



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Evaluación de MAD2B como correpressor de ER $\alpha$  en líneas celulares de cáncer de mama**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestro en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:  
**Alan Mendoza Fuentes**

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Elizabeth Langley M<sup>o</sup>Carron  
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Leticia Rocha Zabaleta  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Mayo, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **I. JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**

**VOCAL: DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**VOCAL: DR. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA**

**VOCAL: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENA**

**SECRETARIO: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**

## **II. COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ELIZABETH LANGLEY M<sup>C</sup>CARRON (INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA)**

**DRA. LETICIA ROCHA ZABALETA (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM)**

**DR. MARCO CERBÓN CERVANTES (FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO NO. 7, TORRE DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**SUSTENTANTE (S): ALAN MENDOZA FUENTES**

### III. AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis se realizó gracias a:

La Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por mi formación académica y profesional.

A la Dra. Elizabeth Langley M<sup>c</sup>Carron y a la Dra. Noemí Baranda Ávila por sus críticas constructivas, aportaciones y apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

El financiamiento brindado por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) correspondiente al protocolo Caracterización de Correguladores del Receptor de Estrógenos en Líneas Celulares de Cáncer de Mama (016/058/IBI) (CEI/1143/16) y al Departamento de Investigación Básica de INCan.

Al comité tutorial formado por la Dra. Leticia Rocha Zabaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), y al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes de la Facultad de Química (UNAM), quienes asesoraron el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Marco Teórico</b> .....	<b>5</b>
<b>3.1. Cáncer de mama</b> .....	<b>5</b>
3.1.1. Definición .....	5
3.1.2. Clasificación.....	5
3.1.3. Epidemiología .....	7
3.1.4. Factores de riesgo .....	9
3.1.5. Papel de las hormonas en el cáncer de mama .....	11
<b>3.2. Receptores de estrógenos (ER)</b> .....	<b>13</b>
3.2.1. Generalidades .....	13
3.2.2. Receptor de estrógenos (ER $\alpha$ ).....	14
3.2.3. Mecanismo clásico de activación ligando dependiente .....	18
<b>3.3. MAD2B, REV7, MAD2L2</b> .....	<b>22</b>
3.3.1. Generalidades .....	22
3.3.2. Función .....	22
<b>4. Antecedentes</b> .....	<b>25</b>
<b>5. Planteamiento del problema</b> .....	<b>26</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>27</b>
<b>7. Objetivos</b> .....	<b>27</b>
7.1. Objetivo general.....	27
7.2. Objetivos particulares .....	27
<b>8. Metodología</b> .....	<b>28</b>
8.1. Ensayo bioinformático.....	28
8.2. Cultivo celular .....	28

8.3.	Subclonación de pCMV–SPORT6–MAD2B en pcDNA3.1/His A .....	29
8.4.	Transfección de plásmidos .....	31
8.5.	Western–Blot .....	32
8.6.	Ensayo de luciferasa y $\beta$ –Galactosidasa .....	33
8.7.	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	34
8.8.	Reacción en cadena de polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa.....	36
8.9.	PCR en tiempo real (qPCR).....	38
<b>9.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>40</b>
9.1.	Análisis de expresión de MAD2B/MAD2L2 en bases de datos bioinformáticas de cáncer de mama y su asociación con la sobrevida de las pacientes .....	40
9.2.	Análisis de expresión de pCMV–SPORT6–MAD2B y pcDNA3.1/His A–MAD2B en la línea celular MCF7 .....	44
9.3.	Efecto de MAD2B sobre la actividad transcripcional de ER $\alpha$ en línea celular MCF7 .....	46
9.4.	Determinación de enriquecimiento de MAD2B en secuencias promotoras blanco de ER $\alpha$ en la línea celular MCF7 .....	48
<b>10.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>51</b>
<b>11.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>57</b>
<b>12.</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>57</b>
<b>13.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>58</b>
<b>14.</b>	<b>Anexo: Plásmidos</b> .....	<b>71</b>

## 1. Resumen

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada, así como la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo. La terapia endócrina es uno de los principales tratamientos disponibles para el cáncer de mama ya que aproximadamente tres cuartas partes de las neoplasias mamarias expresan receptores hormonales, tales como el receptor de estrógenos (ER).

Los ER actúan como factores de transcripción activados por ligando que regulan la transcripción de sus genes blanco controlando una amplia variedad de procesos biológicos, como la proliferación, metabolismo, migración y diferenciación celular. La unión del ligando  $17\beta$ -estradiol con el ER $\alpha$  desencadena cambios conformacionales que conducen a su unión a las secuencias de DNA denominadas elementos de respuesta de estrógenos (EREs) que se encuentran en las regiones reguladoras río arriba de sus genes blanco, en donde se reclutan factores de transcripción pioneros y proteínas correguladoras que modulan su actividad de manera positiva (coactivadores) o negativa (correpresores).

En este trabajo se analizó el papel que MAD2B tiene en la regulación de la actividad transcripcional del ER $\alpha$  en la línea celular de cáncer de mama MCF7. Nuestros resultados sugieren que MAD2B es capaz de inhibir la actividad transcripcional del ER $\alpha$ , principalmente en presencia de ligando agonista, sin embargo MAD2B no fue capaz de reclutarse a los EREs de los genes *pS2/TFF1* y *GREB1* en la línea celular MCF7. No obstante, dada la capacidad de MAD2B de disminuir la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , se puede pensar en mecanismos inhibitorios de ER $\alpha$  que ocurrieran previos a su interacción con el DNA. Estos mecanismos tendrán que ser explorados a futuro para determinar el mecanismo de MAD2B mediante el cual inhibe la actividad transcripcional de ER $\alpha$ . De esta manera, más experimentos son necesarios para poder proponer a MAD2B como un correpresor del receptor, resultando relevante para los mecanismos implicados en los procesos biológicos, como la proliferación celular, el desarrollo y metabolismo de las células de cáncer de mama.

## 2. Abstract

Breast cancer is the most common malignancy diagnosed, as well as the leading cause of cancer death in women worldwide. Endocrine therapy is one of the main treatments available for breast cancer, since approximately three quarters of breast neoplasms express steroid hormone receptors, such as the estrogen receptor (ER). ERs act as ligand activated transcription factors that regulate target genes that control a wide variety of biological processes, such as cell proliferation, metabolism, migration, and differentiation. Binding of the ligand,  $17\beta$ -estradiol, to ER $\alpha$  triggers conformational changes that lead to its binding to DNA sequences called estrogen response elements (EREs) found in regulatory regions upstream of their target genes where pioneer transcription factors and coregulator proteins are recruited to positively (coactivators) or negatively (corepressors) modulate its activity.

In this work, the role that MAD2B plays in the regulation of the transcriptional activity of ER $\alpha$  in the MCF7 breast cancer cell line was analyzed. Although our results suggest that MAD2B can inhibit the transcriptional activity of ER $\alpha$ , mainly in the presence of an agonist ligand, MAD2B is not recruited to the EREs of the pS2/TFF1 and GREB1 genes. However, given the ability of MAD2B to decrease the transcriptional activity of ER $\alpha$ , it is possible to think of ER $\alpha$  inhibitory mechanisms that occur prior to its interaction with DNA. These mechanisms will have to be explored in the future to determine the mechanism by which MAD2B inhibits the transcriptional activity of ER $\alpha$ . In this way, further research is needed to propose MAD2B as a corepressor of ER $\alpha$ , being relevant for mechanisms involved in biological processes, such as cell proliferation, development, and metabolism of breast cancer cells.

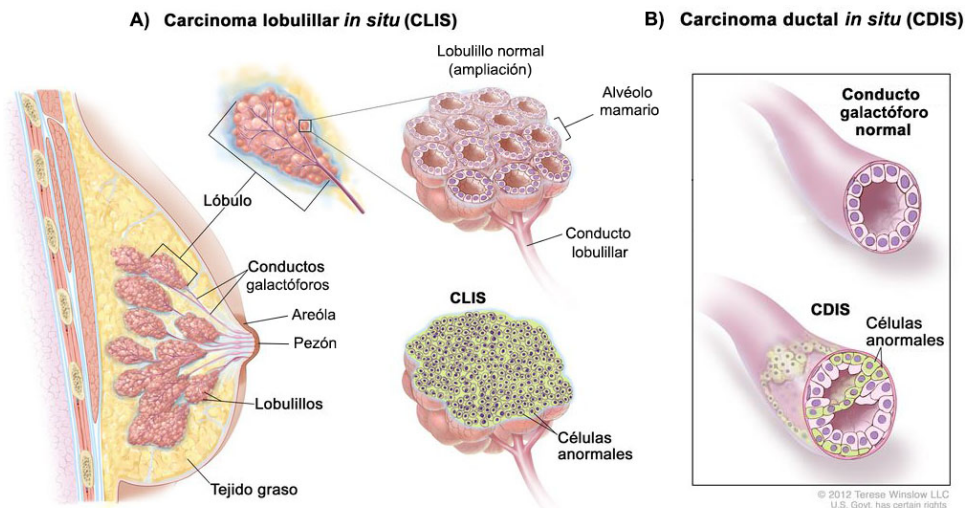


### 3. Marco Teórico

#### 3.1. Cáncer de mama

##### 3.1.1. Definición

El cáncer de mama se refiere a varios tipos de neoplasias que surgen del tejido mamario. Los dos tipos de cáncer de mama más comunes son el carcinoma lobulillar, que comienza en las células que componen la unidad terminal de los conductos lobulillares mamarios (**Figura 1A**) y el carcinoma ductal, que comienza en el revestimiento de los conductos galactóforos (**Figura 1B**) (National Cancer Institute, n.d.).



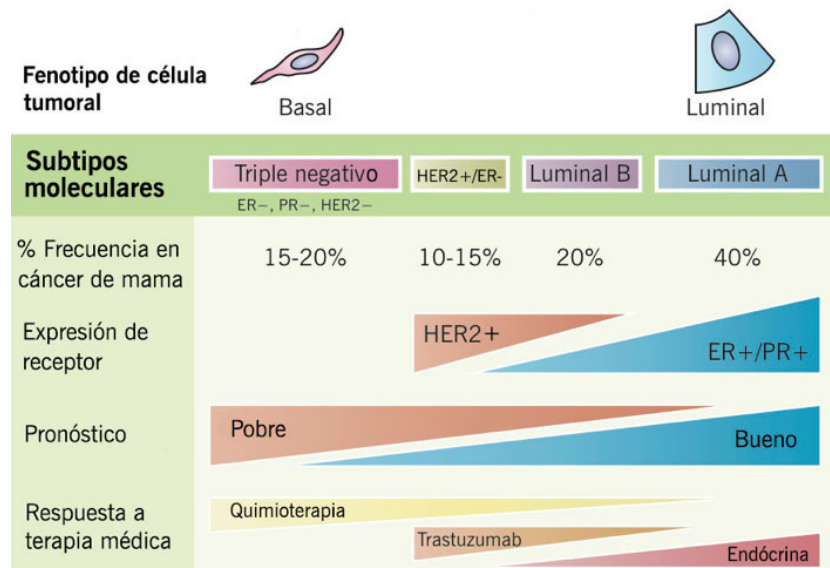
**Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria y los dos principales tipos de neoplasias que se originan a partir del tejido mamario. A.** Las ramificaciones de las glándulas alveolares se organizan en estructuras llamadas lobulillos. Las células que forman los alvéolos (o acinos mamarios) son las susceptibles de generar un CLIS; **B.** Los lóbulos drenan su producto en un conducto galactóforo. Las células que recubren este conducto son las susceptibles de generar un CDIS. CLIS: Carcinoma lobulillar *in situ*; CDIS: Carcinoma ductal *in situ*. Adaptado de Winslow, National Cancer Institute, 2012.

##### 3.1.2. Clasificación

Los avances en el análisis de los perfiles de expresión génica, utilizando técnicas genómicas, han revelado la alta heterogeneidad presente en los cánceres de mama

(Perou, et al., 2000; Sørlie, et al., 2001; Sørlie, et al., 2003). Estos enfoques han servido para identificar diferentes subgrupos de cáncer de mama en función de los patrones de expresión con características moleculares específicas que podrían subclasificar a estos tumores como carcinomas que expresan receptores de estrógenos (ER+) y tumores que no lo expresan (ER-) (Hergueta-Redondo, Palacios, Cano, & Moreno-Bueno, 2008). Además, el cáncer de mama se ha clasificado según la expresión del receptor de progesterona (PR), y la sobreexpresión/amplificación del oncogén *ERBB2* (también llamado *HER2/neu*) que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER2). Estos marcadores moleculares son particularmente importantes para predecir la respuesta clínica a tratamientos específicos y el pronóstico de la enfermedad (Sotiriou, et al., 2003; Nielsen, et al., 2004).

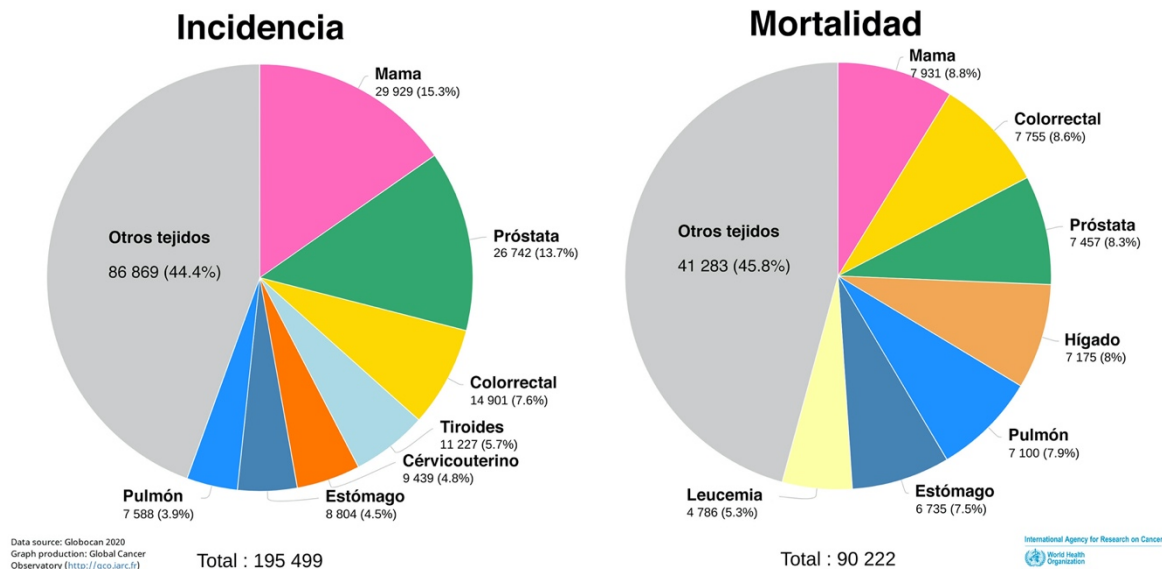
Los alvéolos y los ductos mamarios se organizan en estructuras tubulares tridimensionales que dependen en gran medida de una morfología polarizada, uniones especializadas célula-célula y uniones específicas a una membrana basal subyacente (McGee, Lanigan, Gilligan, & Groner, 2006). Las estructuras tubulares están revestidas por dos capas celulares: la capa epitelial localizada en el lumen (células luminales) y la capa mioepitelial en contacto con la membrana basal (células basales). En cuanto a los tumores de tipo basal o triple negativo, típicamente muestran una baja o nula expresión de HER2, ER y PR. Los tumores HER2+ (es decir, el gen amplificado y/o la proteína sobreexpresada) se clasifican en al menos 2 grupos de expresión distintos: aquellos que son ER- (HER2+/ER-), que típicamente se agrupan cerca de los tumores de tipo basal, y aquellos que son ER+ (y que también pueden ser PR+), los cuales se agrupan con los tumores de origen de células luminales como parte del subtipo luminal B. Los dos subtipos de tumores que expresan ER son el luminal A y luminal B. En comparación con los tumores luminal B, los tumores luminal A expresan niveles más altos de ER, mientras que los tumores luminal B expresan con mayor frecuencia el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-1 (HER1) y HER2 (**Figura 2**) (Carey, et al., 2006).



**Figura 2. Subtipos moleculares en función de la histología celular de cáncer de mama.** Luminal A (ER+/PR+, HER2-), luminal B (ER+/PR+, HER2+), de tipo basal o triple negativo (ER-/PR-, HER2-) y HER2+/ER-/PR-. ER: Receptor de estrógeno; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2; PR: receptor de progesterona. Adaptado de Sims, Howell, Howell, & Clarke, 2007; Wong & Rebelo, 2012.

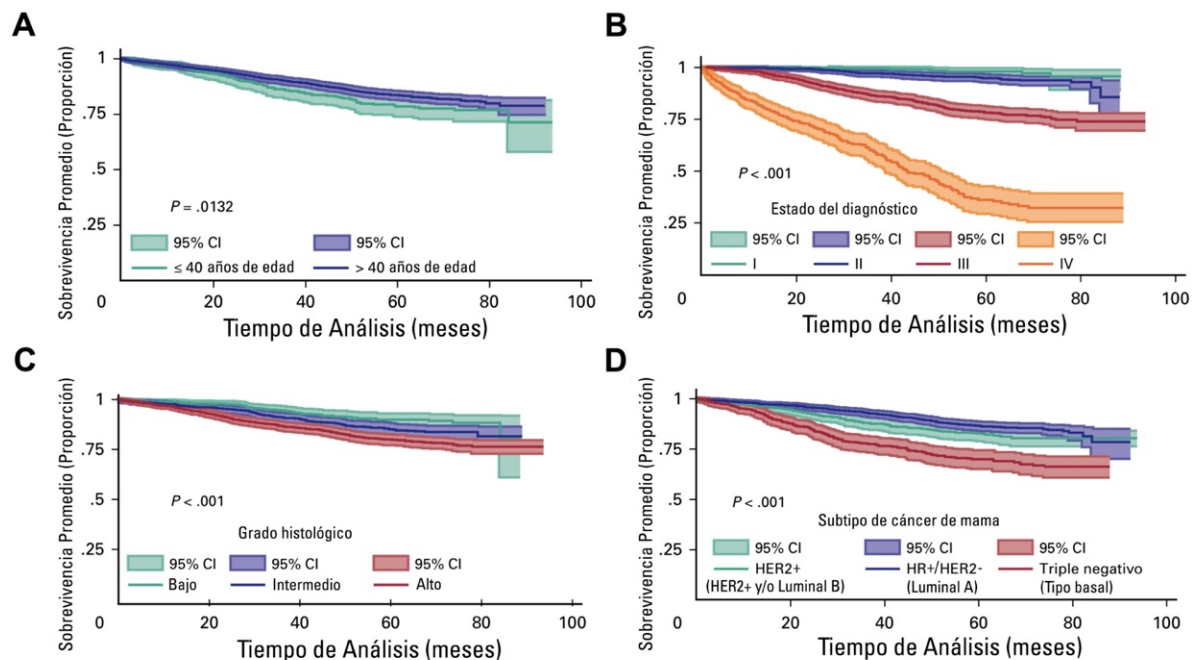
### 3.1.3. Epidemiología

En 2013, el cáncer de mama fue la cuarta causa de muerte en México con 75 229 defunciones que representan el 12.1% del total de muertes en el país (INEGI, 2013). El 45.4% de todas las muertes por cáncer se produjeron en población trabajadora (15 a 64 años) (Mohar-Betancourt, Reynoso-Noverón, Armas-Texta, Gutiérrez-Delgado, & Torres-Domínguez, 2017). Actualmente, el cáncer de mama es el primer lugar en prevalencia a 1, 3 y 5 años, en incidencia y en mortalidad (29 929 nuevos casos y 7 931 defunciones en 2020, respectivamente) sobre los diversos tipos de cáncer en México (Ferlay, et al., 2020) (**Figura 3**).



**Figura 3. Tasas brutas de incidencia y mortalidad de cáncer considerando población mexicana, ambos sexos y todas las edades.** Para cáncer, el resultado se expresa como una tasa anual por cada 100 000 personas en riesgo. Adaptado de la *International Agency for Research on Cancer*, 2020 (Ferlay, et al., 2020; Sung, et al., 2021).

Un estudio estadístico de cohorte señaló que, en pacientes mexicanas con cáncer de mama en etapa temprana, la supervivencia promedio (a cinco años) fue del 97%, mientras que para aquellas con enfermedad localmente avanzada fue del 82%, y para aquellas con enfermedad metastásica fue del 36% (Reynoso-Noverón, et al., 2017). Asimismo, se demostró que los siguientes factores estaban asociados con una peor supervivencia: edad  $\leq 40$  años (**Figura 4A**), estado avanzado en el momento del diagnóstico (**Figura 4B**), tumores lobulillares, alto grado histológico (**Figura 4C**) y subtipo tumoral triple negativo (**Figura 4D**) (Reynoso-Noverón, et al., 2017).



**Figura 4. Supervivencia promedio (a 5 años) de acuerdo con las características clínicas y demográficas relevantes en pacientes con cáncer de mama tratadas en México de 2007 a 2013.** **A.** Edad; **B.** Estado clínico en el momento del diagnóstico; **C.** Grado histológico; **D.** Subtipos de cáncer de mama. CI: intervalo de confianza; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2; HR: receptor hormonal (receptor de progesterona [PR] y receptor de estrógeno [ER]). Adaptado de Reynoso–Noverón, et al., 2017.

### 3.1.4. Factores de riesgo

Décadas de investigación básica, epidemiológica y clínica han llevado a la identificación de numerosos factores de riesgo de cáncer. Se sabe que más de la mitad de todos los casos de cáncer en el mundo son atribuibles a causas prevenibles, incluido el consumo de alcohol y tabaco, la mala alimentación, la inactividad física y la obesidad (Emmons & Colditz, 2017). Sin embargo, existen factores de riesgo específicos asociados con el cáncer de mama:

- **Género:** El género femenino es el principal factor de riesgo en el cáncer de mama. El riesgo de por vida para un hombre es de 1:833 (American Cancer Society, 2018) en comparación con 1:8 para una mujer (**Tabla 1**) (American Cancer Society, 2017).

- **Edad:** El riesgo incrementa conforme la edad avanza. Las probabilidades por edad para desarrollar cáncer de mama en un período de 10 años se proporcionan en la **Tabla 1**. El 81% de los cánceres de mama se diagnostican en mujeres de 50 años o más, y el 89% de las muertes por cáncer de mama también ocurren en este grupo de edad. La edad media al diagnóstico para las mujeres con cáncer de mama es de 62 años (DeSantis, Ma, Sauer, Newman, & Jemal, 2017).

**Tabla 1. Probabilidades por edad de desarrollar cáncer de mama invasivo para mujeres de Estados Unidos de América**

EDAD	PROBABILIDAD A 10 AÑOS <sup>a</sup>	Ó 1 EN:
20	0.1%	1,567
30	0.5%	220
40	1.5%	68
50	2.3%	43
60	3.4%	29
70	3.9%	25
Riesgo de por vida	12.4%	8

a. La probabilidad está entre las personas libres de cáncer al comienzo de cada intervalo de edad según los pacientes diagnosticados desde 2012 hasta 2014. Adaptado de DeSantis, Ma, Sauer, Newman, & Jemal, 2017.

- **Historia familiar:** Los antecedentes familiares son un factor de riesgo importante en casi todos los cánceres y presentan un patrón de herencia autosómico dominante (Daly, et al., 2016). Las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama tienen un mayor riesgo de la enfermedad (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). Aproximadamente del 10% al 15% de todos los casos de cáncer de mama se consideran familiares (Foulkes, 2008).
- **Mutaciones en *BRCA1/2*:** Aproximadamente del 3 al 5% de todos los cánceres de mama se deben a mutaciones en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama *BRCA1* y *BRCA2* (Daly, et al., 2010; Hemel & Domchek, 2010), que están implicados en la reparación de ruptura de DNA de doble cadena por recombinación homóloga (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006; O'Donovan & Livingston, 2010). Las mutaciones en *BRCA1* causan un riesgo de por vida de 60 a 80% de cáncer de

mama; para *BRCA2* estas cifras son ligeramente más bajas con respecto a *BRCA1*, del 40% al 60% (Chen & Parmigiani, 2007; Mavaddat, et al., 2013).

- **Historia reproductiva:** La edad temprana en la menarquia (<13) y la edad avanzada en la menopausia ( $\geq 50$ ) aumentan el riesgo de contraer cáncer de mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012).

La diferenciación celular inducida por el embarazo y otros cambios biológicos confieren una reducción a largo plazo del riesgo de cáncer de mama (Russo & Russo, 2011; Meier-Abt, et al., 2013). La edad tardía en el primer parto y la nuliparidad estimulan preferentemente el crecimiento de los carcinomas de mama lobulillares (Newcomb, et al., 2011).

### 3.1.5. Papel de las hormonas en el cáncer de mama

Aproximadamente, más de dos tercios de todos los cánceres de mama diagnosticados se clasifican como hormono-dependientes, lo que indica que las hormonas son los factores clave que impulsan el crecimiento de estos cánceres (Subramani, Nandy, Pedroza, & Lakshmanaswamy, 2017). Distintos estudios de laboratorio y epidemiológicos respaldan una relación entre las hormonas endógenas y un mayor riesgo de varios cánceres femeninos (Henderson B. E., Ross, Pike, & Casagrande, 1982; Henderson, Ross, & Bernstein, 1988; Hulka, 1997; Xie, Tsao, & Wong, 1999; Henderson & Feigelson, 2000; Clemons & Goss, 2001). En estudios epidemiológicos, se han observado asociaciones constantes entre el riesgo de cáncer de mama, ovario y endometrio y los factores de riesgo reproductivos y hormonales, como el alto índice de masa corporal (IMC) posmenopáusico y el uso de terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopáusicas, que sugieren la importancia de las hormonas endógenas y exógenas en la etiología de estas enfermedades (Brown & Hankinson, 2015).

La relación entre los estrógenos circulante en mujeres y el riesgo de cáncer de mama está bien establecida, con un riesgo aproximadamente 2 veces mayor (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Estudios prospectivos de niveles de estradiol y riesgo de cáncer de mama**

<b>[Estradiol] Caso/ Control (pmol/L)</b>	<b>RR (95% CI) *</b>	<b>Referencia</b>
Varios (reanálisis de 9 estudios prospectivos)	<b>2.0</b> (1.5–2.7)	(Key, Appleby, Barnes, Reeves, & EHBCCG, 2002)
6.9/13.5 & 10.6/5.4	<b>1.7</b> (1.0–2.9)	(Manjer, et al., 2003)
88.86/81.78	<b>2.5</b> (1.5–4.2)	(Zeleniuch-Jacquotte, et al., 2004)
99.1/89.7	<b>2.3</b> (1.6–3.2)	(Kaaks, et al., 2005)
NA	<b>1.6</b> (1.0–2.6)	(Gunter, et al., 2009)
22.1/19.2	<b>1.5</b> (0.9–2.5)	(Sieri, et al., 2009)
37/28	<b>6.4</b> (2.8–14.9)	(Woolcott, et al., 2010)
57.00/57.00	<b>1.4</b> (0.9–2.4)	(Baglietto, et al., 2010)
36.00/36.65	<b>2.1</b> (1.2–3.6)	(Fuhrman, et al., 2012)
8.8/7.3 pg/mL & 8.6/6.9 pg/mL	<b>2.0</b> (1.6–2.7)	(Zhang, Tworoger, Eliassen, & Hankinson, 2013)

\*contraste de la categoría superior contra inferior. Tabla adaptada de (Brown & Hankinson, 2015).



## 3.2. Receptores de estrógenos (ER)

### 3.2.1. Generalidades

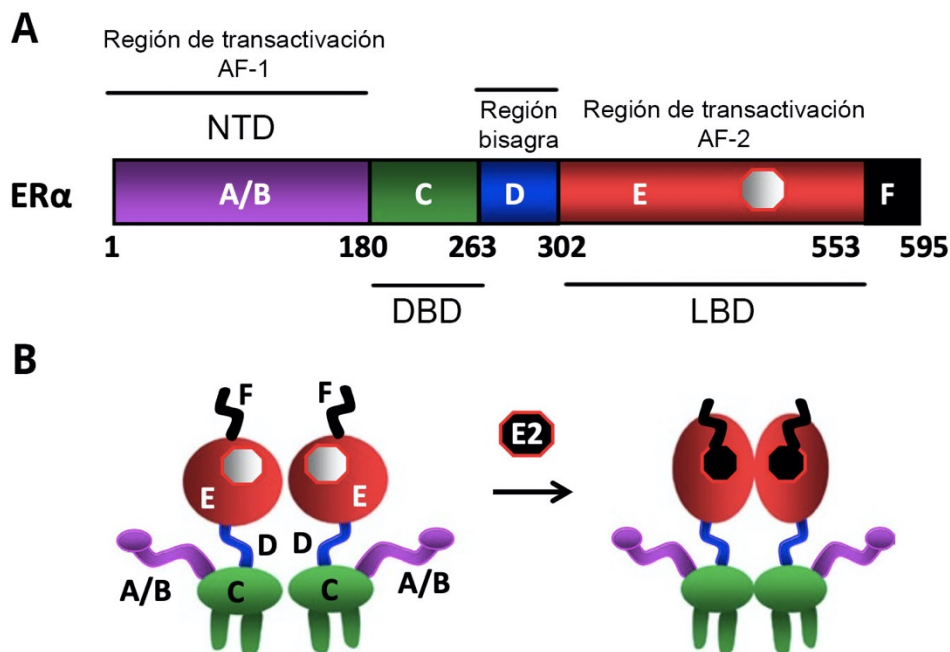
La familia de receptores de hormonas esteroides (SHR) agrupa a los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR), andrógenos (AR), glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) (Mangelsdorf, et al., 1995). Los miembros de esta familia comparten una gran similitud en su secuencia y un alto grado de conservación en su estructura tridimensional y dominios funcionales (Beato & Klug, 2000; Robinson-Rechavi, Escriva-Garcia, & Laudet, 2003; Griekspoor, Zwart, Neefjes, & Michalides, 2007).

Las acciones biológicas del  $17\beta$ -estradiol (E2) son mediadas por su unión a ER $\alpha$  y ER $\beta$ , los dos receptores de estrógenos clásicos. Estos receptores muestran patrones de expresión tejido específicos y regulan procesos celulares distintos (Denger, Reid, Heike, Martin, & Gannon, 2001; Leitman, et al., 2012; Lee, Kim, & Choi, 2012). En el cáncer de mama, la evidencia experimental y clínica ha mostrado que ER $\alpha$  es el regulador clave en la etiología y progresión del cáncer (Girdler & Brotherick, 2000; Chang, Frasor, Komm, & Katzenellenbogen, 2006; Deroo & Korach, 2006).

Los dos subtipos principales de receptores de estrógenos: ER $\alpha$  y ER $\beta$ , son codificados por los genes *ESR1* (Green, et al., 1986) y *Esr2* (Mosselman, Polman, & Dijkema, 1996), y están ubicados en los cromosomas 6 y 14, respectivamente. Ambos ER pertenecen a la familia de los SHRs o factores de transcripción inducibles por ligando (Mangelsdorf, et al., 1995), y son activados por hormonas esteroideas femeninas (estrógenos), principalmente el  $17\beta$ -estradiol (E2) (Anstead, Carlson, & Katzenellenbogen, 1997), que puede atravesar la membrana plasmática e interactuar directamente con los ER dentro de la célula. Una vez activados, los ER regulan la transcripción de sus genes blanco que controlan una amplia variedad de procesos biológicos, como la proliferación celular, el desarrollo, metabolismo y reproducción (Hye-Rim, Tae-Hee, & Kyung-Chul, 2012).

### 3.2.2. Receptor de estrógenos (ER $\alpha$ )

El ER $\alpha$  es un factor de transcripción de 595 aminoácidos y peso molecular de 66 kDa que comparte su estructura con los miembros de la familia de SHRs, la cual está organizada en 5 dominios funcionales (**Figura 5**):

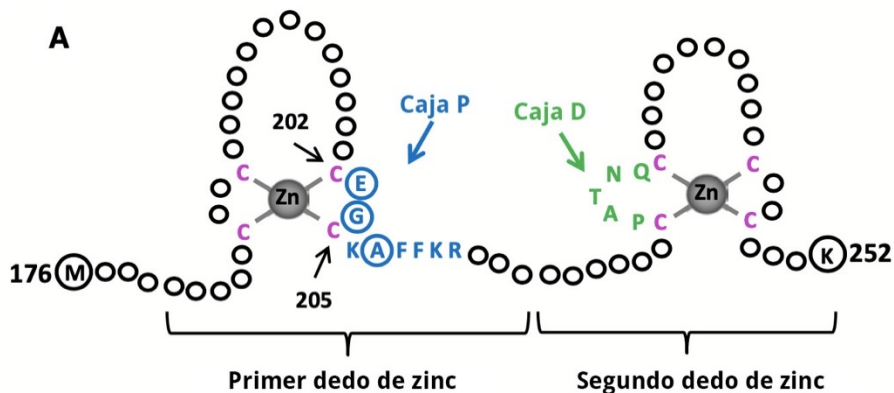


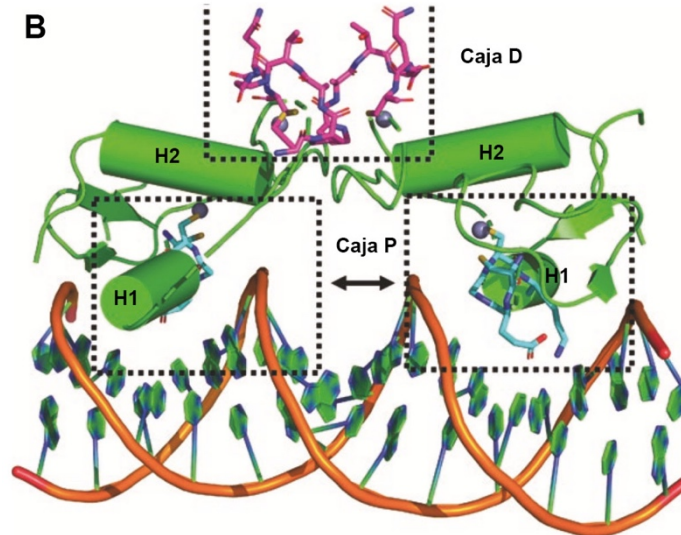
**Figura 5: Estructura de ER $\alpha$ .** **A.** El receptor de estrógenos  $\alpha$  está compuesto por 595 aminoácidos y se divide en 5 dominios diferentes. AF: *Activating Function*, DBD: Dominio de unión a DNA, E2: 17 $\beta$ -estradiol, LBD: Dominio de unión a ligando, NTD: Dominio amino terminal. **B.** ER $\alpha$  como dímero con o sin ligando (E2: 17 $\beta$ -estradiol) cuya unión induce cambios conformacionales en los receptores. Adaptado de (Yaşar, Ayaz, User, Güpür, & Muyan, 2017).

- **Dominio amino terminal (NTD**, por sus siglas en inglés): Está localizado en la parte más variable de receptor en términos de homología y tamaño respecto a los demás SHRs (Kumar & Litwack, Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain, 2009). Contiene al AF-1 (*Activating Function 1*) que es un dominio de transactivación independiente de ligando, ya que diferentes fosforilaciones en distintos residuos de serina, mediante MAPK6 (Kato, et al., 1995), GSK-37 (Medunjanin, et al., 2005), Ciclina/CDK28 (Rogatsky, Trowbridge, & Garabedian, 1999) o PKC (Hernández-Rojas, et al., 2022)

entre otros, pueden activar al ER $\alpha$  permitiendo su dimerización y su translocación al núcleo.

- **Dominio de unión a DNA (DBD, por sus siglas en inglés):** Es el dominio más conservado de los SHRs y está involucrado en mediar la capacidad del ER $\alpha$  para unirse a secuencias específicas de DNA y de su dimerización. Estas capacidades están mediadas a través de dos motivos de dedos de zinc, cada uno formados a su vez por un ion Zn<sup>2+</sup> tetraédricamente coordinado con cuatro residuos de cisteína (Yaşar, Ayaz, User, Güpür, & Muyan, 2017) (**Figura 6A**). Cada motivo de zinc se une a una  $\alpha$ -hélice (del extremo amino del mismo ER $\alpha$ ) a través de la unión del ion (Schwabe, Chapman, Finch, & Rhodes, 1993). Las dos hélices resultantes (H1 y H2) se orientan perpendicularmente entre sí y se cruzan en sus puntos medios (Schwabe, Chapman, Finch, & Rhodes, 1993) (**Figura 6B**). Los distintos residuos de la región del primer motivo de dedos de zinc, llamada caja P, en particular Glu203, Gly204 y Ala207, determinan la especificidad de unión al DNA que es fundamental para la interacción con los Elementos de Respuesta a Estrógenos (EREs, visto con más detalle posteriormente) (Kumar, et al., 2011; Yaşar, Ayaz, User, Güpür, & Muyan, 2017). Los residuos del segundo motivo de dedos de zinc, la caja D, están involucrados interacción proteína–proteína entre dos monómeros ER $\alpha$ , es decir, la dimerización de ER $\alpha$  (Kumar, et al., 2011; Yaşar, Ayaz, User, Güpür, & Muyan, 2017).





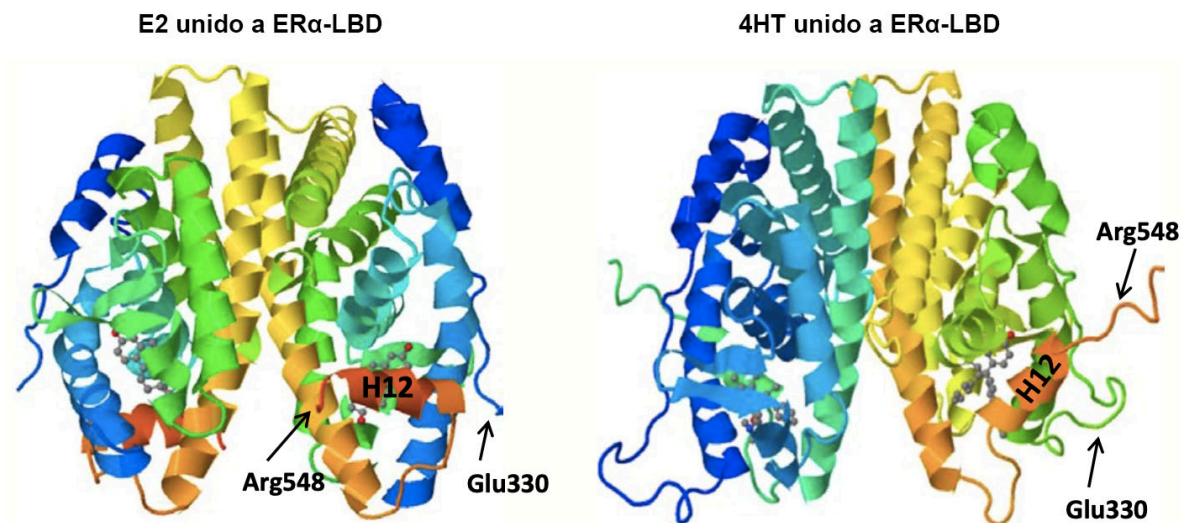
**Figura 6: Estructura del dominio DBD de ER $\alpha$ :** **A.** El DBD de ER $\alpha$  contiene dos dedos de zinc que están formados por un ion Zn $^{2+}$  (gris) que está coordinado por cuatro residuos de cisteína (rosa). En azul una región del primer motivo de dedos de zinc, llamada caja P, que contiene los aminoácidos Glu203, Gly204 y Ala207 y determinan la especificidad de unión de ER $\alpha$  al DNA que es crítica para su unión al ERE. En verde la región del segundo motivo de dedos de zinc, llamada caja D, la cual está involucrada en la dimerización de ER $\alpha$ . Adaptado de (Yaşar, Ayaz, User, Güpür, & Muyan, 2017). **B.** Estructura cuaternaria de ER $\alpha$ -DBD como dímero unido a su secuencia de DNA blanco. Adaptado de (Zhang X. , 2019).

- **Dominio/región bisagra:** El dominio D, originalmente visto como un enlazador flexible entre el DBD y el LBD, es importante para los cambios conformacionales adecuados de ER $\alpha$  (Zwart, et al., 2010), además de intervenir en la localización nuclear del receptor al contener una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) (Picard, Kumar, Chambon, & Yamamoto, 1990; Ylikomi, Bocquel, Berry, Gronemeyer, & Chambon, 1992) e incluso se ha demostrado que interviene en el mecanismo de regulación transcripcional selectiva de ER $\alpha$  (Burns, Li, Arao, Petrovich, & Korach, 2011).
- **Dominio de unión a ligando (LBD,** por sus siglas en inglés): Además de formar la cavidad donde se une el ligando, contiene un dominio de activación transcripcional AF-2 (*Activating Function 2*), dependiente de ligando. Adicionalmente, también interviene en la dimerización del receptor. El ER $\alpha$ -LBD se compone de 12  $\alpha$ -hélices

las cuales se organizan en un plegamiento helicoidal antiparalelo de tres capas: la capa central está formada por las hélices H5/6, H9 y H10, esta capa está emparejada entre las capas L1 (H1-4 y H7) y L2 (H8 y H11), creando una cavidad de unión a ligando. Los elementos estructurales secundarios restantes, una hoja  $\beta$  antiparalela de dos hebras (S1 y S2) y la H12, dinámicamente móvil, flanquean a las tres principales capas (Brzozowski, et al., 1997; Pike, Brzozowski, & Hubbard, 2000; Zhang X. , 2019).

El reconocimiento del ligando se logra a través de puentes de hidrógeno y de la complementariedad de los residuos hidrofóbicos (que recubren la cavidad de unión a ligando) con la naturaleza no polar de los ligandos de ER $\alpha$  (Pike, Brzozowski, & Hubbard, 2000; Vajdos, et al., 2007). De manera que, la unión de un ligando agonista coloca a la H12 sobre la cavidad de manera perpendicular a la interfaz de dimerización (Brzozowski, et al., 1997; Pike, Brzozowski, & Hubbard, 2000; Yaşar, Ayaz, User, Güpür, & Muyan, 2017) (**Figura 7**). Este posicionamiento de H12 es un requisito previo para la activación transcripcional ya que genera una región de activación dependiente del ligando capaz de interactuar con los coactivadores (Brzozowski, et al., 1997; Pike, Brzozowski, & Hubbard, 2000; Vajdos, et al., 2007). De manera contraria, la unión de un ligando antagonista puro o un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM, por sus siglas en inglés) evita que la H12 de ER $\alpha$  se acople en la conformación agonista (**Figura 7**). Este cambio conformacional en H12 conduce a la ocupación de la hendidura de unión a ligando, evitando así la unión de coactivadores y la posterior activación de la transcripción (Brzozowski, et al., 1997; Shiau, et al., 1998; Zhang X. , 2019).

Aunque el ER $\alpha$ -DBD contribuye a la dimerización del receptor, el dominio de dimerización es creado predominante por la H11, residuos de H8 y bucles de H9/H10 de cada monómero ER $\alpha$ -LBD (Tamrazi, Carlson, Daniels, Hurth, & Katzenellenbogen, 2002).



**Figura 7: Estructura del dominio LBD de ER $\alpha$ :** Estructura cuaternaria de ER $\alpha$ -LBD como dímero unido a 17 $\beta$ -estradiol (E2) o 4-hidroxitamoxifen (4HT). La unión de E2 induce un cambio conformacional en el ER $\alpha$ -LBD que posiciona a la H12 sobre la cavidad de unión al ligando. Este posicionamiento genera una superficie para las interacciones con coactivadores. La unión de 4HT evita que H12 se acople en la conformación agonista, evitando eficazmente la unión del coactivador y la activación de la transcripción. Adaptado de (Yaşar, Ayaz, User, Güpür, & Muyan, 2017).

- **Dominio carboxilo terminal F:** Tiene un papel en la modulación de la actividad transcripcional, la dimerización, la estabilización del receptor y el reclutamiento de coactivadores (Montano, Müller, Trobaugh, & Katzenellenbogen, 1995; Koide, et al., 2007; Arao, Hamilton, Coons, & Korach, 2013).

### 3.2.3. Mecanismo clásico de activación ligando dependiente

Existen cuatro diferentes mecanismos de acción de los estrógenos mediante los cuales el ER puede ejercer la transcripción de sus genes blanco: **1)** mecanismo clásico dependiente de ligando, **2)** mecanismo independiente de ERE, **3)** mecanismo independiente de ligando y **4)** mecanismo indirecto de señalización no genómico (**Figura 8**).

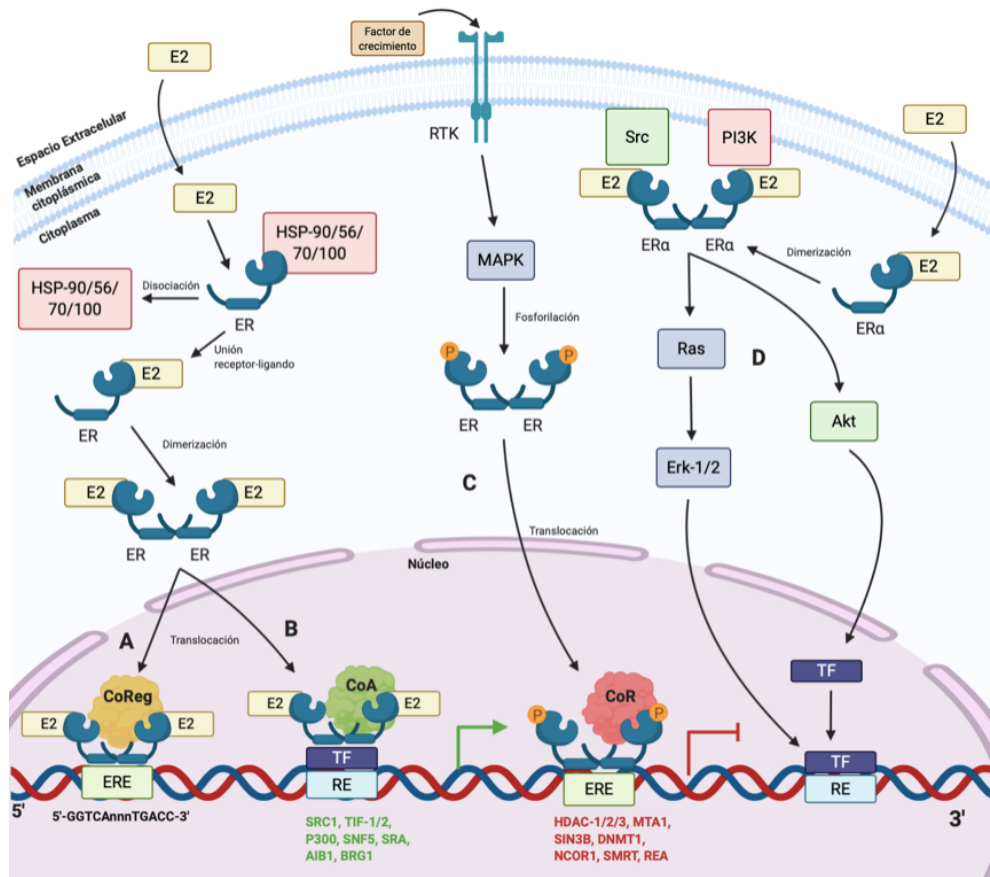
Los ER se localizan mayoritariamente en el citoplasma celular, en complejo con múltiples proteínas chaperonas que lo mantienen estable y accesible para la interacción con ligando, principalmente Hsp90 (proteína de choque térmico 90) (Chambraud, Berry, Redeuilh, Chambon, & Baulieu, 1990; Smith & Toft, 1993); sin embargo, recientemente se ha documentado que los ERs también se asocian con las Hsp56, Hsp70 y Hsp100 (Dhamad, Zhou, Zhou, & Du, 2016). La unión del ligando,  $17\beta$ -estradiol, con el ER (ER-E2) desencadena los cambios conformacionales que conducen a la disociación del complejo ER-Hsp, la heterodimerización y consecuente activación del ER (Beekman, Allan, Tsai, Tsai, & O'Malley, 1993; Wang, et al., 1995; Cowley, Hoare, Mosselman, & Parker, 1997), y la entrada al núcleo (Kocanova, Mazaheri, Caze-Subra, & Bystricky, 2010) (**Figura 8**). Los SHR pueden existir como monómeros, homodímeros o heterodímeros y reconocen secuencias de DNA denominadas elementos de respuesta hormonal (HRE) específicas derivados de pares de secuencias palindrómicas con el consenso: 5'-**RGGTCA**-3' (donde R es una purina) separadas por tres bases (Sever & Glass, 2013) que se encuentran en las regiones reguladoras río arriba de sus genes blanco. Específicamente, el elemento de respuesta a estrógeno (ERE) se trata de una secuencia esencial para la capacidad de respuesta génica al estrógeno (Notides, Lerner, & Hamilton, 1981; Kumar & Chambon, 1988; Klinge C. M., 2001). Se han identificado muchos genes que contienen EREs (Klinge C. M., 2001), y la mayoría de estos EREs contienen uno o más cambios de la secuencia consenso: un segmento de 13 nucleótidos con 10 nucleótidos que forman una repetición invertida: 5'-**GGTCA**nnn**TGACC**-3' (Klein-Hitpass, Ryffel, Heitlinger, & Cato, 1988; Wahli, Martinez, Corthésy, & Cardinaux, 1989).

Aunque la función de ER está fuertemente activada por la unión de ligando (mediante el LBD), la función de también está regulada por modificaciones post-traduccionales (MPT), más específicamente por la fosforilación. Esta MPT en el ER ocurre en varios sitios, la mayoría ubicados en el NTD, y está regulada por mecanismos tanto independientes como de unión a ligando. Los sitios de fosforilación de ER contribuyen a la regulación de múltiples actividades funcionales,

tales como la sensibilidad hormonal, localización nuclear, unión al DNA, interacciones proteína-cromatina y transcripción génica (Anbalagan & Rowan, 2015).

El papel en la transcripción génica depende en gran medida de la interacción del complejo ER-ERE con factores de transcripción pioneros (Magnani, Eeckhoute, & Lupien, 2011; Jozwik & Carroll, 2012; Manavathi, Samanthapudi, & Gajulapalli, Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development, 2014) y proteínas correguladoras: coactivadores (CoA) o correpresoras (CoR) (Shibata, et al., 1997; Klinge C. , 2000; Edwards, 2000; Klinge, Jernigan, Mattingly, Risinger, & Zhang, 2004; Watson, Fairall, & Schwabe, 2012). Los correguladores forman grandes complejos multiprotéicos específicos que están determinados por el tipo de ligando, el contexto celular y el contexto del promotor, por lo tanto, la interacción con los correguladores supone un punto de regulación adicional para la señalización de los SHR.





**Figura 8 Mecanismos de acción del receptor de estrógenos.** **A.** Mecanismo clásico dependiente de ligando; **B.** mecanismo no clásico o independiente de ERE, en donde el ER interacciona con factores de transcripción como AP1; **C.** mecanismo independiente de ligando, el cual activa el ER mediante fosforilación inducida por factores de crecimiento; **D.** mecanismo indirecto de señalización no genómico, el cual involucra bajas cantidades de ER localizado cerca de la membrana plasmática que, a través del reclutamiento de proteínas cinasas (Src y PI3K), activan vías de señalización (Akt, MAPK). Todos estos mecanismos convergen en la proliferación y supervivencia celular. CoReg: Corregulador; E2: 17β-estradiol; ER: receptor de estrógenos; ERE: elemento de respuesta a estrógenos; Hsp: proteína de choque térmico; RE: elemento de respuesta; RTK: Receptor tirosina cinasa; TF: factor de transcripción. Tomado de (Le Romancer, et al., 2011).

### 3.3. MAD2B, REV7, MAD2L2

#### 3.3.1. Generalidades

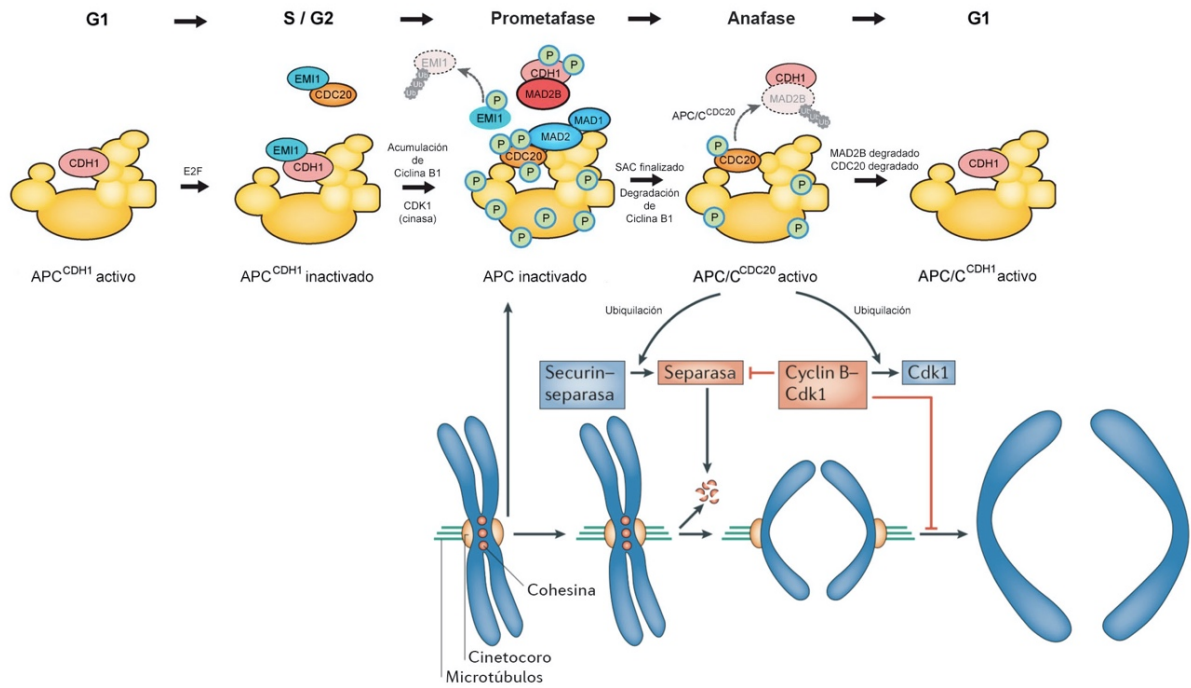
El gen *MAD2L2* (de *Mitotic Arrest Deficient 2 Like 2*) es un gen que se localiza en el brazo corto del cromosoma 1p36 (Cahill, et al., 1999; Murakumo, et al., 2000) y codifica para la proteína de punto de control de ensamblaje del huso mitótico MAD2B (también conocido como REV7) de 211 aminoácidos y 23.344 kDa (The UniProt Consortium, 2021).

#### 3.3.2. Función

Tanto MAD2 como su homólogo MAD2B son capaces de interactuar con diferentes proteínas y están envueltas en distintos procesos biológicos principalmente la inhibición de la activación del complejo promotor de la anafase (APC, por sus siglas en inglés) (Li, Gorbea, Mahaffey, Rechsteiner, & Benezra, 1997; a.Fang, Yu, & Kirschner, 1998; Chen & Fang, 2001; Pflieger, Salic, Lee, & Kirschner, 2001; Peters, 2006; Listovsky & Sale, 2013; Bhat, Wu, Maher, McCormick, & Xiao, 2015). El APC es una ubiquitin ligasa (E3) que, mediante la degradación de la securina, promueve la segregación cromosómica (Watson, Brown, Peters, Stark, & Schulman, 2019; Schrock, Stromberg, Scarberry, & Summers, 2020). Debido a que el APC es esencial para la progresión correcta y ordenada del ciclo celular, su activación es un proceso altamente coordinado por una red de factores regulatorios que incluyen principalmente a las proteínas: MAD2, MAD2B, EMI1, CDC20 y CDH1 (a.Fang, Yu, & Kirschner, 1998; b.Fang, Yu, & Kirschner, 1998; Peters, 2006; Listovsky & Sale, 2013). Mientras que CDC20 y CDH1 funcionan como activadores del APC e interactúan directamente con este complejo en un orden temporal específico (Kramer, Scheuringer, Podtelejnikov, Mann, & Peters, 2000; Qiao, et al., 2016), MAD2 inhibe la activación del APC al asociarse preferentemente con APC<sup>CDC20</sup> (Li, Gorbea, Mahaffey, Rechsteiner, & Benezra, 1997; a.Fang, Yu, & Kirschner, 1998; Reimann, Gardner, Margottin-Goguet, & Jackson, 2001) y MAD2B inhibe al APC principalmente a través de su interacción con CDH1 (**Figura 9**) y en menor medida

con CDC20 (Pfleger, Salic, Lee, & Kirschner, 2001; Reimann, Gardner, Margottin-Goguet, & Jackson, 2001; Listovsky & Sale, 2013). De manera similar, EMI1 es capaz de inactivar al complejo APC<sup>CDH1</sup> (Reimann, Gardner, Margottin-Goguet, & Jackson, 2001) y a CDC20 en fase S del ciclo celular promoviendo la acumulación de la Ciclina B1 (Reimann, et al., 2001).

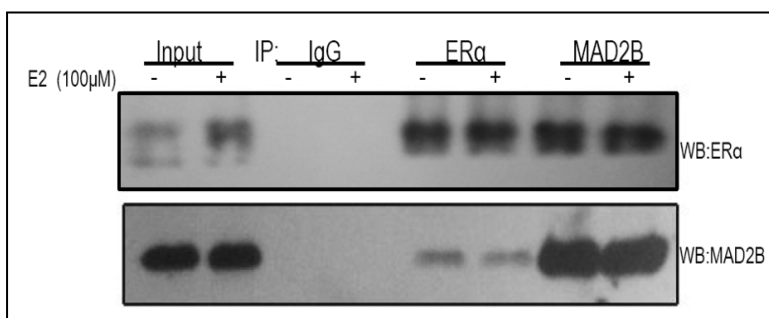
El complejo Ciclina B1/CDK1 fosforila al complejo APC y a CDH1 lo cual reduce su capacidad para unirse y activar al APC (Zachariae, Schwab, Nasmyth, & Seufert, 1998), no obstante, la fosforilación del APC promueve la unión de CDC20, pero no es suficiente para activarlo ya que MAD2 inhibe a APC<sup>CDC20</sup> (Li, Gorbea, Mahaffey, Rechsteiner, & Benezra, 1997; a.Fang, Yu, & Kirschner, 1998; Reimann, Gardner, Margottin-Goguet, & Jackson, 2001) (**Figura 9**). Para llevar a cabo su función MAD2 requiere de la interacción con MAD1, otra proteína del *checkpoint* mitótico, por lo que su efecto inhibitorio está mediado por la formación de complejos MAD1–MAD2 (Sironi, et al., 2001; Luo, Tang, Rizo, & Yu, 2002; Sironi, et al., 2002; De-Antoni, et al., 2005). Por su parte, EMI1 es degradada en respuesta a la fosforilación dependiente de Ciclina B1/CDK1 (Margottin-Goguet, et al., 2003). Cabe resaltar que la fosforilación del APC y CDH1 no es el único mecanismo para prevenir la activación del APC ya que MAD2B contribuye a la inhibición del APC<sup>CDH1</sup> secuestrando a CDH1 (Listovsky & Sale, 2013) (**Figura 9**). Contrario a MAD2, la actividad inhibitoria de MAD2B no requiere de su interacción con MAD1 (Chen & Fang, 2001). Una vez que el punto de control de ensamblaje del huso mitótico (SAC, por sus siglas en inglés) es completado y la anafase es iniciada, APC<sup>CDC20</sup> degrada a MAD2B y libera a CDH1. CDH1 y APC son desfosforiladas permitiendo que CDH1 se vuelva a unir al APC en la fase G1 (**Figura 9**). Así, el secuestro de CDH1 por MAD2B previene la activación prematura del APC (Listovsky & Sale, 2013).



**Figura 9. Mecanismo de inhibición de la activación del complejo promotor de la anafase (APC) y regulación del punto de control de ensamblaje del huso mitótico (SAC).** Durante la prometafase, las proteínas del SAC, como MAD2 y MAD2B, se activan en los cinetocoros. MAD2/MAD2B activados inhiben la capacidad del APC<sup>Cdc20</sup> para ubiquitar a la securina y al complejo Ciclina B/CDK1 y, por lo tanto, prevenir la anafase y la salida mitótica. Entre la metafase y la anafase, el APC<sup>Cdc20</sup> activa a la separasa e inactiva el complejo Ciclina B/CDK1 (como mecanismo de regulación negativa). La separasa escinde los complejos de cohesina que mantienen juntas las cromátidas hermanas y, por lo tanto, inician la separación de las cromátidas hermanas. Adaptado de (Peters, 2006; Listovsky & Sale, 2013).

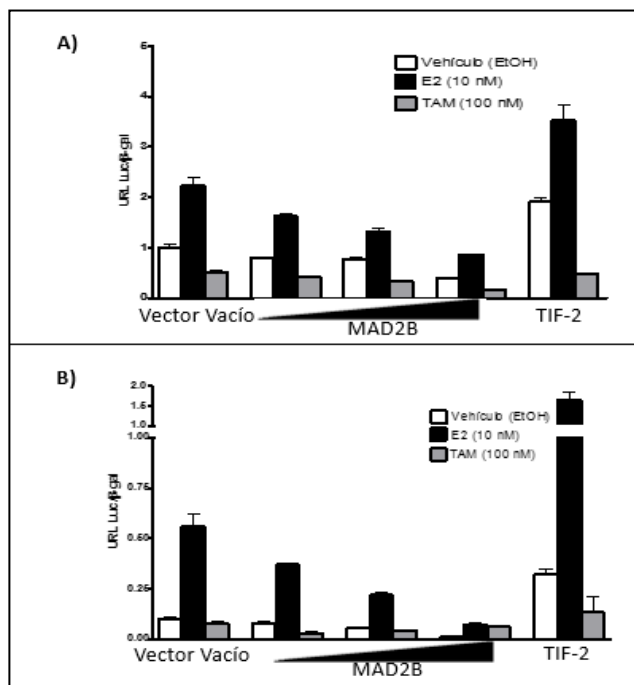
#### 4. Antecedentes

En nuestro laboratorio se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras, donde se detectó a MAD2B como una proteína que interactúa con la región N terminal del ER $\alpha$  (Noriega-Reyes, et al., 2015). La interacción se comprobó a través de los ensayos de coimmunoprecipitación realizados en células T47-D. Mediante *Western Blot*, se observa que cuando se inmunoprecipita al ER $\alpha$  se puede detectar la presencia de MAD2B y al inmunoprecipitar a MAD2B se puede detectar al ER $\alpha$ . Así mismo, se puede observar que la interacción entre MAD2B y ER $\alpha$  es independiente de 17 $\beta$ -estradiol (E2) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Interacción de MAD2B y ER $\alpha$  en células de cáncer de mama T47-D. Las células fueron colectadas tras 24 horas de tratamiento hormonal y se realizó la inmunoprecipitación con los anticuerpos de MAD2B, ER $\alpha$  e IgG (control negativo). Posteriormente se realizó el *Western blot* para la detección de ER $\alpha$  y MAD2B.

Adicionalmente, con el fin de determinar si MAD2B puede modificar la actividad del ER $\alpha$  en ausencia o presencia de ligandos agonistas y antagonistas, se llevaron a cabo ensayos de actividad transcripcional con reporteros de luciferasa en las líneas celulares MDA-MB-231 y CV1 que no expresan el ER $\alpha$ , por lo que se transfeció un plásmido de expresión de este receptor (pSG5-ER $\alpha$ ). Los resultados mostraron que la sobreexpresión de MAD2B inhibe la actividad transcripcional del ER $\alpha$  en presencia de E2 y de tamoxifén, sugiriendo que MAD2B podría ser un correpresor del ER $\alpha$  (**Figura 11**).



**Figura 11. Efecto de MAD2B sobre la actividad transcripcional de ER $\alpha$ .** **A)** CV-1 células de riñón de mono verde ER $\alpha$  negativas. **B)** MDA-MB-231 células de cáncer de mama ER $\alpha$  negativas. Las células fueron tratadas por 48 horas con E2 (10 nM), Tamoxifen (100 nM) y vehículo (etanol). Se transfectaron concentraciones crecientes de MAD2B (100–200 ng), se utilizó al vector vacío (pCMV5) como control negativo y TIF-2 como control positivo al interaccionar con el ER $\alpha$  de una manera dependiente de ligando potenciando su actividad transcripcional (Flaveny, Kumar, & Perdew, 2010).

## 5. Planteamiento del problema

En el laboratorio, se utilizó el sistema del doble híbrido en levaduras para detectar proteínas que interactúan con la región amino-terminal de ER $\alpha$  (aminoácidos 1–180). Se lograron aislar varias clonas que fueron secuenciadas identificando fragmentos de varios genes diferentes, entre los cuales se encontró a MAD2B. Además, un ensayo de *GST-Pulldown* demostró que MAD2B interactúa principalmente con ER $\alpha$  a través del dominio amino-terminal, independientemente de estímulo hormonal. Adicionalmente en el mismo grupo de investigación, se ha comprobado el efecto inhibitorio de MAD2B sobre la actividad transcripcional mediada por ER $\alpha$  (transfectado) en líneas celulares sugiriendo una actividad de MAD2B como correpresor de ER $\alpha$ . Sin embargo, los mecanismos específicos que

conlleven esta actividad no se encuentran dilucidados y la determinación de la actividad transcripcional de ER $\alpha$  dependiente de MAD2B no se ha llevado a cabo en líneas celulares de cáncer de mama positivas para el receptor.

## 6. Hipótesis

Si MAD2B es un correpresor transcripcional de ER $\alpha$ , entonces mediante su sobreexpresión será capaz de regular a la baja la actividad del receptor en células de cáncer de mama MCF7.

## 7. Objetivos

### 7.1. Objetivo general

Determinar los efectos de la sobreexpresión de MAD2B sobre la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en células de cáncer de mama MCF7 y su capacidad de reclutamiento a promotores blanco del ER $\alpha$ .

### 7.2. Objetivos particulares

- ✓ Determinar la relación entre la expresión de MAD2B/MAD2L2 y su co-expresión con *ESR1* en tejidos de mama malignos y/o no malignos (normales) de acuerdo con diferentes características clínico-patológicas y demográficas, empleando un modelo bioinformático.
- ✓ Analizar el efecto de la sobreexpresión de MAD2B sobre la actividad transcripcional del ER $\alpha$  en la línea celular de cáncer de mama MCF7 en presencia y ausencia de ligandos agonistas y antagonistas.
- ✓ Examinar si MAD2B es capaz de reclutarse a promotores blanco que contengan EREs de genes regulados por ER $\alpha$ .

## 8. Metodología

### 8.1. Ensayo bioinformático

Se empleó el sitio *web* interactivo UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>) con el fin de determinar los niveles expresión de MAD2B registrados en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y en la base de datos *Curtis Breast* (*Oncomine*, <https://www.oncomine.org/>) (Curtis, et al., 2012). Adicionalmente, se realizó un análisis de sobrevivencia (Kaplan–Meier) de pacientes con cáncer de mama con el fin de describir su correlación con la expresión MAD2B utilizando UALCAN–TCGA. Con el fin de determinar los genes diferencialmente expresados en relación de MAD2B en carcinoma invasivo de mama, y sus procesos biológicos asociados, se empleó la herramienta *LinkedOmics* (<http://linkedomics.org/>) y un análisis de enriquecimiento GO (*Gene Ontology*) mediante el *software FunRich v.3.1.4* (<http://www.funrich.org>) (Pathan, et al., 2015; Pathan, et al., 2017; Fonseka, Pathan, Chitti, Kang, & Mathivanan, 2020).

### 8.2. Cultivo celular

- La línea celular MCF7 se cultivó con medio DMEM/F12 con rojo de fenol (Caisson Laboratories, Inc., Smithfield, UT, USA) al 8% v/v de suero fetal bovino inactivado (SFB, Gibco, Grand Island, NY, USA), NaHCO<sub>3</sub> 29 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U.I.–estreptomina 100 µg/mL–anfotericina B 25 ng/mL (Gibco, Grand Island, NY, USA), pH 7.4 y se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.
- Las líneas celulares COS7 y HEKT se cultivaron en medio DMEM con rojo de fenol (Caisson Laboratories, Inc., Smithfield, UT, USA) al 8% v/v de SFB inactivado, NaHCO<sub>3</sub> 44 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 100 U.I.–estreptomina 100 µg/mL–anfotericina B 25 ng/mL, pH 7.4 e incubadas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% por 24 h.



### 8.3. Subclonación de pCMV-SPORT6-MAD2B en pcDNA3.1/His A

Se diseñó un par de oligonucleótidos (**Tabla 3**) con el fin de crear, mediante PCR, los sitios de restricción específicos de EcoRI (5'-G\*AATTC-3') y XhoI (5'-C\*TCGAG-3') en pCMV-SPORT6-MAD2B. Inicialmente, se realizó PCR de gradiente con el objetivo de determinar la temperatura ideal de alineamiento del par de cebadores; para ello, 300 ng se sometieron a una reacción individual de PCR de acuerdo con la composición descrita en la **Tabla 7** y las condiciones enlistadas de la **Tabla 8** (cambiando el rango de temperaturas de hibridación: 57-61°C, tiempo de extensión: 72 s y 30 ciclos).

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para PCR**

Secuencia	Amplicón (pb)
FW: 5'-GTA GGA ATT CGG ATG ACC ACG CTC ACA C-3'	733
RV: 5'-TGG CGA GCT CCC CCT CAG CTG CCT TTA TG-3'	

En rojo: sitio de restricción específico de EcoRI. En azul: sitio de restricción específico de XhoI.

Se realizó la doble digestión de los productos de amplificación obtenidos a partir de pCMV-SPORT6-MAD2B ( $\approx 18 \mu\text{L}$ ) y del vector pcDNA3.1/His A (#cat. V38520, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) (**Anexo 14.4**) por 2 h a 37°C con EcoRI y XhoI (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) de acuerdo con la **Tabla 4**.

**Tabla 4: Componentes de doble digestión**

Componentes	pcDNA3.1/His A	Productos de amplificación
Buffer Tango 10X	8 $\mu\text{L}$ (2X)	8 $\mu\text{L}$ (2X)
DNA	3.2 $\mu\text{g}$	$\approx 18 \mu\text{L}$
EcoRI	2 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
XhoI	2 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Agua	c.b.p 40 $\mu\text{L}$	c.b.p 40 $\mu\text{L}$

Posteriormente, la digestión de pcDNA3.1/His A fue desfosforilada de acuerdo con la siguiente reacción:

Para una reacción; 50  $\mu$ L

---

pcDNA3.1/His A digerido	40 $\mu$ L
<i>Buffer</i> CIAP 10X	5 $\mu$ L
CIAP	1 $\mu$ L
Agua	c.b.p 50 $\mu$ L

Las digestiones fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa ultrapura 1.5% en solución TAE (Tris-acetatos 40 mM/EDTA 1 mM, pH 8.2–8.4). El número de pares de bases se determinó empleando los marcadores de pares de bases 1 Kb DNA Ladder (#cat. 15615–016, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) y 1 Kb Plus DNA Ladder (#cat. 10488–085, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente, se purificaron las bandas correspondientes (5.5 Kb de pcDNA3.1/His A y 726 pb del inserto de pCMV–SPORT6–MAD2B) utilizando el kit comercial *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (#cat. D4001, Zymo Research, Irvine, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. El DNA eluído fue cuantificado en un espectrofotómetro y se llevó a cabo la ligación (3:1) del inserto y de pcDNA3.1/His A con DNA ligasa T4 (#cat. EL0011, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y de acuerdo con la siguiente reacción:

Para una reacción (3:1); 10  $\mu$ L

---

T4 DNA ligase	1 $\mu$ L
T4 DNA ligase <i>Buffer</i> 10X	2 $\mu$ L
pcDNA3.1/His A digerido/desfosforilado	50 ng
Inserto pCMV–SPORT6–MAD2B	22 ng*
Agua	c.b.p 10 $\mu$ L

\*Determinado por NEBioCalculator (New England BioLabs, 2019)

Después de 1 h de ligación a T amb (o toda la noche a 4°C), el producto de ligación fue transformado por choque térmico y purificado como se detalla en la sección 8.4. Finalmente, se identificó la obtención del vector deseado mediante ensayos de restricción y PCR tal como se describe en la sección 8.8.

#### **8.4. Transfección de plásmidos**

Los plásmidos pCMV-SPORT6-MAD2B (accession no. BC015244, clone ID: 3916742, #cat. MHS6278-202757173) (**Anexo 14.1**) y pcDNA3.1/His A-MAD2B fueron transformados en células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico (42°C, 30 s) para posteriormente estriarlas en medio sólido LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 15 g/L) con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) con el fin de inocular las colonias resistentes en medio líquido LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y después realizar la lisis alcalina y purificación de los plásmidos por columna empleando el kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

Para comprobar la correcta expresión del plásmido, estos fueron cuantificados en un espectrofotómetro (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments, Winoosky, VT, USA) y transfectados en cantidades crecientes (0, 1, 3, 5 ó 6  $\mu$ g) a 400 000 células COS7, HEKT y MCF7, crecidas como se indica en la sección 8.2. Una vez alcanzada una confluencia del  $\approx$ 80%, se cambió el medio por DMEM o DMEM/F12 sin rojo de fenol con 2% de *stripped*-SFB (SFB tratado con carbón dextrán para eliminar las hormonas) y la transfección fue llevada a cabo por lipofección de acuerdo con el protocolo MAN0007824 Rev.1.0 (Lipofectamine 2000 Reagent, 2013) empleando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) y OPTI-MEM (Gibco, Grand Island, NY, USA). 48 horas después de la transfección, las células se rasparon, se lavaron con PBS frío y se lisaron con *buffer* de lisis con inhibidor de proteasas. Finalmente, los sobrenadantes fueron recolectados mediante centrifugación (12 000 rpm, 30 min,

4°C) y las proteínas fueron cuantificadas mediante el método de Lowry de acuerdo con el protocolo *DC Protein Assay* (DC™ Protein Assay - Bio-Rad, n.d.).

### **8.5. Western-Blot**

Se utilizó una cantidad de 40 µg de proteína para separarla por electroforesis en un gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.0% a 75 V en el gel concentrador y 100 V en el gel separador. Las proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) durante 2 h a 80 V en una cámara húmeda cubierta de hielo con el fin de evitar sobrecalentamiento. Posteriormente, las membranas se incubaron con solución de bloqueo [leche en polvo semidescremada al 5% en *buffer* salino de Tris con Tween-20 (TBS-T, Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20: 0.1%)] durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-MAD2B (monoclonal de conejo, EPR13657, #cat. ab180579, Abcam) a una dilución de 1:5000 en TBS-T durante toda la noche a 4 °C. Pasado el tiempo, las membranas se lavaron con TBS-T tres veces cada 5 min con agitación vigorosa y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:10 000) acoplado a peroxidasa de rábano picante (IgG-HRP, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron tres lavados de 5 min con agitación vigorosa empleando TBS-T. Las proteínas se identificaron mediante quimioluminiscencia con los sustratos de la peroxidasa, Pierce™ ECL Western Blotting (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) y se revelaron por autorradiografía utilizando placas de quimioluminiscencia de alto rendimiento (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Con el fin de normalizar las posibles diferencias en la proteína cargada, se utilizó a la proteína GAPDH como control de carga. Las membranas se incubaron en solución de *mild-stripping* (glicina 15 g/L, SDS 1 g/L, Tween-20: 10 mL/L, pH 2.2) durante 1 h a temperatura ambiente, después se lavaron con TBS-T, se volvieron a incubar con solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente y se les añadió el anticuerpo primario anti-GAPDH

(monoclonal de ratón, sc-47724, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a una dilución de 1:2000 en solución de lavado durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10 000) acoplado a la peroxidasa de rábano picante (IgG-HRP, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Las proteínas nuevamente se identificaron por quimioluminiscencia y se revelaron como se describió anteriormente.

## 8.6. Ensayo de luciferasa y $\beta$ -Galactosidasa

Para determinar cómo MAD2B afecta la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en células de cáncer de mama ER $\alpha$  positivas, se realizaron ensayos de luciferasa con un plásmido reportero que contiene 3 ERE regulando la expresión de la luciferasa (3xERE-Luc). Se inocularon 80 000 células MCF7, por triplicado, en placas de 24 pozos como se describe en la sección 8.2. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo a DMEM/F12 sin rojo de fenol con 1.5% de *stripped*-SFB y se realizaron transfecciones transitorias como se muestra en la **Tabla 5**, utilizando lipofectamina 2000 (en relación 2:1, lipofectamina:DNA) y OPTI-MEM.

**Tabla 5:** Condiciones empleadas en los ensayos de actividad transcripcional de ER $\alpha$

Plásmido	V. V. (pcDNA3.1/His A + o pCMV-SPORT6)*	pcDNA3.1/His A -MAD2B o pCMV-SPORT6-MAD2B			pSG-SRC-1***
Cantidad (ng/pozo)	200	100	150	200	200
3XERE-TATA-Luc** (ng/pozo)	200	200	200	200	200
$\beta$ -gal (ng/pozo)	10	10	10	10	10

\* Anexo 14.1; \*\* anexo 14.2; \*\*\* anexo 14.3; + anexo 14.4.

24 horas después, las células se estimularon con E2 10 nM, (Z)-4-hidroxitamoxifen (TAM, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EUA) 100 nM o con vehículo de disolución [etanol absoluto grado biología molecular (IBI Scientific, Peosta, IA,

USA)]. Las células se estimularon por 48 h. Pasado el tiempo, las células se lisaron con 50  $\mu$ L de *buffer* de lisis ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 nM, Tritón x-100 0.2% y DTT 0.1 mM). Posteriormente, se tomaron 35  $\mu$ L de los lisados y se transfirieron a una placa de fondo blanco de 96 pozos. Las lecturas de actividad de luciferasa se realizaron en un luminómetro GloMax<sup>R</sup> 96 Microplate Luminometer (Promega BioSystems Sunnyvale, CA, USA). Se inyectaron 90  $\mu$ L de *buffer* de reacción de luciferasa (glicil-glicina 25 mM pH 7.8,  $\text{MgCl}_2$  15 mM, ATP 5 mM pH 7.8 y BSA 0.5 mg/mL) y 30  $\mu$ L de luciferina (1 mM) por pozo.

La actividad de  $\beta$ -Galactosidasa fue determinada en los mismos pozos de los lisados empleados en la actividad de luciferasa. Para ello, se agregaron 50  $\mu$ L de *buffer* de reacción de  $\beta$ -Galactosidasa ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM y Galactón 1X) por pozo y se incubaron en ausencia de luz por 1 h. Pasado el tiempo, se leyeron las luminiscencias inyectando 50  $\mu$ L de solución aceleradora (Solución Tropix Emerald al 10% en NaOH 0.2 N).

Finalmente, se obtuvieron las unidades relativas de luminiscencia (URL) al utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{URL Total} = (\text{URL luciferasa} / \text{URL } \beta\text{-Galactosidasa})$$

Para el análisis gráfico se utilizó GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### **8.7. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

Se sembraron  $1.6 \times 10^6$  células MCF7 en cajas de Petri de 10 cm cultivadas como se indica en la sección 8.2. hasta obtener una confluencia del 80%. Con el fin de depletar las hormonas y evitar efectos estrogénicos, se cambió el medio de cultivo a DMEM/F12 sin rojo de fenol (Caisson Laboratories, Inc., Smithfield, UT, USA) al 1.5% v/v de *stripped*-SFB por 48 h y después DMEM/F12 sin rojo de fenol ni SFB por 24 h. Posteriormente, se dieron estímulos de  $17\beta$ -estradiol (E2) 10 nM y se

realizó el *cross-linking* añadiendo formaldehído (36.5%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para llegar a una concentración final de 0.75% v/v a los tiempos: 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 h después del estímulo hormonal. Pasados 10 min a T amb, se añadió glicina (concentración final 125 mM) con el fin de detener el entrecruzamiento por 5 min a 37°C. Las células se recolectaron por raspado mecánico en solución salina amortiguadora de fosfatos fría (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM) con inhibidores de proteasas (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), después se centrifugaron (1500 rpm, 4 min, T amb), se lavaron con PBS-inhibidores y se lisaron por 10 min con *buffer* de lisis (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.1) en hielo. Pasado el tiempo, se obtuvieron los *pellets* centrifugando a las mismas condiciones y se añadió *buffer* Chen (NaCl 150 mM, Tris-Cl 25 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1% y NaDoc 0.5%). A continuación, las células se sonicaron (Lab-Tech Instrumentación, S.A. de C.V, Guadalajara, JAL, MX) en 3 series de 15 s al 100% de amplitud y pulso continuo. Se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación (13 000 rpm, 10 min, 4°C) y se añadieron perlas de sefarosa CL-4B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y esperma de salmón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con el fin de reducir el *background* no específico. Los sobrenadantes se obtuvieron por las mismas condiciones de centrifugación, después de mezclar por 30 min a 4°C en un agitador radial, y se realizaron las inmunoprecipitaciones empleando 1.0 µg de anti-MAD2B (monoclonal de conejo, EPR13657, #cat. ab180579, Aviva), 1.0 µg de anti-ERα (monoclonal de ratón, sc-8002, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) y 1.0 µg de anticuerpo IgG (policlonal de conejo, #2729, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Una fracción se congeló a -20°C como *Inputs*. Las inmunoprecipitaciones se mezclaron en un agitador radial por 5 h a 4°C para después añadir las perlas acopladas con proteína A y se mantuvieron en agitación radial a 4°C toda la noche. Al día siguiente, las perlas fueron recuperadas por centrifugación (13 000 rpm, 10 min, 4°C) y fueron lavadas en el orden siguiente (800 µL, 30 min de incubación en agitador radial a 4°C y recuperando las perlas después de cada lavado a 13 000 rpm, 10 min, 4°C):

- un lavado con *buffer* bajo en contenido de sal (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, tritón X-100 1%, EDTA 2 mM),
- un lavado con *buffer* alto en contenido de sal (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, SDS 0.1%, tritón X-100 1%, EDTA 2 mM),
- un lavado con *buffer* de LiCl (LiCl 0.25 M, Tris-HCl 20 mM pH 8.1, NaCl 500 mM, NP40 1%, NaDoc 1%, EDTA 2 mM),
- dos lavados con *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

El complejo se eluyó por duplicado añadiendo 250  $\mu$ L de *buffer* de elución (SDS 1% y NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M) incubando por 30 min a T amb en un agitador radial. El sobrenadante de cada elución fue recuperado (13 000 rpm, 10 min, T amb) y se agregaron 20  $\mu$ L de NaCl 5 M y 1  $\mu$ L de RNasa A (10 mg/mL, Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) por cada una y se incubaron a 65°C toda la noche para revertir el entrecruzamiento. Al día siguiente se añadieron 2  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) con 10  $\mu$ L de EDTA 0.5 M y 20  $\mu$ L de Tris 1 M pH 6.5 y se incubaron a 45°C por 1 h para diferir las proteínas. El DNA se extrajo utilizando fenol:cloroformo; se precipitó con etanol y se resuspendió en 60  $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

### **8.8. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa**

Empleando un termociclador Arktik (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia), se realizó PCR de gradiente de punto final para determinar la temperatura ideal de alineamiento de los cebadores específicos para la región promotora de los genes regulados por estrógenos (de forma dependiente de E2), enlistados en la **Tabla 6**. Para ello, 100 ng de *Input* (t = 0.5 h) se sometieron a una reacción individual de PCR de acuerdo con la composición descrita en la **Tabla 7**, mientras que las condiciones se enlistan en la **Tabla 8**.



**Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para PCR**

Gen	HGNC ID	Secuencia	Amplicón (pb)	Referencias
<i>TFF1/pS2</i>	11755	FW: 5'-TGG GCT TCA TGA GCT CCT T-3' RV: 5'-TGA GAT TCA GAA AGT CCC TCT TTC-3'	226	(Shigekawa, et al., 2011)
<i>GREB1</i>	24885	FW: 5'-AGC AGT GAA AAA AGT GTG GCA ACT GG-3' RV: 5'-CGA CCC ACA GAA ATG AAA AGG CAG CA-3'	128	(Merrell, et al., 2011) (Lin, et al., 2004)

**Tabla 7. Reacción estándar de PCR**

Reactivo	Concentración final
Buffer PCR (-Mg <sup>2+</sup> ) 10x	1x
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 mM
dNTP Mix 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	0.2 mM
Oligo FW 10 µM	500 nM
Oligo RV 10 µM	500 nM
Platinum Taq DNA polimerasa (5 U/µL)	1.0 U
H <sub>2</sub> O	cbp 25 µL

**Tabla 8. Condiciones de temperaturas y tiempos de reacción de PCR**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	30 s	45
Alineamiento	<i>TFF1/pS2</i> : 52-60 <i>GREB1</i> : 60-65	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	10 min	1
Final	4	infinito	1

Los productos de amplificación para la región promotora de los genes descritos en la **Tabla 6** se sometieron a electroforesis en gel de agarosa ultrapura 1.5% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) en solución TBE 0.5X (Tris–boratos 45 mM/EDTA 1 mM, pH 8.3) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio (10 mg/mL) con un transiluminador. El número de pares de bases se determinó empleando el marcador de pares de bases *GeneRuler 100 pb DNA Ladder* 0.5 µg/µL (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

### **8.9. PCR en tiempo real (qPCR)**

Se realizó qPCR de gradiente para las regiones ERE de los genes, utilizando como templado 100 ng de *Input* (t = 0.5 h) y diluciones seriadas del mismo: 1/5, 1/25 y 1/125. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado de acuerdo con la **Tabla 9** y al protocolo de *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania) y empleando un equipo *StepOnePlus™* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis inicial se llevó a cabo utilizando el *software* de *StepOnePlus* versión 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Una vez obtenidas las temperaturas de alineamiento óptimas, se siguió la misma metodología para analizar las cinéticas de enriquecimiento de los *Input* y de las inmunoprecipitaciones. Para el tratamiento de datos se empleó el método de porcentaje de *Input*, descrito por Thermo Fisher Scientific (ChIP Analysis, n.d.) y utilizando *Microsoft Excel* para Mac Versión 16.30. Para el análisis gráfico se utilizó GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

**Tabla 9. Condiciones de temperaturas y tiempos de reacción de qPCR (amplificación y curva de disociación o *melt*)**

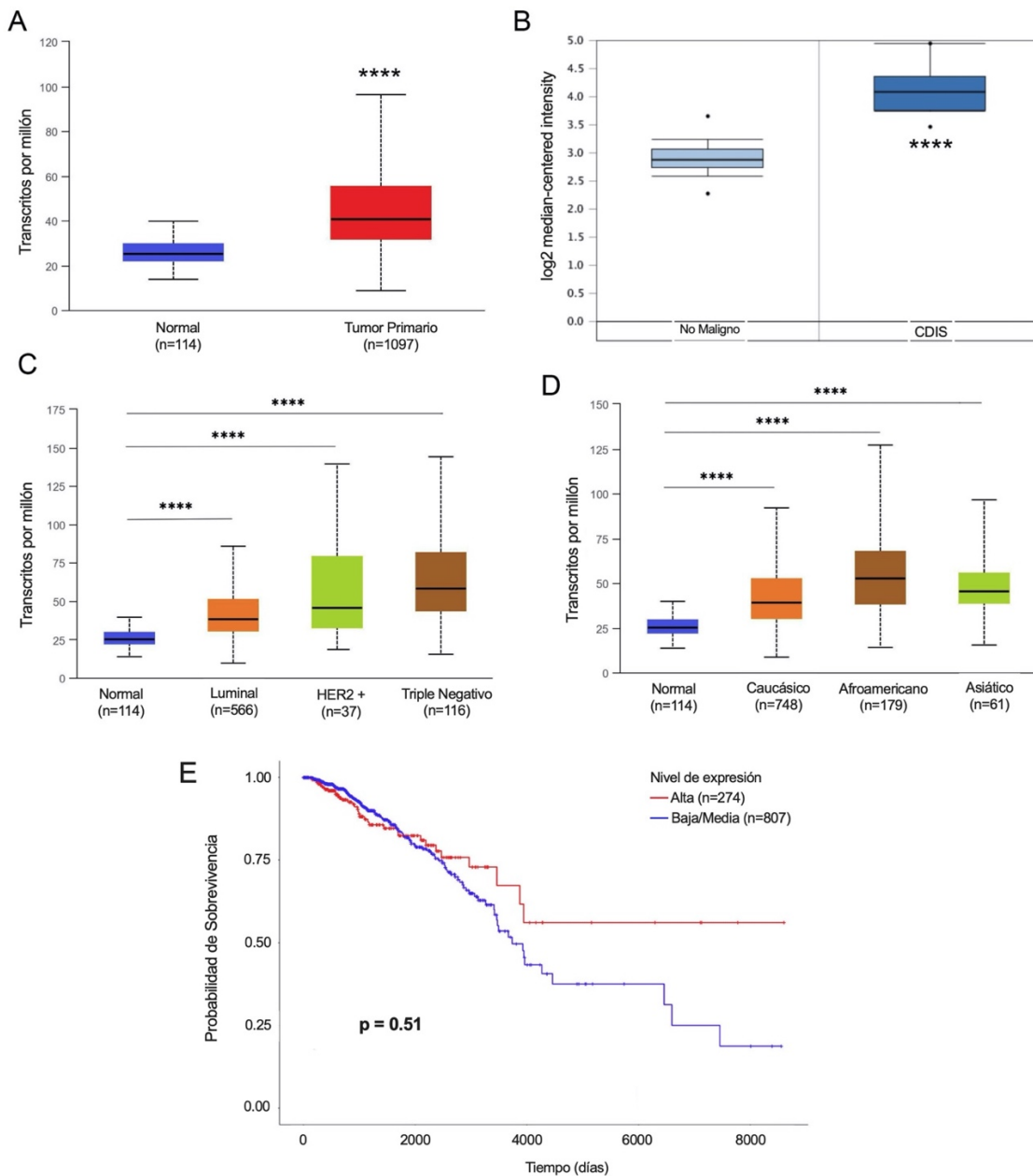
	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Amplificación	Desnaturalización	95	10 min	1
	Incubación	95	15 s	40
	Alineamiento	<b><i>TFF1/pS2</i>: 52–60</b> <b><i>GREB1</i>: 58–62</b>	1 min	
Curva de disociación o <i>melt</i>	1	95	10 min	1
	2	60	15 s	
	3	95	1 min	

## 9. Resultados

### 9.1. Análisis de expresión de MAD2B/MAD2L2 en bases de datos bioinformáticas de cáncer de mama y su asociación con la sobrevida de las pacientes

Se realizó un ensayo bioinformático empleando el sitio *web* interactivo UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>) con el fin de determinar los niveles expresión de MAD2B registrados en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), la cual es una base de datos que ha logrado la caracterización molecular completa de 31 múltiples tipos de cáncer (Chandrashekar, et al., 2017), entre ellos el carcinoma invasivo de mama, cuya base de datos contiene secuenciaciones de mRNA de 1093 pacientes. El análisis de la expresión de MAD2B se llevó a cabo en muestras no malignas (normales) y malignas, así como en distintos subtipos moleculares, fases menopáusicas, estados del tumor y etnias. Como se muestra en el análisis de expresión en los subgrupos de múltiples características clínico-patológicas y demográficas de muestras de cáncer de mama (**Figura 12A, C, D**), existe un nivel elevado de transcripción de MAD2B comparado con el tejido normal en todos los subgrupos analizados con diferencia significativa. Asimismo, se llevó a cabo la determinación de la expresión relativa de MAD2B en tejidos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) empleando la base de datos *Curtis Breast* (Oncomine, <https://www.oncomine.org/>) en donde se analizaron 1992 muestras de carcinoma de mama (ID: EGAD00010000164) y 144 muestras de mama normal (ID: EGAD00010000212) (Curtis, et al., 2012). De manera similar a la expresión documentada en carcinoma invasivo de mama (**Figura 12B**), muestra que MAD2B se encuentra sobreexpresado en los tejidos de CDIS con respecto al tejido sano, con diferencia significativa. Adicionalmente, se realizó un análisis de sobrevivencia (Kaplan–Meier) de pacientes con cáncer de mama con el fin de describir su correlación con la expresión MAD2B empleando UALCAN–TCGA. Se encontró que pacientes con mayor expresión de MAD2B en tejidos de cáncer de mama tienen una esperanza de vida mayor respecto a los que tienen menor expresión de MAD2B

(Figura 12E) sugiriendo una correlación positiva entre MAD2B y la existencia de una mayor supervivencia.



**Figura 12. Expresión relativa de MAD2B en tejidos de mama malignos y no malignos (normales) de acuerdo con diferentes características clínico-patológicas y demográficas relevantes de la base de datos TCGA (carcinoma invasivo de mama):** **A.** muestras de tejido normal y maligno; **B.** Expresión relativa de MAD2B en tejidos de mama malignos y no malignos de la base de datos *Curtis Breast* (CDIS); **C.** subtipo molecular; **D.** etnia; **E.** Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de pacientes con cáncer de mama basado en el nivel de expresión de MAD2B. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  versus tejido no maligno (normales).

Con el fin de determinar los genes diferencialmente expresados relacionados con *MAD2L2* en carcinoma invasivo de mama, se empleó la herramienta *LinkedOmics* (<http://linkedomics.org/>), la cual es una plataforma pública disponible para analizar datos de múltiples -ómicas de 32 diferentes tipos de cáncer registrados en TCGA (Vasaikar, Straub, Wang, & Zhang, 2018). Los resultados fueron analizados mediante el coeficiente de correlación de Pearson y visualizados por medio de mapas de calor, puntos de dispersión o diagrama de volcán. Como se aprecia en la **Figura 13A**, 7467 genes (puntos negros-rojos) mostraron correlación positiva significativa con *MAD2L2*, mientras que 6557 genes (puntos negros-verdes) mostraron correlación negativa significativa (*False Discovery Rate* [FDR] < 0.01). Por su parte la dispersión individual para el gen *ESR1* (codificante del ER $\alpha$ ) indica una correlación de Pearson negativa (-0.04067,  $p = 8.559e-45$ ) respecto a *MAD2L2* (**Figura 13B**). A su vez, los 50 genes más significativos correlacionados positiva y negativamente con *MAD2L2* se muestran en los mapas de calor (**Figura 13C, D**). Debido a que la hipótesis inicial es que *MAD2B* podría ser un correpressor de ER $\alpha$  (regulando sus genes blanco a la baja), se optó investigar el proceso biológico de los genes correlacionados de manera negativa a *MAD2L2* en carcinoma invasivo de mama, para ello los 6557 genes encontrados anteriormente fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento GO (*Gene Ontology*) empleando el *software FunRich v.3.1.4* (<http://www.funrich.org>) (Pathan, et al., 2015; Pathan, et al., 2017; Fonseka, Pathan, Chitti, Kang, & Mathivanan, 2020). El análisis GO reveló una larga lista de procesos biológicos significativos ( $p < 0.05$ ) asociados a los genes analizados. En la **Figura 13E** se muestra el porcentaje de los genes que asociados a los diez procesos biológicos más significativos ( $p < 0.001$ ).

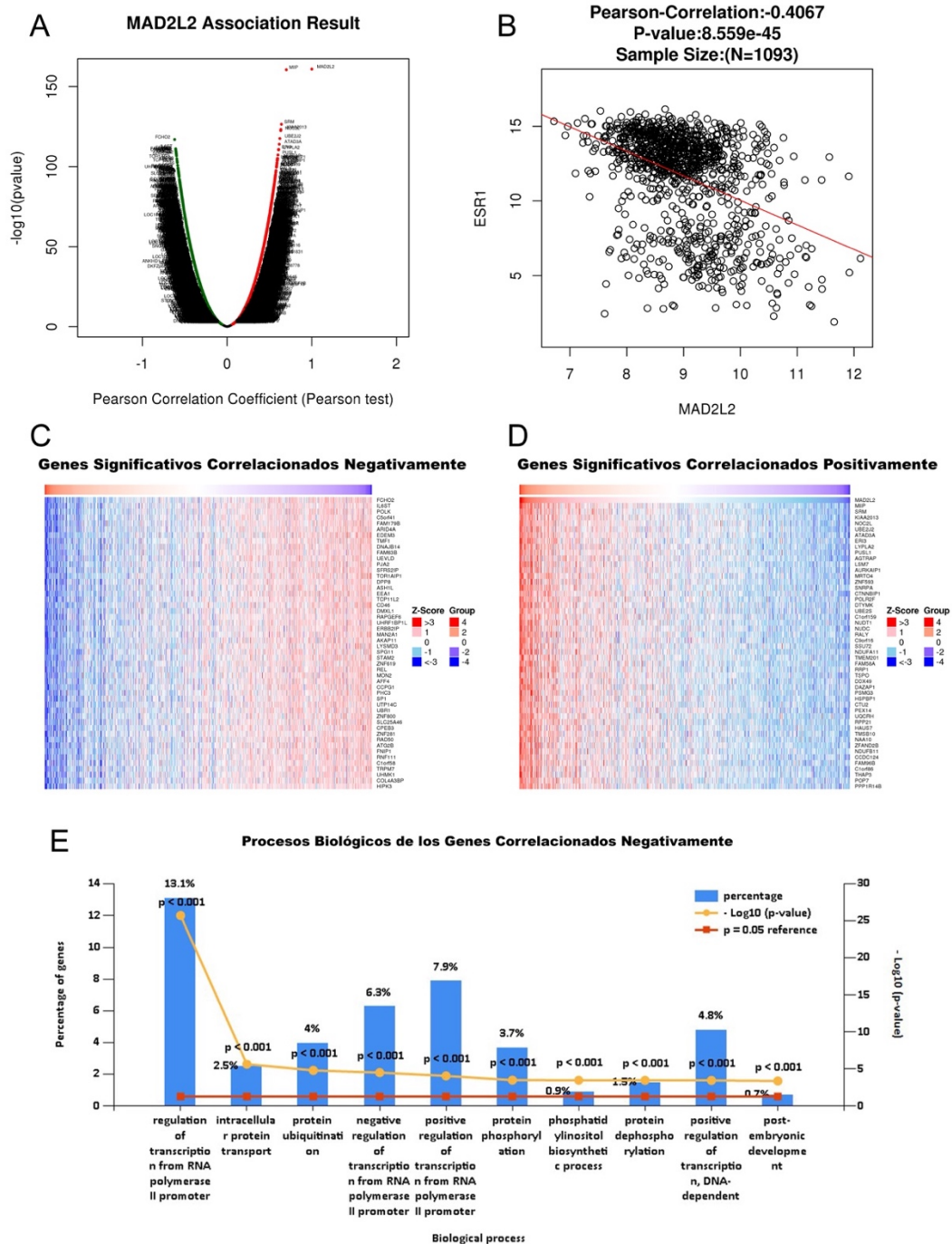
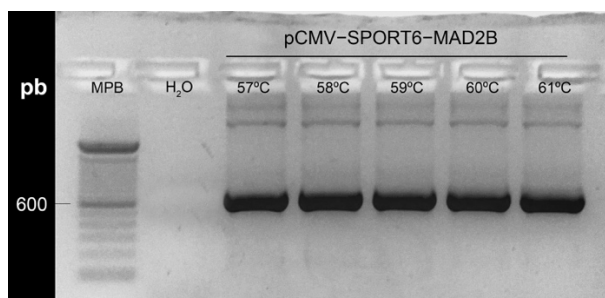


Figura 13. Análisis de coexpresión génica de *MAD2L2* en carcinoma invasivo de mama (empleando la base de datos TCGA). **A.** Genes diferencialmente expresados respecto a *MAD2L2*; **B.** Análisis de correlación de expresión génica para *MAD2L2-ESR1*; **C.** 50 genes más significativos correlacionados negativamente con la expresión de *MAD2L2*; **D.** 50 genes más significativos correlacionados positivamente con la expresión de *MAD2L2*; **E.** Análisis de enriquecimiento de los 10 procesos biológicos más significativos de genes correlacionados negativamente con la expresión de *MAD2L2* ( $p < 0.001$ ).

## 9.2. Análisis de expresión de pCMV-SPORT6-MAD2B y pcDNA3.1/His A-MAD2B en la línea celular MCF7

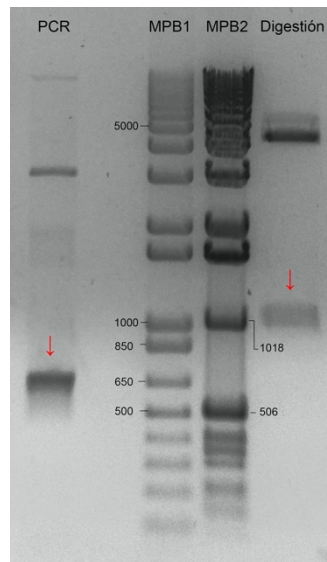
Se verificó la correcta transfección y funcionamiento del plásmido pCMV-SPORT6-MAD2B a diferentes cantidades empleadas en las líneas celulares COS7, HEKT y MCF7 detectando el incremento de los niveles proteicos de MAD2B (**Figura 16**). Las dos primeras líneas celulares mencionadas se utilizaron como controles de transfección ya que ambas expresan el antígeno T-SV40, y son ampliamente utilizadas en estudios de transfección empleando vectores de expresión transitoria que contienen el origen de replicación SV40 (tales como pCMV-SPORT6 y pcDNA3.1/His A), ya que estas células permiten la replicación del plásmido en un alto número de copias (Harvey, Macnaughton, & Gowans, 1997). Sin embargo, debido a que pCMV-SPORT6-MAD2B carece de resistencia a antibióticos para su expresión estable en líneas celulares (**Anexo 14.1**), se optó por subclonar su inserto respectivo (MAD2B) en el vector pcDNA3.1/His A, el cual sí ofrece resistencia a neomicina (**Anexo 14.4**). Inicialmente, se diseñó un par de oligonucleótidos con el fin de crear los sitios de restricción de pCMV-SPORT6-MAD2B, escindir el inserto y finalmente ligarlo con pcDNA3.1/His A. Primeramente, se realizó PCR de gradiente con el objetivo de determinar la temperatura ideal de alineamiento del par de cebadores. Como se aprecia en la **Figura 14**, se lograron conocer las temperaturas de fusión ideales para el par de cebadores (57-61°C).



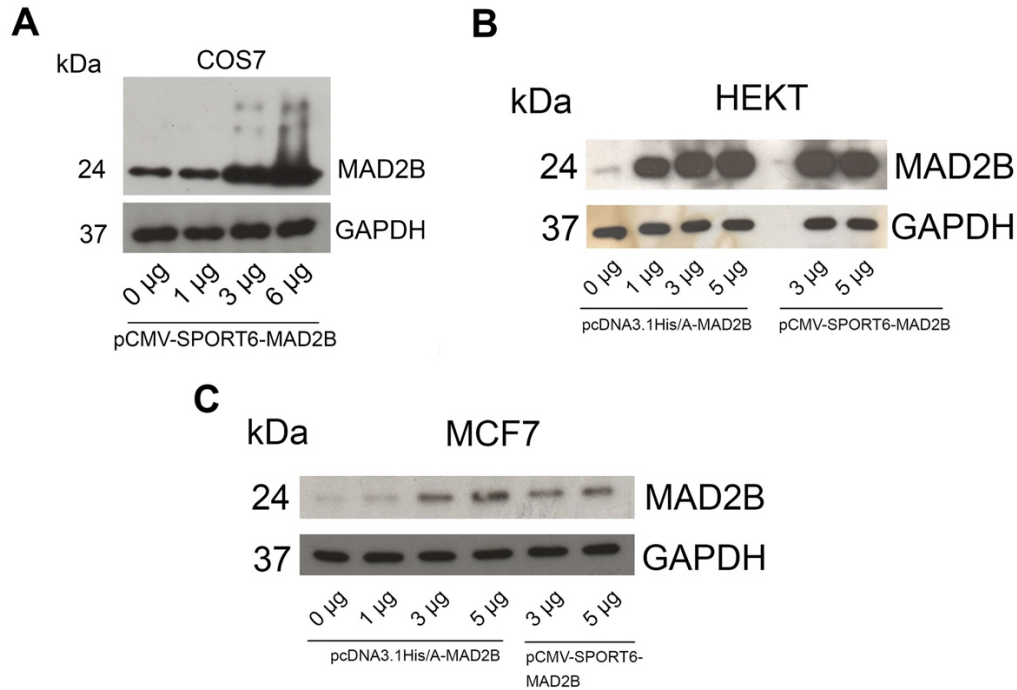
**Figura 14.** Estandarización por PCR de gradiente en punto final de temperaturas de hibridación de cebadores específicos de EcoRI y XhoI de pCMV-SPORT6-MAD2B (773 pb).



El producto de ligación (pcDNA3.1/His A–MAD2B) se identificó mediante PCR y con una doble restricción (EcoRI y XhoI) (**Figura 15**) en donde se observa el amplicón esperado (773 pb) y el producto de la digestión ( $\approx 1$  Kb), respectivamente. Finalmente, se comprobó su correcta expresión mediante *Western Blot* en las líneas celulares HEKT (**Figura 16B**) y MCF7 (**Figura 16C**).



**Figura 15. Identificación de pcDNA3.1/His A–MAD2B mediante PCR (amplicón = 773 pb) y con una doble restricción (EcoRI y XhoI) ( $\approx 1$  Kb).** MPB1 (marcador de pares de bases 1): 1 Kb Plus DNA Ladder (#cat. 10488–085, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA); MPB2 (marcador de pares de bases 2): 1 Kb DNA Ladder (#cat. 15615–016, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).



**Figura 16. Expresión de productos protéicos de los plásmidos pcDNA3.1/His A-MAD2B y/o pCMV-SPORT6-MAD2B transfectados.** Las líneas celulares **A.** COS7, **B.** HEKT y **C.** MCF7 fueron transfectadas con cantidades ascendentes de los vectores pcDNA3.1/His A-MAD2B y/o pCMV-SPORT6-MAD2B con el fin de verificar el correcto funcionamiento de estos. Las dos primeras líneas se usaron como controles de transfección. Como control de carga se usa GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

### 9.3. Efecto de MAD2B sobre la actividad transcripcional de ER $\alpha$ en línea celular MCF7

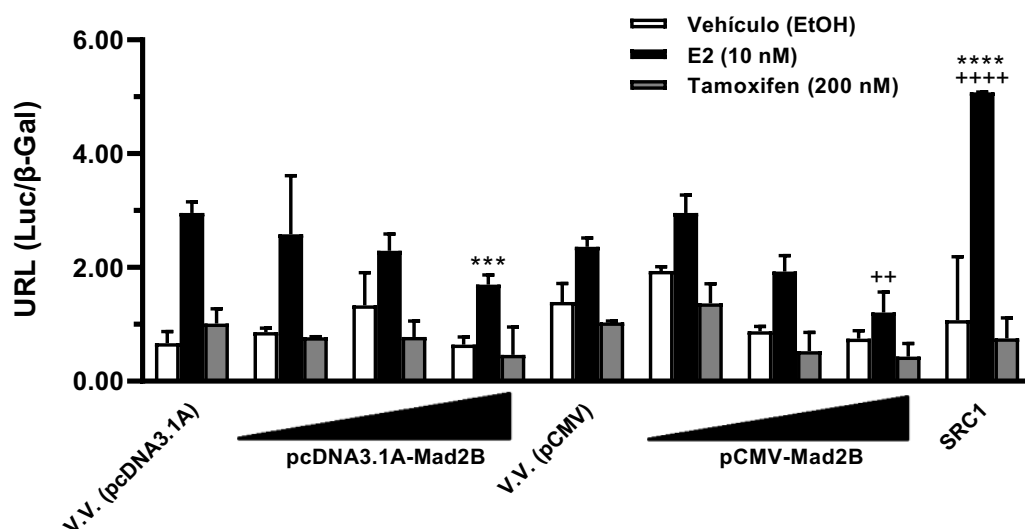
Con el fin de determinar si MAD2B puede modificar la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en líneas celulares de cáncer de mama, se llevaron a cabo ensayos de actividad transcripcional con reporteros de luciferasa. En estos experimentos se realizaron transfecciones transitorias de un reportero de luciferasa que contiene un promotor con 3 elementos de respuesta a estrógenos (3XERE-TATA-Luc, **Anexo 14.2**) y un reportero de  $\beta$ -galactosidasa constitutivamente activo, para evaluar la eficiencia de la transfección y normalizar los datos. Para evaluar el efecto de MAD2B, se transfectaron concentraciones crecientes del plásmido pCMV-SPORT6-MAD2B (**Anexo 14.1**) y pcDNA3.1/His A-MAD2B. Las células

fueron tratadas con el ligando agonista de ER $\alpha$  (E2), un ligando antagonista 4-hidroxitamoxifen (TAM) y el vehículo de disolución (etanol absoluto). Después de 48 h de tratamiento se determinó la actividad de luciferasa y de  $\beta$ -galactosidasa. Adicionalmente se transfectó el coactivador de ER $\alpha$ , SRC-1 (**Anexo 14.3**), como control positivo.

Los resultados muestran (**Figura 17**) que la transfección de las células con la máxima cantidad de los plásmidos pCMV-SPORT6-MAD2B y pcDNA3.1/His A-MAD2B disminuye de manera significativa la actividad transcripcional de ER $\alpha$  inducida con E2 respecto a las células transfectadas con el vector vacío. Cabe resaltar que el plásmido pcDNA3.1/His A-MAD2B provocó un cambio más significativo en la actividad transcripcional de ER $\alpha$  que el causado por pCMV-SPORT6-MAD2B. Adicionalmente, se observa una ligera disminución (no significativa) en presencia de pCMV-SPORT6-MAD2B y pcDNA3.1/His A-MCS-MAD2B inducida por TAM.

Asimismo, la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en células transfectadas con SRC-1 (coactivador de ER $\alpha$  utilizado como control positivo) muestra un aumento significativo con respecto a los dos vectores vacíos.

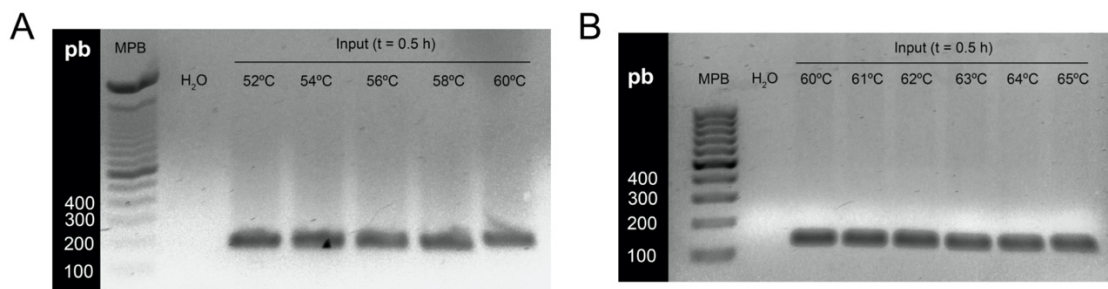
Finalmente, es interesante resaltar la disminución gradual de la actividad de ER $\alpha$  independiente de ligando conforme aumenta la cantidad transfectada de pCMV-SPORT6-MAD2B con respecto al vector vacío (pCMV-SPORT6).



**Figura 17. Efecto de MAD2B sobre la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en presencia y/o ausencia de ligando agonistas (E2) y antagonista ([Z]-4-hidroxitamoxifen) en células MCF7.** EtOH: etanol absoluto grado biología molecular; SRC1: coactivador de receptor nuclear 1 (como control positivo); V. V.: Vector vacío (pcDNA3.1/His A o pCMV-SPORT6). Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (\*\* $p=0.0007$  y \*\*\*\* $p<0.0001$  versus pcDNA3.1/His A; \*\* $p=0.0066$  y \*\*\*\* $p<0.0001$  versus pCMV-SPORT6).

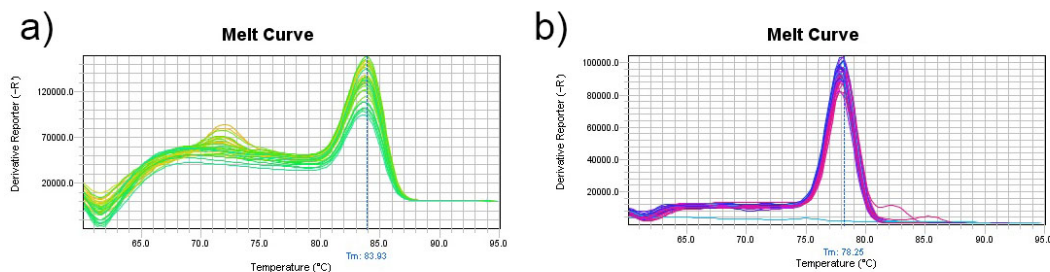
#### 9.4. Determinación de enriquecimiento de MAD2B en secuencias promotoras blanco de ER $\alpha$ en la línea celular MCF7

Con el fin de estudiar si MAD2B es capaz de interaccionar con promotores blanco que contengan EREs de genes regulados por ER $\alpha$ , se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés) en la línea celular MCF7 estimulada con E2 a lo largo de 1 h, en donde se inmunoprecipitaron regiones promotoras EREs asociadas con las proteínas ER $\alpha$  y probablemente MAD2B. El primer análisis se llevó a cabo para conocer las temperaturas de fusión ideales para los cebadores específicos de promotores ERE de dos distintos genes hormono-regulados, *TFF1/pS2* y *GREB1*, empleando PCR de gradiente en punto final. Como templado se utilizó cromatina sin inmunoprecipitar con 0.5 h de estímulo hormonal (*Input t = 0.5*). Como se aprecia en la **Figura 18**, se lograron conocer las temperaturas de fusión ideales para cada par de cebadores, las cuales se resumen en la **Tabla 8**.



**Figura 18.** Estandarización por PCR de gradiente en punto final de temperaturas de hibridación de cebadores específicos para EREs de los genes: **A.** *TFF1/pS2* (226 pb); **B.** *GREB1* (128 pb).

El segundo análisis se llevó a cabo con el fin de conocer las temperaturas de fusión ideales para los mismos cebadores, empleando qPCR de gradiente. Como templado se utilizó cromatina sin inmunoprecipitar con 0.5 h de estímulo hormonal (*Input t = 0.5*). Adicionalmente, se obtuvieron las curvas de disociación, o *melt*, con el fin de asegurar la producción de un solo amplicón (**Figura 19**). Las temperaturas de fusión ideales se resumen en la **Tabla 10**.



**Figura 19.** Estandarización por qPCR de gradiente de temperaturas de hibridación de cebadores específicos para EREs de los genes: **a.** *TFF1/pS2*; **b.** *GREB1*.

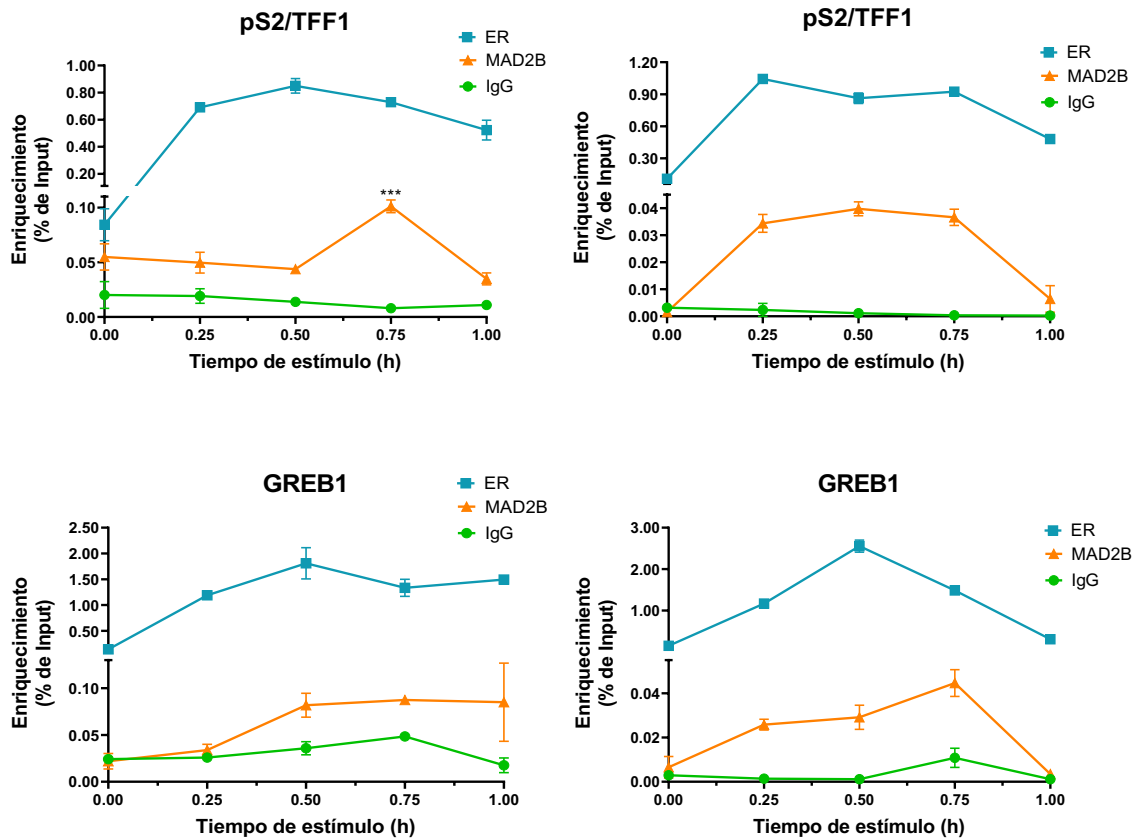
**Tabla 10. Temperaturas de hibridación ideales de cebadores específicos para EREs de distintos genes regulados por estrógenos**

ERE de gen	<i>TFF1/pS2</i>	<i>GREB1</i>
PCR PF (°C)	52–60	60–65
qPCR (°C)	52–60 (58)*	58–62 (61)*
Tamaño de amplicón (pb)	226	128

PF: Punto final; qPCR: PCR en tiempo real. \*Temperatura empleada.

Una vez estandarizadas las temperaturas de fusión de los cebadores, se determinó el porcentaje de ocupación/enriquecimiento de ER $\alpha$  y MAD2B en la región promotora ERE de dos distintos genes. Como templado se utilizó la cromatina y las inmunoprecipitaciones. Las cinéticas de enriquecimiento para los promotores ERE de *pS2/TFF1* y *GREB1* (**Figura 20**) muestran un aumento de la ocupación de la región ERE por ER $\alpha$  a partir de los 15 min de estímulo hormonal, seguida de una disminución a los 45 min. Sin embargo, en la mayoría de los tiempos evaluados

MAD2B no muestra diferencia significativa con respecto a IgG (como control negativo).



**Figura 20.** Curso temporal de reclutamiento/enriquecimiento de ER, MAD2B e IgG (como control negativo) a las secuencias ERE de 2 distintos genes a lo largo de 1 h de estímulo con E2 10 nM en la línea celular MCF7. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes (\*\*\*)  $p=0.001$  versus IgG).

## 10. Discusión

El cáncer de mama es la primera neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo (Ferlay, et al., 2020; Sung, et al., 2021). Aproximadamente, el 70–80% de los cánceres de mama humanos son hormono–dependientes y ER positivos (Lumachi, Santeufemia, & Basso, 2015). La transcripción génica mediada por el ER es un proceso complejo que presenta múltiples puntos de regulación, entre los que se encuentra la interacción del receptor con proteínas correguladoras (McDonnell & Norris, 2002; O'Malley & Kumar, 2009). Más de un tercio de los correguladores de ER involucrados en el cáncer de mama están desregulados (Lonard, Lanz, & O'Malley, 2007; Lonard & O'Malley, 2012; Cortez, et al., 2014) y contribuyen a la tumorigénesis (Cortez, et al., 2014), la resistencia a la terapia y la metástasis (Kumar, et al., 2009; Burandt, et al., 2013; Girard, Daniel, Lange, & Ostrander, 2014; Manavathi, et al., 2013).

Inicialmente el gen codificante de MAD2B, *MAD2L2* (o *hREV7*), fue caracterizado como un homólogo de *Rev7* de *S. cerevisiae* (*scRev7*) (Cahill, et al., 1999; Murakumo, et al., 2000) y actualmente el Comité de Nomenclatura de genes HUGO (HGNC, por sus siglas en inglés) aprueba el uso de los símbolos REV7 y POLZ2 para referirse a MAD2B (Tweedie, et al., 2021). De manera similar a su contraparte de levadura (*scRev7*), MAD2B funciona como una proteína adaptadora que forma, junto con REV1/3, el complejo DNA polimerasa–zeta ( $\zeta$ ), la cual es una DNA polimerasa propensa a errores involucrada en la reparación del daño al DNA mediante el mecanismo *Translesion DNA Synthesis* (TDS) (Murakumo, et al., 2000; Gan, Wittschieben, Wittschieben, & Wood, 2008; Hara, et al., 2010). No obstante, se ha asociado MAD2B principalmente con la inhibición de la activación del complejo promotor de la anafase (APC) (Li, Gorbea, Mahaffey, Rechsteiner, & Benezra, 1997; a.Fang, Yu, & Kirschner, 1998; Chen & Fang, 2001; Pflieger, Salic, Lee, & Kirschner, 2001; Listovsky & Sale, 2013) participando en la regulación la segregación cromosómica.

Como punto de partida, se utilizó un análisis *in silico* de coexpresión con el fin de identificar la similitud de patrones de expresión de distintos genes respecto a *MAD2L2* (especialmente *ESR1*), empleando el coeficiente de correlación de Pearson (*r*). La correlación negativa significativa encontrada entre *MAD2L2* y *ESR1* bien podría indicar una baja asociación entre estos dos genes, así como una baja correlación entre *MAD2L2* y procesos biológicos involucrados con la regulación transcripcional. No obstante, se ha reportado la capacidad de MAD2B de interactuar con ciertas proteínas, permitiendo la activación de factores de transcripción como Elk-1 a través de su unión con JNK, sugiriendo su papel como una proteína adaptadora que permite la fosforilación eficiente de Elk-1 por JNK (Zhang , Yang, & Sharrocks, 2007). Por otra parte, se ha confirmado que MA2DB puede unirse a TCF4 bloqueando su actividad transcripcional al disminuir su capacidad de unión con el DNA (Hong, Chou, Lin, & Wu, 2009). Incluso se ha documentado la interacción de MAD2B con la proteína bacteriana IpaB, causando el arresto del ciclo celular en la fase G2/M de manera dependiente de MAD2B (Iwai, et al., 2007). Asimismo, por medio de un sistema del doble híbrido en levaduras, en nuestro laboratorio se logró detectar a MAD2B como una proteína que interactúa con la región amino-terminal de ER $\alpha$  (Noriega-Reyes, et al., 2015) lo cual fue confirmado con un ensayo de *GST-Pulldown* especificando que la interacción se lleva a cabo independientemente de estímulo hormonal. Si bien, la interacción MAD2B-ER $\alpha$  ha sido comprobada, aún se desconoce si MAD2B puede alterar la actividad transcripcional y la expresión de genes blanco de ER $\alpha$ , permaneciendo su papel en el cáncer de mama poco claro.

De acuerdo con el ensayo bioinformático llevado a cabo, dos distintas bases de datos (TCGA y *Curtis Breast-Oncomine*) coincidieron al mostrar que los niveles de transcripción de MAD2B son mayores en muestras de cáncer de mama respecto al tejido sano. Resulta interesante el cambio de nivel de transcripción de MAD2B en función del subtipo molecular, en donde el nivel incrementa conforme la expresión de receptores de hormonas esteroideas (SHRs) de cada subtipo molecular (canónicamente ER y PR) disminuye, lo cual concuerda con estudios de expresión



proteica de MAD2B en donde se muestra un aumento de expresión de MAD2B en líneas celulares luminales respecto a una línea no maligna y, a su vez, una mayor expresión en líneas celulares triple negativas respecto a las luminales. Adicionalmente, un análisis inmunohistoquímico que indica una mayor expresión de MAD2B en tejidos malignos de mama respecto a muestras de tejidos sanos (Feng, Wei, Heng, Yantao, & Chunbo, 2016). Por lo tanto, resulta necesario determinar si la diferencia de los niveles transcripcionales y de expresión de MAD2B tienen relación con la señalización de SHRs, específicamente con la del ER $\alpha$ , ya que, hasta la fecha, las investigaciones enfocadas a MAD2B/MAD2L2 y cáncer de mama han sido limitadas y en ninguna de estas se ha abordado la correlación entre MAD2B/MAD2L2 y ER $\alpha$  (o incluso SHRs) (Cheung, et al., 2006; Yuan, et al., 2006; Vaclavicek, et al., 2007; Varadi, et al., 2011; Zhao, et al., 2011; Feng, Wei, Heng, Yantao, & Chunbo, 2016; Pernicone, Peretz, Grinshpon, & Listovsky, 2020). Si bien, podría existir una relación entre MAD2B y ER $\alpha$ , cabe resaltar la correlación positiva entre MAD2B y la esperanza de vida de pacientes con cáncer de mamá, por lo que MAD2B podría tener un papel clínico-patológico en el desarrollo de la enfermedad.

Actualmente, existe una amplia variedad de técnicas para cuantificar la actividad transcripcional, tales como PCR-digital (dPCR), secuenciación de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-seq), hibridación *in situ* de fluorescencia de RNA de una sola molécula (smRNA-FISH), o más comúnmente PCR con transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR). El ensayo de actividad transcripcional de luciferasa es una técnica que también evalúa la actividad transcripcional proveyendo cuantificaciones casi instantáneas, con alta sensibilidad y amplio espectro dinámico, además de ofrecer baja interferencia con la actividad endógena de las células (u organismo de interés) (Allard & Kopish, 2008), catalogándola como una técnica adaptable, eficiente y empleada en la actualidad para evaluar la actividad transcripcional de SHRs (Della-Torre, et al., 2018; Kojima, et al., 2019; Mesa, Xu, Yip, & Zhang, 2019; Diaz-Bessone, et al., 2019). En el presente trabajo se utilizó un reportero de luciferasa 3XERE-TATA-Luc

conteniendo 3 copias del promotor blanco de ER $\alpha$  (GGTCA CAG TGACC) en el vector pGL2-TATA-Inr, con el fin de correlacionar la luminiscencia con la actividad del promotor y por ende la actividad transcripcional de ER $\alpha$  y fue validado utilizando el ya caracterizado coactivador de ER $\alpha$ : SRC-1 (Yao, Ku, Zhou, Scully, & Livingston, 1996; Margeat, et al., 2001).

El ensayo indica que el incremento de MAD2B reduce de manera gradual la actividad de ER $\alpha$ , incluso en presencia de 17 $\beta$ -estradiol, es decir, cuando la activación de ER $\alpha$  es inducida por vía hormonal. De igual manera, MAD2B podría ser capaz de disminuir la actividad basal de ER $\alpha$  (tratamiento en ausencia de agonista o antagonista) y posiblemente potenciar el efecto inhibitorio del (Z)-4-hidroxitamoxifen, indicando que MAD2B podría actuar como un correpresor de ER $\alpha$  tanto de manera dependiente como independiente de ligando. De manera similar, el actual grupo de investigación demostró anteriormente que MAD2B interactúa principalmente con ER $\alpha$  a través del dominio amino-terminal (NTD) independientemente de estímulo hormonal. Se ha propuesto que las diferentes funciones de la región AF-1 (región de transactivación independiente de ligando ubicada en el NTD) están mediadas por mecanismos que involucran su interacción con diferentes correguladores (Hall & McDonnell, 2005; Woo, Sze, Chung, & Lin, 2019) incluidos: BTF3 (Green, Thompson, Johnston, & El-Tanani, 2007), SRA1 (Deblois & Giguère, 2003), p27/p68 (Watanabe, et al., 2001), CoCoA (Kim, Li, & Stallcup, 2003), hMMS19 (Wu, Li, & Chen, 2001), SPBP (Gburcik, Bot, Maggiolini, & Picard, 2005) y Smad4 (Wu, et al., 2003). Es por lo que las diferentes funciones de AF-1 pueden estar mediadas por una gran variedad de correguladores que deben identificarse para comprender la contribución de este dominio a la transactivación de ER $\alpha$ .

Adicionalmente, resulta interesante la disminución de la actividad de ER $\alpha$  independiente de ligando conforme aumenta la cantidad pCMV-SPORT6-MAD2B en comparación con el vector vacío (pCMV-SPORT6). Sin embargo, el vector pcDNA3.1/His A no exhibe esta particularidad, además de presentar resistencia a antibióticos para su expresión estable en líneas celulares haciéndolo un vector de

preferencia para futuros experimentos con el fin de sobreexpresar MAD2B de manera estable.

La expresión de los genes blanco de ER $\alpha$  podría requerir del reclutamiento del receptor junto con el complejo de transcripción y sus correguladores hacia la región promotora (ERE). Con el fin de examinar este proceso, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seleccionando dos de los genes con mayor intensidad de unión a ER $\alpha$  de acuerdo con datos obtenidos a partir de un ChIP-*paired-end-tag* (ChIP-PET) (Lin, et al., 2007) y un microarreglo (Zwart, et al., 2013), anteriormente descritos en la línea MCF7.

En presencia de E2, el ER $\alpha$  muestra un reclutamiento significativo a partir de los 15 min al ERE de *pS2/TFF1* y un ligero decremento a partir de 1 h. Previamente se ha reportado el reclutamiento de ER $\alpha$  al mismo ERE de *pS2/TFF1* en la línea MCF7, mostrando un alto enriquecimiento incluso a partir de los 10 min e incrementando hasta al menos los 45 min de estímulo (Li & Davie, 2008; Stossi, Madak-Erdogan, & Katzenellenbogen, 2009), lo que concuerda con nuestros datos. De hecho, está bien documentada la cinética de reclutamiento del receptor al promotor de *pS2/TFF1* de manera secuencial y cronometrada en células MCF7 inducidas con E2 10 nM (Métivier, et al., 2003). De igual manera se presenta una cinética de reclutamiento similar de ER $\alpha$  sobre el ERE 1 ( $\approx -1.6$  Kb) de *GREB1* inclusive a partir de los 0 min de estímulo y teniendo su máximo enriquecimiento a los 30 min y un decremento a los 60 min. Anteriormente, se ha determinado la cinética de enriquecimiento de ER $\alpha$  sobre los 3 EREs de *GREB1* empleando la línea MCF7 en donde se describe un comportamiento de ERE 1 idéntico al observado y siendo éste ERE el que se recluta en mayor medida (Sun, Nawaz, & Slingerland, 2007). Sin embargo, el reclutamiento de MAD2B a los EREs de los genes *pS2/TFF1* y *GREB1* en la línea MCF7 no resultó significativo en la mayoría de los tiempos muestreados implicando que MAD2B no es capaz de unirse a las secuencias específicas de ER $\alpha$ . No obstante, dada la capacidad de MAD2B de disminuir la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , se puede pensar en mecanismos inhibitorios de ER $\alpha$  que ocurrieran previos a su interacción con el DNA, como se observó con TCF4, donde MAD2B inhibe su

interacción con el DNA, resultando en menor actividad transcripcional (Hong, Chou, Lin, & Wu, 2009). Adicionalmente, podría inhibir la dimerización o la interacción con alguna proteína accesoria del ER $\alpha$ . Estos mecanismos tendrán que ser explorados a futuro para determinar el mecanismo de MAD2B mediante el cual inhibe la actividad transcripcional de ER $\alpha$ . Más experimentos son necesarios (indicados en la **Sección 12**) para poder proponer a MAD2B como un correpresor del receptor, resultando relevante para los mecanismos implicados en los procesos biológicos, como la proliferación celular, el desarrollo y metabolismo de las células de cáncer de mama.

## 11. Conclusiones

Bajo las condiciones experimentales de este estudio, MAD2B no es capaz de reclutarse a promotores blanco que contienen Elementos de Respuesta a Estrógenos (EREs) de dos genes regulados por ER $\alpha$ , *pS2/TFF1* y *GREB1*, en la línea celular de cáncer de mama MCF7; sin embargo, MAD2B fue capaz de reducir significativamente la actividad transcripcional de ER $\alpha$  en presencia de su ligando agonista 17 $\beta$ -estradiol en la línea celular de cáncer de mama MCF7. Más investigación es necesaria para poder sugerir o confirmar a MAD2B como un correpressor de ER $\alpha$ .

## 12. Perspectivas

Los resultados encontrados abren nuevas perspectivas con respecto al mecanismo por el cual MAD2B reduce la actividad transcripcional de ER $\alpha$ , entre las cuales se encuentran:

1. Evaluar si existe reclutamiento significativo de MAD2B sobre los EREs de los dos genes evaluados previamente realizando el ensayo de ChIP en línea MCF7 que sobreexpresa de manera estable a MAD2B, aprovechando la subclonación del vector pCMV-SPORT6-MAD2B en pcDNA3.1/His A realizada exitosamente en este trabajo. Adicionalmente, seleccionando los tiempos de muestreo en donde disminuye la expresión de ambos genes mencionados.
2. Determinar si existe reclutamiento significativo basal de MAD2B sobre EREs de genes regulados a la baja por estradiol/ER $\alpha$ .
3. Analizar si MAD2B es realmente capaz de reclutarse a algún ERE en un muestreo más amplio de genes regulados por ER $\alpha$  empleando técnicas más sofisticadas tales como ChIP-seq y así poder confirmar, o no, que MAD2B es un correpressor de ER $\alpha$ .

### 13. Referencias

- Addgene*. (n.d.). Retrieved Mayo 2020, from 3X ERE TATA luc was a gift from Donald McDonnell (Addgene plasmid # 11354): <https://www.addgene.org/11354/>
- Allard, S., & Kopish, K.** (2008). Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes*, 21, 23-26.
- American Cancer Society*. (2017, July 1). Retrieved from How Common Is Breast Cancer?: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>
- American Cancer Society*. (2018, April 27). Retrieved from Key Statistics for Breast Cancer in Men: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer-in-men/about/key-statistics.html#references>
- Anbalagan, M., & Rowan, B.** (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in 4 human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418(3), 264-272.
- Anstead, G. M., Carlson, K. E., & Katzenellenbogen, J. A.** (1997). The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*, 62(3), 268-303.
- Arao, Y., Hamilton, K., Coons, L., & Korach, K.** (2013). Estrogen Receptor  $\alpha$  L543A,L544A Mutation Changes Antagonists to Agonists, Correlating with the Ligand Binding Domain Dimerization Associated with DNA Binding Activity. 288(29), 21105-21116.
- Baglietto, L., Severi, G., English, D., Krishnan, K., Hopper, J., McLean, C., . . . Giles, G.** (2010). Circulating Steroid Hormone Levels and Risk of Breast Cancer for Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 19(2), 492-502.
- Beato, M., & Klug, J.** (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*, 6(3), 225–236.
- Beekman, J. M., Allan, G. F., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W.** (1993). Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Molecular Endocrinology*, 7(10), 1266-1274.
- Bhat, A., Wu, Z., Maher, V., McCormick, J., & Xiao, W.** (2015). Rev7/Mad2B plays a critical role in the assembly of a functional mitotic spindle. *Cell Cycle*, 14(24), 3929-3938.
- Brown, S. B., & Hankinson, S. E.** (2015). Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids*, 99(Pt A), 8-10.
- Brzozowski, A., Pike, A., Dauter, Z., Hubbard, R., Bonn, T., Engström, O., . . . Carlquist, M.** (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753–758.
- Burandt, E., Jens, G., Holst, F., Jänicke, F., Müller, V., Quaas, A., . . . Lebeau, A.** (2013). Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 137(3), 745-53.
- Burns, K., Li, Y., Arao, Y., Petrovich, R., & Korach, K.** (2011). Selective Mutations in Estrogen Receptor  $\alpha$  D-domain Alters Nuclear Translocation and Non-estrogen Response Element Gene Regulatory Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12640-12649.

- Cahill, D. P., da-Costa, L. T., Carson-Walter, E. B., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Lengauer, C.** (1999). Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics*, *58*(2), 181-7.
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., . . . Millikan, R. C.** (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, *295*(21), 2492-2502.
- Chambraud, B., Berry, M., Redeuilh, G., Chambon, P., & Baulieu, E. E.** (1990). Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(33), 20686-91.
- Chandrashekar, D., Bashel, B., Balasubramanya, S., Creighton, C., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B., & Varambally, S.** (2017). UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, *19*(8), 649-658.
- Chang, E. C., Frasar, J., Komm, B., & Katzenellenbogen, B. S.** (2006). Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology*, *147*(10), 4831-42.
- Chen, J., & Fang, G.** (2001). MAD2B is an inhibitor of the anaphase-promoting complex. *Genes & Development*, *15*(14), 1765-1770.
- Chen, S., & Parmigiani, G.** (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(11), 1329-1333.
- Cheung, H., Chun, A., Wang, Q., Deng, W., Hu, L., Guan, X.-Y., . . . Wang, X.** (2006). Inactivation of Human MAD2B in Nasopharyngeal Carcinoma Cells Leads to Chemosensitization to DNA-Damaging Agents. *Cancer Research*, *66*(8), 4357-4367.
- ChIP Analysis.* (n.d.). Retrieved 2019, from Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/chromatin-remodeling/chromatin-immunoprecipitation-chip/chip-analysis.html>
- Clemons, M., & Goss, P.** (2001). Estrogen and the Risk of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *344*(4), 276-285.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.** (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet*, *358*, 1389-1399.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.** (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncology*, *13*(11), 1141-1151.
- Cortez, V., Samayoa, C., Zamora, A., Martinez, L., Tekmal, R., & Vadlamudi, R.** (2014). PELP1 overexpression in the mouse mammary gland results in the development of hyperplasia and carcinoma. *Cancer Research*, *74*(24), 7395-405.
- Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S., & Parker, M. G.** (1997). Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  Form Heterodimers on DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(32), 19858-19862.
- Curtis, C., Shah, S., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O., Dunning, M., . . . Aparicio, S.** (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, *486*, 346-352.

- Daly, M. B., Axilbund, J. E., Buys, S., Crawford, B., Farrell, C. D., Friedman, S., . . . Litton, J.** (2010). Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 8(5), 562-594.
- Daly, M. B., Pilarski, R., Axilbund, J. E., Berry, M., Buys, S. S., Crawford, B., . . . Klein, C.** (2016). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 14(2), 153-62.
- DC™ Protein Assay - Bio-Rad.** (n.d.). Retrieved May 2019, from Bio-Rad: <http://www.bio-rad.com/es-mx/product/dc-protein-assay?ID=22faf97a-6b8d-4763-8b97-3dc530dcab66>
- Della-Torre, S., Rando, G., Meda, C., Ciana, P., Ottobrini, L., & Maggi, A.** (2018). Transcriptional activity of oestrogen receptors in the course of embryo development. *Journal of Endocrinology*, 238(3), 165–176.
- De-Antoni, A., Pearson, C. G., Cimini, D., Canman, J. C., Sala, V., Nezi, L., . . . Musacchio, A.** (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Current Biology*, 15(3), 214-25.
- Deblois, G., & Giguère, V.** (2003). Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85(2-5), 123-131.
- Denger, S., Reid, G., Heike, B., Martin, K., & Gannon, F.** (2001). Tissue-specific expression of human ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the male. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178(1-2), 155-160.
- Deroo, B. J., & Korach, K. S.** (2006). Estrogen receptors and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 561–570.
- DeSantis, C. E., Ma, J., Sauer, A. G., Newman, L. A., & Jemal, A.** (2017). Breast Cancer Statistics, 2017, Racial Disparity in Mortality by State. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 439–448.
- Dhamad, A. E., Zhou, Z., Zhou, J., & Du, Y.** (2016). Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ) and Biochemical Characterization of the ER $\alpha$ -Hsp70 Interaction. *PLOS ONE*, 11(8), 1-19.
- Diaz-Bessone, M., Simón-Gracia, L., Scodeller, P., de-los-Angeles-Ramirez, M., Lago-Huvelle, M., Soler-Illia, G., & Simian, A.** (2019). iRGD-guided tamoxifen polymersomes inhibit estrogen receptor transcriptional activity and decrease the number of breast cancer cells with self-renewing capacity. *Journal of Nanobiotechnology*, 17, 1-14.
- Edwards, D. P.** (2000). The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(3), 307-324.
- Emmons, K., & Colditz, G.** (2017). Realizing the Potential of Cancer Prevention - The Role of Implementation Science. *The New England Journal of Medicine*, 376(10), 986-990.
- a.Fang, G., Yu, H., & Kirschner, M. W.** (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Development*, 12(12), 1871-83.
- b.Fang, G., Yu, H., & Kirschner, M.** (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Molecular Cell*, 2(2), 163-71.



- Flaveny, C., Kumar, M., & Perdew, G.** (2010). *Comprehensive Toxicology (Second Edition) 2.11 - Modulation of Soluble Receptor Signaling by Coregulators* (Vol. 2). University Park, Pennsylvania, USA: Elsevier Ltd.
- Feng, L., Wei, W., Heng, Z., Yantao, H., & Chunbo, W.** (2016). Knockdown of REV7 Inhibits Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *Oncology Research*, *24*, 315–325.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Pineros, M., . . . Bray, F.** (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today: International Agency for Research on Cancer*. Retrieved 2021 Octubre, from <https://gco.iarc.fr/today>
- Fonseka, P., Pathan, M., Chitti, S., Kang, T., & Mathivanan, S.** (2020). FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *Journal of Molecular Biology*, *166747*.
- Foulkes, W. D.** (2008). Inherited Susceptibility to Common Cancers. *The New England Journal of Medicine*, *359*(20), 2143-2153.
- Fuhrman, B., Schairer, C., Gail, M., Boyd-Morin, J., Xu, X., Sue, L., . . . Ziegler, R.** (2012). Estrogen Metabolism and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *Journal of the National Cancer Institute*, *104*(4), 326–339.
- Gan, G., Wittschieben, J., Wittschieben, B., & Wood, R.** (2008). DNA polymerase zeta (pol-zeta) in higher eukaryotes. *Cell Research*, *18*, 174-183.
- Gburcik, V., Bot, N., Maggiolini, M., & Picard, D.** (2005). SPBP is a phosphoserine-specific repressor of estrogen receptor alpha. *25*(9), 3421-30.
- Girard, B., Daniel, A., Lange, C., & Ostrander, J.** (2014). PELP1: a review of PELP1 interactions, signaling, and biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *328*(1), 642-651.
- Girdler, F., & Brotherick, I.** (2000). The oestrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and their role in breast cancer: a review. *The Breast*, *9*(4), 194-200.
- Green, C., Thompson, P., Johnston, P., & El-Tanani, M.** (2007). Interaction between transcription factor, basal transcription factor 3, and the NH2-terminal domain of human estrogen receptor alpha. *Molecular Cancer Research*, *5*(11), 1191-1200.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P., & Chambon, P.** (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, *320*(6058), 134-139.
- Griekspoor, A., Zwart, W., Neefjes, J., & Michalides, R.** (2007). Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear Receptor Signaling*, *5*, 1-9.
- Gudmundsdottir, K., & Ashworth, A.** (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, *25*(43), 5864-5874.
- Gunter, M., Hoover, D., Yu, H., Wassertheil-Smoller, S., Rohan, T., Manson, J., . . . Strickler, H.** (2009). Insulin, Insulin-Like Growth factor-I, and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *Journal of the National Cancer Institute*, *101*(1), 48-60.
- Hall, J., & McDonnell, D.** (1999). The Estrogen Receptor Beta-Isoform (ERbeta) of the Human Estrogen Receptor Modulates ERalpha Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology*, *140*(12), 5566-5578.
- Hall, J., & McDonnell, D.** (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Molecular Interventions*, *5*(6), 343-357.
- Hara, K., Hashimoto, H., Murakumo, Y., Kobayashi, S., Kogame, T., Unzai, S., . . . Sato, M.** (2010). Crystal Structure of Human REV7 in Complex with a Human

- REV3 Fragment and Structural Implication of the Interaction between DNA Polymerase-zeta and REV1. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(16), 12299–12307.
- Harvey, T., Macnaughton, T., & Gowans, E.** (1997). The development and characterisation of a SV40 T-antigen positive cell line of human hepatic origin. *Journal of Virological Methods*, 65(1), 67-74.
- Hemel, D., & Domchek, S. M.** (2010). Breast cancer predisposition syndromes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24(5), 799-814.
- Henderson, B. E., & Feigelson, H. S.** (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3), 427–433.
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Pike, M. C., & Casagrande, J. T.** (1982). Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Research*, 42(8), 3232-9.
- Henderson, B., Ross, R., & Bernstein, L.** (1988). Estrogens as a Cause of Human Cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Research*, 48, 246-253.
- Hergueta-Redondo, M., Palacios, J., Cano, A., & Moreno-Bueno, G.** (2008). “New” molecular taxonomy in breast cancer. *Clinical Translational Oncology*, 10, 777-785.
- Hernández-Rojas, R., Jiménez-Arellano, C., de la Fuente-Granada, M., Ordaz-Rosado, D., García-Becerra, R., Valencia-Mayoral, P., . . . González-Arenas, A.** (2022). The interplay between estrogen receptor beta and protein kinase C, a crucial collaboration for medulloblastoma cell proliferation and invasion. *Cell Signaling*, 92(110246).
- Hong, C.-F., Chou, Y.-T., Lin, Y.-S., & Wu, C.-W.** (2009). MAD2B, a novel TCF4-binding protein, modulates TCF4-mediated epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19613-22.
- Horizon Discovery.* (n.d.). Retrieved Mayo 2020, from MGC cDNAs MAD2L2 (HUMAN): <https://horizondiscovery.com/products/gene-modulation/overexpression-reagents/cdna/PIFs/MGC-cDNAs?nodeid=entrezgene-10459&catalognumber=MHS6278-202757173#undefined>
- Hulka, B. S.** (1997). Epidemiologic analysis of breast and gynecologic cancers. *Progress in clinical and biological research*, 396, 17-29.
- Hye-Rim, L., Tae-Hee, K., & Kyung-Chul, C.** (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. 28(2), 71–76.
- Invitrogen ThermoFisher Scientific.* (n.d.). Retrieved 2020 Diciembre, from pcDNA™3.1/His A, B, & C Mammalian Expression Vectors Cat. V38520: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V38520#/V38520>
- Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., . . . Sasakawa, C.** (2007). A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell*, 130(4), 611-23.
- Jozwik, K. M., & Carroll, J. S.** (2012). Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nature Reviews Cancer*, 12, 381-385.
- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G. U., Heitlinger, E., & Cato, A. C.** (1988). A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Research*, 16(2), 647–663.
- Klinge, C.** (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*, 65, 227–251.

- Klinge, C. M.** (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, 29(14), 2905–2919.
- Klinge, C. M., Jernigan, S. C., Mattingly, K. A., Risinger, K. E., & Zhang, J.** (2004). Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  by coactivators and corepressors. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33, 387–410.
- Kaaks, R., Rinaldi, S., Key, T. J., Berrino, F., Peeters, P. H., Biessy, C., . . . Chang-Claude, J.** (2005). Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocrine-Related Cancer*, 12(4), 1071–1082.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., . . . Chambon, P.** (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, 270(5241), 1491-4.
- Key, T., Appleby, P., Barnes, I., Reeves, G., & EBCCG.** (2002). Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(8), 606-616.
- Kim, J. H., Li, H., & Stallcup, M. R.** (2003). CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an N-terminal activation domain of p160 coactivators. *Molecular Cell*, 12(6), 1537-1549.
- Kocanova, S., Mazaheri, M., Caze-Subra, S., & Bystricky, K.** (2010). Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC Molecular and Cell Biology*, 11(98), 1-13.
- Koide, A., Zhao, C., Naganuma, M., Abrams, J., Deighton-Collins, S., Skafar, D., & Koide, S.** (2007). Identification of Regions within the F Domain of the Human Estrogen Receptor  $\alpha$  that Are Important for Modulating Transactivation and Protein-Protein Interactions. *Molecular Endocrinology*, 21(4), 829–842.
- Kojima, H., Takeuchi, S., Sanoh, S., Okuda, K., Kitamura, S., Uramaru, N., . . . Yoshinari, K.** (2019). Profiling of bisphenol A and eight its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology*, 413, 48-55.
- Kramer, E., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A., Mann, M., & Peters, J.-M.** (2000). Mitotic Regulation of the APC Activator Proteins CDC20 and CDH1. *Molecular Biology of the Cell*, 11(5), 1555–1569.
- Kumar, R., & Litwack, G.** (2009). Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids*, 74(12), 877-883.
- Kumar, R., Zakharov, M., Khan, S., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., . . . Jasuja, R.** (2011). The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *Journal of Amino Acids*, 2011, 1-7.
- Kumar, R., Zhang, H., Holm, C., Vadlamudi, R., Landberg, G., & Rayala, S.** (2009). Extranuclear coactivator signaling confers insensitivity to tamoxifen. *Clinical Cancer Research*, 15(12), 4123-30.
- Kumar, V., & Chambon, P.** (1988). The Estrogen Receptor Binds Tightly to Its Responsive Element as a Ligand-Induced Homodimer. *Cell*, 55, 145-156.
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J., & Corbo, L.** (2011). Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocrine Reviews*, 32(5), 597-622.

- Lee, H.-R., Kim, T.-H., & Choi, K.-C.** (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Laboratory Animal Research*, 28(2), 71–76.
- Leitman, D. C., Paruthiyil, S., Yuan, C., Herber, C. B., Olshansky, M., Tagliaferri, M., . . . Speed, T. P.** (2012). Tissue-specific regulation of genes by estrogen receptors. *Seminars in Reproductive Medicine*, 30(1), 14-22.
- Li, L., & Davie, J.** (2008). Association of Sp3 and estrogen receptor alpha with the transcriptionally active trefoil factor 1 promoter in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(2), 365-9.
- Li, Y., Gorbea, C., Mahaffey, D., Rechsteiner, M., & Benezra, R.** (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12431-6.
- Lin, C.-Y., Ström, A., Vega, V., Kong, S., Yeo, A., Thomsen, J., . . . Liu, E.** (2004). Discovery of estrogen receptor  $\alpha$  target genes and response elements in breast tumor cells. *Genome Biology*, 5(9), R66.
- Lin, C.-Y., Vega, V., Thomsen, J., Zhang, T., Kong, S., Xie, M., . . . Liu, E.** (2007). Whole-Genome Cartography of Estrogen Receptor  $\alpha$  Binding Sites. *PLoS GeneticS*, 3(6), e87.
- Lipofectamine 2000 Reagent.* (2013, June 12). Retrieved May 2019, from Thermo Fisher Scientific: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine\\_2000\\_Reag\\_protocol.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf)
- Listovsky, T., & Sale, J.** (2013). Sequestration of CDH1 by MAD2L2 prevents premature APC/C activation prior to anaphase onset. *Journal of Cell Biology*, 203(1), 87-100.
- Lonard, D. M., & O'Malley, B. W.** (2012). Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(10), 598-604.
- Lonard, D., Lanz, R., & O'Malley, B.** (2007). Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocrine Reviews*, 28(5), 575-87.
- Lumachi, F., Santeufemia, D., & Basso, S.** (2015). Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 231–239.
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., & Yu, H.** (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Molecular Cell*, 9(1), 59-71.
- McDonnell, D., & Norris, J.** (2002). Connections and Regulation of the Human Estrogen Receptor. *Science*, 296(5573), 1642-1644.
- McGee, S. F., Lanigan, F., Gilligan, E., & Groner, B.** (2006). Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression. *EMBO Reports*, 7(11), 1084–1088.
- Magnani, L., Eeckhoute, J., & Lupien, M.** (2011). Pioneer factors: directing transcriptional regulators within the chromatin environment. *Trends in Genetics*, 27(11), 465-474.
- Manavathi, B., Dey, O., Gajulapalli, V. N., Bhatia, R., Bugide, S., & Kumar, R.** (2013). Derailed Estrogen Signaling and Breast Cancer: An Authentic Couple. *Endocrine Reviews*, 34(1), 1–32.

- Manavathi, B., Samanthapudi, V. S., & Gajulapalli, V. N.** (2014). Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2(34), 1-13.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., . . . Evans, R. M.** (1995). The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell*, 83(6), 835-839.
- Manjer, J., Johansson, R., Berglund, G., Janzon, L., Kaaks, R., Agren, A., & Lenner, P.** (2003). Postmenopausal breast cancer risk in relation to sex steroid hormones, prolactin and SHBG (Sweden). *Cancer Causes and Control*, 14(7), 599–607.
- Margeat, E., Pujol, N., Boulahtouf, A., Chen, Y., Müller, J., Gratton, E., . . . Royer, C.** (2001). The human estrogen receptor  $\alpha$  dimer binds a single SRC-1 coactivator molecule with an affinity dictated by agonist structure. *Journal of Molecular Biology*, 306(3), 433-442.
- Margottin-Goguet, F., Hsu, J., Loktev, A., Hsieh, H.-M., Reimann, J., & Jackson, P.** (2003). Prophase Destruction of Emi1 by the SCF-Beta-TrCP/Slimb Ubiquitin Ligase Activates the Anaphase Promoting Complex to Allow Progression beyond Prometaphase. *Developmental Cell*, 4, 813-826.
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., . . . Cook, J.** (2013). Cancer Risks for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results From Prospective Analysis of EMBRACE. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(11), 812–822.
- Medunjanin, S., Hermani, A., De Servi, B., Grisouard, J., Rincke, G., & Mayer, D.** (2005). Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 33006-14.
- Meier-Abt, F., Milani, E., Roloff, T., Brinkhaus, H., Duss, S., Meyer, D. S., . . . Bentires-Alj, M.** (2013). Parity induces differentiation and reduces Wnt/Notch signaling ratio and proliferation potential of basal stem/progenitor cells isolated from mouse mammary epithelium. *Breast Cancer Research*, 15(2), 1-17.
- Merrell, K. W., Crofts, J., Smith, R., Sin, J., Kmetzsch, K., Merrell, A., . . . Lin, C.-Y.** (2011). Differential recruitment of nuclear receptor coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor- $\alpha$ . *Oncogene*, 30(13), 1608–1614.
- Mesa, A., Xu, R., Yip, A., & Zhang, A.** (2019). Steps toward a luciferase assay system for investigating gene expression. *Undergraduate Journal of Experimental Microbiology and Immunology (UJEMI)*, 24, 1-16.
- Métivier, R., Penot, G., Hübner, M., Reid, G., Brand, H., Kos, M., & Gannon, F.** (2003). Estrogen Receptor- $\alpha$  Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. *Cell*, 115(6), 751-763.
- Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., & Torres-Domínguez, J. A.** (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *American Society of Clinical Oncology*, 3(6), 740-748.
- Montano, M., Müller, V., Trobaugh, A., & Katzenellenbogen, B.** (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Molecular Endocrinology*, 9(7), 814–825.

- Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R.** (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*, 392(1), 49-53.
- Murakumo, Y., Roth, T., Ishii, H., Rasio, D., Numata, S., Croce, C., & Frishel, R.** (2000). A Human REV7 Homolog That Interacts with the Polymerase-zeta Catalytic Subunit hREV3 and the Spindle Assembly Checkpoint Protein hMAD2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4391-4397.
- National Cancer Institute. (n.d.). Retrieved from NCI Dictionary of Cancer Terms: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/breast-cancer>
- Newcomb, P. A., Trentham-Dietz, A., Hampton, J. M., Egan, K. M., Titus-Ernstoff, L., Andersen, S. W., . . . Willett, W. C.** (2011). Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer. *Cancer*, 117(9), 1946–1956.
- New England BioLabs. (2019, Diciembre). Retrieved from NEBioCalculator.
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., . . . Perou, C. M.** (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(16), 5367-5374.
- Noriega-Reyes, M., Rivas-Torres, M., Oñate-Ocaña, L., Jordan-Vallés, A., Baranda-Avila, N., & Langley, E.** (2015). Novel role for PINX1 as a coregulator of nuclear hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 414, 9-18.
- Notides, A. C., Lerner, N., & Hamilton, D. E.** (1981). Positive cooperativity of the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8), 4926–4930.
- O'Donovan, P. J., & Livingston, D. M.** (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31(6), 961-967.
- O'Malley, B., & Kumar, R.** (2009). Nuclear receptor coregulators in cancer biology. *Cancer Research*, 69(21), 8217-22.
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Chisanga, D., Alessandro, R., Ang, C., Askenase, P., . . . Mathivanan, S.** (2017). A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1321455).
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C., Gangoda, L., Quek, C., Williamson, N., . . . Mathivanan, S.** (2015). FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*, 15, 2597-2601.
- Pernicone, N., Peretz, L., Grinshpon, S., & Listovsky, T.** (2020). MDA-MB-157 Cell Line Presents High Levels of MAD2L2 and Dysregulated Mitosis. *Anticancer Research*, 40(10), 5471-5480.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Rijn, M. v., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Børresen-Dale, A. L.** (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752.
- Peters, J.-M.** (2006). The anaphase promoting complex/ cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 644–656.
- Pfleger, C. M., Salic, A., Lee, E., & Kirschner, M. W.** (2001). Inhibition of Cdh1–APC by the MAD2-related protein MAD2L2: a novel mechanism for regulating Cdh1. *Genes & Development*, 15(14), 1759–1764.

- Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., & Yamamoto, K.** (1990). Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regulation*, 1(3), 291–299.
- Pike, A., Brzozowski, A., & Hubbard, R.** (2000). A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5), 261-8.
- Qiao, R., Weissmann, F., Yamaguchi, M., Brown, N., VanderLinden, R., Imre, R., . . . Peters, J.-M.** (2016). Mechanism of APC/CCDC20 activation by mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), E2570-E2578.
- Reimann, J., Freed, E., Hsu, J., Kramer, E., Peters, J.-M., & Jackson, P.** (2001). Emi1 Is a Mitotic Regulator that Interacts with Cdc20 and Inhibits the Anaphase Promoting Complex. *Cell*(105), 645–655.
- Reimann, J., Gardner, B., Margottin-Goguet, F., & Jackson, P.** (2001). Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes & Development*, 15, 3278–3285.
- Reynoso-Noverón, N., Villarreal-Garza, C., Soto-Perez-de-Celis, E., Arce-Salinas, C., Matus-Santos, J., Ramírez-Ugalde, M. T., . . . Mohar, A.** (2017). Clinical and Epidemiological Profile of Breast Cancer in Mexico: Results of the Seguro Popular. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 757-764.
- Robinson-Rechavi, M., Escriva-Garcia, H., & Laudet, V.** (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*, 116, 585-586.
- Rogatsky, I., Trowbridge, J., & Garabedian, M.** (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22296-302.
- Russo, I. H., & Russo, J.** (2011). Pregnancy-Induced Changes in Breast Cancer Risk. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16, 221–233.
- Schrock, M., Stromberg, B., Scarberry, L., & Summers, M.** (2020). APC/C ubiquitin ligase: Functions and mechanisms in tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 67(2), 80-91.
- Schwabe, J., Chapman, L., Finch, J., & Rhodes, D.** (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75(3), 567-78.
- Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., . . . Børresen-Dale, A. L.** (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*, 98(19), 10869-10874.
- Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., . . . Botstein, D.** (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*, 100(14), 8418–8423.
- Sever, R., & Glass, C. K.** (2013). Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), 1-4.
- Shiau, A., Barstad, D., Loria, P., Cheng, L., Kushner, P., Agard, D., & Greene, G.** (1998). The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937.
- Shibata, H., Spencer, T. E., Oñate, S. A., Jenster, G., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W.** (1997). Role of co-activators and co-repressors in the

- mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Progress in Hormone Research*, 52, 141-64.
- Shigekawa, T., Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Shimizu, C., Saji, S., . . . Inoue, S.** (2011). FOXP1, an Estrogen-Inducible Transcription Factor, Modulates Cell Proliferation in Breast Cancer Cells and 5-year Recurrence-Free Survival of Patients With Tamoxifen-Treated Breast Cancer. *Hormones and Cancer*, 2(5), 286-97.
- Sieri, S., Krogh, V., Bolelli, G., Abagnato, C., Grioni, S., Pala, V., . . . Muti, P.** (2009). Sex Hormone Levels, Breast Cancer Risk, and Cancer Receptor Status in Postmenopausal Women: The ORDET Cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(1), 169-176.
- Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De-Antoni, A., Jeang, K.-T., & Musacchio, A.** (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1–Mad2 core complex: implications of a ‘safety belt’ binding mechanism for the spindle checkpoint. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 21(10), 2496–2506.
- Sironi, L., Melixetian, M., Faretta, M., Prosperini, E., Helin, K., & Musacchio, A.** (2001). Mad2 binding to Mad1 and Cdc20, rather than oligomerization, is required for the spindle checkpoint. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 20(22), 6371–6382.
- Smith, D. F., & Toft, D. O.** (1993). Steroid Receptors and Their Associated Proteins. *Molecular Endocrinology*, 7(1), 4-11.
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., . . . Liu, E. T.** (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10393-10398.
- Stossi, F., Madak-Erdogan, Z., & Katzenellenbogen, B.** (2009). Estrogen Receptor Alpha Represses Transcription of Early Target Genes via p300 and CtBP1. *Molecular and Cellular Biology*, 29(7), 1749–1759.
- Subramani, R., Nandy, S., Pedroza, D. A., & Lakshmanaswamy, R.** (2017). Role of Growth Hormone in Breast Cancer. *Endocrinology*, 158(6), 1543-1555.
- Sun, J., Nawaz, Z., & Slingerland, J.** (2007). Long-Range Activation of GREB1 by Estrogen Receptor via Three Distal Consensus Estrogen-Responsive Elements in Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 21(11), 2651–2662.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F.** (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tamrazi, A., Carlson, K., Daniels, J., Hurth, K., & Katzenellenbogen, J.** (2002). Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Molecular Endocrinology*, 16(12), 2706-19.
- The UniProt Consortium.** (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489.
- Tweedie, S., Braschi, B., Gray, K., Jones, T., Seal, R., Yates, B., & Bruford, E.** (2021). Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D939–D946.
- Vaclavicek, A., Lorenzo-Bermejo, J., Wappenschmidt, B., Meindl, A., Sutter, C., Schmutzler, R., . . . Försti, A.** (2007). Genetic variation in the major mitotic checkpoint genes does not affect familial breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 106, 205–213.



- Vajdos, F., Hoth, L., Geoghegan, K., Simons, S., LeMotte, P., Danley, D., . . . Pandit, J.** (2007). The 2.0 Å crystal structure of the ER $\alpha$  ligand-binding domain complexed with lasofoxifene. *Protein Science*, *16*(5), 897-905.
- Varadi, V., Bevier, M., Grzybowska, E., Johansson, R., Enquist, K., Henriksson, R., . . . Försti, A.** (2011). Genetic variation in genes encoding for polymerase  $\zeta$  subunits associates with breast cancer risk, tumour characteristics and survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, *129*, 235–245.
- Vasaikar, S., Straub, P., Wang, J., & Zhang, B.** (2018). LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D956–D963.
- Wahli, W., Martinez, E., Corthésy, B., & Cardinaux, J. R.** (1989). cis- and trans-acting elements of the estrogen-regulated vitellogenin gene B1 of *Xenopus laevis*. *J Steroid Biochem.*, *34*(1-6), 17-32.
- Wang, H., Peters, G. A., Zeng, X., Tang, M., Ip, W., & Khan, S. A.** (1995). Yeast Two-hybrid System Demonstrates That Estrogen Receptor Dimerization Is Ligand-dependent in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*, 23322-23329.
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arao, Y., . . . Kato, S.** (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor  $\alpha$  coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J*, *20*(6), 1341-1352.
- Watson, E., Brown, N., Peters, J.-M., Stark, H., & Schulman, B.** (2019). Posing the APC/C E3 Ubiquitin Ligase to Orchestrate Cell Division. *Trends in Cell Biology*, *29*(2), 117-134.
- Watson, P. J., Fairall, L., & Schwabe, J. W.** (2012). Nuclear hormone receptor corepressors: Structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *348*, 440–449.
- Woolcott, C., Shvetsov, Y., Stanczyk, F., Wilkens, L., White, K., Caberto, C., . . . Goodman, M.** (2010). Plasma Sex Hormone Concentrations and Breast Cancer Risk in an Ethnically Diverse Population of Postmenopausal Women: The Multiethnic Cohort Study. *Endocrine-related cancer*, *17*(1), 125-134.
- Woo, A. R., Sze, S. K., Chung, H. H., & Lin, V. C.-L.** (2019). Delineation of critical amino acids in activation function 1 of progesterone receptor for recruitment of transcription coregulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(4), 522-533.
- Wu, L., Wu, Y., Gathings, B., Wan, M., Li, X., Grizzle, W., . . . Cao, X.** (2003). Smad4 as a transcription corepressor for estrogen receptor  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, *278*(17), 15192-200.
- Wu, X., Li, H., & Chen, J.** (2001). The human homologue of the yeast DNA repair and TFIIH regulator MMS19 is an AF-1-specific coactivator of estrogen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(26), 23962-8.
- Xie, B., Tsao, S. W., & Wong, Y. C.** (1999). Induction of high incidence of mammary tumour in female Noble rats with a combination of 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone. *Carcinogenesis*, *20*(6), 1069–1078.
- Ylikomi, T., Bocquel, M., Berry, M., Gronemeyer, H., & Chambon, P.** (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *The EMBO Journal*, *11*(10), 3681-94.
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S., Güpür, G., & Muyan, M.** (2017). Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, *16*(1), 4-20.

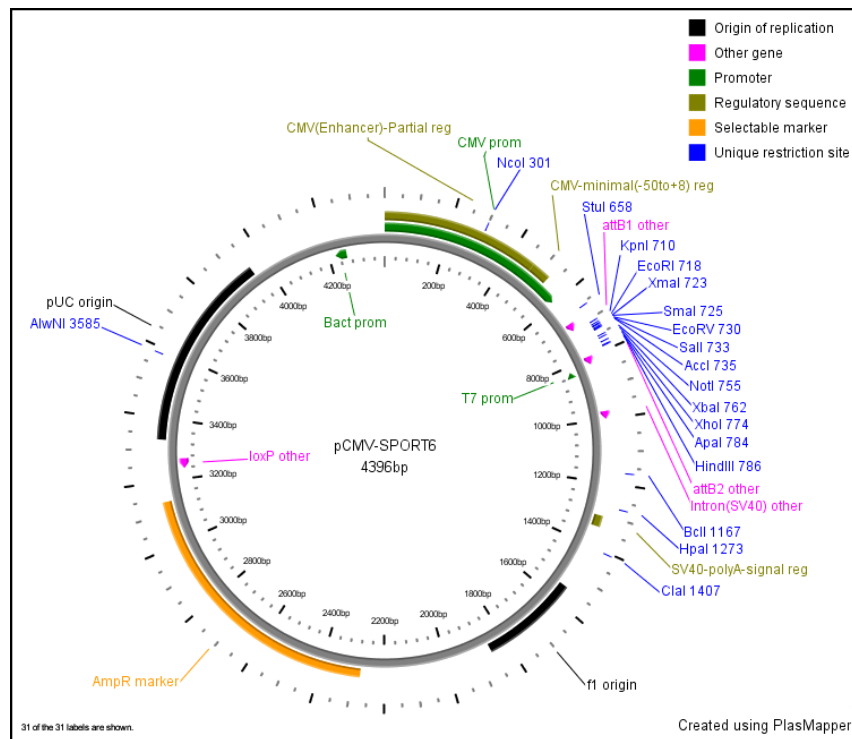
- Yao, T., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., & Livingston, D.** (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10626-31.
- Yuan, B., Xu, Y., Woo, J.-H., Wang, Y., Bae, Y., Yoon, D.-S., . . . Gabrielson, E.** (2006). Increased Expression of Mitotic Checkpoint Genes in Breast Cancer Cells with Chromosomal Instability. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 405-410.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., & Seufert, W.** (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*, 282(5394), 1721-4.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., Shore, R., Koenig, K., Akhmedkhanov, A., Afanasyeva, Y., Kato, I., . . . Toniolo, P.** (2004). Postmenopausal levels of oestrogen, androgen, and SHBG and breast cancer: long-term results of a prospective study. *British Journal of Cancer*, 90(1), 153–159.
- Zhang , L., Yang, S.-H., & Sharrocks, A.** (2007). Rev7/MAD2B links c-Jun N-terminal protein kinase pathway signaling to activation of the transcription factor Elk-1. *Molecular and Cellular Biology*, 27(8), 2861-9.
- Zhang, X.** (2019). *Estrogen Receptor and Breast Cancer Celebrating the 60th Anniversary of the Discovery of ER*. Humana Press.
- Zhang, X., Tworoger, S., Eliassen, A., & Hankinson, S.** (2013). Postmenopausal plasma sex hormone levels and breast cancer risk over 20 years of follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*, 137(3), 883–892.
- Zhao, J., Liu, S., Wang, H., Zhang, X., Kang, T., Li, Z., . . . Cao, S.** (2011). Mitotic arrest deficient protein MAD2B is overexpressed in human glioma, with depletion enhancing sensitivity to ionizing radiation. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18, 827-833.
- Zwart, R., de Leeuw, R., Rondaij, M., Neefjes, J., Mancini, M., & Michalides, R.** (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of Cell Science*, 123(8), 1253–1261.
- Zwart, W., Koornstra, R., Wesseling, J., Rutgers, E., Linn, S., & Carroll, J.** (2013). A carrier-assisted ChIP-seq method for estrogen receptor-chromatin interactions from breast cancer core needle biopsy samples. *BMC Genomics*, 14(232), 1-7.

## 14. Anexo: Plásmidos

### 14.1. pCMV-SPORT6-MAD2B

MHC Human MAD2L2 Sequence-Verified cDNA

<b>Adhesión:</b>	BC015244
<b>ID de clona:</b>	3916742
<b>Número de catálogo:</b>	MHS6278-202757173
<b>Cepa huésped:</b>	DH10B TonA
<b>Vector:</b>	pCMV-SPORT6
<b>Tipo de vector:</b>	Expresión de mamíferos
<b>Antibiótico (Bacteria):</b>	Ampicilina (Concentración: 100 µg/mL), rango de resistencia: 50-200 µg/mL
<b>Cebadores de secuenciación:</b>	sp6, T7, 21M13, M13 reverso
<b>Sitio de restricción 3'</b>	NotI
<b>Sitio de restricción 5'</b>	Sall
<b>Selección de mamíferos:</b>	N/A
<b>Referencia</b>	(Horizon Discovery, n.d.)

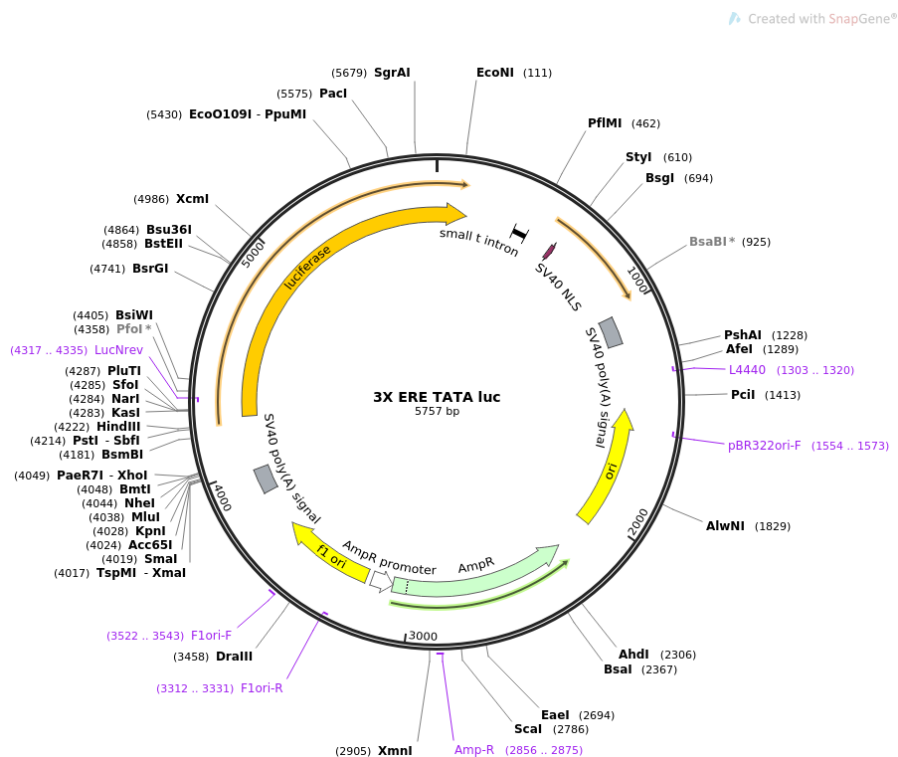


(Horizon Discovery, n.d.)

## 14.2. 3XERE-TATA-Luc

Luciferase reporter containing 3 copies of vitellogenin ERE

<b>Número de catálogo:</b>	11354
<b>Vector:</b>	pGL2-TATA-Inr
<b>Fabricante:</b>	Stratagene
<b>Tamaño sin inserto (pb):</b>	5600
<b>Tipo de vector:</b>	Luciferasa (expression bacteriana)
<b>Resistencia bacteriana</b>	Ampicilina
<b>Cepa de crecimiento</b>	DH5 $\alpha$
<b>Nombre de gen/inserto</b>	ERE (GGTCA CAG TGACC)
<b>Especie</b>	<i>H. sapiens</i>
<b>Cebador de secuenciación 5':</b>	lucNrev
<b>Sitio de restricción 3'</b>	BglII
<b>Sitio de restricción 5'</b>	BglII
<b>Referencia</b>	(Hall & McDonnell, 1999)

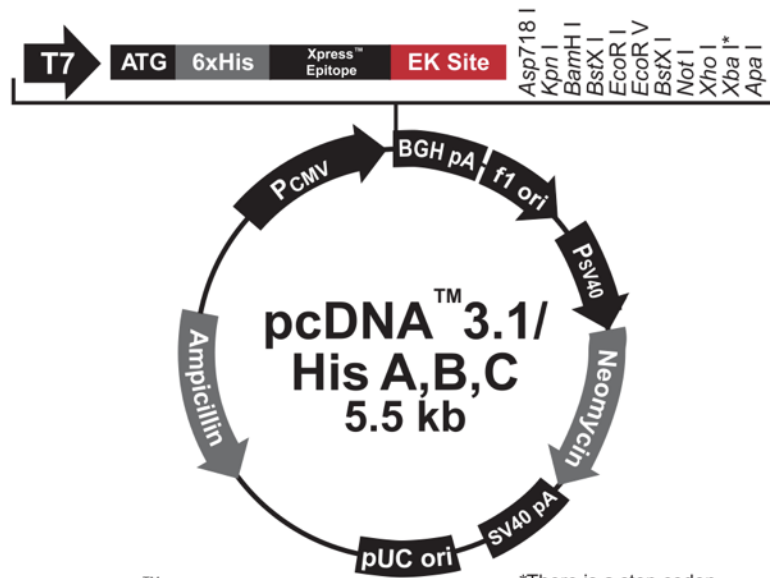


(Addgene, n.d.)

## 14.3. pSG-SRC-1

Donado por el Dr. Pierre Chambon (INSERM, Francia).

## 14.4. pcDNA3.1/His A



Comments for pcDNA™3.1/His A  
5514 nucleotides

\*There is a stop codon  
following the Xba I  
site in version A.

(Invitrogen ThermoFisher Scientific, n.d.)