2 en diferentes tejidos mamarios, se obtuvo la información genómica a partir de la plataforma UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/>). De dicho portal se tomaron y procesaron los perfiles de expresión génica de datos públicos provenientes del TGCA (The Cancer Genome Atlas) y del GDC (Genomic Data Commons). La expresión génica de *MSI2* se analizó en tejidos normales, tejidos tumorales y metastásicos, su comparación en los subtipos moleculares de cáncer de mama y la correlación con el *ESR1*.

6.4 Tratamientos

Las células MCF7 fueron tratadas con 17β -Estradiol (1×10^{-9} M), 4-Hidroxitamoxifeno (1×10^{-7} M) y Fulvestrant (1×10^{-7} M) durante 45 minutos, 24 horas y 48 horas. Los diferentes tratamientos se realizaron en medio DMEM sin rojo de fenol suplementado al 10% con suero bovino fetal (SFB) tratado con Carbón y Dextrano. Al final de las incubaciones, las células se cosecharon, lavaron y procesaron según los diferentes análisis para los que se emplearon.

6.5 Extracción y cuantificación de proteínas

Las cajas de cultivo con las diferentes líneas celulares y con los distintos tratamientos se lavaron con 3 ml de PBS 1X (137 mM NaCl, KCl 2.7 mM, NaH_2PO_4 10 mM, KH_2PO_4 y 2 mM, pH 7,4); posteriormente, las células se rasparon en 1 ml de PBS 1X, la suspensión se colectó en tubos de 1.5 ml y se centrifugó por 2 minutos a 2,000 rpm. Una vez centrifugado, el botón celular fue lisado mediante agitación en Vórtex con 150 μl de buffer RIPA. Por último, el homogeneizado se centrifugó a 13,000 rpm en microcentrífuga y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 600 μl correctamente etiquetado. Los lisados celulares se mantuvieron en refrigeración a -90°C .

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford en placas de 96 pozos. Posteriormente, una curva estándar se llevó a cabo con albumina de suero bovino con concentraciones entre 0 hasta 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las lecturas

de absorbancia a 595 nm se analizaron en un lector de placas Epoch de la marca BioTek. Tanto la curva como las muestras se midieron por triplicado.

6.6 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

Para realizar la separación de las proteínas por su peso molecular, se utilizaron 50 µg de proteínas totales a las cuales se les añadió un volumen de buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 120 mM pH,6.8, SDS 4%, 20% al glicerol, 1% de β-mercaptoetanol y 0.02% de azul de bromofenol) a una concentración final de 1X. Las muestras se calentaron a 96°C durante 1 minuto y se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel separador (pH 8.8) se preparó con una mezcla de acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 1%, Tris 375 mM y 0.1% de SDS. El gel concentrador (pH 6.8) se preparó con una mezcla de acrilamida al 4%, bis- acrilamida al 0.1%, Tris 125 mM y SDS al 0.1%. Para lograr la polimerización, a ambos geles se añadieron persulfato de amonio al 0.05% y TEMED al 0.003%. La separación de proteínas se realizó con medio de electroforesis (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, 0.1% de SDS) pH 8.3 a un voltaje constante de 90 V durante 3 horas.

6.7 Análisis de proteínas mediante Western blot

Una vez separadas las proteínas electroforéticamente se transfirieron a membranas de PVDF previamente activadas durante 1 minuto en metanol. La transferencia se realizó en medio de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 190 mM y 20% de metanol) pH 8.3 a un voltaje constante de 35 V durante 16 horas. La transferencia de las proteínas se corroboró mediante la tinción de la membrana con una solución de rojo de Ponceau al 0.5% en ácido acético al 2% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, con la finalidad de reducir las interacciones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se lavaron y se bloquearon en leche descremada sin grasa al 5% en TBS-T (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 y 0.1% de Tween) durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 20 minutos con TBS-T. Posterior a los lavados, las membranas se incubaron en agitación con los diferentes anticuerpos primarios (MSI2 1:800, REα 1:200, REβ 1:200, E-cadherina 1:500 y β-actina 1:1000) durante toda la noche a

una temperatura de 4°C. Las membranas fueron lavadas en 3 ocasiones durante 10 minutos con TBS-T con la finalidad de retirar el excedente de anticuerpo y posteriormente se incubaron durante al menos 2 horas con el anticuerpo secundario anti-ratón a una proporción de 1:30,000. Una vez transcurrida la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 2 veces con TBS-T. Por último, las proteínas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia usando el reactivo Immobilon Western como sustrato y el equipo Gel Logic 100, kodak®.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas en el programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) con la finalidad de cuantificar la expresión de las diferentes proteínas midiendo su densidad óptica. Los resultados fueron normalizados usando la expresión constitutiva de la β -actina.

6.8 Descripción del vector para el silenciamiento de MSI2

El silenciamiento de la proteína MSI2 fue realizado con el vector lentiviral MSI2 Human shRNA Plasmid Kit (TL303128) de la marca Origene (Rockville, MD, EE. UU.). El kit contiene 4 viales con 5 μ g de diferentes constructos de shRNA codificados en vectores lentivirales y un vial con un constructo que tiene una región de shRNA no específica que funciona como control negativo (TLR30021). Cada constructo de shRNA se encuentra dirigido por el promotor U6 (polimerasa III) que controla la expresión en células de mamíferos. El producto de la expresión de los shRNAs genera un RNA interferente (RNAi) adecuado para el silenciamiento de genes de manera transitoria y a largo plazo. De igual manera contienen un marcador de resistencia a cloranfenicol para selección bacteriana, un marcador de selección para la transfección celular de Puromicina controlado por el promotor SV40 y una región que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) dirigido por el promotor CMV (Figura 9).

Los casetes que codifican para los diferentes shRNAs están conformados por las hebras sentido de 29 nucleótidos y anti-sentido del mismo número de nucleótidos. Las cuales se encuentran conectadas por una secuencia corta que da forma a la horquilla característica de este tipo de RNA. Estos constructos se encuentran

enmarcados en dos regiones de corte para las enzimas EcoR1 y Xba1 que son convenientes para su validación.

Las secuencias de los diferentes shRNA específicos son:

- TLR303128 A: GCCACGGCATAGCTGGACCTTTGATTGCA
- TLR303128 B: TTATCGGTGGACTGAGCTGGCAGACCTCA
- TLR303128 C: CCACCATGAGTTAGATTCCAAGACGATTG
- TLR303128 D: GACCTCACCAGATAGCCTTAGAGACTATT

Debido a que los 4 plásmidos codifican para diferentes RNA interferentes, todos (incluyendo el control negativo) se amplificaron en bacterias.

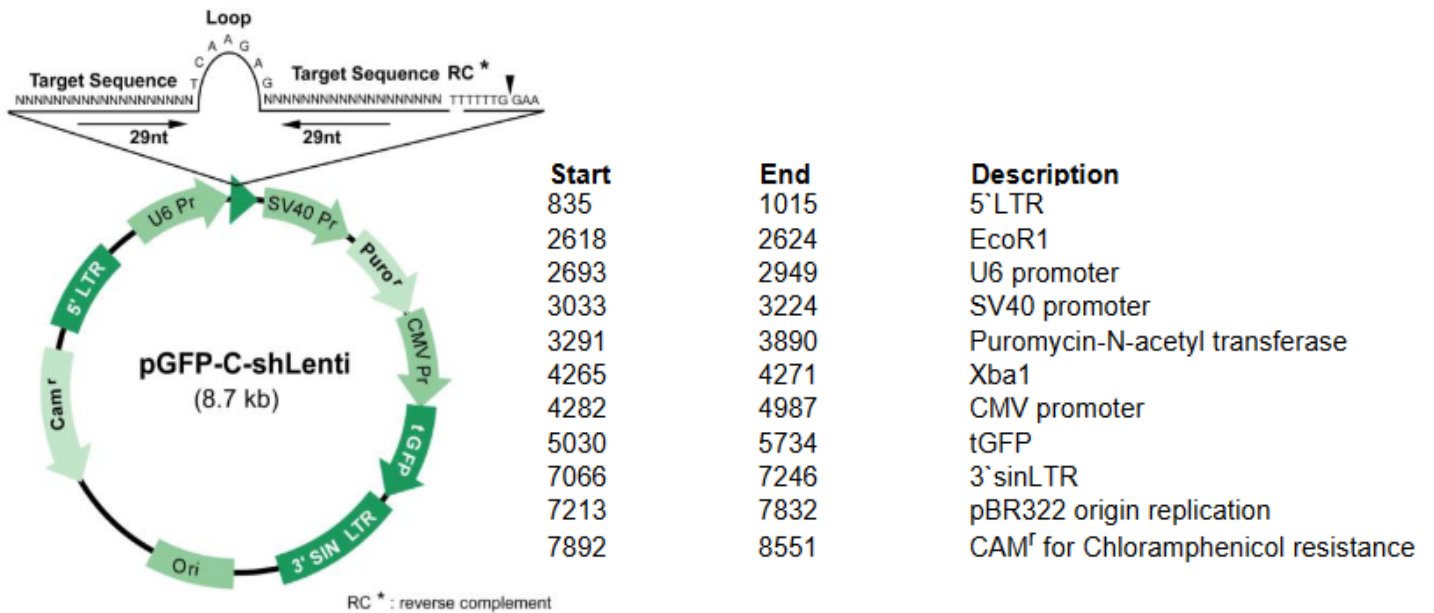


Figura 7: Estructura general del Vector lentiviral pGFP-C-shRNALenti.

6.9 Preparación de bacterias competentes

Una colonia única de bacterias *E. Coli* de la cepa DH5 α se inoculó en 250 ml de medio SOB (0.5% de extracto de levadura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl y 20 mM de MgSO₄) por 16 horas en agitación a 200 rpm a 29°C. Posteriormente, cuando el cultivo tuvo una densidad óptica (D.O.)_{590nm} menor o igual a 0.26, se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugado, el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en 80 ml de solución tampón CCMB80 (10 mM de KOAc pH 7.0, 80 mM de CaCl₂·2H₂O, 20 mM de MnCl₂·4H₂O, 10 mM de MgCl₂·6H₂O y 10% de glicerol) frío y a pH 6.4. Las células bacterianas se incubaron durante 20 minutos en hielo y a continuación se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Por último, el botón celular se resuspendió en 20 ml de solución tampón CCMB80 y se tomaron alícuotas de 1 ml que fueron colocadas en criotubos para posteriormente congelarlos a -70°C no sin antes dejarlas en un baño frío con etanol y hielo seco durante 1 hora.

6.10 Transformación de bacterias competentes

De una alícuota de bacterias competentes se tomaron 50 μ l y se colocaron en 5 tubos de 1.5 ml, uno para cada constructo. Posteriormente, 0.1 μ g de los ADNs de interés se adicionaron y se mezclaron suavemente para posteriormente dejarlos en hielo durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, las bacterias se incubaron durante 60 segundos en un baño de agua a 42°C. Una vez hecho este último paso, a cada tubo se le añadieron 250 μ l de medio SOC (0.5 % de extracto de levadura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 20 mM de MgSO₄ y Glucosa 20 mM) y se volvieron a incubar durante 60 minutos en agitación a 37°C. Consecutivamente, se sembraron 25 μ l de cada tubo en cajas Petri con medio SOB-agar (0.5 % de extracto de levadura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 20 mM de MgSO₄ y 1.5% de agar bacteriológico) con antibiótico (34 μ g/ml de cloranfenicol) para seleccionar las bacterias transformadas y se dejó incubar por 20 horas a 37°C. Posteriormente, una colonia bacteriana aislada se picó de cada caja y se transfirió a 250 ml de medio SOB con cloranfenicol. Estos nuevos cultivos se

incubaron a 37°C en agitación (300 rpm) con suficiente aireación por alrededor de 10 horas. Por último, alícuotas de 1 ml de cada cultivo se tomaron y se les añadieron 200 µl de glicerol al 1.5% para posteriormente congelarlas a -70°C.

6.11 Maxipreparación

Para la extracción y purificación de los ADNs se utilizó el kit Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System, de la marca Promega. De acuerdo con el protocolo del fabricante, los cultivos bacterianos de 250 ml transformados con los ADNs de interés se centrifugaron a 5,000 rpm durante 20 minutos; posteriormente, los sobrenadantes se desecharon y los botones celulares se resuspendieron en 15 ml de la solución de re-suspensión. Después, 15 ml de la solución de lisis se agregaron y se incubaron por 20 minutos. Inmediatamente, 15 ml de la solución neutralizadora se añadieron y se centrifugaron a 11,000 rpm por 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron usando papel Whatman y a los filtrados se les añadió 0.5 volúmenes de isopropanol. Se centrifugaron nuevamente a 11,000 rpm y al final, se resuspendieron los botones con 2 ml de buffer TE 1X (10 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM EDTA pH 8.0). Inmediatamente, 10 ml de resina se añadieron y los extractos se transfirieron a columnas conectadas a un sistema de vacío y transcurridos unos segundos, se adicionaron 25 ml de la solución de lavado. Se prosiguió a adicionar 5 ml de etanol al 80% y se dejó drenar en el sistema de vacío durante 1 minuto. Transcurrido el tiempo, las columnas se colocaron dentro de tubos de 50 ml y se centrifugaron a 2,500 rpm en un rotor con cubetas oscilantes. Las columnas se conectaron al sistema de vacío por 5 minutos y; subsecuentemente, las columnas fueron colocadas a nuevos tubos de 50 ml (contenidos en el kit) y se adicionaron 1.5 ml de agua libre de nucleasas precalentadas (65 - 70°C). Después de un minuto, los diferentes ADNs se eluyeron centrifugando los tubos de 50 ml (con las columnas dentro) a 2,500 rpm por 5 minutos en una centrifuga con rotor de cubetas oscilantes. Los eluidos obtenidos se filtraron y se colectaron en tubos de 1.5 ml mediante el uso de jeringas con extensión Luer-Lok conectadas a filtros Nalgene de 0.2 µm. Por último, estos tubos se centrifugaron a 11,000 rpm por 2 minutos para asegurarnos de eliminar todos los restos de resina del ADN e inmediatamente, los sobrenadantes

se transfirieron a nuevos tubos y los diferentes extractos de ADN ya purificados se reservaron a -20 °C para su posterior validación.

6.12 Validación del ADN de los vectores lentivirales.

Los distintos extractos de ADN se cuantificaron midiendo su absorbancia a 260 nm y la calidad se evaluó midiendo la relación 260/280 y 260/230. Ambas valoraciones se realizaron con el equipo NanoPhotometer N50. Posteriormente, una digestión enzimática doble se realizó durante 3 horas con EcoR1 y XbaI. Los ADNs digeridos fueron separados por electroforesis en gel de TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) y agarosa al 1%. Se tomó 1 µg de los ADNs digeridos y se les añadió buffer de carga con bromuro de etidio a una concentración de 5µg/ml. La separación electroforética del material genético se realizó a un voltaje constante de 90V durante 2 horas en buffer TBE. El peso de las bandas se determinó cualitativamente con un marcador de peso molecular de 1Kb.

6.13 Transfección de células de cáncer de mama

Las células T-47D fueron sembradas en cajas Petri de 100 mm y se mantuvieron en su medio específico, bajo las condiciones óptimas de cultivo. Cuando se tuvo una confluencia del 80%, las células fueron despegadas con tripsina y centrifugadas para obtener el pellet. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio Opti-MEM y contadas (son necesarias 6,000,000 de células). Posteriormente, las células fueron colocadas dentro de una cubeta (Gene pulser®) con 1 ml de Opti-MEM y 80 µg del ADN de interés. La cubeta fue colada dentro del equipo (GenePulser MXcell®) y se dio un pulso de electroporación a 350 V, 550 de capacitancia, 50 de resistencia y una duración de 50 ms.

Para analizar el éxito de la transfección, 72 horas después, las células fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia para corroborar la expresión de la proteína verde fluorescente que nos indica la correcta integración de ADN plasmídico. Posteriormente, las células fueron mantenidas durante cuatro semanas en medio DMEM con 0.2 µg/ml de Puromicina (antibiótico de selección).

6.14 Ensayo de ligación por proximidad

Para determinar la interacción proteica entre MSI2 y el RE α se usó la técnica de ensayo de ligación por proximidad (PLA, por sus siglas en inglés), la cual permite el análisis de interacciones proteína-proteína de manera *in situ* a distancias menores de 40 nm. El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, en cámaras de 16 pozos se sembraron 10,000 células (178599, Nunc Lab-Teck, Thermo Scientific) en medio DMEM con suero fetal bovino al 10% durante 24 horas y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Posteriormente, las células se trataron durante 45 minutos con Etanol (0.01%), Estradiol (1x10⁻⁹ M) Tamoxifeno (1x10⁻⁷ M) y Fulvestrant (1x10⁻⁷ M). Estos tratamientos fueron preparados en medio DMEM sin rojo fenol y con suero fetal bovino al 10% tratado con carbón y dextrano. Posteriormente, las células se lavaron dos veces durante 5 minutos con PBS frío, se fijaron durante 20 minutos con PBS/ Paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% durante 10 minutos. En seguida, las células se lavaron 3 veces por 5 minutos con TBS-T al 0.05% e inmediatamente se bloquearon con 40 μ l de solución de bloqueo (Duolink Blocking Solution (1X), (DUO82007) durante 1 hora a 37 °C en cámara de humedad y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios: monoclonal de ratón contra MSI2 1:100 monoclonal de conejo contra RE α 1:100 previamente diluidos en Duolink Antibody Diluent (1X), (DUO82008). Para la detección de los anticuerpos primarios, las células fueron lavadas 2 veces por 5 minutos con la solución de lavado A (Duolink In Situ Wash Buffers, Fluorescence, DUO82049) y posteriormente incubadas durante 1 hora a 37 °C con las sondas de PLA contra conejo (Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS, DUO92002) y ratón (Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS, DUO92004) en una dilución 1:5 en la solución de dilución de anticuerpos.

Después del tiempo de incubación con las sondas de PLA, las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos con la solución de lavado (A) y a partir de este punto, se utilizaron los diferentes reactivos que se incluyen en el kit con el nombre de Duolink In Situ Detection Reagents Red, (DUO92008). Las células se incubaron durante 45

minutos a 37°C con la solución de ligación (DUO82009) diluida 1:5 en agua inyectable. Esta solución contiene a los oligonucleótidos de conexión que hibridan con las sondas de PLA y a todos los componentes necesarios para ligación, con la excepción de la enzima (ADN ligasa, DUO82029), la cual es añadida a la solución de ligación a una concentración final del 1:40. Seguido del tiempo de ligación, las células fueron lavadas 2 veces durante 2 minutos con la solución de lavado (A) e incubadas en oscuridad durante 2 horas a 37°C en la solución de amplificación (DUO82011). Esta solución contiene todos los componentes necesarios para amplificar el ADN circular formado en el paso anterior y contiene también a las sondas de detección que, en este kit, son oligonucleótidos acoplados al fluorocromo Rojo Texas. Al igual que la solución de ligación, se debe diluir 1:5 en agua inyectable y adicionar la ADN Polimerasa (DUO82030) 1:80. En este mismo punto, se añadieron fluoresceína Faloidina y solución Hoechst en concentraciones finales de 1:250 y 1:100, respectivamente. Por último, las células fueron lavadas en dos ocasiones con la solución de lavado (B) y posteriormente se cubrieron con el medio de montaje Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI, (DUO82040) y un cubreobjetos. Las imágenes obtenidas con microscopía confocal (Nikon A1R+ STORM) y las señales positivas para PLA se procesaron con el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Para cada condición experimental, se realizaron 2 experimentos independientes y se tomaron a consideración al menos 100 núcleos.

6.15 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron y graficaron usando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Software, CA, EE. UU.). Para los estudios bioinformáticos se realizaron pruebas estadísticas como T de Student, Correlación de Pearson, análisis de la varianza (ANOVA) y para los grupos comparables una prueba de Tukey-Kramer. Estas últimas dos pruebas también fueron aplicadas para los análisis de expresión y cuantificación de las interacciones proteicas. Valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.1 La expresión de *MSI2* aumenta en el subtipo de cáncer de mama RE positivo y su expresión génica correlaciona positivamente con el *ESR1*.

Con el propósito de evaluar la relación entre la expresión génica de *MSI2* y el *ESR1* se usó la plataforma UCSC Xena de la Universidad de Santa Cruz en California. De dicha plataforma se obtuvieron y procesaron los datos genómicos de cáncer de mama de la cohorte TCGA (The Cancer Genome Atlas) y de la cohorte GDC (Genomic Data Commons). Los perfiles de expresión génica de ambas cohortes fueron determinados por secuenciación de ARN Illumina HiSeq.

Los datos provenientes de las cohortes son en su mayoría de mujeres blancas no hispanas con un rango de edad de entre 26 a 90 años y con diagnóstico de cáncer de mama ductal o lobulillar. Una vez adquirida esta información, la expresión de *MSI2* se analizó en un total de 1, 218 muestras de la cohorte TCGA que correspondían a tejido sólido normal (n=117), tejido tumoral primario (n=1, 097) y tejido metastásico (n=7). Se realizó un análisis estadístico y se determinó que *MSI2* tiene mayor expresión en los tejidos de tumores primarios y metastásicos en comparación con los de tejidos normales (Figura 8). De igual forma, la expresión de *MSI2* se analizó en 780 muestras clasificados como RE negativo (n=179) y RE positivo (n=601). El análisis comparativo entre los tumores concluyó que *MSI2* tiene significativamente mayor expresión en aquellos tejidos de cáncer de mama que expresan al RE α (Figura 9).

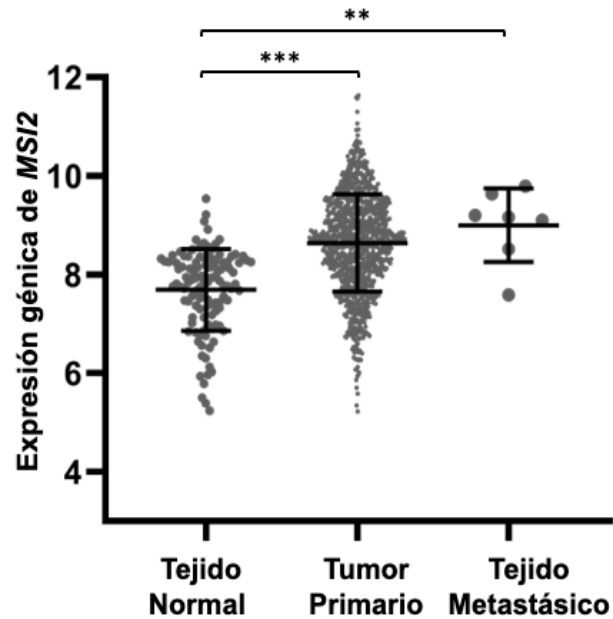


Figura 8: La expresión génica de MSI2 aumenta en tejido mamario cancerígeno comparado con el normal. Gráfico comparativo de la expresión génica (ARN-seq) de MSI2 en tejido sólido normal ($n=114$), proveniente de tumor primario ($n=1097$) y metastásico ($n=7$). Los datos fueron obtenidos de la plataforma UCSC Xena de la cohorte TCGA. Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey-Kramer. ** $p \leq 0.001$ y *** $p \leq 0.0001$.

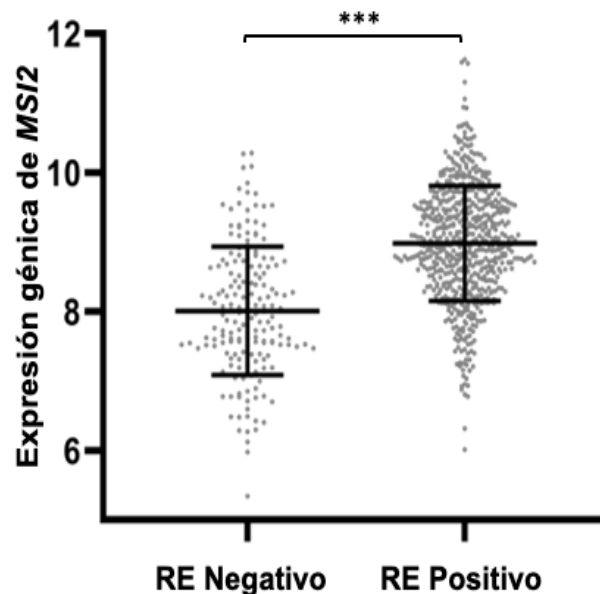


Figura 9: La expresión de MSI2 está asociada a los tumores RE positivo. Gráfico comparativo de la expresión génica (ARN-seq) de MSI2 en muestras de tumores clasificados como RE negativo ($n=179$) y RE positivo ($n=601$). Los datos fueron obtenidos de la plataforma UCSC Xena provenientes de la cohorte TCGA. Para el análisis estadístico se realizó una T de Student. *** $p \leq 0.0001$.

Consecutivamente, la expresión de *MSI2* se analizó en los diferentes subtipos moleculares del cáncer de mama en un total de 522 muestras. CMTN normal (=8) y basal (n=98), HER2 enriquecido (n=58) y RE positivo luminal A (n=231) y luminal B (n=127). Empleando los datos del TCGA se comprobó que *MSI2* posee mayor expresión en los tumores de cáncer de mama con expresión del RE, particularmente en el subtipo luminal B (Figura 10) y la menor expresión se observó en los tejidos de CMTN tipo normal y basal.

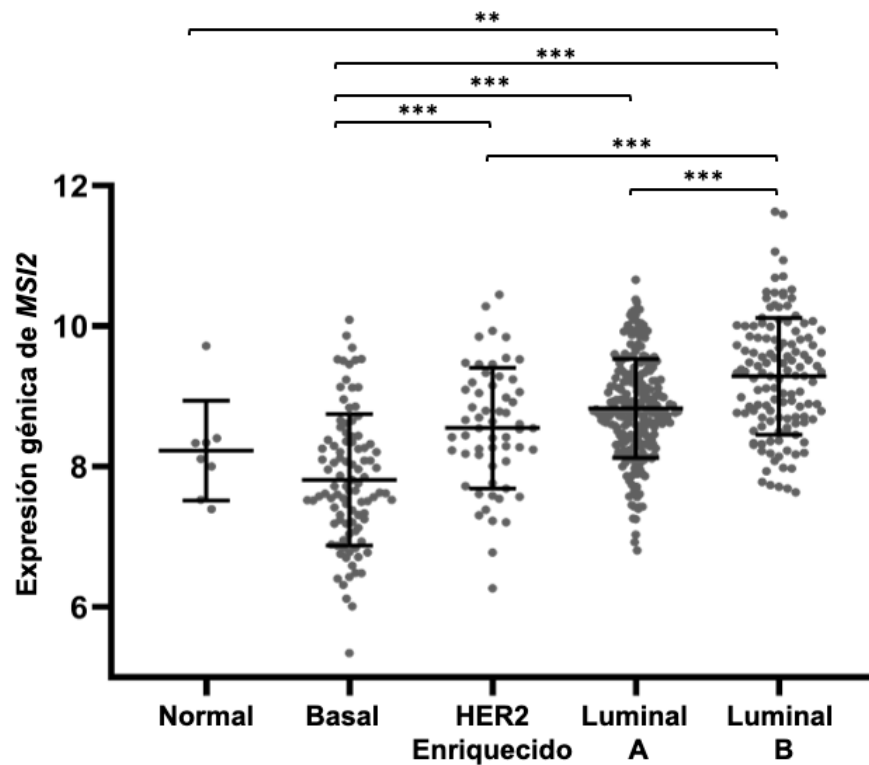


Figura 10: La expresión génica de *MSI2* está aumentada en el subtipo luminal B. Gráfico comparativo de la expresión génica (ARN-seq) de *MSI2* en tejidos clasificados como cáncer de mama triple negativo tipo normal (n=8) y tipo Basal (n=98), HER2 enriquecido (n=58), luminal A (n=231) y luminal B (n=127). Los datos fueron obtenidos de la plataforma UCSC Xena provenientes de la cohorte TCGA. Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba Tukey-Kramer. ** $p \leq 0.001$ y *** $p \leq 0.0001$.

Considerando la alta expresión de *MSI2* en los subtipos luminales, evaluamos la posible correlación en la expresión génica de *MSI2* y el *ESR1* utilizando los datos provenientes de la cohorte TCGA (n=358) (Figura 11 A) y de la cohorte GDC (n=42) (Figura 11 B). De los datos obtenidos fueron considerados solo aquellos provenientes de tejidos clasificados como cáncer de mama luminal A y luminal B. El análisis mostró en ambas cohortes procesadas por separado, que existe una correlación positiva entre la expresión génica de *MSI2* y el *ESR1*.

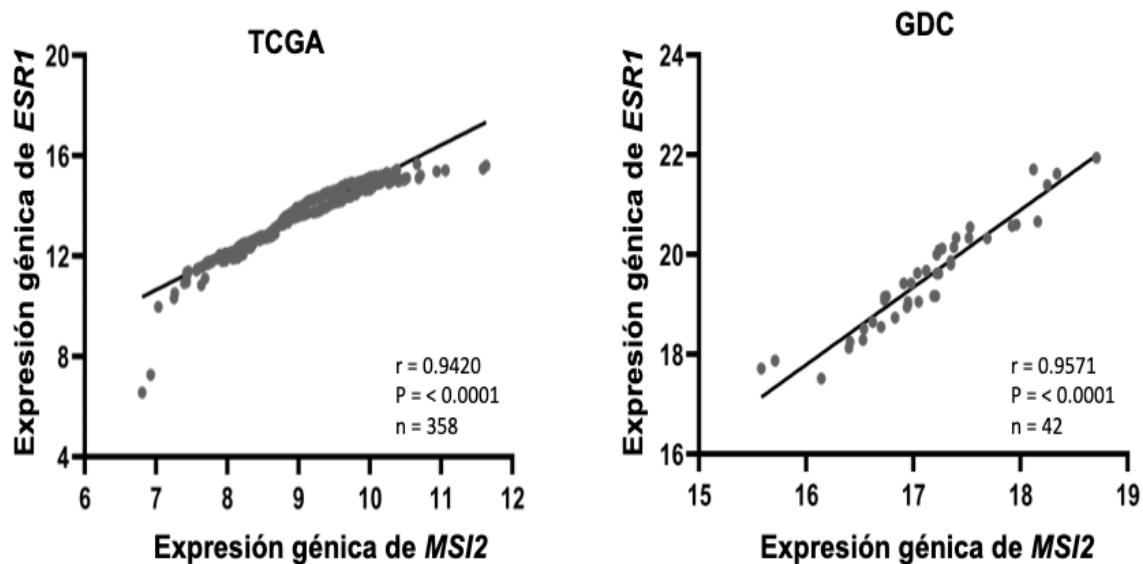


Figura 11: La expresión génica de *MSI2* correlaciona positivamente con la del *ESR1*. Los gráficos de dispersión muestran la correlación positiva entre la expresión génica (ARN-seq) de *MSI2* y el *ESR1*. Los datos graficados corresponden a muestras clasificadas como cáncer de mama luminal A y luminal B que forman parte de la colección de la plataforma UCSC Xena. El gráfico (A) corresponde a la cohorte TCGA (n=358), mientras que el (B) a los datos de la cohorte GDC (n=42). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de correlación de Pearson.

7.2 Las líneas celulares de cáncer de mama RE positivo tienen mayor expresión proteica de MSI2.

Partiendo de un panel de líneas celulares de cáncer de mama con fenotipo luminal A (MCF y T-47D), luminal B (BT-474 y MDA-MB-361), HER2 positivo (SKBR3) y triple negativo (MDA-MB-231) se realizó la extracción de proteínas y mediante Western blot se determinó la expresión de MSI2 y RE α . Los resultados muestran que las células clasificadas con fenotipo luminal A y luminal B expresaron la proteína de MSI2. En contraste, las células HER2 positivo y triple negativo no mostraron la presencia de la proteína (Figura 12). Adicionalmente, la expresión proteica del RE α se corroboró en las células luminales, la cual coincide con la de MSI2.

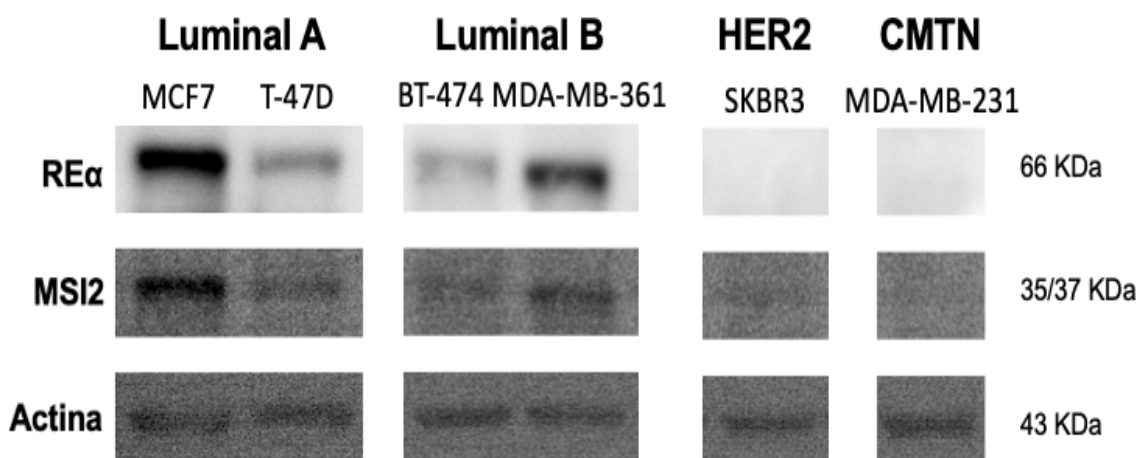


Figura 12: Las líneas celulares de cáncer de mama RE positivo expresan la proteína de MSI2. Imagen representativa de la expresión proteica del RE α (66 KDa) y MSI2 (35/37 KDa) en un panel de líneas celulares de cáncer de mama con subtipo luminal A (MCF7 y T-47D), luminal B (BT-474 y MDA-MB-361), HER2 positivo (SKBR3) y triple negativo (MDA-MB-231). La proteína β -actina (43 KDa) se utilizó como control de carga (50 μ g) y se realizaron 3 experimentos independientes.

7.3 El Estradiol aumenta la expresión proteica de MSI2.

Una vez que se determinó que MSI2 se expresa en la línea celular MCF7 se decidió determinar si la expresión proteica de MSI2 dependía de la vía de señalización del RE α ; por lo que, las células fueron sincronizadas en G0 mediante ayuno de suero y posteriormente tratadas en ausencia (control), o presencia de Etanol como vehículo (0.01%), Estradiol (1×10^{-9} M), Tamoxifeno (1×10^{-7} M) y Fulvestrant (1×10^{-7} M)

durante 48 horas. Mediante la técnica de Western blot y posterior análisis densitométrico, se determinó que la expresión proteica de MSI2 aumentó significativamente cuando las células fueron estimuladas con Estradiol en comparación con el control y con el vehículo. Los tratamientos con Tamoxifeno y Fulvestrant no mostraron efecto en la expresión de MSI2 (Figura 13).

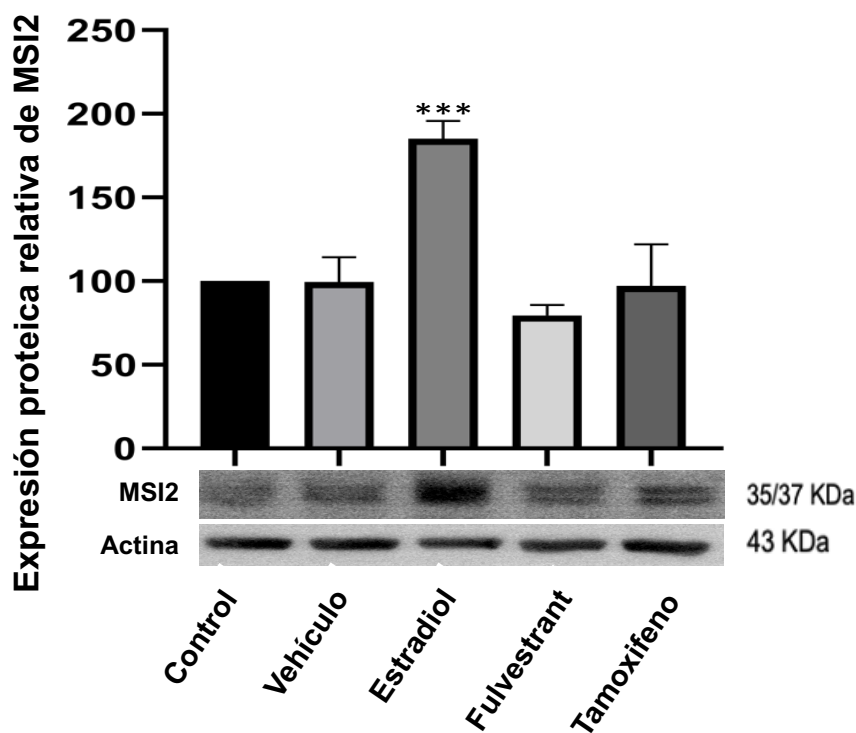


Figura 13: El estradiol aumenta la expresión proteica de MSI2. En la parte superior se muestra un gráfico comparativo del contenido proteico relativo de MSI2 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 con diferentes tratamientos; y en la parte inferior una imagen representativa de los Western blot. Las células fueron tratadas durante 48 horas en ausencia (control) o presencia de Etanol (0.01%) como vehículo, Estradiol (1×10^{-9} M), Tamoxifeno (1×10^{-7} M) y Fulvestrant (1×10^{-7} M). Los experimentos fueron realizados por triplicados y se usó la proteína β -actina como control de carga (50 μ g). El análisis estadístico corresponde a una prueba ANOVA de una vía y un post hoc de Tukey-Kramer. *** = $p < 0.0001$ vs control y vehículo. La comparación entre los grupos experimentales se realizó tomando al grupo control como el 100% del contenido proteico.

7.4 El silenciamiento de la expresión proteica de MSI2 afecta la expresión de proteínas asociadas al subtipo luminal.

Para el silenciamiento de la expresión de MSI2 se usaron vectores lentivirales que contenían una región de shRNA con la secuencia específica para el ARNm de MSI2. Se realizó la reconstitución de cuatro constructos con la secuencia específica contra MSI2 (TLR303128 A-D) y un constructo que contiene una secuencia de unión no específica que funciona como control negativo (TLR3001). Los constructos fueron clonados en bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α , para posteriormente extraerlos y purificarlos. Para validar la identidad y correcta purificación, los diferentes vectores fueron digeridos con enzimas de restricción (EcoRI y XbaI) y consecutivamente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. De este modo se pudo observar que tras el corte enzimático se generaron dos bandas (observables en todos los carriles del gel); la primera corresponde a la fracción pesada del ADN que se encuentra entre las 6200 y 7000 pb, y la segunda localizada entre las 1500 y 2000 pb. Con base en el mapa del vector (Figura 7), se determinó que esta última banda corresponde a la zona de corte de las enzimas EcoRI y XbaI debido a que dicha región de digestión da como resultado una banda de alrededor de 1700pb y que corresponde a la región donde se encuentra codificado el shRNA (Figura 14).

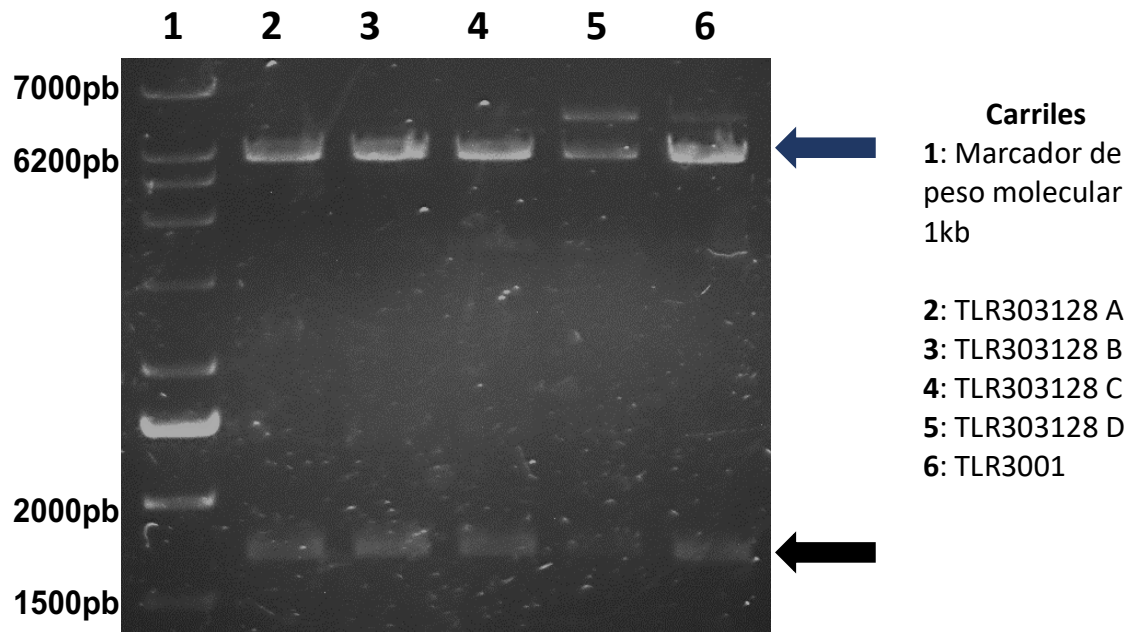


Figura 14: Validación de la identidad y purificación de los vectores virales shRNA MSI2. Las muestras de ADN fueron incubadas durante 2 horas con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. Los fragmentos obtenidos de la digestión enzimática fueron separados por su tamaño en un gel de TBE con agarosa al 1% y teñidas con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). En todos los carriles (2-6) se observan dos importantes bandas: la primera corresponde a la fracción pesada del ADN que se encuentra entre las 6200 y 7000 pb (señalada con una flecha color azul), y una segunda banda con tamaño aproximado a las 2000 pb (señalada con una flecha color negro). La última banda corresponde al fragmento de ADN donde se encuentra la secuencia que codifica al shRNA específico para MSI2 o en el caso del constructo E (TLR3001), una secuencia de unión no específica.

Una vez que se obtuvieron y se validaron los diferentes constructos, se continuó con la transfección de líneas celulares de cáncer de mama con los vectores mediante el método de electroporación. Las células MCF7 y T-47D fueron transfectadas con los constructos TLR303128 C y TLR3001 (control negativo) que a partir de este momento se renombraron como shRNA MSI2 y shRNA C-, respectivamente. Para determinar la eficacia de la transfección, las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia 48 horas después de ser electroporadas con los constructos shRNA MSI2 y shRNA C-. Debido a que los constructos poseen una región codificante para la proteína verde fluorescente (GFP), se logró observar un gran porcentaje de células fluorescentes en la línea celular T-47D, lo cual confirmó la introducción del constructo en las células. En

contraste con las células MCF7, donde el porcentaje de transfección fue considerablemente menor. Por lo cual, las células T-47D se crecieron durante cuatro semanas en presencia Puromicina (0.2 $\mu\text{g/ml}$). Transcurrido el tiempo, las células se volvieron a observar con el fin de corroborar la correcta selección mediante el uso del antibiótico. De este modo, se validó la generación de células T-47D con una transfección estable de los constructos shRNA MSI2 y shRNA C- (Figura 15).

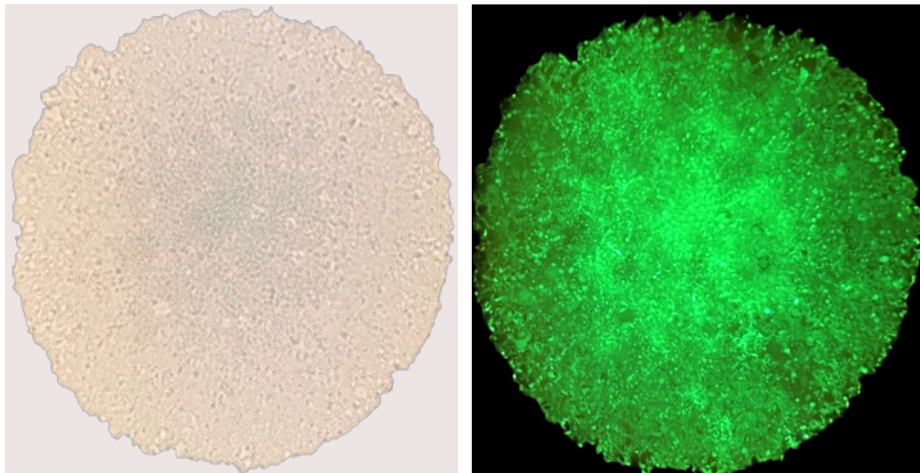


Figura 15: Incorporación del vector lentiviral shRNA MSI2 en células de cáncer de mama RE positivo. Se muestran imágenes de células de cáncer de mama T-47D transfectadas con el vector lentiviral shRNA específico para el silenciamiento de MSI2 (shRNA MSI2). Las células fueron electroporadas en presencia de 80 μg del ADN previamente purificado y seleccionadas durante cuatro semanas con Puromicina (0.2 $\mu\text{g/ml}$). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia para evaluar la transfección mediante la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP).

Posteriormente, mediante la técnica de Western blot se comprobó la eficacia en el silenciamiento de la proteína MSI2 y el efecto que tiene dicho silenciamiento en la expresión del RE α , RE β y E-cadherina.

Comparando la expresión basal de MSI2 en las células T-47D silvestres y en las células transfectadas con los dos vectores (shRNA MSI2 y shRNA C-) se demostró el silenciamiento de la expresión proteica de MSI2 en las células transfectadas con el vector shRNA MSI2. En consecuencia, el abatimiento en la expresión de las proteínas RE α , RE β y E-cadherina también fue observada (Figura 16). Estos resultados nos sugieren un posible papel de MSI2 en las características epiteliales de las células de cáncer de mama RE positivo, por lo que futuros estudios deberán llevarse a cabo.

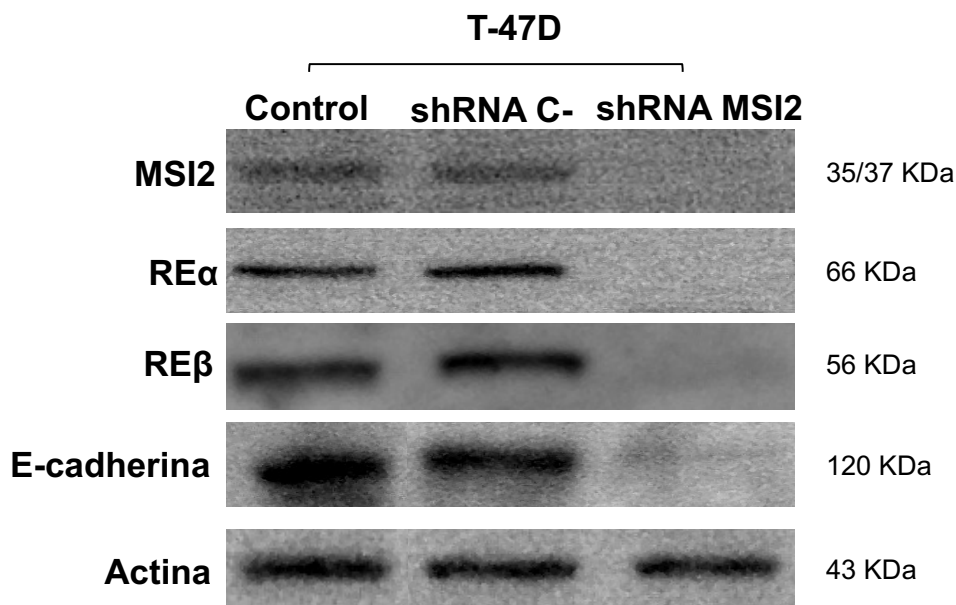


Figura 16: El silenciamiento de la expresión proteica de MSI2 afecta la expresión del RE α , RE β y E-cadherina. Imágenes representativas de Western blots se muestran donde se analizó la expresión de las proteínas MSI2 (35/37 kDa), RE α (66 kDa), RE β (56 kDa) y E-cadherina (120 kDa) en la línea celular T-47D. En el primer carril, la línea celular silvestre (control), seguido de las células transfectadas con el vector control (shRNA C-) y; por último, las células transfectadas con el vector específico para silenciar a MSI2 (shRNA MSI2). La proteína β -actina se utilizó como control de carga (50 μ g) y se realizaron 3 experimentos independientes.

7.5 MSI2 y el RE α interactúan físicamente en células de cáncer de mama.

Con el objetivo de determinar si la interacción entre MSI2 y el RE α **podría ocurrir a nivel proteico** se realizó un ensayo de ligación por proximidad, el cual permite determinar la interacción entre proteínas que se encuentren a menos de 40 nm, la presencia de interacción entre las proteínas se puede observar cómo puntos de color rojo mediante microscopía confocal. Como control interno de la técnica y para descartar falsos positivos, se realizaron diferentes aproximaciones experimentales en donde fueron omitidos alguno de los reactivos claves de la técnica (anticuerpos primarios o sondas de PLA).

Las células de cáncer de mama MCF7 incubadas simultáneamente con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra MSI2 y RE α mostraron la señal fluorescente de puntos rojos; en contraste con, las células incubadas solamente con el anticuerpo del RE α . Estos resultados indican la interacción endógena basal entre las proteínas de MSI2 y el RE α (Figura 17).

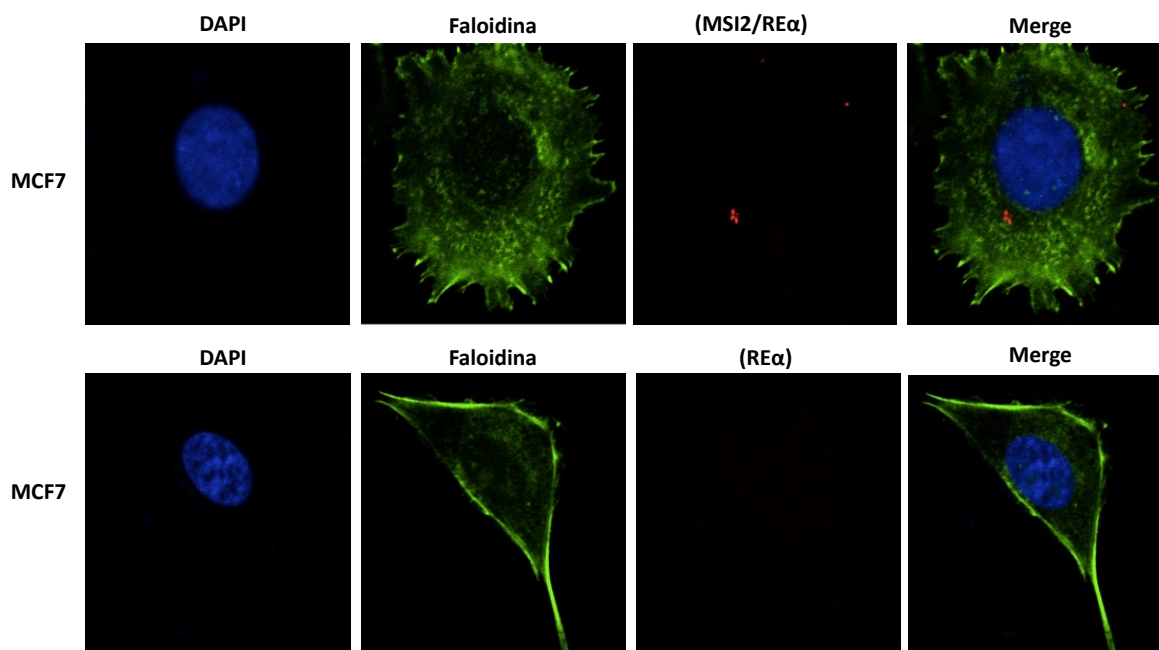


Figura 17: MSI2 y el RE α interactúan físicamente en células de cáncer de mama. Imágenes representativas de los ensayos de ligación por proximidad de MSI2 y del RE α en células MCF7. En el panel superior se muestra una célula de cáncer de mama en donde el núcleo se encuentra teñido con DAPI y el citoesqueleto con Faloidina. Los puntos fluorescentes de color rojo representan la interacción proteica entre MSI2 y el RE α con distancia menor a 40 nm. Como control de la técnica en el panel inferior se muestra un ensayo en donde se omitió el uso del anticuerpo anti-MSI2.

7.6 El Estradiol, Fulvestrant y Tamoxifeno disminuyen las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α .

Una vez demostrada la interacción proteica entre MSI2 y RE α , el efecto del Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant se analizó sobre dicha interacción física. Para este estudio se utilizó la línea celular MCF7, para lo cual, las células fueron sincronizadas en G0 mediante ayuno de suero, y posteriormente fueron tratadas en ausencias (control) o presencia de Etanol como vehículo (0.01%), Estradiol (1×10^{-9} M), Tamoxifeno (1×10^{-7} M) y Fulvestrant (1×10^{-7} M) durante 45 minutos. El análisis cuantitativo de los puntos de color rojo, indicativo de la interacción proteína-proteína, se llevó a cabo en las fotografías obtenidas mediante microscopía confocal. El número de puntos observados se normalizaron por núcleo celular. El tratamiento con Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant disminuyó significativamente la interacción entre MSI2 y el RE α comparado con el control o el vehículo. De manera interesante, tamoxifeno disminuyó aún más la interacción proteína-proteína y fue significativamente diferente comparada con Estradiol y Fulvestrant (Figura 18).

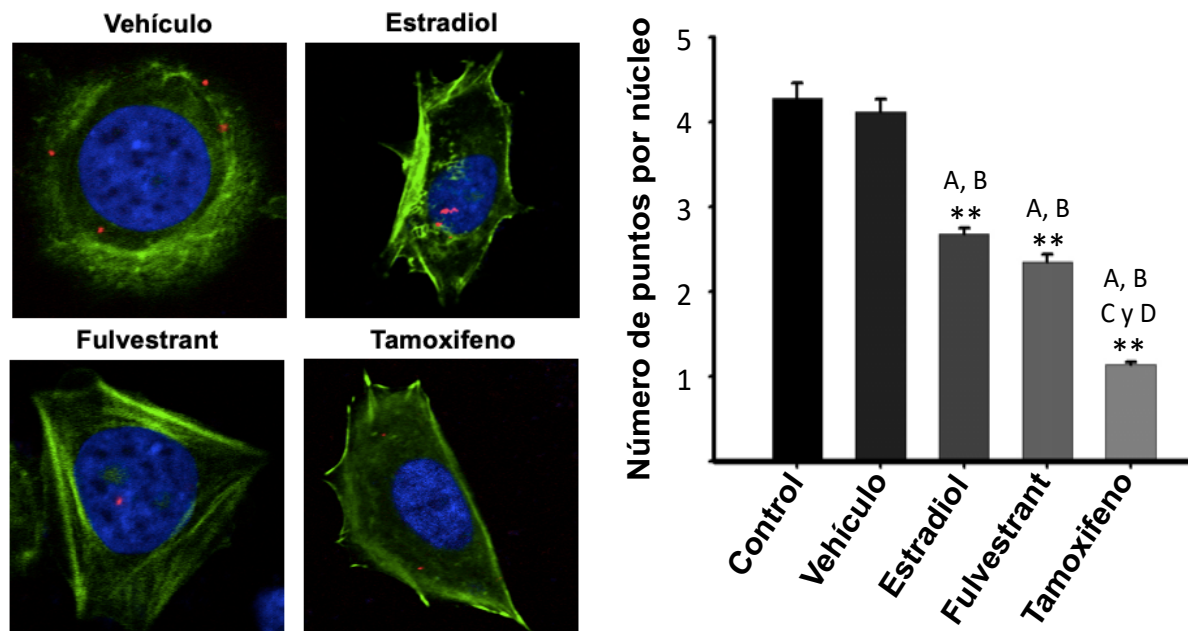
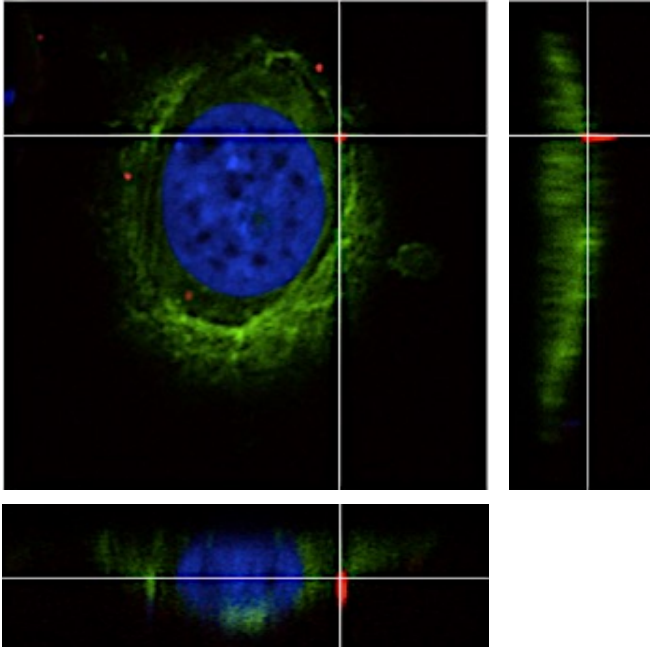


Figura 18: El Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant disminuyen las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α . Del lado derecho se muestra un panel representativo de los PLA en las células de cáncer de mama MCF7, los puntos fluorescentes de color rojo representan la interacción proteica entre MSI2 y el RE α con distancia menor a 40 nm. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y el citoesqueleto con faloidina. De lado izquierdo se muestra un gráfico comparativo del efecto a 45 minutos del Etanol como vehículo (0.01%), Estradiol (1×10^{-9} M), Tamoxifeno (1×10^{-7} M) y Fulvestrant (1×10^{-7} M) en la interacción proteica. Dos experimentos independientes se realizaron, cada uno por duplicado, los resultados se expresan como la media \pm error estándar de al menos 200 núcleos por condición. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Tukey-Kramer. ** $p < 0.0001$ vs Control (A), Vehículo (B), Estradiol (C) y Fulvestrant (D).

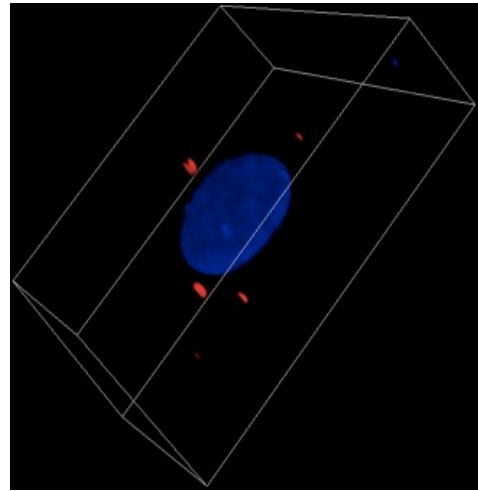
Para determinar la localización celular basal de las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α se realizaron tomas fotográficas de las células MCF7 en plano "z" (z-stack) con el microscopio confocal. De este modo, con las reconstrucciones en 3D y las imágenes ortogonales se determinó que dichas interacciones se pueden localizar tanto a nivel citoplasmático, como nuclear (Figura 19). De manera interesante en las células estimuladas con Estradiol, la interacción proteína-proteína se observó preferentemente en el núcleo; en cambio, en las células no tratadas o tratadas con los antiestrógenos, la interacción se localiza en el citoplasma y el núcleo. Otra observación fue la diferencia en el tamaño de los puntos fluorescente, donde el Estradiol mostró los puntos de mayor tamaño, en contraste con los de los antiestrógenos. Futuros estudios deberán llevarse a cabo para confirmar estas observaciones, así como investigar su posible implicación biológica.

Vehículo

Imágenes ortogonales

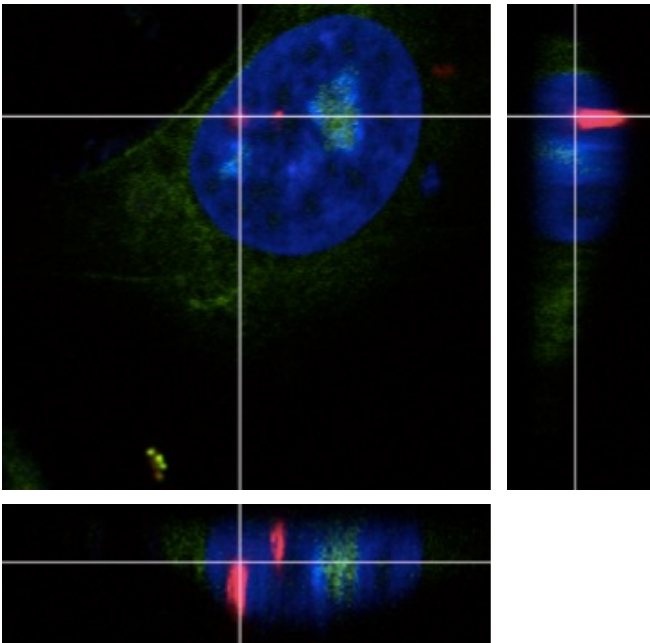


Reconstrucción en 3D

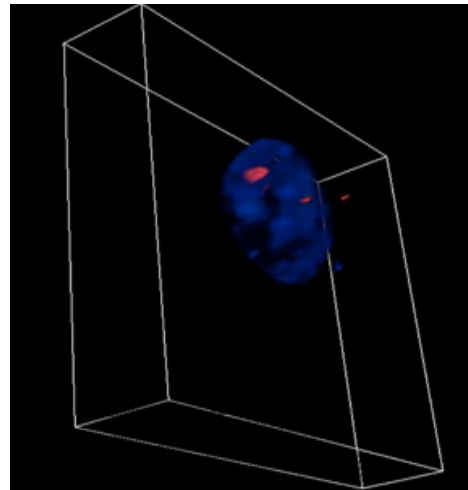


Estradiol

Imágenes ortogonales



Reconstrucción en 3D



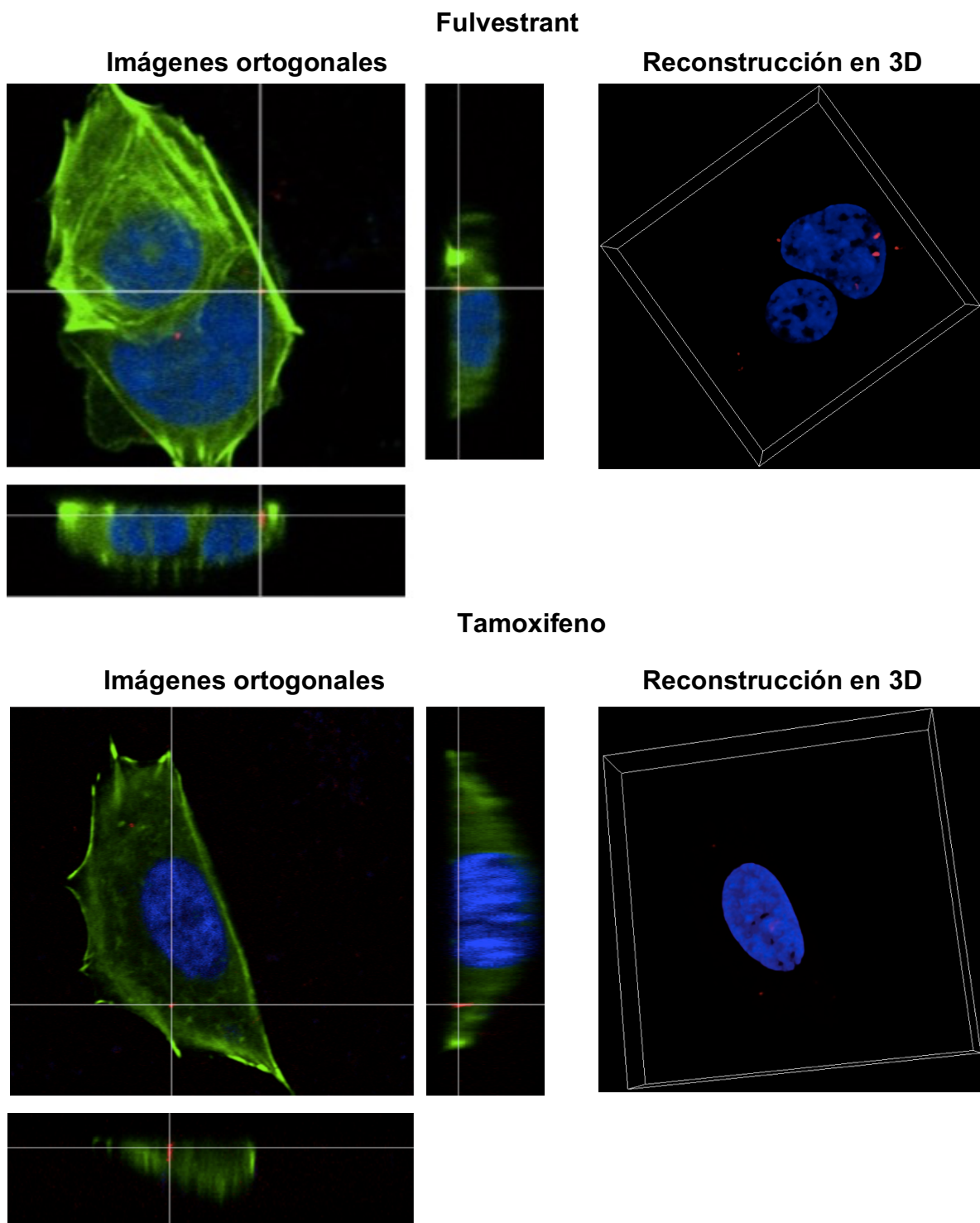


Figura 19: Las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α se encuentran a nivel citoplasmático y nuclear y se modulan por los tratamientos. Imágenes representativas de las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α . Se muestran reconstrucciones en 3D y ortogonales de las imágenes tomadas en el microscopio confocal mediante tomas en plano z (z-stack). El tratamiento con Estradiol (1×10^{-9} M) favorece la formación de complejos proteicos (MSI2 y RE α) a nivel del núcleo celular; mientras que, con el Tamoxifeno (1×10^{-7} M) y el Fulvestrant (1×10^{-7} M) se encuentran preferentemente a nivel citoplasmático.

En el cáncer de mama *MSI2* ha demostrado tener diversas funciones importantes, como la supresión de la progresión tumoral a través de la represión de la transición epitelio mesénquima(121). Además, la expresión de esta proteína se relaciona con mejor pronóstico para los pacientes con tumores mamarios (121).

Hallazgos recientes han identificado a *MSI2* como un regulador del RE α . De hecho, en el cáncer de mama RE positivo, la expresión de *MSI2* se encuentra altamente enriquecida (117). Sin embargo, los mecanismos de la participación de *MSI2* en estos tumores aún no han sido completamente dilucidados y por ello en este trabajo se pretendió profundizar en la relación de *MSI2* con el RE α .

De este modo, la primera aproximación para determinar dicha relación fue utilizando la plataforma UCSC Xena, la cual brinda la posibilidad de visualizar y obtener información genómica de bases de datos públicos como los provenientes del TGCA (The Cancer Genome Atlas) o del GDC (Genomic Data Commons). Los datos de la expresión génica de *MSI2* y del *ESR1* de tejidos mamarios normales y tumorales se obtuvieron y se procesaron. El análisis determinó que la expresión de *MSI2* se encuentra mayormente expresada en tejidos tumorales y particularmente en aquellos clasificados como RE positivo; específicamente, *MSI2* tiene una expresión significativamente aumentada en el subtipo de cáncer de mama luminal B. De hecho, se demostró que existe una correlación positiva entre la expresión de *MSI2* y el *ESR1* en los tejidos de cáncer de mama con fenotipo luminal. Estudios previos reportaron que la expresión *MSI2* correlaciona con más de 5, 000 genes, entre los que destaca el *ESR1* y algunos de sus genes blancos como la Ciclina D1 (*CCND1*) (117). A diferencia de esos estudios, nosotros determinamos una correlación positiva entre *MSI2* y el *ESR1* en dos cohortes diferentes y con los datos específicamente de muestras clasificados como cáncer de mama RE positivo (luminal A y luminal B), excluyendo a los subtipos HER2 enriquecido y triple negativo. Futuros estudios deberán analizar la expresión de *MSI2* en mujeres mexicanas con cáncer de mama y determinar si existen diferencias entre

poblaciones, además de estudiar si la expresión de *MSI2* está relacionada con factores epigenéticos.

Posteriormente, en líneas celulares de cáncer de mama clasificadas con subtipos moleculares luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo se comprobó que la expresión de *MSI2* se encuentra en las células con fenotipo luminal, y que esta expresión coincide con la de $RE\alpha$, por lo que se hipotetizó que podría existir una relación en la expresión de ambas proteínas. De este modo, análisis de Western blot se realizaron para determinar el efecto del ligando natural del $RE\alpha$ (Estradiol) y de sus inhibidores (Tamoxifeno y Fulvestrant) en los niveles de expresión de *MSI2*. Sorprendentemente, Estradiol aumentó la expresión proteica de *MSI2*; mientras que, los antiestrógenos no la modificaron. Estos resultados son importantes; debido a que, no hay información previa respecto a la modulación de la expresión de *MSI2* por hormonas esteroideas.

El Estradiol es una hormona que unida a su receptor media un gran número de eventos relacionados con la proliferación y diferenciación celular. El dímero formado por el Estradiol y el receptor interactúa con secuencias específicas en los promotores de sus genes diana. Dichas secuencias se denominan elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y están conformadas por una secuencia repetida, invertida y separada por tres nucleótidos no específicos (5'-GGTCAnnnTGACC-3') (140). En este sentido, los resultados sobre la regulación positiva en la expresión de *MSI2* mediada por el ligando del receptor, podría deberse a que el promotor posee secuencias para ERE. Por lo cual, futuros estudios deben de llevarse a cabo mediante el uso de la técnica de secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) para comprobar la posible interacción directa del $RE\alpha$ con ERE putativos en la región promotora de *MSI2* (141). Sin embargo, también se deberá investigar si el receptor activado pudiera unirse de forma indirecta a motivos del ADN de *MSI2* y regular su transcripción a través de otros factores de transcripción.

La generación de la línea celular T-47D shRNA *MSI2* estable nos permitió corroborar la pérdida de la expresión del $RE\alpha$, como previamente ha sido informado (117). Lo cual sugiere que, *MSI2* afecta el crecimiento de células de cáncer de mama al regular la función del $RE\alpha$ (117). Además, el silenciamiento de *MSI2*

también impactó negativamente en la expresión de las proteínas RE β y E-cadherina. La regulación de dichas proteínas es de suma importancia para el cáncer de mama; el RE β juega un papel controversial; sin embargo, recientemente se ha reportado que tiene un papel inhibitorio en la migración e invasión celular (142). Por su parte, la desregulación de la proteína E-cadherina impacta negativamente en el pronóstico del cáncer de mama al estar relacionada con la transición epitelio mesénquima y en general con peor supervivencia global (143). Se ha sugerido que MSI2 es un marcador favorable para el pronóstico del cáncer de mama triple negativo; ya que, MSI2 es un regulador negativo de la transición epitelio mesénquima y que la pérdida de su expresión conduce a un estado metastásico (121).

Partiendo de las evidencias que establecen a MSI2 como una proteína de unión al ARN, que particularmente interactúa con el mensajero del RE α favoreciendo su estabilidad (117), aunado a que la expresión génica de MSI2 correlaciona positivamente con la del RE α se estableció la hipótesis de una posible interacción entre MSI2 y el RE α . Existen diferentes tecnologías y desarrollos metodológicos para determinar las interacciones proteicas, entre las cuales se encuentra el Ensayo de Ligación por Proximidad (PLA). Con este ensayo es posible determinar interacciones proteicas con una distancia < 40nm, además permite la detección de pocas moléculas en interacción lo que convierte al ensayo en una técnica sumamente sensible. (144). Mediante esta metodología se pudo comprobar que MSI2 y el RE α interactúan físicamente a nivel proteico y que dicha interacción disminuye con el uso del Tamoxifeno, el Fulvestrant y el Estradiol. Particularmente, esta última hormona favorece las interacciones proteicas a nivel nuclear; mientras que, los antiestrógenos lo propician a nivel citoplasmático. De manera interesante, el uso de Estradiol también generó un aumento en el tamaño de las interacciones mientras que el Tamoxifeno y el Fulvestrant las redujeron.

Estudios previos en las células MCF7, mediante la técnica de inmunoprecipitación y análisis de espectrometría de masas, mostraron que MSI2 se une a 126 proteínas relacionadas con el ARN (proteínas ribosómicas, hnRNP, proteínas ribonucleares y

RBP) (117). Asimismo, más de 150 moléculas capaces de interactuar con el RE α fueron identificadas, entre las cuales se encuentra MSI2 (138).

Es importante destacar que la inmunoprecipitación es una técnica muy usada para identificar la interacción de moléculas con proteínas específicas. Su variante (co-inmunoprecipitación) es considerada uno de los métodos estándar para identificar interacciones proteína-proteína ya que puede identificar dichas interacciones de manera directa o indirecta en un complejo de proteínas. (145). En este sentido, se ha mencionado que la co-inmunoprecipitación no es tan precisa ya que, si bien detecta interacciones entre proteínas en un gran complejo, esto no necesariamente representa interacciones específicas y físicamente cercanas.

Es por ello por lo que la evidencia aquí sustentada es relevante ya que hasta la realización de este trabajo no hay información que respalde la interacción proteica directa entre MSI2 y el RE α mediante una técnica con sensibilidad comparable al PLA (distancia < 40 nm). Sin embargo, queda por dilucidar el mecanismo por el cual, la unión de los ligandos antagonistas y el agonista del receptor propician la disminución de dichas interacciones. Estos experimentos se realizaron a tiempos cortos en donde la expresión de las proteínas no se vio afectada (datos no mostrados), por lo que se hipotetiza que la reducción de la interacción podría deberse a los cambios conformacionales que se generan en el receptor cuando entra en contacto con el Estradiol, el Tamoxifeno y el Fulvestrant. No existe evidencia que pueda indicar el sitio de interacción entre las proteínas, por lo que se requiere de realizar modelos computacionales que puedan predecir si dicha hipótesis es posible. Aunado a esto, el incremento en el tamaño de las interacciones proteicas entre MSI2 y el RE α en presencia del Estradiol, podría deberse a que esta hormona provoca un incremento en la cantidad de proteína que interacciona en sitios específicos en el núcleo, por lo que se observan menos puntos de PLA pero con mayor tamaño.

La proteína de unión al ARN MSI2 posee importantes funciones en el desarrollo de diversas neoplasias malignas. Sin embargo, en el cáncer de mama su importancia se centra en su función moduladora del RE α y su participación en el mantenimiento de proteínas características del fenotipo epitelial. Aquí se demostró que la expresión

génica de *MSI2* se encuentra enriquecida en tumores RE positivos y que su expresión proteica aumenta en presencia del ligando natural del receptor. Aunado a esto, se demostró que *MSI2* posee la capacidad de interactuar físicamente con el RE α en células de cáncer de mama y que dicha interacción es disminuida por el estradiol y los antiestrógenos. Además, el silenciamiento de *MSI2* regula negativamente la expresión proteica de los subtipos α y β del RE, así como la de E-caderina.

Estudios han reportado que derivados naturales como el Gosipol y la Gosipolona son capaces de inhibir la actividad de *MSI2* al interrumpir su unión con sus ARN blancos (146). En este mismo estudio determinaron que el uso de la Gosipolona inducía la autofagia y regulaban a la baja la señalización de la vía Notch/Wnt. Particularmente determinaron que este derivado natural interrumpe la unión de *MSI2* con el ARN mensajero de la proteína Numb en células de cáncer de colon. De manera interesante, se observó que la Gosipolona disminuía la expresión de la Ciclina D1, misma proteína que disminuye cuando se silencia la expresión de *MSI2* en células de cáncer de mama (117). Por lo tanto, es necesario evaluar el efecto de la inhibición de la actividad de *MSI2* en cáncer de mama.

En conjunto estos hallazgos indican la relevancia clínica que podría tener *MSI2* en el cáncer de mama al estar íntimamente involucrado con el RE α , el blanco terapéutico por excelencia para los tumores mamarios luminales y por su relación con proteínas relacionadas con la transición epitelio mesénquima. Por lo cual, *MSI2* podría considerarse como una molécula blanco de interés terapéutico para aquellos pacientes con cáncer de mama RE positivo.

9. CONCLUSIÓN

La expresión génica de MSI2 esta enriquecida en tumores RE positivo y el estradiol incrementa los niveles proteicos de MSI2. Esta proteína de unión al ARN interactúa físicamente con el RE α en células de cáncer de mama RE positivo y dicha interacción disminuye con el estradiol y los antiestrógenos. La expresión tanto del RE α , RE β y E-cadherina depende de la presencia de MSI2.

- Determinar si el efecto del Estradiol en el aumento en la expresión de MSI2 es mediado por la regulación transcripcional directa del RE α o por la activación de otras vías de señalización.
- Analizar la interacción proteica entre MSI2 y el RE α por PLA en otras líneas celular RE positivo, para descartar que el efecto sea específico de las células MCF7.
- Corroborar mediante técnicas más sensibles la interacción proteica entre MSI2 y el RE α , así como el efecto del Estradiol, Tamoxifeno y Fulvestrant.
- Evaluar el efecto del silenciamiento de MSI2 en la expresión de genes relacionados con la transición epitelio mesénquima y genes estrógeno dependientes.
- Establecer el efecto del silenciamiento de MSI2 en la proliferación y en la respuesta a la terapia endocrina en células de cáncer de mama RE positivo.
- Determinar el efecto de la sobreexpresión de MSI2 en células RE negativas, evaluando la expresión de diferentes genes y la respuesta a la terapia endocrina.

11. REFERENCIAS

1. World Health Organization: Cancer [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2022 february 3 [updated 2022 July 8; cited 2023 february 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PubMed PMID: 10647931.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PubMed PMID: 35022204.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590. PubMed PMID: 31912902.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660. PubMed PMID: 33538338.
7. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021;127(16):3029-30. doi: 10.1002/cncr.33587. PubMed PMID: 34086348.
8. Valencia DN. Brief Review on COVID-19: The 2020 Pandemic Caused by SARS-CoV-2. *Cureus*. 2020;12(3):e7386. doi: 10.7759/cureus.7386. PubMed PMID: 32337113.
9. Corley DA, Sedki M, Ritzwoller DP, Greenlee RT, Neslund-Dudas C, Rendle KA, et al. Cancer Screening During the Coronavirus Disease-2019 Pandemic: A Perspective From the National Cancer Institute's PROSPR Consortium. *Gastroenterology*. 2021;160(4):999-1002. doi: 10.1053/j.gastro.2020.10.030. PubMed PMID: 33096099.
10. Sharpless NE. COVID-19 and cancer. *Science*. 2020;368(6497):1290. doi: 10.1126/science.abd3377. PubMed PMID: 32554570.
11. Instituto Nacional de Estadística y Geografía: Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre) [Internet] Ciudad de

México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2021 October 19. [updated 2022 July 8; cited 2023 February 1]. Available from: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_LUCHACANCER2021.pdf

12. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):27-35. doi: 10.1097/PAP.000000000000232. PubMed PMID: 31045583.

13. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin.* 2018;13(3):325-38. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.004. PubMed PMID: 30100073.

14. Erber R, Hartmann A. Histology of Luminal Breast Cancer. *Breast Care (Basel).* 2020;15(4):327-36. doi: 10.1159/000509025. PubMed PMID: 32982642.

15. Yang WT, Zhu XZ. [The introduction of 2012 WHO classification of tumours of the breast]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2013;42(2):78-80. doi: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2013.02.002. PubMed PMID: 23710911.

16. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52. doi: 10.1038/35021093. PubMed PMID: 10963602.

17. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74. doi: 10.1073/pnas.191367098. PubMed PMID: 11553815.

18. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23. doi: 10.1093/annonc/mdt303. PubMed PMID: 23917950.

19. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 2010;28(10):1684-91. doi: 10.1200/JCO.2009.24.9284. PubMed PMID: 20194857.

20. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):66. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2. PubMed PMID: 31548545.
21. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2794-803. doi: 10.1200/JCO.2013.54.1870. PubMed PMID: 25049332.
22. Howell SJ, Wardley AM, Armstrong AC. Re: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(24):1730; author reply -1. doi: 10.1093/jnci/djp390. PubMed PMID: 19893007.
23. Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2017;12(2):81-92. doi: 10.2174/1574887112666170202165049. PubMed PMID: 28164759.
24. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010;220(2):263-80. doi: 10.1002/path.2648. PubMed PMID: 19927298.
25. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):61. doi: 10.1186/s13058-020-01296-5. PubMed PMID: 32517735.
26. Groheux D, Hindié E, Delord M, Giacchetti S, Hamy AS, de Bazelaire C, et al. Prognostic impact of (18)FDG-PET-CT findings in clinical stage III and IIB breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(24):1879-87. doi: 10.1093/jnci/djs451. PubMed PMID: 23243198.
27. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1688-98. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0432. PubMed PMID: 25208879.
28. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the

implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol.* 2011;24(2):157-67. doi: 10.1038/modpathol.2010.200. PubMed PMID: 21076464.

29. Moran MS. Radiation therapy in the locoregional treatment of triple-negative breast cancer. *Lancet Oncol.* 2015;16(3):e113-22. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71104-0. PubMed PMID: 25752562.

30. Kwapisz D. Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(3):607-17. doi: 10.1007/s00262-020-02736-z. PubMed PMID: 33015734.

31. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(6):486-504. doi: 10.2174/156802612799436641. PubMed PMID: 22242852.

32. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;50(1):3-22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.003. PubMed PMID: 15094156.

33. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007;87(3):905-31. doi: 10.1152/physrev.00026.2006. PubMed PMID: 17615392.

34. Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, et al. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem.* 1986;24(1):77-83. doi: 10.1016/0022-4731(86)90035-x. PubMed PMID: 2422449.

35. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 2005;23(8):1616-22. doi: 10.1200/JCO.2005.10.036. PubMed PMID: 15755967.

36. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.* 2014;90:13-29. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012. PubMed PMID: 24971815.

37. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4258-65. doi: 10.1210/jcem.82.12.4470. PubMed PMID: 9398750.

38. Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*. 1993;17(1):263-5. doi: 10.1006/geno.1993.1320. PubMed PMID: 8406468.
39. Haldosén LA, Zhao C, Dahlman-Wright K. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(1):665-72. doi: 10.1016/j.mce.2013.08.005. PubMed PMID: 23954741.
40. Omoto Y, Iwase H. Clinical significance of estrogen receptor β in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci*. 2015;106(4):337-43. doi: 10.1111/cas.12613. PubMed PMID: 25611678.
41. Speirs V. Oestrogen receptor beta in breast cancer: good, bad or still too early to tell? *J Pathol*. 2002;197(2):143-7. doi: 10.1002/path.1072. PubMed PMID: 12015736.
42. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev*. 2008;29(2):217-33. doi: 10.1210/er.2006-0045. PubMed PMID: 18216219.
43. Speirs V, Carder PJ, Lansdown MR. Oestrogen receptor beta: how should we measure this? *Br J Cancer*. 2002;87(6):687; author reply 8-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6600534. PubMed PMID: 12237781.
44. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12 Suppl):4338s-42s; discussion 411s-412s. PubMed PMID: 11916222.
45. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2018;186:1-24. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.12.012. PubMed PMID: 29289555.
46. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240(4854):889-95. doi: 10.1126/science.3283939. PubMed PMID: 3283939.

47. Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* 2004;6(1):39-52. doi: 10.1186/bcr742. PubMed PMID: 14680484.
48. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* 1989;59(3):477-87. doi: 10.1016/0092-8674(89)90031-7. PubMed PMID: 2805068.
49. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med.* 1999;246(2):133-8. doi: 10.1046/j.1365-2796.1999.00545.x. PubMed PMID: 10447781.
50. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.* 2000;65(5):227-51. doi: 10.1016/s0039-128x(99)00107-5. PubMed PMID: 10751636.
51. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 1986;320(6058):134-9. doi: 10.1038/320134a0. PubMed PMID: 3754034.
52. Mader S, Chambon P, White JH. Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(5):1125-32. doi: 10.1093/nar/21.5.1125. PubMed PMID: 8385312.
53. Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J.* 1986;5(9):2231-6. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04489.x. PubMed PMID: 3780678.
54. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* 1987;51(6):941-51. doi: 10.1016/0092-8674(87)90581-2. PubMed PMID: 3690665.
55. Norris JD, Fan D, Kerner SA, McDonnell DP. Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 1997;11(6):747-54. doi: 10.1210/mend.11.6.0008. PubMed PMID: 9171238.
56. Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR. Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and

glucocorticoid receptors. *Cell Regul.* 1990;1(3):291-9. doi: 10.1091/mbc.1.3.291. PubMed PMID: 2100202.

57. Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 1990;9(9):2811-8. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07469.x. PubMed PMID: 2118104.

58. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, et al. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol.* 1994;8(1):21-30. doi: 10.1210/mend.8.1.8152428. PubMed PMID: 8152428.

59. Webster NJ, Green S, Tasset D, Ponglikitmongkol M, Chambon P. The transcriptional activation function located in the hormone-binding domain of the human oestrogen receptor is not encoded in a single exon. *EMBO J.* 1989;8(5):1441-6. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb03526.x. PubMed PMID: 2767048.

60. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 2013;19(3):197-209. doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.007. PubMed PMID: 23348042.

61. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer.* 2004;90 Suppl 1:S2-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6601629. PubMed PMID: 15094757.

62. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell.* 1988;55(1):145-56. doi: 10.1016/0092-8674(88)90017-7. PubMed PMID: 3167974.

63. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999;20(3):321-44. doi: 10.1210/edrv.20.3.0366. PubMed PMID: 10368774.

64. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):561-70. doi: 10.1172/JCI27987. PubMed PMID: 16511588.

65. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*. 1998;95(7):927-37. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81717-1. PubMed PMID: 9875847.
66. Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*. 2005;5(6):343-57. doi: 10.1124/mi.5.6.7. PubMed PMID: 16394250.
67. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2000;2(5):335-44. doi: 10.1186/bcr78. PubMed PMID: 11250726.
68. Szostakowska M, Trębińska-Stryjewska A, Grzybowska EA, Fabisiewicz A. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;173(3):489-97. doi: 10.1007/s10549-018-5023-4. PubMed PMID: 30382472.
69. Hughes-Davies L, Caldas C, Wishart GC. Tamoxifen: the drug that came in from the cold. *Br J Cancer*. 2009;101(6):875-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6605231. PubMed PMID: 19672259.
70. Hayes TG. Pharmacologic treatment of male breast cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(15):2499-510. doi: 10.1517/14656560903200634. PubMed PMID: 19708850.
71. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E, et al. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;353(9169):1993-2000. doi: 10.1016/S0140-6736(99)05036-9. PubMed PMID: 10376613.
72. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, et al. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet*. 2003;361(9354):296-300. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12342-2. PubMed PMID: 12559863.

73. Sanchez-Spitman AB, Swen JJ, Dezentje VO, Moes DJAR, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2019;12(6):523-36. doi: 10.1080/17512433.2019.1610390. PubMed PMID: 31008668.
74. Jordan VC. Chemosuppression of breast cancer with tamoxifen: laboratory evidence and future clinical investigations. *Cancer Invest.* 1988;6(5):589-95. doi: 10.3109/07357908809082124. PubMed PMID: 3063338.
75. Jordan VC. Selective estrogen receptor modulation: a personal perspective. *Cancer Res.* 2001;61(15):5683-7. PubMed PMID: 11479197.
76. Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(36):5815-24. doi: 10.1200/JCO.2007.11.3886. PubMed PMID: 17893378.
77. Park WC, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med.* 2002;8(2):82-8. doi: 10.1016/s1471-4914(02)02282-7. PubMed PMID: 11815274.
78. Shagufta, Ahmad I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *Eur J Med Chem.* 2018;143:515-31. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.056. PubMed PMID: 29207335.
79. Jordan VC, Allen KE. Evaluation of the antitumour activity of the non-steroidal antioestrogen monohydroxytamoxifen in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *Eur J Cancer (1965).* 1980;16(2):239-51. doi: 10.1016/0014-2964(80)90156-5. PubMed PMID: 6768559.
80. Jordan VC. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S269-76. doi: 10.1038/sj.bjp.0706399. PubMed PMID: 16402113.
81. Jordan VC. Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(3):R235-46. doi: 10.1530/ERC-14-0092. PubMed PMID: 24659478.
82. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 1997;389(6652):753-8. doi: 10.1038/39645. PubMed PMID: 9338790.
-

83. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol.* 2004;33(2):387-410. doi: 10.1677/jme.1.01541. PubMed PMID: 15525597.
84. Romano A, Adriaens M, Kuenen S, Delvoux B, Dunselman G, Evelo C, et al. Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17beta-estradiol and tamoxifen. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;314(1):90-100. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.008. PubMed PMID: 19698761.
85. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science.* 2002;295(5564):2465-8. doi: 10.1126/science.1068537. PubMed PMID: 11923541.
86. Walsh CA, Qin L, Tien JC, Young LS, Xu J. The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *Int J Biol Sci.* 2012;8(4):470-85. doi: 10.7150/ijbs.4125. PubMed PMID: 22419892.
87. Fabian CJ, Kimler BF. Chemoprevention for high-risk women: tamoxifen and beyond. *Breast J.* 2001;7(5):311-20. doi: 10.1046/j.1524-4741.2001.21570.x. PubMed PMID: 11906441.
88. Mikelman S, Mardirossian N, Gnegy ME. Tamoxifen and amphetamine abuse: Are there therapeutic possibilities? *J Chem Neuroanat.* 2017;83-84:50-8. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.08.004. PubMed PMID: 27585851.
89. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(12):1135-41. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70257-6. PubMed PMID: 21087898.
90. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9793):771-84. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8. PubMed PMID: 21802721.

91. Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M. Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem.* 2009;55(10):1770-82. doi: 10.1373/clinchem.2008.121756. PubMed PMID: 19574470.
92. Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(1):160-6. doi: 10.1038/sj.clpt.6100367. PubMed PMID: 17882159.
93. Hu XX, Zhou Q, Lan T, Huang XX, Liang BQ, Dai DP, et al. Functional characterization of 22 novel CYP2D6 variants for the metabolism of Tamoxifen. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(6):819-25. doi: 10.1111/jphp.12556. PubMed PMID: 27109434.
94. Cronin-Fenton DP, Damkier P. Tamoxifen and CYP2D6: A Controversy in Pharmacogenetics. *Adv Pharmacol.* 2018;83:65-91. doi: 10.1016/bs.apha.2018.03.001. PubMed PMID: 29801584.
95. Dodwell D, Wardley A, Johnston S. Postmenopausal advanced breast cancer: options for therapy after tamoxifen and aromatase inhibitors. *Breast.* 2006;15(5):584-94. doi: 10.1016/j.breast.2006.01.007. PubMed PMID: 16504510.
96. Nardone A, De Angelis C, Trivedi MV, Osborne CK, Schiff R. The changing role of ER in endocrine resistance. *Breast.* 2015;24 Suppl 2:S60-6. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.015. PubMed PMID: 26271713.
97. Carlson RW. The history and mechanism of action of fulvestrant. *Clin Breast Cancer.* 2005;6 Suppl 1:S5-8. doi: 10.3816/cbc.2005.s.008. PubMed PMID: 15865849.
98. Bucourt R, Vignau M, Torelli V. New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor. *J Biol Chem.* 1978;253(22):8221-8. PubMed PMID: 556354.
99. Wakeling AE. The potential for a novel pure anti-oestrogen. *Horm Res.* 1989;32 Suppl 1:257-9; discussion 60. doi: 10.1159/000181359. PubMed PMID: 2613211.
100. McClelland RA, Manning DL, Gee JM, Anderson E, Clarke R, Howell A, et al. Effects of short-term antiestrogen treatment of primary breast cancer on estrogen receptor mRNA and protein expression and on estrogen-regulated genes. *Breast*

Cancer Res Treat. 1996;41(1):31-41. doi: 10.1007/BF01807034. PubMed PMID: 8932874.

101. Wakeling AE, Bowler J. Biology and mode of action of pure antioestrogens. *J Steroid Biochem.* 1988;30(1-6):141-7. doi: 10.1016/0022-4731(88)90086-6. PubMed PMID: 3386242.

102. Wakeling AE, Bowler J. Novel antioestrogens without partial agonist activity. *J Steroid Biochem.* 1988;31(4B):645-53. doi: 10.1016/0022-4731(88)90014-3. PubMed PMID: 3199810.

103. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* 1991;51(15):3867-73. PubMed PMID: 1855205.

104. Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6883-7. doi: 10.1073/pnas.87.17.6883. PubMed PMID: 2395882.

105. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol.* 1999;19(2):1002-15. doi: 10.1128/MCB.19.2.1002. PubMed PMID: 9891036.

106. Dauvois S, White R, Parker MG. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* 1993;106 (Pt 4):1377-88. doi: 10.1242/jcs.106.4.1377. PubMed PMID: 8126115.

107. Nicholson RI, Gee JM, Manning DL, Wakeling AE, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Responses to pure antiestrogens (ICI 164384, ICI 182780) in estrogen-sensitive and -resistant experimental and clinical breast cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;761:148-63. doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb31376.x. PubMed PMID: 7625718.

108. Pink JJ, Jordan VC. Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1996;56(10):2321-30. PubMed PMID: 8625307.

109. Wijayaratne AL, McDonnell DP. The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists,

- antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35684-92. doi: 10.1074/jbc.M101097200. PubMed PMID: 11473106.
110. El Khissiin A, Leclercq G. Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett.* 1999;448(1):160-6. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00343-9. PubMed PMID: 10217432.
111. Wijayaratne AL, Nagel SC, Paige LA, Christensen DJ, Norris JD, Fowlkes DM, et al. Comparative analyses of mechanistic differences among antiestrogens. *Endocrinology.* 1999;140(12):5828-40. doi: 10.1210/endo.140.12.7164. PubMed PMID: 10579349.
112. DeFriend DJ, Howell A, Nicholson RI, Anderson E, Dowsett M, Mansel RE, et al. Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res.* 1994;54(2):408-14. PubMed PMID: 8275477.
113. Hyder SM, Chiappetta C, Murthy L, Stancel GM. Selective inhibition of estrogen-regulated gene expression in vivo by the pure antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res.* 1997;57(13):2547-9. PubMed PMID: 9205050.
114. Blin C, L'Horset F, Leclerc T, Lambert M, Colnot S, Thomasset M, et al. Contrasting effects of tamoxifen and ICI 182 780 on estrogen-induced calbindin-D 9k gene expression in the uterus and in primary culture of myometrial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995;55(1):1-7. doi: 10.1016/0960-0760(95)00154-r. PubMed PMID: 7577712.
115. Huynh HT, Pollak M. Insulin-like growth factor I gene expression in the uterus is stimulated by tamoxifen and inhibited by the pure antiestrogen ICI 182780. *Cancer Res.* 1993;53(23):5585-8. PubMed PMID: 8242606.
116. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. NCCN Guidelines Insights: Breast Cancer, Version 1.2017. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017;15(4):433-51. doi: 10.6004/jnccn.2017.0044. PubMed PMID: 28404755.
117. Kang MH, Jeong KJ, Kim WY, Lee HJ, Gong G, Suh N, et al. Musashi RNA-binding protein 2 regulates estrogen receptor 1 function in breast cancer. *Oncogene.* 2017;36(12):1745-52. doi: 10.1038/onc.2016.327. PubMed PMID: 27593929.

118. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet.* 2014;15(12):829-45. doi: 10.1038/nrg3813. PubMed PMID: 25365966.
119. Anji A, Kumari M. Guardian of Genetic Messenger-RNA-Binding Proteins. *Biomolecules.* 2016;6(1):4. doi: 10.3390/biom6010004. PubMed PMID: 26751491.
120. De Weer A, Speleman F, Cauwelier B, Van Roy N, Yigit N, Verhasselt B, et al. EVI1 overexpression in t(3;17) positive myeloid malignancies results from juxtaposition of EVI1 to the MSI2 locus at 17q22. *Haematologica.* 2008;93(12):1903-7. doi: 10.3324/haematol.13192. PubMed PMID: 18815193.
121. Li M, Li AQ, Zhou SL, Lv H, Wei P, Yang WT. RNA-binding protein MSI2 isoforms expression and regulation in progression of triple-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):92. doi: 10.1186/s13046-020-01587-x. PubMed PMID: 32448269.
122. Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, Okano H. Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J Neurosci.* 2001;21(20):8091-107. PubMed PMID: 11588182.
123. Cragle C, MacNicol AM. Musashi protein-directed translational activation of target mRNAs is mediated by the poly(A) polymerase, germ line development defective-2. *J Biol Chem.* 2014;289(20):14239-51. doi: 10.1074/jbc.M114.548271. PubMed PMID: 24644291.
124. Kawahara H, Imai T, Imataka H, Tsujimoto M, Matsumoto K, Okano H. Neural RNA-binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP. *J Cell Biol.* 2008;181(4):639-53. doi: 10.1083/jcb.200708004. PubMed PMID: 18490513.
125. Wuebben EL, Mallanna SK, Cox JL, Rizzino A. Musashi2 is required for the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(4):e34827. doi: 10.1371/journal.pone.0034827. PubMed PMID: 22496868.
126. Park SM, Deering RP, Lu Y, Tivnan P, Lianoglou S, Al-Shahrour F, et al. Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF- β signaling in HSCs. *J Exp Med.* 2014;211(1):71-87. doi: 10.1084/jem.20130736. PubMed PMID: 24395885.

127. Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, Congdon KL, Blum J, Lento WE, et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature*. 2010;466(7307):765-8. doi: 10.1038/nature09171. PubMed PMID: 20639863.
128. Lee J, An S, Choi YM, Ahn KJ, Lee JH, Kim TJ, et al. Musashi-2 is a novel regulator of paclitaxel sensitivity in ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 2016;49(5):1945-52. doi: 10.3892/ijo.2016.3683. PubMed PMID: 27600258.
129. Löblein MT, Falke I, Eich HT, Greve B, Götte M, Troschel FM. Dual Knockdown of Musashi RNA-Binding Proteins MSI-1 and MSI-2 Attenuates Putative Cancer Stem Cell Characteristics and Therapy Resistance in Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21). doi: 10.3390/ijms222111502. PubMed PMID: 34768932.
130. Dong P, Xiong Y, Hanley SJB, Yue J, Watari H. Musashi-2, a novel oncoprotein promoting cervical cancer cell growth and invasion, is negatively regulated by p53-induced miR-143 and miR-107 activation. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):150. doi: 10.1186/s13046-017-0617-y. PubMed PMID: 29073938.
131. Wang R, Liu L, Jiao J, Gao D. Knockdown of MIR4435-2HG Suppresses the Proliferation, Migration and Invasion of Cervical Cancer Cells via Regulating the miR-128-3p/MSI2 Axis in vitro. *Cancer Manag Res*. 2020;12:8745-56. doi: 10.2147/CMAR.S265545. PubMed PMID: 33061572.
132. Choi YM, Kim KB, Lee JH, Chun YK, An IS, An S, et al. DBC2/RhoBTB2 functions as a tumor suppressor protein via Musashi-2 ubiquitination in breast cancer. *Oncogene*. 2017;36(20):2802-12. doi: 10.1038/onc.2016.441. PubMed PMID: 27941885.
133. Troschel FM, Minte A, Ismail YM, Kamal A, Abdullah MS, Ahmed SH, et al. Knockdown of Musashi RNA Binding Proteins Decreases Radioresistance but Enhances Cell Motility and Invasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6). doi: 10.3390/ijms21062169. PubMed PMID: 32245259.
134. Sun J, Sheng W, Ma Y, Dong M. Potential Role of Musashi-2 RNA-Binding Protein in Cancer EMT. *Onco Targets Ther*. 2021;14:1969-80. doi: 10.2147/OTT.S298438. PubMed PMID: 33762829.
135. Licata LA, Hostetter CL, Crismale J, Sheth A, Keen JC. The RNA-binding protein HuR regulates GATA3 mRNA stability in human breast cancer cell lines.

Breast Cancer Res Treat. 2010;122(1):55-63. doi: 10.1007/s10549-009-0517-8. PubMed PMID: 19728080.

136. Heinonen M, Fagerholm R, Aaltonen K, Kilpivaara O, Aittomäki K, Blomqvist C, et al. Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(23):6959-63. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1432. PubMed PMID: 18056170.

137. Xu Y, Huangyang P, Wang Y, Xue L, Devericks E, Nguyen HG, et al. ER α is an RNA-binding protein sustaining tumor cell survival and drug resistance. Cell. 2021;184(20):5215-29.e17. doi: 10.1016/j.cell.2021.08.036. PubMed PMID: 34559986.

138. Shin EM, Huynh VT, Neja SA, Liu CY, Raju A, Tan K, et al. GREB1: An evolutionarily conserved protein with a glycosyltransferase domain links ER α glycosylation and stability to cancer. Sci Adv. 2021;7(12). doi: 10.1126/sciadv.abe2470. PubMed PMID: 33731348.

139. Katz Y, Li F, Lambert NJ, Sokol ES, Tam WL, Cheng AW, et al. Musashi proteins are post-transcriptional regulators of the epithelial-luminal cell state. Elife. 2014;3:e03915. doi: 10.7554/eLife.03915. PubMed PMID: 25380226.

140. Huang J, Li X, Yi P, Hilf R, Bambara RA, Muyan M. Targeting estrogen responsive elements (EREs): design of potent transactivators for ERE-containing genes. Mol Cell Endocrinol. 2004;218(1-2):65-78. doi: 10.1016/j.mce.2003.12.005. PubMed PMID: 15130512.

141. Arao Y, Hamilton KJ, Grimm SA, Korach KS. The genomic regulatory elements for estrogen receptor alpha transactivation-function-1 regulated genes. FASEB J. 2020;34(12):16003-21. doi: 10.1096/fj.202001435R. PubMed PMID: 33064339.

142. Song P, Li Y, Dong Y, Liang Y, Qu H, Qi D, et al. Estrogen receptor β inhibits breast cancer cells migration and invasion through CLDN6-mediated autophagy. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):354. doi: 10.1186/s13046-019-1359-9. PubMed PMID: 31412908.

143. Corso G, Figueiredo J, De Angelis SP, Corso F, Girardi A, Pereira J, et al. E-cadherin deregulation in breast cancer. *J Cell Mol Med*. 2020;24(11):5930-6. doi: 10.1111/jcmm.15140. PubMed PMID: 32301282.
144. Alam MS. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol*. 2018;123(1):e58. doi: 10.1002/cpim.58. PubMed PMID: 30238640.
145. Evans IM, Paliashvili K. Co-immunoprecipitation Assays. *Methods Mol Biol*. 2022;2475:125-32. doi: 10.1007/978-1-0716-2217-9_8. PubMed PMID: 35451753.
146. Lan L, Liu H, Smith AR, Appelman C, Yu J, Larsen S, et al. Natural product derivative Gossypolone inhibits Musashi family of RNA-binding proteins. *BMC Cancer*. 2018;18(1):809. doi: 10.1186/s12885-018-4704-z. PubMed PMID: 30097032.