



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

**EFFECTO DE LA MODULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LINC RNA RP11-400K9.4 EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**M EN C. MIGUEL ÁNGEL FERNÁNDEZ ROJAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. VILMA A. MALDONADO LAGUNAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR**

**DR. JUAN MIRANDA RÍOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS**

**DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ  
FACULTAD DE MEDICINA**

**CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2021.**



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.

## *Agradecimientos*

A mi familia, por su apoyo y cariño constante.

A la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, por la confianza y guía durante estos años. Gracias por permitirme formar parte de su grupo.

A los Doctores Juan Miranda Ríos y Leticia Verdugo Díaz, por su tiempo y asesoramiento durante el desarrollo de este trabajo.

A CONACYT por el apoyo financiero otorgado bajo el número de becario 288752

A los miembros del laboratorio de Epigenética del INMEGEN del cual forme parte. Gracias por las enseñanzas y buenos momentos compartidos.

Un agradecimiento especial a la Dra. Brenda López Ruiz, por su valiosa ayuda durante los últimos 12 años.

A los miembros del jurado, por su tiempo y apoyo para hacer de este un mejor trabajo

Presidente	Dra. Marcela Lizano Soberón
Secretario	Dra. Vilma A. Maldonado Lagunas
Vocal	Dr. Alejandro Manuel García Carranca
Vocal	Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Vocal	Dr. Julio Isael Pérez Carreón

# INDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Capítulo I.-Introducción</b>	
1.1 Cáncer de Mama.....	3
1.1.1 Cáncer de Mama en México .....	3
1.2 Subtipos Moleculares .....	5
1.2.1 Luminal A y B .....	5
1.2.2 Her-2 positivos .....	6
1.2.3 Triples negativos.....	6
1.3 Células Troncales Tumorales (CSCs).....	7
1.3.1 Modelo Estocástico.....	8
1.3.2 Modelo Jerárquico .....	8
1.3.3 Modelo Unificado.....	9
1.3.4 Vías de señalización implicadas en células troncales tumorales.....	10
1.3.5 Vía de NF-kB en células troncales tumorales.....	11
1.3.6 Vía de NF-kB, apoptosis y supervivencia celular.....	12
1.4 RNAs largos No Codificantes (LncRNAs).....	14
1.4.1 Clasificación .....	15
1.4.2 Mecanismos de acción.....	16
1.4.3 RNAs largos no codificantes en células troncales tumorales.....	18
1.4.4 RNAs largos no codificantes y apoptosis .....	19
<b>Capítulo II.- Hipótesis y Objetivos</b>	
2.1 Hipótesis.....	20
2.2 Objetivos .....	20
2.2.1 General .....	20
Particulares .....	20
<b>Capítulo III.- Materiales y Métodos</b>	
3.1 Extracción de plásmidos.....	21
3.2 Cultivo de la línea MCF7 .....	22
3.3 Transfecciones transitorias .....	22
3.4 Curva dosis respuesta y Transfecciones estables.....	23
3.5 Extracción de RNA.....	23
3.6 Diseño de primers y Validación de RNA-Seq.....	24

3.7 Localización de RNAs largos no codificantes intergénicos (LincRNAs).....	25
3.7.1 Fraccionamiento celular.....	25
3.7.2 Patrón de proteínas y Western blot.....	25
3.7.3 Expresión relativa de RP11-757G1.6 y RP11-400K9.4 .....	27
3.8 Expresión relativa de RP11-400K9.4 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.....	27
3.9 Formación de esferoides.....	28
3.10 Separación de población MCF7 CD44+/CD24- por citometría de flujo “sorting”.....	28
3.11 Sobreexpresión e inhibición de RP11-400K9.4 en células MCF7.....	29
3.12 Ensayos de proliferación celular.....	30
3.13 Ensayos de migración <i>in vitro</i> .....	30
3.14 Microarreglos de expresión .....	31
3.15 Análisis bioinformático .....	31
3.16 Ensayo de viabilidad celular.....	32
 <b>Capítulo IV.- Resultados</b>	
4.1 Selección de RNAs largos no codificantes intergénicos (LincRNAs) y Validación de RNA-Seq.....	33
4.2 Localización subcelular de RP11-400K9.4 .....	34
4.3 Expresión de RP11-400K9.4 en líneas celulares.....	35
4.4 Expresión de lincRNA RP11-400K9.4 en CSCs y esferoides mamarios .....	37
4.5 Análisis de la sub o sobreexpresión de RP11-400K9.4 en células de cáncer de mama.....	38
4.6 Ensayos de migración <i>in vitro</i> en células de cáncer de mama.....	39
4.7 Análisis Bioinformático.....	39
4.8 Ensayos <i>in vitro</i> de daño por radiación UV-C y proliferación .....	43
 <b>Capítulo V.- Discusión</b>	
5.1 LincRNA RP11-400K9.4 en cáncer de mama .....	45
5.2 RP11-400K9.4 regula la supervivencia celular y migración en células de cáncer de mama. ....	47
 <b>Capítulo VI. - Conclusiones y Perspectivas.....</b>	
<b>Capítulo VII.- Literatura citada .....</b>	
<b>Capítulo VIII.- Apéndices</b>	
Apéndice I .....	64
Apéndice II.....	68

## Resumen

El cáncer de mama constituye la principal causa de muerte asociada a neoplasias en mujeres mexicanas. De manera general podemos definir el cáncer como un conjunto de padecimientos que conducen a la división descontrolada de las células, de tal forma que uno de los componentes afectados durante el desarrollo de cáncer es la regulación de la expresión génica. Los tumores son entidades heterogéneas compuestas por diferentes poblaciones celulares con funciones específicas, dentro de ellas las células troncales tumorales (CSCs) constituyen una subpoblación muy importante dado su papel en la propagación, manutención y resistencia del tumor a fármacos. Durante las últimas tres décadas se ha demostrado la importancia de la regulación génica mediada por RNAs no codificantes (ncRNAs), especialmente los microRNAs (miRNAs) y los RNA largos no codificantes (lncRNAs), estos últimos han sido descritos como participes en prácticamente todas las “hallmarks” del cáncer, denotando su importancia y versatilidad. Así mismo se ha descrito la importancia de vías de señalización, como NF-KB en la población de células troncales de mama, específicamente se ha observado como la sobreexpresión de la cinasa Ikke promueve la adquisición de fenotipo troncal en células de cáncer de mama, así como la desregulación de diversos lncRNAs, entre ellos el lincRNA RP11-400K9.4. Dado lo anterior decidimos evaluar el efecto de la desregulación del lncRNA RP11-400K9.4 en células de cáncer de mama, siendo así el primer estudio en abordar la funcionalidad de dicho lincRNA. Para ello en primera instancia ubicamos al RNA en la fracción citoplasmática lo cual corroboramos de manera bioinformática por medio de la base lncATLAS, posteriormente evaluamos la expresión del RNA en un panel de diez líneas celulares de cáncer de mamá (MCF7, T47D, ZR751, MDA-MB-361, 453, 468, 231, SKBR3, HS578T y BT-20), encontrando una mayor expresión en líneas con menor capacidad invasiva, tales como MDA-MB-453, T47D y MCF-7. Posteriormente, generamos células que sub o sobreexpresan el lincRNA RP11-400k9.4, con las cuales realizamos ensayos de migración, observando una menor capacidad migratoria en células con mayor expresión del RNA largo RP11-400k9.4. Consecuentemente, realizamos microarreglos de expresión con la finalidad de observar los genes y vías afectadas, encontrando un total de 329 genes desregulados y a las vías de censado y reparación de daño a DNA por radiación ionizante, como las mayormente afectadas. Así mismo realizamos ensayos de viabilidad celular tras aplicar un tratamiento de radiación ultravioleta (UV-C) encontrando una mayor supervivencia en respuesta a una sobreexpresión de RP11-400K9.4, así como un nulo efecto del RNA en la proliferación celular. Finalmente, evaluamos los genes involucrados en procesos apoptóticos desencadenados por daño a DNA observando un mayor nivel en dos conocidos oncogenes involucrados en la cascada apoptótica, BIRC3 y BIRC5. Por tanto, a pesar de no poder clasificar al lincRNA como oncogén o supresor de tumor, en este trabajo analizamos por primera vez la importancia que tiene la desregulación del lincRNA RP11-400K9.4 en la migración y supervivencia de células de cáncer de mama, lo que a su vez resalta la importancia de continuar con la investigación de dicho lincRNA y las implicaciones clínicas que podría tener.

## Abstract

Breast cancer represents the main death cause in Mexican women associated with neoplasia. In general, cancer is defined as a set of diseases that cause uncontrolled cell division that can lead to changes in the regulation of gene expression. Tumors are heterogeneous entities formed by several and specific cellular subpopulations, of which Cancer Stem Cells (CSCs) are found within the tumor and represent an important population due to their role during tumor propagation, maintenance, and drug resistance.

In the last three decades, it has been shown the importance of epigenetic regulation by non-coding RNAs (ncRNAs) especially microRNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs) that have been reported as relevant for “Cancer hallmarks”.

Similarly, pathways like NF-KB play an important role in Breast CSCs, particularly it has been identified that the kinase Ikke overexpression promotes stem phenotype acquisition of the breast cancer cells as well as the deregulation of several lncRNAs, including lincRNA RP11-400K9.4, a not yet explored lncRNA at a functional level.

Therefore, we evaluated the effect of RP11-400K9.4 deregulation in breast cancer cells. First, we located this lncRNA in the cytoplasmic fraction, which was corroborated by the lncATLAS database. Besides, we evaluated its expression in ten breast cancer cell lines (MCF7, T47D, ZR751, MDA-MB-361, 453, 468, 231, SKBR3, HS578T y BT-20), finding higher expression in cell lines with low invasive capacity, like MDA-MB-453, T47D y MCF-7. Subsequently, we produced RP11-400K9.4 sub and overexpressed clones with which we perform migration tests, observing a lower migratory capacity in cells with higher expression of RP11-400K9.4. Consequently, we carry out a microarray assay to identify the affected genes and pathways, finding a total of 329 deregulated genes, as well as DNA-IR damage detection and reparation pathways as the most affected.

Likewise, we implemented cellular viability assay after UV-C radiation and observed higher cellular survival in response to RP11-400K9.4 overexpression, we did not observe effects in cellular proliferation. Finally, we evaluated the expression of genes involved in apoptotic processes as a result of DNA damage. We found higher levels of BIRC3 and BIRC5, two known oncogenes implicated in apoptosis. Therefore, after all these analyses we cannot classify lincRNA RP11-400K9.4 as an oncogene or a tumor suppressor, however, we discovered the relevance of RP11-400K9.4 deregulation in breast cancer cells migration and survival after UV-C radiation. More studies are required to understand the relevance of RP11-400K9.4 during cancer development.

## **Capítulo I.- Introducción**

### **1.1 Cáncer de Mama (CaMa).**

El cáncer es un conjunto de enfermedades causadas por múltiples factores genéticos y epigenéticos, los cuales en su conjunto alteran el DNA de una célula, la cual en consecuencia adquiere ciertas características o “hallmarks”, que le permiten generar un tumor y posteriormente invadir otros tejidos [1,2]. Particularmente el cáncer de mama se desarrolla a partir del epitelio que recubre a los lóbulos (glándulas productoras de leche) y ductos (estructuras que conducen la leche hacia el pezón) de las glándulas mamarias, de ahí su clasificación histológica como carcinoma lobular (LC) o ductal (DC), sin embargo, ambos tipos de carcinoma se originan a partir de la unidad terminal lóbulo-ductal (TDLU) [3,4]. Ambos tipos de carcinoma se diferencian no solo por el epitelio donde se desarrolla sino también por la expresión de ciertas moléculas. Mientras que los carcinomas lobulares se caracterizan por no expresar E-cadherina y  $\beta$ -catenina, aunado a la producción citoqueratina 8 y 18, los tumores de origen ductal son positivos a la expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina además de la baja o nula expresión de citoqueratinas [3,4]. Por ende, las diferencias en el patrón de expresión de estas moléculas por cada tipo carcinoma, impactan en la terapia a la cual son susceptibles.

#### **1.1.1 Cáncer de Mama en México.**

El Cáncer de mama (CaMa) es un problema de salud pública a nivel mundial, constituyendo el 11.7% del total de los casos de cáncer detectados en el 2020. Además de ser la principal causa de muerte en población femenina a nivel mundial [5]



Esta tendencia mundial se ve reflejada en nuestro país en donde de acuerdo a los datos proporcionados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) podemos observar que si tomamos en cuenta a la totalidad de la población mexicana y los distintos tipos de cáncer, a nivel nacional el cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia y prevalencia a pesar de ser el quinto en cuanto a mortalidad se refiere, lugar que se eleva hasta la primera posición si exclusivamente tomamos en cuenta las defunciones de mujeres (Fig. 1). Considerando el periodo del año 2011 al año 2016, el CaMa paso de una tasa de 14 a 16 muertes por cada 100,000 habitantes. Así mismo, en el periodo de 2010-2020 se reportó un incremento en la incidencia de la enfermedad en 12 personas por cada 100,000 habitantes, se prevé que esta incidencia se duplique para el año 2040 de acuerdo a las estimaciones de la OPS [5–7].

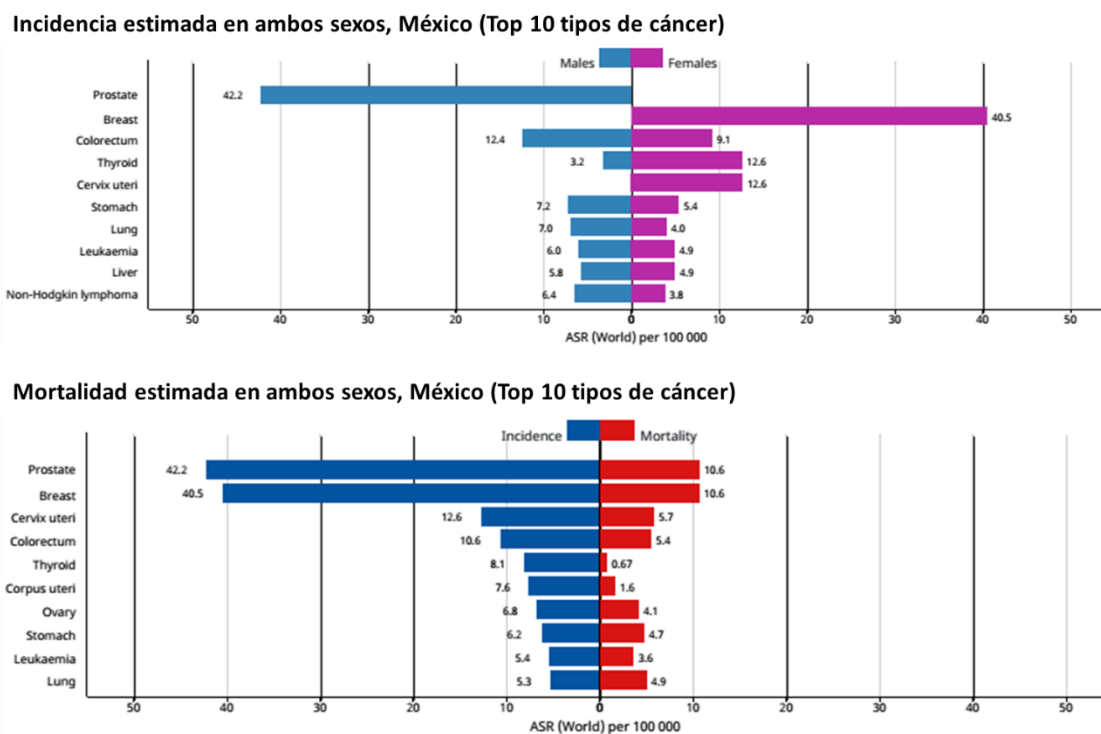


Fig. 1. Estadísticas de incidencia, mortalidad y prevalencia de Cáncer de Mama en población mexicana en 2020 (IARC, 2020)

## **1.2. Subtipos Moleculares.**

El CaMa puede ser clasificado de acuerdo a diversos criterios, sin embargo, debido al sesgo que existía a la hora de diagnosticar y diferenciar entre los subtipos de CaMa basados únicamente en las características histológicas, se evidenció la necesidad de desarrollar nuevos criterios de clasificación. Por tanto, a inicios del siglo XXI se reportó por primera vez la división de tumores mamarios con base en el criterio molecular, es decir a la expresión o ausencia de ciertos genes y proteínas, que, en conjunto con los parámetros histopatológicos, así como su respuesta a las terapias actuales nos permite clasificar los diferentes tumores de mama de manera precisa en comparación a décadas anteriores. Esta clasificación define cuatro subtipos de cáncer de mama, Luminales A y B, Her-2 positivo y triples negativos (Fig. 2) [8–10]

### **1.2.1 Luminal A y B.**

Este subgrupo de es el más abundante englobando alrededor del 70% de los tumores diagnosticados, los de tipo luminal A se caracterizan por ser los de mejor pronóstico ya que son de bajo grado y expresan receptores de estrógeno y progesterona lo que los hace candidatos a la terapia endocrina.

Por su parte, los luminales B siguen siendo de mejor pronóstico en comparación a las demás clases, sin embargo, es más agresivo que los luminales tipo A, debido a su alto carácter proliferativo. Estos tumores se caracterizan por tener una alta expresión de genes de proliferación, así como una expresión variable de receptores hormonales [11–13].

### **1.2.2 HER2 positivo.**

Este tipo de tumores comprende aproximadamente un 10% del total, se trata de tumores de mal pronóstico ya que presentan un grado histológico más avanzado en comparación con los de tipo luminal, aunado a que no expresan receptores hormonales, pero si presentan una amplificación del gen que codifica para el receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano o HER2. Esta amplificación produce la sobreexpresión del receptor de membrana, lo que favorece la activación de vías como MAPK, PI3K/AKT y JAK/STAT, vías conocidas por participar en procesos de proliferación, crecimiento y migración entre otras [14,15].

### **1.2.3 Triples Negativos.**

Los tumores triple negativos o “Basal like” son los de peor pronóstico de entre todos los subtipos. Representan alrededor del 15% de los casos detectados y como su nombre indica se caracterizan por no poseer receptores para estrógeno, progesterona o HER2, a la par de una alta expresión de genes asociados a proliferación además de citoqueratinas. Así mismo presentan sub expresión de proteínas de uniones estrechas y de adhesión como E-Cadherina, lo cual implica una mayor facilidad de sufrir transformación epitelio-mesénquima y por tanto menor dificultad para migrar. Debido a esto resulta obvia la ineficacia de las terapias hormonales o basadas en anticuerpos contra HER2, por lo que la alternativa es el uso de quimioterapia antes y después un proceso quirúrgico [16,17].

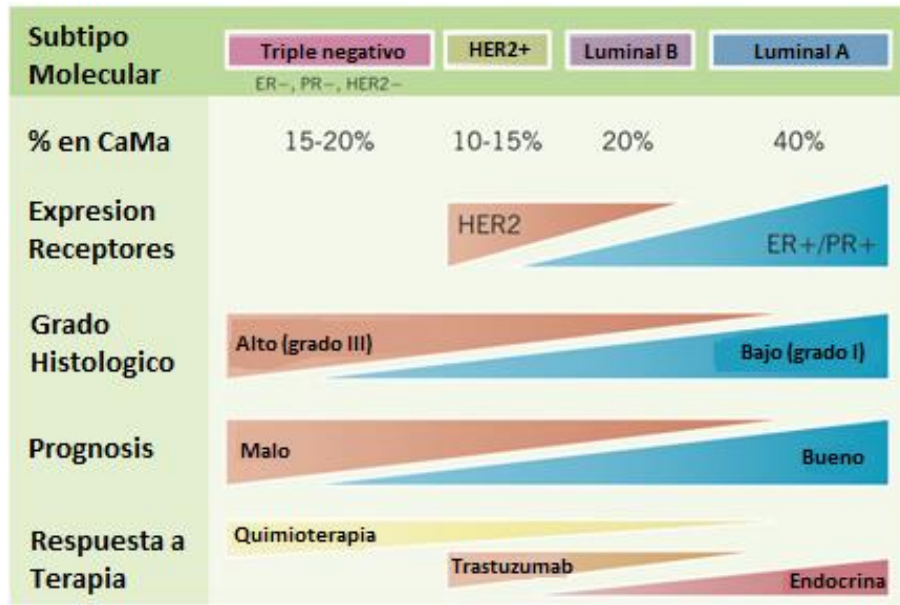


Fig. 2. Subtipos Moleculares de Cáncer de Mama y características asociadas a cada uno de ellos (Tomado y modificado de Wong 2012)

### 1.3 Células Troncales Tumorales (CSCs).

Un tumor es una masa celular heterogénea compuesta por diferentes subpoblaciones celulares las cuales desempeñan funciones específicas para la manutención y propagación del mismo. Dentro de estas poblaciones aparte de las células tumorales, se encuentran células infiltrantes de tipo endotelial, hematopoyéticas y estromales las cuales pueden generar cambios metabólicos como hipoxia y gradiente de nutrientes y deshechos. Así mismo algunos factores como metilación, modificación de histonas, estado de la cromatina y los ncRNAs contribuyen a esta heterogeneidad tumoral [19–21].

Los primeros reportes acerca de la existencia de heterogeneidad tumoral datan del siglo XIX, sin embargo, no fue hasta el siglo XX que se evidenciaron variaciones en marcadores de superficie, anomalías genéticas, rangos de crecimiento diferente y respuesta

diferencial a la terapia. A la fecha se han propuesto tres modelos que discuten la heterogeneidad tumoral, así como apoyan o refutan la existencia de una subpoblación denominada Células Troncales Tumorales o CSCs (por sus siglas en inglés) de la cual se han mostrado evidencias experimentales resaltando su importancia, ya que es la encargada de mantener el tumor y posiblemente es el origen del mismo [22–24].

Las células CSCs al igual que las células troncales normales, poseen la capacidad de dividirse asimétricamente, lo cual les permite autorrenovarse, dando lugar a otra célula troncal y a su vez dar lugar a otra célula con capacidad de diferenciarse. Se ha demostrado que las CSCs presentan mayor resistencia a los antineoplásicos, mayor capacidad invasiva/metastásica y la capacidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes, comparadas a las células no troncales del mismo tumor. Al conjunto de estas características se denomina fenotipo troncal [20,24,25]

### **1.3.1 Modelo Estocástico.**

Esta hipótesis también conocida como Evolución Clonal, fue el primer modelo propuesto y establece que todas las células tienen la misma potencialidad, es decir todas son capaces de autorrenovarse, así como dividirse y dar lugar a células hijas diferenciadas, de tal forma que de acuerdo a esta hipótesis no existiría heterogeneidad intra-tumoral (Fig 3a) [19,26].

### **1.3.2 Modelo Jerárquico.**

A diferencia del modelo estocástico donde todas las células tumorales son equipotentes, en esta hipótesis se postula la existencia de diferentes subpoblaciones con potencialidades diferentes. De esta forma se postula la existencia de CSCs, las cuales se encuentran en la cima de la jerarquía y poseen la capacidad de dividirse asimétricamente dando lugar a una

célula idéntica, es decir presentan la capacidad de autorrenovarse, a la vez que dan lugar a una célula más diferenciada. Por otra parte, dentro de dicha jerarquía se encuentran células caracterizadas por presentar un límite proliferativo menor en comparación a las CSCs, estas células denominadas de amplificación transitoria (TAs) se encuentran en mayor proporción dentro del tumor y eventualmente dan lugar a células tumorales diferenciadas (Fig 3b) [19,26].

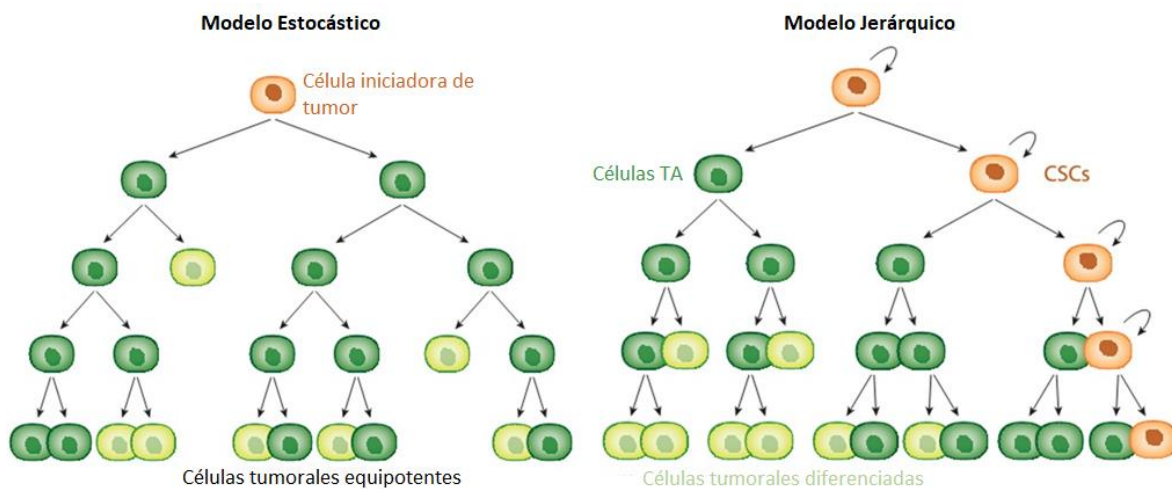


Fig. 3. Modelos de Crecimiento Tumoral. a) Modelo Clásico o estocástico donde todas las células tumorales son equipotentes; b) Modelo Jerárquico donde existe heterogeneidad intratumoral, dando lugar a diferentes subpoblaciones o clonas con diferente grado de potencialidad (Tomado y modificado de Nassar y Blanpain 2016).

### 1.3.3 Modelo Unificado.

Finalmente debido a las deficiencias de cada uno de los modelos antes mencionados, surgió un modelo unificado el cual establece la presencia de diferentes subpoblaciones o “clonas” a lo largo del curso temporal de evolución de un tumor. Esta hipótesis plantea la existencia de una clona dominante inicial o fundadora a partir de la cual pueden surgir otras más a lo largo del tiempo debido a la acumulación de nuevas mutaciones de tal forma que la clona

dominante encontrada en un punto específico del desarrollo de un tumor, no necesariamente es la misma en un punto de tiempo diferente. Este punto de vista nos muestra un curso temporal tumoral dinámico, permitiendo la aparición y eliminación de subclonas o subpoblaciones las cuales debido a este carácter maleable pueden adquirir propiedades troncales favoreciendo así la poza de estas células o bien adquiriendo mutaciones que favorecen un estadio más diferenciado. Por tanto, este modelo plantea a un tumor como un ente heterogéneo con una jerarquía donde el punto más alto o pluripotente de la misma está representado por las CSCs las cuales pueden sufrir de evolución clonal permitiendo perpetuar a dicha clona en particular hasta que gracias a la acumulación de mutaciones favorables aparezca una clona más apta y remplace a la anterior (Fig. 4) [27,28].

#### **1.3.4 Vías de señalización implicadas en células troncales tumorales.**

Diferentes vías de traducción de señales como las vías de Wnt, Notch y Hedgehog, están involucradas en el desarrollo embrionario y por tanto en la generación y diferenciación de los diferentes tipos celulares del organismo [29]. Debido a que las CSC, presentan características similares a las troncales normales, no es de sorprender que dichas vías se vean alteradas en estas células, favoreciendo la adquisición y mantenimiento de dicho estado multipotente [30].

Aunadas a estas vías, existen otras más, las cuales al participar en la regulación de los “hallmarks” del cáncer, se les ha asociado a su vez con la adquisición de un fenotipo troncal tumoral. Dentro de estas vías, una de sumo interés es la vía de NF-kappa B (NF-kB), la cual participa en la respuesta inflamatoria e inmune del cuerpo, cuya activación

permanente y evasión, respectivamente, son conocidas “hallmarks” del cáncer. NF- $\kappa$ B participa en muchos procesos celulares al interactuar con otras vías como Notch, Wnt, Hedgehog, Ras, PI3k, MAPK, STAT y AKT, de tal forma que se ha ligado a la expresión aberrante de NF- $\kappa$ B con procesos alterados como la proliferación, supervivencia, metástasis y angiogénesis [29,31]. Se ha reportado que NF- $\kappa$ B puede regular la expresión de los componentes de otras vías, como  $\beta$ -catenina, lo cual promueve la expresión de genes involucrados con la adquisición de un fenotipo troncal [32].

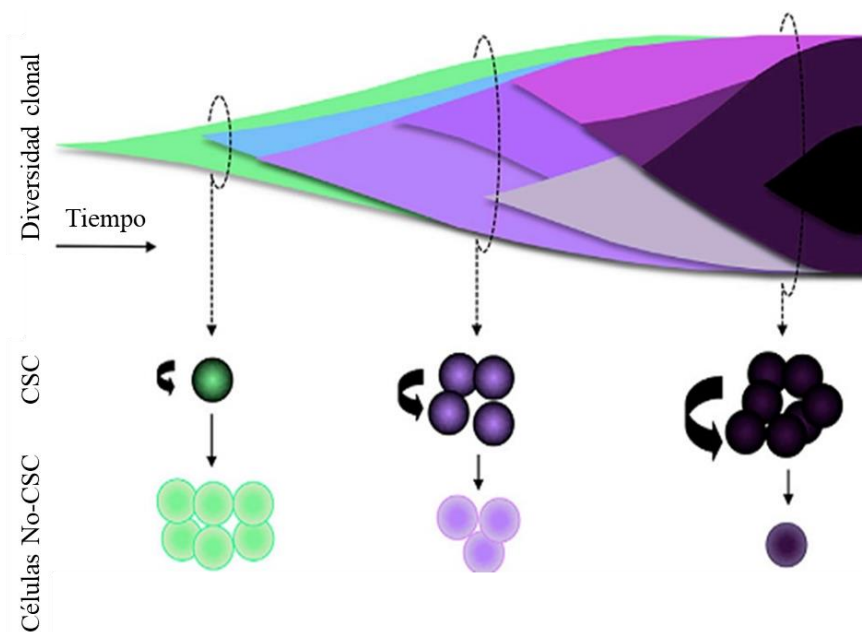


Fig. 4. Modelo unificado del crecimiento tumoral, donde se incluye tanto la existencia de células troncales tumorales, así como la expansión clonal de las diferentes subpoblaciones tumorales (Tomado y modificado de Kreso y Dick 2014).

### 1.3.5 Vía de NF- $\kappa$ B en células troncales tumorales.

NF- $\kappa$ B es un factor transcripcional compuesto por dímeros que regulan la transcripción de diversos genes. Existen dos vías de señalización, canónica y no canónica, a través de NF-



BK. En la vía canónica de NF- $\kappa$ B participan las proteínas p50/p65. En condiciones basales el dímero se encuentra en el citoplasma unido a la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . Después de un estímulo, I $\kappa$ B $\alpha$  es fosforilado en las serinas 32 y 36 por el complejo compuesto de tres cinasas (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y IKK $\gamma$ ) lo cual la dirige a degradarse, liberando el dímero p50/p65, el cual transloca al núcleo, se une al DNA en secuencias específicas y regula la transcripción de genes blanco [33–35]. La cinasa IKK épsilon (IKK $\epsilon$ , IKK $\epsilon$ ) es otra cinasa reguladora de I $\kappa$ B $\alpha$ , la cual fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  en la serina 36 para activar a NF-kappa B [32,36].

El RNA mensajero de IKK $\epsilon$  es regulado por TNF- $\alpha$  e interleucina 1B y en su promotor tiene un sitio responsivo a p65/p50 [37,38]. Se ha reportado que IKK $\epsilon$  está sobreexpresado en cáncer de próstata y su sobreexpresión favorece la metástasis e invasión de células tumorales de ovario y el crecimiento de células de cáncer de mama estrógeno negativas, mientras que su disminución, inhibe el crecimiento e invasividad de líneas celulares de cáncer de mama (Fig. 5) [35,39–43].

### **1.3.6 Vía de NF- $\kappa$ B, apoptosis y supervivencia celular.**

Como se mencionó anteriormente la vía de NF-BK es sumamente versátil, siendo indispensable para la progresión tumoral de tumores líquidos y sólidos, presentando importancia en prácticamente cada una de las características propias de un desarrollo tumorigénico propuestas por Hannahan y Weinberg, tales como diferenciación, proliferación, adhesión celular, metástasis, inflamación, angiogénesis, evasión de apoptosis y supervivencia [44,45].

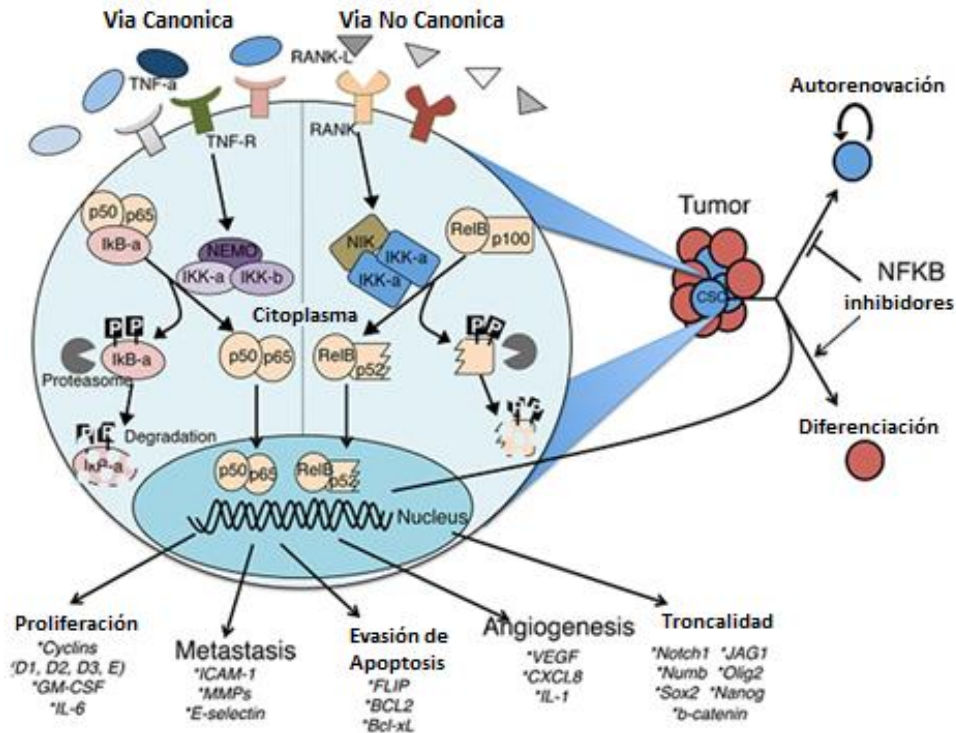


Fig. 5. Vías Canónica y No Canónica de NF-κB y su impacto en el desarrollo tumoral (Tomado y modificado de Vazquez-Santillan et al. 2015)

El proceso apoptótico ha sido ampliamente estudiado el cual es desencadenado tanto por estímulos en condiciones fisiológicas naturales como en un estado patológico, tal como el cáncer. El estímulo de apoptosis puede darse a través de dos vías, la vía intrínseca o mitocondrial y la extrínseca, ambas son activadas de manera diferente, sin embargo, convergen en la activación de Caspasa 3 lo que provoca la degradación de diferentes componentes, desensamble de la célula y posterior fagocitosis [46,47]. En el caso particular del cáncer la evasión de apoptosis y por consecuencia supervivencia, depende de un desbalance entre las señales o estímulos pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, una disminución o inhibición de la actividad de las caspasas además del bloqueo o

desensibilización de los receptores TNF o Fas y por ende la regulación de proteínas cascada abajo como JNK [48–50].

Dentro de las proteínas anti-apoptóticas cuya desregulación se ha visto asociada a la supervivencia de células tumorales y por tanto al progreso de diferentes tipos de cáncer se encuentran las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). Estas proteínas se unen a las caspasas impidiendo su función y por tanto inhibiendo el proceso de apoptosis, diferentes estudios han mostrado la regulación de NF-KB sobre diferentes IAPs entre ellas BIRC3(cIAP2) y BIRC5 (Survivina), observando una mayor expresión de estas proteínas tras el encendido continuo de la vía de NF-KB como resultado de su desregulación durante el desarrollo tumoral [51–53]. De igual manera se ha observado el incremento en la expresión de BIRC3 en cáncer de mama tras aplicarse terapia hormonal, esto debido al incremento en la actividad de TNF, lo que se ve reforzado al encontrar mayor quimio-resistencia en diferentes tipos de cáncer tras sobreexpresarse diferentes proteínas de la familia IAPs [54,55].

#### **1.4 RNAs largos no codificantes (LncRNAs).**

Los lncRNAs son transcritos con una longitud mayor a 200 pb que comparten diversas características con los RNAs mensajeros (mRNAs) como el poseer una caperuza o cap en el extremo 5' así como sufrir de “splicing”, sin embargo, a diferencia de estos, la mayoría de los RNAs largos no codifican para proteínas. El hecho de que algunos si puedan codificar pequeños péptidos funcionales resulta contradictorio a la definición inicial, sin embargo,

estos RNAs siguen manteniendo la categoría de lncRNAs ya que desempeñan ambos roles [56–58].

El mantenimiento de un estado pluripotente o la adquisición de un estado diferenciado son procesos finamente regulados debido a la importancia que conlleva para la homeostasis tisular el generar células diferenciadas con una función específica o bien al mantener un pool de células con carácter troncal capaces de regenerar un tejido cuando éste es dañado [59]. A la fecha se han descrito diferentes RNAs no codificantes (ncRNAs por sus siglas en inglés) involucrados en ambos procesos y debido a la similitud entre las células troncales normales y las tumorales, es normal el que se hayan descrito algunos RNAs no codificantes participes de la adquisición y manutención de un estado troncal en células cancerosas [57,60–62].

#### **1.4.1 Clasificación.**

Los lncRNAs pueden clasificarse de acuerdo a los loci que los producen como, intrónicos, exónicos e intergénicos, así como presentar una direccionalidad sentido o antisentido, es decir transcribirse en la misma dirección o en dirección opuesta con respecto a los genes codificantes aledaños. Los RNAs largos no codificantes intergénicos (lincRNAs) se codifican en regiones flanqueadas por genes codificantes y son transcritos por la RNA polimerasa II y III, los RNAs largos intrónicos son transcritos de igual manera por la polimerasa III y como su nombre indica están codificados exclusivamente en intrones y surgen como resultado de “splicing” alternativo, finalmente los RNAs largos exónicos se sintetizan a partir de regiones codificantes por la RNA polimerasa II y generalmente se

expresan en menor medida con respecto a sus contrapartes (mRNAs) codificantes (Fig. 6) [56,60].

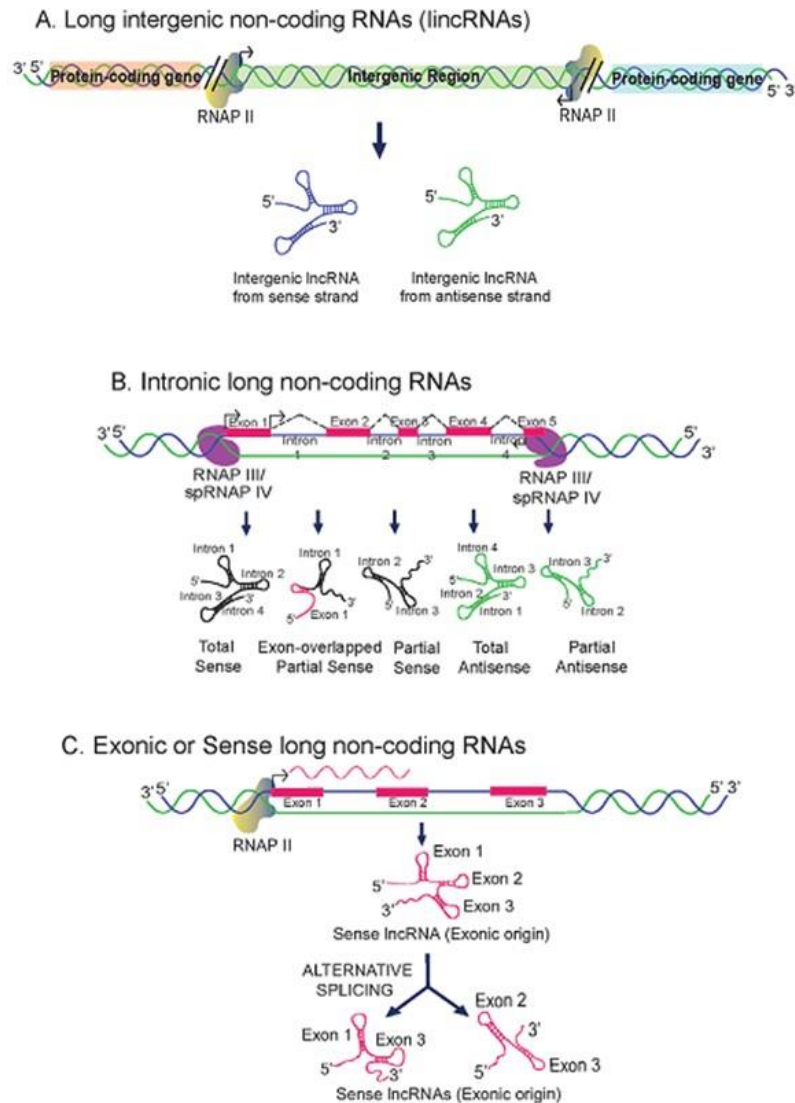


Fig. 6. Clasificación de RNAs largos no codificantes (lncRNAs) de acuerdo a su posición en el genoma (Tomado de Khandelwal et al. 2015).

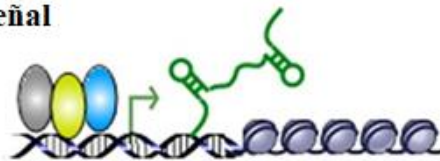
### 1.4.2 Mecanismos de Acción.

A la fecha se han descrito varias funciones para los lncRNAs, entre ellas se puede numerar su participación en diferenciación, desarrollo y progresión tumoral, metabolismo celular,

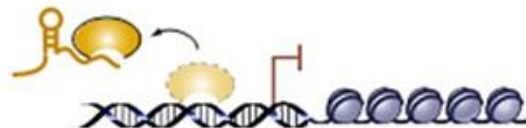
regulación del estado de la cromatina, transcripción, “splicing”, transporte de RNA y traducción.

Pueden llevar acabo su función en *cis* o *trans*, además de realizarla a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, actuando como señales al favorecer la transcripción de sus genes blanco mediante el reclutamiento de la maquinaria de encargada de dicho proceso, como moléculas señuelo al unirse y secuestrar a proteínas reguladoras u otras clases de RNAs no codificantes impidiendo su unión con sus secuencias de DNA blanco, como moléculas guía al reclutar complejos RNA-proteína a ciertos genes blanco y como andamios al proveer de plataformas para el ensamblaje de complejos proteína-RNA. (Fig. 7) [56,58,63].

#### I. Señal



#### II. Señuelo



#### III. Guia



#### IV. Andamio

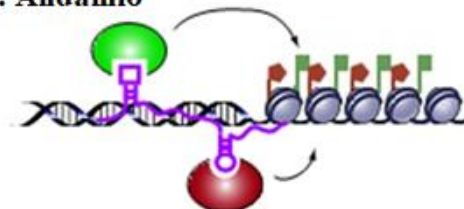


Fig. 7. Mecanismos de acción descritos para lncRNAs. I) Actúan como moléculas señalizadoras favoreciendo la expresión de un gen dado, II) Pueden secuestrar proteínas impidiendo su unión con sus regiones blanco en el DNA, III) Dirigen complejos proteicos a sus sitios de unión en el DNA alterando la expresión de dicha región IV) Actúan como andamios al reclutar proteínas que alteran el estado de compactación de la cromatina (Tomado y modificado de K. C. Wang y Chang 2011).

#### **1.4.3 RNAs largos no codificantes en células troncales tumorales.**

Durante los últimos años los RNAs no codificantes (ncRNAs), es decir los RNAs que se transcriben, pero no producen o codifican proteínas, han cobrado relevancia como importantes reguladores de la expresión génica en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos incluyendo el cáncer, especialmente los miRNAs y los lncRNAs, ya que se ha reportado que la ganancia o pérdida de su función puede favorecer el desarrollo de cáncer, así como la adquisición de un fenotipo troncal. A la fecha se han descrito diversos miRNAs y lncRNAs involucrados tanto en el desarrollo normal de la mama, como en el proceso de tumorigénesis y metástasis del cáncer de mama [62,64,65].

De igual manera, se ha descrito la importancia de la desregulación de diferentes RNA's largos no codificantes en CSC's provenientes de diferentes tipos de cáncer, como mama, próstata y pulmón entre otros [66]. Algunos de estos RNA's como Linc00617, LncSOX2OT, HOTAIR, lncH19 y lncRNA-HH han sido caracterizados como oncogenes en tumores mamarios y asociados a un mal pronóstico producto de su sobreexpresión. Dicha desregulación propicia la adquisición de características como: adquisición de un estado pluripotente, capacidad de autorrenovación, incremento en la proliferación, migración e invasión, resistencia a fármacos y elongación de telómeros [67–71].

Así mismo, datos obtenidos en nuestro grupo de investigación sugieren que células de cáncer de mama que sobreexpresan IKKe presentan mayor porcentaje de células troncales, así como características tumorigénicas [72]. Al realizar un análisis del transcriptoma por

secuenciación masiva se encontró un grupo de lincRNAs (RNAs largos no codificantes intergénicos) con niveles modificados en las células que sobreexpresaban a la cinasa IKKe [72]

#### **1.4.4 RNAs largos no codificantes y apoptosis.**

Al igual que la modulación en la regulación de la expresión de LncRNA's afecta la adquisición de características pertenecientes a un fenotipo pluripotente, también se ha demostrado su impacto en la regulación del proceso apoptótico y por ende su importancia en el desarrollo de enfermedades [73,74]. En el caso del cáncer la evasión de este programa de muerte celular, conduce a la supervivencia de células transformadas y por tanto su posterior crecimiento y propagación [75]. De esta forma algunos RNAs largos como HOTAIR, HOXA-AS2, AFAP1-AS1, SPRYT4-ITI, TP73-AS1, PlncRNA-1 y OIP5-AS1, han sido descritos como inhibidores del proceso de apoptosis y promotores del crecimiento tumoral [75–80]. De igual manera en cáncer de mama se ha observado la inhibición de apoptosis y progresión tumoral regulada por RNAs no codificantes como TUG1, lincRNA-APOC1P1-3, BCRT1, AC009283.1, LINC01087 y MIAT [81–86].

Recientes estudios han señalado al RNA largo no codificante intergénico (lincRNA) RP11-400k9.4, como un posible marcador de tumores triples negativos [87–89]. Así mismo Orlova y colaboradores encontraron diferentes lncRNAs, entre ellos RP11-400K9.4, asociados con la desregulación del inhibidor de la cinasa IKK épsilon y la regulación del fenotipo troncal en células de cáncer de mama (MCF7) [72]. Por tanto, en el presente trabajo se investigó el papel y la repercusión de los cambios en los niveles de expresión del



lincRNA RP11-400K9.4 en la regulación del fenotipo troncal y progresión tumoral de la línea celular MCF-7.

## **Capítulo II.- Hipótesis y Objetivos.**

### **2.1 Hipótesis.**

Si el RNA largo intergénico no codificante RP11-400K9.4 presenta una expresión alterada en células de cáncer de mama, entonces participará en la regulación del fenotipo troncal, clonogenicidad y supervivencia de células MCF-7.

### **2.2 Objetivos.**

#### **2.2.1 Objetivo General**

Evaluar la participación del RNA largo intergénico no codificante RP11-400K9.4 en la regulación del fenotipo troncal, clonogenicidad y supervivencia de células MCF-7.

#### **2.2.2 Objetivos Particulares**

- I. Determinar la localización del lincRNA RP11-400K9.4 en células MCF7
- II. Evaluar si lincRNA RP11-400K9.4 se encuentra sobreexpresado en la población troncal de células MCF-7.
- III. Determinar si la alteración de los niveles endógenos, con ensayos de pérdida y/o ganancia de función de lincRNA RP11-400K9.4 en la línea celular MCF7 modifica su potencial tumorigénico

## **Capítulo III.- Materiales y Métodos.**

### **3.1 Extracción de plásmidos.**

Para el presente trabajo se emplearon 4 plásmidos diferentes pcDNA3-flag Ikkε que contiene una versión silvestre del gen, pcDNA3-flag Ikkε (K38A) el cual contiene una sustitución de una lisina por una alanina en la posición 38, inactivando a la proteína, pcDNA3-flag GFP y el vector vacío PLXSN, estos dos últimos como controles.

La extracción de los plásmidos a partir de bacterias previamente transformadas, se llevó a cabo con el kit Geneall Exprep Plasmid SV Midi (Geneall Biotechnology Co.). Brevemente, se plaquearon las bacterias transformadas con los diferentes plásmidos en placas petri con agar LB y ampicilina (100µg/µl) a 37°C, durante toda la noche, posteriormente, se tomó una colonia y se colocó en un tubo con 5 ml de caldo LB con ampicilina durante 8 horas, a 37°C en agitación. Pasadas las 8 horas el contenido de cada tubo fue vertido en un matraz con 250 ml de caldo LB con ampicilina e incubado a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugo en contenido de los matraces a 4000 rpm durante 5 minutos para obtener el pellet de bacterias, posteriormente, el pellet se resuspendió en 12.5 ml del buffer S1, se añadieron 12.5 ml del buffer S2 y se incubo por 5 minutos, después se añadieron 17.5 ml del buffer S3 y se incubo por 5 minutos más en hielo, para posteriormente centrifugar dicha mezcla a 5,000 rpm durante 20 minutos.

Una vez obtenido el lisado, este se colocó en una columna y se incubo por 2 minutos, después se centrifugo a 2,200 rpm durante 3 minutos y se repitió dicho proceso hasta pasar el total del lisado por el filtro. Posteriormente, el lisado fue colocado en una columna SV Midi repitiendo el proceso de centrifugación tantas veces como fuese necesario hasta pasar en su totalidad el lisado. Después se le agregaron 9 ml de Buffer AW a la columna y se

centrifugo a 2,200 rpm durante 3 minutos, posteriormente se le agregaron 12 ml de Buffer PW y centrifugo de igual manera.

Después de este lavado, se colocaron 3 ml más de Buffer PW y se centrifugo a 5,000 rpm durante 15 minutos, finalmente se colocó la columna en un tubo nuevo y se agregaron 600  $\mu$ l de agua MilliQ previamente calentada a 70°C, se incubo por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugo por 5 minutos a 5,000 rpm.

Por último, se cuantificó la concentración obtenida de cada plásmido por medio de espectrometría con ayuda del equipo Nanodrop.

### **3.2 Cultivo de la línea MCF7.**

La línea celular MCF7 fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection HTB-22). Se cultivó y mantuvo a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en medio EMEM (ATCC, 30-2003) con suero fetal bovino al 5% (ATCC, 30-2020).

### **3.3 Transfecciones Transitorias.**

Se obtuvieron células a partir de un cultivo confluyente y en placas de 6 pozos, se sembraron alrededor de 1 millón de células por pozo, para un total de 8 pozos, 2 pozos por cada plásmido empleado. Posteriormente, se colocaron 7.5  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) mas 3  $\mu$ g de cada plásmido agregando el volumen de medio sin suero necesario para un volumen final de 100  $\mu$ l en un tubo eppendorf y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación, se colocaron los 100  $\mu$ l de la mezcla de Lipofectamina (Thermo Fisher Scientific) con cada uno de los plásmidos en cada uno de los pozos correspondientes y se aforo a un volumen final de 1 ml de medio sin suero por pozo, posteriormente se dejó incubar durante 24 hrs a 37°C en una atmosfera al 5%

CO<sub>2</sub>, después se les retiro la mezcla y se tripsinizó a las células con una mezcla de PBS1x/Tripsina 0.05%/EDTA 0.53mM y se incubo a 37°C el tiempo necesario hasta observara a las células despegadas de la placa de cultivo. La mezcla fue inactivada con la adición de medio EMEM con suero fetal bovino (SFB) al 5% y se centrifugo a 1100 rpm durante 5 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 5 ml de medio con SFB e incubado por 24 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4 Curva Dosis Respuesta y Transfecciones Estables.**

Se realizó una curva de concentración de G418 (Gentamicina), para lo cual en una placa de 24 pozos se sembraron 200,000 células MCF7 por pozo en medio EMEM con suero al 5% y se les agrego una concentración de G418 desde 100µg hasta 1 mg por µl por duplicado. Posteriormente se les dejo crecer y se determinó la concentración a la cual morían las células mediante su observación en el microscopio.

Una vez determinada la concentración de G418 necesaria, se realizó el proceso de transfección como se menciona anteriormente, sin embargo, en este caso se dejaron crecer por 2 semanas en presencia del antibiótico y 4 semanas más hasta obtener un cultivo confluyente de células que expresaran establemente los plásmidos de interés.

### **3.5 Extracción de RNA.**

La extracción del RNA se realizó a partir de 4 millones de células aproximadamente y por medio de Trizol y de acuerdo al protocolo ya establecido [90]. Brevemente, se resuspenden las células en 1 ml de trizol e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, añadir 200 µl de cloroformo e incubar nuevamente 5 minutos y centrifugar a 11000 rpm por 15 minutos. Una vez pasado el tiempo se habrán formado 2 fases, una orgánica y otra acuosa,

esta última se transfirió a un tubo limpio y se le agregó isopropanol en una proporción 1:1 vol/vol y se dejó incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, eliminando al final el sobrenadante y conservando el pellet obtenido, al cual se le realizaron dos lavados con etanol al 70%, para finalmente resuspender el pellet en 20  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y almacenarlo a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, la integridad del RNA obtenido fue cuantificado por medio de espectrometría en el equipo Nanodrop, así como su integridad por medio de geles de agarosa al 1.5%.

### **3.6 Diseño de primers y Validación de RNA-Seq.**

El diseño de los oligonucleótidos a usar se realizó con el programa Primer 3<sup>®</sup> Plus, y se confirmó la especificidad de los mismos con los programas BLAST, Primer BLAST, The Sequence Manipulation Suite y MFEprimer-2.0.

A partir del RNA extraído previamente, se realizó una retrotranscripción utilizando oligonucleótidos aleatorios (Kit High-Capacity cDNA reverse Transcription Applied Biosystems), para obtener DNA complementario (cDNA). Una vez obtenido el cDNA se realizó una PCR tiempo real empleando el sistema PCR tiempo real 7500<sup>™</sup> y SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). La expresión relativa de genes se calculó usando el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  [91] tomando como controles al gen endógeno humano SDHA (Succinato deshidrogenasa subunidad A) y a las células transfectadas con el vector vacío. Todas las reacciones se realizaron por triplicado por cada muestra.

### **3.7 Localización de RNAs largos no codificantes intergénicos (LincRNA's).**

#### **3.7.1 Fraccionamiento celular.**

Se llevó a cabo un fraccionamiento celular y extracción de RNA de cada uno de los cultivos de células transfectadas con los plásmidos pcDNA3-flag IKKe, pcDNA3-flag IKKe (K38A) y PLXSN con ayuda del sistema Paris Kit (Thermo Fisher Scientific). Para esto, se transfectaron transitoriamente células MCF7 con los 3 plásmidos mencionados, posteriormente, 4 millones de células transfectadas fueron lisadas con 400µl del buffer de fraccionamiento e incubadas en hielo por 10 minutos, después se centrifugo a 500 xg por 5 minutos y se separó el sobrenadante (fracción citoplasmática) del pellet (fracción nuclear) obtenido. Posteriormente, a ambas fracciones se les agregaron 400 µl del buffer de disrupción y se tomó de cada fracción una porción la cual se guardó a -20°C para su uso, las porciones restantes fueron mezcladas con un volumen igual de la solución 2x lysis/binding, así como un volumen igual a la inicial de etanol al 100%. Una vez obtenida la mezcla, esta fue colocada en columnas con filtro y centrifugadas a 13,000 rpm durante 1 minuto, el termino se lavaron las columnas con 700µl de Solución de lavado y posteriormente 500µl de 2/3 solución de lavado. Finalmente, la columna fue colocada en un tubo nuevo y se le agregaron 50 µl de la solución de elución (en 2 rondas, una de 40µl y otra de 10µl) previamente calentada a 95°C y centrifugando a 13,000 rpm durante 30 segundos.

#### **3.7.2 Patrón de Proteínas y Western Blot.**

Para evaluar la pureza de las fracciones obtenidas, se realizó un corrimiento electroforético en geles desnaturalizantes de acrilamida, para lo cual en primera instancia se realizó una curva de  $\alpha$ -globina mediante el kit Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad), el cual se basa en

el método de Bradford. Posteriormente, con estos mismos reactivos se realizó la cuantificación de la cantidad de proteínas de cada una de las fracciones obtenidas. Una vez cuantificadas, se cargaron 30 µg de cada muestra en un gel de acrilamida al 10% y se realizó la electroforesis a un voltaje constante de 110 volts por 1 hora, terminado el tiempo, el gel se tiñó con azul de Commasie para evidenciar el patrón de proteínas.

A la par se realizó un inmunoreconocimiento contra las proteínas Laminina A/C y  $\alpha$ -Tubulina para evidenciar su localización en núcleo y citoplasma respectivamente, para esto una vez realizado el corrimiento electroforético se equilibró el gel en buffer de transferencia por 15 min, a la vez que se humedeció una membrana PVDF del tamaño del gel en metanol por 10 minutos y 10 minutos más en Buffer de transferencia. Posteriormente, se colocaron tanto el gel, así como la membrana entre un par de papel filtro en una cámara de transferencia semiseca y se transfirió a un voltaje constante de 15 volts durante 20 minutos. Terminado el tiempo, la membrana se colocó en TBS-Tween 0.1% con leche descremada al 5% y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas, posteriormente se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos cada lavado, con TBS-Tween0.1%. Una vez lavada la membrana se incubó con el anticuerpo primario Laminina A/C (Santa Cruz) en TBS-Tween0.1% (1:1000) durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente, posteriormente se lavó nuevamente con TBS-Tween0.1% y se incubó con el anticuerpo primario contra  $\alpha$ -Tubulina (Santa Cruz) en TBS-Tween0.1% (1:1000) bajo las mismas condiciones. Al término de esta incubación, se lavó la membrana y se incubó por 2 horas más con el anticuerpo secundario Anti-ratón (Santa Cruz) en TBS-Tween0.1% (1:2000). Finalmente, la membrana se lavó nuevamente con TBS-Tween0.1% y se reveló mediante su incubación con una mezcla de HRP-Substrate Luminol Reagent (Bio Rad) y

HRP-Substrate Peroxide Solution (Bio Rad) (1:1) durante 5 minutos, y posterior exposición en el fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (Bio Rad).

### **3.7.3 Expresión Relativa de RP11-757G1.6 y RP11-400K9.4**

Con los oligonucleótidos diseñados previamente se llevó a cabo la evaluación de la expresión de los LincRNA's de interés en ambas fracciones empleando los mismos reactivos señalados anteriormente y al igual que en los ensayos de validación se empleó como control a las células transfectadas con el vector vacío, sin embargo, en este caso se usó como gen endógeno al snRNA-U48.

Cabe mencionar que la expresión de este snRNA fue evaluada empleado sondas TaqMan, por lo cual en primera instancia se realizó la síntesis de cDNA a partir del RNA previamente obtenido con ayuda de los componentes del kit MicroRNA Reverse Transcription y el oligonucleótido del kit TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems), el cual consiste en un stem loop específico para el snRNA de interés, posteriormente este cDNA fue utilizado para evaluar la expresión relativa del snRNA-U48 con ayuda del TaqMan Universal PCR Master MixII (Applied Biosystems).

### **3.8 Expresión relativa de RP11-400K9.4 en diferentes líneas celulares de cáncer de mama.**

Diez líneas celulares pertenecientes a distintos subtipos de Cáncer de Mama (MCF7, T47D, ZR751, MDA-MB-361, 453, 468, 231, SKBR3, HS578T y BT-20) fueron crecidas en medio DMEM o RPMI suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5% de acuerdo con las instrucciones del fabricante y mantenidas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. De estas se extrajo RNA



y sintetizó cDNA con el cual se realizó una PCR en tiempo real siguiendo las especificaciones antes mencionadas para evaluar la expresión del lincRNA. Así mismo el cálculo de dicha expresión fue realizado de igual manera con el método descrito por Livak en 2001 [91].

### **3.9 Formación de esferoides.**

Se realizó la formación de esferas por agregación, para lo cual se sembraron 2 millones de células en botellas de 12.5 cm<sup>2</sup> con medio Lebovitz (L-15) al 10% de Suero Fetal Bovino durante 6 días en una incubadora de agitación orbital a 60 rpm, realizando cambios de medio cada 48 hrs y disgregando aquellos cúmulos amorfos que pudieran generarse.

### **3.10 Separación de población MCF-7 CD44+/CD24- por citometría de flujo “sorting”.**

Las células de los esferoides mamarios se disgregaron mediante su incubación con Acutasa (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 37°C durante 10 minutos, después se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS-FBS 1%. Diez millones de células se incubaron con anticuerpos FITC-CD44 y PE-CD24 por 30 minutos en hielo y ausencia de luz, mientras que para compensar se emplearon perlas incubadas con los mismos anticuerpos. Así mismo se empleó un millón de células como control, a la vez que dos millones más fueron marcados, uno con PE-IgG2 y uno más con FITC-IgG2a los cuales fueron utilizados como anticuerpos de isotipo. Para la separación celular por citometría de flujo se utilizó el equipo FACSAria (BD BioSciences, USA)

### **3.11 Sobreexpresión e inhibición de RP11-400K9.4 en células MCF7.**

Para establecer sistemas que sobre o subexpresaran al lincRNA de interés, se transfectaron de manera estable e independiente dos shRNAs dirigidos contra el lincRNA y un GeneBlock correspondiente a la secuencia de este.

Los shRNAs para silenciar al lincRNA fueron diseñados con ayuda de los softwares, e-RNAi, Lncipedia, Ensembl, BLAST y la herramienta shRNA Clone Designer proporcionada por la casa comercial Clontech, así mismo se realizó siguiendo las pautas recomendadas en la literatura para obtener la mayor eficiencia posible en el silenciamiento. Posteriormente, procedimos a clonar los shRNAs dentro del vector pcDNA 3.1, como ya se especificó anteriormente y tomando como control un plásmido con un shRNA contra Luciferasa. Finalmente, esta inserción fue corroborada mediante la digestión de los plásmidos con la enzima de restricción *MluI* y corrimiento electroforético de las muestras en geles de agarosa al 1%.

En lo que respecta a la sobreexpresión de RP11-400K9.4, se optó por el uso de GeneBlocks, estos se refieren a versiones sintéticas de algún gen de interés manufacturados por la casa comercial Applied Biosystems; en nuestro caso se sintetizó el RNA largo RP11-400K9.4, el cual posteriormente se ligó en el vector pcDNA 3.1 con ayuda del kit In-Fusion HD Cloning (Takara) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se transfectó a células MCF7, como ya se indicó anteriormente.

Después de ser ligados, se realizó una triple digestión de los vectores generados, con las enzimas de restricción *EcoRV-NheI-EcoNI* con la finalidad de corroborar la inserción del lincRNA de interés y de igual manera, una vez digerido los plásmidos se realizó un corrimiento electroforético de las muestras en geles de agarosa al 2%

### **3.12 Ensayos de Proliferación celular.**

En placas adherentes de 96 pozos se colocaron 3000 células de los diferentes grupos de células MCF7 transfectadas (MCF7/Luc, MCF7/Geneblock, MCF7/shRNA1, MCF7/shRNA2) y se les agregaron 100 ml de medio DMEM suplementado con FBS al 5%.

A partir del inicio del experimento se evaluó la proliferación cada 12 horas por medio de un ensayo de MTT (Promega). Este ensayo consiste en la adición de sales de tetrazolio para su reducción a formazan, para esto se deja incubando durante 1 hora a las células con 15 ml del colorante de tetrazolio, posteriormente se agregan 100 ml de solución de solubilización para liberar el colorante reducido al medio de cultivo y poder leerlo en el espectrómetro Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector a una longitud de onda de 580 nm.

### **3.13 Ensayos de Migración *in vitro*.**

Al igual que en los ensayos de proliferación, se emplearon los mismos grupos de células MCF7 transfectadas, de los cuales se colocaron 30,000 células por inserto en placas Transwell (Corning), estas placas constan de 24 pozos con 12 insertos los cuales tienen una membrana con un tamaño de poro de 8 micras, el cual permite el paso de las células desde la parte superior de la membrana hacia la inferior, denotando así el fenómeno de migración celular. Para esto se colocaron a las células en presencia de medio suplementado con suero al 5% como quimioatrayente durante 24 horas, pasado el tiempo las membranas fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, posteriormente se lavaron nuevamente con PBS y se tiñeron durante 1 hora con cristal violeta al 1%, finalmente se lavaron con aguas destilada y se dejaron secar.

Una vez teñidas la membrana fueron fotografiadas y dichas imágenes analizadas con ayuda del programa ImageJ para contabilizar el número de células que migraron.

### **3.14 Microarreglos de expresión.**

Para determinar los patrones de expresión génica asociados a la expresión del RNA largo no codificante RP11-400k9.4, se transfectaron células MCF7 con un vector que expresa Luciferasa como control, o bien con la construcción de sobreexpresión (Geneblock) generados anteriormente. El RNA total se obtuvo después de tres semanas, una vez que las células expresaban de manera estable el gen de luciferasa o el lincRNA RP11-400k9.4. Posteriormente este RNA fue tratado con DNAsa (Promega) y analizada su integridad mediante el Bioanalizador 2100 (Agilent), utilizando aquellas muestras que mostraron un índice de integridad (RIN) mayor o igual a 9. De esta forma utilizamos 3 réplicas de cada grupo (Control=Luc y Sobreexpresión=GeneBlock RP11-400k9.4) en el arreglo Human Gene 2.0 (Affymetrix).

### **3.15 Análisis Bioinformático**

Tras obtener los datos de expresión de los genes alterados, la base general fue filtrada tomando en cuenta un umbral de  $\pm 3$  veces o superior, así como un valor de  $p \leq 0.05$ . Posteriormente se realizó el análisis de los genes restantes mediante la plataforma GSEA, así como las bases de genes “Hallmark” y “KEGG” obtenidos de la base de datos MSigDB [92] para identificar los procesos celulares afectados [93]. Así mismo, mediante el uso del programa REVIGO [94] se obtuvieron los datos acerca de los procesos biológicos afectados, como desarrollo de glándulas mamarias, apoptosis, daño a DNA por radiación ionizante, etc., mientras que las principales vías de señalización desreguladas se realizó

mediante su análisis con el programa KPA (Clarivate™), además del uso y análisis de las bases de datos BioPlanet 2019, NCI-Nature 2016 and WikiPathways 2019 Human con el software Enrichr [95,96].

### **3.16 Ensayo de viabilidad celular**

En placas adherentes de 96 pozos se colocaron 15,000 células de los diferentes grupos de células MCF7 y MDA-MB-438 transfectadas (Luc, Geneblock (GB400), shRNA1, shRNA2). Se les agregaron 100 ml de medio DMEM sin suplementar y se incubaron durante toda una noche a 37°C en una atmosfera al 5% CO<sub>2</sub>.

Posteriormente se les irradia con luz UV-C a una longitud de onda de 254nm durante 3 minutos, tras lo cual se les volvió a incubar en medio sin suero durante 24 horas. Transcurrido este tiempo la viabilidad celular se evaluó mediante la adición de sales de tetrazolio, tal como se mencionó anteriormente.

## **Capítulo IV.- Resultados.**

### **4.1 Selección de RNAs largos no codificantes intergénicos (LincRNAs) y Validación de RNA-Seq.**

A partir de los datos de la Secuenciación Masiva previamente reportados [72] se eligieron algunos RNAs largos no codificantes para validar los resultados de la secuenciación por medio de PCR en tiempo real. Para esta elección, primero seleccionamos a aquellos RNAs no codificantes que pertenecieran a la clase intergénica (lincRNA's) además de no presentaran isoformas. De esta forma se identificaron 14 lincRNA's desregulados en células que presentan sobreexpresión de *Ikkε* (Fig. 8A).

Posteriormente seleccionamos 3 de estos 14 lincRNAs, dos de ellos (RP11-757G1.6, RP11-400K9.4) debido al cambio en su expresión (fold change) y uno más seleccionado al azar (RP11-865I6.2). Una vez seleccionados los lincRNAs, se procedió a diseñar un par de oligonucleótidos para amplificar cada uno de ellos (Apéndice I), gracias a los cuales pudimos observar una sobreexpresión de 5.2, 3.6 y 1.5 (*p value* <0.0001) veces en los lincRNA's RP11-757G1.6, RP11-400K9.4 y RP11-865I6.2 respectivamente. Dichos valores fueron similares los obtenidos en la Secuenciación Masiva, por lo que pudimos corroborar que estos datos son válidos y no son producto de algún artefacto durante la Secuenciación (Fig. 8B y 8C).

Finalmente cabe mencionar que si bien el objetivo del presente trabajo fue el evaluar el efecto que conlleva el cambio en la expresión del lincRNA RP11-400K9.4, nos interesó también analizar al lincRNA RP11-757G1.6 debido a que fue el RNA con el mayor cambio en su expresión, sin embargo, al final no se continuo con su análisis ya que no fue posible realizar una transfección eficiente y estable.

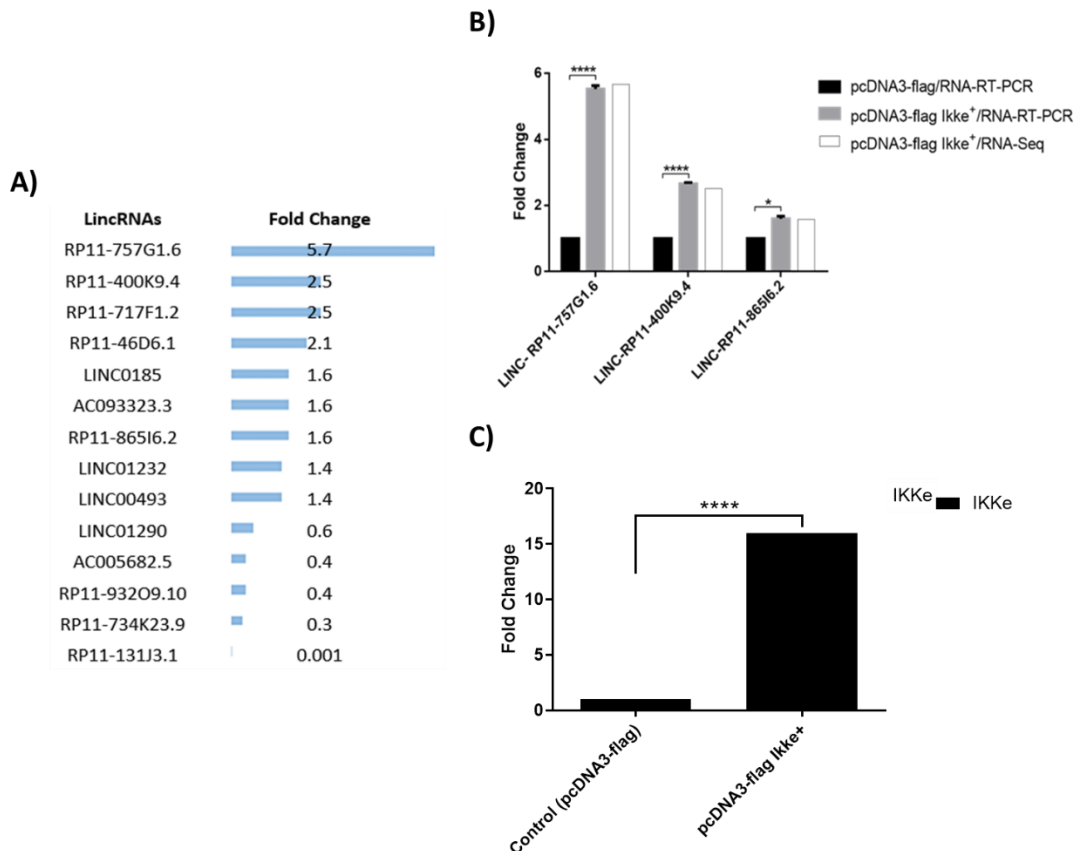


Fig. 8. LincRNAs con expresión alterada tras la modulación de Ikke y validación de datos de secuenciación masiva. A) RNA's largos no codificantes intergénicos que presentaron alteración en su expresión en células transfectadas transitoriamente con el vector pcDNA3-flag Ikke, reportados previamente [72]; B) Expresión relativa de los LincRNAs de interés obtenida por secuenciación masiva y PCR en tiempo real en células MCF7 transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA3-flag Ikke. C) Expresión relativa de IKKe en células MCF7, transfectadas transitoriamente con el plásmido pcDNA3-flag Ikke. Los datos mostrados corresponden a las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significancia se calculó mediante una t-Student: \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### 4.2 Localización subcelular de RP11-400K9.4

Con el objetivo de identificar la localización del LincRNA de interés, realizamos un fraccionamiento celular a partir del cual extrajimos proteínas y RNA de ambas fracciones. Con las proteínas realizamos dos corrimientos electroforéticos en geles de acrilamida desnaturalizantes al 10%, uno de ellos se tiñó con azul de Coomassie para evidenciar el patrón de proteínas, mientras que el otro se transfirió a una membrana PVDF sobre el cual

A/C. Observamos la presencia de Laminina A/C en La fracción nuclear, mientras que  $\alpha$ -Tubulina solo se observó en la fracción citoplasmática, lo que denota la pureza de las fracciones obtenidas (Fig. 9A).

Posteriormente, realizamos la retrotranscripción del RNA obtenido de las diferentes fracciones para obtener cDNA y utilizarlo posteriormente para evaluar la expresión de RP11-757G1.6, RP11-400K9.4 por medio de PCR en Tiempo Real y determinar su localización subcelular, observando una mayor expresión del RNA largo RP11-400K9.4 en la fracción citoplasmática (Fig. 9B). Dicho resultado se confirmó mediante la base IncATLAS, donde tomando como referencia a MALAT1 (lncRNA nuclear), se analizó la localización del RNA RP11-400k9.4, encontrándolo primordialmente en el citoplasma. Por tanto, podemos concluir que el predominio de este RNA largo es citoplasmático, dando así un posible indicio de su función, como molécula señuelo. (Fig. 9C).

#### **4.3 Expresión de RP11-400K9.4 en líneas celulares.**

Procedimos a realizar la evaluación de la expresión del RNA largo RP11-400K9.4 en un panel de 10 líneas celulares pertenecientes a los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama, esto con el objetivo de identificar la posible asociación de este RNA con un subtipo en particular. Sin embargo, tras realizar el análisis y a diferencia de otros RNAs que se caracterizan por ser particulares de un subtipo de cáncer particular como Triples negativos, en este caso no observamos este fenómeno ya que no está asociado al estatus hormonal de las células, tiempo de división o subtipo, aun así encontramos una correlación inversa entre la capacidad invasiva de las células y la expresión de RP11-400K9.4, es decir,



menor expresión del RNA largo en líneas como MDA-MB-361, HS578T y MDA-MB-231 a la vez que células como MDA-MB-453, T47D y MCF-7 presentan mayores niveles de RP11-400K9.4 (Fig. 9D).

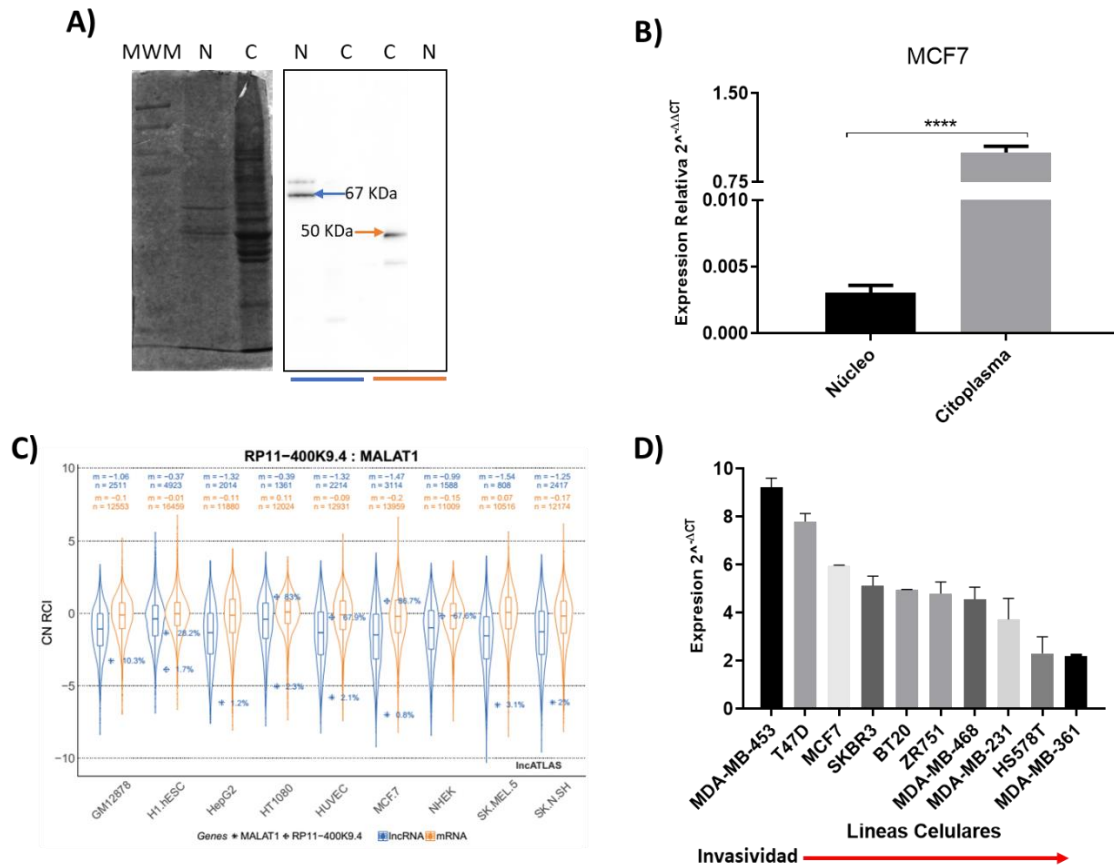


Fig. 9. Expresión del lincRNA RP11-400k9.4 en células de cáncer de mama y localización subcelular. A) Patrón de proteínas de las fracciones nucleares y citoplasmáticas teñidas con azul de comassie así como Western blot de las fracciones nucleares y citoplasmáticas contra laminina (67 kDa, azul) y  $\alpha$ -tubulina (50 kDa, anaranjado); B) Expresión relativa de RP11-400K9.4 en ambas fracciones mediante PCR tiempo real; C) Expresión relativa de RP11-400K9.4 en ambas fracciones reportada en la base lincATLAS; D) Expresión de RP11-400K9.4 obtenidos a partir de diez líneas celulares pertenecientes a distintos subtipos moleculares de cáncer de mama. MWM= Marcador de peso molecular, N= núcleo, C= citoplasma, CN RCI= Índice de Concentración Relativa calculada para Citoplasma y Núcleo. La normalización de los datos de expresión relativa se realizó tomando como referencia al gen SDHA. Los datos mostrados corresponden a las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significancia se calculó mediante una t-Student: \*\*\*\*p < 0.0001.

#### 4.4 Expresión de lincRNA RP11-400K9.4 en CSC's y esferoides mamarios.

Por otra parte, dados los antecedentes donde se señalan la importancia de Ikke y lincRNAs en la población de células troncales de cáncer de mama [72], así como al enriquecimiento de esta población en cultivos 3D como mamoesferas en comparación a cultivos en monocapa (2D) [97], decidimos realizar la medición de RP11-400K9.4 en células CD44+/CD24- (población troncal) provenientes de esferoides por agregación tras su cultivo por 20 días. Observamos una disminución en la expresión del lincRNA en población troncal en comparación con las células no troncales CD44-/CD24+ (Fig 10A). Mas aun, al comparar la expresión del RNA en cultivos en monocapa versus los esferoides antes mencionados, encontrando una mayor expresión en cultivos en 2D vs 3D (Fig. 10B).

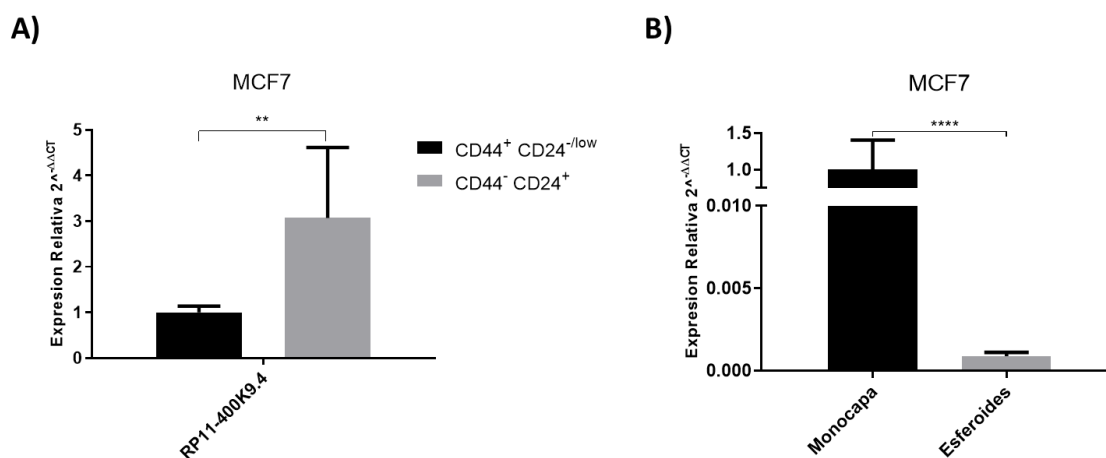


Fig. 10. Expresión del lincRNA RP11-400K9.4 en células CD44+/CD24- así como cultivos 2D y 3D de células MCF7. A) Expresión de RP11-400K9.4 en células troncales (CD44+/CD24-) y no troncales (CD44-/CD24+) cultivadas en monocapa; B) Expresión del lincRNA en cultivos monocapa vs esferoides. Los datos mostrados corresponden a las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significancia se calculó mediante una t-Student: CD44+/CD24- vs CD44-/CD24+ y Monocapa vs esferoides, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001.

#### 4.5 Análisis de la sub o sobreexpresión de RP11-400K9.4 en células de cáncer de mama.

Con la finalidad de crear células de dos subtipos diferentes que sub o sobreexpresaran el RNA largo RP11-400K9.4, diseñamos un par de shRNAs, así como una versión sintética del RNA (GB400). Tanto los shRNAs como el GB400, fueron ligados de manera eficiente en el plásmido de interés. Particularmente, para el ligamiento del GB400 en el vector, fue necesario agregar un par de secuencias adaptadoras complementarias al vector. Una vez ligado se confirmó la correcta incorporación del RNA al vector mediante una triple digestión. De esta forma obtuvimos transfecciones estables de células MCF7 y MDA-MB-468 que presentaran niveles bajos o altos del LincRNA RP11-400K9.4 con respecto a los niveles basales (Fig. 11A-D) permitiéndonos realizar ensayos de proliferación, migración y respuesta a daño por radiación ultravioleta.

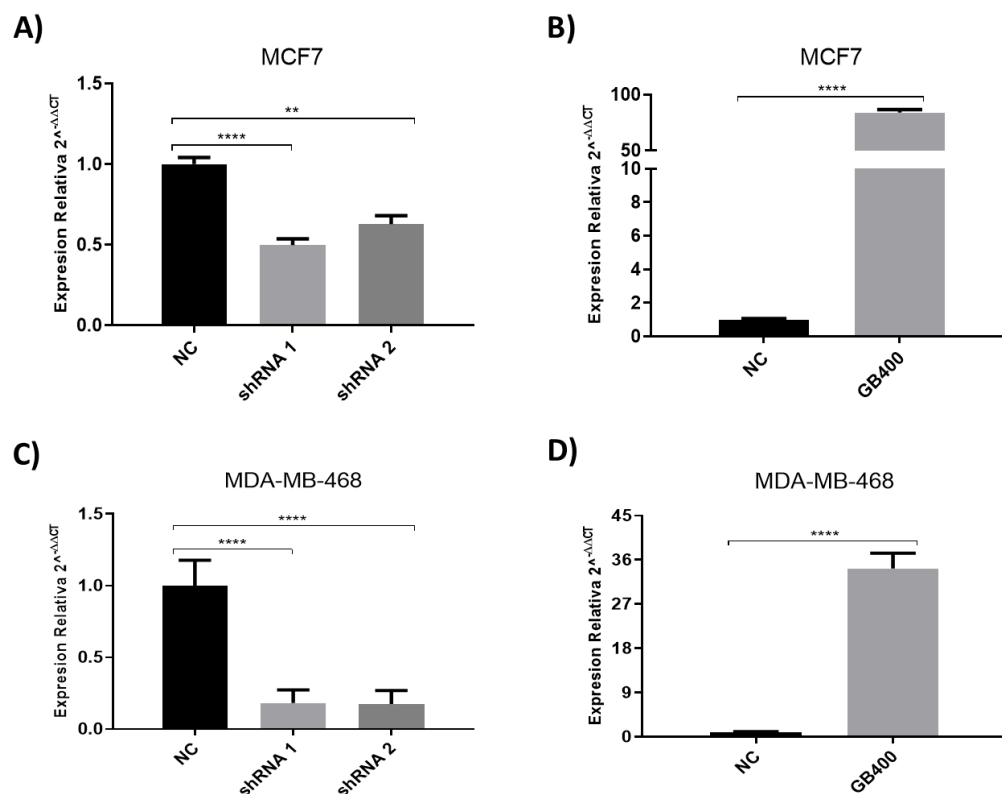


Fig. 11. Modulación de la expresión de RP11-400K9.4 en células MCF7 y MDA-MB-468. A y B) Sub y sobreexpresión de RP11-400K9.4 en células MCF7; C y D) Sub y sobreexpresión de RP11-400K9.4 en células MDA-MB-468. Los datos mostrados corresponden a las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. NC= Células control transfectadas con el vector vacío. La significancia se calculó mediante una t-Student, NC vs shRNA1/2 y NC vs GB400, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 4.6 Ensayos de migración *in vitro* en células de cáncer de mama.

Después de obtener las clonas descritas anteriormente sembramos 30,000 células en cada uno de los pocillos transwell permitiendo su paso de un lado a otro de la membrana usando SFB como atrayente durante 24 ó 48 hrs según correspondiera. Tras fijar y teñir las células de ambas líneas celulares, observamos una menor migración celular en los grupos transfectados con el vector que sobreexpresaba al RNA largo (GB400) y las células control que fueron transfectadas con el vector vacío (NC), en comparación con las células donde se inhibió la expresión del RNA (shRNA1 y shRNA2), donde se observó una mayor migración celular (Fig. 12A-D).

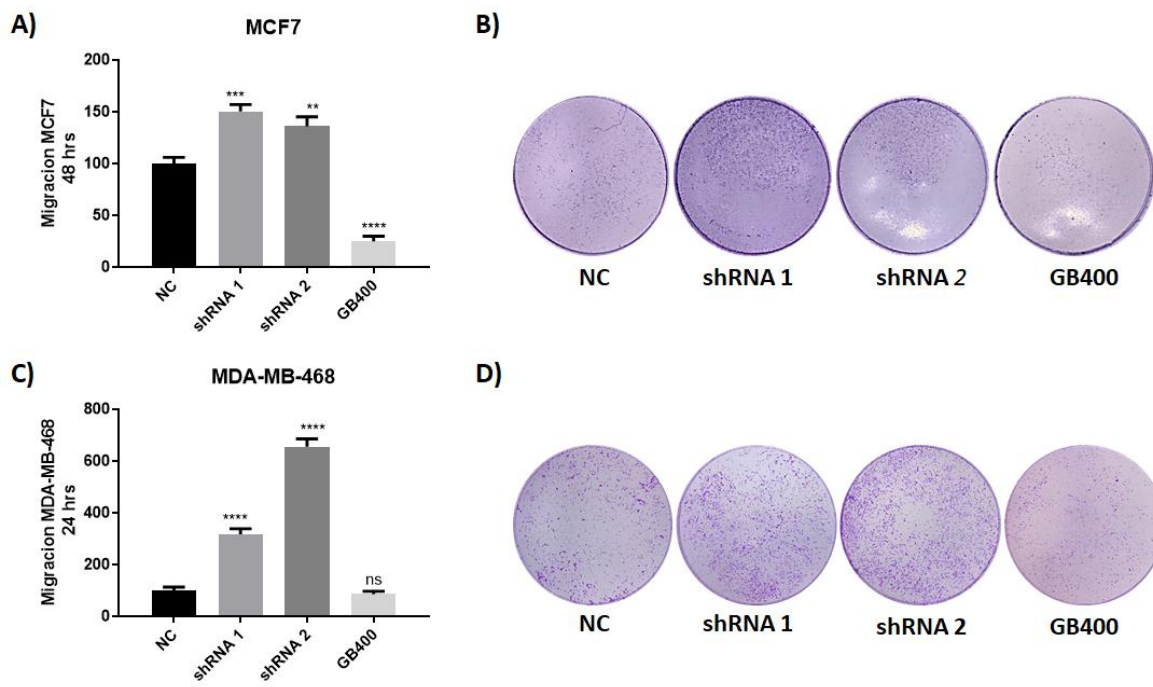


Fig. 12. Reducción en la migración de células MCF7 y MDA-MB-468 tras la sobreexpresión del lincRNA RP11-400K9.4. A) Cuantificación de migración MCF7; B) Membranas Transwell teñidas tras la migración de células MCF7; C) Cuantificación de migración MDA-MB-468; D) Membranas Transwell teñidas tras la migración de células MDA-MB-468. Los datos mostrados corresponden a las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significancia se calculó mediante una ANOVA: NC=Control, GB400= Geneblock RP11-400-K9.4; NC vs shRNA1/shRNA2/GB400, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns= no significativo.

#### 4.7 Análisis Bioinformático.

Tras observar el efecto *in vitro* que tiene la modulación del RNA largo intergénico RP11-400K9.4, decidimos analizar la expresión genética global a través de microarreglos con la finalidad de observar los genes que cambiaron su expresión como respuesta a la desregulación de nuestro lincRNA. Por tanto, usando tres muestras de RNA de células MCF7 transfectadas con el vector Luc como control (NC) y 3 muestras de RNA de células transfectadas con la vector GB400 encontramos 710 genes desregulados, de los cuales 398 presentaban una expresión al alza, mientras que 312 se encontraban subexpresados (Fig. 13A), dichos genes fueron tomados en cuenta gracias a un cambio en su expresión de  $\pm 3$  veces, así como un valor de  $p \leq 0.05$ . Posteriormente llevamos a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico mediante la herramienta Heatmapper [98], con la cual se generó un mapa de calor de los perfiles de expresión de cada condición.

De esta forma y usando los parámetros default a excepción del uso de  $\pm 3$  veces de cambio en la expresión, obtuvimos un mapa de calor o heatmap claramente agrupado donde se observaron 347 genes desregulados, 71 genes sobreexpresados y 276 genes subexpresados (Fig. 13B). Finalmente, para validar dichos datos elegimos al azar 15 genes para medir su expresión por PCR en tiempo Real, así, observamos que 12 genes (80%) presentaban una expresión similar a la señalada por medio de microarreglos (Fig. 13C y D), confirmando la reproducibilidad de los cambios de expresión obtenidos.

Una vez conocidos los genes desregulados realizamos un análisis para determinar las vías de señalización alteradas, para ello se emplearon los programas bioinformáticos GSEA, KPA, REVIGO y Enrichr. Tras ser filtrada la base mediante un cambio en la expresión de  $\pm 3$  o superior, así como un valor de  $p \leq 0.05$ , se realizó un análisis de GSEA con los parámetros default y considerando un valor de  $FDR < 0.25$  como estadísticamente significativo, usando los sets Hallmark y KEGG descargado de la base MsigDB (Fig. 14C). Posteriormente se llevó a cabo el análisis correspondiente usando los parámetros default de los softwares KPA, REVIGO y Enrichr [92,94–96].

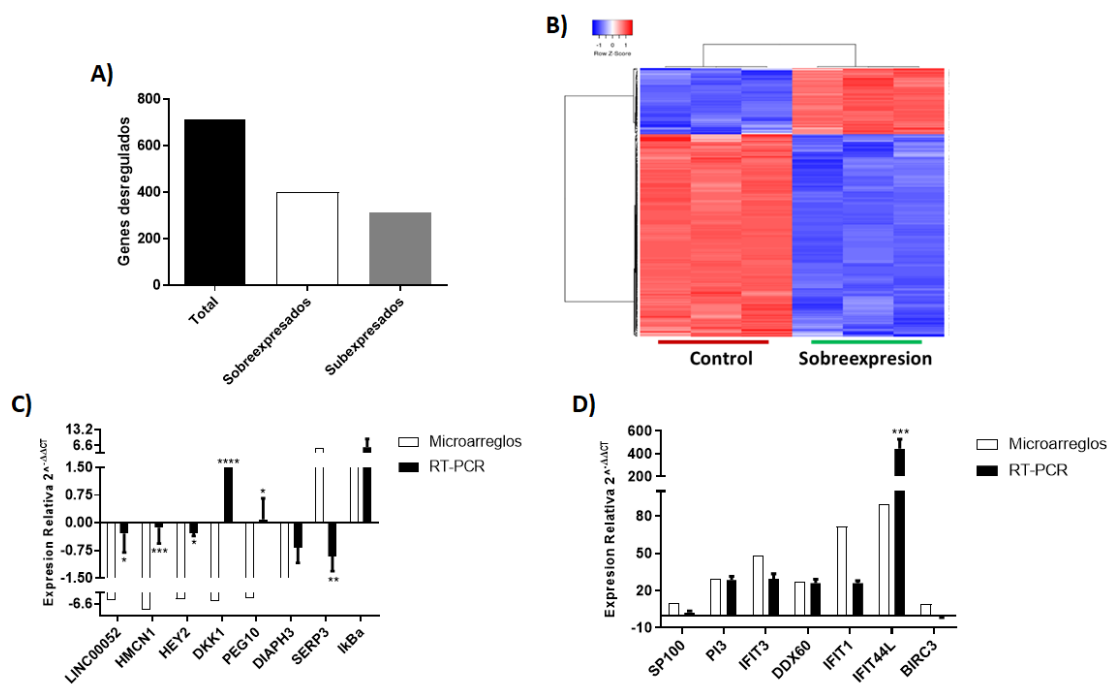


Fig. 13. Genes con expresión alterada tras la sobreexpresión de LincRNA en células MCF7. A) Número de genes desregulados, totales al alza y baja; B) Mapa de calor de los genes alterados con un cambio de expresión de  $\pm 3$  veces por la sobreexpresión de RP11-400K9.4; C y D) Validación de la expresión de 15 genes mediante PCR en tiempo real. Los datos de PCR corresponden a las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significancia se calculó mediante una ANOVA de dos vías: Microarreglos vs PCR en tiempo real, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Con estos análisis obtuvimos un gráfico donde se señalan los procesos biológicos alterados, como desarrollo de glándulas mamarias, apoptosis y daño a DNA mediante radiación ionizante entre otras (Fig. 14A), además las vías de señalización afectadas (Fig. 14B y C).

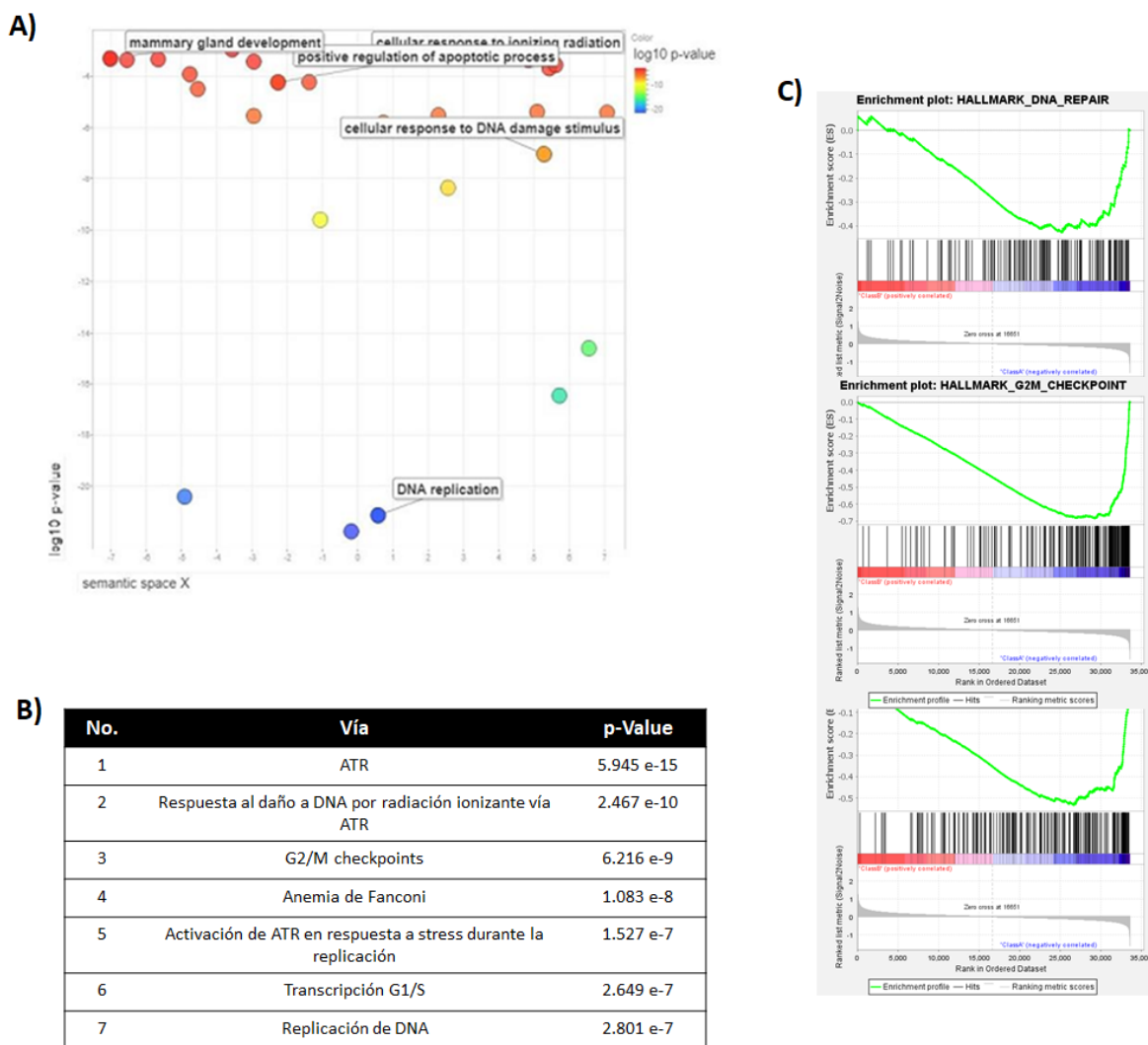


Fig. 14. Vías de señalización y procesos celulares alterados tras la sobreexpresión de RP11-400K9.4 en células MCF7. A y C) Principales procesos celulares afectados por la sobreexpresión de RP11-400K9.4 analizadas mediante los programas REVIGO y GSEA (Gene Set Enrichment Analysis); B) Principales vías alteradas obtenidas mediante su análisis por KPA y Enrichr.

#### 4.8 Ensayos *in vitro* de daño por radiación UV-C y proliferación.

El análisis bioinformático arrojó evidencia acerca de la desregulación de vías relacionadas con la reparación de daño a DNA inducido por radiación ultravioleta, particularmente la vía de ATR. Debido a esto realizamos ensayos de viabilidad, para los cuales tras sembrar células MCF7 y MDA-MB-468 estas fueron irradiadas con luz UV-C a una longitud de 254 nm durante 3 minutos, tiempo tras el cual fueron incubadas en medio privado de suero durante 24 horas. Posteriormente mediante un ensayo de degradación de sales de tetrazolio (MTT), medimos la absorbancia del medio, observando una menor viabilidad celular cuando el RNA largo era silenciado, a la vez que al sobreexpresarlo la viabilidad aumentaba con respecto al grupo control (Fig. 15A y B).

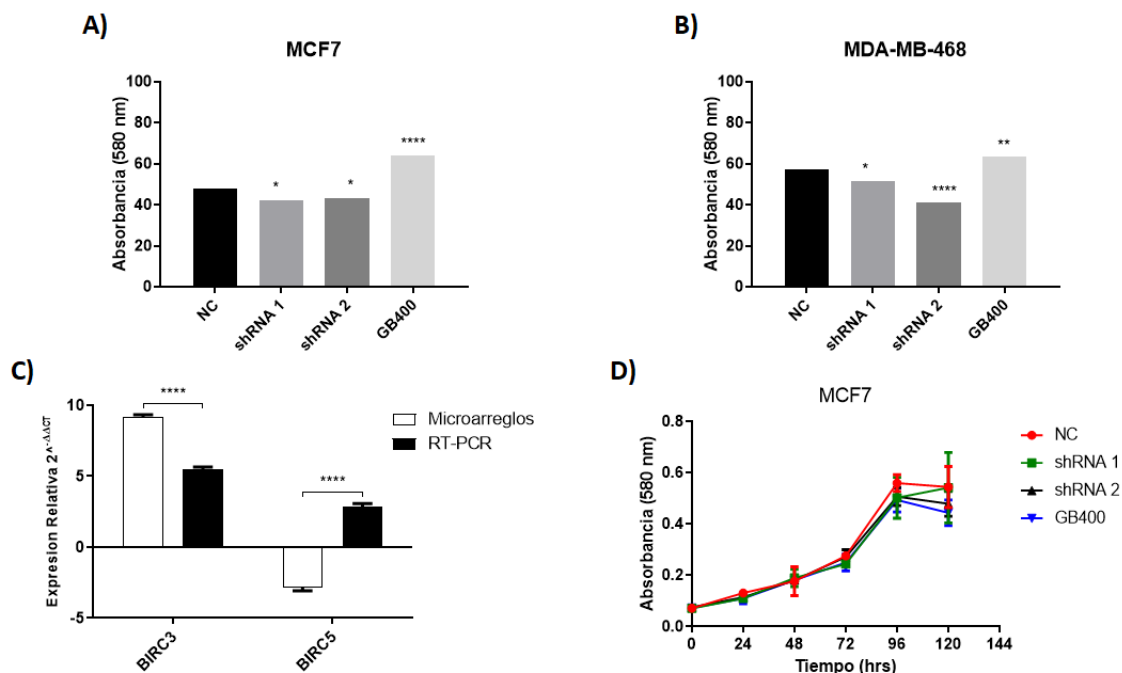


Fig. 15. El aumento en la expresión de lincRNA RP11-400k9.4 promueve la supervivencia de células MCF7 a la par de un nulo efecto en su proliferación. A y B) Supervivencia de células de CaMa que sobre y subexpresan al RNA RP11-400K9.4 irradiadas con luz UV-C. C) Expresión de BIRC3 y BIRC5 en células MCF7 que sobreexpresan RP11-400K9.4. D) Proliferación de células MCF7 transfectadas con los shRNAs o GB400. Los datos de PCR y proliferación corresponden a las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significancia se calculó mediante una ANOVA: NC vs shRNA1/shRNA2/GB400; Microarreglos vs PCR en tiempo real, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



Uno de los procesos desencadenados tras la radiación con UV-C es el proceso de apoptosis, del cual encontramos un par de proteínas participes, cIAP-2 (BIRC3) y Survivina (BIRC5). Tras medir los niveles de BIRC3 y BIRC5 mediante PCR en tiempo real (Fig. 15C), encontrando a ambas proteínas sobreexpresadas en células con sobreexpresión de RP11-400K9.4 reforzando el papel protector del RP11-400K9.4 a la inducción de muerte por radiación ionizante. Sin embargo, al medir la proliferación celular en los diferentes grupos celulares no observamos diferencias estadísticamente significativas (Fig. 15D).

## **Capítulo V.- Discusión.**

### **5.1 LincRNA RP11-400K9.4 en cáncer de mama.**

El cáncer de mama es la principal causa de muerte asociada a una neoplasia maligna a nivel mundial. Datos de nuestro país muestran un incremento anual en la incidencia del cáncer de mama, siendo de 35.2 mujeres por cada 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 17.2 defunciones por cada 100,000 mujeres en 2019 [6]. Por ende y como se mencionó anteriormente el estudio epigenético de este, y otros tipos de cáncer, ha cobrado gran relevancia durante las últimas décadas debido a la intervención de estos procesos en la expresión génica [99–101]. Particularmente se han evidenciado el efecto regulador de RNAs no codificantes en el desarrollo tumoral, lo que aunado a su estabilidad y detección en muestras biológicas (plasma sanguíneo, orina y saliva), señalan su potencial uso para el diagnóstico y tratamiento del cáncer [102–104].

Con esto en mente, se han tratado de identificar firmas de RNAs no codificantes largos y pequeños, con los cuales se puedan identificar los distintos subtipos moleculares del cáncer de mama [87,105–107]. Dentro de los RNAs largos no codificantes propuestos como marcadores del subtipo Her2 positivo, el RNA RP11-400K9.4 cobra relevancia no solo por su sobreexpresión en dichos tumores, sino también por su reciente identificación en células de cáncer de mama capaces de adquirir características propias de un fenotipo pluripotente, asociado a la subpoblación de CSC's [72]. En este trabajo observamos una expresión variable a través de diferentes líneas celulares tanto Erbb2 positivas como negativas, lo cual puede deberse a las diferencias del abordaje empleado en cada estudio. Sin embargo, observamos una correlación inversa entre el nivel de expresión y la capacidad invasiva de las células.

Así mismo, observamos que la población de células CD44+ CD24-/Low (CSC's) de la línea MCF7 expresó en menor medida el RNA RP11-400K9.4 con respecto a las células no troncales de esta línea. Una vez más la discrepancia de este dato con respecto a lo reportado por Orlova y colaboradores puede deberse a la medición de este RNA en células con una sobreexpresión transitoria de Ikke [72], ya que observamos el regreso de este RNA a niveles de expresión normales en una transfección estable, lo que indica un aumento en su expresión como resultado del estrés producido durante su manipulación [108,109]. Dicha inferencia se ve reforzada al observar una mayor expresión en células cultivadas en monocapa (2D), versus un cultivo tridimensional, como lo son los esferoides multicelulares, mismos que poseen una población de células troncales enriquecida [97,110]

Así mismo se ha observado un mayor potencial tumorigénico así como una mayor migración e invasividad en células CD44+ CD24-/Low [111]. Por tanto, dada la correlación inversa observada entre la expresión del RNA RP11-400K9.4 y la capacidad invasiva de las líneas analizadas, así como su baja expresión en cultivos en 3D, concluimos que dicho RNA no tiene un papel relevante en la biología de las CSC's. No obstante, sería interesante corroborar dichos resultados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* de invasión, así como el analizar la expresión del RNA largo en mamoesferas en comparación a los esferoides por agregación aquí analizados.

A la fecha se han reportado poco más de 107,000 transcritos de RNA largos no codificantes [112], los cuales pueden ser clasificados de acuerdo a su ubicación dentro de la célula (nuclear o citoplasmático), lo que determina la función del RNA en cuestión debido a la estrecha relación entre dicho lncRNA y su molécula blanco. De esta forma se han descrito ampliamente lncRNA nucleares debido a su importancia en la regulación del estado de la

cromatina, splicing y transcripción entre otros procesos, tal es el caso de RNAs como MALAT1, HOTAIR, PANDA, XIST, etc. [113,114].

En contraste, el estudio de RNA largos no codificantes situados en el citoplasma ha sido menor a pesar de la sugerencia de su mayor número en comparación con lncRNA nucleares [115,116]. Estos RNAs al igual que los de la fracción nuclear, interactúan con proteínas, material genético y otros RNAs no codificantes para llevar a cabo su función reguladora [117]. En este trabajo tras realizar un fraccionamiento celular de células MCF7, observamos una mayor expresión del lincRNA RP11-400k9.4 en la fracción citoplasmática versus la fracción nuclear, dicho resultado se vio corroborado mediante el análisis *in silico* del RNA en diferentes líneas celulares de origen diferente y tomando como referencia un RNA nuclear ampliamente descrito (MALAT1). De esta forma el siguiente paso es analizar a nivel de RNA mensajero y proteína, en células que presenten sub o sobreexpresión del ncRNA, la o las moléculas con las cuales interactúa RP11-400K9.4, esto mediante ensayos de precipitación (RIP-Chip-seq), PCR en tiempo real y Western-blot permitiendo identificar su función.

## **5.2 RP11-400K9.4 afecta la supervivencia celular y migración en células de cáncer de mama.**

Si bien tras su análisis, aparentemente el lincRNA RP11-400K9.4 no es relevante para la adquisición y mantenimiento de un estado pluripotente, propio de células troncales tumorales (CSC's), pudimos observar afectaciones en procesos importantes para la mantenimiento y propagación de células tumorales mamarias, tales como lo son resistencia a radiación ionizante y por ende la supervivencia de las células, así como su capacidad de

migrar. Dichos procesos fueron identificados mediante el análisis de datos de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) y sus correspondientes ensayos de pérdida y ganancia de función.

De esta forma encontramos una menor migración en células sobreexpresantes de RP11-400k9.4 respecto de las células con baja expresión. Además, encontramos una menor muerte celular inducida por radiación ionizante (UV-C) en células con mayores niveles de RP11-400K9.4. El proceso de diseminación o metástasis es sumamente complejo y permite a las células tumorales sufrir un proceso de desdiferenciación o transdiferenciación y adquirir la capacidad de desplazarse [118–120]. El principal mecanismo para llevar a cabo el proceso de diseminación es la Transición Epitelio Mesénquima o EMT (por sus siglas en inglés), mediante el cual las células epiteliales adquieren características de células mesenquimales, como: morfología asimétrica, mayor movilidad e invasividad, presencia de adhesiones focales, expresión de N-cadherina, vimentina y metaloproteasas entre otras, así como un rearrreglo en el tipo de fibras o microtúbulos presentes en el citoesqueleto [121–124].

Una vez que las células se desanclan de la membrana basal, estas pueden migrar ya sea de manera individual o colectiva con el objetivo de colonizar otros tejidos. Diferentes RNAs largos no codificantes se han asociado al proceso de migración celular y por ende metástasis, ya sea como oncogenes (ANCR, CCAT1, PART1, HIF1A-AS2) o bien como supresores de tumor (GAS5, NKILA y FENDRR) [125–131]. La disminución en la capacidad de migrar de las células tras la inhibición de la expresión del lincRNA RP11-400K9.4 sugiere un comportamiento tipo supresor de tumor, sin embargo, contrasta con el aumento en la supervivencia celular tras su radiación con luz UV-C.

Estos resultados aunados a la observación del incremento en la expresión de BIRC3 a la par de una disminución en la expresión de algunas cinasas de la vía de ATR y la interacción de ambas vías con proteínas de la vía NFkB, la cual ha sido ampliamente descrita en el proceso de tumorigenesis, incluyendo la resistencia por parte de las células a radiación ionizante (SINGH, XIA), nos hace pensar que el lincRNA RP11-400k9.4 efectúa su función reguladora a través la vía de NFkB. En este sentido se ha observado que diferentes células tumorales desarrollan resistencia a la radioterapia debido a la sobreexpresión de las proteínas ATR y ATM quienes inhiben diferentes cinasas (Cdc25A, Ciclina A/B/E y CDK1) cascada abajo, lo que promueve el arresto del ciclo celular y por ende promueve la supervivencia celular debido a la evasión de apoptosis y activación de la maquinaria de reparación de DNA, misma que es estimulada mediante radiación ionizante (BROWN, AL, WU). Así mismo, diferentes RNAs no codificantes, como GAS5, RP11 -670E13.6, Inc-GKN2-1:1, GAS6-AS1, LOC338799, etc., han sido implicados en la respuesta de células normales y tumorales al daño producido por la radiación UV [75,132–135], otorgando en el caso de células tumorales, resistencia ante tratamientos basados en radiación.

Por otra parte, se sabe que la expresión de BIRC3 así como otras APIs (proteínas inhibidoras de apoptosis) es regulada positivamente a través de la vía no canónica de NFkB [136], observando la evasión del proceso de apoptosis, lo que en conjunto con el proceso de arresto del ciclo celular inducido por la sobreexpresión de ATR podría explicar la supervivencia de las células irradiadas con luz UV-C, así como una disminución en la migración celular. Dicha hipótesis se ve reforzada gracias a lo reportado en otros trabajos donde se observan estos mismos efectos (arresto del ciclo celular y disminución de migración) después de tratar a diferentes tipos de células tumorales con fármacos como

gramicidina e icarina [137,138]. Así mismo se ha asociado el aumento de expresión de BIRC3 con la progresión de diferentes tipos tumorales como células sanguíneas, hepatocitos y células de tejido mamario [139–142]. Particularmente se ha observado una mayor resistencia a radiación ultravioleta en células de carcinoma de glándulas adrenales e hígado como resultado de la sobreexpresión de BIRC3 [143,144]

Dado lo anterior, hipotetizamos que el RNA RP11-400k9.4, ejerce un efecto oncogénico en células de cáncer de mama mediante su unión a proteínas cascada arriba de la vía de ATR/ATM (ATR, ATM, CHK1 o CHK2) o bien directamente mediante su interacción con proteínas citoplasmáticas de la vía no canónica de NFkB (IKKs, NEMO, TBK1 o TRAF3), induciendo por una parte el arresto del ciclo celular y reparación de las células dañadas, así como la expresión de BIRC3 y evasión del proceso apoptótico. Por tanto, a pesar de ser necesario realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* de tumorigenesis, así como ensayos de precipitación de RNA y medir las diferentes proteínas a las cuales este unido, para poder definir al lincRNA RP11-400k9.4 como un oncogén.

## **Capítulo VI. - Conclusiones y Perspectivas.**

A la fecha existen tres estudios donde se ha reportado la sobreexpresión del RNA largo no codificante intergénico RP11-400k9.4 en células tumorales mamarias, sin embargo, este trabajo representa el primer abordaje experimental acerca de la función de RP11-400k9.4 en células de cáncer de mama. Encontramos una mayor expresión del RNA en cultivos 2D vs 3D, a la par de una mayor proporción en la fracción citoplasmática con respecto al núcleo. Así mismo observamos una menor migración en células con sobreexpresión de RP11-400k9.4 a la par de una mayor resistencia al daño por radiación ionizante (UV.C), esto sin verse afectada la capacidad proliferativa de las células. Finalmente, mediante el análisis de datos de RNA-Seq pudimos encontrar la desregulación de la vía de ATR, así como de algunas proteínas (BIRC3) reguladas por la vía de NFkB, lo que podría señalar a la vía de NFkB como la mediadora del papel oncogénico del RNA RP11-400k9.4.

De acuerdo a los resultados aquí mostrados observamos una disminución en la migración de las células que sobre expresaban el RNA RP11-400k9.4. Dada la importancia de la migración e invasión celular en el proceso de metástasis, sería interesante corroborar dichos resultados mediante ensayos *in vivo* de migración e invasión con células que presenten sub o sobreexpresión del RNA largo.

Así mismo, mediante el análisis bioinformático de células con una expresión alterada del RNA RP11-400K9.4, encontramos diferentes moléculas de las vías de ATR y NF-kB, las cuales modificaban su expresión en respuesta a este cambio. Por ende, el siguiente paso a seguir consiste en la identificación de la interacción de estas proteínas con el lincRNA RP11-400k9.4. Para esto sería necesario realizar ensayos de precipitación de RNA y



secuenciación y consecuentemente la medición de dichas proteínas tanto a nivel de mensajero por PCR en tiempo real y a nivel de proteína por western blot. Finalmente, con esta información aunado a la obtenida mediante ensayos de ganancia y pérdida de función de estas proteínas en células con sub y sobreexpresión de RP11-400k9.4, podríamos definir la vía de acción del RNA largo y por ende su función.

## **Capítulo VII.- Literatura Citada.**

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. **2000**; 100(1):57–70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. **2011**; 144(5):646–674.
3. Barroso-Sousa R, Metzger-Filho O. Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications. *Ther Adv Med Oncol*. **2016**; 8(4):261–266.
4. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. **2015**; 8:23–31.
5. IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER [Internet]. 2020 [cited 2020 Dec 27]. Available from: <https://www.iarc.fr/>
6. Sala de prensa. Noticias [Internet]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI; 2020 [cited 2020 Dec 27]. Available from: <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=5996>
7. Secretaria de Salud. Cáncer en cifras [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 4]. Available from: <https://www.infocancer.org.mx/?c=investigacion&a=cancer-cifras>
8. Al-thoubaity FK. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Ann Med Surg*. **2019**; 49:44–48.
9. Aftimos P, Azim HA, Sotiriou C. Chapter 26 - Molecular Biology of Breast Cancer. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *Mol Pathol Second Ed* [Internet]. Academic Press; 2018 [cited 2021 Jan 4]. p. 569–588. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128027615000262>
10. Snoj N, Dinh P, Bedard P, Sotiriou C. Chapter 25 - Molecular Biology of Breast Cancer. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *Mol Pathol* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2009 [cited 2021 Jan 4]. p. 501–517. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744197000251>
11. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. Nature Publishing Group; **2013**; 10(9):494–506.
12. Li Z, Hu P, Tu J, Yu N. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget*. **2016**; 7(40):65024–65033.
13. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *The Oncologist*. **2018**; 23(5):556–565.
14. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*

- [Internet]. **2012** [cited 2021 Jan 4]; 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539433/>
15. Dean-Colomb W, Esteva FJ. Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. **2008**; 44(18):2806–2812.
  16. Aysola K, Desai A, Welch C, et al. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hered Genet Curr Res* [Internet]. **2013** [cited 2021 Jan 4]; 2013(Suppl 2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4181680/>
  17. Mehanna J, Haddad FG, Eid R, Lambertini M, Kourie HR. Triple-negative breast cancer: current perspective on the evolving therapeutic landscape. *Int J Womens Health*. **2019**; 11:431–437.
  18. Wong E. Breast cancer pathogenesis and histologic vs. molecular subtypes | *McMaster Pathophysiology Review* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jan 4]. Available from: <http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastcancer-copy/>
  19. Fulawka L, Donizy P, Halon A. Cancer stem cells - the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biol Res. Sociedad de Biología de Chile*; **2014**; 47:1–9.
  20. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol*. **2012**; 44(12):2144–2151.
  21. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*; **2017**; 23(10):1124–1134.
  22. Islam F, Gopalan V, Lam AK-Y. Chapter 6 - Cancer Stem Cells: Role in Tumor Progression and Treatment Resistance. In: Dammacco F, Silvestris F, editors. *Oncogenomics* [Internet]; 2019 [cited 2021 Jan 4]. p. 77–87. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128117859000065>
  23. Walcher L, Kistenmacher A-K, Suo H, et al. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* [Internet]. *Frontiers*; **2020** [cited 2021 Jan 4]; 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01280/full>
  24. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*. **2012**; 12(2):133–143.
  25. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*; **2008**; 8(10):755–768.
  26. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*. **2016**; 11:47–76.
  27. Kreso A, Dick JE. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*. **2014**; 14(3):275–291.

28. Song Y, Wang Y, Tong C, et al. A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. *Br J Cancer*. **2017**; 116(8):973–989.
29. Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (Baltimore)*. **2016**; 95(1 Suppl 1):S8–S19.
30. Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim Biophys Acta*. **2013**; 1830(2):2481–2495.
31. Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*. **2007**; 3(1):7–17.
32. Arkan MC, Greten FR. IKK- and NF- $\kappa$ B-mediated functions in carcinogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2011**; 349:159–169.
33. Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, et al. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer Res*. **2010**; 70(24):10464–10473.
34. Shostak K, Chariot A. NF- $\kappa$ B, stem cells and breast cancer: the links get stronger. *Breast Cancer Res BCR*. **2011**; 13(4):214.
35. Kaltschmidt C, Banz-Jansen C, Benhidjeb T, et al. A Role for NF- $\kappa$ B in Organ Specific Cancer and Cancer Stem Cells. *Cancers* [Internet]. **2019** [cited 2021 Jan 4]; 11(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6563002/>
36. Rinkenbaugh AL, Baldwin AS. The NF- $\kappa$ B Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells* [Internet]. **2016** [cited 2020 Dec 27]; 5(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931665/>
37. Péant B, Diallo J-S, Lessard L, et al. Regulation of IkappaB kinase epsilon expression by the androgen receptor and the nuclear factor-kappaB transcription factor in prostate cancer. *Mol Cancer Res MCR*. **2007**; 5(1):87–94.
38. Kravchenko VV, Mathison JC, Schwamborn K, Mercurio F, Ulevitch RJ. IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *J Biol Chem*. **2003**; 278(29):26612–26619.
39. Hsu S, Kim M, Hernandez L, et al. IKK- $\epsilon$  coordinates invasion and metastasis of ovarian cancer. *Cancer Res*. **2012**; 72(21):5494–5504.
40. Li Q, Sun H, Zou J, et al. Increased expression of estrogen receptor  $\alpha$ -36 by breast cancer oncogene IKK $\epsilon$  promotes growth of ER-negative breast cancer cells. *Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. **2013**; 31(6):833–841.
41. Qin B, Cheng K. Silencing of the IKK $\epsilon$  gene by siRNA inhibits invasiveness and growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res BCR*. **2010**; 12(5):R74.

42. Shen RR, Hahn WC. Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene*. **2011**; 30(6):631–641.
43. Vazquez-Santillan K, Melendez-Zajgla J, Jimenez-Hernandez L, Martínez-Ruiz G, Maldonado V. NF- $\kappa$ B signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cell Oncol Dordr*. **2015**; 38(5):327–339.
44. Xia L, Tan S, Zhou Y, et al. Role of the NF $\kappa$ B-signaling pathway in cancer. *OncoTargets Ther*. **2018**; 11:2063–2073.
45. Park MH, Hong JT. Roles of NF- $\kappa$ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells* [Internet]. **2016** [cited 2021 Jan 4]; 5(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931664/>
46. Debatin K-M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother CII*. **2004**; 53(3):153–159.
47. Jan R, Chaudhry G-S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. **2019**; 9(2):205–218.
48. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*. **1999**; 19(6):350–364.
49. Khan KH, Blanco-Codesido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol*. **2014**; 90(3):200–219.
50. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer*. **2017**; 8(9–10):682–694.
51. Zhang J, Webster JD, Dugger DL, et al. Ubiquitin Ligases cIAP1 and cIAP2 Limit Cell Death to Prevent Inflammation. *Cell Rep*. **2019**; 27(9):2679-2689.e3.
52. Silke J, Meier P. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins–Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. **2013** [cited 2021 Jan 4]; 5(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552501/>
53. Berthelet J, Dubrez L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells*. **2013**; 2(1):163–187.
54. Wang D, Berglund A, Kenchappa RS, Forsyth PA, Mulé JJ, Etame AB. BIRC3 is a novel driver of therapeutic resistance in Glioblastoma. *Sci Rep*. **2016**; 6:21710.
55. Rathore R, McCallum JE, Varghese E, Florea A-M, Büsselberg D. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*. **2017**; 22(7):898–919.
56. Rinn JL, Chang HY. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*. **2012**; 81(1):145–166.

57. Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell*. **2016**; 29(4):452–463.
58. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*. **2011**; 43(6):904–914.
59. Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol*; **2019**; 21(9):1060–1067.
60. Khandelwal A, Bacolla A, Vasquez KM, Jain A. Long non-coding RNA: A new paradigm for lung cancer. *Mol Carcinog*. **2015**; 54(11):1235–1251.
61. Kim DH, Marinov GK, Pepke S, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals dynamic changes in lncRNA expression during reprogramming. *Cell Stem Cell*. **2015**; 16(1):88–101.
62. Piao H-L, Ma L. Non-coding RNAs as regulators of mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **2012**; 17(1):33–42.
63. Geisler S, Collier J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2013**; 14(11):699–712.
64. Soudyab M, Iranpour M, Ghafouri-Fard S. The Role of Long Non-Coding RNAs in Breast Cancer. *Arch Iran Med*. **2016**; 19(7):508–517.
65. Zhang T, Hu H, Yan G, et al. Long Non-Coding RNA and Breast Cancer. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. **2019** [cited 2021 Jan 4]; 18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6466467/>
66. Castro-Oropeza R, Melendez-Zajgla J, Maldonado V, Vazquez-Santillan K. The emerging role of lncRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Cell Oncol Dordr*. **2018**; 41(6):585–603.
67. Zhou M, Hou Y, Yang G, et al. LncRNA-Hh Strengthen Cancer Stem Cells Generation in Twist-Positive Breast Cancer via Activation of Hedgehog Signaling Pathway. *Stem Cells Dayt Ohio*. **2016**; 34(1):55–66.
68. Wang J, Sun J, Yang F. The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer. *Oncol Lett*. **2020**; 19(1):7–16.
69. Mozdarani H, Ezzatizadeh V, Rahbar Parvaneh R. The emerging role of the long non-coding RNA HOTAIR in breast cancer development and treatment. *J Transl Med*. **2020**; 18(1):152.
70. Wang Y, Wu N, Luo X, Zhang X, Liao Q, Wang J. SOX2OT, a novel tumor-related long non-coding RNA. *Biomed Pharmacother*. **2020**; 123:109725.

71. Li H, Zhu L, Xu L, et al. Long noncoding RNA linc00617 exhibits oncogenic activity in breast cancer. *Mol Carcinog.* **2017**; 56(1):3–17.
72. Orlova Z, Pruefer F, Castro-Oropeza R, et al. IKK $\epsilon$  regulates the breast cancer stem cell phenotype. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* **2019**; 1866(4):598–611.
73. Favalaro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in disease. *Aging.* **2012**; 4(5):330–349.
74. Xu X, Lai Y, Hua Z-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep [Internet].* **2019** [cited 2021 Jan 4]; 39(BSR20180992). Available from: <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>
75. Rossi MN, Antonangeli F. LncRNAs: New Players in Apoptosis Control [Internet]. *Int. J. Cell Biol. Hindawi*; 2014 [cited 2021 Jan 4]. p. e473857. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2014/473857/>
76. Zhu B-Z, Lin L. Effects of lncRNA HOTAIR on proliferation and apoptosis of myeloma cells through NF- $\kappa$ B pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **2019**; 23(22):10042–10048.
77. Song L, Wang L, Pan X, Yang C. lncRNA OIP5-AS1 targets ROCK1 to promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis through a mechanism involving miR-143-3p in cervical cancer. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* **2020**; 53(1):e8883.
78. Guo W, Zhong K, Wei H, Nie C, Yuan Z. Long non-coding RNA SPRY4-IT1 promotes cell proliferation and invasion by regulation of Cdc20 in pancreatic cancer cells. *PLOS ONE. Public Library of Science*; **2018**; 13(2):e0193483.
79. Yang Q, Cui Z-L, Wang Q, et al. PlncRNA-1 induces apoptosis through the Her-2 pathway in prostate cancer cells. *Asian J Androl.* **2017**; 19(4):453–457.
80. Song W, Zhang J, Xia Q, Sun M. Down-regulated lncRNA TP73-AS1 reduces radioresistance in hepatocellular carcinoma via the PTEN/Akt signaling pathway. *Cell Cycle. Taylor & Francis*; **2019**; 18(22):3177–3188.
81. Cedro-Tanda A, Ríos-Romero M, Romero-Córdoba S, et al. A lncRNA landscape in breast cancer reveals a potential role for AC009283.1 in proliferation and apoptosis in HER2-enriched subtype. *Sci Rep*; **2020**; 10(1):13146.
82. Liang Y, Song X, Li Y, et al. LncRNA BCRT1 promotes breast cancer progression by targeting miR-1303/PTBP3 axis. *Mol Cancer.* **2020**; 19(1):85.
83. Almnaseer ZA, Mourtada-Maarabouni M. Long noncoding RNA MIAT regulates apoptosis and the apoptotic response to chemotherapeutic agents in breast cancer cell lines. *Biosci Rep.* **2018**; 38(4).

84. Tripathi R, Aier I, Chakraborty P, Varadwaj PK. Unravelling the role of long non-coding RNA - LINC01087 in breast cancer. *Non-Coding RNA Res.* **2020**; 5(1):1–10.
85. Liao X-H, Wang J-G, Li L-Y, et al. Long intergenic non-coding RNA APOC1P1-3 inhibits apoptosis by decreasing  $\alpha$ -tubulin acetylation in breast cancer. *Cell Death Dis.* **2016**; 7(5):e2236–e2236.
86. Zhou H, Sun L, Wan F. Molecular mechanisms of TUG1 in the proliferation, apoptosis, migration and invasion of cancer cells. *Oncol Lett.* **2019**; 18(5):4393–4402.
87. Mathias C, Zambalde EP, Rask P, Gradia DF, Oliveira JC de. Long non-coding RNAs differential expression in breast cancer subtypes: What do we know? *Clin Genet.* **2019**; 95(5):558–568.
88. Van Grembergen O, Bizet M, Bony EJ de, et al. Portraying breast cancers with long noncoding RNAs. *Sci Adv [Internet].* **2016** [cited 2020 Dec 26]; 2(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5010371/>
89. Su X, Malouf GG, Chen Y, et al. Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. *Oncotarget.* **2014**; 5(20):9864–9876.
90. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **1987**; 162(1):156–159.
91. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* **2001**; 25(4):402–408.
92. GSEA [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 4]. Available from: <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>
93. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**; 102(43):15545–15550.
94. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLOS ONE.* **2011**; 6(7):e21800.
95. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **2016**; 44(W1):W90–W97.
96. Clarivate Analytics [Internet]. Clarivate. 2020 [cited 2021 Jan 4]. Available from: <https://clarivate.com/>



97. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia N Y N*. **2015**; 17(1):1–15.
98. Babicki S, Arndt D, Marcu A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res*. **2016**; 44(W1):W147-153.
99. Kondo Y, Shinjo K, Katsushima K. Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers. *Cancer Sci*. **2017**; 108(10):1927–1933.
100. Begolli R, Sideris N, Giakountis A. LncRNAs as Chromatin Regulators in Cancer: From Molecular Function to Clinical Potential. *Cancers [Internet]*. **2019** [cited 2021 Jan 4]; 11(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6826483/>
101. Virani S, Virani S, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS. Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR J*. **2012**; 53(3–4):359–369.
102. Abolghasemi M, Tehrani SS, Yousefi T, et al. Critical roles of long noncoding RNAs in breast cancer. *J Cell Physiol*. **2020**; 235(6):5059–5071.
103. B A-R, Mr B-T, I C-G, Ma M-A, Rd Á-A. Relationship of lncRNA to Breast Cancer. *J Cancer Immunol [Internet]*. *ScientificArchives*; **2020** [cited 2021 Jan 4]; 2(1). Available from: #
104. Garcia L. lncRNAs in Hallmarks of Cancer and Clinical Applications | IntechOpen [Internet]. 2019 [cited 2021 Jan 4]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/non-coding-rnas/lncrnas-in-hallmarks-of-cancer-and-clinical-applications>
105. Li J, Wang W, Xia P, et al. Identification of a five-lncRNA signature for predicting the risk of tumor recurrence in patients with breast cancer. *Int J Cancer*. **2018**; 143(9):2150–2160.
106. Zhao E, Lan Y, Quan F, et al. Identification of a Six-lncRNA Signature With Prognostic Value for Breast Cancer Patients. *Front Genet [Internet]*. *Frontiers*; **2020** [cited 2020 Dec 21]; 11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00673/full>
107. Wang Z, Wang J, Liu L, He Q, Wei M. Development of a nine-lncRNA signature as a novel prognostic marker of estrogen receptor-negative breast cancer. *Oncol Lett. Spandidos Publications*; **2020**; 19(4):2979–2988.
108. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. **2010**; 397(8):3173–3178.
109. Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, et al. Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. *BMC Mol Biol*. **2011**; 12:27.

110. Pérez JCG, Castilla ME, Zajgla JM, Lagunas VM. Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas. *Rev Educ Bioquímica*. **2006**; 25(4):101–107.
111. Taurin S, Alkhalifa H. Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses. *Neoplasia N Y N*. **2020**; 22(12):663–678.
112. LNCipedia [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 4]. Available from: <https://lncipedia.org/>
113. Guh C-Y, Hsieh Y-H, Chu H-P. Functions and properties of nuclear lncRNAs—from systematically mapping the interactomes of lncRNAs. *J Biomed Sci*. **2020**; 27(1):44.
114. Sun Q, Hao Q, Prasanth KV. Nuclear long noncoding RNAs: key regulators of gene expression. *Trends Genet TIG*. **2018**; 34(2):142–157.
115. Noh JH, Kim KM, McClusky W, Abdelmohsen K, Gorospe M. Cytoplasmic functions of lncRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **2018**; 9(3):e1471.
116. Aillaud M, Schulte LN. Emerging Roles of Long Noncoding RNAs in the Cytoplasmic Milieu. *Non-Coding RNA. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; **2020**; 6(4):44.
117. Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2020**; :1–23.
118. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verh Dtsch Ges Pathol*. **2007**; 91:21–28.
119. Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer*. **2012**; 12(6):425–436.
120. Jha A. Tumor dedifferentiation: diagnostic and therapeutic implications. *J Pathol Nepal*. **2017**; 7(2):1202–1211.
121. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. **2006**; 66(17):8319–8326.
122. Charpentier M, Martin S. Interplay of Stem Cell Characteristics, EMT, and Microtentacles in Circulating Breast Tumor Cells. *Cancers*. **2013**; 5(4):1545–1565.
123. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. **2001**; 23(10):912–923.
124. Xu Q, Deng F, Qin Y, et al. Long non-coding RNA regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Cell Death Dis*. **2016**; 7(6):e2254.

125. Ma X, Zhou J, Liu J, et al. LncRNA ANCR promotes proliferation and radiation resistance of nasopharyngeal carcinoma by inhibiting PTEN expression. *OncoTargets Ther.* **2018**; 11:8399–8408.
126. Ji J, Dai X, Yeung S-CJ, He X. The role of long non-coding RNA GAS5 in cancers. *Cancer Manag Res.* **2019**; 11:2729–2737.
127. Wang Z, Xu R. 

lncRNA PART1 Promotes Breast Cancer Cell Progression by Directly Targeting miR-4516

 [Internet]. *Cancer Manag. Res.* Dove Press; 2020 [cited 2021 Jan 4]. p. 7753–7760. Available from: <https://www.dovepress.com/lncrna-part1-promotes-breast-cancer-cell-progression-by-directly-targeting-peer-reviewed-fulltext-article-CMAR>
128. Liu Z, Chen Q, Hann SS. The functions and oncogenic roles of CCAT1 in human cancer. *Biomed Pharmacother.* **2019**; 115:108943.
129. Liu B, Sun L, Liu Q, et al. A cytoplasmic NF- $\kappa$ B interacting long noncoding RNA blocks I $\kappa$ B phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Cell.* **2015**; 27(3):370–381.
130. Guo X, Lee S, Cao P. The inhibitive effect of sh-HIF1A-AS2 on the proliferation, invasion, and pathological damage of breast cancer via targeting miR-548c-3p through regulating HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in vitro and vivo. *OncoTargets Ther.* **2019**; 12:825–834.
131. Li Y, Zhang W, Liu P, et al. Long non-coding RNA FENDRR inhibits cell proliferation and is associated with good prognosis in breast cancer. *OncoTargets Ther.* **2018**; 11:1403–1412.
132. Xu D, Wang Y, Wang J, Qi F, Sun Y. The Potential Regulatory Roles of lncRNAs in DNA Damage Response in Human Lymphocytes Exposed to UVC Irradiation. *BioMed Res Int.* **2020**; 2020:8962635.
133. Zheng Y, Xu Q, Peng Y, et al. Expression Profiles of Long Noncoding RNA in UVA-Induced Human Skin Fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol.* **2017**; 30(6):315–323.
134. Miguel V, Lamas S, Espinosa-Diez C. Role of non-coding-RNAs in response to environmental stressors and consequences on human health. *Redox Biol.* **2020**; 37:101580.
135. Su M, Wang H, Wang W, et al. LncRNAs in DNA damage response and repair in cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin.* **2018**; 50(5):433–439.
136. Simon P, Sargent R, Rabson A. Inhibitor of apoptosis protein BIRC3 (API2, cIAP2, AIP1) is upregulated by the non-canonical NF $\kappa$ B pathway. *Cancer Res.* **2007**; 67(9 Supplement):5327–5327.

137. Wang P, Zhang J, Xiong X, et al. Icaritin suppresses cell cycle transition and cell migration in ovarian cancer cells. *Oncol Rep.* **2019**; 41(4):2321–2328.
138. Chen T, Wang Y, Yang Y, et al. Gramicidin inhibits human gastric cancer cell proliferation, cell cycle and induced apoptosis. *Biol Res [Internet]. Sociedad de Biología de Chile*; **2019** [cited 2020 Dec 23]; 52. Available from: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0716-97602019000100253&lng=es&nrm=iso&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0716-97602019000100253&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
139. Boehm JS, Zhao JJ, Yao J, et al. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell.* **2007**; 129(6):1065–1079.
140. Cao J, Qiu J, Wang X, et al. Identification of microRNA-124 in regulation of Hepatocellular carcinoma through BIRC3 and the NF- $\kappa$ B pathway. *J Cancer.* **2018**; 9(17):3006–3015.
141. Fu P-Y, Hu B, Ma X-L, et al. New insight into BIRC3: A novel prognostic indicator and a potential therapeutic target for liver cancer. *J Cell Biochem.* **2019**; 120(4):6035–6045.
142. Diop F, Moia R, Favini C, et al. Biological and clinical implications of BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* **2020**; 105(2):448–456.
143. A I, A B. Expression of TBX2 promotes anchorage-independent growth and survival in the p53-negative SW13 adrenocortical carcinoma. *Cancer Lett.* **2009**; 278(2):230–240.
144. Chopra M, Dharmarajan AM, Meiss G, Schrenk D. Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* **2009**; 111(1):49–63.

## Capítulo VIII.- Apéndices.

### Apéndice I

- a. Oligonucleótidos diseñados para el presente estudio. F= Oligonucleótido forward o sentido, R= Oligonucleótido reverse o antisentido.

Gen	Secuencia (5'- 3')
RP11-400k9.4	F.- TAC CAG TCA CTA TAC GCC GAT G R.- CCT CAC ATC TGC AAT CCA AG
RP11-757G1.6	F.- CCC CGT CTT TAT TGG ATC TG R.- TCG TTC TAA GCA CAC CTC TGT C
RP11-865I6.2	F.- GGG AGG AAG AAA TGC TAC ACA G R.- AAT CTG TGG AAC TGA CAA AGG C
LINC00052	F.- ACA TGC ACA CGA GCT TTC TG R.- GGA AGG TGC TGC TTT GAA TG
SDHA	F.- GGA CCT GGT TGT CTT TGG TC R.- CCA GCG TTT GGT TTA ATT GG
MMP13	F.- TAA GGA GCA TGG CGA CTT CT R.- GGT CCT TGG AGT GGT CAA GA
MMP1	F.- GAT GTG GAG TGC CTG ATG TG R.- CTG CTT GAC CCT CAG AGA CC
HMCN1	F.- TGT GCA ACA TTA GGC CTT GC R.- ACC TTT CCC ACA ACT TTC GC
DKK1	F.- TGC CTC AGG ATT GTG TTG TG R.- TGC TTG GTA CAC ACT TGA CC
HEY2	F.- ACA TTG CAC AAG GGA AGA CG

	R.- GCA GCC TAT TGC AAG ACT TCT G
IFI44L	F.- ATG GGC ACG TTA GGT TGT TG R.- TGG GTG AGT TTG CAC AAA GC
IFIT1	F.- GGA CAA GGT GGA GAA CAT TTG C R.- TTT TCA AAG CAG GCC TTG GC
IFIT3	F.- AAG GGC GAA GGT GTG TTT TG R.- TAC ATC GCA ATT GCC AGT CC
PI3	F.- TCA AAG GCC GTG TTC CAT TC R.- TGG ACC TTT GAC TGG CTC TTG
DDX60	F.- TGC CAA GTG GTG AAG TTC TC R.- TTC ACC CAG TTT TGG CGA TG
BIRC3	F.- TGG GAA TCT GGA GAT GAT CC R.- TGG GCT GTC TGA TGT GGA TA
BIRC5	F.- GTG TCT GTC AGC CCA ACC TT R.- CAC CCT GCA GCT CTA TGA CA
PEG10	F.- AAA TGG GCC GTT GTC TGT AG R.- CCA GAC TTT TGC TTG CAG TG
DIAPH3	F.- AAA TGG GGT CTG CAG ATG AG R.- CAA AGC TTT CCA CCC AAC TC
SERP3	F.- GCA AGT CAG TGC AGC ATT TG R.- TGA AAG GCA GGA TCT GTG TG
IκBα	F.- CTT GGG TGC TGA TGT CAA TG R.- ACA CCA GGT CAG GAT TTT GC
SP100	F.- GTG AGG TGT GCA ACA AAT GG R.- TGC AGA AGA TGC AAC TCC AC

- b. Secuencias del par de “short hairpins” diseñados para el silenciamiento del RNA largo no codificante RP11-400K9.4

Gen	Secuencia del shRNA (5' – 3')	Secuencia del siRNA (5' – 3')
RP11-400k9.4	<p><b>shRNA1</b></p> <p><b>F.-</b> GATCCGCAAGATGTTTCAGAGACTTT CAAGAGAAGTCTCTGAAACATCTTGCTTT TTACGCGTG</p> <p><b>R.-</b> AATTCACGCGTAAAAAAGCAAGATGTT TCAGAGACTTCTCTTGAAAGTCTCTGAAAC ATCTTGCG</p>	<p><b>siRNA1</b></p> <p>GCAAGATGTTTCAGA GACT</p> <p><b>siRNA2</b></p> <p>CGATCAACATACTCA GAAA</p>
	<p><b>shRNA2</b></p> <p><b>F.-</b> GATCCGCGATCAACATACTCAGAAATT CAAGAGATTTCTGAGTATGTTGATCGTTTT TTACGCGTG</p> <p><b>R.-</b> AATTCACGCGTAAAAAACGATCAACAT ACTCAGAAATCTCTTGAATTTCTGAGTATG TTGATCGCG</p>	

- c. Secuencia del Geneblock diseñada para la sobreexpresión del RNA largo no codificante RP11-400K9.4

TTAAACTTAAGCTTGAGAAATTCCTTCTCCCTATGTCCCAGCCTACCCCACTTTACCGA  
GGCCAACAGCCGCCTCAGAAACCAGATTCAGGAGCTAACATGCCCCAGGTCTCACGAG  
GATCAGAGACTCCAGAGGCCAGGGAAGGAGATCAAGGTAGTCAAGCGGGGGTTCGTCT  
CAGATCTGGTTGTGCTCGAGCTATGCAAATGCCTCTCACGGAGATGCGAGGACCTATCT  
ATTATGATGACCAGGGCCACATCCGGAGGGGGCAACAGACTTTCATCTATCAGCCCTTT  
TCAACCACTGATCTACTAAACTGGAAACACTCTGAACCCTGCCATCTTGCTCCTGGTAT  
CAGAGAGCCCTGTCGTGCATAACTGTGTAGAAGTGTTGGACTCGGTTTACTCCAGCAG  
ACCTGATCTCCGGGACCAGCCTTGGGCATCAGTAGACTGGAAGCTATATGTGGACAGG  
AGCAGCTTCATCAACCCACAAGGAGAGAGATGTGCGGGATATGTGGTGAACCTGGA  
CACTGTCGTTGAAGCCAGATCGTTGCTCCAAGGCACTTCAGCCCAGAAAGATGAGCTC  
ATTGCTTTAATTTGGGCCTTAGAACTCAGTTAAGGCCTTCTACGGTCCCAGGCTTTCTGC  
TGCATACTGAAGGGCCACGAAGTACAGTCATCTGGACTTGGCACCTGGAATACAAG  
GATGGAAAGCATCATTTCTGCCAGCTTCTTATGGTCCTGAGGCGAGACAGTCATGAGA  
GAGGAAAAGTCAATGACTTCTGACCACTGCCAGCCTCGCTTCCTGCATTTTCTTCTTC

GGCTTACTCTTGCCAAGTTGGAGTTGCCTAACTTCCAAGAGGGTATTTGCTCTTTTTTTT  
TTCTCACTCCACAACTCTTCCCAGGTAGTTCAGTCCACTCCCATCTACCAGTCACTATA  
CGCCGATGAATGCCAATATTATTATTTCCAGCTTAGACATTGTTCTTGGATTGCAGATG  
TGAGGTTTGACTTGTTTACTAGACATTGCTGGCTGAGGATCCCTAGCATAACATGGCCC  
AAATTC AATTTATTTCCAAAGCTGTCTCATCTCCTTTGTTCTCTGTAATGATGTTGCTAT  
CCATTCGATCAACATACTCAGAAATATCACCCCTCCTTCTTCTTCCAAGATAAGTGA  
GTTGCTCACGACATGATCATGTTTTGGCAGTGTACTCTGTCCATTCCCATCACTTAGTAA  
GAATCATCTAGGTTATGCTGAAGTATGAAGTTAATCTCCAAATTTCTCTGGCTCAGTAC  
AGAAAAAGTCCATTTCTCCCTTCTGCAATGCACCCAATGCAGGTCTGCAGGGTCTCTGC  
TGTGCGTTGTCCCTCAGGGACTCAGGCTGAAGAGGCCCTTGTCTTATCTGGCCACCT  
CCTCTGCACATGGCTCAGGATTTTCCAGGCAAGGGGTTGAGCAGAGGCTTTTTCAGTGCT  
GGGCCTGGATGTGACATAAGATGCTTCTGCTCACAGCCTTGTGGTCAGAACAAGTCAC  
ATCATCCCTCCTACTTGCAGGGGTGCTGGGCAGCGTAGTCATCCACAGATCAGGAGAG  
GGAGCAGAGGCAGGTGTTCCCGGGCTGCAGCGATCTCCACTGCACTGCTGTGGGCTGA  
ACTGTGCCCTCCACCCACCAAGCTTATATGCTGCCAGCCTCACCTCCACACCTTAGA  
ATGTGGCTGTATCTCGACATAGGGTCCTTACAGAGGTAGTTAAGTTAAAGCAGGGTCA  
TTAGGGTGGGCCCTAAGGTACTCTGACTGGTGTTTTTATGAGAAGAGGAGATTAGGAC  
TTACAGGGAGAGACTAGGTATGTGAGCACACAGAGAAAAGACCATGTGAAGACGA  
GAAGAAGGCAACTGTCTCCAATCCAGACGGAGATGCCAGGCACAGCCCTTCTGTCACA  
ACCCTCAGAAGGAACCAACCCTGCCGACACCTTGGCCTTGTACTTCTGGCCTCCAGAAC  
CGCAGGAAAGTACATTTCTGTTGCTTAGGCCGCTCAGCCTGTGGCACTTTGTTACAGCT  
TCTCACCCAGTTCAGGCCCTTTTAATTGATTGCTGGGCCTTTGCAGTTGTTTTTGCTTCT  
AATATATTCATCTCTCAATTTATTTCTGGAGGCTGCCACCCGAGGGGCAGAACTTCAAT  
TGTGTCCCTAATGGGAAACCTTGTGAGTATCTGGTACAGCACAAGGTTGCTAAA  
GCATCTTCTGCCAGAATTCTGTGAGTATCTGGTTAGGTGGGTCTGGAATATACTGAGTT  
TAAAAAAGTTAAATAGGTTTCTTTACTGCAAGATGTTTCAGAGACTTTAATATGCTACT  
CTGCTGTATGAATCTCCAGGCAGGAAATCTTATAAAATGTGTTTCTGAAATGCGAGCTC  
GGATCCAC



## Apéndice II

### a. Artículo generado

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 17: 769-779 (2020)  
doi:10.21873/cgp.20231

## lincRNA-RP11400K9.4 Regulates Cell Survival and Migration of Breast Cancer Cells

MIGUEL A. FERNÁNDEZ-ROJAS<sup>1</sup>, JORGE MELENDEZ-ZAJGLA<sup>2</sup> and VILMA MALDONADO LAGUNAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Epigenetics Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México City, México;

<sup>2</sup>Functional Genomics Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México City, México

**Abstract.** *Background/Aim:* Several works in the past decades pointed out the key role of long intergenic non-coding RNA (lincRNA) in breast cancer development. Here in we report for first time the importance of deregulation of lincRNA RP11-400K9.4 in breast cancer cells which played a role in cell survival and migration. *Materials and Methods:* After RP11-400K9.4 silencing by short hairpin RNAs or overexpression by GeneBlocks, real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR), microarray, migration, proliferation and viability assay were performed. *Results:* RP11-400K9.4 expression was mainly in the cytoplasmic fraction in 2D culture. Overexpression of RP11-400K9.4 led to a reduction of migration by MCF-7 and MDA-MB-368 cells and an increase in cellular survival after UV-C radiation. Bioinformatic analyses highlighted irradiation-induced DNA damage, DNA repair and cell-cycle pathways as the mainly affected by RP11-400K9.4. Furthermore RT-PCR assay demonstrated the overexpression of baculoviral IAP repeat containing 3 (BIRC3) a known oncogene that promotes radiotherapy resistance through the nuclear factor kappa B (NFκB) pathway. *Conclusion:* RP11-400K9.4 participates in the modulation of migration and survival processes probably via the BIRC3/NFκB pathway.

Breast cancer is a worldwide health problem, representing the most common life-threatening malignant neoplasm in women and the second cause of death associated with cancer (1). In the case of Mexico, breast cancer is also the most common type in women, and its mortality has been increasing in recent years; this tendency is expected to continue in the coming years (2).

This article is freely accessible online.

*Correspondence to:* Vilma Maldonado, Ph.D., Epigenetics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, México City, México. Tel: +52 5553501900, e-mail: vmaldonado@inmegen.gob.mx

*Key Words:* Breast cancer, lincRNA-RP11400K9.4, cell survival, migration, BIRC3.

The cancer cell phenotype is a dynamic state in which cells modify distinctive and complementary capabilities such as proliferation, evasion of cell growth signals, sensitivity to death via different external and internal stimuli, migration and invasion (3).

Resistance to death constitutes a genuine hallmark of cancer and is a major obstacle in the treatment of cancer. The sensitivity of a cell to death from external and internal stimuli depends on specific molecules and transduction pathways regulated at the translational and post-translational levels. The inhibitors of apoptosis (IAP) are a family of functionally and structurally related proteins that serve as endogenous inhibitors of programmed cell death and play a very important role in cancer cells obtaining resistance to death (4). A common feature of IAPs is the presence of a baculovirus IAP repeat (BIR), a 70 amino acid domain, in one to three copies which function mainly by mediating protein-protein interactions (5). This family comprises BIRC1 (NAIP), BIRC2 (cIAP1), BIRC3 (cIAP2), BIRC4 (xIAP), BIRC5 (survivin) and BIRC6.

BIRC3 can directly bind to caspases 3, 7, and 9 to inhibit their activation (6). This protein has also been implicated in the activation of several signal transduction pathways associated with malignancy (7). BIRC3 was found to be up-regulated in breast cancer cells stimulated with interleukin-1β, and this change is associated with resistance to doxorubicin, whereas silencing of BIRC3 reduced the viability of cells after exposure to the drug (8). BIRC3 plays also an important role in regulating the nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathway, which is involved in the development of cancer (9). Recently, it was shown that this protein can be associated with non-coding RNAs: binding of *miR-124* to BIRC3 inhibited the proliferation and migration of in human hepatocellular carcinoma (10). Interestingly, in 2019, Jiang *et al.* reported that the long non-coding RNA lincRNA-HCP5 promoted triple-negative breast cancer progression, regulating BIRC3 by binding to *miR-219a-5p* (11).

After the discovery of lincRNA in eukaryotic cells in 1986, work has shown their importance as genetic and epigenetic regulators in tumor cells and therefore in the acquisition of

hallmarks or emergent neoplastic characteristics (12, 13). Various studies have shown a role of lincRNA in the regulation of migration and death resistance, such as CCND1-upstream intergenic DNA repair 1 (CUPPID1) and 2, nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (NEAT1), and DNA damage-sensitive RNA1 (DDSR1) (14-17). Recently, long intergenic non-coding RNA (lincRNA) RP11400k9.4 was pointed out as a possible marker for triple-negative breast cancer (18-20). In addition, we found that this lincRNA is associated with deregulation of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon (IKK $\epsilon$ ) kinase and the stem cell phenotype in breast cancer (21). In this study, we aimed to elucidate the role of this lincRNA in breast cancer cells.

## Materials and Methods

**Cell culture.** Cells lines MCF-7, T47D, ZR751, MDA-MB-361, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, SKBR3, HS578T and BT-20 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and maintained at 37°C with 5% of CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Eagle's minimum essential medium (EMEM) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium with fetal bovine serum (FBS) at 5-15%, according to recommendations from the ATCC.

**Cellular transfection.** To generate cell lines that stably overexpress lincRNA RP11-400k9.4, MCF-7 and MDA-MB-468 cells were transfected with 7.5 ml of lipofectamine and 3  $\mu$ g of the pcDNA3.1 vector containing the complete cDNA of the lincRNA GB400 (GeneBlock for RP11-400k9.4) (gBlocks<sup>®</sup> Gene fragments, IDT, Newark, NJ, USA). As transfection control, we used the same vector with a Luciferase insert. These cells were selected with 600 and 800  $\mu$ g/ml of 418 Geneticin (Thermo Fisher Scientific, CDMX, México) respectively. For the loss-of-function experiments, two short hairpin RNAs (shRNAs) were designated with the software RNAi Tool (Clontech, Takara, CA, USA). The oligonucleotides with the sequence of shRNA or a Luciferase sequence were inserted in the pSiren RQ vector (Clontech) and 3  $\mu$ g of vector and 7.5 ml lipofectamine were used for the transfection. Cells were selected with 400 ng/ml puromycin (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA).

**Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).** Trizol reagent was employed for total RNA isolation of transfected cells. 1  $\mu$ g of RNA previously treated with DNase was used for retrotranscription with High Capacity cDNA Reversion Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Franklin Lakes, MA, USA). cDNA (50 ng) was mixed with 7  $\mu$ l of Sybr Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and 0.24 mM of each primer Supplementary Table I (<https://www.dropbox.com/sh/z82pwriyvwjw7i/AADPvyeuQTLKPi xFjuyvSG0ba/Supplementary%20table%20I.docx?dl=0>), and the assays were performed using a QuantStudio 7 Flex Real Time PCR system. Data were analyzed with QuantStudio Real-Time PCR software (Thermo Fisher Scientific, Franklin Lakes, MA, USA) according to the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method (22).

**Cellular fractionation.** Nuclear and cytoplasmic fractions of MCF-7 cells were obtained with PARIS kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer instructions. Total RNA and protein

from both fractions were extracted. The purity of the fractions was corroborated with RNA electrophoresis. The protein fraction was separated with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane. Finally, the membrane was incubated with antibodies toward tubulin and A/C lamin (ab15246, ab224816; Abcam, Cambridge, UK) for cytoplasmic and nuclear fractions, respectively.

**Extraction of total RNA.** MCF-7 and MDA-MB-468 cells were lysed with 1 ml Trizol reagent, 200  $\mu$ l chloroform was added and was then vortexed, after centrifuging at 8000  $\times$  g for 12 min. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and was mixed with 0.5 ml isopropyl alcohol and then the bottom was recuperated by centrifugation at 10,000  $\times$  g for 10 min and dissolved with 40  $\mu$ l of water.

**RNA microarray and pathway analysis.** The quality of total RNA was evaluated using an Agilent RNA Bioanalyzer and only RNA of samples with RNA integrity number (RIN) of 9 or higher were used. Three independent samples of MCF7 cells overexpressing lincRNA RP11-400k9.4 and three of cells transfected with control luciferase were treated with DNase and hybridized to Affymetrix Gen 2.0 Human Gene slides (Thermo Fisher Scientific) on INMEGEN Microarray Department. Analysis was performed with the Transcriptome Analysis console (Affymetrix/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Only genes with a fold change threshold of  $\pm 3$  or higher and  $p \leq 0.05$  were considered for analysis with Key Pathway Advisor software (KPA; Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA), METACORE<sup>™</sup> (Philadelphia, PA, USA). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; <http://www.broadinstitute.org/gsea>) was performed by applying Hallmark and KEGG gene sets downloaded from MSigDB database. We used default settings and considered a false discovery rate of  $< 0.25$  as statistically significant (23). Likewise, REVIGO (24) (<http://revigo.irb.hr/>) and Enrichr (25) (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) analyses were performed with default settings (medium similarity=0.7 and calculated  $p$ -value for Gene Ontology predicted pathways). This allowed us to obtain a scatterplot of affected biological processes such as mammary gland development, apoptosis, irradiation-induced DNA damage, by REVIGO and a table of main deregulated signaling pathways such as ATR by combining the BioPlanet 2019, NCI-Nature 2016 and WikiPathways 2019 Human databases using Enrichr software.

**Multicellular spheroid formation.** A total of 2 $\times$ 10<sup>6</sup> MCF-7 cells were cultivated in non-adherent plates with Leibovitz's L-15 media and incubated with 60 rpm orbital agitation at 37°C. Spheroids were counted and measured at 21 days and finally disaggregated with trypsin. Total RNA was isolated as described above.

**Migration assay.** MCF-7 and MDA-MB-368 cells were seeded at 3 $\times$ 10<sup>5</sup> on inserts of transwell plates (Corning, NY, USA) without fetal bovine serum (FBS) overnight. The medium was replaced by fresh medium after 12 hours and medium with 10% FBS was placed on the bottom wells. After 24 hours, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Gentian violet at 10%. Finally, the insert membranes were allowed to dry and the cells that had migrated across the membrane were counted with a stereoscopic microscope and analyzed using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

**Proliferation assay.** MCF-7 cells were seeded 3 $\times$ 10<sup>3</sup> on each well of a 96-well plate (Corning). DMEM with 5% FBS was added and the cells maintained at standard temperature and CO<sub>2</sub> conditions.



Table 1. Top 10 deregulated RNAs after forced overexpression of lincRNA-RP11400K9.4 in MCF-7 cells.

ID	Gene	Fold change
IFI44L	Interferon induced protein 44-like	89
IFIT1	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	71
OAS2	2'-5'-Oligoadenylate synthetase 2	62
IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	48
IFI44	Interferon induced protein 44	47
HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	43
CP	Ceruloplasmin	33
PI3	Peptidase inhibitor 3	30
DDX60	DEXD/H-box helicase 60	27
CASP14	Caspase 14	26
HMCN1	Hemicentin 1	-8
HIST1H1B	H1.5 Linker histone, cluster member	-6
LINC00052	Long intergenic non-protein coding RNA 52	-6
DKK1	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	-6
HEY2	Hes-related family BHLH transcription factor with YRPW motif 2	-5
HIST1H2BM	H2B Clustered histone 14	-5
PEG10	Paternally expressed 10	-5
MCM10	Minichromosome maintenance 10 replication initiation factor	-5
FAM111B	Family with sequence similarity 111 member B	-5
SCIN	Scinderin	-4

The cells were then exposed to 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent (Promega, Madison, WI, USA) for 30 minutes in the dark and the dye solubilized for 1 hour. The dye concentration was measured at 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours using a Beckman DTX 880 spectrophotometer (Beckman, Indianapolis, IN, USA) at a wavelength of 595 nm.

**Viability assay.** MCF-7 cells transfected with Luc, shRNA1, shRNA2 and GB400 were irradiated with UV light at 254 nm for 3 minutes before seeding at  $1.5 \times 10^4$ /well in three wells of a 96-well plate (Corning). After 24 h, the cells were stained with MTT (Promega) reagent and absorbance at 595 nm measured.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed with Graph Pad Prism 6 software (San Diego, CA, USA). We considered a minimum *p*-value of 0.05 and used one- and two-tailed ANOVA test and Student *t*-test to determine significant differences between groups.

## Results

**LincRNA-RP11400k9.4 general features.** lincRNA-RP11400k9.4 (ENSG00000237807 (RP11-400K9.4), ENST00 000426023.1 (RP11-400K9.4-001), lncOPRK1-3:12) is a long non-coding RNA of 2387 base pairs, intergenic, with two exons (Exon1: 154435889-54436491, Exon 2: 254427731-54429514), located on chromosome 8, at 54,427,731-54,436,491 (Supplementary Figure 1A; [https://www.dropbox.com/sh/z82pwriyvwjw7f/AA BVYIdJa\\_Psqbj-SL6z AHXFu/Supplementary%20figure%201.pdf?dl=0](https://www.dropbox.com/sh/z82pwriyvwjw7f/AA BVYIdJa_Psqbj-SL6z AHXFu/Supplementary%20figure%201.pdf?dl=0)). It has been shown that lincRNA-RP11400k9.4 is expressed in four normal tissues/cell lines: Heart, testes, ovary and prostate; and in five types of cancer: Invasive breast carcinoma, lung squamous cell carcinoma and low grade glioma

(<http://annolnc.cbi.pku.edu.cn/status.jsp?id=5D3C6210-200201084703>) (Supplementary Figure 1B and C; [https://www.dropbox.com/sh/z82pwriyvwjw7f/AA BVYIdJa\\_Psqbj-SL6zAHXFu/Supplementary%20figure%201.pdf?dl=0](https://www.dropbox.com/sh/z82pwriyvwjw7f/AA BVYIdJa_Psqbj-SL6zAHXFu/Supplementary%20figure%201.pdf?dl=0)).

To determine the subcellular distribution of lincRNA-RP11400k9.4, cellular cytoplasmic and nuclear fractions of MCF-7 cells were obtained and its levels were determined by RT-PCR in each fraction. As shown in Figure 1A, lincRNA-RP11400k9.4 was found at highest levels in the cytoplasmic fraction. This result is coincident with the data on the lncATLAS database (<https://lncatlas.crg.eu/>) (Figure 1B).

To determine if lincRNA-RP11400k9.4 was characteristic of one of the breast cancer subtypes, expression analysis was performed on 10 cell lines. We found that the expression was not associated with the hormonal receptor status, subtype, claudin level or doubling time (Supplementary Table II; <https://www.dropbox.com/sh/z82pwriyvwjw7f/AAAXgWg8nE155B8eNo4GKWR9a/Supplementary%20Tablas%20II.docx?dl=0>). Interestingly, we found an inverse correlation between invasive capacity and level of lincRNA-RP11400k9.4. The lowest levels of expression were found in the MDA-MB-361 and HS578T and MDA231 cell lines, which have a high invasive capacity, whereas the highest levels were found in the MDA-MB-453, T47D and MCF-7 cell lines, which have lower invasive capacity (Figure 1C).

**Comprehensive transcriptional analysis of MCF-7 overexpressing lincRNA-RP11400k9.4.** In a previous study we observed a decrease in the level of several lncRNAs, including lincRNA-RP11400k9.4, in MCF-7 cells which had acquired a

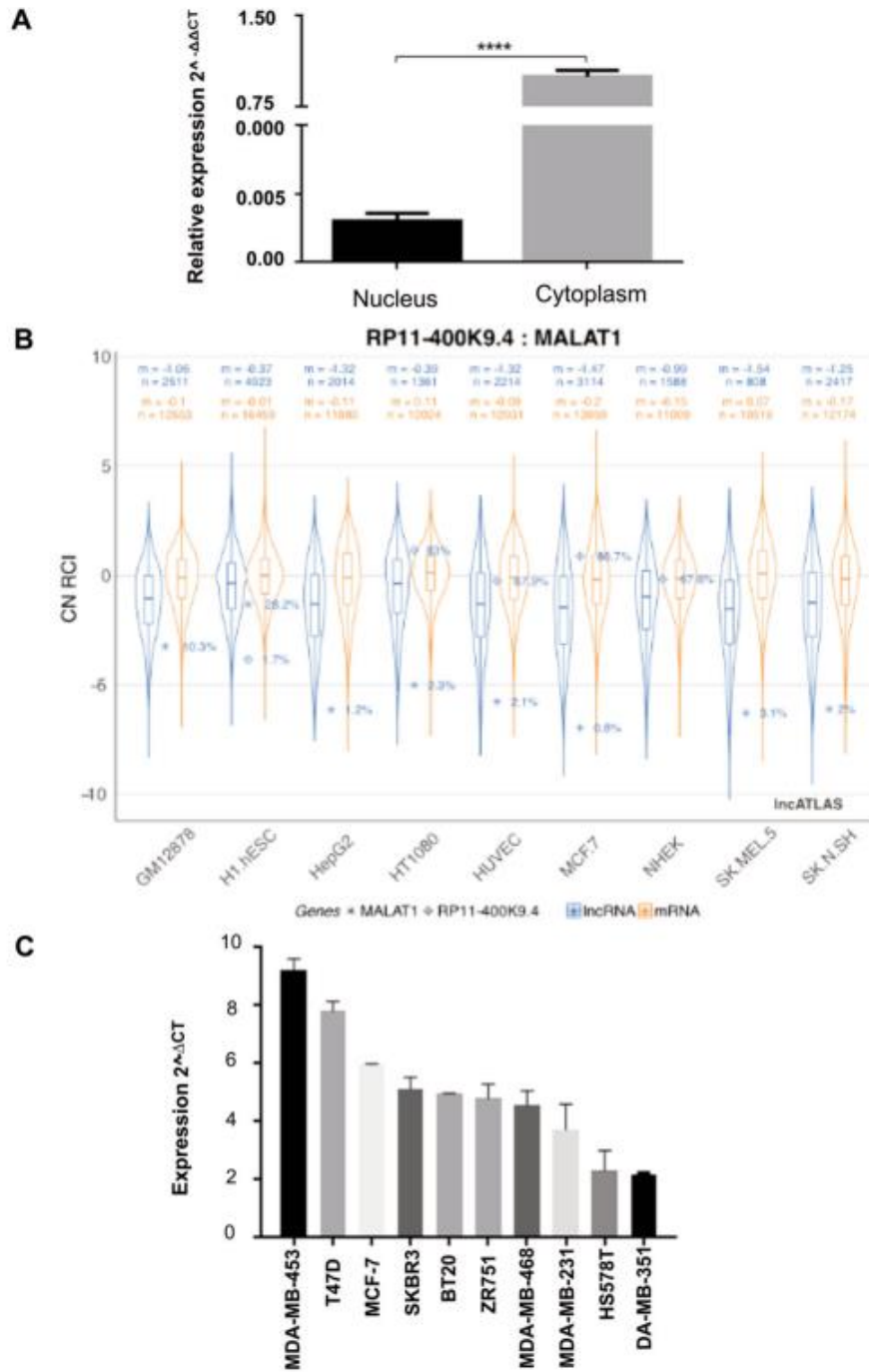


Figure 1. Subcellular localization of long intergenic non-coding RP11-0400k9.4 (*lincRNARP11-400k9.4*). A: Subcellular distribution of *lincRNA RP11-400k9.4* in MCF-7 cells. B: Data of the *lincATLAS* database of subcellular relative expression of *lincRNA RP11-400k9.4* and metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (*MALAT1*) as positive control of the analysis in MCF-7 and several other cell lines. C: Expression of *lincRNA* in a panel of 10 cell lines. All data are shown as the mean with  $\pm$ SEM from three independent experiments. Student's *t*-test was performed to evaluate differences. \*\*\*\*Significantly different at  $p=0.0001$ .

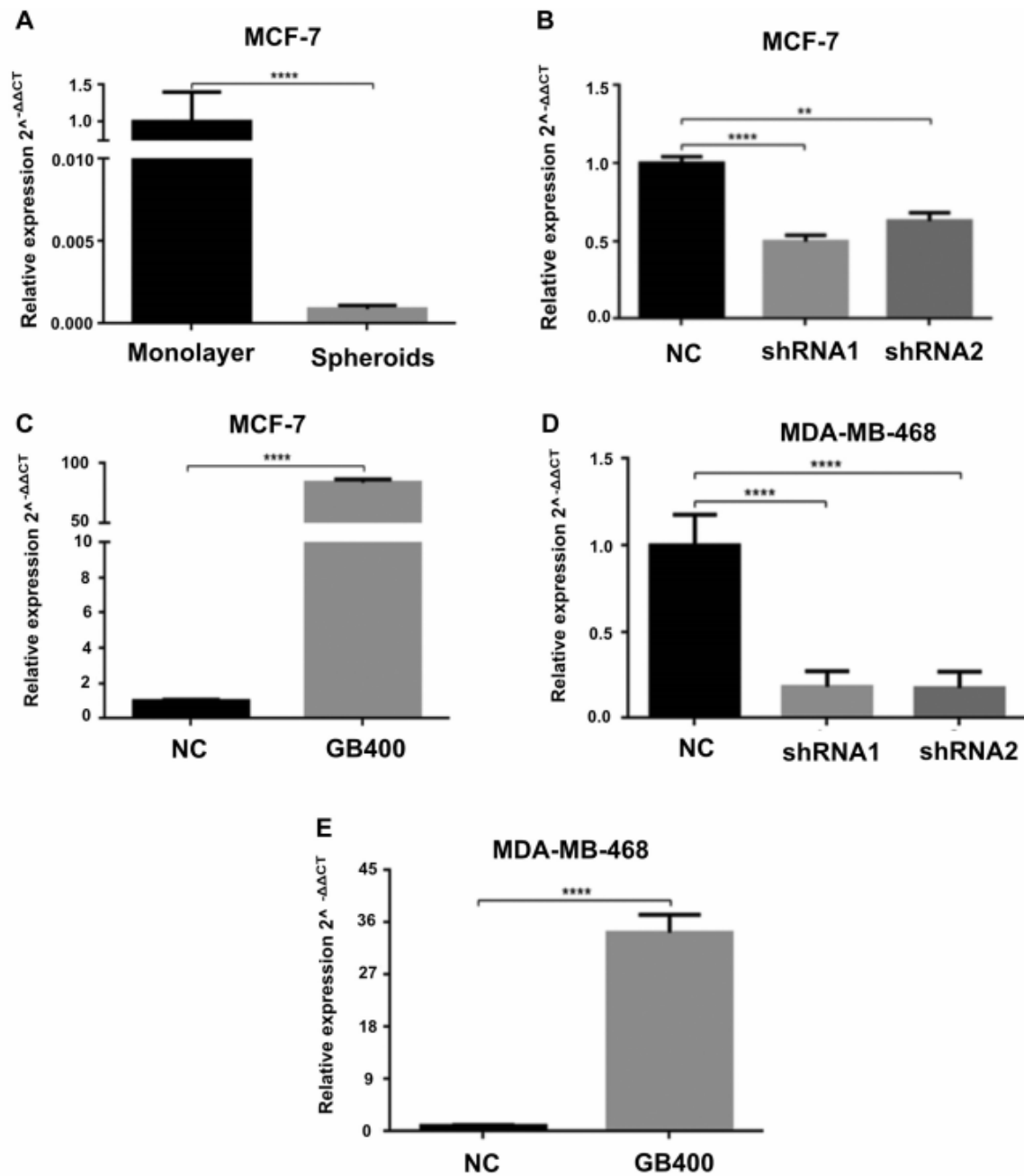


Figure 2. Long intergenic non-coding RP11-0400k9.4 (lincRNARP11-400k9.4) expression in MCF-7 cells. A: Relative expression of lincRNARP11-400k9.4 in MCF-7 cells growing in 3D (spheroids) in comparison to monolayer cultures. B: Underexpression of lincRNARP11-400k9.4 using two short hairpin RNA (shRNAs) in MCF-7 cells. C: Overexpression of lincRNARP11-400k9.4 using GeneBlock for RP11-400k9.4 (GB400) in MCF-7 cells. D: Underexpression of lincRNARP11-400k9.4 using two shRNAs in MDA-MB-468 cells. E: Overexpression of lincRNARP11-400k9.4 using GeneBlock for RP11-400k9.4 (GB400) in MDA-MB-468 cells. All data are shown as the mean with  $\pm$ SEM from three independent experiments. Student's *t*-test was performed to evaluate differences. Significantly different at: \*\* $p=0.01$  and \*\*\*\* $p=0.0001$ .

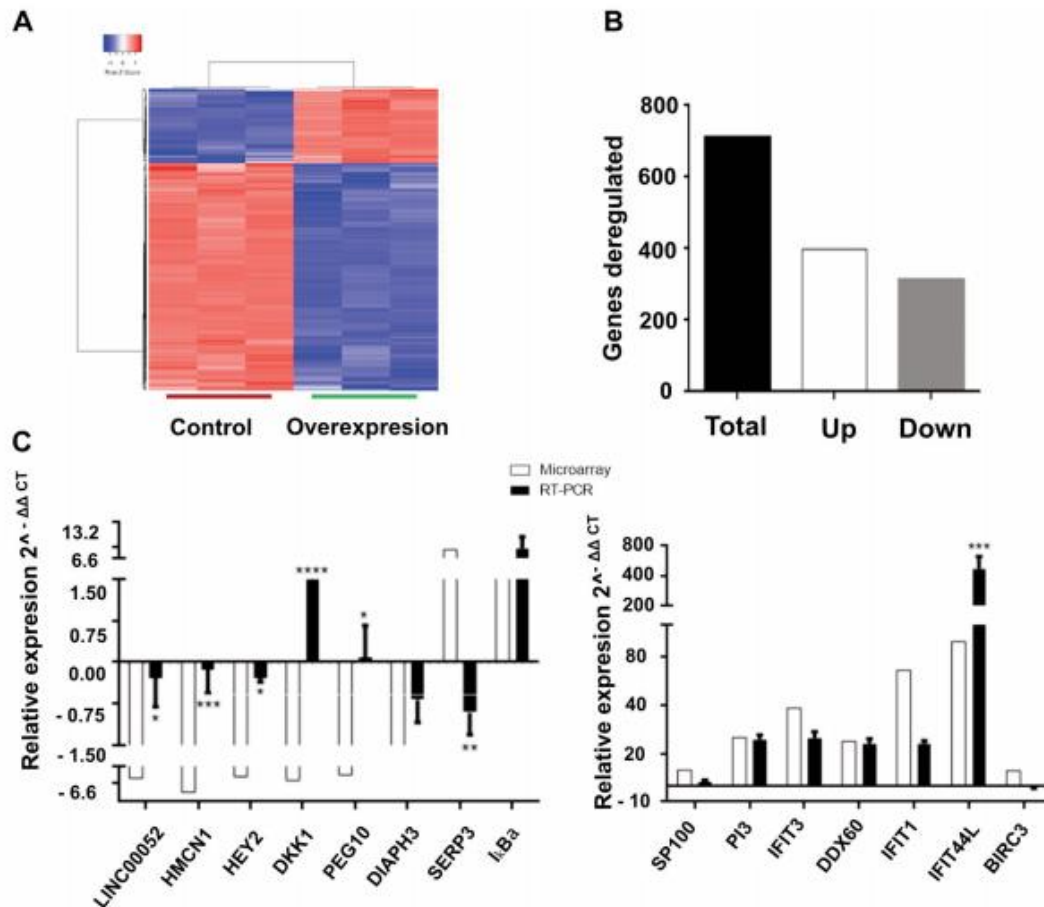


Figure 3. Impact of long intergenic non-coding RP11-0400k9.4 (*lincRNAP11-400k9.4*) overexpression in MCF-7 cells. A: Heatmap of transcripts altered by *lincRNAP11-400k9.4* overexpression. B: mRNAs deregulated in MCF-7 cells with *lincRNAP11-900k9.4* overexpression. C: Microarray expression data validation of 15 genes by real-time polymerase chain reaction. LINC00052: Long intergenic non-protein coding RNA 52; HMCN1: hemicentin 1; HEY2: Hes-related family BHLH transcription factor with YRPW motif 2; DKK1: Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1; PEG10: paternally expressed 10; DIAPH3: diaphanous-related formin 3; SERP3: Serpine 3; IkBa: NFkB Inhibitor alpha; SP100: speckled 100 kDa; P13: peptidase inhibitor 3; IFIT3: interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3; DDX60: DExD/H-box helicase 60; IFIT1: interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1; IFIT44L: interferon-induced protein 44-like; BIRC3: baculoviral IAP repeat containing 3. Data shown are the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Two-way ANOVA was performed to evaluate the significance of microarray vs. real time polymerase chain reaction data: Significantly different at: \* $p=0.05$ , \*\* $p=0.01$ , \*\*\* $p=0.001$ , and \*\*\*\* $p=0.0001$ .

stem-like phenotype after IKK $\epsilon$  was overexpressed (21). It is well known that three-dimensional (3D) MCF-7 culture (spheroids) mimic the main features of human solid tumors including migration, invasion, proliferation, stemness features, and an increase of IKK $\epsilon$  level (21). We evaluated the expression of *lincRNA-RP11400k9.4* in 3D cultures. As shown in Figure 2A, we found a lower expression of *lincRNA-RP11400k9.4* in spheroids when compared to cells cultured in monolayers.

To deepen the understanding of the role of *lincRNA-RP11400k9.4* in breast cancer we performed loss- and gain-

of-function experiments by over- and underexpressing *lincRNA-RP11400k9.4* in MCF-7 and MDA-MB-468 cells by transfecting two shRNAs (Figure 2B and D) or a plasmid with the *lincRNA-RP11400k9.4* gene (Figure 2C and E); in both cases we used transfected cells with a control vector to compare the effects.

Firstly, we performed whole-genome expression analysis using MCF-7 cells with overexpression of *lincRNA-RP11400k9.4* versus luciferase expression. The validation of data obtained with the microarray analysis was performed using



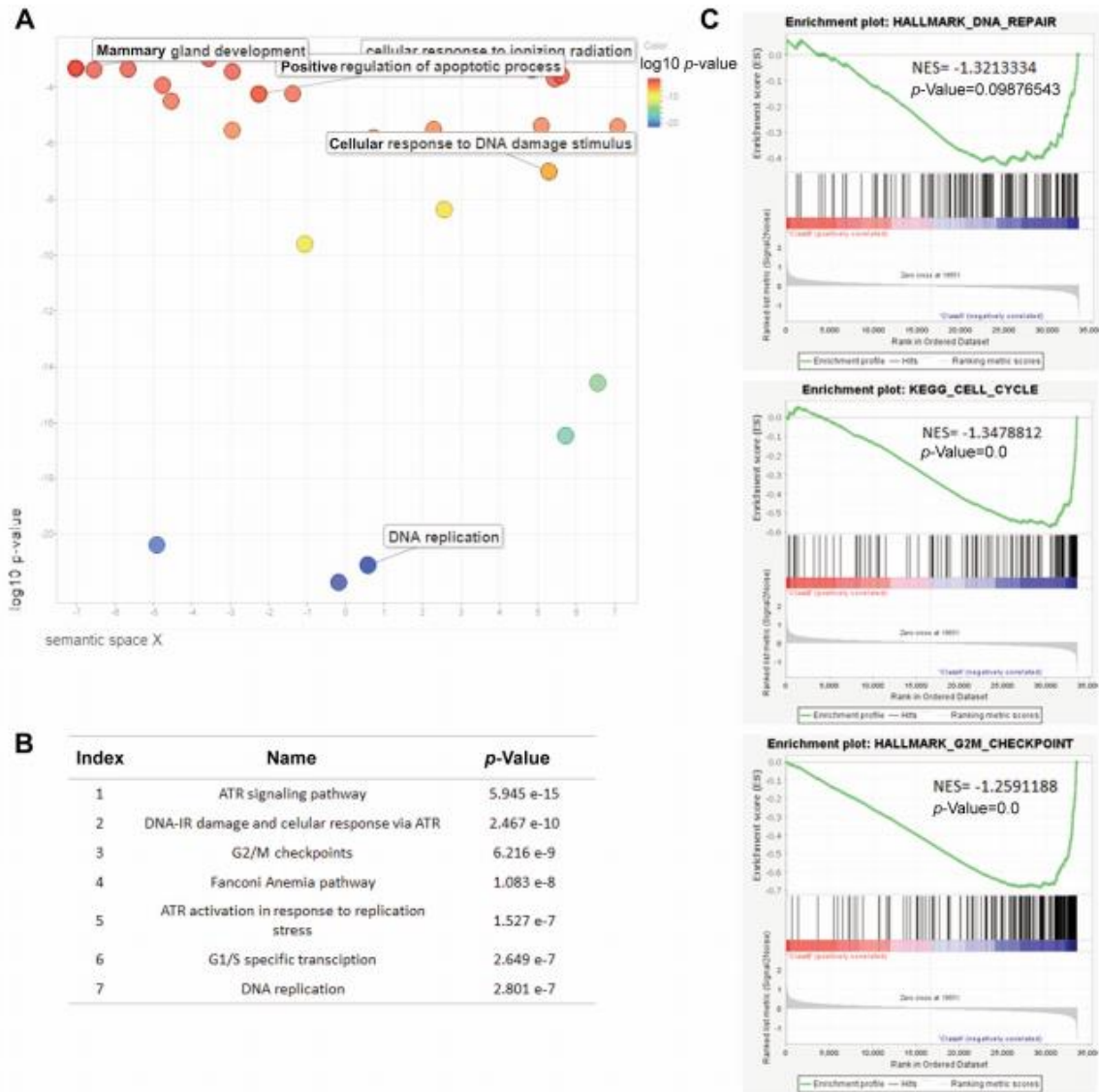


Figure 4. Bioinformatic analysis of long intergenic non-coding RP11-0400k9.4 (*lincRP11-400k9.4*) overexpression in MCF-7 cells. **A** and **B**: Main cellular processes altered by *lincRP11-900k.9.4* overexpression analyzed by DAVIDREVIGO software and Gene set enrichment analysis. **C**: Pathways most altered as analyzed by Key Pathway Advisor (KPA), Metacore and Enrichr software. NES: Normalized enrichment score; ATR: ataxia telangiectasia and RAD3-related; IR: ionizing radiation; G1: gap 1; S: synthesis.

RT-PCR (Figure 3). As shown in Figure 3B, 710 transcripts were deregulated: Levels of 398 increased and 312 decreased, using a fold change of 2 or more and  $p < 0.05$  as threshold. Table I shows the top 10 altered RNAs. In order to delve into the expression changes mediated by *lincRNA-RP11400k9.4*, we carried out a network analysis using the KPA, Metacore,

Enrichr, GSEA and REVIGO tools. We found that the main altered processes were related to DNA repair mechanisms, including DNA damage by UV radiation (Figure 4).

To corroborate the role of *lincRNA-RP11400k9.4* in DNA repair mechanisms, and in particular DNA damage induced by UV radiation, we exposed MCF-7 and MDA-MB 468

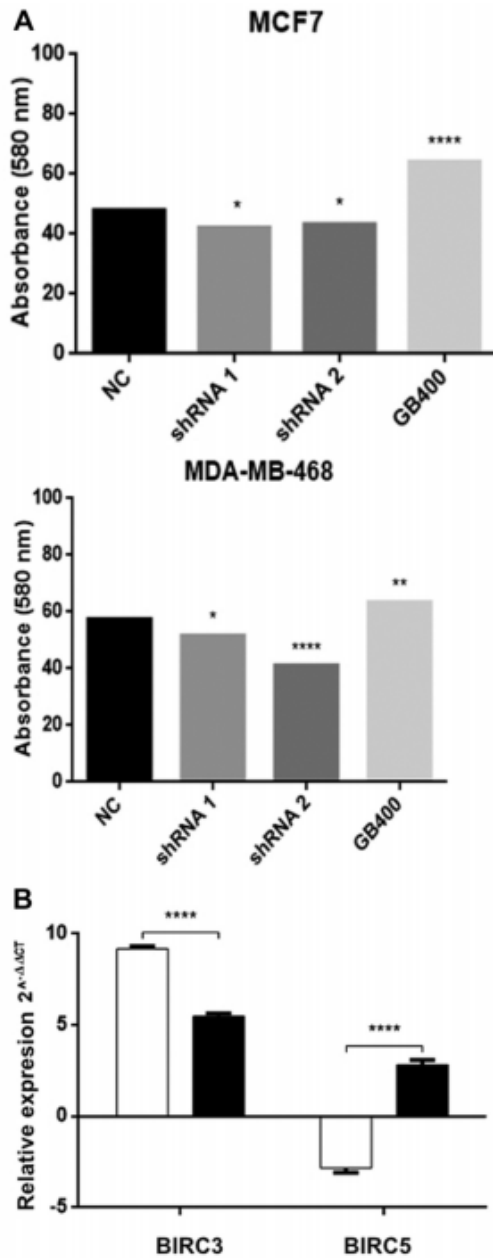


Figure 5. Effect of long intergenic non-coding RP11-0400k9.4 (lincRP11-400k9.4) expression on cellular survival and proliferation. A: Cellular survival after exposure to ultraviolet (UV) radiation of MCF-7 (left) and MDA-MB-468 (right) cells overexpressing (GB400) or underexpressing lincRP11-400k9.4. B: Expression of Baculoviral IAP Repeat Containing 3 (BIRC3) and Baculoviral IAP Repeat Containing 5 (BIRC5) in MCF-7 cells overexpressing lincRNA RP11-400k9.4. Short hairpin RNA (shRNA); geneblock for RP11-400k9.4 (GB400). Two-way ANOVA was performed to evaluate the significance of differences. Significantly different at: \* $p=0.05$ , \*\* $p=0.01$ , and \*\*\*\* $p=0.0001$ .

cells with dysregulated lincRNA-RP11400k9.4 levels to UV light (254 nm) for 3 min. Twenty-four hours later, cellular viability was measured. As shown in Figure 5A, cells with lincRNA-RP11400k9.4 knockdown were more sensitive to UV radiation exposure and, as expected, cells with lincRNA-RP11400k9.4 overexpression presented higher cellular survival after UV radiation. Since UV light induces apoptosis, we analyzed the RNA data for differentially expressed genes associated with this process. Interestingly, we found that BIRC3, BCL2 apoptosis regulator-like protein 11 (BIM) and survivin (BIRC5) were dysregulated by lincRNA-RP11400k9.4 overexpression. We then measured BIRC3 and BIRC5 expression using RT-PCR and found that the expression of both genes was increased (Figure 5B). It is important to note that in the microarray data only BIRC3 expression increased whereas that of BIRC5 decreased, perhaps due to the presence of multiple functional isoform of this proteins with different regulatory patterns.

Since it has been reported that BIRC3 increases resistance to cell death but at the same time inhibits migration and proliferation, we evaluated the migratory capacity of these cells by transwell assay. As shown in Figure 6, both MCF-7 and MDA-MB-468 cells with knockdown of lincRNA-RP11400k9.4 expression presented a migration increase. As expected, overexpression of lincRNA-RP11400k9.4 produced a reduction in the migration of MCF-7 cells (Figure 6A-D). Finally, we measured the proliferative capacity using transfected MCF-7 and MDA-MB-468 cells. As shown in Figure 6E, changes in the level of lincRNA-RP11400k9.4 did not affect the proliferation of these cells.

## Discussion

Cancer consists of at least 100 diseases shaped by an uncontrolled cell growth. Breast cancer in particular, represent the third cause of Mexican cancer-associated deaths for women of 30 years and older and has maintain this status over the past 8 years (1, 26).

Twenty-four years ago, with the discovery of the first lincRNA in eukaryotic cells and their important role in cellular physiology, a new paradigm was established and more recently, this paradigm has extended to carcinogenesis. Recently, Mathias *et al.* found that some lincRNAs are potential markers of breast cancer subtypes (18). More interesting, Su *et al.* performed bioinformatical analyses on 658 ductal carcinomas and found several lincRNAs to be differentially expressed between breast cancer subtypes, lincRNA-RP11400k9.4 being one of the RNAs associated with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-overexpressing subtype (19). HER2-overexpressing tumors are characterized by their aggressiveness and short survival time for their carrier. This observation was similar to that of Van Grembergen *et al.* in a 995 patient cohort where



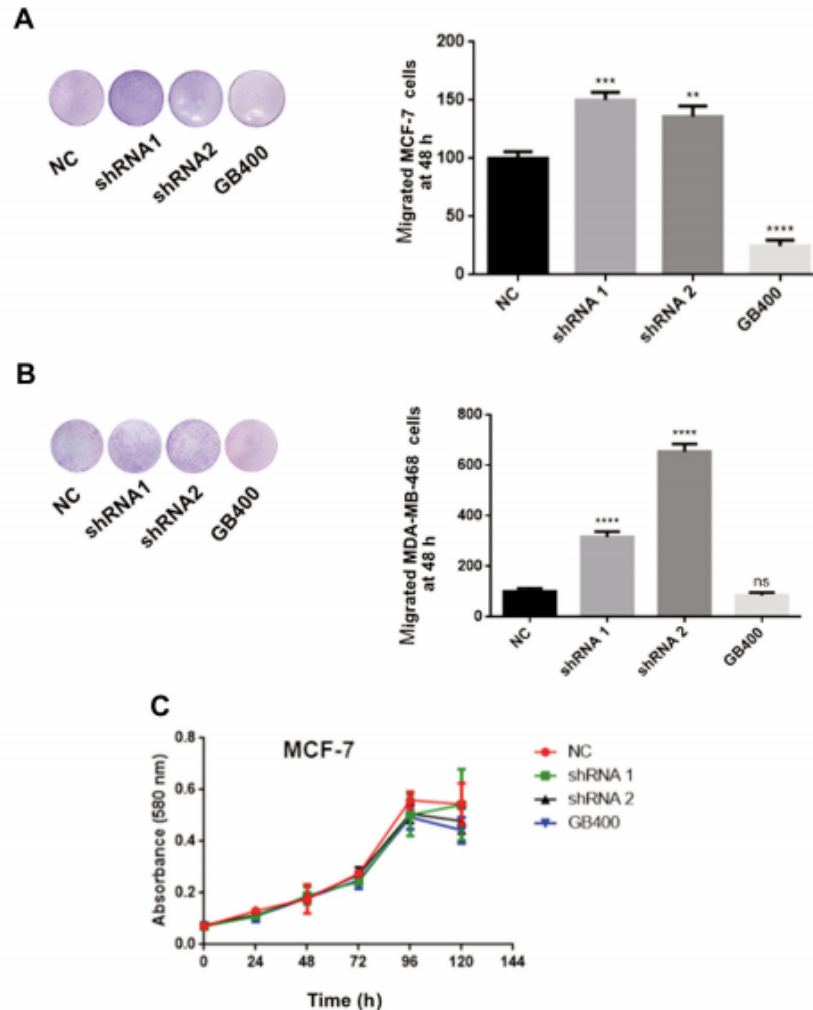


Figure 6. Functional analysis of long intergenic non-coding RP11-0400k9.4 (*lincRP11-400k9.4*) in breast cancer cells. A: Representative images and quantification of Transwell assay of migration in MCF-7 cells. B: Representative images and quantification of Transwell assay of migration in MDA-MB-468 cells. overexpression of *lincRP11-400k9.4* reduced migration of both cell lines. C: MCF-7 proliferation presented no alteration after forced or silenced expression of *lincRP11-400k9.4*. Short hairpin RNA (shRNA); GeneBlock for RP11-400k9.4 (GB400). All data are shown as the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Student's *t*-test was performed to evaluate differences. Significantly different from the negative control (NC) at: \*\* $p=0.01$ , \*\*\* $p=0.001$ , \*\*\*\* $p=0.0001$ .

*lincRNA-RP11400k9.4* was also overexpressed in the HER2 subtype (20). We did not find a clear correlation between the level of *lincRNA-RP11400k9.4* and HER2-positive status in a panel of breast cancer cell lines. A higher level of this *lincRNA* was found in the MDA-MB-453 cell line, which is HER2-positive, whereas a lower level was found in MDA-MB-361 cells, which are also HER2-positive. In addition, the T47D cell line, which is negative for HER2 showed high

levels of *lincRNA-RP11400k9.4*. These results indicate that alternative pathways may be involved in regulating *lincRNA-RP11400k9.4* expression.

*LincRNA-RP11400k9.4* was found to be mainly located in the cytoplasmic compartment and was dysregulated in 3D breast cancer cultures and in breast cancer cells that overexpress IKK $\epsilon$ . When *lincRNA-RP11400k9.4* was overexpressed in breast cancer cells, a relatively large number of RNAs were

deregulated. Network analyses with data from dysregulated RNAs suggested that lincRNA-RP11400k9.4 may be associated with the ability of cells to survive when exposed to UV radiation. These results were validated with *in vitro* loss- and gain-of-function approach assays. As expected, overexpression of lincRNA-RP11400k9.4 resulted in a decrease in cell death caused by UV exposure and a decrease in migration but no changes in cell proliferation. BIRC3, a protein that is a member of the NF $\kappa$ B survival pathway, was deregulated in cells that overexpressed lincRNA-RP11400k9.4.

BIRC3 participates in non-canonical nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) pathway activation. The activation of NF $\kappa$ B is a commonly observed phenomenon in breast cancer, facilitating the development of a hormone-independent, invasive, high-grade and late-stage tumor phenotype (27). Activated NF $\kappa$ B is associated with resistance to chemotherapy, radiotherapy and endocrine therapy (28).

BIRCs are able to abrogate death-inducing signals, by direct inhibition of caspases and modulation on NF $\kappa$ B (16). Aberrant BIRC3 expression has been found in a several human cancer types. Dierlamm *et al.* found that the fusion BIRC3–mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma protein in lymphoma conferred resistance to apoptosis (29). Yuan *et al.* reported that the BIRC3 enhanced resistance to apoptosis in HPV16E6/E7-immortalized human oral keratinocytes (30). There are reports that point to the role of BIRC3 in the regulation of UV-induced apoptosis: Ismail and Bateman reported that BIRC3 is regulated by T-box transcription factor 2 in SW13 cells and increased resistance to apoptotic stimuli including UV-radiation (31) and it has been reported that BIRC3 was overexpressed in UV- irradiated hepatocytes (32). BIRC3 might mediate the effect of lincRNA-RP11400k9.4, lincRN, perhaps operating downstream of NF $\kappa$ B and be partly responsible for its effects. Further experiments are needed to address this.

## Conclusion

LincRNA-RP11400k9.4 is an intergenic non-coding RNA, expressed in the cytoplasm of breast cancer cells, which regulates the sensitivity to death after exposure to UV radiation. This lincRNA also inhibits cell migration, although not proliferation in these cells. Its effects may be mediated by BIRC3, a member of the family of IAPs that is regulated by NF $\kappa$ B.

## Conflicts of Interest

The Authors declare that there are no conflicts of interest in regard to this study.

## Authors' Contributions

M.F., J.M., and V.M. contributed to the design and implementation of the research, to the analysis of the results and to the writing of the article.

## Acknowledgements

This work was part of the PhD thesis of Miguel Ángel Fernández Rojas, doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 288752. This study was supported by grants Grant A1-S-8462 to J.M-Z. We greatly acknowledge the technical support of Dra. Karla Vázquez Santillán, Dra. Rosario Castro Oropeza, Dra. Marcela De la Fuente Hernández and Dr. Alfredo García Venzor for the ongoing support.

## References

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394-424, 2018. PMID: 30207593, DOI: 10.3322/caac.21492
- 2 Girotti MR, Salatino M, Dalotto-Moreno T and Rabinovich GA: Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *J Exp Med* 217(2), 2020. PMID: 7041721. DOI: 10.1084/jem.20182041
- 3 Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646-674, 2011. PMID: 21376230. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 4 Srinivasula SM and Ashwell JD: IAPs: What's in a name? *Mol Cell* 30(2): 123-135, 2008. PMID: 2677451. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.008
- 5 Birnbaum MJ, Clem RJ and Miller LK: An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with cys/his sequence motifs. *J Virol* 68(4): 2521-2528, 1994. PMID: 236730. DOI: 10.1128/JVI.68.4.2521-2528.1994
- 6 Schimmer AD: Inhibitor of apoptosis proteins: Translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64(20): 7183-7190, 2004. PMID: 15492230. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1918
- 7 Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Naitoh T, Ogawa H, Ando T, Yazaki N, Watanabe K, Haneda S, Shibata C and Sasaki I: Inhibitor of apoptosis protein family as diagnostic markers and therapeutic targets of colorectal cancer. *Surg Today* 41(2): 175-182, 2011. PMID: 21264751. DOI: 10.1007/s00595-010-4390-1
- 8 Mendoza-Rodriguez M, Arevalo Romero H, Fuentes-Panana EM, Ayala-Summano JT and Meza I: IL-1 $\beta$  induces up-regulation of BIRC3, a gene involved in chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Lett* 390: 39-44, 2017. PMID: 28093282. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.01.005
- 9 Gyrd-Hansen M and Meier P: IAPs: From caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10(8): 561-574, 2010. PMID: 20651737. DOI: 10.1038/nrc2889
- 10 Cao J, Qiu J, Wang X, Lu Z, Wang D, Feng H, Li X, Liu Q, Pan H, Han X, Wei J, Liu S and Wang L: Identification of microRNA124 in regulation of hepatocellular carcinoma through BIRC3 and the NF- $\kappa$ B pathway. *J Cancer* 9(17): 3006-3015, 2018. PMID: 6134807. DOI: 10.7150/jca.25956
- 11 Wang L, Luan T, Zhou S, Lin J, Yang Y, Liu W, Tong X and Jiang W: Lncrna hcp5 promotes triple negative breast cancer progression as a ceRNA to regulate BIRC3 by sponging *mir-219a-5p*. *Cancer Med* 8(9): 4389-4403, 2019. PMID: 6675706. DOI: 10.1002/cam4.2335

- 12 Lin K, Song LJ, Ma J, Zhang TS, You DY and He YW: Identification of cancer hallmark-associated gene and lincRNA cooperative regulation pairs and dictate lincRNA roles in oral squamous cell carcinoma. *J Cell Mol Med* 24(9): 5213-5223, 2020. PMID: 7205782. DOI: 10.1111/jcmm.15174
- 13 Deng Y, Luo S, Zhang X, Zou C, Yuan H, Liao G, Xu L, Deng C, Lan Y, Zhao T, Gao X, Xiao Y and Li X: A pan-cancer atlas of cancer hallmark-associated candidate driver lincRNAs. *Mol Oncol* 12(11): 1980-2005, 2018. PMID: 6210054. DOI: 10.1002/1878-0261.12381
- 14 Adriaens C, Standaert L, Barra J, Latil M, Verfaillie A, Kalev P, Boeckx B, Wijnhoven PW, Radaelli E, Vermi W, Leucci E, Lapouge G, Beck B, van den Oord J, Nakagawa S, Hirose T, Sablina AA, Lambrechts D, Aerts S, Blanpain C and Marine JC: P53 induces formation of NEAT1 lincRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat Med* 22(8): 861-868, 2016. PMID: 27376578. DOI: 10.1038/nm.4135
- 15 Betts JA, Moradi Marjaneh M, Al-Ejeh F, Lim YC, Shi W, Sivakumaran H, Tropee R, Patch AM, Clark MB, Bartonicek N, Wiegman AP, Hillman KM, Kaufmann S, Bain AL, Gloss BS, Crawford J, Kazakoff S, Wani S, Wen SW, Day B, Moller A, Cloonan N, Pearson J, Brown MA, Mercer TR, Waddell N, Khanna KK, Dray E, Dinger ME, Edwards SL and French JD: Long noncoding RNAs CUPID1 and CUPID2 mediate breast cancer risk at 11q13 by modulating the response to DNA damage. *Am J Hum Genet* 101(2): 255-266, 2017. PMID: 5544418. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.07.007
- 16 Casimiro S, Alho I, Bettencourt M, Pires R, Lipton A and Costa L: Rankl enhances the effect of an antagonist of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in RANK-positive breast cancer cells. *J Bone Oncol* 2(3): 116-122, 2013. PMID: 4723389. DOI: 10.1016/j.jbo.2013.07.001
- 17 Wu Z and Wang Y: Studies of lincRNAs in DNA double-strand break repair: What is new? *Oncotarget* 8(60): 102690-102704, 2017. PMID: 5731991. DOI: 10.18632/oncotarget.22090
- 18 Mathias C, Zambalde EP, Rask P, Gradia DF and de Oliveira JC: Long non-coding RNAs differential expression in breast cancer subtypes: What do we know? *Clin Genet* 95(5): 558-568, 2019. PMID: 30614523. DOI: 10.1111/cge.13502
- 19 Su X, Malouf GG, Chen Y, Zhang J, Yao H, Valero V, Weinstein JN, Spano JP, Meric-Bernstam F, Khayat D and Esteva FJ: Comprehensive analysis of long non-coding RNAs in human breast cancer clinical subtypes. *Oncotarget* 5(20): 9864-9876, 2014. PMID: 4259443. DOI: 10.18632/oncotarget.2454
- 20 Van Grembergen O, Bizet M, de Bony EJ, Calonne E, Putmans P, Brohee S, Olsen C, Guo M, Bontempi G, Sotiriou C, Defrance M and Fuks F: Portraying breast cancers with long noncoding RNAs. *Sci Adv* 2(9): e1600220, 2016. PMID: 5010371. DOI: 10.1126/sciadv.1600220
- 21 Orlova Z, Pruefer F, Castro-Oropeza R, Ordaz-Ramos A, Zampedri C, Maldonado V, Vazquez-Santillan K and Melendez-Zajgla J: IKKepsilon regulates the breast cancer stem cell phenotype. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866(4): 598-611, 2019. PMID: 30615901. DOI: 10.1016/j.bbamer.2019.01.002
- 22 Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods* 25(4): 402-408, 2001. PMID: 11846609. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- 23 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES and Mesirov JP: Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(43): 15545-15550, 2005. PMID: 1239896. DOI: 10.1073/pnas.0506580102
- 24 Supek F, Bosnjak M, Skunca N and Smuc T: REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms. *PLoS One* 6(7): e21800, 2011. PMID: 3138752. DOI: 10.1371/journal.pone.0021800
- 25 Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gunderson GW and Ma'ayan A: Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44(W1): W90-97, 2016. PMID: 4987924. DOI: 10.1093/nar/gkw377
- 26 Geografía. INdEy: Instituto nacional de estadística y geografía. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales. 2016. Available at: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf) [Last accessed on 31st August 2020]
- 27 Wang W, Nag SA and Zhang R: Targeting the NFkappaB signaling pathways for breast cancer prevention and therapy. *Curr Med Chem* 22(2): 264-289, 2015. PMID: 6690202. DOI: 10.2174/0929867321666141106124315
- 28 Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Eppenberger U and Benz CC: The NFkappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12(Suppl 1): S37-46, 2005. PMID: 16113098. DOI: 10.1677/erc.1.00977
- 29 Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H and Marynen P: The apoptosis inhibitor gene *API2* and a novel 18q gene, *MLT*, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 93(11): 3601-3609, 1999. PMID: 10339464. DOI: 10.1182/blood.V93.11.3601
- 30 Yuan H, Fu F, Zhuo J, Wang W, Nishitani J, An DS, Chen IS and Liu X: Human papillomavirus type 16 e6 and e7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene* 24(32): 5069-5078, 2005. PMID: 15856013. DOI: 10.1038/sj.onc.1208691
- 31 Ismail A and Bateman A: Expression of TBX2 promotes anchorage-independent growth and survival in the p53-negative SW13 adrenocortical carcinoma. *Cancer Lett* 278(2): 230-240, 2009. PMID: 19216023. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.01.006
- 32 Chopra M, Dharmarajan AM, Meiss G and Schrenk D: Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci* 111(1): 49-63, 2009. PMID: 19520675. DOI: 10.1093/toxsci/kfp128

Received July 28, 2020

Revised August 29, 2020

Accepted September 2, 2020