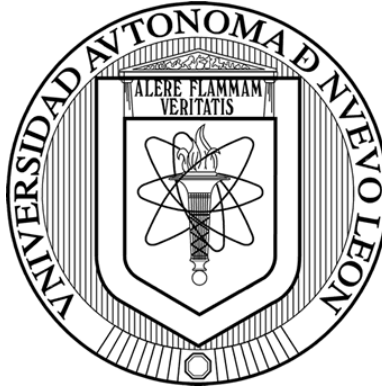


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FÁRMACOS EPIGENÉTICOS SOBRE LA
EXPRESIÓN DE MYCT1 EN LA LÍNEA CELULAR HEPG2 DE
HEPATOCARCINOMA HUMANO.”

Por

L.B.G. LUISA RENDON GARLANT

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2026

Evaluación del efecto de fármacos epigenéticos sobre la expresión de MYCT1 en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma humano.

Comité de Tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides
Presidente



Dr. Moises Franco Armides Molina
Secretario



Dr. Juan Manuel Aleocer González
Vocal



Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Vocal



Dra. Diana Resendez Pérez
Vocal



Dra. Katuska Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado

Evaluación del efecto de fármacos epigenéticos sobre la expresión de MYCT1 en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma humano.



Dr. Pablo Zapata Benavides

Director interno



Dr. Mario A. Bermúdez de León

Director externo

El presente proyecto se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Pablo Zapata Benavides, y en el Departamento de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Mario A. Bermúdez de León.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directores de tesis el Dr. Mario Bermúdez y el Dr. Pablo Zapata quienes me dieron la oportunidad de continuar con mi formación escolar y profesional. Por la confianza y paciencia durante los momentos complicados. Muchas gracias por el espacio brindado y por la perspectiva que me fomentaron de la ciencia. A la Dra. Elena Camacho por ser parte vital de este equipo y siempre compartir sus experiencias y conocimiento conmigo.

A mis compañeros del CIBIN que se han vuelto como una familia para mí, que me hacían disfrutar mis días de trabajo y me apoyaban en mis días malos. Fueron parte vital de mi formación y espero la vida nos mantenga juntos. A mis compañeros del L5 por las juntas enriquecedoras y por siempre hacerme parte de su equipo de trabajo.

Finalmente a mi familia por acompañarme en este camino, por permitirme hacer lo que me apasiona y siempre creer en mí. Gracias por siempre escuchar e interesarse en mi investigación y los temas que platico con ustedes aunque sé que en ocasiones es difícil de entender. Este trabajo es también de ustedes.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 Epidemiología.....	4
4.2 Factores de riesgo.....	4
4.3 Estadios y tratamientos.....	5
4.4 Diagnóstico.....	5
4.5 Alteración de vías	6
4.6 MYCT1	6
4.7 Regulación MYCT1.....	6
4.8 MYCT1 y cáncer	7
5. JUSTIFICACIÓN.....	10
6. HIPÓTESIS.....	11
7. OBJETIVOS.....	12
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
9. RESULTADOS.....	17
9.1 Expresión MYCT1 en línea celular HepG2	17
9.2 Expresión MYCT1 en línea celular HepG2 en respuesta al tratamiento.....	20
9.3 Evaluación de procesos en línea celular HepG2 en respuesta al tratamiento	24
10. DISCUSIÓN.....	28
11. CONCLUSIÓN	30
12. PERSPECTIVAS	31
13. BIBLIOGRAFÍA.....	32
Anexo 1	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de interacciones de MYCT1 en diferentes rutas celulares.	9
Figura 2. Diagrama de flujo de estrategia experimental general.....	13
Figura 3. Nivel de expresión MYCT1 en línea celular HepG2.....	18
Figura 4. Nivel de expresión MYCT1 en línea celular HepG2.	19
Figura 5. Nivel de expresión proteica MYCT1 en línea celular HepG2.....	20
Figura 6. Concentración mínima inhibitoria (IC50) de HepG2 expuestas niclosamida	21
Figura 7. Evaluación transcrito MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 48 h y 72 h.....	21
Figura 8. Reamplificación productos de PCR para evaluación de transcrito MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 48 h y 72 h.	22
Figura 9. Nivel de expresión proteica MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 48 h.	23
Figura 10 Nivel de expresión proteica MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 72 h.	23
Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular en HepG2 en respuesta a los fármacos.	25
Figura 12. Proliferación celular normalizada (OD 570/600) en HepG2 en respuesta a los fármacos.....	26
Figura 13. Porcentaje de cierre de lesión en HepG2 en respuesta a los fármacos.	27

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARID1A	Dominio 1A de interacción rico en AT
ARID2	Dominio de interacción rico en AT 2
ARN	Ácido ribonucleico
CCNA2	Ciclina A2
CCNE1	Ciclina E1
cDNA	ADN complementario
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa
GSK3A	Glucógeno sintasa cinasa 3A
HCC	Carcinoma hepatocelular
LTC	Linfocitos T citotóxicos.
MEC	Matriz extracelular
miARN	MicroARNs
MMP 7	Metaloproteinasas de matriz 7
MYCT1	Myc target 1
NPM1	Nucleofosmina 1
PBS	Buffer de fosfato salino
PGM1	Fosfoglucomutasa1
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
RPS6KA3	Cinasa S6 ribosomal alfa
UGP2	Glucosa-1-fosfato uridiltransferasa
YY1	Ying-yang 1

1. RESUMEN

El cáncer es una de las mayores causas de muerte en la actualidad. Esta patología es caracterizada por diferentes comportamientos biológicos de un grupo de células como lo es la proliferación sostenida, incremento en capacidad migratoria, evasión de mecanismo naturales de muerte e inclusive evasión del sistema inmune. Las neoplasias presentadas en hígado tienen una alta incidencia en México ya que dentro de los factores de riesgo están los trastornos metabólicos como es la obesidad y diabetes, ambas con alta presencia en el país. Se ha visto la necesidad de desarrollar nuevos blancos terapéuticos dirigidos a tratar etapas avanzadas de esta neoplasia ya que los tratamientos farmacológicos existentes han comenzado a presentar resistencia en los pacientes. Por otro lado, MYCT1 es un candidato a supresor tumoral que se ha identificado en una expresión baja en un gran número de neoplasias. Así mismo, se ha relacionado el incremento en la expresión de este gen con un mejor pronóstico y un comportamiento menos agresivo de parte de las células tumorales, volviéndose un posible blanco terapéutico. Por consiguiente, el presente trabajo buscaba evaluar el efecto de los fármacos epigenéticos sobre la expresión de MYCT1 en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma humano. La estrategia experimental que se siguió fue medir la expresión tanto basal como después del tratamiento con los fármacos epigenéticos de MYCT1 en HepG2 por medio de RT-qPCR y Western blot. Posterior a esto se determinó el efecto de la modificación de la expresión de MYCT1 generada por los tratamientos sobre la viabilidad, proliferación y migración de la línea celular HepG2. Se determinó que el nivel de expresión proteico basal de MYCT1 es hasta 3 veces menor al compararlo con controles sanos y no fue posible cuantificar el transcrito debido a su baja abundancia. Los fármacos epigenéticos no fueron capaces de restablecer la expresión de MYCT1, sin embargo, algunos de ellos como la niclosamida, metformina, ácido valproico y azacitidina 10 μ M tuvieron un efecto en disminuir la viabilidad celular y todos los fármacos disminuyeron el potencial migratorio de manera significativa. Los fármacos epigenéticos demostraron ser un buen tratamiento debido a su amplio espectro de blancos moleculares. Debido a la baja abundancia en el modelo celular se cree que MYCT1 está relacionado en el desarrollo de neoplasias y el restablecimiento de su expresión podría disminuir la malignidad celular.

2. ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death in the present day. This pathology is characterized by different biological behaviors displayed by a group of cells such as sustained proliferation, increase in migratory capacity, evasion of natural cell death mechanisms and even immune system evasion. Liver neoplasia has a high incidence in Mexico since part of the risk factors includes metabolic disorders like obesity and diabetes, both with high prevalence within the country. A need for new therapeutic targets focused on treating advanced stages of this neoplasia has surged. MYCT1 is a tumor suppressor candidate, that has been identified with low expression in multiple neoplasia's. The increased in expression of this gene has been correlated with better prognostic and less aggressive behavior of tumor cells, making it a possible therapeutic target. That is why, we were looking to evaluate the effect of epigenetic drugs over the expression of MYCT1 in the cell line HepG2 from human hepatocarcinoma. Overall experimental strategy was to measure baseline as well as post treatment expression of MYCT1 in HepG2 by RT-qPCR and Western blot. After this, the effect of epigenetics drug treatment over cell viability, proliferation and migration rate were measured. Basal MYCT1 protein expression was found to be up to threefold lower compared with healthy controls, and transcript levels could not be quantified due to their low abundance. Epigenetic drugs were unable to restore MYCT1 expression; however, some of them, including niclosamide, metformin, valproic acid, and azacitidine 10 μ M, were able to reduce cell viability. Moreover, all drugs significantly decreased the migratory potential. Epigenetic drugs proved to be a promising therapeutic approach because of their broad spectrum of molecular targets. Given the low abundance of MYCT1 in the cellular model, it is believed that MYCT1 is involved in the development of neoplasia, and restoring its expression could reduce cellular malignancy.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación sostenida y resistencia a muerte de un grupo de células, así como un incremento en el potencial de invasión y metástasis a otros tejidos (Hanahan y Weinberg, 2011). Las clasificaciones más comunes para esta enfermedad son por su ubicación en el cuerpo humano, así como por el tipo de tejido en el que se presenta este crecimiento celular anormal. Existen seis subgrupos histológicos para clasificar esta enfermedad: 1) Carcinoma cuando el crecimiento se presente en tejido epitelial y el recubrimiento de órganos, 2) sarcoma en tejido conectivo o de soporte como son los huesos, 3) mieloma de células plasmáticas de medula ósea, 4) leucemia en medula ósea, 5) linfoma en nódulos o ganglios de sistema linfático y 6) mixto (NIH, 2000). Debido a la alta prevalencia de trastornos metabólicos, así como el alto consumo de alcohol existe una alta tasa de mortalidad e incidencia de cáncer hepático en México. Por tal razón, el cáncer hepático se posicionó como el octavo cáncer con mayor incidencia en el país y el cuarto en mortalidad en el año 2022 (GLOBOCAN, 2022). A pesar de que se cuenta con tratamientos sistemáticos y quimioembolizaciones, el desarrollo de resistencia hacia los fármacos reduce su eficacia y limita las opciones de tratamientos disponibles para los pacientes.

Por esta razón surge la necesidad de buscar tratamientos y blancos terapéuticos alternativos, como es el caso de MYCT1. Estudios recientes han identificado a *MYCT1* como un posible gen supresor tumoral en ciertos tipos de cáncer como hepatocarcinoma celular (Xu et al., 2020; Pu et al., 2019). Se ha generado gran interés en comprender su interacción con rutas metabólicas, así como su mecanismo de regulación.

Este trabajo tiene como objetivo utilizar el reposicionamiento de fármacos para modular la expresión de *MYCT1* y observar su efecto en procesos cancerosos como lo son la migración, proliferación y viabilidad.

4. ANTECEDENTES

Acorde a la Asociación Americana de Cáncer, las principales clasificaciones de cáncer primario de hígado son el hepatocarcinoma celular (HCC) que se presenta en hepatocitos, el colangiocarcinoma intrahepático que se presenta en los ductos de bilis, angiosarcoma, el hemangiosarcoma que se presenta en los vasos sanguíneos que irrigan este órgano, y finalmente el hepatoblastoma que se presenta solamente en infantes y es bastante heterogéneo en cuanto a su origen. Sin embargo, el hepatocarcinoma celular es el de mayor incidencia, englobando un 90% de los casos presentados (Llovet et al., 2021).

Epidemiología

En el año 2022 el GLOBOCAN reportó 18,741,966 casos de cáncer a nivel mundial de los cuales 866,136 eran pacientes con cáncer de hígado posicionándolo en sexto lugar de incidencia. Ese mismo año fueron reportadas a nivel mundial 9,674,416 defunciones a causa del cáncer siendo 758,725 de estos casos a causa de cáncer de hígado posicionándolo en tercer lugar de mortalidad (GLOBOCAN, 2022). Se predice que para el año 2030 la incidencia aumente 1.05 millones de casos a nivel mundial. En México esta patología se posiciona en el octavo lugar de incidencia y en el cuarto lugar de mortalidad. Esta última ha ido al alza en los últimos años pasando de 4.16 casos de fallecimiento por 100,000 habitantes en el año 2000 a 10 por cada 100,000 habitantes en el 2019 (INEGI, 2021).

Factores de riesgo

Una gran porción de los casos presentado de HCC son pacientes con un antecedente de infección de virus de hepatitis B y en una menor proporción de hepatitis C. Estos virus infectan células hepáticas produciendo inflamación crónica, estrés oxidativo y desregulación de factores de crecimiento y citocinas. Así mismo, el virus de hepatitis B tiene habilidad de integrarse al genoma lo que puede desencadenar mutaciones. (Szabó et al., 2004). El consumo excesivo de alcohol también es un factor de riesgo identificado ya que genera un ambiente de estrés oxidativo y producción de citocinas proinflamatorias (McClain et al., 2002). El consumo de alcohol hace más propenso el desarrollo de cáncer o bien podría desencadenar cirrosis hepática que es también una de las causas más comunes de HCC. Algunos factores ambientales como la ingesta de aflatoxinas, que es un mutágeno con la

capacidad de generar sustituciones de guanina por timina en genes importantes como lo es p53, tiende a incrementar el riesgo de desarrollo de cáncer (Bressac et al., 1991). Adicional a los previamente mencionados existen muchos otros factores de riesgo para este padecimiento, como la obesidad y la diabetes, lo que explica su alta tasa de incidencia a nivel mundial. .

Estadios y tratamientos

La clínica de cáncer hepático de Barcelona (BCLC) ha categorizado las diferentes etapas de esta enfermedad y los mejores tratamientos para cada una de las clasificaciones: La etapa 0 donde el tumor tiene un tamaño menor a 2 cm y hay un funcionamiento correcto del hígado, es recomendado como tratamiento la ablación o resección del tejido. La etapa A donde se presentan de 1 a 3 tumores menores a 3 cm con funcionamiento correcto del hígado, si el paciente es candidato se opta por un trasplante, en caso de no serlo se hace la ablación y resección. La etapa B se caracteriza por preservar un buen funcionamiento hepático, sin embargo, hay presencia de múltiples tumores. Se recomienda la terapia sistémica como atezolizumab y bevacizumab que son fármacos de primera línea o la quimioembolización. En la etapa C se han esparcido las células cancerosas a vasos sanguíneos, nódulos linfáticos u otros órganos, pero aún hay un funcionamiento correcto del hígado. La terapia sistémica con fármacos como el sorafenib suele ser la mejor opción de tratamiento en esta etapa. Finalmente, la etapa D es cuando se presenta un daño severo al hígado y se considera una etapa terminal. Debido al avance de la enfermedad es poco probable que el tratamiento aumente el índice de supervivencia por lo que se busca tratar los síntomas acompañado de cuidados paliativos. (Barcelona Clinic Liver Cancer, 2021; Reig et al., 2022)

Diagnóstico

Los pacientes con HCC suelen ser asintomáticos hasta que se presentan síntomas como ictericia, dolor en el área abdominal, fiebre y acumulación de fluido en el abdomen. Estos signos suelen desarrollarse en etapas avanzadas de la enfermedad y son asociados usualmente a un daño crónico. (American cancer society, 2019). Los métodos de diagnóstico más comunes son ultrasonido, resonancia magnética u otros estudios de imagenología. En caso de obtener resultados atípicos en las pruebas de imagen se sugiere realizar una biopsia para confirmar el diagnóstico (Llovet et al., 2021).

Alteración de vías

El desarrollo del cáncer se debe comúnmente a un conjunto de alteraciones en vías de importancia para el funcionamiento celular. En el hepatocarcinoma se han resaltado algunos eventos importantes para el desarrollo de éste. Algunas de las mutaciones más frecuentes se encuentran en genes reguladores del ciclo celular como lo son RB1, CCNA2, CCNE1, PTEN, ARID1A, ARID2, RPS6KA3, NFE2L2, y P53 (Llovet et al. 2021). Se ha identificado que las mutaciones en P53 podrían contribuir no sólo a la progresión de esta patología si no también como iniciador al generar un desbalance en el ciclo celular (Farazi et al., 2006). También es común que se presente la desregulación de genes por eventos epigenéticos como es la hipermetilación, esto se ha observado en genes como E-cadherina, *Apoptosis-associated speck-like protein (ASC)*, *p16(INK4a)* entre otros (Kubo et al., 2004; Liew et al., 1999). Esta desregulación también puede atribuirse a alteraciones en factores de transcripción. Se ha observado la elevada expresión nuclear de β -catenina en pacientes con HCC (Ishizaki et al., 2004). Lo anterior puede derivar en la activación de genes que promueven el desarrollo de cáncer como lo son *MYC*, *MMP7*, ciclina D entre otros (Gregorieff y Clevers, 2005). Así mismo, hay genes que se sabe están desregulados e implicados en el desarrollo de cáncer, pero se desconoce la razón de esta modificación en la expresión, tal es el caso del gen MYCT1

MYCT1

También conocido como “MYC Target 1” fue identificado por primera vez en carcinoma de laringe por Qiu y colaboradores, por lo que fue originalmente nombrada *MTLC*. El gen se ubica en el cromosoma 6q25, cuenta con 21 kb, dos exones y un intrón. El gen codifica para una proteína de 235 aminoácidos (Qiu et al., 2003). Desde su descubrimiento solo se ha identificado una isoforma que cuenta con 48 aminoácidos menos, sin embargo, esta modificación no tiene impacto en la estructura y función de la proteína (Fu et al., 2011). En un análisis bioinformático realizado por Zhang y colaboradores, se ubicaron dos regiones fuertemente hidrofóbicas y una región anfipática (Zhang et al., 2016). En cuanto a su estructura secundaria, esta proteína cuenta con hélices-alfa, hebras extendidas y giros aleatorios los cuales forman el 51% de las estructuras secundarias.

Regulación MYCT1

Se han identificado hasta el momento seis sitios de unión a factores de transcripción importantes en la región promotora del gen *MYCT1*. Fu y colaboradores identificaron dos regiones de unión a Myc, pues dicho factor incrementa la expresión de *MYCT1*, y como consecuencia reduce la proliferación y aumenta el porcentaje de apoptosis en la línea celular Hep2. Otra de las regiones tiene el elemento de unión al factor ETV2 el cual es de vital importancia para la angiogénesis. Se observó que la presencia de ETV2 aumentaba la expresión de *MYCT1*, y como consecuencia se tenía un mejor desarrollo de vascularización en líneas celulares endoteliales (Kabir et al., 2021). También se identificaron regiones de unión para factores represores como Yin-Yang-1 (YY1). Xu y colaboradores comprobaron la unión de YY1 a la región promotora de *MYCT1*, y que como consecuencia había una reducción en la expresión del gen. De la misma manera el elemento de unión de respuesta a AMP cíclico (CREB), encontrado usualmente sobre-expresado en tejido tumoral, tiene una actividad represora sobre *MYCT1* (Zhang et al., 2018).

Aunado a la regulación que generan estos sitios en la región promotora, también existe la regulación por medio de marcas epigenéticas. La región promotora del *MYCT1* cuenta con 12 islas CpG de las cuales 11 están completamente metiladas en tejido proveniente de pacientes con cáncer de laringe. Una de estas islas CpG metiladas interfiere con la unión a Myc lo que genera una menor expresión del gen *MYCT1* (Yang et al., 2012). A nivel post-transcripcional se han identificado algunos microARNs (miARN) que regulan a este gen, tal es el caso de miR-632, que HCC se observó que éste miARN generando una represión en *MYCT1* y es un mal pronóstico en pacientes (Pu et al., 2019). A pesar de que se posee información sobre la región promotora, marcas epigenéticas e inclusive silenciamiento por ARN, aún no se ha elucidado con certeza el mecanismo de regulación de *MYCT1*.

MYCT1 y cáncer

En la actualidad el estudio de *MYCT1* ha generado interés ya que tiene un papel directo sobre vías de apoptosis, migración y proliferación, mismas que se sabe son de vital importancia en el desarrollo de cáncer. El papel de este gen en el desarrollo de cáncer sigue siendo investigado y se ha descrito la posibilidad de una función dual de supresor de tumor u oncogénico, esto dependiendo del tejido y el contexto celular. En cáncer de células escamosas de laringe identificaron que este gen se encontraba en menor expresión al ser

comparado con tejido sano, al aumentar la expresión de este pudieron observar un incremento en la apoptosis junto con una reducción en la proliferación e invasión en la línea celular Hep2 (Fu et al., 2011). En cáncer de hígado también es un gen que se encuentra regulado a la baja, sin embargo, al inducir la sobreexpresión de miR-34a-5p lograron reducir la represión de *MYCT1* generada por YY1 teniendo como resultado una menor proliferación, invasión y migración de las células cancerosas (Xu et al., 2020). En células endoteliales tumorales se ha observado una expresión elevada del gen y una función importante en la angiogénesis (Kabir et al., 2021). Al observar este comportamiento dependiente del contexto celular surge interés por identificar los blancos de interacción y las rutas metabólicas involucradas.

MYCT1 interacción con múltiples vías

Se ha identificado el papel que juega *MYCT1* en algunas rutas relacionadas con viabilidad, apoptosis entre otras funciones celulares básicas (Figura 1). Fu y colaboradores identificaron que la sobreexpresión de *MYCT1* generaba un arresto en la fase G1 lo cual lo atribuyeron a un posible decremento en la regulación de las ciclinas D1 y E. En cáncer de laringe se esclareció la relación de *MYCT1* y la apoptosis celular, pues la baja expresión de NPM1 promovió apoptosis de manera intrínseca y extrínseca por el clivaje de las caspasas 8,9 y 3. (Wang et al., 2019). También se ha identificado asociación de *MYCT1* con procesos de migración y adhesión. Este mecanismo se debe probablemente a la capacidad de esta proteína de regular negativamente la expresión de colágeno VI y N-acetiltransferasa 10 (NAT10) (Zhang et al., 2018; Wang et al., 2021).

Otra vía que se ve influenciada por *MYCT1* es el metabolismo de glucógeno, que también promueve la traducción de enzimas necesarias para el ciclo de glucógeno como fosfoglucomutasa1 (PGM1), glucosa-1-fosfato uridiltransferasa (UGP2) y glucógeno sintasa cinasa 3A (GSK3A). Como consecuencia, se genera una reprogramación metabólica en las células tumorales buscando una homeostasis y supervivencia (Ding et al., 2022). Aún no se ha evaluado que implicaciones podría tener la alteración de esta vía sobre el comportamiento celular y el desarrollo del cáncer. Adicional a las rutas mencionadas previamente, aún no se ha definido la participación de *MYCT1* en el contexto celular no cancerígeno.

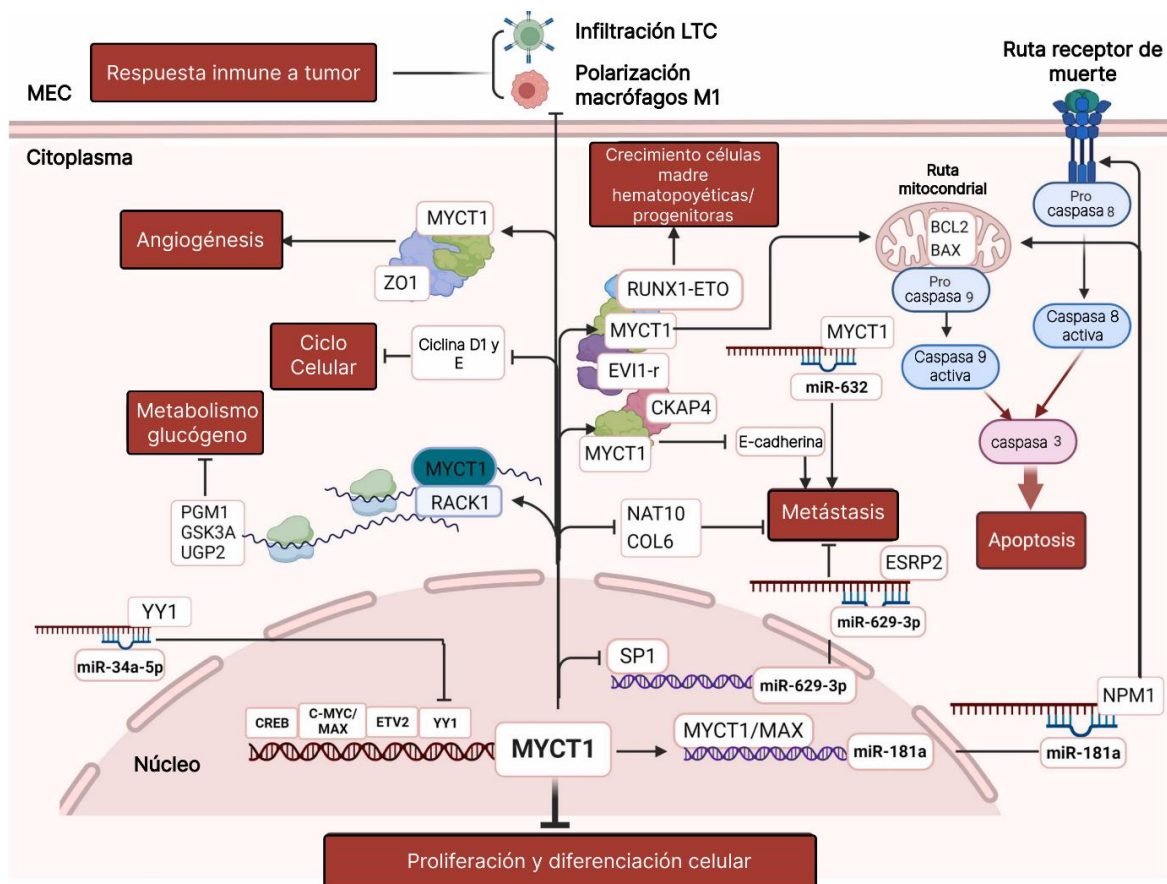


Figura 1. Resumen de interacciones de MYCT1 en diferentes rutas celulares. Recuperada de Xu et al., 2023. MEC: matriz extracelular, LTC: linfocitos T citotóxicos.

5. JUSTIFICACIÓN

Con el aumento de mortalidad e incidencia de diferentes tipos de cáncer en los últimos años, es necesario la búsqueda de tratamientos alternativos con mejores resultados. En el caso de hepatocarcinoma celular la gran mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas donde el trasplante o la ablación no son opciones efectivas de tratamiento (Forner et al., 2006). Son en estas etapas donde se implementa la terapia sistemática, sin embargo, el desarrollo de resistencia a estos fármacos es un problema común en el hepatocarcinoma celular. Existen múltiples mecanismos por el cual se podría presentar esta resistencia, como la modificación en el metabolismo, por mutaciones en los blancos terapéuticos o la absorción del fármaco (Ladd et al., 2024). El estudio reciente del gen *MYCT1* ha permitido identificarlo como un factor importante en el desarrollo del cáncer. Su método de regulación es de especial interés ya que se ha visto ligado a la evolución de esta patología. Actualmente no se conoce su nivel de expresión ni el efecto sobre el comportamiento celular en muchos tipos de cáncer. Sin embargo, con la información que se posee hasta el momento, promete ser un posible blanco terapéutico.

Es por ello por lo que el presente trabajo busca caracterizar el nivel de expresión de *MYCT1* en un modelo de hepatocarcinoma celular, y el efecto de una variedad de fármacos epigenéticos sobre el nivel de expresión de este gen. Así mismo, es importante evaluar las consecuencias que la modificación de expresión tiene sobre el comportamiento celular.

Planteamiento del problema

Derivado de los antecedentes sobre el constante incremento en la incidencia de la patología de cáncer hepático, así como la resistencia y limitaciones en los tratamientos actuales surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible utilizar los fármacos 5-azacitidina, Metformina, Ácido valproico, Hidralazina, Talidomida, Niclosamida como inductores de la expresión de *MYCT1* en un modelo de hepatocarcinoma? Y de ser así ¿Tendrá esta modificación un efecto sobre la capacidad migratoria, proliferativa, invasiva y la viabilidad de la línea de carcinoma hepatocelular?

6. HIPÓTESIS

Los fármacos epigenéticos son capaces de modificar la expresión de MYCT1, afectando la viabilidad, proliferación y migración en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma humano.

7. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de los fármacos epigenéticos sobre la expresión de MYCT1 en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma humano.

Objetivos específicos

1. Medir la expresión basal de MYCT1 en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma.
2. Evaluar la expresión genética de MYCT1 en respuesta a los fármacos epigenéticos, en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma por medio de RT-qPCR y Western blot.
3. Determinar el efecto de fármacos epigenéticos sobre la viabilidad, proliferación y migración de la línea celular HepG2.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

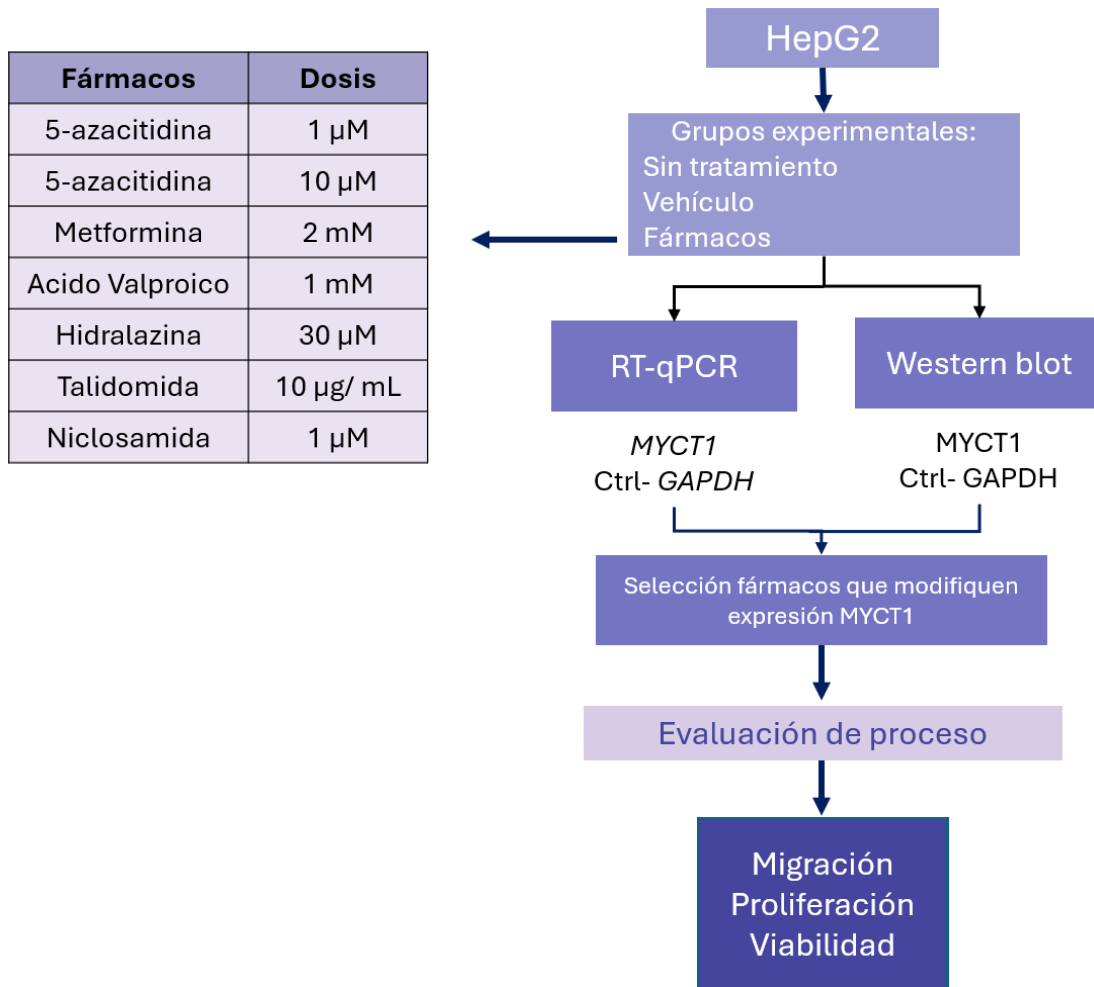


Figura 2. Diagrama de flujo de estrategia experimental general.

Cultivo celular.

La línea celular de HepG2 se adquirió con la empresa ATCC (catálogo HB-8065). La línea celular se mantuvo en medio DMEM alta glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium cat. 21068028 Gibco, Carlsbad, California, EUA) adicionado con 1 % de aminoácidos no esenciales (cat.11140050, Gibco), 1 % de antibiótico (Antibiotic-Antimycotic [100X] cat. 15240112, Gibco), 1% de piruvato de sodio (cat. 11360088, Gibco) y suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, cat. 26140079, Gibco). Las condiciones de incubación fueron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 100 % de humedad relativa.

Síntesis de ADNc, PCR punto final y PCR cuantitativa

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) con la enzima retro transcriptasa reversa M-MLV y hexámeros aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.). La mezcla 1 fue preparada añadiendo 1 μ L de dNTP's [10 mM], 1 μ L de hexámeros aleatorios [50 ng/ μ L], 500 ng de ARN y 10 μ L de agua libre de nucleasas. La mezcla 2 fue preparada con 2 μ L de DTT [100 mM], 1 μ L de RNasa Out [40 U/ μ L] (Invitrogen), 4 μ L de First Strand Buffer [5X] (Invitrogen). La mezcla de reacción 1 fue incubada por 5 min a 65 °C, y después en hielo para añadirse la mezcla de reacción 2, y se incubó por 2 min a 37 °C. Posteriormente, se agregó 1 μ L de enzima M-MLV y fue incubada la reacción a 25 °C durante 10 min y 50 min a 37 °C. Finalmente, la reacción se inactivó a 70 °C por 15 min. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso. Posteriormente se realizó una reacción de PCR punto final para validar el ADNc sintetizado anteriormente. Se utilizó el reactivo GoTaq® con 1 μ L de iniciadores dirigidos hacia el gen *GAPDH* (F: TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G, R:TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT), 12.5 μ L de GoTaq®, 1 μ L de cDNA y se adicionó agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 25 μ L. Los parámetros empleados fueron: 30 ciclos de fase de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, fase de alineamiento a 57 °C por 30 segundos, fase de polimerización a 72 °C durante 30 segundos y una fase de polimerización final a 72 °C durante 3 minutos

Para la PCR cuantitativa se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción 12.5 μ L Universal Master Mix (cat. 4304437, Applied Biosystems), 1.25 μ L sonda Taqman *GAPDH* (cat.4310884E, Thermofisher) o *MYCT1* (Hs00228305_m1, Thermofisher), 3 μ L ADNc (1:128), 8.25 μ L de agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en una fase de activación de la polimerasa a 50 °C durante 2 minutos y, 95°C por 10 min, seguido de 50 ciclos de fase de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y de alineamiento y polimerización a 60 °C por 1 minuto. Como control endógeno, se utilizó el gen *GAPDH*. El análisis de los datos obtenidos se realizó con QuantStudio TM Design & Analysis Software v1.5.2. y los valores de expresión relativa se analizaron por la formula descrita de Livak y Schmitgen (2001).

Extracción de proteínas y Western Blot

La extracción de proteínas se realizó con buffer Pierce™ RIPA (Thermofisher, cat. 89901, MA, EUA). La placa de cultivo se lavó con PBS 1X (8 g NaCl + 0.2 g KCl + 1.44 g Na₂HPO₄ + 0.24 g KH₂PO₄, pH 7.4) y las células se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se removió el PBS y se agregó inhibidor de proteasa (Thermofisher, cat. A32955). La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford, con 2 mg/mL de albúmina sérica bovina como estándar (Thermofisher, cat. 23209) y se leyó la absorbancia a 600 nm. De las muestras se realizó una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 10 % (Bio-Rad, cat. 161-0154, CA, EUA) con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) a 75V por 25 minutos y a 120V durante 50 minutos empleando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó en membrana PVDF empleando la Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) a 15 V durante 2 h. El bloqueo se realizó con 5 % de leche descremada (Svelty®) en buffer TBS 1X (Tris Base + NaCl, pH 7.6) durante 1 h en agitación constante a 300 rpm y se lavó la membrana con TBST (TBS + Tween 20). Las membranas se dejaron en incubación con los anticuerpos primarios (anti-MYC1, Cat. ab139945) durante toda la noche a 4 °C y 300 rpm. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó por 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante a 300 rpm seguido de lavados con TBST. La membrana se transfirió a un acetato y se agregó la solución reveladora, incubando la reacción por 1 minuto. Finalmente, se detectó la quimioluminiscencia por medio del ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad).

Ensayo de viabilidad y proliferación

Se sembraron 8,000 células en placas de 96 pozos para cada uno de los períodos a evaluar: 24, 48, 72 y 96 h y se incubaron durante 24 h en medio DMEM completo. Transcurridas 24 h se realizó un lavado con buffer de fosfato salino (PBS) y se añadieron los tratamientos correspondientes. El control positivo se trató con mitomicina C (Cayman Chemical Co., cat. 11435, MI, EUA) a una concentración de 10 µg/mL. De acuerdo con el tiempo de medición, el medio DMEM se sustituyó con medio adicionado con azul de alamar™ HS (Invitrogen, cat. A50100) y se incubaron las células por 3 hs en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia a 570 y 600 nm. Los datos registrados de las absorbancias fueron procesados con la fórmula $[(O2 \times A1) - (O1 \times A2)] / [(O2 \times P1) - (O1 \times P2)] \times 100$ para el cálculo de la viabilidad celular, considerando como 100 % a las

células tratadas solamente con DMEM o con el vehículo. El cálculo del crecimiento celular normalizado se realizó mediante la lectura de absorbancia a 570 y 600 nm. Realizando el cálculo 570 nm- 600 nm y normalizando a 1 tomando como 1 las 24 h de cada respectivo tratamiento.

Ensayo de lesión.

Se realizó la siembra de 1×10^5 células en una caja de 60mm hasta alcanzar confluencia de 90 %, para posteriormente realizar una lesión con una punta amarilla de 200 μ L. El medio se retiró, se hizo un lavado con PBS 1 $\times$ y se tomaron fotografías de evidencia con el microscopio invertido EVOS (Invitrogen™ EVOS™ FL Digital Inverted Fluorescence Microscope cat. 12-563-460, Waltham, Massachusetts, EUA). Las células se mantuvieron en medio de privación por 24 h, este medio contenía DMEM adicionado con 1% de aminoácidos no esenciales y 1 % de antibióticos como se mencionó previamente. Posteriormente se adicionó medio con el fármaco. Se tomaron fotografías para monitorear la migración por 0, 24, 48 y 72 h con el tratamiento. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ 1.54i.

Estadística.

Los resultados fueron analizados con GraphPad Prism 8.02. Se utilizaron las pruebas t-student y ANOVA para datos con distribución normal y Mann–Whitney para pruebas no paramétricas. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con $p < 0.01$

9. RESULTADOS

Expresión MYCT1 en línea celular HepG2

Con el objetivo de evaluar el nivel basal de expresión transcripcional y proteica de MYCT1 en la línea celular HepG2 se realizaron ensayos de PCR cuantitativa y Western blot. Se realizó una PCR cuantitativa utilizando sonda Taqman para MYCT1 con muestras de cDNA provenientes de células HepG2 y de sangre periférica de un sujeto aparentemente sano. Se obtuvo una amplificación de *GAPDH*, pero no se observó amplificación de *MYCT1*. Para determinar la funcionalidad de los iniciadores y sonda utilizados para amplificar MYCT1, adicionalmente se diseñaron dos pares de iniciadores dirigidos a dos regiones diferentes del mRNA de *MYCT1*. Los productos esperados por PCR punto final eran de 168 pb (Primers 1) y 144 pb (Primers 2), respectivamente. Con los primers 1 se observó una banda tenue en la muestra de sangre periférica y un barrido en el carril correspondiente a HepG2 (Figura 2A). Se realizó una reamplificación del producto de PCR diluido 1:100. Se realizó una segunda amplificación, incluyendo cDNA de otras dos líneas celulares, *i.e.*, fibroblastos dérmicos humanos y células 5637. Se observó una banda intensa correspondiente a la reamplificación de HepG2 y no se observó una amplificación con las otras dos muestras (Figura 2B).

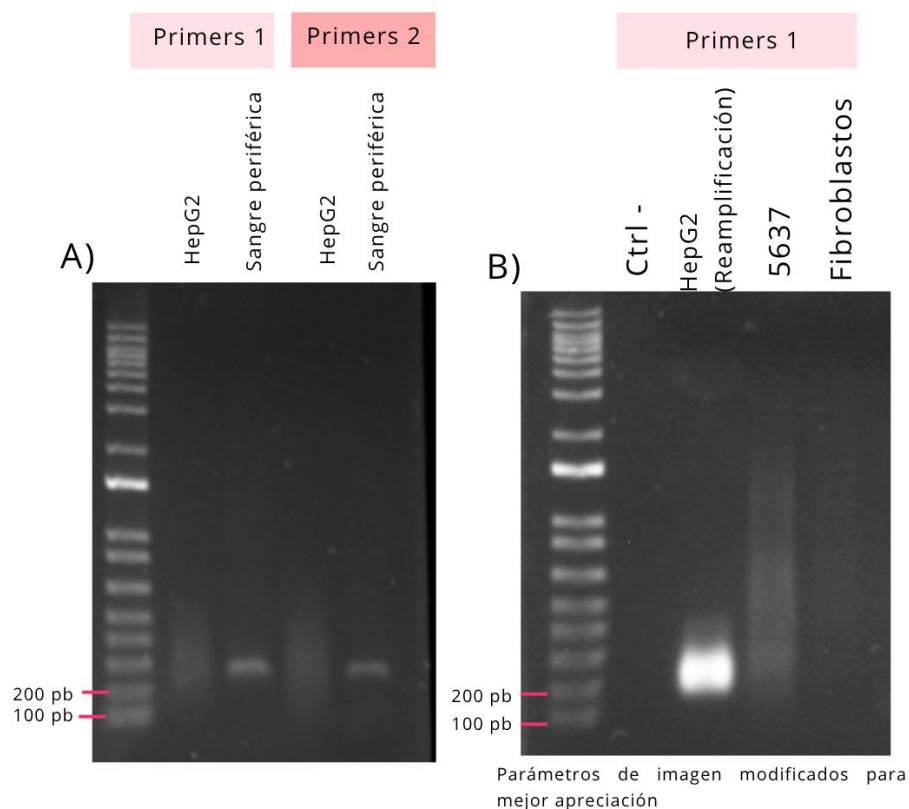


Figura 3. Nivel de expresión MYCT1 en línea celular HepG2. A) La evaluación de la expresión de MYCT1 se realizó por medio de PCR punto final utilizando ambos sets de iniciadores (primers). B) Re-amplificación de muestra HepG2 y PCR punto final de cDNA de fibroblastos dérmicos humanos y células 5637 utilizando iniciadores (primers 1).

Con el objetivo de tener un control positivo de expresión se incluyeron dos productos de PCR correspondientes a ambas isoformas de la región codificante de MYCT1, desde codón de inicio hasta el codón de paro. Contando con estos controles se volvió a realizar una PCR punto final, donde se obtuvo nuevamente una banda tenue para la muestra de sangre periférica con ambos pares de iniciadores. No se obtuvo una amplificación con la muestra de HepG2 para ninguno de los cebadores, solamente se observó un barrido. En los controles positivos se observa una banda intensa para el set de primers 2, sin embargo, no se observó amplificación para el primer set de iniciadores ya que estos van dirigidos fuera de la región codificante de MYCT1 (Figura 3).

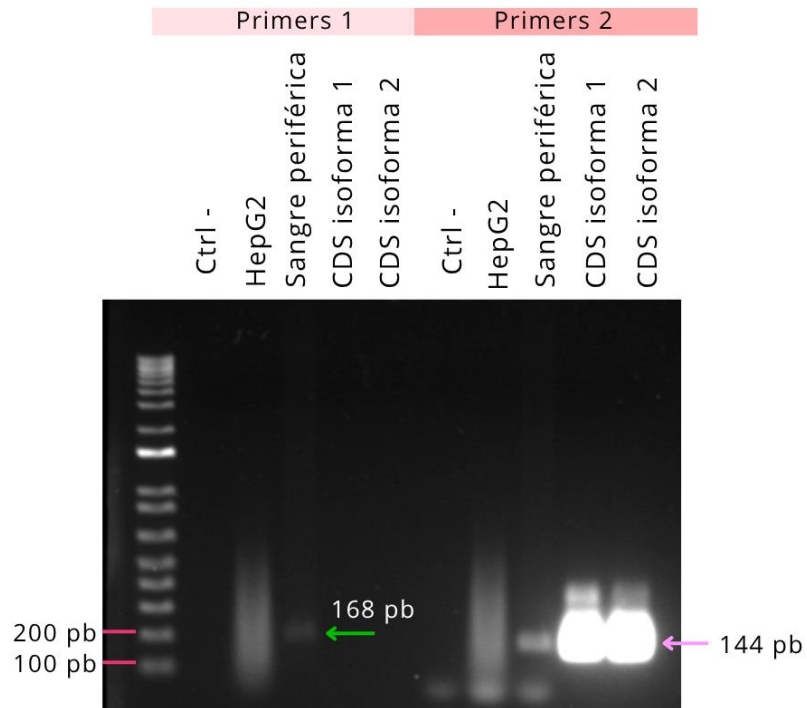


Figura 4. Nivel de expresión MYCT1 en línea celular HepG2. La evaluación de la expresión de MYCT1 se realizó por medio de PCR punto final con ambos sets de cebadores. La flecha verde demuestra el producto de PCR del primer set de cebadores de 168 pb, la flecha rosada demuestra el producto de 144 pb del segundo set de cebadores.

Se realizó un ensayo de Western blot para evaluar el nivel proteico de MYCT1 en HepG2, y se pudo observar una expresión de MYCT1 tres veces mayor en el control positivo que pertenece a extracto proteico obtenido de pulmón de ratón (Figura 4). Esto indica una baja expresión del blanco de interés en la línea HepG2 al compararlo con muestras provenientes de controles sanos.

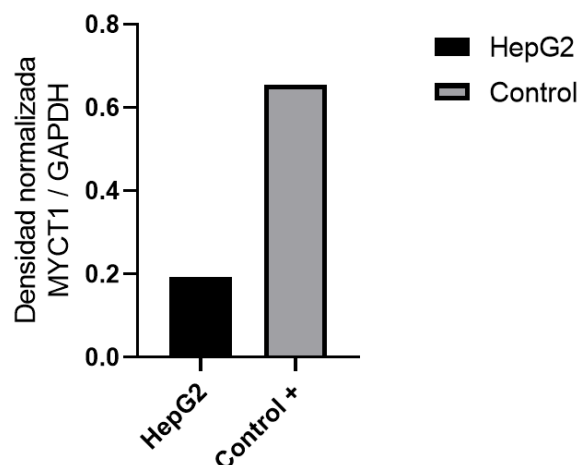


Figura 5. Nivel de expresión proteica MYCT1 en línea celular HepG2. La evaluación de la expresión de MYCT1 se realizó por medio de Western Blot.

Expresión MYCT1 en línea celular HepG2 en respuesta al tratamiento

Previo al tratamiento y con el objetivo de evaluar la concentración inhibitoria media (IC50), se realizó un ensayo de viabilidad con resazurina a diferentes dosis para la metformina y niclosamida debido a que estos presentaron un alto porcentaje de muerte al utilizar las dosis consultadas en literatura. Basado en los resultados se decidió trabajar con una concentración de 1 μ M para niclosamida (Figura 5A) y 2 mM para metformina (Figura 5B).

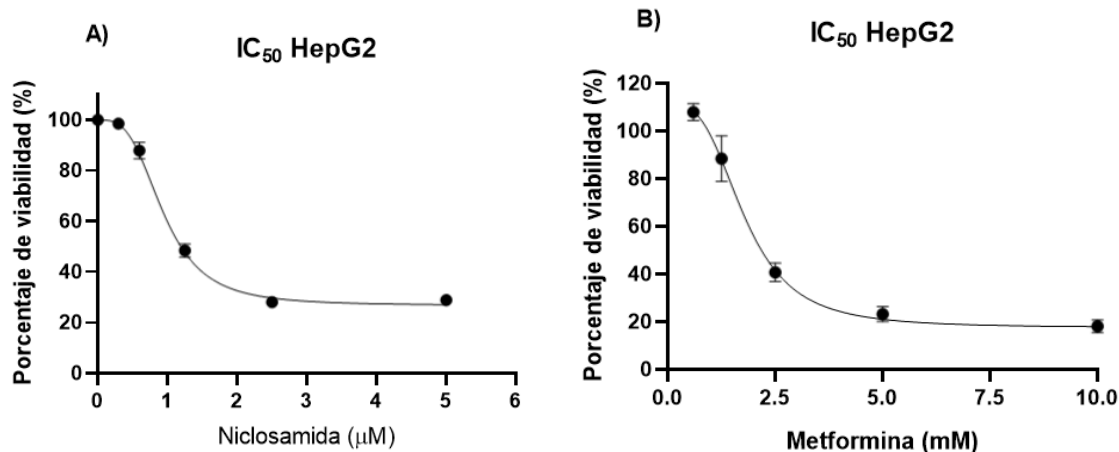


Figura 6. Concentración mínima inhibitoria (IC_{50}) de HepG2 expuestas niclosamida y metformina. Se realizó un ensayo de resazurina para evaluar el IC_{50} de A) niclosamida a las 48 h y B) Metformina a las 72 h. Con el fin de evaluar si los fármacos epigenéticos son capaces de modificar la expresión de MYCT1. Se realizaron tratamientos con los siguientes fármacos 5-azacitidina, talidomida y niclosamida a un plazo de 48 h y metformina, ácido valproico e hidralazina a 72 h. Se evaluó la expresión de MYCT1 a nivel transcripcional por PCR punto final. Se incluyó como control positivo el CDS de MYCT1 isoforma 2 que se amplificó a partir de sangre (Figura 6)

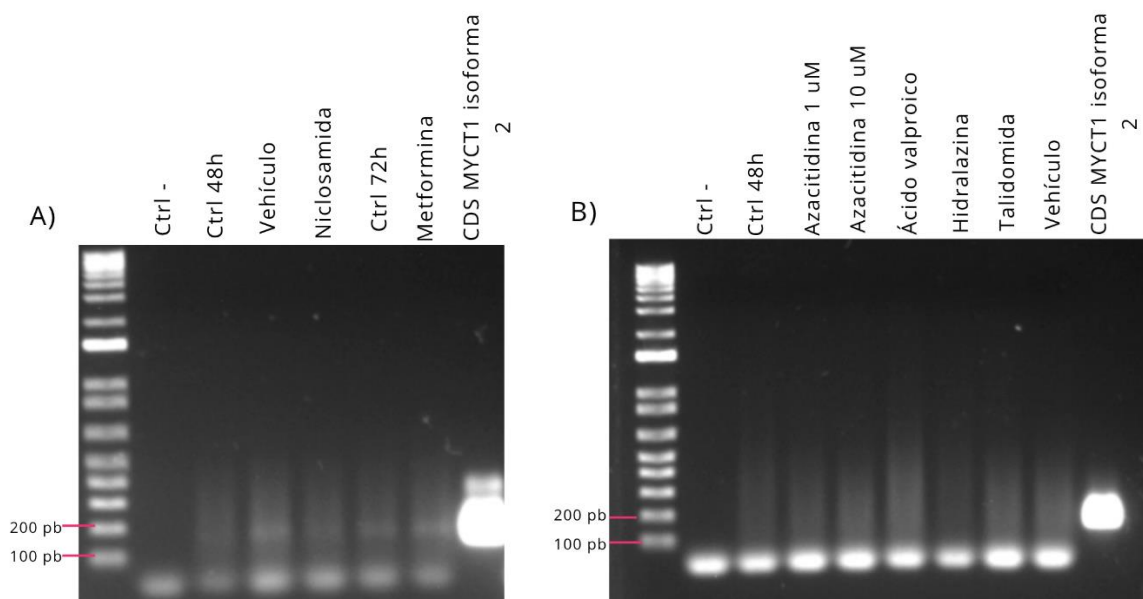


Figura 7. Evaluación transcritos MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 48 h y 72 h. La evaluación de la expresión de MYCT1 se realizó por medio de PCR punto final.

No se obtuvieron productos de amplificación para ninguno de los tratamientos, se presentaba un barrido igual que el que se observó en el ensayo de evaluación del nivel basal de expresión en HepG2. Se realizó una reamplificación de todas las muestras, en una dilución 1:100, donde se obtuvo la banda esperada de 144 pb y bandas adicionales correspondientes a artefactos de PCR (Figura 7).

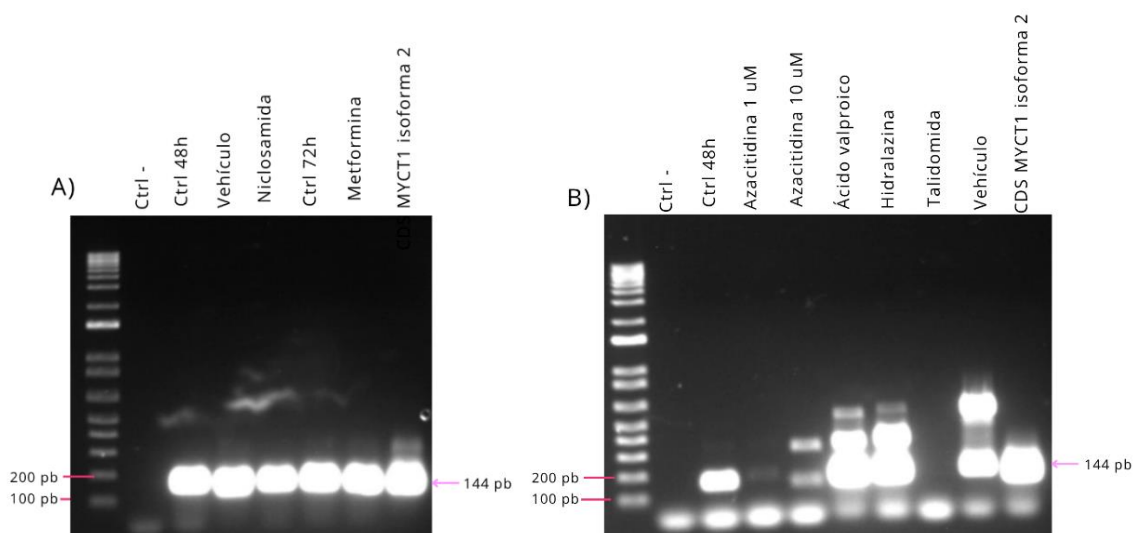


Figura 8. Reamplificación productos de PCR para evaluación de transcrito MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 48 h y 72 h. La evaluación de la expresión de MYCT1 se realizó por medio de PCR punto final con muestras previamente amplificadas.

Se evaluó la expresión de MYCT1 a nivel proteico con Western Blot y no se observó un aumento en respuesta a ninguno de los tratamientos, sin embargo, en respuesta a todos los tratamientos exceptuando azacitidina [10 μ M] se observó una disminución estadísticamente significativa comparado con el control (Figura 8 y 9).

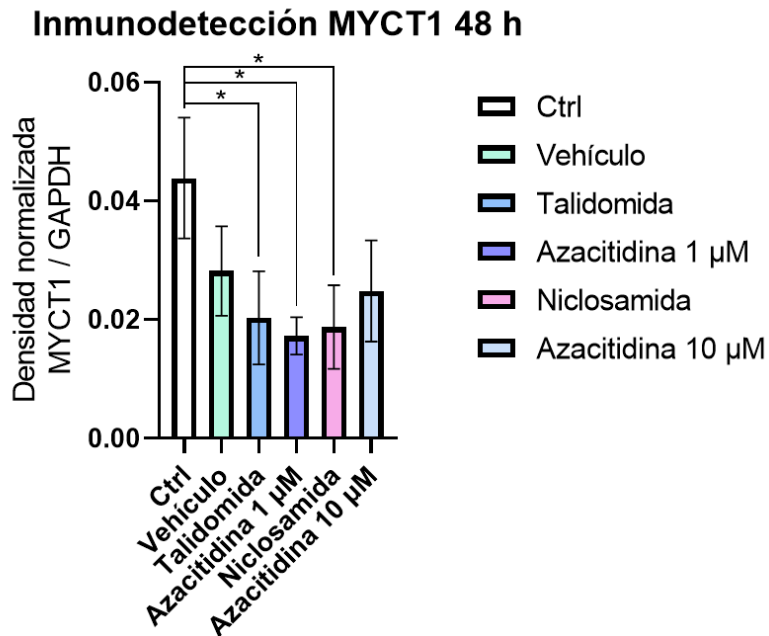


Figura 9. Nivel de expresión proteica MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 48 h. La evaluación de la expresión de MYCT1 se realizó por medio de Western Blot. * $P < 0.01$

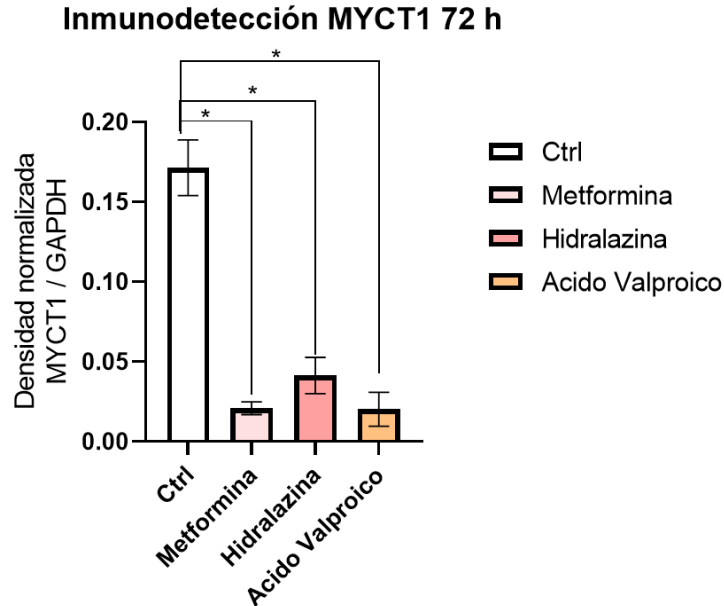


Figura 10 Nivel de expresión proteica MYCT1 en línea celular HepG2 posterior a la exposición de tratamientos de 72 h. La evaluación de la expresión de MYCT1 se realizó por medio de Western Blot. * $P < 0.01$

Evaluación de procesos en línea celular HepG2 en respuesta al tratamiento

Con el objetivo de analizar la viabilidad y proliferación de la línea celular HepG2 en respuesta a los diversos tratamientos se realizó un ensayo con azul de alamar a 24, 48, 72 y 96 h (Figura 10). A las 24 h se observó un decremento significativo de las células tratadas con niclosamida y metformina al comparar con sus respectivos controles. A las 48 h se mantuvo esta diferencia y además un decremento en porcentaje de viabilidad del grupo tratado con ácido valproico. Para las 72 h se mantuvo este patrón en los grupos previamente mencionados y a las 96 h de exposición se observó una disminución estadísticamente significativa en el resto de los tratamientos exceptuando talidomida y azacitidina 1 μ M. En cuanto al crecimiento normalizado no se observó una diferencia significativa en ninguno de los tratamientos a lo largo de las 4 lecturas. Se pudo apreciar una tendencia a la disminución de parte de la niclosamida y la metformina sin embargo no fue significativa estadísticamente (Figura 11).

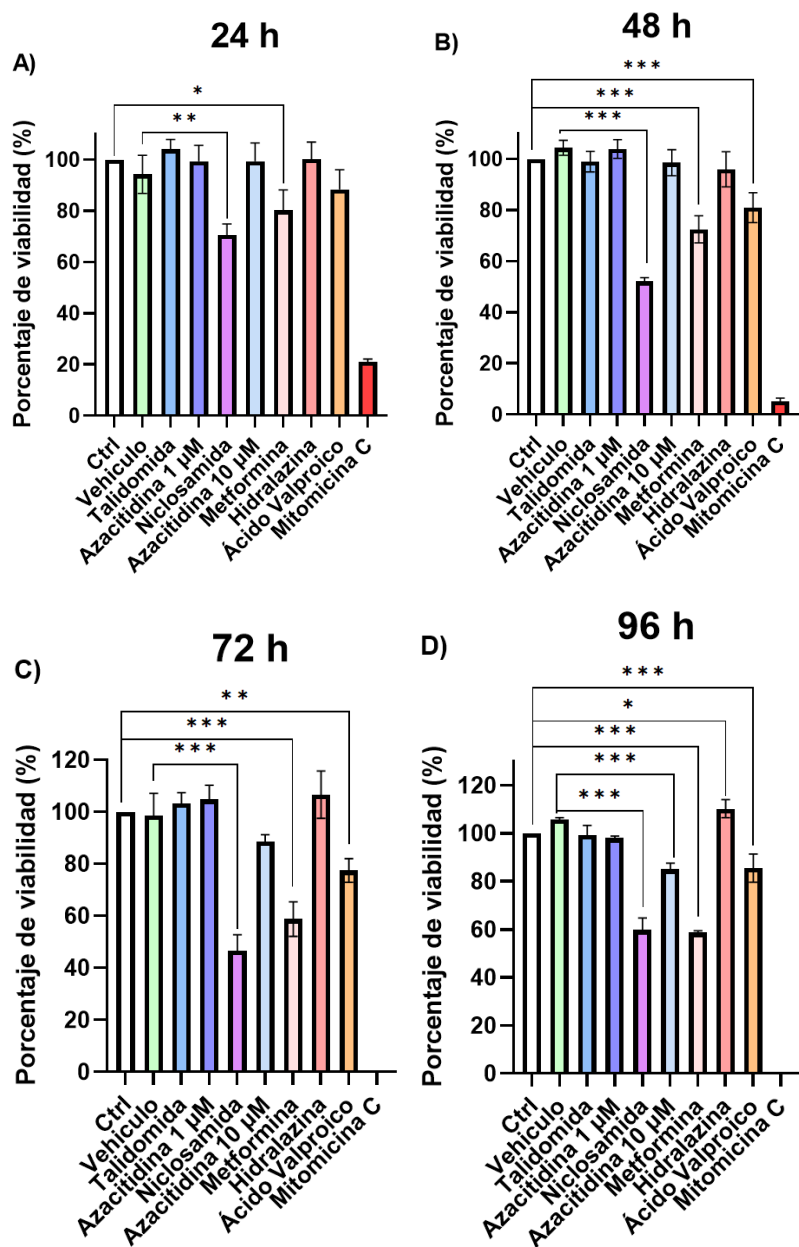


Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular en HepG2 en respuesta a los fármacos. Por medio de un ensayo MTS con azul de alamar se evaluó el porcentaje de viabilidad celular a las A) 24 h, B) 48 h, C) 72 h y D) 96 h. Utilizando mitomicina C [10 mg/mL] como control de muerte celular. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$

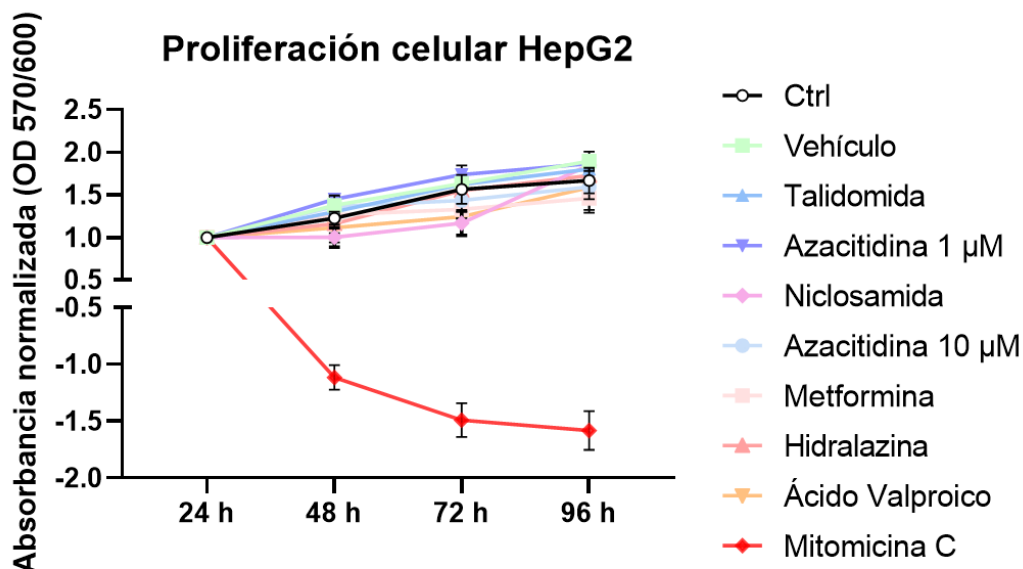


Figura 12. Proliferación celular normalizada (OD 570/600) en HepG2 en respuesta a los fármacos. Por medio de un ensayo con azul de alamar se evaluó la proliferación celular a las 24, 48, 72 y 96 h. Utilizando mitomicina C [10 mg/mL] como control de muerte celular.

Adicionalmente se evaluó si existía una modificación en el potencial migratorio en HepG2 en respuesta a los fármacos epigenéticos por lo que se realizó un ensayo de lesión. En el grupo evaluado a las 48 h se observó una disminución estadísticamente significativa en respuesta a los cuatro tratamientos, en el caso de la niclosamida se obtuvo un porcentaje de cierre negativo esto debido a la disminución en la viabilidad que se observó en el ensayo previo. Para el grupo evaluado a las 72 h también se observó una disminución estadísticamente significativa para los tres tratamientos utilizados.

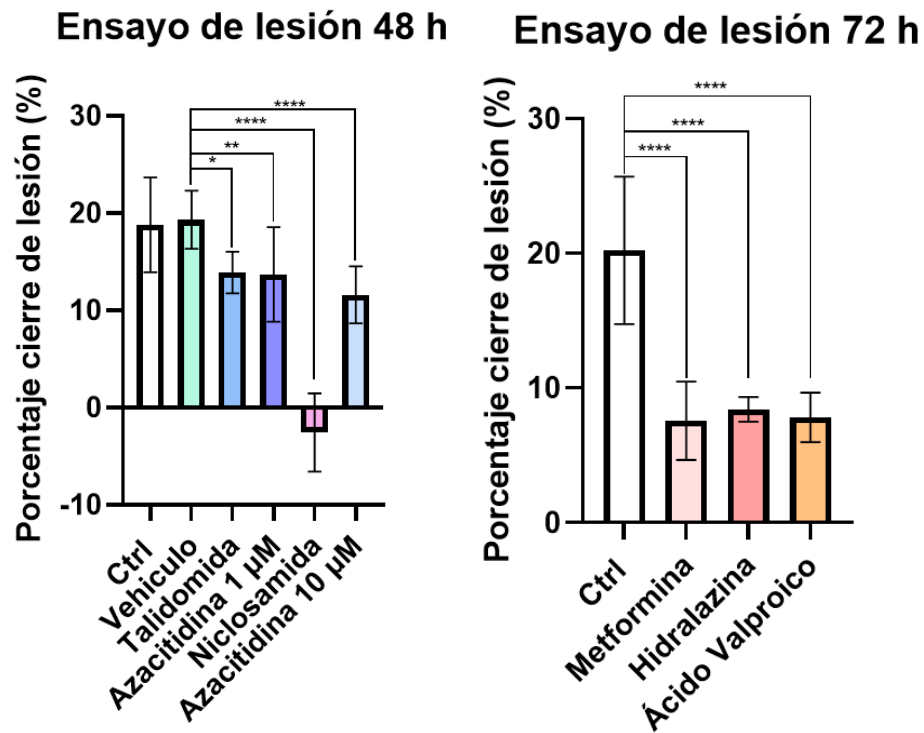


Figura 13. Porcentaje de cierre de lesión en HepG2 en respuesta a los fármacos. Por medio de un ensayo de lesión se evaluó potencial migratorio a las 48 y 72 h. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$

10.DISCUSIÓN

Debido a la falta de información sobre el sitio de hibridación de la sonda comercial Taqman de thermofisher no fue posible hacer un alineamiento para confirmar si existía variación en la detección dependiendo de la isoforma de MYCT1. Por esa razón se decidió sintetizar un par de cebadores que permitiera conocer bien el sitio de alineamiento y descartar así un problema de detección dependiente de la sonda. Las dificultades para cuantificar el transcrito de MYCT1 se deben principalmente a su baja abundancia en este modelo celular ya que los controles positivos utilizados nos confirman el correcto funcionamiento de los cebadores y la técnica de PCR. Fu y colaboradores observaron hipermetilación en la región promotora de *MYCT1* de muestras de médula ósea provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda. No se conoce el estado epigenético de este gen en el modelo de HepG2 por lo que no se puede afirmar que la metilación esté reduciendo la expresión del gen sin embargo basado en reportes previos es posible que sea la causa. Los resultados de la inmunodetección demuestran un nivel de expresión proteica de MYCT1 tres veces menor comparado con controles sanos, esto también fue reportado en otras líneas celulares de hepatocarcinoma al compararlas con hepatocitos sanos (Pu et al., 2019). Sin embargo, al realizar la inmunodetección se observó que el anticuerpo anti-MYCT1 Abcam (ab139945) era poco específico y generaba varias bandas, este fenómeno se mantuvo aun con un cambio de lote. Esto puede deberse principalmente al hecho de que es un anticuerpo policlonal, ya que el hecho de que reconozca múltiples epítomos lo hace menos específico. Se realizaron los análisis densitométricos utilizando como señal una banda que se encontraba en el peso esperado, pero se reconoce la limitante que esta inespecificidad representa. Se obtuvo en el modelo HepG2 una baja expresión del gen y una reducción de proteína comparado con el control sano lo que podría indicar una relación de este blanco con el desarrollo de malignidad. “La ruta para la transformación maligna involucra la represión de genes más que la inducción de nuevos genes.” (Danielsson et al., 2013)

Los fármacos epigenéticos no fueron capaces de restablecer la expresión de *MYCT1* a nivel transcrito, es posible que estén involucrados otros mecanismos de silenciamiento adicional a la metilación como lo es la regulación de la velocidad de transcripción, la interacción con factores de transcripción entre otros eventos moleculares. Se observó una disminución en la

expresión proteica de MYCT1 en respuesta a todos los fármacos utilizados exceptuando el tratamiento con azacitidina 10 μ M.

No se observó una diferencia significativa en la tasa de proliferación celular. Se observó una reducción en la viabilidad celular a las 96 h en respuesta a todos los fármacos exceptuando la talidomida y azacitidina 1 μ M. Se obtuvo a las 96 h un aumento en la viabilidad del grupo tratado con hidralazina. Se redujo el potencial migratorio en respuesta a todos los tratamientos de 48 y 72 h. Sin embargo, esto no parece estar relacionado con la modulación de MYCT1. Una de las principales limitantes al usar fármacos epigenéticos es que estos no son dirigidos por lo que podrían estar afectando otros blancos y modulando otras vías que generen la disminución en la viabilidad y potencial migratorio que se observó.

11. CONCLUSIÓN

No se logró cuantificar la expresión basal del transcrito MYCT1 en células HepG2 debido a su baja expresión en este modelo. Se observó una expresión proteica de MYCT1 tres veces mayor en extracto total de pulmón de ratón en comparación con las células HepG2. El nivel del transcrito en los diferentes grupos de tratamiento no pudo ser cuantificado debido a su baja expresión. A nivel proteico se observó una disminución en todos los tratamientos, con excepción de azacitidina 10 μ M, en comparación con los controles de referencia. Asimismo, se observó una disminución en el porcentaje de viabilidad a las 96 h como consecuencia de todos los tratamientos, excepto para talidomida 10 μ g/mL y azacitidina 1 μ M. Por otro lado, el tratamiento con hidralazina generó un aumento alrededor del 10% de viabilidad

La proliferación celular no fue afectada por los diferentes tratamientos; sin embargo, el potencial migratorio disminuyó en respuesta a todos los tratamientos en sus respectivos tiempos de evaluación.

12. PERSPECTIVAS

El encontrar un nivel tan bajo de expresión de MYCT1 en el modelo celular HepG2 lo convierte en un excelente modelo de estudio para restablecer la expresión por medio de técnicas como vectores de sobreexpresión. En el presente trabajo se incluye el inicio de esta estrategia de sobreexpresión, sin embargo, es necesario continuar con este trabajo y evaluar el efecto que la expresión del gen *MYCT1* tiene sobre comportamientos como la migración, viabilidad, proliferación e invasión celular. También fue identificado un posible SNP proveniente de la muestra de sangre del sujeto aparentemente sano, no se ha caracterizado el efecto funcional o estructural que esta mutación podría tener sobre la proteína MYCT1. Sería interesante realizar un modelado de la proteína con esta mutación y evaluar si afecta su funcionamiento.

13. BIBLIOGRAFÍA

American Cancer Society. (2019) *Signos y síntomas del cáncer de hígado*. [Online] Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/types/liver-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-symptoms.html>

American Cancer Society. (2019). *What is liver cancer?* Recuperado Diciembre 9, 2024, en <https://www.cancer.org/cancer/types/liver-cancer/about/what-is-liver-cancer.html>

Bressac, B., Kew, M., Wands, J., & Ozturk, M. (1991). Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350(6317), 429-431.

Ding, D. X., Wang, Y., Yan, W., & Fu, W. N. (2022). *MYCT1* alters the glycogen shunt by regulating selective translation of RACK1-mediated enzymes. *iScience*, 25(3), 103955. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103955>

Forner, A., Hessheimer, A. J., Real, M. I., & Bruix, J. (2006). Treatment of hepatocellular carcinoma. *Critical reviews in oncology/hematology*, 60(2), 89-98.

Fu, S., Guo, Y., Chen, H., Xu, Z. M., Qiu, G. B., Zhong, M., ... & Fu, W. N. (2011). *MYCT1*-TV, a novel *MYCT1* transcript, is regulated by c-Myc and may participate in laryngeal carcinogenesis. *PLoS One*, 6(10), e25648.

Gregorieff, A., & Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & development*, 19(8), 877-890.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

INEGI . Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el cáncer. Comunicado de prensa num 105/21

International Agency for Research on Cancer. (2022). *Global cancer observatory: Cancer today*. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/>

Ishizaki, Y., Ikeda, S., Fujimori, M., Shimizu, Y., Kurihara, T., Itamoto, T., ... & Asahara, T. (2004). Immunohistochemical analysis and mutational analyses of β -catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *International journal of oncology*, 24(5), 1077-1083.

Kabir, A. U., Subramanian, M., Lee, D. H., Wang, X., Krchma, K., Wu, J., Naismith, T., Halabi, C. M., Kim, J. Y., Pulous, F. E., Petrich, B. G., Kim, S., Park, H. C., Hanson, P. I., Pan, H., Wickline, S. A., Fremont, D. H., Park, C., & Choi, K. (2021). Dual role of endothelial *MYCT1* in tumor angiogenesis and tumor immunity. *Science translational medicine*, 13(583), eabb6731. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb6731>

Ladd, A. D., Duarte, S., Sahin, I., & Zarrinpar, A. (2024). Mechanisms of drug resistance in HCC. *Hepatology*, 79(4), 926-940.

- Liew, C. T., Li, H. M., Lo, K. W., Leow, C. K., Chan, J. Y., Hin, L. Y., ... & Lee, J. C. K. (1999). High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 18(3), 789-795.
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., ... & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Disease cebadores*, 7(1), 1-28.
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., ... & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Disease cebadores*, 7(1), 1-28.
- McClain, C. J., Hill, D. B., Song, Z., Deaciuc, I., & Barve, S. (2002). Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol*, 27(1), 53-61.
- Murata, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Sakaguchi, Y., Fu, H. Y., Kawano, S., & Hori, M. (2004). Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox-2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Laboratory investigation*, 84(8), 1050-1059.
- Pu, J., Wang, J., Xu, Z., Lu, Y., Wu, X., Wu, Y., ... & Wei, H. (2019). miR-632 functions as oncogene in hepatocellular carcinoma via targeting *MYCT1*. *Human gene therapy Clinical development*, 30(2), 67-73.
- Qiu, G., Xu, Z., Huang, D., Gong, L., Li, C., Sun, X., & Sun, K. (2003). Cloning and characterization of MTLC, a novel gene in 6q25. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi= Zhonghua yixue yichuanxue zazhi= Chinese journal of medical genetics*, 20(2), 94-97.
- Reig, M., Forner, A., Rimola, J., Ferrer-Fàbrega, J., Burrel, M., Garcia-Criado, Á., ... & Bruix, J. (2022). BCLC strategy for prognosis prediction and treatment recommendation: The 2022 update. *Journal of hepatology*, 76(3), 681-693.
- Szabó, E., Páska, C., Novák, P. K., Schaff, Z., & Kiss, A. (2004). Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathology & Oncology Research*, 10, 5-11.
- Wang, P. P., Ding, S. Y., Sun, Y. Y., Li, Y. H., & Fu, W. N. (2021). *MYCT1* inhibits the adhesion and migration of laryngeal cancer cells potentially through repressing collagen VI. *Frontiers in Oncology*, 10, 564733.
- Xu, X. P., Peng, X. Q., Yin, X. M., Liu, Y., & Shi, Z. Y. (2020). miR-34a-5p suppresses the invasion and metastasis of liver cancer by targeting the transcription factor YY1 to mediate *MYCT1* upregulation. *Acta Histochemica*, 122(6), 151576.
- Zhang, W. D., Chen, H. X., Wang, Y. X., Chen, Z. P., Shan, Z. J., & Xu, G. (2016). Bioinformatic analysis of c-Myc target from laryngeal cancer cell gene of laryngeal cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 12(1), 58-61.
- Zhang, Z. X., Zhang, W. N., Sun, Y. Y., Li, Y. H., Xu, Z. M., & Fu, W. N. (2018). CREB promotes laryngeal cancer cell migration via *MYCT1*/NAT10 axis. *OncoTargets and therapy*, 11, 1323–1331. <https://doi.org/10.2147/OTT.S156582>

Anexo 1

Con el objetivo de evaluar el efecto que tendría la sobreexpresión de este gen en el modelo HepG2 que como se observó anteriormente posee un nivel bajo de expresión de *MYCT1*. Se realizó la subclonación de los fragmentos correspondientes a toda la región codificante de *MYCT1* amplificados a partir de una muestra de sangre periférica (Figura A1).

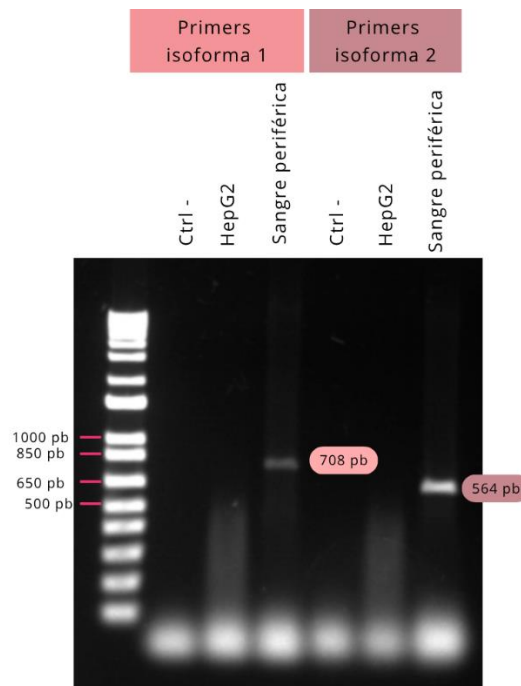


Fig. A1 Amplificación de región codificante de *MYCT1* isoforma 1 y 2 a partir de muestra de sangre periférica por medio de PCR punto final. Se amplificó la región codificante de *MYCT1* para ambas isoformas utilizando cDNA de sangre periférica. La primera isoforma tiene un tamaño de 708 pb y la segunda isoforma de 564 pb.

Una vez obtenido los amplicones se subclonaron en el vector pCR 2.1-TOPO. Se obtuvieron 7 candidatos para la isoforma 1 y 11 candidatos para la isoforma 2, los cuales fueron confirmados por PCR punto final. Se confirmó un candidato positivo para la isoforma 1 (Figura A2A) y dos candidatos positivos para la isoforma 2 (Figura A2B). Posteriormente estos candidatos fueron digeridos con la enzima *NheI* para una segunda caracterización de los cuales no se obtuvo candidato positivo para isoforma 1 y se confirmaron los dos candidatos de la isoforma 2 (Figura A3).

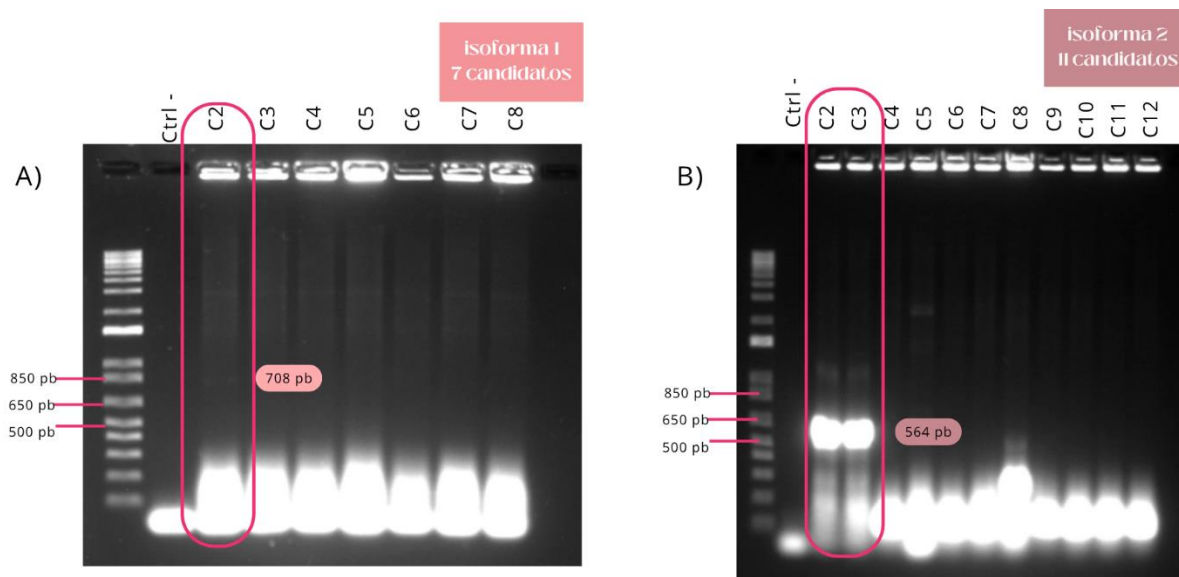


Fig. A2 Caracterización candidatos pCR 2.1-TOPO MYCT1 isoformas 1 y 2 por PCR punto final. Caracterización por PCR de colonias de candidatos A) pCR 2.1-TOPO MYCT1 isoforma 1 con 1 candidato positivo B) pCR 2.1-TOPO MYCT1 isoforma 2 con 2 candidatos positivos.

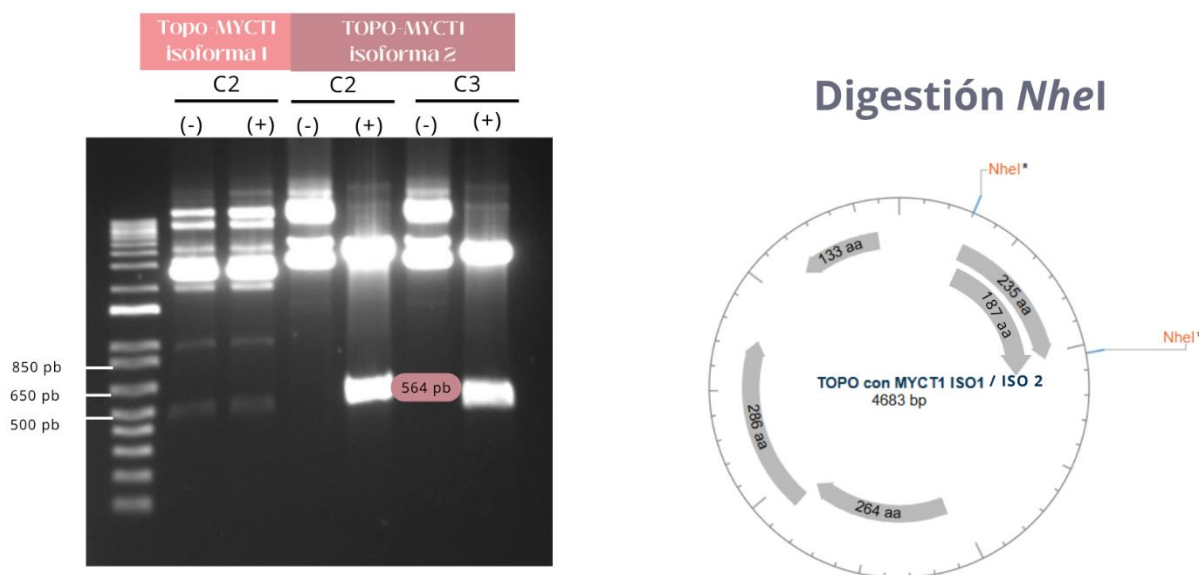


Fig. A3 Caracterización candidatos pCR 2.1-TOPO MYCT1 isoformas 1 y 2 por digestión con enzima NheI. Liberación del fragmento con enzima *NheI* con tamaño esperado de 708 pb para isoforma 1 y 564 pb isoforma 2.

Se continuo el proceso de subclonación con los candidatos provenientes de la isoforma 2 (candidato C2 y C3). El fragmento liberado por la digestión con la enzima *NheI* fue ligado en el vector pQBI-25. Se obtuvieron 25 candidatos de cada ligación y se realizó primeramente

una PCR de colonia con un pool de bacterias y una vez confirmadas aquellos pools positivos se realizó la PCR de colonia individualmente. Se obtuvo un candidato positivo de cada candidato (Figura A4).

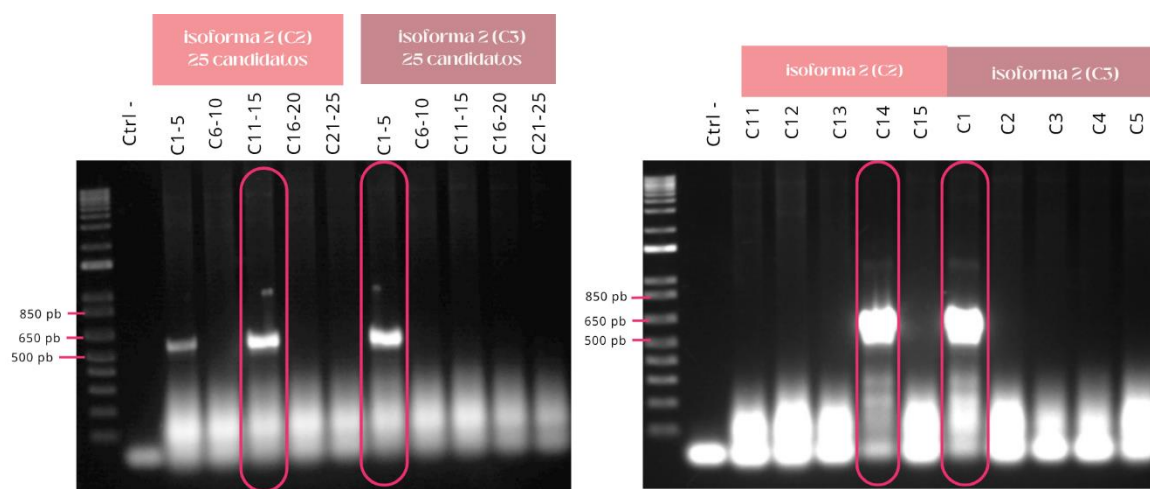


Fig. A4 Caracterización candidatos pQBI-25 MYCT1 isoforma 2. Caracterización por PCR de colonias de candidatos. pQBI-25 MYCT1 isoforma 2 candidato C2 con 1 candidato positivo y pQBI-25 MYCT1 isoforma 2 candidato C3 con 1 candidato positivo.

Al confirmar los dos candidatos de la construcción pQBI-25 MYCT1 isoforma 2. Se decidió mandar a secuencia, se identificó que ambos candidatos poseían dos cambios de base. Ambos poseen un cambio de guanina por adenina en la posición 210. Al analizar la base de datos de single nucleotide polymorphism (SNP) para este gen se identificó que este cambio corresponde a rs767809324 una variante de una sola base de la cual no se tiene información sobre la frecuencia o el impacto funcional. Sin embargo, las otras sustituciones no pudieron ser identificadas en la base de datos por lo que se asume que son errores cometidos por la enzima Taq polimerasa.

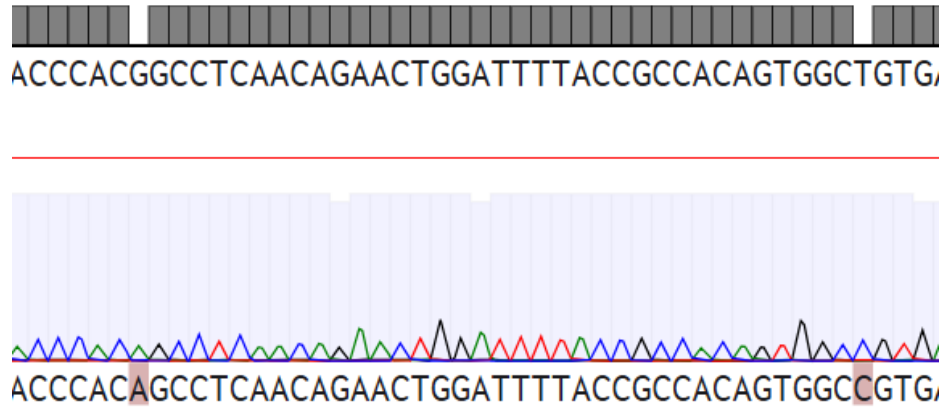


Fig. A5 Secuenciación MYCT1 isoforma 2 candidato 2. Se muestran dos transiciones, una en la posición 211 A>G y otra en 247 C>T.



Fig. A6 Secuenciación MYCT1 isoforma 2 candidato 3. Se muestran una transversión en la posición 24 T>A y una transición 211 A>G.