



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PAPEL DE LOS microRNAs 27b Y 155 EN LA REGULACIÓN DE LA  
REPARACIÓN DEL DAÑO AL ADN

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
RICARDO IVÁN PERAZA VEGA

DIRECTOR DE TESIS  
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR  
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

DR. JUAN MIRANDA RÍOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos institucionales**

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través de la beca nacional para estudios de posgrado con número 292749.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor por sus observaciones, apoyo e interés en este trabajo:

- Dr. Emilio Rojas del Castillo (Tutor principal)
  - Dr. Juan Miranda Ríos
  - Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

## **Agradecimientos a título personal**

Agradezco de manera especial al Dr. Emilio Rojas del Castillo por todo su apoyo como mi tutor durante el desarrollo de mi proyecto de investigación en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas. A la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez, por sus valiosas aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre por su gran apoyo técnico en la realización de los experimentos realizados en este trabajo.

A Azucena Ayala Pichardo por ayudarme siempre con todos los trámites de cada semestre.

**A mis padres y mi hermana, gracias por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.**

*Dedicado a la memoria de mi mamá.*

# Contenido

LISTA DE ABREVIACIONES, GENES Y PROTEÍNAS.....	1
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
Biogénesis y función de los miRNAs .....	8
Papel de los miRNAs en la reparación del daño al ADN .....	11
Mecanismos de reparación del daño al ADN.....	13
<i>Reparación por escisión de bases (BER)</i> .....	14
<i>Reparación por escisión de nucleótidos (NER)</i> .....	16
<i>Reparación de rupturas de doble cadena por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (HRR)</i> .....	19
ANTECEDENTES.....	26
miR-27b.....	27
miR-155.....	29
OBJETIVO GENERAL .....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
HIPÓTESIS .....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Compuestos químicos .....	31
Línea celular y condiciones de cultivo .....	31
Transfección de miRNAs.....	32
Extracción de ARN .....	32
Evaluación de la expresión de miR-27b y miR-155 en células transfectadas .....	33
Tratamiento con agentes de daño al ADN.....	33
<i>Agentes de daño, dosis y concentraciones</i> .....	33
<i>Exposición e intervalos de evaluación del daño al ADN</i> .....	34
Evaluación de la capacidad de reparación del daño al ADN por medio del ensayo Cometa ...	35

Análisis <i>in silico</i> para la búsqueda de genes predichos como blanco de miR-27b-3p y miR-155-p .....	36
Análisis de la expresión de genes de reparación del ADN .....	37
Análisis de enriquecimiento de vías e interacción de proteínas.....	40
RESULTADOS .....	41
Expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p.....	41
Evaluación del daño en el ADN .....	41
Búsqueda de genes predichos como blanco de miR-27b-3p y miR-155.....	45
Efecto de miR-27b-3p sobre la expresión de genes de reparación del ADN.....	48
Elaboración de un artículo de revisión sobre la función de los miRNAs en la reparación de DSBs a través de HRR y NHEJ.....	56
DISCUSIÓN .....	58
CONCLUSIÓN .....	69
REFERENCIAS .....	70

## Lista de abreviaciones, genes y proteínas.

<b>Abreviación</b>	<b>Definición</b>
ABL1	ABL Proto-Oncogene 1
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGO2	Argonaute RISC Catalytic Component 2
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase 1
ANOVA	Análisis de Varianca (Analysis of Variance)
AOPEP	Aminopeptidase O (Putative)
AP	Apurínico
APE1	Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	ATM Serine/Threonine Kinase
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
ATR	ATR Serine/Threonine Kinase
BALB	Bagg Albino
BER	Reparación por Escisión de Base (Base Excision Repair)
BLM	BLM RecQ Like Helicase
BP1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1
BRCA1	BRCA1 DNA Repair Associated
BRCA2	BRCA2 DNA Repair Associated
BRIT1	Microcephalin 1
CCD	Charged-coupled device
CCL18	C-C Motif Chemokine Ligand 18
CCR4	C-C Motif Chemokine Receptor 4
CDC25C	Cell Division Cycle 25C
CDS	Secuencia codificante (Coding Sequence)
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CHK2	Checkpoint Kinase 2
CPD	Carboxypeptidase D
CSA	ERCC Excision Repair 8, CSA Ubiquitin Ligase Complex Subunit
CSB	ERCC Excision Repair 6, Chromatin Remodeling Factor
DCLRE1C	DNA Cross-Link Repair 1C
DCP2	Decapping MRNA 2
DDB1	Damage Specific DNA Binding Protein 1
DDB2	Damage Specific DNA Binding Protein 2
DDR	Respuesta al Daño en el ADN (DNA Damage Response)
DGCR8	DGCR8 Microprocessor Complex Subunit
DICER	Dicer 1, Ribonuclease III
DMC1	DNA Meiotic Recombinase 1

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA-PKcs	Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit
DOX	Doxorrubicina (en este texto)
DSB	Ruptura de Cadena Doble (Double-strand break)
E2F	E2F Transcription Factor 1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EME1	Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1
ERCC1	ERCC Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit
ERK	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
EXO1	Exonuclease 1
EXP5	Exportin 5
FANCA	FA Complementation Group A
FANCB	FA Complementation Group B
FANCC	FA Complementation Group C
FANCD2	FA Complementation Group D2
FANCE	FA Complementation Group E
FANCF	FA Complementation Group F
FANCG	FA Complementation Group G
FANCI	FA Complementation Group I
FANCL	FA Complementation Group L
FANCM	FA Complementation Group M
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False Discovery Rate
FEN1	Flap Structure-Specific Endonuclease 1
FOXO3	Forkhead Box O3
GADD34	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A
HDR	Homology Directed Repair
HER2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
HR	Homologous Recombination
HRR	Reparación por Recombinación de Homólogos (Homologous Recombination Repair)
HUS1	HUS1 Checkpoint Clamp Component
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
IL6	Interleukin 6
KSRP	KH-Type Splicing Regulatory Protein
KU70	X-Ray Repair Cross Complementing 6, 5'-Deoxyribose-5-Phosphate Lyase Ku70
KU80	X-Ray Repair Cross Complementing 5
LIG1	DNA Ligase 1
LIG3	DNA Ligase 3
LIG4	DNA Ligase 4
LMP	Bajo punto de fusión (Low melting point)



MCPH1	Microcephalin 1
MDC1	Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	Reparación de apareamientos incorrectos (Mismatch Repair)
MPG	N-Methylpurine DNA Glycosylase
MRE11A	MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease
MRN	MRN complex (MRE11A-RAD50-NBS1)
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
MUS81	MUS81 Structure-Specific Endonuclease Subunit
MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
NBS1	Nibrin
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos (Nucleotide Excision Repair)
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (Non-Homologous End Joining)
NUP153	Nucleoporin 153
OGG1	8-Oxoguanine DNA Glycosylase
OLA1	Obg Like ATPase 1
OTM	Olive Tail Moment
PAMM	Peroxiredoxin Like 2A
PAN2	Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit PAN2
PAN3	Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit PAN3
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic
POLD1	DNA Polymerase Delta 1, Catalytic Subunit
POLE	DNA Polymerase Epsilon, Catalytic Subunit
PRKDC	Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit
PTTG1	PTTG1 Regulator Of Sister Chromatid Separation, Securin
RAD50	RAD50 Double Strand Break Repair Protein
RAD51	RAD51 Recombinase
RAD51B	RAD51 Paralog B
RAD51C	RAD51 Paralog C
RAD51D	RAD51 Paralog D
RAD52	RAD52 Homolog, DNA Repair Protein
RAD9	RAD9 Checkpoint Clamp Component A
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RNF8	Ring Finger Protein 8
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replication Protein A1
SFB	Suero Fetal Bovino
SLX1	SLX1 Homolog A, Structure-Specific Endonuclease Subunit
SLX4	SLX4 Structure-Specific Endonuclease Subunit

SSA	Alineamiento de Cadena Única (Single Strand Annealing)
SSB	Ruptura de Cadena Sencilla/Única (Single Strand Break)
TFIIH	ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor
TOP3A	DNA Topoisomerase III Alpha
TOPBP1	DNA Topoisomerase II Binding Protein 1
TP53	Tumor Protein P53
TRBP	TARBP2 Subunit Of RISC Loading Complex
UNG	Uracil DNA Glycosylase
UTR	Región no traducida (Untranslated region)
UV	Ultravioleta
XLF	Non-Homologous End Joining Factor 1, XRCC4-Like Factor
XPA	XPA, DNA Damage Recognition And Repair Factor
XPB	ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit
XPC	XPC Complex Subunit, DNA Damage Recognition And Repair
XPB	ERCC Excision Repair 2, TFIIH Core Complex Helicase Subunit
XPE	Damage Specific DNA Binding Protein 1
XPF	ERCC Excision Repair 4, Endonuclease Catalytic Subunit
XPG	ERCC Excision Repair 5, Endonuclease
XRCC1	X-Ray Repair Cross Complementing 1
XRCC2	X-Ray Repair Cross Complementing 2
XRCC3	X-Ray Repair Cross Complementing 3
XRCC4	X-Ray Repair Cross Complementing 4
XRCC7	Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit
XRN1	5'-3' Exoribonuclease 1



## Resumen

En este trabajo se estudió el papel de los microRNAs (miRNAs) miR-27b-3p y miR-155-5p en la reparación del daño al ADN. La expresión de ambos miRNAs se ha observado desregulada en diversos tipos de cáncer y algunos estudios sugieren que pueden desempeñar un papel en la reparación del ADN, sin embargo, su función en este contexto es mayormente desconocida. Para estudiar esta posibilidad, se indujo la sobreexpresión de miR-27b-3p y miR-155-5p en fibroblastos murinos embrionarios pertenecientes a la línea celular BALB/c-3T3 A31-1-1 y se expusieron a diferentes agentes de daño al ADN con distintos mecanismos de acción. Se evaluó la capacidad de reparación del ADN de las células que sobreexpresaban miR-27b-3p y miR-155-5p y se comparó con la de células con expresión basal. Observamos que las células que sobreexpresaban miR-27b-3p redujeron su capacidad para reparar las lesiones generadas por cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), radiación ionizante (RI) y doxorubicina (DOX) principalmente. Las células que sobreexpresaban miR-155-5p no presentaron cambios en su capacidad de reparación. La inhibición de la expresión de miR-27b-3p no tuvo efectos sobre la capacidad de reparación del ADN. De acuerdo con un análisis *in silico* para la búsqueda de blancos predichos para ambos miRNAs, miR-27b-3p podría modular la expresión de un número de genes mayor que miR-155-5p. Se analizó la expresión de 84 genes involucrados en la reparación del ADN en células que sobreexpresaban miR-27b-3p y se observaron 27 genes con una expresión desregulada. De acuerdo con un análisis de enriquecimiento de vías, dichos genes desregulados participan principalmente en la reparación de DSBs por recombinación de homólogos (HRR) y de lesiones oxidativas por escisión de bases (BER), así como en la señalización de rupturas de doble cadena (DSBs) y regulación del ciclo celular. La sobreexpresión de miR-27b-3p también altera el perfil de expresión de los genes de reparación durante la reparación del daño al ADN generado por DOX. Los resultados de este trabajo demuestran que miR-27b-3p funciona como un regulador negativo de la reparación del ADN y que el aumento en su expresión reduce la capacidad de reparación al alterar la expresión de genes involucrados en HRR, BER, así como en la señalización de DSBs y regulación del ciclo celular.

## Abstract

This work studied the role of miR-27b-3p and miR-155-5p microRNAs (miRNAs) in DNA damage repair. The expression of both miRNAs has been observed to be deregulated in various types of cancer, and some studies suggest that they may play a role in DNA repair; however, their role in this context is largely unknown. The overexpression of miR-27b-3p and miR-155-5p was induced in murine embryonic fibroblasts belonging to the BALB/c-3T3 A31-1-1 cell line and exposed to different DNA damage agents with different mechanisms of action. Cells overexpressing miR-27b-3p and miR-155-5p were assessed for DNA repair capacity and compared to cells with basal expression. We observed that cells that overexpressed miR-27b-3p reduced their ability to repair lesions generated by ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>), ionizing radiation (IR), and doxorubicin (DOX) mainly. Cells that overexpressed miR-155-5p did not show changes in their repair capacity. Inhibition of miR-27b-3p expression did not affect DNA repair capacity. A bioinformatic analysis showed that both miRNAs could potentially modulate DNA repair gene expression, with miR-27b-3p having a larger number of predicted target genes than miR-155-5p. The expression of 84 genes involved in DNA repair in cells that overexpressed miR-27b-3p was analyzed, and 27 genes with deregulated expression were observed. According to a pathway enrichment analysis, these deregulated genes are mainly involved in repairing DSBs by homologous recombination repair (HRR) and oxidative damage by base excision repair (BER), as well as in double-strand break (DSB) signaling and cell cycle regulation. Overexpression of miR-27b-3p also alters the expression profile of repair genes during DOX-generated DNA damage repair. The results of this work demonstrate that miR-27b-3p functions as a negative regulator of DNA repair and that increased expression reduces repair capacity by altering the expression of genes involved in HRR, BER, DSB signaling, and cell cycle regulation.

## Introducción

Desde su descubrimiento en trabajos relacionados con genes heterocrónicos de *Caenorhabditis elegans* en 1993 [1], los microRNAs (miRNAs) han demostrado ser actores fundamentales en el control de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los miRNAs son cadenas cortas de ARN (~22 nt de longitud), procesados a partir de regiones tallo-asa o hairpin formados por transcritos más largos, que regulan virtualmente todos los procesos celulares [2]. Los miRNAs modulan post-transcripcionalmente la expresión de genes mediante su unión con secuencias complementarias de ARN mensajero (mRNA) regulando así la traducción y estabilidad de éstos. Debido a que la abundancia y la actividad de miRNAs difieren entre tipos celulares y a lo largo del desarrollo, es posible generar patrones de expresión génica muy particulares, sobre los cuales la evolución puede modelar complejas redes regulatorias requeridas para afrontar contingencias ambientales, genéticas y estocásticas [2].

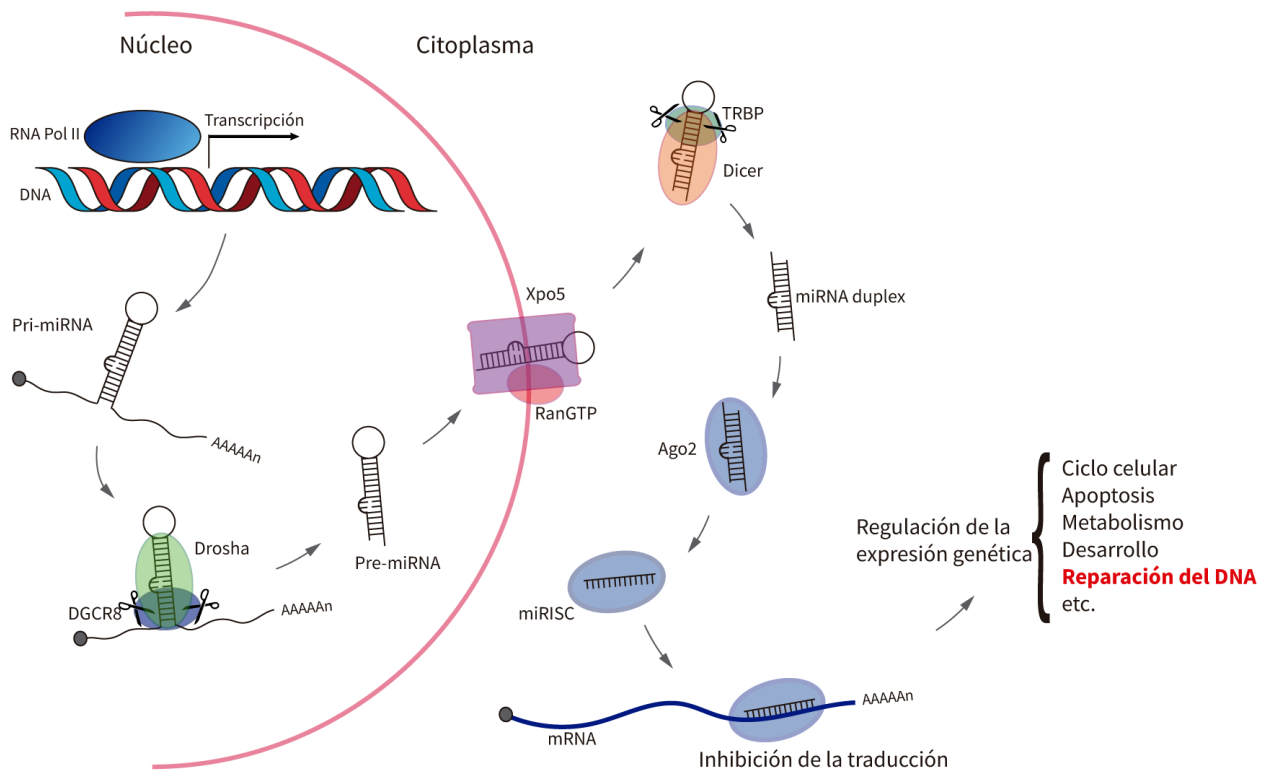
Los miRNAs probablemente surgieron más de una vez durante la evolución en distintos reinos y muchos de ellos han permanecido conservados entre especies pertenecientes al mismo reino [2–4]. El número de miRNAs en cada especie es variable y está directamente correlacionado con la complejidad morfológica de los organismos, lo cual sugiere que la aparición de miRNAs nuevos a lo largo de la evolución puede ser una pieza clave en la aparición de organismos complejos [2]. Actualmente, el número de miRNAs anotados para humano es de 2,654 (secuencias maduras) [5], sin embargo, aún se desconoce el número total exacto de miRNAs existentes en el genoma humano. Por medio de predicciones computacionales y la identificación de mRNAs blanco a través del análisis de datos de secuenciación masiva, se ha estimado que cada miRNA puede, en teoría, unirse a cientos de mRNAs diferentes lo cual de forma colectiva resulta en la regulación de la expresión de más de la mitad de los genes que codifican proteínas en humano [6].

Las perturbaciones en la expresión y actividad de los miRNAs, por lo tanto, pueden tener consecuencias negativas para la célula y el organismo a distintos niveles, entre los que

se incluyen defectos en el desarrollo embrionario, alteraciones en el metabolismo, la proliferación y la división celular, defectos en la reparación del daño al ADN, entre otros.

## **Biogénesis y función de los miRNAs**

El modelo canónico de biogénesis de los miRNAs en mamíferos fue formulado con base en dos observaciones. La primera fue que los miRNAs son inicialmente producidos como transcritos primarios largos (pri-miRNAs) que luego son procesados para generar precursores intermediarios con forma de tallo-asa (pre-miRNAs), los cuales son cortados nuevamente generando así miRNAs maduros. La segunda observación fue que las actividades catalíticas para el primer y segundo corte ocurren en el núcleo y el citoplasma, respectivamente. De tal forma que la exportación nuclear del pre-miRNA es necesaria para que el procesamiento en el citoplasma pueda ocurrir (Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema general de la biogénesis de los microRNAs. El pri-miRNA es transcrito por la ARN polimerasa II (RNA Pol II) y adquiere una estructura secundaria tallo-asa, la cual es cortada por el complejo Microprocesador (DROSHA-DGCR8) para liberar un pre-miRNA. El pre-miRNA es exportado al citoplasma por la Exportina 5 (Xpo5) y RAN-GTP. En el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por el complejo DICER-TRBP y se produce un dúplex de RNA, el cual es cargado en la proteína Argonauta (AGO2). Sólo una de las dos cadenas del dúplex de ARN permanece en Ago2, y la otra es degradada, quedando así el Complejo Silenciador Inducido por miRNA (miRISC), el cual reconoce RNAs mensajeros con una secuencia complementaria a la del miRNA que lleva incorporado, inhibiendo así su traducción.

La transcripción de los genes que codifican miRNAs produce transcritos primarios, llamados pri-miRNAs, que suelen ser de al menos 1 kb de longitud y que presentan una región tallo-asa [7,8]. Un pri-miRNA típico consiste de un tallo de 33-35 pb, un loop terminal y segmentos de cadena sencilla en los extremos 5' y 3' de longitud variable [8]. El tallo-asa del pri-miRNA es cortado por una RNasa tipo III conocida como DROSHA generando el pre-miRNA de ~65 nt de longitud (Fig. 1). DROSHA contiene dos dominios de RNasa tipo III (RIIIDs) en tándem en su estructura molecular, así como un dominio de unión a ARN de doble cadena (dsRBDs), dichos dominios son esenciales para el procesamiento de los pri-miRNAs. Posteriormente, DROSHA interacciona con el cofactor DGCR8, y forma un complejo proteico conocido como Microprocesador el cual corta al pri-miRNA a aproximadamente 11 pb de distancia desde la base del tallo del hairpin y a

aproximadamente a 22 pb de la unión apical del loop terminal dejando un “overhang” de dos nucleótidos en el extremo 3’ del pre-miRNA [8].

Después del procesamiento por DROSHA, el pre-miRNA es exportado al citoplasma donde es procesado por otra RNasa tipo III denominada DICER quien con ayuda del cofactor TRBP genera un producto final de ~22 nt de longitud (Fig. 1). La exportación ocurre a través de canales proteicos embebidos en la membrana nuclear y es mediada por el receptor nuclear exportina-5 (EXP5) en asociación con el cofactor Ran unido a GTP [7–9]. DICER tiene dos dominios RNasa tipo III en tándem, un dominio de unión a ARN de doble cadena (dsRBD) y corta al pre-miRNA a 22 nt de distancia del extremo opuesto al loop del hairpin, dejando, al igual que DROSHA, un “overhang” de 2 nt en el extremo 3’ y generando finalmente un dúplex de ARN de ~22 nt de longitud [10].

Luego del procesamiento por DROSHA y DICER, el dúplex de miRNA maduro es incorporado en un complejo efector conocido como miRISC (complejo silenciador inducido por miRNA) conformado por el componente catalítico Argonauta RISC (AGO2) y el propio dúplex de ARN (Fig. 1). En este momento una de las dos cadenas del dúplex es descartada de miRISC en un proceso dependiente de la estabilidad termodinámica relativa de los dos extremos del dúplex. La cadena que tenga un apareamiento de bases relativamente más inestable en el extremo 5’ es la que permanece con mayor frecuencia dentro de miRISC, mientras que la cadena con una interacción más fuerte en 5’ es generalmente descartada. Se piensa que la interacción débil en el 5’ facilita la apertura del dúplex desde ese extremo y el comienzo del desenrollamiento del dúplex mediado por AGO2 [10,11]. La cadena que permanece se conoce como “cadena guía” es el miRNA maduro activo, mientras que la cadena descartada del miRISC se denomina “cadena pasajera” [10].

El complejo miRISC se une a mRNAs con una secuencia complementaria a la del miRNA e inhibe su traducción (Fig. 1). Los miRNAs interactúan con sus mRNAs blanco formando apareamientos Watson-Crick con las regiones no traducidas (UTRs) o incluso con regiones codificantes del mensajero [12]. La región 5’ representada por los nucleótidos 2 al 8 del miRNA maduro, representan una región particularmente conservada entre miRNAs de diferentes especies. Esta región, se denomina región



semilla y es el contribuyente más importante para determinar la especificidad de la unión del miRNA y sus mRNAs los blanco [13]. Se ha demostrado que el reconocimiento del mRNA blanco es iniciado por un apareamiento transitorio con un segmento de la región semilla (nucleótidos 2 al 4) el cual se vuelve cinéticamente estable cuando el apareamiento se extiende a la longitud completa de la región semilla. AGO2 estabiliza esta interacción para incrementar el tiempo de permanencia en el sitio de reconocimiento mucho más tiempo del que se esperaría para un apareamiento RNA-RNA [14]. La unión del miRNA con su blanco causa la represión de la traducción y en algunos casos también puede promover la degradación del mRNA. Al respecto, se ha sugerido que los miRNAs primeramente reprimen la traducción y luego promueven el decaimiento de sus blancos. El momento de decaimiento puede variar dependiendo del contexto celular, por ejemplo, en células embrionarias, los blancos traducionalmente reprimidos permanecen estables durante más tiempo que en células con mecanismos de vigilancia más robustos, donde son degradados más rápidamente [4].

Se ha sugerido que los miRNAs inhiben la traducción dependiente del Cap ubicado en el extremo 5' del mRNA blanco. La posterior degradación del mRNA blanco es catalizada por enzimas involucradas en la vía de decaimiento de mRNAs 5'-3', en la cual el mRNA es desadenilado por la acción de las subunidades de ribonucleasa específica de poli(A) PAN2 y PAN3 y el receptor 4 de quimioquinas con motivo C-C (CCR4-NOT) para luego ser decapitado por la acción de la metaloenzima decapante de ARNm 2 (DCP2) y otras proteínas que actúan como cofactores. Finalmente los mRNA son degradados por la exoribonucleasa-1 5' – 3' XRN1 [6].

### **Papel de los miRNAs en la reparación del daño al ADN**

El ADN está constantemente expuesto a numerosos agentes exógenos y endógenos que son capaces de alterar su estructura química y producir una variedad de modificaciones químicas conocidas comúnmente como “lesiones” o “daño”. Se estima que un día ocurren entre  $10^4$  y  $10^5$  lesiones al ADN en una célula de mamífero [15,16]. La presencia de tales lesiones puede generar mutaciones en la secuencia del ADN alterando así la integridad de la información genética y comprometiendo el correcto funcionamiento de

los procesos celulares. La acumulación del daño en el ADN puede promover un estado de inestabilidad genómica que resulta en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. La reparación del daño al ADN permite, por lo tanto, mantener la integridad del genoma y la transmisión fidedigna de la información genética a las células hijas.

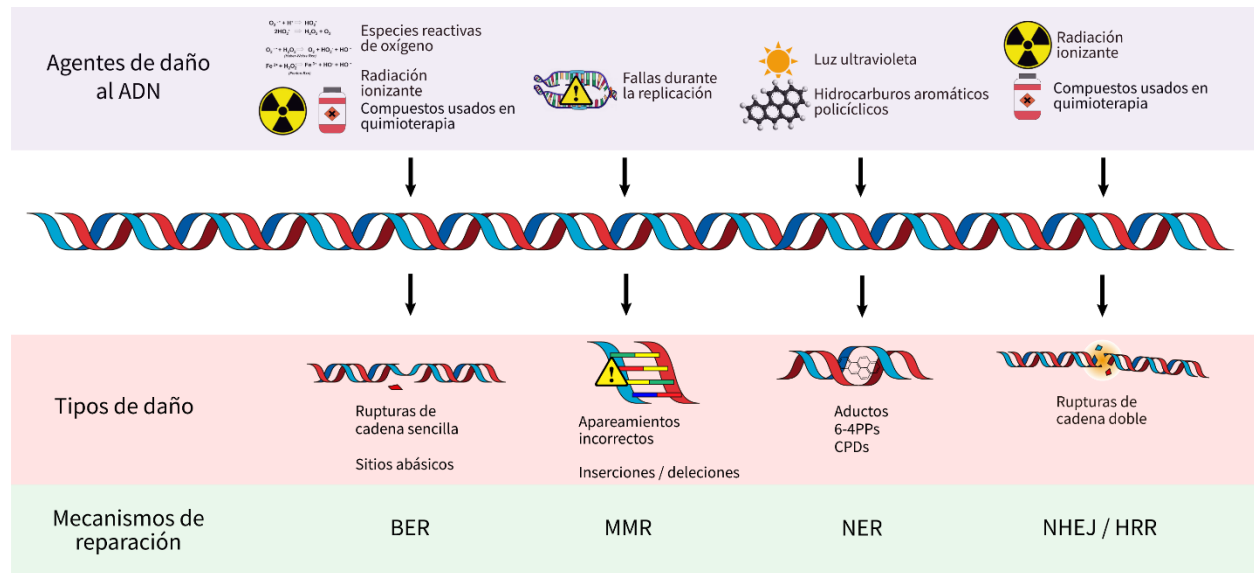
Entre los múltiples procesos celulares regulados por los miRNAs se encuentra precisamente la reparación del daño al ADN. Se ha observado que un gran número de miRNAs participan como moduladores de la expresión de genes involucrados en la respuesta al daño al ADN (DDR, por las siglas en inglés de *DNA damage response*) y en los distintos mecanismos de reparación del daño al ADN [17–19]. De igual manera, la presencia de daño en el ADN puede funcionar como un estímulo que promueve la expresión de miRNAs específicos a través de proteínas de señalización. Uno de los actores fundamentales en la señalización y activación de la DDR es la cinasa Serina/Treonina ATM (ATM), la cual puede promover la biogénesis de un número importante de miRNAs por medio de la activación de TP53 o a través de la fosforilación de la proteína reguladora de empalme tipo KH (KSRP), quien puede unirse con gran afinidad al loop terminal de determinados pri-miRNAs y pre-miRNAs e interactuar con DROSHA o DICER facilitando así la biogénesis de ciertos miRNAs [20].

Se ha observado que el nivel de exportación de diversos pre-miRNAs desde el núcleo al citoplasma se incrementa cuando existe la presencia de daño en el ADN. Lo anterior es debido a la actividad de la cinasa 1 serina/treonina AKT (AKT), una cinasa activada por ATM, a su vez, AKT fosforila a la nucleoporina 153 (NUP153) resultando en un incremento en la interacción entre NUP153 y EXP5 [21]. El tratamiento con diferentes tipos y dosis de agentes causantes de daño al ADN resulta en una activación diferencial de diversos miRNAs [22], lo cual sugiere que los miRNAs regulan la reparación del ADN mediante un mecanismo basado en la naturaleza e intensidad del daño [23]. Asimismo, muchos promotores de miRNAs tienen características similares a las de genes codificantes de proteínas y su expresión puede ser controlada por distintos factores de transcripción involucrados en la DDR, tales como TP53, el factor de transcripción E2F (E2F) y el factor de transcripción MYC [24]. Por ejemplo, se ha visto que el daño al ADN promueve la expresión dependiente de TP53 de miR-34, miR-192, miR-194 y miR-215,

lo cual favorece el arresto del ciclo celular dado que dichos miRNAs tienen como blancos a varios transcritos involucrados en la regulación del ciclo celular [24–26].

### Mecanismos de reparación del daño al ADN

Las células cuentan con mecanismos que permiten reparar los distintos tipos de lesiones que ocurren en el ADN. De manera general, se han descrito cinco principales mecanismos: reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación de apareamientos de base incorrectos (MMR), unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación por recombinación homóloga (HRR) (Fig. 2). El mecanismo empleado por la célula dependerá del tipo de lesión presente en el ADN, la etapa del ciclo celular y el grado de diferenciación celular [27,28].



**Figura 2.** Tipos de daño al DNA y mecanismos de reparación asociados. Diversos agentes físicos y químicos generan distintos tipos de daño, los cuales son reparados por mecanismos de reparación específicos.

### *Reparación por escisión de bases (BER)*

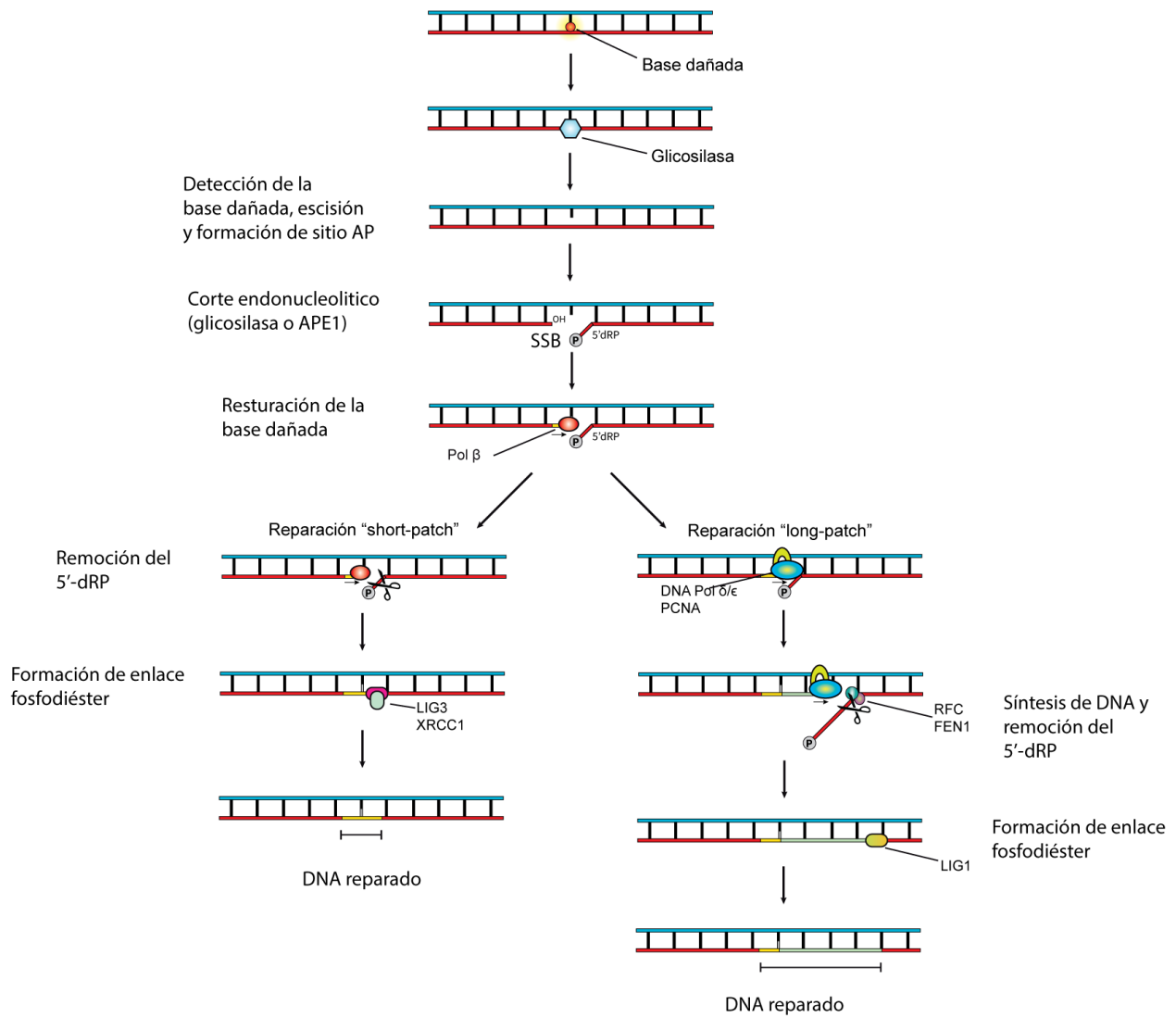
Las lesiones oxidativas al ADN generadas por especies reactivas de oxígeno (ROS, por las siglas en inglés de *Reactive Oxygen Species*), la alquilación de bases, producto de la reacción del ADN con determinados metabolitos y agentes ambientales, así como las reacciones de hidrólisis espontáneas como la desaminación y la despurinación, son lesiones que no distorsionan en gran medida la estructura de la molécula de ADN y que son reparadas por la célula a través del mecanismo BER [29]. Es posible identificar ciertas etapas generales ocurriendo a lo largo de este mecanismo de reparación: 1) la detección y remoción de la base de ADN alterada por una ADN glicosilasa generando así un sitio abásico (sitios apurínicos o apirimídicos: AP) temporal por el corte del enlace N-glucosídico, 2) la incisión por parte de una endonucleasa sobre el sitio AP para cortar el enlace fosfodiéster tras lo cual se produce una ruptura de cadena única/sencilla (SSB) temporal, 3) la síntesis de ADN por parte de una polimerasa y 4) la ligación del ADN mediante la acción de una ligasa (Fig. 3).

El primer paso enzimático durante BER es llevado a cabo por ADN glicosilasas que catalizan el corte del enlace N-glucosídico entre la base sustrato y la posición 1' de la desoxirribosa creando así un sitio AP [28,30–33]. Se han identificado al menos 12 diferentes glicosilasas, las cuales presentan ciertas diferencias estructurales entre sí que les permiten detectar y remover lesiones de base específicas a cada enzima o con un bajo número de sustratos compartidos [34]. Sin embargo, la mayoría de las glicosilasas funcionan bajo un mismo mecanismo para la escisión de bases. Dicho mecanismo consiste en “girar” la base (*base flipping*) hacia el exterior de la doble hélice, lo que permite su acoplamiento en el sitio activo de la enzima y el corte del enlace N-glucosídico [33]. Posteriormente, ocurre el corte del enlace fosfodiéster para producir un SSB, este corte puede ser llevado a cabo por la propia glicosilasa, si es que cuenta con actividad AP liasa, o por otras enzimas AP endonucleasas [30]. De las 12 glicosilasas descritas, 5 de ellas cuentan con actividad AP liasa y se les denomina como glicosilasas bifuncionales, por lo tanto son glicosilasas que además de liberar a la base modificada, pueden realizar el corte del enlace fosfodiéster para generar el SSB [30]. Cuando la glicosilasa no puede realizar este segundo paso, como es el caso de las glicosilasas monofuncionales, la endodesoxirrinonucleasa específica de sitios

apurínicos/apurimidínicos APE1 (APE1) se encarga de hidrolizar el enlace fosfodiéster y crear el SSB con un grupo 3'-OH y un 5'-desoxiribosa fosfato (dRP) [35,36]. Posterior al corte por APE1 en el sitio AP, ocurre la remoción del 5'-dRP y la inserción del nucleótido faltante, ambos llevados a cabo por la ADN polimerasa  $\beta$  en un proceso conocido como *short-patch* BER (SP-BER) [36,37].

Además de SP-BER, puede ocurrir un proceso alternativo conocido como *long-patch* BER (LP-BER), en el cual, la síntesis de ADN es de más de un solo nucleótido (desde 2 a 12 nucleótidos) involucrando el desplazamiento de una de las dos cadenas de ADN y la formación de un saliente 5' temporal [36]. Durante LP-BER, la síntesis de ADN está a cargo de las polimerasas Pol  $\delta$  y la Pol  $\epsilon$  en conjunto con PCNA. Dichas polimerasas llevan a cabo la síntesis de ADN al mismo tiempo que van desplazando la cadena original y formando el saliente temporal. Dicho saliente es cortado por una nucleasa estructura-específica, principalmente por la endonucleasa 1 específica de estructura FEN1 (FEN1), para formar así un sustrato que pueda ser ligado [30].

El paso final de BER, y de todos los mecanismos de reparación, es sellar generando un enlace fosfodiéster covalente entre el extremo 3'-OH del nucleótido río arriba y el extremo 5'-PO<sub>4</sub> del nucleótido río abajo. En el caso de BER, este paso final es llevado a cabo por la ADN-ligasa 3 (LIG3) en asociación con el complemento cruzado de reparación de rayos X 1 (XRCC1) para el caso de SP-BER y la ADN-ligasa 1 (LIG1) en el caso de LP-BER [30].



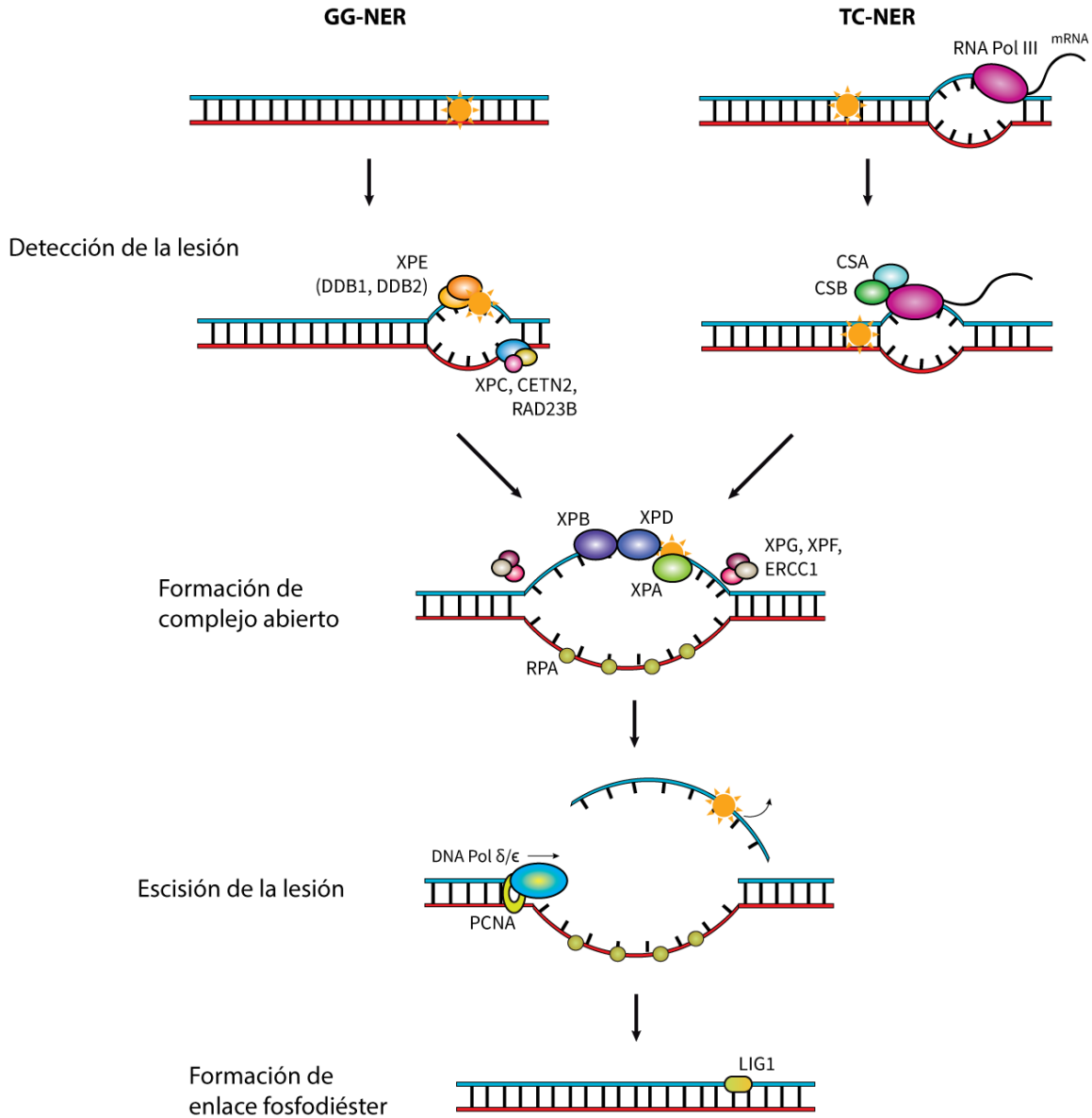
**Figura 3.** Mecanismo general la reparación por escisión de bases (BER). BER permite la reparación de bases oxidadas, desaminadas o alquiladas. Puede actuar a través de dos sub-vías conocidas como long-patch BER (LP-BER) y short-patch BER (SP-BER).

### Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

A diferencia de las lesiones reparadas por BER, NER actúa sobre lesiones que sí distorsionan de manera importante la estructura de la doble hélice del ADN. NER permite reparar lesiones como los dímeros ciclobutano-pirimidina (CPDs) y fotoproductos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs), los cuales son las principales lesiones generadas por luz UV. Asimismo, actúa en la reparación de aductos químicos de gran volumen, enlaces cruzados inter e intracadena generados por agentes como el cisplatino y ciclopurinas

generadas por ROS [16]. Los pasos generales de NER incluyen la detección de la lesión, la escisión del fragmento de ADN que contiene la lesión y la síntesis y ligación de la sección liberada [38] (Fig. 4). La detección de lesiones en NER puede ocurrir de dos formas: de manera global (*global genome NER*, GG-NER) o de forma acoplada a la transcripción (*transcription-coupled NER*, TC-NER). En GG-NER, todo el genoma es examinado en busca de distorsiones en la estructura de doble hélice del ADN, mientras que en TC-NER, la señalización comienza cuando la ARN Pol II queda estancada durante el proceso de elongación de la transcripción en una región del ADN donde existe una lesión [38] (Fig. 4).

En GG-NER, el reconocimiento de las lesiones que no alteran la estructura de hélice del ADN ocurre por la proteína unión a ADN específica 1 (XPE), formada por las subunidades específicas de daño DDB1 y DDB2, quienes detecta la lesión y forma un complejo con el ADN que es luego transferido a la subunidad del complejo XPC (XPC). Por otra parte, XPC es capaz de detectar las lesiones que sí alteran la estructura tridimensional del ADN [39,40]. En TC-NER, el estancamiento de la ARN Pol II inicia la señalización y reclutamiento de factores específicos de TC-NER tales como la subunidad del complejo de ubiquitina ligasa CSA (CSA) y el factor de remodelación de la cromatina CSB (CSB) (en lugar de XPE y XPC), quienes remueven la ARN Pol II estancada y permiten el acceso del resto de proteínas de NER. Después de la detección de la lesión, tanto GG-NER como TC-NER prosiguen de la misma manera general. El siguiente paso ocurre cuando el factor de reconocimiento XPA (XPA) y la subunidad helicasa del complejo central TFIIH (TFIIH), quien contiene a las helicatas XPB y XPD, son reclutados hacia el sitio de la lesión para formar un complejo abierto y permitir la verificación de la lesión [41]. RPA se une a las secciones de cadena sencilla lo que permite la extensión y estabilización del complejo [38,42]. Posteriormente, el complejo formado por subunidad endonucleasa no catalítica (ERCC1) con la subunidad catalítica endonucleasa XPF (XPF) y la endonucleasa XPG (XPG) cortan la cadena que contiene la lesión en ambos lados 5' y 3' dejando un fragmento de ~30 nt de longitud. Finalmente, la ADN polimerasa Pol  $\delta$  ó  $\epsilon$  realiza la síntesis de ADN utilizando como molde la cadena complementaria libre de la lesión y la ligasa I sella el corte restante [43].



**Figura 4.** Mecanismo general la reparación por escisión de nucleótidos (NER). NER permite la reparación de lesiones como 6-4PPs y CPDs generados por luz UV. La detección de lesiones en NER puede ocurrir de dos formas: de manera global (GG-NER) o de forma acoplada a la transcripción (TC-NER).



### *Reparación de rupturas de doble cadena por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (HRR)*

Entre los diferentes tipos de lesiones que pueden ocurrir en el ADN, las rupturas de doble cadena (DSBs, por las siglas en inglés de *double-strand breaks*) son consideradas como lesiones altamente citotóxicas dado que pueden conducir a la pérdida sustancial de información genética con mayor probabilidad que otros tipos de lesiones, incrementar la frecuencia de mutaciones y promover la formación de aberraciones cromosómicas. Tales alteraciones pueden finalmente conducir a la muerte celular, envejecimiento prematuro, neurodegeneración, inmunodeficiencia y cáncer [44,45]. Los DSBs pueden ser generados de diversas maneras, incluyendo la exposición a radiación ionizante (RI), el colapso de la maquinaria de replicación por la presencia de otro tipo de lesiones, la conversión espontánea a DSBs de clústeres de SSBs, las modificaciones transitorias sobre el ADN producidas por otros mecanismos como BER, y el efecto de compuestos químicos radiomiméticos [46]. Se estima que al día ocurren entre 10 y 50 DSBs en células humanas de manera endógena [47].

Los DSBs son reparados a través de la vía de unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) (Fig. 5) y la reparación por recombinación de homólogos (*homologous recombination repair*, HRR) (Fig. 6), la utilización de uno u otro mecanismo por parte de la célula depende de factores que incluyen la etapa del ciclo celular durante la cual ocurrió la lesión. La reparación a través de NHEJ no requiere de la presencia de un cromosoma homólogo, por lo que puede ser empleado en cualquier fase del ciclo celular, aunque es mayormente activo durante las fases G0 y G1. Por otro lado, HRR hace uso de la secuencia del cromosoma homólogo correspondiente al sitio donde ocurrió el DSB y por lo tanto es el mecanismo predominante en las fases S y G2 [48–50].

## NHEJ

Al igual que otros mecanismos de reparación, NHEJ requiere de una nucleasa para hacer una resección de la zona dañada del ADN, polimerasas para sintetizar ADN nuevo y una ligasa para restaurar la integridad de las cadenas de ADN (Fig. 5). La maquinaria de NHEJ reconoce los DSBs y los une de forma indiscriminada, se trata por lo tanto, de un mecanismo propenso a errores y potencialmente genotóxico [51]. En células humanas, NHEJ repara la gran mayoría de los DSBs fuera de las fases S y G2 del ciclo celular. Sin embargo, también se ha propuesto que puede reparar cerca del 80% de los DSBs en G2 y S que ocurren en zonas no proximales a la horquilla de replicación [52,53].

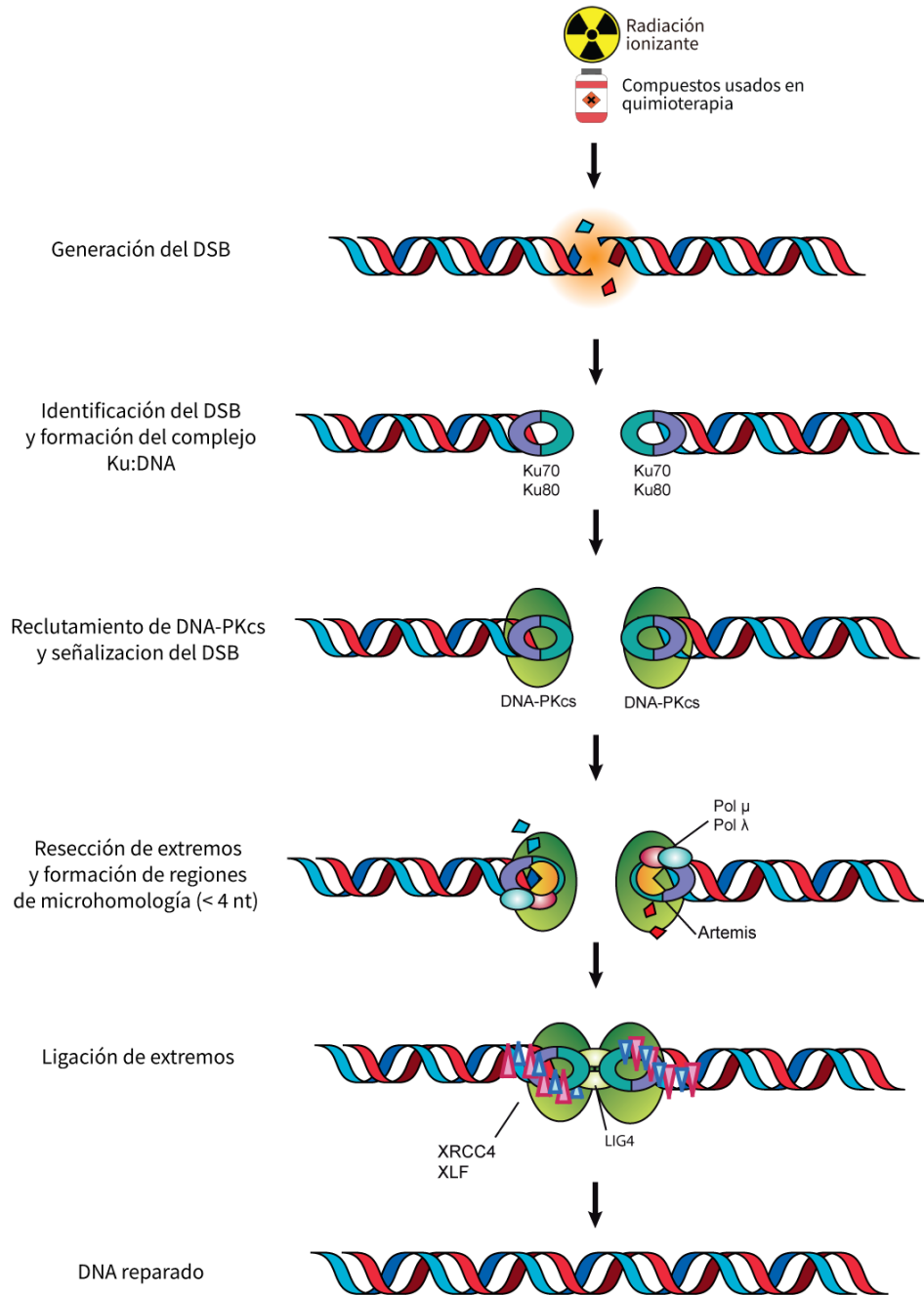
En la reparación por NHEJ, cuando surge un DSBs en el ADN de las células de vertebrados, éste es reconocido por un heterodímero que consiste de las proteínas de reparación Ku70 y Ku80 (Ku) para formar un complejo Ku:ADN el cual funciona como un nodo en el cual pueden luego unirse otras proteínas que participan en NHEJ [51,52] (Fig. 5). Se piensa que hay un complejo Ku:ADN en cada uno de los extremos del DSB, lo cual permite que éste sea modificado en preparación para su posterior unión [51]. Ku funciona como un cofactor específico para el reclutamiento estable de la subunidad catalítica de la cinasa proteína-ADN llamada DNA-PKcs (codificada por *PRKDC/XRCC7*). La cinasa DNA-PKcs actúa como un señalizador de DSBs, regula el procesamiento de los extremos del DSB a través de la fosforilación de distintos sustratos y facilita el reclutamiento de otros efectores que participan en NHEJ, por lo tanto juega un papel crucial en dicho mecanismo de reparación [54].

La mayoría de los DSBs tienen dos extremos de ADN incompatibles que no permiten la ligación directa debido a modificaciones químicas en 5' ó 3' así como la presencia de salientes (*overhangs*) no apareables. Es aquí donde la actividad de resección de ciertas nucleasas permite que los dos extremos sean compatibles. Dicha resección involucra la degradación de secciones cortas de los salientes 5' o 3' ya sea por la actividad de exonucleasas o endonucleasas para exponer o generar regiones cortas de microhomología ( $\leq 4$  nt) entre las cadenas para facilitar la unión de los extremos. Este proceso es distinto al de la resección extensa ( $\geq 20$  nt) que ocurre para iniciar HRR. Cuando la resección de ADN es necesaria en NHEJ, DNA-PKcs se asocia con la

endonucleasa-exonucleasa Artemis (*DCLRE1C*). Cuando DNA-PKcs se une al ADN se autofosforila y activa a Artemis permitiendo su actividad endonucleasa [55], la cual entonces puede procesar al ADN en los límites entre el ADN de cadena sencilla y el de cadena doble sobre los salientes 5' y 3', los cuales son creados frecuentemente en las rupturas de ADN [56,57] (Fig. 5). Se ha estimado que entre el 20 y 50% de los DSBs inducidos por RI requieren de Artemis para su reparación [58,59]. El complejo Artemis-DNA-PKcs remueve endonucleolíticamente los salientes de ADN de 5' y 3' para crear estructuras que puedan ser ligadas por el complejo XRCC4-ADN-LIG4

Las ADN polimerasas Pol  $\mu$  y Pol  $\lambda$  son dos polimerasas de baja fidelidad que participan en NHEJ al interactuar con Ku [60] (Fig. 5). Ambas pueden incorporar nucleótidos de forma dependiente o independiente de una cadena molde, aunque Pol  $\mu$  hace esto último con mayor frecuencia [60–62]. Pol  $\mu$  promueve el ligamiento de los salientes 3' incompatibles añadiendo nucleótidos sin usar una cadena molde y generando regiones de micro-homología que permitan el apareamiento y ligación [63]. Pol  $\lambda$  promueve principalmente la ligación de salientes compatibles que requieren una síntesis de llenado [63,64]. Es decir, cuando los salientes opuestos son apareables pero queda un espacio que debe ser llenado antes de la ligación. Por lo tanto, no es de sorprender que Pol  $\lambda$  tenga muy poco efecto en la unión de salientes 3' que no son apareables ya que no le proveen de una cadena molde [65].

La ADN ligasa IV (*LIG4*) funciona exclusivamente en NHEJ y es considerada como la ligasa catalíticamente más flexible dado que tiene la capacidad para ligar sobre huecos y extremos de ADN incompatibles [51,62]. LIG4 interactúa y forma un complejo con el gen de reparación de rayos X complemento cruzado 4 (XRCC4) y el factor 1 de unión de extremos no homólogos, factor similar a XRCC4 (XLF) (Fig. 5). La interacción con XRCC4 favorece la actividad enzimática de LIG4 [52], mientras que el factor XLF es una proteína que ayuda en la ligación eficiente de los extremos del DSB al facilitar la unión de salientes 5' y 3' incompatibles [63,65].



**Figura 5.** Esquema general de la reparación de rupturas de cadena doble (DSBs) a través del mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ).

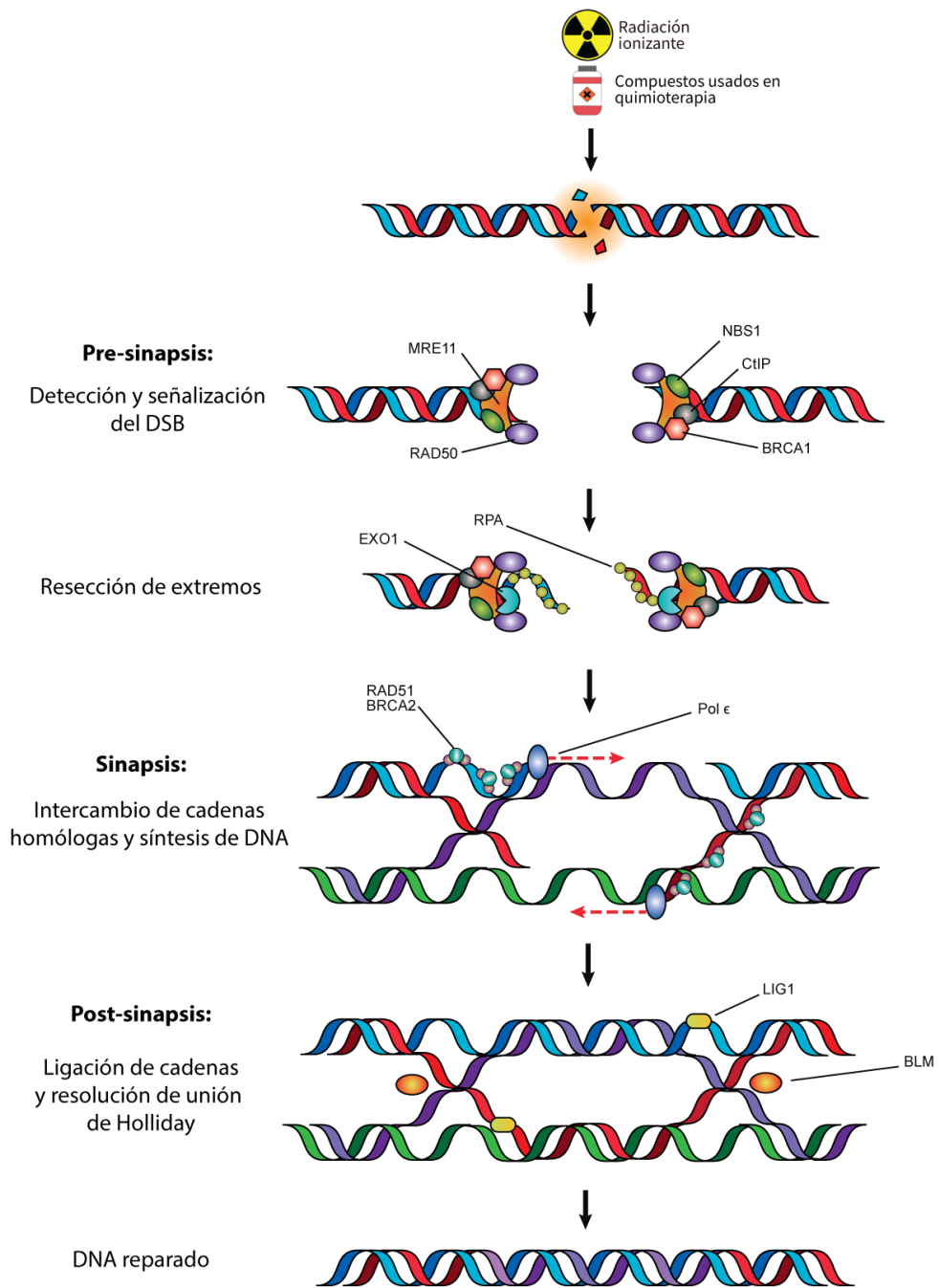
## HRR

Dado que la HRR requiere de la presencia de un cromosoma homólogo sin daño para reparar los DSBs, es generalmente considerado como un mecanismo de reparación libre de errores [66]. Este mecanismo utiliza un molde de ADN para reparar el sitio donde ocurrió el DSB y por lo tanto su actividad está limitada a las fases S y G2 del ciclo celular, una vez que la replicación del ADN ha ocurrido [67].

Se pueden distinguir tres fases principales durante la reparación por HRR: pre-sinapsis, sinapsis y post-sinapsis (Fig. 6). Durante la pre-sinapsis, ocurre la detección del DSB acompañada del procesamiento nucleolítico 5' – 3' de los extremos de ADN de cadena sencilla (ssDNA) a cargo del complejo formado por la nucleasa de reparación de ruptura de doble hebra MRE11A (MRE11A), la proteína reparadora de roturas de doble hebra RAD50 (RAD5) y la nibrina 1 (NBS1) (MRE11A-RAD50-NBS1) (en conjunto: MRN) para generar moléculas con un extremo saliente 3' de ssDNA. El complejo MRN actúa como un sensor de DSBs, como coactivador para la señalización de “checkpoints” del ciclo celular inducidos por la presencia de DSBs y como un efector en la reparación por HRR [68,69]. MRE11A tiene actividad de endonucleasa y exonucleasa [70]. RAD50 posee actividad de ATPasa y adenilato cinasa, estimula la unión a ADN y la actividad nucleasa de MRE11A. NBS1 no presenta actividades enzimáticas pero su reclutamiento a los DSBs es esencial para la activación de ATM y el inicio de la DDR [71,72]. La exonucleasa de EXO1 y el complejo formado por la helicasa de replicación DNA2 (DNA2) y la helicasa BLM (BLM) Dna2/BLM están implicadas en la formación del saliente 3'. La exonucleasa 1 EXO1 es un miembro de la familia de nucleasas XPG, la cual incluye a las nucleasas XPG, FEN1 y GEN1 [73,74]. EXO1 presenta actividad exonucleasa dependiente de doble cadena 5'-3' y actividad endonucleasa específica para estructuras 5'-flap [75,76]. EXO1 es reclutada a los DSBs por medio de la endonucleasa RBBP8 (CtIP) y actúa preferencialmente sobre ADN de doble cadena con extremos 5' resectados producto de la actividad de MRN estimulada por CtIP [77].

Luego del procesamiento nucleolítico, en la fase de sinapsis, los extremos 3' ssDNA son cubiertos por la proteína de replicación A1 (RPA) (Fig. 6). La unión de RPA elimina estructuras secundarias en las secciones de ssDNA, lo cual es necesario para el correcto

ensamblaje de los filamentos de la recombinasa RAD51 [78]. El ssDNA cubierto con RPA es un sustrato importante para el reclutamiento de recombinasas como RAD51 que llevan a cabo el intercambio de las cadenas homólogas de ADN. La presencia de RPA en el 3' ssDNA regula negativamente el ensamblaje de RAD51, por lo que debe ser previamente removido por otras proteínas mediadoras de la recombinación como RAD52, las proteínas asociadas a reparación BRCA1, BRCA2, y otros parálogos de RAD51 como RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3 [78,79]. Las recombinasas clave en eucariontes son DMC1 y RAD51. DMC1 está involucrada principalmente en la recombinación meiótica, mientras que RAD51 es la recombinasa esencial en HRR. Una vez removido RPA, RAD51 interacciona con ssDNA de una forma dependiente de ATP para formar un filamento de nucleoproteína que inicia la búsqueda de homología [67,78,79]. Una vez que se ha identificado el ADN homólogo, RAD51 facilita la invasión de la cadena de ADN en la cual, la cadena de ADN dañada invade el dúplex del ADN molde (Fig. 6). Lo siguiente en ocurrir es la síntesis de ADN a partir del extremo 3' de la cadena que invade por parte de la Pol  $\epsilon$  (*POLE*) seguido de la ligación mediada por LIG1 para generar una estructura temporal conocida como unión de Holliday [80] (Fig. 6). En la fase de post-sinapsis, esta estructura es resuelta de tres posibles maneras, por “disolución” mediada por un complejo formado por la helicasa BLM y la topoisomerasa 3 alfa TOP3A, por un corte simétrico realizado por la endonucleasa de uniones de Holliday GEN1 o las endonucleasas específicas de estructura SLX1/SLX4, o bien finalmente por un corte asimétrico a cargo de la endonucleasa específica de estructura MUS81/EME1 [81–83].



**Figura 6.** Esquema general de la reparación de rupturas de cadena doble (DSBs) a través del mecanismo de recombinación homóloga (HR).

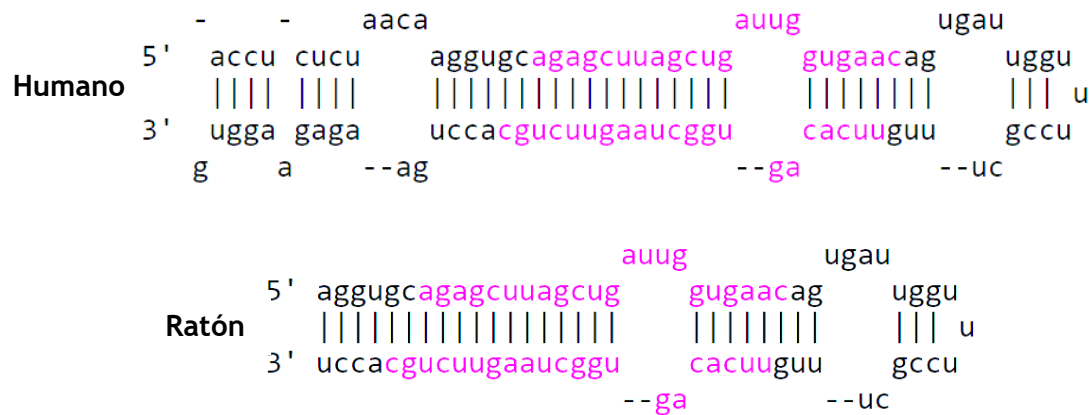
## Antecedentes

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la capacidad que la mezcla de los metales pesados arsénico, cadmio y plomo (As, Cd y Pb, respectivamente) tiene para inducir la transformación morfológica, como una característica de actividad carcinogénica, en un modelo de transformación celular de dos etapas usando fibroblastos murinos embrionarios pertenecientes a la línea celular BALB/c-3T3 A31-1-1 [84]. Dicha mezcla de metales pesados puede alterar múltiples aspectos celulares tales como la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular [85]. Se ha propuesto que los metales pueden generar daño al ADN principalmente a través de la generación de ROS [86,87]. La acumulación de daño en el ADN debido a fallas en los mecanismos de reparación puede conducir a un estado de inestabilidad genómica, el cual es considerado como una característica facilitadora del proceso de carcinogénesis, ya que favorece la generación de mutaciones que facilitan la adquisición de un fenotipo tumoral [88]. Asimismo, en nuestro grupo de trabajo también se ha visto que la exposición a dicha mezcla de metales modifica el perfil de expresión de diversos miRNAs [89], lo cual puede tener como consecuencia la alteración de procesos celulares, incluyendo la reparación del ADN. Por lo anterior, surgió el interés de comenzar a explorar si existe una relación entre los cambios en la expresión de miRNAs y las alteraciones en la capacidad de reparación del daño al ADN, pudiendo así promover la inestabilidad genómica y la transformación celular. Entre los miRNAs sobreexpresados en las células expuestas a la mezcla de As, Cd y Pb se encuentran miR-27b y miR-155 [89]. En este trabajo se estudió el papel de miR-27b y miR-155 en la reparación del daño al ADN.



## miR-27b

miR-27b pertenece a la familia de miRNAs miR-23-27-24, la cual contiene dos parálogos: el clúster miR-23a-27a-24-2 ubicado en el cromosoma 19 en humanos y 8 en ratones, y el clúster miR-23b-27b-24-1 ubicado en el cromosoma 9 en humanos y en el 13 en ratones. Luego del procesamiento por DROSHA y DICER, tanto en humanos como en ratones, la cadena 5p del dúplex de ARN de miR-27b mide 22 nt de longitud mientras que la cadena 3p cuenta con 21 nt (Fig. 7). La cadena 3p de miR-27b tiene un número de genes blanco muy superior al de la cadena 5p [90]. El clúster al que pertenece miR-27b se ubica en una región intrónica del gen de la aminopeptidasa AOPEP [91]. La proteína codificada es una metalopeptidasa dependiente de zinc que cataliza la eliminación de un aminoácido del amino terminal de una proteína o péptido. Se trata de una proteína poco estudiada, pero se cree que puede desempeñar un papel en la generación de angiotensina IV [92]. En cuanto a patologías asociadas con este gen, algunas variantes que causan la pérdida de función de la aminopeptidasa se han asociado con distonía hereditaria [93], sin embargo, no se ha asociado con la reparación del ADN ni con el desarrollo de cáncer.



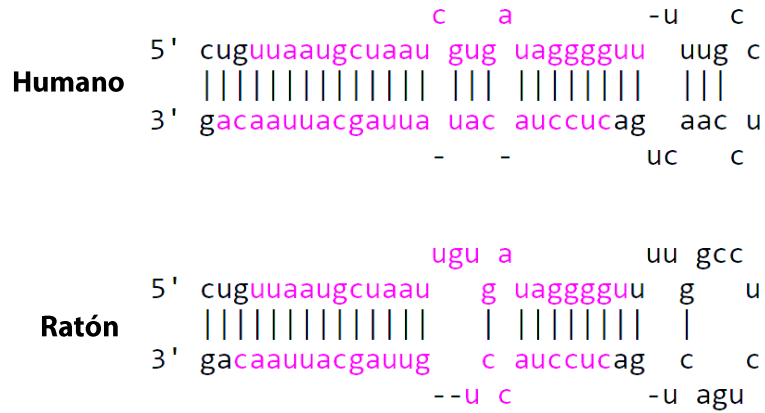
**Figura 7.** Estructura secundaria del hsa-pre-miR-27b-3p (arriba) y del mmu-pre-miR-27b-3p (abajo). En rosa se indica el dúplex de ARN maduro que resulta después del procesamiento por DROSHA y DICER, conformado por las cadenas 5p y 3p. Imágenes tomadas de miRBase.org

Diversos estudios han demostrado que la expresión de miR-27b-3p se encuentra desregulada en distintos tipos de cáncer, por ejemplo, se ha visto que se encuentra sobreexpresado en glioma, cáncer cervical y de mama, mientras que en cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, gástrico, vejiga y leucemia mieloide aguda, se le ha observado subexpresado [94–101]. Los mecanismos detrás de la desregulación de miR-27b-3p no han sido descritos completamente, no obstante, se piensa que tal desregulación es debida principalmente a eventos de pérdida genómica, cambios epigenéticos (metilación del ADN y modificación de marcas de histonas), alteraciones en su regulación transcripcional y vías de señalización involucradas en su expresión [90]. Debido a los diferentes contextos celulares entre tumores, miR-27b-3p ha sido reportado tanto como oncogen/oncomiR [102] y como supresor de tumores [103]. Por ejemplo, de acuerdo con datos del Atlas del Genoma del Cáncer, el promotor de miR-27b-3p está hipermetilado en cáncer de riñón, mientras que en cáncer de hígado los niveles de metilación niveles no presentan cambios [90].

La relación que guarda miR-27b-3p con los mecanismos de reparación del daño al ADN es mayormente desconocida. No obstante, se ha visto que miR-27b pertenece a un grupo de 29 miRNAs cuya biogénesis aumenta con la presencia de daño en el ADN a través de la fosforilación mediada por ATM de KSRP. KSRP puede unirse entonces con gran afinidad al “loop” terminal de determinados pri-miRNAs y pre-miRNAs y promover el procesamiento por parte de DROSHA y DICER facilitando así la biogénesis de los mismos [20]. Se desconoce el efecto que puede tener miR-27b-3p en presencia del daño al ADN.

## miR-155

miR-155 se ubica en un exón del B-cell Integration Cluster (BIC), un ARN no codificante localizado en el cromosoma 21 en humanos y 16 en ratones [104]. Después del procesamiento por DROSHA y DICER, la cadena 5p del dúplex mide 24 nt de longitud en humanos y 23 nt en ratones, mientras que la cadena 3p tiene 22 nt de longitud en humanos y 21 nt en ratones (Fig. 8).



**Figura 8.** Estructura secundaria del hsa-miR-155-5p (arriba) y el mmu-miR-155-5p (abajo). En rosa se indica el dúplex de ARN maduro que resulta luego del procesamiento por DROSHA y DICER, conformando por las cadenas 5p y 3p. Imágenes tomadas de miRBase.org

Debido a que miR-155-5p se encuentra frecuentemente sobreexpresado en células cancerosas, se le ha considerado como un oncomiR con un papel importante en el desarrollo de diversos tipos de cáncer tales como linfoma, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, colon, cervical, páncreas, pulmón y tiroides [105–110].

En lo que respecta a su relación con la reparación del daño al ADN, algunos estudios sugieren que miR-155 podría regular negativamente los mecanismos HRR y MMR ya que se ha demostrado que puede regular directamente la expresión de genes como RAD51, MLH1, MSH2 y MSH6 además de reprimir indirectamente la expresión de la subunidad catalítica de POLD1, una enzima de alta fidelidad activa en los mecanismos de reparación BER y NER por medio de la regulación negativa del factor de transcripción FOXO3a [111–113]. Además, se ha visto que la sobreexpresión de miR-155 en células de glioma es dependiente de DNA-PKcs [114], quien, como se ha mencionado, funciona

como transductor en la señalización de NHEJ. La cadena 5p del miR-155 tiene una expresión hasta 200 veces más elevada que la cadena 3p [115] y, de igual manera, el número de genes blanco putativos para miR-155-5p supera al de miR-155-3p.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de miR-27b-3p y miR-155-5p en la regulación de los mecanismos de reparación del ADN.

### Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de miR-27b-3p y miR-155-5p sobre la capacidad de reparación del daño al ADN.
- Determinar si existen genes involucrados en la reparación del ADN que puedan ser regulados por miR-27b-3p y miR-155-5p.
- Evaluar si la sobreexpresión de miR-27b-3p y miR-155-5p modifica la expresión de genes involucrados en los mecanismos de reparación del ADN.
- Elaborar un artículo de revisión sobre la función de los miRNAs en la reparación de DSBs a través de los mecanismos de reparación HRR y NHEJ.

## HIPÓTESIS

El aumento en la expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p causa la disminución de la capacidad de reparación del daño al ADN a través de la regulación negativa de genes involucrados en los mecanismos de reparación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Compuestos químicos

Ácido bórico y cloruro de sodio (pureza 99.99%, Cat. 0084, 3624-01) fueron adquiridos de J. T. Baker (México), hidróxido de sodio (pureza 99%, Cat. 106462) obtenido de Merck (Alemania), Tris-Base (Cat. H5131) adquirido de Promega (EUA). Acido etilendiaminotetraacético sal disódica dihidrato (EDTA disódico) (Cat. E-5134), agarosa de bajo punto de fusión (LMP) (Cat. A-9414), agarosa regular (Cat. A-6877), bromuro de etidio (Cat. E-8751), cloruro férrico (Cat. 451649), dimetil sulfóxido (DMSO) (Cat. D-5879), clorhidrato de doxorrubicina (Cat. D-1515), diacetato de fluoresceína (FDA) (Cat. F-7378) y Triton X-100 (Cat. T-9284) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, EUA. Antibiótico-antimicótico (Cat. 15240062), suero fetal bovino (SFB) (Cat. 1524006) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium de alta glucosa (Cat. 12100046) adquiridos a través de ThermoFisher Scientific.

### Línea celular y condiciones de cultivo

Se emplearon fibroblastos embrionarios murinos de la línea celular BALB/c-3T3 A31-1-1 adquirida a través de la Colección Americana de Cultivos Celulares en 2009 (ATCC, Cat. CCL-163). Este fue el mismo tipo celular empleado en el ensayo de transformación celular donde se observó originalmente la desregulación de miRNAs por la exposición a la mezcla de As, Cd y Pb. La línea celular ha sido mantenida en criopreservación con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium de alta glucosa (Cat. 12100046, ThermoFisher Scientific) suplementado con DMSO 5% en nitrógeno líquido. Los cultivos celulares se realizaron con DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Cat. 1524006, ThermoFisher Scientific) y 1% de antibiótico-antimicótico (Cat. 15240062, ThermoFisher Scientific) en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los experimentos se llevaron a cabo con pases tempranos (5 a 6) de subcultivo.

## Transfección de miRNAs

Las células BALB/c-3T3 fueron transfectadas con secuencias mimetizadoras (mimics) para hsa-miR-27b-3p y hsa-miR-155-5p, así como con una secuencia inhibitoria de la expresión de miR-27b-3p (anti-miR-27b-3p) (Ambion, EUA) empleando el agente de transfección siPORT™ NeoFX™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Lituania) de acuerdo al protocolo del fabricante empleando siempre una cantidad de células de  $2.4 \times 10^5$  y una concentración final de las secuencias mimics e inhibitoria fue de  $0.75 \mu\text{M}$ . Las secuencias usadas fueron las siguientes:

hsa-miR-27b-3p:	3'-UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC-5'
mimic:	3'-UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC-5'
inhibidor:	5'-TTGUGUCACCGAUUCAAGACG-3'
hsa-miR-155-5p:	5'-UUA AUGC UAAUCGUGAUAGGGGUU-3'
mimic:	5'-UUA AUGC UAAUCGUGAUAGGGGUU-3'

## Extracción de ARN

Se extrajo ARN total tanto de células transfectadas como no transfectadas por medio del kit LEV simplyRNA Cells (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el equipo de extracción automatizado Maxwell 16 Instrument (Promega). El ARN total se extrajo 24 horas después de la transfección para evaluar la expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p, así como de genes de reparación de ADN. De igual forma, se extrajo ARN 48 h después de la exposición a DOX para evaluar la expresión de los genes de reparación durante la reparación de las lesiones al ADN inducidas por la DOX. El ADN genómico fue eliminado de las muestras usando DNasa I incluida en los cartuchos del kit. Se midió la pureza del ARN extraído midiendo la densidad óptica de las muestras a 260 / 280 nm, la cual se mantuvo dentro del rango de 1.9 a 2.2 para todas las muestras. La pureza y cuantificación del ARN se realizó utilizando el equipo Multiskan GO (ThermoFisher).

## Evaluación de la expresión de miR-27b y miR-155 en células transfectadas

Para verificar la eficacia de la transfección, se analizó la expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p en las células transfectadas y se comparó con la expresión en células no transfectadas. Tal determinación se llevó a cabo por RT-qPCR 24 horas después de la transfección usando el kit TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems™, EUA) el cual contiene primers específicos para hsa-miR-27b-3p y hsa-miR-155-5p siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó un termociclador TC-512 (Techne) para la reacción de transcripción reversa y síntesis de cDNA y un termociclador con sistema de detección para PCR en tiempo real Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). Los datos de expresión fueron analizados de acuerdo al método de comparación del *Cycle threshold* (Ct) de cada condición y se realizaron pruebas de *t* de Student ( $p < 0.05$ ) con los valores  $2^{-\Delta CT}$  promedio provenientes de las réplicas de cada condición [116]. Se utilizó al gen nucleolar *Rnu6* como gen endógeno para la normalización de valores de expresión.

## Tratamiento con agentes de daño al ADN

### *Agentes de daño, dosis y concentraciones*

Para determinar si los cambios en la expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p alteraban la capacidad de reparación del daño al ADN, se indujeron lesiones en el ADN de las células transfectadas y control (agente de transfección sin mimics) a través de la exposición a diferentes agentes de daño. Los agentes utilizados fueron: cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ , Sigma-Aldrich, 451649), doxorubicina (DOX) (clorhidrato de doxorubicina, Sigma-Aldrich D-1515), luz ultravioleta (UV) y radiación ionizante (RI). Cada uno de estos agentes produce distintos tipos de lesiones en el ADN, los cuales a su vez son reparados por diferentes mecanismos de reparación (Tabla 1). Las dosis y concentraciones utilizadas de radiación UV, RI y DOX fueron determinadas por medio de curvas dosis-respuesta. En el caso del  $\text{FeCl}_3$  se utilizó la misma concentración empleada en trabajos previos del grupo de trabajo. Se eligieron aquellas que generaran un daño significativo en el ADN y que no redujeron la viabilidad celular por debajo del 70%. La viabilidad

celular fue determinada por medio de tinción doble con diacetato de fluoresceína (FDA) (5 mg/ml) y bromuro de etidio (BrEt) (0.2 mg/ml). De esta forma, las células intactas (vivas) aparecen verdes y las células con la membrana dañada (muertas) aparecen rojas [117,118].

**Tabla 1.** Mecanismos y concentraciones empleadas de los agentes de daño al ADN.

Agente	Tipo de daño sobre el ADN	Mecanismo involucrado	Dosis / concentración	Viabilidad (FDA/BrEt) (%)
Luz UV	6-4PPs y CPDs	NER	126 mJ	75±4
FeCl <sub>3</sub>	Oxidación de bases del ADN por producción de ROS	BER	100 µM / 1 hora	89±6
Radiación ionizante	DSBs, SSBs, oxidación de bases por producción de ROS	HRR, NHEJ, BER	7.5 Gy	77±6
Doxorrubicina	DSBs debido a la inhibición de topoisomerasas tipo II, oxidación de bases por producción de ROS	HRR, NHEJ, BER	50 µM / 1 hora	78±5

6-4PPs: fotoproductos 6-4 pirimidina-pirimidona; CPDs: dímeros ciclobutano-pirimidina (*cyclobutane pyrimidine dimers*); ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*); DSBs: cortes de cadena doble (*double-strand breaks*); SSBs: cortes de cadena sencilla (*single-strand breaks*); NER: reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*); BER: reparación por escisión de bases (*base excision repair*); NHEJ: unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*); HR: reparación por recombinación homóloga (*homologous recombination repair*).

### Exposición e intervalos de evaluación del daño al ADN

El tratamiento con los agentes de daño se llevó a cabo 24 h después de la transfección, puesto que es el tiempo, establecido en el protocolo de transfección del fabricante, a partir del cual se puede trabajar con las células transfectadas. A las células que serían tratadas con FeCl<sub>3</sub> y DOX, se les retiró el medio de cultivo y se sustituyó con medio fresco con la concentración especificada de cada compuesto. Las células permanecieron en incubación (37°C) durante una hora en presencia del compuesto, tras lo cual, se les retiró nuevamente el medio de cultivo y se les colocó medio fresco. Fueron guardadas en incubación durante los intervalos de tiempo mencionados en la Tabla 1. En el caso de las células que serían expuestas a UV, las cajas de cultivo conteniendo las células, fueron colocadas dentro de un irradiador UV (Crosslinker UVC-500, Hoefler) para recibir



la dosis de UV correspondiente. Respecto a las células que serían tratadas con RI, las cajas de cultivo fueron transportadas a un irradiador Gammacell-1000 con una fuente radioactiva de Cesio-137 donde recibieron la dosis correspondiente. Luego del tratamiento con UV y RI, a estas células se les realizó un cambio de medio de cultivo y fueron guardadas en incubación durante los tiempos correspondientes (Tabla 2).

**Tabla 2.** Intervalos de tiempo para la evaluación del daño al ADN posteriores a la exposición a los agentes de daño.

Agente	Intervalos de tiempo
FeCl <sub>3</sub>	0 h (daño inducido), 1 h, 24 h
UV	0 h (daño inducido), 1 h, 24 h
RI	0 h (daño inducido), 1 h, 24 h
DOX	24 h (daño inducido), 36 h, 48 h

### Evaluación de la capacidad de reparación del daño al ADN por medio del ensayo Cometa

El nivel de daño en las células transfectadas y control (tratadas únicamente con el agente de transfección siPORT sin mimics) se evaluó por medio del ensayo cometa en dos modalidades: alcalino (pH > 13) y neutro (pH = 8.5). Se determinó el nivel de daño en cada uno de los intervalos de tiempos señalados posteriores a la exposición a los agentes.

Para la realización del ensayo cometa, las células provenientes de las distintas condiciones y tratamientos fueron suspendidas en agarosa de LMP 0.5% y dispuestas sobre portaobjetos de 76 x 26 mm (Knittel Glass, Alemania) previamente preparados con una capa de agarosa regular 0.5%. Se colocó encima un cubreobjetos de 24 x 50 mm (Corning™) y se guardaron durante 5 minutos a 4° C. Una vez que la agarosa que contenía las células se solidificó, se retiró el cubreobjetos y se añadió una segunda capa de agarosa LMP 0.5%, se colocó encima otro cubreobjetos y se guardó durante otros 5 minutos a 4°C. Luego de que la segunda capa de agarosa LMP se solidificó, las laminillas se introdujeron en una solución de lisis fría preparada con 45 ml de solución stock de

lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA disódico, 10 mM Tris-Base), 4 ml de DMSO y 400 µl de Triton X-100 en tubos Coplin durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, las laminillas se sumergieron en un búfer de electroforesis alcalino (NaOH 300 mM, 1 mM EDTA disódico) o neutro (90 mM de ácido bórico, 5 mM EDTA disódico, 117 mM Tris-Base) durante 20 minutos (alcalino) o 45 minutos (neutro) para permitir el desenrollamiento de la cromatina. Luego de este periodo de tiempo, se llevó a cabo la electroforesis durante 20 minutos a 300 mA y 25 V (0.8 V/cm<sup>2</sup>) para el caso del cometa alcalino y 20 mA / 25 V (0.05 V/cm<sup>2</sup>) en el caso del cometa neutro. Luego de la electroforesis, las laminillas se lavaron con buffer de neutralización pH 7.5 (Tris-Base 0.4 M) y se fijaron con etanol 96%. Una vez secas las laminillas se tiñeron con 15 µl de bromuro de etidio (2 µg/ml) y se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60, Japón) con un filtro de excitación de 515 – 560 nm y un objetivo de 20X. El microscopio estaba conectado a una cámara CCD (Hitachi KP-M1AN, Japón) para el análisis de los cometas con el software de análisis Komet v5.0. Se elaboraron al menos dos laminillas por condición y se analizaron 50 cometas en cada una para un total de 100 cometas por condición. Se realizaron al menos tres réplicas experimentales. Se compararon los valores de Olive Tail Moment (OTM) [119] en cada intervalo de tiempo entre las células transfectadas y no transfectadas para determinar diferencias en la capacidad de reparación. El parámetro OTM representa el producto del porcentaje del ADN total en la cola por la distancia entre los centros de masa de la cabeza y la cola del cometa [OTM = (promedio cola – promedio cabeza) x % ADN en la cola]. Los valores de OTM de cada condición se compararon usando pruebas de ANOVA y comparación múltiple de Dunnet ( $p < 0.05$ ).

### **Análisis *in silico* para la búsqueda de genes predichos como blanco de miR-27b-3p y miR-155-p**

Para conocer los genes blanco putativos de miR-27b-3p y miR-155-5p que participan en mecanismos de reparación del ADN, primero se obtuvo la lista de genes agrupados dentro del término “DNA repair” de acuerdo a la base de datos Gene Ontology [120]. Dicha lista fue utilizada en la plataforma electrónica miRWalk 2.0 [121] para buscar interacciones predichas entre miR-27b-3p / miR-155-5p y genes de reparación. Para dicha búsqueda se utilizaron los siguientes parámetros: región de interacción con el

mRNA ya sea en secuencia codificante (CDS), 5'-UTR ó 3'-UTR, valor mínimo de  $p$  de 0.05, longitud mínima de la región semilla de 7 nt, se incluyeron todas las bases de datos disponibles al momento de la búsqueda (miRWalk, miRDB, PITA, MicroT4, miRMap, RNA22, miRanda, miRNAMap, RNAhybrid, miRBridge, PICTAR2 y TargetScan). Se consideraron sólo aquellos genes que resultaran predichos en al menos la mitad de las bases de datos especificadas en la búsqueda.

### Análisis de la expresión de genes de reparación del ADN

Para determinar la expresión de genes de reparación del ADN en las células transfectadas y control, primero se sintetizó el ADN complementario a partir del ARN total extraído usando el kit *RT2 First Strand* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Para esto, se utilizaron alícuotas de 0.5 ug de ARN total provenientes de cada muestra. Se determinaron los niveles de expresión de 84 genes de reparación de ADN por medio de PCR en tiempo real usando el arreglo *DNA Damage Signaling Pathway RT<sup>2</sup> Profiler* (PAMM-029ZF, Qiagen) con base en las instrucciones del fabricante. Los genes de reparación incluidos en el arreglo fueron los siguientes:

	<b>Gen</b>	<b>Descripción</b>
1	<i>Abl1</i>	Protooncogén ABL 1
2	<i>Apex1</i>	Endodesoxirribonucleasa 1 apurínica/apirimidínica
3	<i>Atm</i>	ATM Serina/Treonina Quinasa
4	<i>Atr</i>	ATR Serina/Treonina Quinasa
5	<i>Atrx</i>	Remodelador de cromatina ATRX
6	<i>Bax</i>	BCL2 asociado X, regulador de apoptosis
7	<i>Blm</i>	BCL2 asociado X, regulador de apoptosis
8	<i>Brca1</i>	Reparación de ADN BRCA1 asociada
9	<i>Brca2</i>	Reparación de ADN BRCA2 asociada
10	<i>Brip1</i>	Helicasa 1 que interactúa con BRCA1
11	<i>Cdc25a</i>	Ciclo de división celular 25A
12	<i>Cdc25c</i>	Ciclo de división celular 25C
13	<i>Cdkn1a</i>	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A
14	<i>Chek1</i>	Quinasa de punto de control 1
15	<i>Chek2</i>	Quinasa de punto de control 2
16	<i>Dclre1a</i>	Reparación de enlaces cruzados de ADN 1A

17	<i>Ddb2</i>	Proteína de unión a ADN específica de daño 2
18	<i>Ddit3</i>	Transcripción inducible del daño del ADN 3
19	<i>Ercc1</i>	Reparación por escisión 1 de ERCC, subunidad no catalítica de endonucleasa
20	<i>Ercc2</i>	ERCC Excision Repair 2, TFIIH Core Complex Helicase Subunit
21	<i>Exo1</i>	Exonucleasa 1
22	<i>Fanca</i>	FA Complementación Grupo A
23	<i>Fancc</i>	FA Complementación Grupo C
24	<i>Fancd2</i>	FA Complementación Grupo D2
25	<i>Fancg</i>	FA Complementación Grupo G
26	<i>Fen1</i>	Endonucleasa 1 específica de la estructura del colgajo
27	<i>Gadd45a</i>	Alfa inducible de detención del crecimiento y daños en el ADN
28	<i>Gadd45g</i>	Gamma inducible de detención del crecimiento y daño del ADN
29	<i>H2afx</i>	Histona variante H2A.X
30	<i>Hus1</i>	Componente de abrazadera de punto de control HUS1
31	<i>Lig1</i>	ADN ligasa 1
32	<i>Mbd4</i>	Dominio 4 de unión a metil-CpG, ADN glicosilasa
33	<i>Mcph1</i>	Microcefalina 1
34	<i>Mdc1</i>	Mediador del punto de control 1 del daño del ADN
35	<i>Mgmt</i>	O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa
36	<i>Mif</i>	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
37	<i>Mlh1</i>	Homólogo MutL 1
38	<i>Mlh3</i>	Homólogo MutL 3
39	<i>Mpg</i>	N-metilpurina ADN glicosilasa
40	<i>Mre11a</i>	Homólogo MRE11, nucleasa de reparación de ruptura de doble hebra
41	<i>Msh2</i>	MutS homólogo 2
42	<i>Msh3</i>	MutS homólogo 3
43	<i>Nbn</i>	nibrina
44	<i>Nthl1</i>	Nth Like DNA Glicosilasa 1
45	<i>Ogg1</i>	8-oxoguanina ADN glicosilasa
46	<i>Parp1</i>	Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 1
47	<i>Parp2</i>	Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa 2
48	<i>Pcna</i>	Antígeno nuclear de células en proliferación
49	<i>Pms2</i>	PMS1 Homolog 2, componente del sistema de reparación de errores de coincidencia
50	<i>Pole</i>	ADN polimerasa épsilon, subunidad catalítica
51	<i>Polh</i>	ADN polimerasa Eta
52	<i>Poli</i>	ADN polimerasa Iota
53	<i>Ppm1d</i>	Proteína Fosfatasa, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> Dependiente 1D
54	<i>Ppp1r15a</i>	Proteína Fosfatasa 1 Subunidad Reguladora 15A
55	<i>Prkdc</i>	Proteína quinasa, subunidad catalítica activada por ADN
56	<i>Pttg1</i>	Regulador PTTG1 de separación de cromátidas hermanas, Securin
57	<i>Rad1</i>	Exonucleasa de ADN de punto de control RAD1
58	<i>Rad17</i>	RAD17 Componente de cargador de abrazadera de punto de control

59	<i>Rad18</i>	RAD18 E3 Ubiquitina Proteína Ligasa
60	<i>Rad21</i>	Componente complejo de cohesina RAD21
61	<i>Rad50</i>	Proteína reparadora de roturas de doble hebra RAD50
62	<i>Rad51</i>	Recombinasa RAD51
63	<i>Rad51c</i>	RAD51 Paralog C
64	<i>Rad51l1</i>	Transcripción de novela, antisentido para RAD51L1
65	<i>Rad52</i>	Homólogo RAD52, proteína reparadora de ADN
66	<i>Rad9</i>	Abrazadera de punto de control RAD9 Componente A
67	<i>Rev1</i>	Polimerasa dirigida por ADN REV1
68	<i>Rnf8</i>	Proteína del dedo anular 8
69	<i>Rpa1</i>	Proteína de replicación A1
70	<i>Smc1a</i>	Mantenimiento estructural de los cromosomas 1A
71	<i>Smc3</i>	Mantenimiento estructural de los cromosomas 3
72	<i>Sumo1</i>	Pequeño modificador similar a la ubiquitina 1
73	<i>Terf1</i>	Factor de unión de repetición telomérica 1
74	<i>Topbp1</i>	ADN topoisomerasa II proteína de unión 1
75	<i>Trp53</i>	Proteína tumoral P53
76	<i>Trp53bp1</i>	Proteína tumoral P53 Proteína de unión 1
77	<i>Ung</i>	Uracilo ADN Glicosilasa
78	<i>Wrn</i>	WRN RecQ como helicasa
79	<i>Xpa</i>	XPA, factor de reparación y reconocimiento de daños en el ADN
80	<i>Xpc</i>	Subunidad del complejo XPC, factor de reparación y reconocimiento de daños en el ADN
81	<i>Xrcc1</i>	Complemento cruzado de reparación de rayos X 1
82	<i>Xrcc2</i>	Complemento cruzado de reparación de rayos X 2
83	<i>Xrcc3</i>	Complemento cruzado de reparación de rayos X 3
84	<i>Xrcc6</i>	Complemento cruzado de reparación de rayos X 6

El análisis de los datos se llevó a cabo por el método de comparación del *Cycle threshold* (Ct) a través de la plataforma del Centro de Análisis de Datos de Qiagen. Los valores de expresión fueron normalizados respecto a la expresión de cinco genes endógenos (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* y *Hsp90ab1*) incluidos en el arreglo de PCR. Se estableció un umbral de expresión de veces de cambio o *Fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) igual a 2 (2-fold) para considerar a los genes como sobreexpresados o subexpresados.

## **Análisis de enriquecimiento de vías e interacción de proteínas**

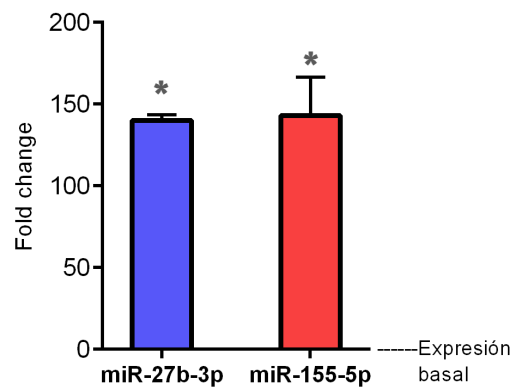
Los genes que resultaron subexpresados (2-fold) en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p, fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento de vías en la plataforma web *Reactome* [122], esto permitió determinar los procesos celulares más representados por dichos genes. Se estableció un umbral de probabilidad mínimo de  $1 \times 10^{-10}$  para considerar a los procesos como representativos.

Por otra parte, las proteínas de los genes diferencialmente expresados entre las células tratadas con DOX y las células que sobreexpresaban miR-27b-3p igualmente tratadas con DOX, fueron sometidos a un análisis en la base de datos STRING [123] para conocer las interacciones entre las proteínas y los procesos mayormente enriquecidos funcionalmente.

## RESULTADOS

### Expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p

Para corroborar que la transfección de las secuencias mimetizadoras de miR-27b-3p y miR-155-5p resultaba en la sobreexpresión de dichos miRNAs, se analizó su expresión en las células transfectadas y no transfectadas y se compararon con los niveles de expresión basal. Como se esperaba, la transfección generó un incremento significativo en la expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p (Fig. 9).

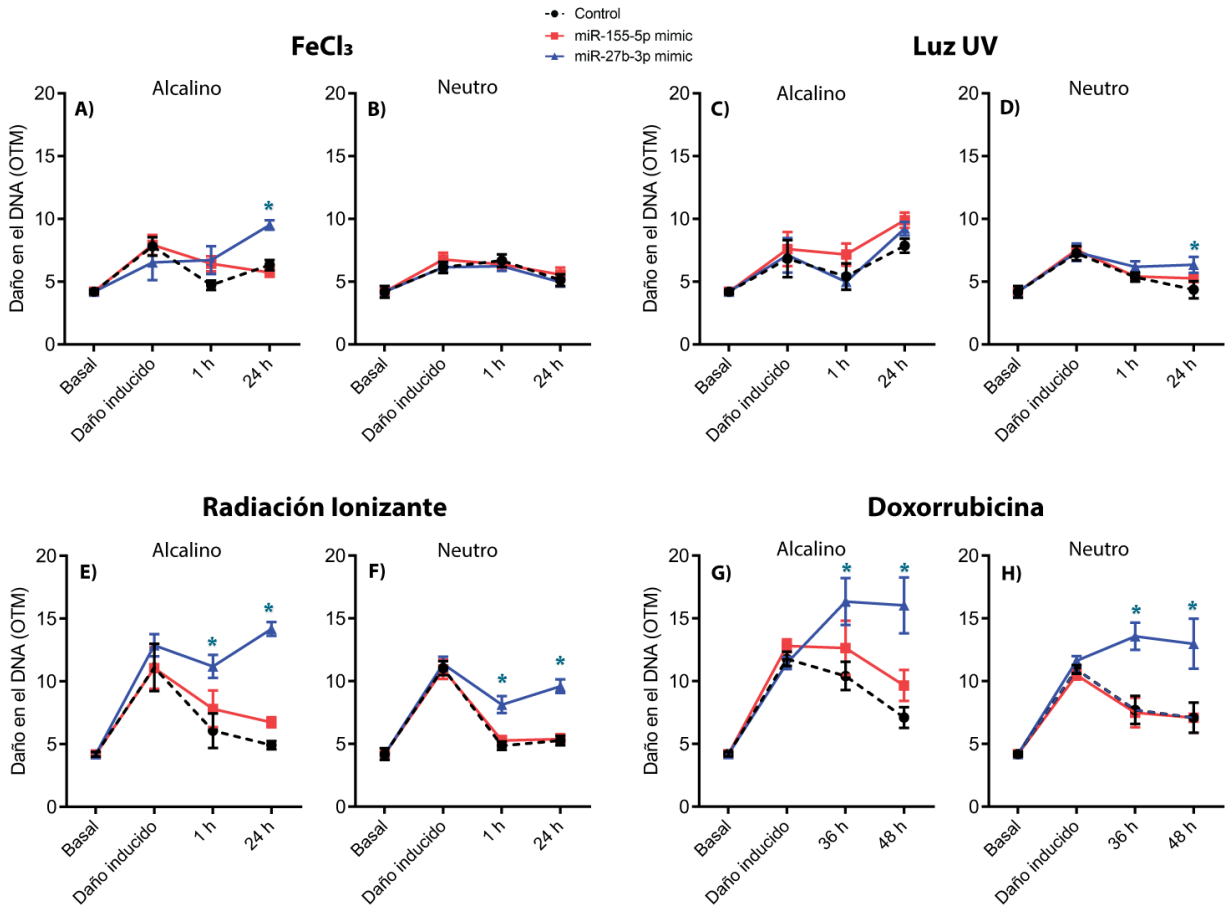


**Figura 9.** Expresión de miR-27b-3p y miR-155-5p en células transfectadas con las secuencias mimetizadoras de cada miRNA. Se muestran los valores de expresión relativa o *Fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) media y desviación estándar de tres réplicas. Se empleó *Rnu6* como gen endógeno para la normalización de datos por el método comparativo de *Cycle threshold* (Ct). (\*) Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con la expresión en células no transfectadas (expresión basal) con base en pruebas de *t* de Student.

### Evaluación del daño en el ADN

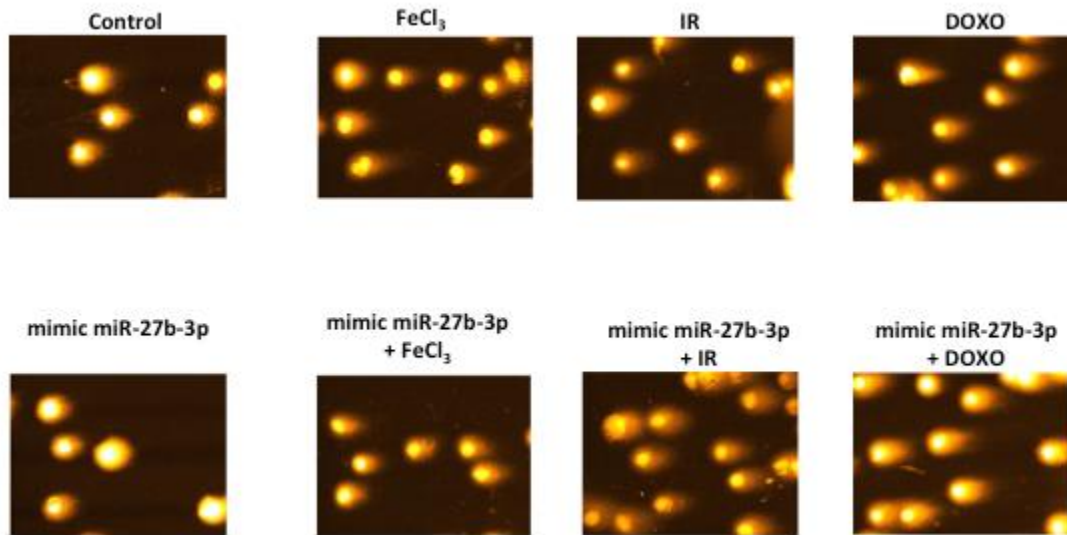
Los datos obtenidos en el ensayo cometa, mostraron que las células transfectadas con miR-27b-3p mantuvieron valores de OTM superiores a los de las células no transfectadas en los intervalos de tiempo posteriores a los tratamientos con FeCl<sub>3</sub>, UV, RI y DOX (Fig. 10). Esta diferencia en los niveles de daño en el ADN sugería una inhibición de los mecanismos de reparación por parte de miR-27b-3p.

El efecto más evidente de la sobreexpresión de miR-27b-3p sobre los niveles de daño al ADN se observó en las células tratadas con FeCl<sub>3</sub>, RI y DOX (Fig. 10 – A, E, F, G, H). Considerando el tipo de lesiones al ADN generados por estos agentes y los mecanismos de reparación asociados, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de miR-27b-3p probablemente genera una disminución en la actividad de BER y HRR / NHEJ, los mecanismos encargados de reparar las lesiones causadas por estos agentes, mediante la alteración de la expresión de genes involucrados en tales procesos. Por su parte, la sobreexpresión de miR-155-5p no generó ningún cambio en la capacidad de reparación del ADN en nuestro modelo (Fig. 10).



**Figura 10.** La sobreexpresión de miR-27b-3p disminuye la capacidad de reparación del ADN. Evaluación de los niveles de daño en el ADN inducido por cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>), luz ultravioleta (UV), radiación ionizante y doxorrubicina en células transfectadas con miR-27b-3p (azul), miR-155-5p (rojo) y no transfectadas (negro). Unidades de daño al DNA expresadas como Olive Tail Moment (OTM) media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres réplicas experimentales. (\*) Diferencia estadísticamente significativa en comparación con la condición sin transfectar en el mismo intervalo de tiempo con base en pruebas de ANOVA y comparación múltiple de Dunn ( $p < 0.05$ ).



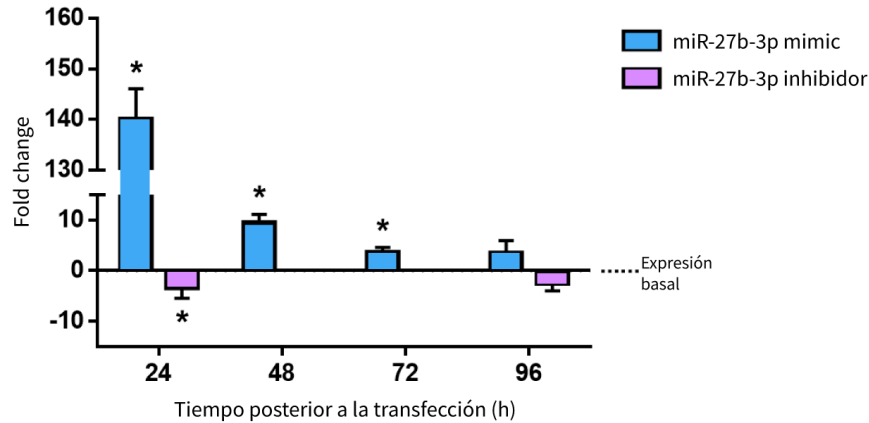


**Figura 11.** Imágenes representativas del daño al ADN detectado en el ensayo cometa. Imagen tomada del artículo derivado de este proyecto. IR: radiación ionizante; DOXO: doxorubicina; FeCl<sub>3</sub>: cloruro férrico.

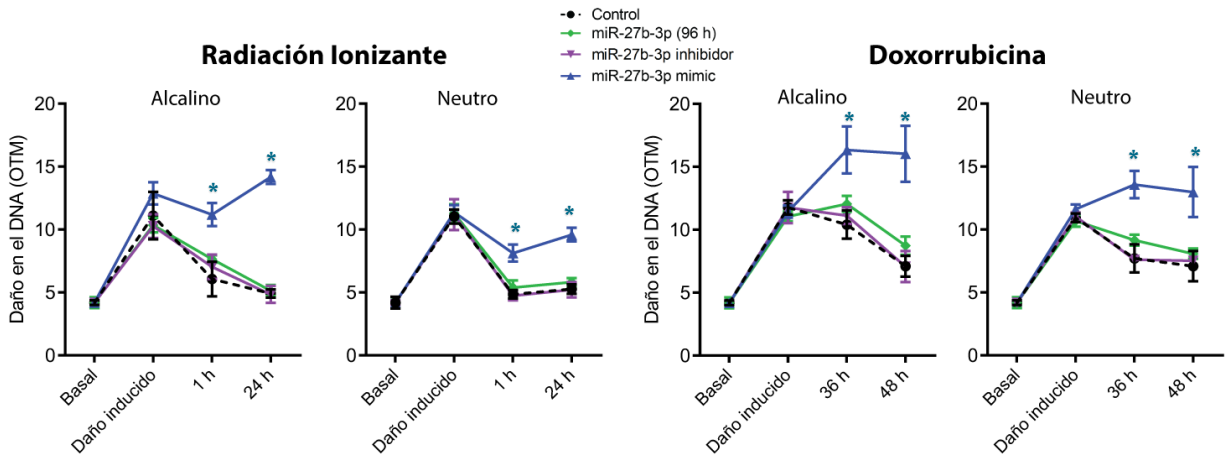
Por otro lado, para conocer si la inhibición de miR-27b-3p generaba un impacto sobre los niveles de daño en el ADN que sugiriera un efecto sobre la capacidad de reparación del ADN, distinto al efecto observado cuando el miRNA estaba sobreexpresado, evaluamos la capacidad de reparación del ADN en células transfectadas con un inhibidor de miR-27b-3p. Estas células fueron tratadas con RI y DOX, agentes con los que el efecto de la sobreexpresión de miR-27b-3p resultó más evidente en ambas modalidades del ensayo cometa. Las células fueron tratadas 24 horas después de la transfección con el inhibidor, momento en que la expresión de miR-27b-3p era significativamente más baja que el nivel basal (Fig. 12). La inhibición de miR-27b-3p no generó cambios en la capacidad de reparación del daño al ADN (Fig. 13).

Adicionalmente, para corroborar que el efecto de miR-27b-3p sobre el nivel de daño al ADN es dependiente de la sobreexpresión de dicho miRNA, evaluamos la cantidad de daño generado por RI y DOX una vez que la expresión de miR-27b-3p, en las células transfectadas con la secuencia mimic, había regresado a niveles próximos al basal. Este lapso se determinó analizando la expresión de miR-27b-3p a distintos intervalos posteriores a la transfección. Encontramos que el nivel de expresión de dicho miRNA ya

no era significativamente distinto al nivel de expresión basal cuando han pasado 96 horas posteriores a la transfección (Fig. 12). No se encontraron diferencias en la capacidad de reparación del ADN 96 horas después de la transfección con miR-27b-3p (Fig. 13). Estos resultados indicaron que únicamente la sobreexpresión activa de miR-27b-3p genera un aumento en los niveles de daño al ADN, sugiriendo así que la sobreexpresión de dicho miRNA causa alteraciones en la capacidad de reparación del ADN.



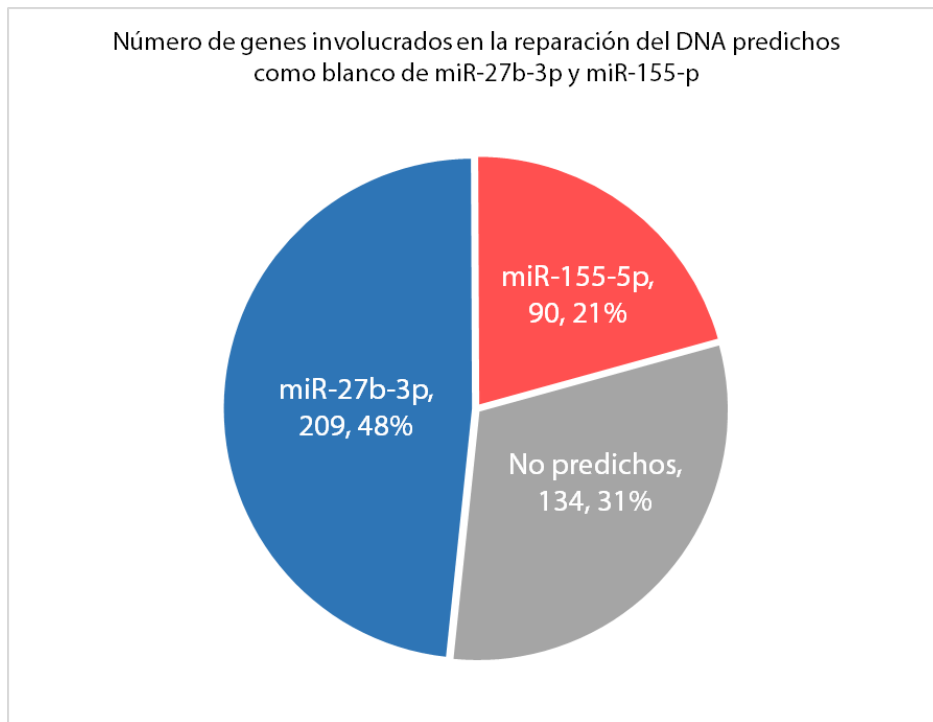
**Figura 12.** Expresión de miR-27b-3p en distintos intervalos de tiempo posteriores a la transfección con el inhibidor y secuencias mimetizadora. Se muestran los valores de expresión relativa o *Fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) media y desviación estándar de tres réplicas. Se empleó *Rnu6* como gen endógeno para la normalización de datos por el método Ct comparativo. (\*) Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con la expresión basal en células no transfectadas de acuerdo con pruebas de *t* de Student.



**Figura 13.** Únicamente la sobreexpresión activa de miR-27b-3p genera alteraciones en la capacidad de reparación del ADN. Evaluación de los niveles de daño en el ADN inducido por radiación ionizante y doxorubicina en células que sobreexpresan (azul) miR-27b-3p, células transfectadas con el inhibidor de miR-27b-3p (púrpura), así como células que regresaron a niveles de expresión basales del miRNA (96 h después de la transfección con secuencias mimic de miR-27b-3p) (verde). Unidades de daño al DNA expresadas como Olive Tail Moment (OTM) media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres réplicas. (\*) Diferencia estadísticamente significativa en comparación con la condición control (línea discontinua negra) en el mismo intervalo de tiempo ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con pruebas de ANOVA y comparación múltiple de Dunn.

## Búsqueda de genes predichos como blanco de miR-27b-3p y miR-155

Como primera aproximación para conocer si miR-27b-3p y miR-155-5p podrían regular genes involucrados en la reparación del ADN, se realizó un análisis *in silico* utilizando diferentes bases de datos disponibles en línea para buscar genes predichos como blancos de los miRNAs mencionados. De acuerdo con este análisis, existen 209 genes de reparación del ADN que podrían ser regulados por miR-27b-3p (Fig. 14; Tabla 3). Este número representa el 48% del total de genes (433) clasificados dentro del término de *DNA Repair* de Gene Ontology. En contraste, se encontraron 90 genes predichos como blancos putativos de miR-155-5p, lo que representa el 21% del total de genes en la categoría de *DNA Repair* (Fig. 14; Tabla 4).



**Figura 14.** Proporción de genes clasificados con el término *DNA repair* de Gene Ontology predichos como blancos putativos de miR-27b-3p y miR-155-5p. Datos obtenidos con base en un análisis *in silico* para la búsqueda de interacciones predichas miRNA - mRNA.

**Tabla 3.** Genes clasificados dentro del término *DNA Repair* de Gene Ontology predichos como blancos putativos de miR-27b-3p.

<i>ABL1</i>	<i>CCNO</i>	<i>EEPD1</i>	<i>FBXO18</i>	<i>KIN</i>	<i>NSMCE1</i>	<i>PPP4C</i>	<i>RNASEH2A</i>	<i>STUB1</i>	<i>UBR5</i>
<i>ACTL6A</i>	<i>CDC14B</i>	<i>EGFR</i>	<i>FBXO6</i>	<i>LIG1</i>	<i>NUCKS1</i>	<i>PPP4R2</i>	<i>RNF111</i>	<i>SUPT16</i>	<i>UHRF1</i>
<i>AP5Z1</i>	<i>CDC7</i>	<i>EME2</i>	<i>FIGN</i>	<i>LIG3</i>	<i>NUDT16L1</i>	<i>PRKDC</i>	<i>RNF168</i>	<i>SWSAP1</i>	<i>UIMC1</i>
<i>APEX1</i>	<i>CDK9</i>	<i>EPC2</i>	<i>FIGNL1</i>	<i>MARF1</i>	<i>ORAOV1</i>	<i>PRMT6</i>	<i>RPA1</i>	<i>TAOK1</i>	<i>UPF1</i>
<i>APEX2</i>	<i>CETN2</i>	<i>ERCC4</i>	<i>FOXM1</i>	<i>MC1R</i>	<i>PALB2</i>	<i>PRPF19</i>	<i>RPAIN</i>	<i>TDP1</i>	<i>USP1</i>
<i>APLF</i>	<i>CHD1L</i>	<i>ERCC6</i>	<i>GEN1</i>	<i>MCM8</i>	<i>PARG</i>	<i>PSME4</i>	<i>RRM2B</i>	<i>TERF2IP</i>	<i>USP28</i>
<i>APTX</i>	<i>CHEK1</i>	<i>ERCC6L2</i>	<i>GTF2H2</i>	<i>MCM9</i>	<i>PARP1</i>	<i>RAD1</i>	<i>RTEL1</i>	<i>TEX15</i>	<i>USP3</i>
<i>ASCC3</i>	<i>CHEK2</i>	<i>ERCC8</i>	<i>GTF2H4</i>	<i>MCRS1</i>	<i>PARP9</i>	<i>RAD51B</i>	<i>RUVBL1</i>	<i>TICRR</i>	<i>USP45</i>
<i>ASF1A</i>	<i>CLSPN</i>	<i>ETAA1</i>	<i>HELB</i>	<i>MDC1</i>	<i>PARPBP</i>	<i>RAD54B</i>	<i>RUVBL2</i>	<i>TIMELESS</i>	<i>USP47</i>
<i>ATM</i>	<i>CUL4A</i>	<i>EXD2</i>	<i>HELQ</i>	<i>MGMT</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>RAD9A</i>	<i>SETD2</i>	<i>TMEM161A</i>	<i>USP7</i>
<i>ATRX</i>	<i>CYREN</i>	<i>EXO1</i>	<i>HERC2</i>	<i>MLH3</i>	<i>PDS5A</i>	<i>RAD9B</i>	<i>SETX</i>	<i>TONSL</i>	<i>UVRAG</i>
<i>BABAM1</i>	<i>DCLRE1A</i>	<i>EYA1</i>	<i>HINFP</i>	<i>MMS22L</i>	<i>PDS5B</i>	<i>RBBP8</i>	<i>SHPRH</i>	<i>TOP2B</i>	<i>VCP</i>
<i>BACH1</i>	<i>DCLRE1B</i>	<i>EYA2</i>	<i>HMG1</i>	<i>MNAT1</i>	<i>PIF1</i>	<i>RBX1</i>	<i>SIRT1</i>	<i>TRIM28</i>	<i>WRN</i>
<i>BARD1</i>	<i>DCLRE1C</i>	<i>EYA4</i>	<i>HUS1</i>	<i>MRE11A</i>	<i>PMS1</i>	<i>RECQL4</i>	<i>SLX4</i>	<i>TRIP12</i>	<i>XPA</i>
<i>BCCIP</i>	<i>DDB1</i>	<i>FAM168A</i>	<i>HUWE1</i>	<i>MSH2</i>	<i>PMS2</i>	<i>RECQL5</i>	<i>SMARCA1</i>	<i>TRP53BP1</i>	<i>XPC</i>
<i>BLM</i>	<i>DDX1</i>	<i>FANCA</i>	<i>IER3</i>	<i>MSH3</i>	<i>PNKP</i>	<i>REV3L</i>	<i>SMC2</i>	<i>TRPC2</i>	<i>XRCC2</i>
<i>BOD1L</i>	<i>DHX9</i>	<i>FANCC</i>	<i>INO80</i>	<i>MSH4</i>	<i>POLE</i>	<i>RFC1</i>	<i>SMC5</i>	<i>TRRAP</i>	<i>XRCC6</i>
<i>BRCA2</i>	<i>DMAP1</i>	<i>FANCD2</i>	<i>INO80B</i>	<i>MTOR</i>	<i>POLI</i>	<i>RFC2</i>	<i>SMC6</i>	<i>UBE2N</i>	<i>ZFP365</i>
<i>BRIP1</i>	<i>DNA2</i>	<i>FANCG</i>	<i>INO80D</i>	<i>NABP1</i>	<i>POLL</i>	<i>RFC3</i>	<i>SMG1</i>	<i>UBE2V1</i>	<i>ZFYVE26</i>
<i>CBX8</i>	<i>DOT1L</i>	<i>FANCI</i>	<i>KDM1A</i>	<i>NEIL3</i>	<i>POLN</i>	<i>RFC4</i>	<i>SPIDR</i>	<i>UBE2V2</i>	<i>ZRANB3</i>
<i>CCDC155</i>	<i>DTX3L</i>	<i>FANCM</i>	<i>KDM2A</i>	<i>NFRKB</i>	<i>POLQ</i>	<i>RIF1</i>	<i>SSRP1</i>	<i>UBE2W</i>	

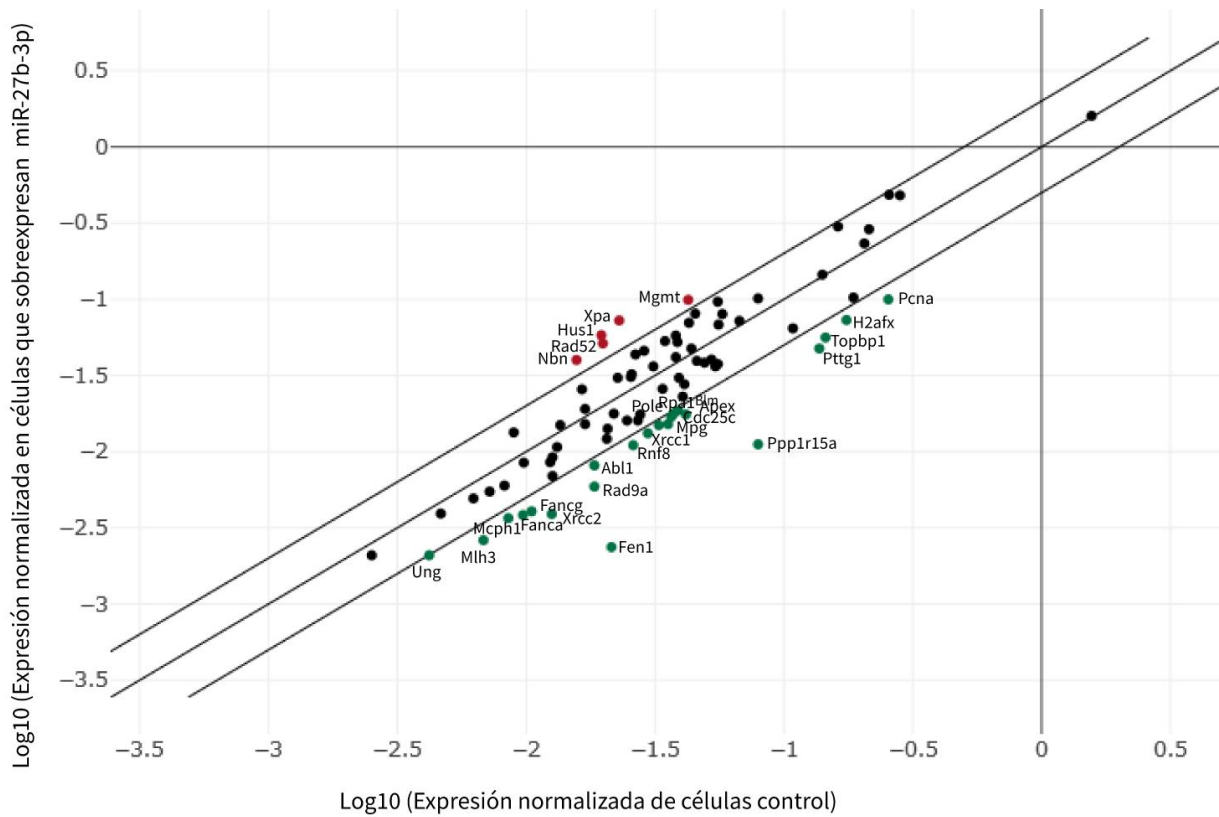
**Tabla 4.** Genes clasificados dentro del término *DNA Repair* de Gene Ontology predichos como blancos putativos de miR-155-5p.

<i>ASCC3</i>	<i>DCLRE1A</i>	<i>FANCG</i>	<i>INIP</i>	<i>MSH3</i>	<i>PSME4</i>	<i>SETX</i>	<i>SSRP1</i>	<i>UBE2U</i>
<i>ATRX</i>	<i>DEK</i>	<i>FANCM</i>	<i>INO80</i>	<i>MTOR</i>	<i>RBBP8</i>	<i>SFPQ</i>	<i>SWSAP1</i>	<i>UBE2V2</i>
<i>AXIN2</i>	<i>DHX9</i>	<i>FEN1</i>	<i>KDM2A</i>	<i>NEIL2</i>	<i>RBM17</i>	<i>SHPRH</i>	<i>SYCP1</i>	<i>UBE2W</i>
<i>BACH1</i>	<i>DTX3L</i>	<i>FIGN</i>	<i>KIF22</i>	<i>PARP9</i>	<i>REV1</i>	<i>SMC1A</i>	<i>TAOK1</i>	<i>USP28</i>
<i>BARD1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GEN1</i>	<i>LIG4</i>	<i>POLA1</i>	<i>RIF1</i>	<i>SMC2</i>	<i>TEX15</i>	<i>USP3</i>
<i>BRCA2</i>	<i>ERCC1</i>	<i>GTF2H2</i>	<i>MARF1</i>	<i>POLK</i>	<i>RNF111</i>	<i>SMC3</i>	<i>TRIP12</i>	<i>USP45</i>
<i>CDC14B</i>	<i>ETAA1</i>	<i>GTF2H3</i>	<i>MCM9</i>	<i>POLQ</i>	<i>RNF168</i>	<i>SMC5</i>	<i>TRRAP</i>	<i>USP7</i>
<i>CDK7</i>	<i>EXO5</i>	<i>HELB</i>	<i>MGME1</i>	<i>PPP4R2</i>	<i>RNF8</i>	<i>SMC6</i>	<i>TTC5</i>	<i>UVSSA</i>
<i>CHD1L</i>	<i>FAM168A</i>	<i>HERC2</i>	<i>MLH3</i>	<i>PRKDC</i>	<i>RRM2B</i>	<i>SMG1</i>	<i>UBE2D3</i>	<i>WRNIP1</i>
<i>CLSPN</i>	<i>FANCF</i>	<i>HMG2</i>	<i>MMS19</i>	<i>PSMD14</i>	<i>RTEL1</i>	<i>SMUG1</i>	<i>UBE2N</i>	<i>XRCC2</i>



## Efecto de miR-27b-3p sobre la expresión de genes de reparación del ADN

Con el fin de averiguar si la reducción en la capacidad de reparación del ADN en las células que sobreexpresan miR-27b-3p estaba relacionada con una desregulación de la expresión de genes de reparación del ADN, se analizó la expresión de 84 genes que participan en la reparación y señalización del daño al ADN. Este análisis se llevó a cabo 24 horas después de la transfección, el mismo tiempo en el que las células se expusieron a los agentes de daño. Las células que sobreexpresaban miR-27b-3p, mostraron cambios (2-fold) en la expresión de 27 genes, con 22 genes subexpresados y 5 genes sobreexpresados (Fig. 15; Tabla 5). De acuerdo con un análisis de enriquecimiento de vías en Reactome, los genes desregulados están mayormente involucrados en procesos relacionados con la reparación de DSBs por recombinación homóloga, ciclo celular, BER y otros procesos cercanos (Tabla 6). Estos resultados refuerzan la idea de que la sobreexpresión de miR-27b-3p causa una disminución de la capacidad de reparación a través de la represión de genes asociados directa e indirectamente con los procesos de reparación del ADN.



**Figura 15.** La sobreexpresión de miR-27b-3p modifica la expresión de 27 genes involucrados en la reparación del ADN. Se muestra la expresión de 84 genes involucrados en la señalización y reparación del ADN en células que sobreexpresan miR-27b-3p. Este gráfico compara la expresión normalizada de cada gen en el arreglo de PCR entre las células no transfectadas (control) y las células transfectadas que sobreexpresan miR-27b-3p. La línea central indica ausencia de cambios en la expresión. Las líneas exteriores representan el umbral 2-fold para considerar los genes como subexpresados (verde) o sobreexpresados (rojo). Datos de expresión normalizados  $Fold\ change\ (2^{-\Delta\Delta Ct})$  representados en  $\log_{10}$ .

**Tabla 5.** Valores de expresión de genes subexpresados (en verde) y sobreexpresados (en rojo) (2-fold) en células transfectadas con miR-27b-3p.

Subexpresados		Sobreexpresados	
Gen	Fold change	Gen	Fold change
<b>Abi1</b>	-2.26	<b>Hus1</b>	2.97
<b>Apex1</b>	-2.38	<b>Mgmt</b>	2.33
<b>Blm</b>	-2.08	<i>Nbn</i>	2.55
<i>Cdc25c</i>	-2.1	<i>Rad52</i>	2.59
<b>Fanca</b>	-2.53	<b>Xpa</b>	3.16
<b>Fancg</b>	-2.58		
<i>Fen1</i>	-9.05		
<i>H2afx</i>	-2.39		
<i>Mcp1</i>	-2.33		
<b>Mlh3</b>	-2.6		
<i>Mpg</i>	-2.34		
<i>Pcna</i>	-2.55		
<b>Pole</b>	-2.19		
<i>Ppp1r15a</i>	-7.1		
<i>Pttg1</i>	-2.88		
<b>Rad9a</b>	-3.11		
<i>Rnf8</i>	-2.36		
<b>Rpa1</b>	-2.16		
<i>Topbp1</i>	-2.58		
<i>Ung</i>	-2.01		
<i>Xrcc1</i>	-2.25		
<i>Xrcc2</i>	-3.22		

Valores de expresión relativa normalizados *Fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). En negritas se destacan los genes predichos como blancos putativos de miR-27b-3p de acuerdo con el análisis *in silico* para la predicción de genes blanco.



**Tabla 6.** Valores de  $p$ , y tasa de descubrimiento falso (*false discovery rate*, FDR) y nombre de los genes asociados a los procesos representados por los genes desregulados en las células que sobreexpresan miR-27b-3p de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de vías en Reactome.

Proceso celular	$p$ -Value	FDR	Genes asociados
Reparación dirigida por homología ( <i>homology directed repair</i> , HDR)	1.11E-16	6.66E-15	<i>Abl1; Blm; Fen1; H2afx; Hus1; Nbn; Pcna; Pole; Rad52; Rad9a; Rnf8; Rpa1; Topbp1; Xrcc1; Xrcc2</i>
HDR a través de recombinación homóloga o alineamiento de cadena única	1.11E-16	6.66E-15	<i>Abl1; Blm; H2afx; Hus1; Nbn; Pcna; Pole; Rad52; Rad9a; Rnf8; Rpa1; Topbp1; Xrcc2</i>
Reparación de ruptura de doble cadena de ADN	1.11E-16	6.66E-15	<i>Abl1; Blm; Fen1; H2afx; Hus1; Pcna; Rad52; Rad9a; Rnf8; Rpa1; Topbp1; Xrcc1; Xrcc2</i>
Reparación de ADN	1.11E-16	6.66E-15	<i>Abl1; Apex1; Blm; Fanca; Fancg; Fen1; H2afx; Hus1; Mgmt; Mpg; Nbn; Pcna; Pole; Rad52; Rad9a; Rnf8; Rpa1; Topbp1; Ung; Xpa; Xrcc1; Xrcc2</i>
HDR por alineamiento de cadena única	5.36E-14	2.57E-12	<i>Abl1; Blm; Hus1; Nbn; Rad52; Rad9a; Rpa1; Topbp1</i>
HDR a través de recombinación homóloga	1.01E-13	4.04E-12	<i>Blm; Hus1; Nbn; Pcna; Pole; Rad9a; Rpa1; Topbp1; Xrcc2</i>
Ciclo celular	1.39E-13	4.73E-12	<i>Abl1; Blm; Cdc25c; Fen1; H2afx; Hus1; Mcph1; Mlh3; Nbn; Pcna; Pole; Pttg1; Rad9a; Rnf8; Rpa1; Topbp1</i>
Resolution de sitios abásicos	2.78E-13	7.47E-12	<i>Apex1; Fen1; Mpg; Pcna; Pole; Rpa1; Ung; Xrcc1</i>
Punto de control de daño al AND G2/M	2.87E-13	7.47E-12	<i>Blm; Cdc25c; H2afx; Hus1; Nbn; Rad9a; Rnf8; Rpa1; Topbp1</i>
Reparación por escisión de bases (BER)	1.7E-12	4.08E-11	<i>Apex1; Fen1; H2afx; Mpg; Pcna; Pole; Rpa1; Ung; Xrcc1</i>
Fase presináptica de emparejamiento de ADN homólogo e intercambio de cadenas	8.17E-12	1.72E-10	<i>Blm; Hus1; Nbn; Rad9a; Rpa1; Topbp1; Xrcc2</i>
Emparejamiento de ADN homólogo e intercambio de cadenas	1.33E-11	2.67E-10	<i>Blm; Hus1; Nbn; Rad9a; Rpa1; Topbp1; Xrcc2</i>
Procesamiento de extremos rotos de doble cadena de ADN	3.97E-11	7.15E-10	<i>Blm; H2afx; Hus1; Nbn; Rnf8; Rad9a; Rpa1; Topbp1</i>
Puntos de control G2/M	8.3E-11	1.41E-09	<i>Blm; Cdc25c; H2afx; Hus1; Nbn; Rnf8; Rad9a; Rpa1; Topbp1</i>
BER de parche largo dependiente de PCNA	2.91E-09	4.65E-08	<i>Apex1; Fen1; Pole; Pcna; Rpa1;</i>
Puntos de control del ciclo celular	1.47E-08	2.09E-07	<i>Blm; Cdc25c; H2afx; Hus1; Nbn; Rad9a; Rnf8; Rpa1; Topbp1</i>
Resolución de sitios AP a través de la vía de reemplazo de parche de múltiples nucleótidos	1.49E-08	2.09E-07	<i>Apex1; Fen1; Pcna; Pole; Rpa1;</i>
Regulación de la actividad de TP53 a través de la fosforilación	9.99E-08	1.3E-06	<i>Blm; Hus1; Nbn; Rad9a; Rpa1; Topbp1</i>
Recombinación meiótica	2.79E-07	3.35E-06	<i>Blm; H2afx; Mlh3; Nbn; Rpa1</i>
Síntesis y ligadura de reparación de ADN de relleno de brechas en GG-NER	5.66E-07	6.23E-06	<i>Pcna; Pole; Rpa1; Xrcc1</i>

(FDR) *False Discovery Rate*



Para identificar los cambios en la expresión de los genes de reparación que ocurren como respuesta al daño generado por DOX, y determinar si dicha respuesta está alterada en las células que sobreexpresan miR-27b-3p, analizamos el patrón de expresión de los 84 genes contenidos en el arreglo de PCR a las 48 h después de la exposición a DOX con y sin la sobreexpresión de miR-27b-3p. Observamos que la sobreexpresión de miR-27b-3p genera cambios en el perfil de expresión de las células tratadas con DOX (Fig. 16 A, B). Aunque los patrones de expresión guardan cierta similitud, tanto los genes involucrados como sus niveles de expresión son distintos (Tabla 7).

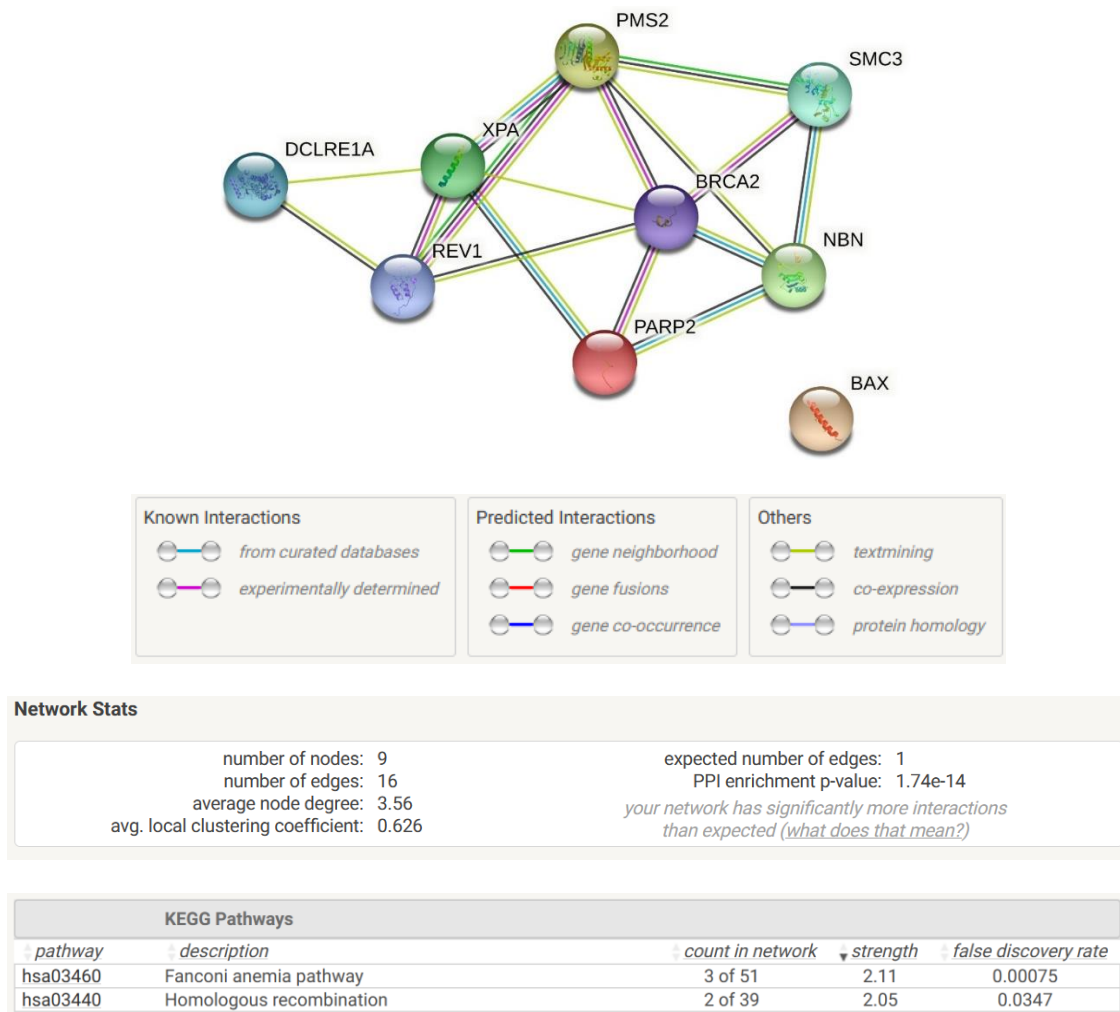


**Tabla 7.** Valores de expresión de los genes sub y sobreexpresados en las células tratadas con doxorubicina.

Células control				Células que sobreexpresan miR-27b-3p			
Subexpresados		Sobreexpresados		Subexpresados		Sobreexpresados	
Gen	Fold change	Gen	Fold change	Gen	Fold change	Gen	Fold change
<i>Abl1</i>	-3.05	<i>Hus1</i>	2.27	<i>Bax</i>	-2.25	<i>Cdkn1a</i>	3.36
<i>Apex1</i>	-2.64	<i>Ppmd1</i>	2.64	<i>Brca1</i>	-2.22	<i>Ercc1</i>	2.73
<i>Atm</i>	-3.29	<i>Xpa</i>	2.1	<b><i>Brca2</i></b>	-2.66	<i>Ppp1r15a</i>	2.04
<i>Blm</i>	-2.36			<i>Cdc25c</i>	-3.32		
<i>Brca1</i>	-2.29			<b><i>Chek1</i></b>	-2.59		
<i>Cdc25c</i>	-5.73			<b><i>Dclre1a</i></b>	-2.55		
<b><i>Chek1</i></b>	-2.77			<b><i>Exo1</i></b>	-2.64		
<b><i>Exo1</i></b>	-2.44			<b><i>Fancc</i></b>	-3.82		
<b><i>Fanca</i></b>	-4.85			<b><i>Fancc2</i></b>	-3.9		
<b><i>Fancc</i></b>	-3.09			<i>H2afx</i>	-2.03		
<b><i>Fancc2</i></b>	-4.53			<i>Nbn</i>	-2.33		
<b><i>Fancg</i></b>	-2.92			<i>Parp2</i>	-2.04		
<i>Fen1</i>	-4.59			<i>Pms2</i>	-2.55		
<i>H2afx</i>	-5.49			<i>Rad21</i>	-2.57		
<b><i>Lig1</i></b>	-2.34			<b><i>Rad51b</i></b>	-2.48		
<i>Mbd4</i>	-2.28			<i>Rev1</i>	-2.32		
<i>Mcp1</i>	-3.55			<i>Smc3</i>	-2.22		
<b><i>Mdc1</i></b>	-2.33			<i>Terf1</i>	-4.35		
<b><i>Mlh3</i></b>	-2.2			<b><i>Wrn</i></b>	-2.99		
<i>Mpg</i>	-2.48			<b><i>Xpa</i></b>	-2.25		
<b><i>Parp1</i></b>	-3.41						
<i>Pcna</i>	-3.68						
<b><i>Pole</i></b>	-2.84						
<b><i>Poli</i></b>	-2.94						
<i>Ppp1r15a</i>	-4.49						
<i>Pttg1</i>	-4.4						
<i>Rad18</i>	-2.43						
<i>Rad21</i>	-2.14						
<b><i>Rad51b</i></b>	-2.8						
<b><i>Rad9a</i></b>	-2.92						
<b><i>Rpa1</i></b>	-2.28						
<i>Smc1a</i>	-3.01						
<i>Terf1</i>	-2.2						
<i>Topbp1</i>	-4.46						
<i>Ung</i>	-3.11						
<b><i>Wrn</i></b>	-2.07						
<i>Xrcc1</i>	-2.82						
<b><i>Xrcc2</i></b>	-6.4						

Se muestran los valores de expresión normalizados respecto a la condición sin doxorubicina para cada caso. Valores de expresión relativa normalizados *Fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). En negritas se destacan los genes predichos como blancos putativos de miR-27b-3p de acuerdo con el análisis *in silico* para la predicción de genes blanco.

Para tratar de comprender la relación que guardan los patrones de expresión con la pérdida de la funcionalidad reparativa causada por la sobreexpresión de miR-27b-3p, se realizó una búsqueda de las interacciones entre las proteínas de los genes cuya expresión difiere en mayor medida entre las células tratadas con DOX y las células que sobreexpresaban miR-27b-3p igualmente tratadas con DOX (Fig. 17). El análisis de interacciones, realizado en la base de datos STRING [123], mostró que las proteínas de los genes analizados tienen interacciones, algunas putativas y otras experimentalmente demostradas, entre ellas y como conjunto pueden participar con cierta probabilidad en procesos relevantes para la reparación de DSBs tales como HRR y la vía de la anemia de Fanconi (Fig. 17).



**Figura 17.** Análisis de interacciones entre las proteínas de genes diferencialmente expresados entre células tratadas con doxorubicina y células que sobreexpresan miR-27b-3p tratadas con el mismo compuesto. Análisis realizado en la base de datos STRING v11.5.

## **Elaboración de un artículo de revisión sobre la función de los miRNAs en la reparación de DSBs a través de HRR y NHEJ.**

Como actividad complementaria al proyecto de investigación aquí presentado, se decidió elaborar un artículo de revisión en el que se abordara el papel de los miRNAs en la reparación de DSBs a través de los mecanismos HRR y NHEJ. Se decidió enfocar la revisión en la reparación de DSBs porque se trata del tipo de lesión considerado como el más genotóxico ya que puede causar una pérdida significativa de información genética, conduciendo así a enfermedades como el cáncer. Para la elaboración de la revisión, se realizó una extensa búsqueda bibliográfica de artículos publicados entre los años 2010 a 2021 donde se hubiera demostrado una asociación entre miRNAs y genes involucrados en NHEJ y HRR. Adicionalmente, se realizó un análisis de datos de interacciones validadas provenientes de TarBase v.8 para realizar gráficos que permitieran visualizar las interacciones entre miRNAs y genes que participan en HRR y NHEJ. Esto nos permitió elaborar un artículo que ofrece una visión amplia y actualizada acerca de cuáles son los miRNAs involucrados, sus blancos específicos dentro de cada mecanismo y el efecto de dicha interacción en diferentes modelos y tipos celulares. Al momento de elaboración de este manuscrito de tesis, el artículo ha sido publicado en la revista *International Journal of Molecular Sciences* y puede ser consultado con el siguiente enlace:

<https://doi.org/10.3390/ijms23063231>

A continuación, se muestra el resumen de dicho artículo de revisión:

---

### ***Interactions between miRNAs and Double-Strand Breaks DNA Repair Genes, Pursuing a Fine-Tuning of Repair***

*The repair of DNA damage is a crucial process for the correct maintenance of genetic information, thus, allowing the proper functioning of cells. Among the different types of lesions occurring in DNA, double-strand breaks (DSBs) are considered the most harmful type of lesion, which can result in significant loss of genetic information, leading to diseases, such as cancer. DSB repair occurs through two main mechanisms, called non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination repair (HRR). There is evidence showing that miRNAs play an important role in the regulation of genes acting in NHEJ and HRR mechanisms, either through direct complementary binding to mRNA targets, thus, repressing translation, or by targeting other genes involved in the transcription and activity of DSB repair genes. Therefore, alteration of miRNA expression has an impact on the ability of cells to repair DSBs, which, in turn, affects cancer therapy sensitivity. This latter gives account of the importance of miRNAs as regulators of NHEJ and HRR and places them as a promising target to improve cancer therapy. Here, we review recent reports demonstrating an association between miRNAs and genes involved in NHEJ and HRR. We employed the Web of Science search query TS (“gene official symbol/gene aliases\*” AND “miRNA/microRNA/miR-”) and focused on articles published in the last decade, between 2010 and 2021. We also performed a data analysis to represent miRNA–mRNA validated interactions from TarBase v.8, in order to offer an updated overview about the role of miRNAs as regulators of DSB repair.*

---

Peraza-Vega R.I., Valverde M., Rojas E. Interactions between miRNAs and Double-Strand Breaks DNA Repair Genes, Pursuing a Fine-Tuning of Repair. *Int. J. Mol. Sci.* (2022), 23(6), 3231. <https://doi.org/10.3390/ijms23063231>

## DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto de la sobreexpresión de miR-27b-3p y miR-155-5p sobre la capacidad de reparación del ADN. Los niveles de daño en el ADN fueron evaluados por medio del ensayo cometa en dos modalidades de pH: alcalino (pH >13) y neutro (pH = 8.5). Al utilizar ambas modalidades del ensayo cometa es posible detectar y distinguir distintos tipos de lesiones en el ADN. El ensayo cometa neutro permite detectar daño al ADN principalmente en la forma de DSBs. Por su parte, el ensayo cometa alcalino, puede detectar DSBs, SSBs, así como sitios álcali-lábiles tales como sitios AP que pueden convertirse en rupturas en presencia de un pH alcalino [124,125]. Por ejemplo, el daño oxidativo generado por el tratamiento con FeCl<sub>3</sub>, sólo es evidente en el ensayo cometa alcalino (Fig. 10 – A, B), puesto que la generación de sitios AP es un paso inicial durante BER [126].

Las células que sobreexpresaban miR-27b-3p redujeron su capacidad para reparar las lesiones al ADN generadas por los tratamientos con FeCl<sub>3</sub>, DOX y RI. Esta reducción de la capacidad de reparación se reflejó en los valores de OTM. En los tiempos de evaluación posteriores a los tratamientos con FeCl<sub>3</sub>, DOX y RI, observamos que los valores de OTM fueron significativamente más altos en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p que en las células no transfectadas, las cuales siguen una tendencia a disminuir durante el tiempo posterior a los tratamientos (Fig. 10 – A, E, F, G, H). Tomando en cuenta que el tratamiento con FeCl<sub>3</sub> favorece la formación de lesiones oxidativas en el ADN y que DOX junto con RI generan principalmente DSBs, los resultados del ensayo cometa sugerían que probablemente los procesos de BER y de reparación de DSBs estaban desregulados en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p, debido posiblemente a una desregulación en la expresión de genes asociados con estos procesos. En el caso de las células que sobreexpresaban miR-155-5p, sus niveles de OTM no mostraron diferencias significativas en comparación con las células no transfectadas. Esto indica que la sobreexpresión de miR-155-5p no altera la capacidad de reparación del ADN en nuestro modelo.



Las herramientas bioinformáticas para la predicción de interacciones miRNA – mRNA están en constante desarrollo para mejorar la precisión de dichas interacciones, de tal manera que las predicciones puedan reflejar, con una alta probabilidad, las interacciones que ocurren en realidad dentro de las células. La mayoría de dichas herramientas tienen en común la utilización de una serie de características para determinar la probabilidad de interacción entre un miRNA y un mRNA. Entre dichas características, están la complementariedad de la región semilla, el grado de conservación entre especies tanto de la secuencia del miRNA como de la secuencia blanco, la energía libre como medida de la estabilidad de la interacción y la accesibilidad al sitio de hibridación con el blanco [127]. Sin embargo, además de las características mencionadas, las distintas herramientas de predicción disponibles también incluyen sus propios criterios para determinar la probabilidad de las interacciones. Por tal motivo, para la búsqueda de genes blanco predichos de miR-27b-3p y miR-155-5p, en este trabajo se decidió emplear el mayor número de bases de datos que miRWalk v2 tiene disponible a la fecha de realización de la búsqueda (12 bases de datos, ver sección de Materiales y Métodos), así como restringir la selección de sólo aquellas interacciones predichas que coincidieran en al menos la mitad de las bases de datos. De acuerdo con estos criterios de búsqueda, el 48% (209 genes) de los genes clasificados con el término GO: *DNA repair*, son blancos predichos de miR-27b-3p. Por otra parte, los blancos predichos de miR-155-5p representan el 21% de los genes con dicho término (Fig. 14; Tablas 3 y 4). Estos datos sugieren que la participación de miR-27b-3p sobre los procesos de reparación del ADN podría ser mayor que la de miR-155-5p. Tal idea es congruente con los resultados de nuestro modelo sobre la capacidad de reparación del ADN en el que vimos que únicamente la sobreexpresión de miR-27b-3p tuvo un efecto sobre la capacidad de reparación del ADN.

De manera consistente con los resultados del ensayo cometa, observamos que la sobreexpresión de miR-27b-3p redujo la expresión de genes (2-fold) que participan en la reparación de lesiones oxidativas por BER y reparación de DSBs por HRR. En lo que se refiere a genes asociados con BER, los genes que redujeron su expresión fueron: *Mpg*, *Ung*, *Apex1 (Ape1)*, *Fen1*, *Xrcc1*, *Pcna* y *Pole* (Fig. 15 y Tabla 5). Las proteínas MPG y UNG son glicosilasas monofuncionales encargadas de retirar bases modificadas tales como 3meA, 7meG, 3meG, en el caso de MPG, y U, 5-fluoroacil (5-FU), en el caso de

UNG [128]. Por otra parte, APE1 es una endonucleasa de sitios apurínicos/apirimídicos que surgen después de la remoción de la base alterada y lleva a cabo el corte del enlace fosfodiéster para producir un SSB [30]. PCNA y POLE son proteínas asociadas con la replicación del ADN que participan en la variante “long-patch” de BER. En conjunto, PCNA y POLE se encargan de la síntesis de ADN nuevo a partir del 3'-OH presente en el sitio de corte dejado por APE1 [38]. Por su parte FEN1 es una endonucleasa que participa en long-patch BER y se encarga de retirar la estructura “flap” o el saliente de ADN que queda después de la síntesis de la nueva sección de ADN [30]. XRCC1 no tiene actividad enzimática, pero funciona como un punto de andamiaje para otros componentes de BER como APE1 y otras glicosilasas [129]. Es posible que la reducción de la expresión de los genes mencionados haya sido la razón de la reducción de la capacidad para reparar las lesiones oxidativas generadas por el FeCl<sub>3</sub>. La expresión de la glicosilasa encargada de remover las lesiones tipo 8-oxoG, OGG1, no se redujo significativamente en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p. Esto último sugiere que, si bien el reconocimiento y remoción de las bases con este tipo de modificación probablemente podía llevarse a cabo, las reacciones posteriores como el corte endonucleolítico y la síntesis de ADN no podían ocurrir de manera eficiente, promoviendo así la formación de sitios retardados de reparación álcali-lábiles y SSBs que pudieron ser detectados con el ensayo cometa alcalino (Fig. 10-A). Sin embargo, las ROS también pueden generar otras lesiones oxidativas, entre las que se incluye 5-OH-C que genera 5-OH-U por desaminación, un tipo de lesión removido por UNG [130,131]. Como se ha mencionado, la expresión de UNG estaba reducida en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p, por lo que el reconocimiento de estas lesiones oxidativas probablemente no podía ocurrir de manera eficiente. En conjunto, los resultados indican que la sobreexpresión de miR-27b-3p desregula la expresión de genes que participan en BER, lo cual resulta en una capacidad deficiente para reparar las lesiones en el ADN que son detectadas y removidas por esta vía.

La sobreexpresión de miR-27b-3p también causó la reducción en la expresión de genes asociados con la reparación de DSBs por HRR. La expresión de *Rpa1*, *Topbp1*, *H2afx*, *Xrcc2* y *Blm* estaba reducida (2-fold) en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p (Fig. 15 y Tabla 5). Como se mencionó durante la sección de introducción, RPA es una proteína que se une al ADN después de la resección que se lleva a cabo durante la HRR

para remover posibles estructuras secundarias que pudieran obstruir la unión posterior de la recombinasa RAD51 [78]. Se ha visto que la reducción de la expresión de RPA puede reducir la reparación de DSBs, alterar la replicación del ADN y aumentar la sensibilidad de las células a RI [132,133]. TOPBP1 es una proteína que funciona en la señalización del daño al ADN y además actúa como mediador de la fosforilación y activación de RAD51 para reemplazar a RPA durante la HRR [134]. El gen *H2afx* codifica la variante de la histona H2A, llamada H2AX. Esta variante de histona juega un papel crucial en la señalización a nivel de cromatina de la presencia de DSBs. Los DSBs son señalizados por la fosforilación en S139 de H2AX por parte de ATM, ATR y PRKDC (DNA-PKcs) [45]. La variante H2AX está presente en aproximadamente el 15% de las histonas H2A, y hay dos histonas H2A por nucleosoma [135]. Por lo tanto, la desregulación de H2AX puede tener un impacto negativo en la capacidad de reparación de DSBs al comprometer su correcta señalización. Por su parte, XRCC2 es un parólogo de RAD51 que funciona como mediador en el reemplazo de RPA por RAD51 durante HRR [136]. La disminución en la expresión de XRCC2 se ha asociado con un retraso en la reparación de DSBs [137]. BLM es una helicasa involucrada en la replicación y reparación del ADN. Durante HRR, BLM contribuye a la resección del ADN para generar la sección de ADN de cadena sencilla a la cual se une luego RPA y se ha visto que puede regular la recombinación mediada por RAD51 [138]. Tomando en cuenta las funciones de las proteínas mencionadas, la desregulación de la expresión de sus genes puede afectar negativamente la funcionalidad del proceso de reparación por HRR. Los resultados tanto del análisis de expresión como los de la capacidad de reparación por medio del ensayo cometa, demuestran que la sobreexpresión de miR-27b-3p reduce la capacidad de reparación de DSBs a través de la desregulación negativa de la expresión de genes involucrados en HRR.

En las células que sobreexpresaban miR-27b-3p también se observó una reducción de los niveles de expresión de otros genes que no participan directamente en HRR y BER pero que están asociados con la señalización del daño al ADN, particularmente DSBs, así como en la modulación del ciclo celular cuando existe la presencia de lesiones en el ADN. Dichos genes fueron *Abl1*, *Cdc25c*, *Fanca*, *Fancg*, *Mcph1*, *Mlh3*, *Ppp1r15a*, *Pttg1* y *Rnf8* (Fig. 15 y Tabla 5). *Abl1* codifica una tirosina cinasa ampliamente asociada con varios aspectos de la respuesta al daño al ADN. La actividad de ABL1 aumenta en

respuesta a las lesiones generadas por RI y se ha reportado que su activación depende de ATM [139]. ABL1 puede fosforilar a proteínas que participan en la reparación de DSBs tales como DNA-PKcs, RAD51, RAD52, BRCA1, RAD9 y TOPBP1 [139–145], lo cual indica que ABL1 juega un papel relevante en la regulación de la reparación de DSBs y arresto del ciclo celular. CDC25C es fosforilada e inactivado por CHK1/CHK2 de manera dependiente de ATM y p53 para llevar a cabo el arresto en G2 cuando hay daño en el ADN [146]. Se ha visto que MCPH1 funciona como mediador en la señalización por ATM y ATR durante la respuesta al daño al ADN [147]. La reducción en los niveles de MCPH1 se han asociado con una disminución en la formación de focos de MDC1, 53BP1 y ATM necesarios para la reparación de DSBs generados por RI [148]. También se ha visto que MCPH1 cuando es activado por ATM, interacciona con TOPBP1, quien a su vez funciona como activador de ATR, para amplificar la señal de éste último cuando hay estrés replicativo [149]. De igual forma, se ha reportado que MCPH1 interacciona con BRCA2 y RAD51 durante HRR y que participa en la modulación del checkpoint G2-M al regular la expresión de BRCA1 y CHK1 [150,151]. *Ppp1r15a (Gadd34)* es un gen asociado con el arresto del ciclo celular y su expresión es inducida en la respuesta al daño al ADN. El aumento en la expresión de *Gadd34* se ha asociado con un incremento en la apoptosis de células con daño al ADN [152]. *Pttg* es un gen involucrado en la separación de cromátidas hermanas durante la mitosis [153]. El incremento en la expresión de PTTG1 causa errores en la segregación de los cromosomas durante la mitosis y se ha asociado con un aumento de la inestabilidad genómica [154]. RNF8 participa en la señalización de los DSBs mediante la mono-ubiquitinación de H2A y H2B [155,156]. La deficiencia de RNF8 se ha asociado con el desarrollo de tumores, probablemente por el incremento de inestabilidad genómica [157]. FANCA y FANCG interactúan entre sí y participan en la reparación de entrecruzamientos intercadena y DSBs por la vía de anemia de Fanconi. FANCA y FANCG junto con FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCL y FANCM forman el complejo FA, el cual puede monoubiquitinar a las proteínas FANCD2 y FANCI, las cuales a su vez colocalizan con BRCA1, BRCA2 y RAD51 en los sitios de daño [158,159]. Se ha visto que FANCA puede llevar a cabo la alineación e intercambio de cadenas durante la reparación de DSBs, en un nivel de actividad similar al de RAD52, y que esta actividad es estimulada por la interacción con FANCG [160]. La desregulación en la expresión de los genes mencionados afecta negativamente la señalización del daño al

ADN, principalmente DSBs, necesaria para una correcta respuesta al daño al ADN a nivel del ciclo celular. La reducción en la expresión de estos genes, observada en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p, sugiere que la reducción en la capacidad para reparar el ADN es debida a una alteración que no sólo se restringe a los procesos de HRR y BER, sino que es más generalizada y que abarca múltiples niveles de la reparación del ADN, como son la detección de las lesiones, señalización de la presencia del daño, mecanismos de control del ciclo celular y la activación y funcionalidad de proteínas y complejos efectores de las reacciones de corte, recombinación y síntesis de ADN.

Un caso particular fue el observado con las células tratadas con UV. En las células que sobreexpresaban miR-27b-3p tratadas con UV, vimos niveles de OTM más elevados a las 24 h posteriores al tratamiento en comparación con las células no transfectadas en el ensayo cometa neutro (Fig. 10-D). Si bien es una ligera diferencia, es suficiente para ser significativa ( $p < 0.05$ ) y, dado que esta diferencia sólo se observó en el ensayo cometa neutro, sugiere la presencia de DSBs que no han sido reparados de manera eficiente en las células que sobreexpresan miR-27b-3p. Si bien, la luz UV no genera DSBs directamente, es un tipo de daño adicional que puede presentarse como resultado del bloqueo y colapso de la maquinaria de transcripción o replicación por la presencia de CPDs [161,162], o bien, debido a una inadecuada reparación de los SSBs temporales que se producen durante la reparación de los CPDs a través de NER (Fig. 4). Como se mencionó con anterioridad, la expresión de *Pcna*, *Pole* y *Xrcc1* estaba reducida como resultado de la sobreexpresión de miR-27b-3p. Las proteínas de estos genes, además de participar en BER, también lo hacen en NER llevando a cabo las funciones de síntesis de ADN, en el caso de PCNA y POLE, y punto de andamiaje para otras proteínas en el caso de XRCC1. Otro gen que participa en NER y cuya expresión se vio alterada en las células que sobreexpresan miR-27b-3p es *Xpc*. Sin embargo, a diferencia de *Pcna*, *Pole* y *Xrcc1*, la expresión de *Xpc* no estaba reducida sino aumentada. La proteína XPC reconoce lesiones que alteran la estructura de hélice en el ADN y recluta el complejo TFIIH durante GG-NER. El aumento en la expresión de XPC se ha asociado con un aumento en la tasa de reparación de entrecruzamientos intercadena [163]. Si bien, las lesiones generadas por la luz UV como los CPDs y los 6-4PPs no alteran en gran medida la estructura de hélice del ADN, éstas no pueden ser reconocidas directamente por XPC,

no obstante, una vez que XPC se asocia con DDB1 y DDB2 puede detectarlas [164]. Es posible que la desregulación al alta de XPC haya favorecido la detección de las lesiones causadas por UV, pero éstas no pudieron ser reparadas eficientemente por la baja expresión de *Pcna*, *Pole* y *Xrcc1*. Las lesiones no reparadas pudieron entonces haber representado obstáculos para la maquinaria de transcripción y replicación, promoviendo así su colapso y generando DSBs, los cuales a su vez no pudieron repararse eficientemente por la afectación de HRR.

Se ha reconocido ampliamente que la función canónica de los miRNAs es silenciar la expresión de sus genes blanco. Sin embargo, en años recientes también se han observado otros mecanismos alternativos a través de los cuales los miRNAs pueden promover la expresión de diversos genes. Se sabe que algunos pre-miRNAs pueden unirse a factores de transcripción y se ha propuesto que pueden facilitar la interacción entre éstos y la secuencia de sus promotores blanco [165]. Asimismo, existen ejemplos de miRNAs que después de su biogénesis, regresan y se localizan en el núcleo donde promueven la activación transcripcional o el silenciamiento de genes blanco a través de la interacción entre RISC y remodeladores de cromatina guiados por el miRNA hacia la secuencia del promotor [166]. También se ha reportado que diversos miRNAs pueden interactuar con la secuencia promotora de ciertos genes y activar su transcripción mediante un proceso conocido como activación por ARN (RNAa). En este proceso, la interacción del miRNA con el promotor promueve el reclutamiento de factores de transcripción y de ARN Pol II para activar la transcripción del gen [167]. La regulación positiva de la expresión génica por parte de los miRNAs es un campo de estudio nuevo, donde las interacciones entre miRNAs y promotores, enhancers y factores de transcripción no han sido tan estudiadas como en el caso de las interacciones de regulación canónicas. Además, se desconocen los factores que intervienen en el regreso de los miRNAs al núcleo [166]. Por esta razón son muy pocas las herramientas de predicción que consideran la interacción entre miRNAs y promotores entre sus criterios de búsqueda de blancos. Debido a estos factores, para la búsqueda de genes blanco realizada en este trabajo no se consideraron interacciones miRNA – promotor. Sin embargo, la sobreexpresión de miR-27b-3p generó una desregulación en la expresión de genes que sugiere que este miRNA puede modular la expresión génica a través de vías de regulación tanto canónicas como alternativas. Además de la reducción de los

genes ya mencionados, también se observó un aumento en la expresión de los genes *Hus1*, *Rad9a*, *Rad52*, *Nbn*, *Xpa* y *Mgmt* en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p (Fig. 15 y Tabla 5). Los cuatro primeros genes están involucrados principalmente en la reparación de DSBs. HUS1 es conocido por formar un complejo con RAD1 y RAD9 similar estructuralmente a PCNA [168]. En presencia de DSBs, dicho complejo se une al ADN y facilita la fosforilación de CHK1, una cinasa que regula el progreso de la fase S y el arresto G2/M [168]. RAD52 participa en conjunto con RAD51 y parálogos de este último, como XRCC2, en la remoción de RPA [78,79]. Además se ha demostrado que RAD52 en conjunto con CtIP reclutan a BRCA1 hacia los DSBs y que el reclutamiento de RAD51 hacia los DSBs en zonas transcripcionalmente activas es dependiente de RAD52 [169]. NBS1 (NBN) es un miembro del complejo MRN. Como se mencionó anteriormente, el complejo MRN actúa como sensor de DSBs, como coactivador para la señalización de checkpoints del ciclo celular inducidos por la presencia de DSBs y como un efector en la reparación por HRR [68,69]. Por otra parte, XPA participa en la reparación por NER y actúa durante el segundo paso de verificación de la lesión [41]. Además de interactuar con TFIIH, XPA interactúa con RPA para formar el andamiaje previo al corte endonucleolítico [170]. Finalmente, MGMT es una enzima que remueve directamente modificaciones O<sup>6</sup>-meG. El aumento en la expresión de genes como *Hus1*, *Rad9a*, *Rad52*, *Nbn*, *Xpa* y *Mgmt* sugiere que probablemente miR-27b-3p podría ejercer una regulación positiva en la transcripción de estos genes ya sea mediante interacciones con elementos asociados a su transcripción, o bien, a través de la inhibición de factores que reprimen la expresión de estos genes. De manera similar a lo que observamos con los genes que redujeron su expresión, la reparación de DSBs es un proceso representado por los genes que aumentaron su expresión en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p. Estos resultados apoyan la idea de que el papel de miR-27b-3p en la reparación del ADN está principalmente asociado a la reparación de DSBs a través de interacciones de regulación canónicas y alternativas.

No todos los genes desregulados en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p son blancos predichos de este miRNA. Asimismo, no todos los genes predichos como blanco de miR-27b-3p estaban desregulados. De los 84 genes analizados, 43 (51%) de ellos son blancos predichos y de los 27 genes cuya expresión estaba desregulada, 15 de ellos (56%) son blancos predichos (Tabla 3). Esto podría ser percibido como una discrepancia

entre los genes predichos como blanco y los genes que efectivamente se observaron desregulados, sin embargo, es importante tener en cuenta que la regulación mediada por miRNAs es una compleja red de interacciones en la que cada mRNA puede interactuar con numerosos miRNAs y viceversa, que frecuentemente un mRNA puede tener múltiples sitios de reconocimiento para un mismo miRNA o para varios que pueden interactuar al mismo tiempo [171]. Además, se ha sugerido que las interacciones miRNA – mRNA actúan como un mecanismo de control bidireccional en donde los blancos también afectan la actividad de los miRNAs [172]. Al respecto, la hipótesis de los RNAs endógenos en competencia (ceRNAs) postula que los blancos endógenos compiten entre ellos por la unión a miRNAs, por lo tanto, cambios en la expresión de un miRNA puede influir en la interacción de un blanco con otro miRNA ya sea promoviéndola o reprimiéndola [173]. De tal manera que las interacciones miRNA – mRNA son totalmente dependientes del contexto celular y por lo tanto es difícil predecir las interacciones que pueden presentarse en un experimento *in vitro* [174]. A pesar de las limitaciones computacionales y el alcance de los algoritmos empleados por las herramientas de búsqueda, la predicción de interacciones facilita el proceso de reducir los posibles blancos de cierto miRNA y determinar los procesos celulares en que participan. Como se mencionó anteriormente, el análisis *in silico* realizado en este trabajo mostró que miR-27b-3p tiene un mayor número de genes blanco putativos relacionados con la reparación del ADN que miR-155-5p y esto se vio reflejado en la disminución de la capacidad de reparación en las células que sobreexpresaban miR-27b-3p.

La sobreexpresión de miR-27b-3p causó cambios generales en el perfil de expresión de los 84 genes de reparación del ADN durante la reparación de las lesiones causadas por DOX. Se ha reportado que la exposición a DOX causa una desregulación en la expresión de genes involucrados en varios procesos celulares incluyendo la reparación del ADN [175–177]. Por ejemplo, la expresión de genes como *Atm*, *Blm*, *Brca1*, *Cdc25c*, *Exo1*, *Fanca*, *Fancd2*, *Fancg*, *Fen1*, *H2afx*, *Pole*, *Pttg1* y *Xrcc2* se ha observado disminuida en células tratadas con DOX [177,178]. En este trabajo también se observaron modificaciones en la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN después del tratamiento con DOX, entre los que se incluyen los genes mencionados con una expresión a la baja (Fig. 16 A, B). Se ha sugerido que la reducción en la expresión de



genes de reparación después del tratamiento con DOX puede estar relacionada con el inicio de la adquisición de un fenotipo de resistencia al compuesto [178]. Sin embargo, las causas detrás de la desregulación de genes de reparación del ADN por la exposición a DOX no han sido suficientemente exploradas. El perfil de expresión de los 84 genes después de la exposición a DOX fue distinto entre las células que sobreexpresaban miR-27b-3p y las células no transfectadas (Fig. 16 A, B; Tabla 7). Con base en el análisis de interacciones, las proteínas de los nueve genes desregulados únicamente en las células tratadas con DOX que sobreexpresan miR-27b-3p (*Dclre1a*, *Rev1*, *Xpa*, *Pms2*, *Brca2*, *Parp2*, *Smc3*, *Nbn*, *Bax*) mantienen algunas interacciones putativas y otras experimentalmente validadas entre ellos, asimismo, como grupo de proteínas participan en procesos como HRR, la reparación del ADN por la vía de anemia de Fanconi y regulación del ciclo celular (Fig. 17). De estos genes, *Dclre1a*, *Xpa*, *Pms2* y *Brca2*, son genes predichos como blancos putativos de miR-27b-3p. Este cambio en el perfil de expresión ayuda a explicar la pérdida de la funcionalidad reparativa que observamos en el ensayo cometa con las células que sobreexpresan miR-27b-3p. En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión de miR-27b-3p altera la respuesta a nivel génico que ocurre como parte del proceso de reparación del daño al ADN y, por consiguiente, la abundancia e interacción de las proteínas de reparación, lo que finalmente se traduce en la pérdida de la funcionalidad de la reparación del ADN observada en el ensayo cometa. Por otra parte, los resultados sugieren que la sobreexpresión de miR-27b-3p podría ser un factor importante en la sensibilidad de células tumorales ante el tratamiento con DOX o compuestos que actúen de manera similar.

La reducción de la expresión del miR-27b-3p a través de la transfección con el inhibidor no tuvo efecto sobre la capacidad de reparación del ADN. Asimismo, cuando las células fueron expuestas a los agentes de daño después de 96 h posteriores a la transfección con miR-27b-3p, momento en el que la expresión del miRNA ha vuelto a niveles similares al basal, no se observaron alteraciones en su capacidad de reparación (Fig.12). Estos resultados sugieren que la función de miR-27b-3p, como regulador de la reparación del ADN, depende de un incremento en su nivel de expresión.

La pérdida o ganancia de regulación genética mediada por miRNAs puede conducir a una modulación inapropiada de sus genes blanco. Por lo tanto, las alteraciones en la expresión de miRNAs pueden contribuir al desarrollo de enfermedades pues modifican el funcionamiento de los procesos celulares [179]. Los mecanismos que generan la desregulación de miR-27b-3p no se han logrado estudiar a detalle, no obstante, se ha observado que al igual que como ocurre con otros miRNAs, ciertos cambios epigenéticos, tales como la metilación y la modificación de histonas, la regulación mediada por otros miRNAs, así como alteraciones en la regulación transcripcional y vías de señalización son factores que pueden desregular la expresión de miR-27b-3p. En diversos tipos de cáncer, la expresión de miR-27b-3p se ha observado desregulada, tanto a la alta como a la baja [92 – 99], y se ha visto que múltiples vías de señalización, entre las que se incluye NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT, ER $\alpha$ /ERK 1/2 pueden regular la expresión de miR-27b-3p [180]. Asimismo, otros factores como TNF $\alpha$ , EGF, HER2, IL6, CCL18 e IFN $\gamma$  se han asociado con la regulación de la expresión de este miRNA [90]. En el contexto del cáncer, a menudo se clasifica a los miRNAs como oncogenes (oncomiRs) y supresores de tumores dependiendo de su nivel de expresión y la relación entre su expresión y la de genes involucrados en procesos relevantes durante la formación de tumores tales como la reparación del ADN, ciclo celular, proliferación y apoptosis [181,182]. Sin embargo, dado que los efectos de los miRNAs son intrínsecamente pleiotrópicos, no es raro que un miRNA actúe como supresor en un tipo específico de tumor y como oncogén en otro tipo de tumor [183]. Como se mencionó, la expresión de miR-27b-3p se ha visto tanto al alta como a la baja en diferentes tipos de cáncer [94–101], lo que sugiere que tiene un doble papel como oncogén y supresor de tumores, el cual dependerá del contexto particular del tumor. El funcionamiento de miR-27b-3p en el cáncer, como ocurre con otros miRNAs, depende de determinantes específicos, incluidas las características moleculares, celulares e histológicas intrínsecas y extrínsecas de los tumores así como de la abundancia y disponibilidad de los mRNA blanco [182,184]. Los resultados aquí presentados con el modelo utilizado en este trabajo indican que miR-27b-3p funciona como regulador negativo de la reparación del ADN y que su actividad como tal depende de un aumento en su expresión, lo cual se traduce en la acumulación de daño en el ADN.

## CONCLUSIÓN

Los hallazgos presentados en este trabajo demuestran por primera vez que miR-27b-3p funciona como un regulador negativo de la reparación del ADN. Cuando este miRNA está sobreexpresado, puede desregular la expresión de genes involucrados en mecanismos de reparación del ADN, principalmente HRR y BER, así como otros genes que participan en la señalización de DSBs y regulación del ciclo celular. La desregulación en la expresión de dichos genes causa una reducción en la capacidad de reparación del daño al ADN, principalmente DSBs y lesiones oxidativas. Por lo tanto, el papel de miR-27b-3p en la reparación del ADN, representa un tema de estudio interesante que puede contribuir a mejorar los criterios de diagnóstico y tratamiento del cáncer, puesto que las estrategias de quimioterapia y radioterapia están diseñadas para destruir células cancerosas por medio de la inducción de daño al ADN, de tal modo que para que la terapia sea exitosa es importante aprovechar las posibles vulnerabilidades de las células cancerosas en su capacidad de reparación del ADN. Estudiar los efectos de la sobreexpresión de miR-27b-3p sobre la sensibilidad de células cancerosas a agentes físicos y químicos empleados en el tratamiento del cáncer, permitirá determinar su utilidad como posible marcador de sensibilidad en distintos tipos de tumores. Asimismo, el estudio de los factores intrínsecos y extrínsecos determinantes para la expresión de miR-27b-3p y la regulación de sus genes blanco, permitirá delinear de mejor manera la importancia de este miRNA en el tratamiento contra el cáncer.

## REFERENCIAS

- [1] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*. 75 (1993) 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
- [2] D.P. Bartel, Metazoan MicroRNAs, *Cell*. 173 (2018) 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>.
- [3] S.A. Shabalina, E. V. Koonin, Origins and evolution of eukaryotic RNA interference, *Trends Ecol. Evol.* 23 (2008) 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>.
- [4] S.L. Ameres, P.D. Zamore, Diversifying microRNA sequence and function., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 475–88. <https://doi.org/10.1038/nrm3611>.
- [5] A. Kozomara, M. Birgaoanu, S. Griffiths-Jones, miRBase: from microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
- [6] S. Jonas, E. Izaurralde, Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing, *Nat. Rev. Genet.* 16 (2015) 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>.
- [7] V.N. Kim, MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 376–85. <https://doi.org/10.1038/nrm1644>.
- [8] M. Ha, V.N. Kim, Regulation of microRNA biogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- [9] M.T. Bohnsack, K. Czaplinski, D. Gorlich, Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs, *RNA*. 10 (2004) 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>.
- [10] M. Ha, V.N. Kim, Regulation of microRNA biogenesis., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- [11] H. a Meijer, E.M. Smith, M. Bushell, Regulation of miRNA strand selection: follow

- the leader?, *Biochem. Soc. Trans.* 42 (2014) 1135–40.  
<https://doi.org/10.1042/BST20140142>.
- [12] D. Kim, Y.M. Sung, J. Park, S. Kim, J. Kim, J. Park, H. Ha, J.Y. Bae, S. Kim, D. Baek, General rules for functional microRNA targeting., *Nat. Genet.* 48 (2016) 1517–1526. <https://doi.org/10.1038/ng.3694>.
- [13] E. Berezikov, Evolution of microRNA diversity and regulation in animals., *Nat. Rev. Genet.* 12 (2011) 846–60. <https://doi.org/10.1038/nrg3079>.
- [14] S.D. Chandradoss, N.T. Schirle, M. Szczepaniak, I.J. Macrae, C. Joo, A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting, *Cell.* 162 (2015) 96–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.032>.
- [15] J.A. Swenberg, K. Lu, B.C. Moeller, L. Gao, P.B. Upton, J. Nakamura, T.B. Starr, Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment., *Toxicol. Sci.* 120 Suppl 1 (2011) S130-45.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq371>.
- [16] J. a Marteiijn, H. Lans, W. Vermeulen, J.H.J. Hoeijmakers, Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 465–81. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>.
- [17] M. He, W. Zhou, C. Li, M. Guo, MicroRNAs, DNA damage response, and cancer treatment, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17122087>.
- [18] M. Majidinia, B. Yousefi, DNA damage response regulation by microRNAs as a therapeutic target in cancer, *DNA Repair (Amst).* 47 (2016) 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.09.003>.
- [19] G. Wan, R. Mathur, X. Hu, X. Zhang, X. Lu, MiRNA response to DNA damage, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 478–484.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.06.002>.
- [20] X. Zhang, G. Wan, F.G. Berger, X. He, X. Lu, The ATM Kinase Induces MicroRNA Biogenesis in the DNA Damage Response, *Mol. Cell.* 41 (2011) 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.020>.
- [21] G. Wan, X. Zhang, R.R. Langlely, Y. Liu, X. Hu, C. Han, G. Peng, L.M. Ellis, S.N.

- Jones, X. Lu, Article DNA-Damage-Induced Nuclear Export of Precursor MicroRNAs Is Regulated by the ATM-AKT Pathway, *CellReports*. 3 (2013) 2100–2112. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.038>.
- [22] Y. Wang, T. Taniguchi, MicroRNAs and DNA damage response: Implications for cancer therapy, *Cell Cycle*. 12 (2013) 32–42. <https://doi.org/10.4161/cc.23051>.
- [23] N.L. Simone, B.P. Soule, D. Ly, A.D. Saleh, J.E. Savage, W. DeGraff, J. Cook, C.C. Harris, D. Gius, J.B. Mitchell, Ionizing Radiation-Induced Oxidative Stress Alters miRNA Expression, *PLoS One*. 4 (2009) e6377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006377>.
- [24] G. Bottai, B. Pasculli, G.A. Calin, L. Santarpia, Targeting the microRNA-regulating DNA damage/repair pathways in cancer., *Expert Opin. Biol. Ther.* 14 (2014) 1667–83. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.950650>.
- [25] S.A. Georges, M.C. Biery, S. -y. Kim, J.M. Schelter, J. Guo, A.N. Chang, A.L. Jackson, M.O. Carleton, P.S. Linsley, M.A. Cleary, B.N. Chau, Coordinated Regulation of Cell Cycle Transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215, *Cancer Res.* 68 (2008) 10105–10112. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1846>.
- [26] C.J. Braun, X. Zhang, I. Savelyeva, S. Wolff, U.M. Moll, T. Schepeler, T.F. Orntoft, C.L. Andersen, M. Dobbstein, p53-Responsive MicroRNAs 192 and 215 Are Capable of Inducing Cell Cycle Arrest, *Cancer Res.* 68 (2008) 10094–10104. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1569>.
- [27] P. Fortini, E. Dogliotti, Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways, *DNA Repair (Amst)*. 6 (2007) 398–409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.008>.
- [28] A.B. Robertson, A. Klungland, T. Rognes, I. Leiros, Base excision repair: The long and short of it, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 981–993. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8736-z>.
- [29] H.E. Krokan, M. Bjoras, Base Excision Repair, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a012583–a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.

- [30] Y.-J. Kim, D.M. Wilson, Overview of base excision repair biochemistry., *Curr. Mol. Pharmacol.* 5 (2012) 3–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122461> (accessed January 10, 2018).
- [31] M.L. Hegde, T.K. Hazra, S. Mitra, Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells., *Cell Res.* 18 (2008) 27–47. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.8>.
- [32] B. Dalhus, J.K. Laerdahl, P.H. Backe, M. Bjørås, DNA base repair – recognition and initiation of catalysis, *FEMS Microbiol. Rev.* 33 (2009) 1044–1078. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00188.x>.
- [33] J.I. Friedman, J.T. Stivers, Detection of Damaged DNA Bases by DNA Glycosylase Enzymes, *Biochemistry.* 49 (2010) 4957–4967. <https://doi.org/10.1021/bi100593a>.
- [34] K. Hitomi, S. Iwai, J.A. Tainer, The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair, *DNA Repair (Amst).* 6 (2007) 410–428. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.004>.
- [35] R. Abbotts, S. Madhusudan, Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer, *Cancer Treat. Rev.* 36 (2010) 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.12.006>.
- [36] R. Abbotts, D.M. Wilson, Coordination of DNA single strand break repair, *Free Radic. Biol. Med.* 107 (2016) 228–244. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039>.
- [37] Y. Matsumoto, K. Kim, Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair, *Science (80-. ).* 269 (1995) 699–702. <https://doi.org/10.1126/science.7624801>.
- [38] T.S. Dexheimer, DNA Repair of Cancer Stem Cells, *DNA Repair Cancer Stem Cells.* (2013) 19–32. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4590-2>.
- [39] A. Scrima, R. Koní, B.K. Czyzewski, Y. Kawasaki, P.D. Jeffrey, Y. Nakatani, S. Iwai, N.P. Pavletich, N.H. Thomä, Structural Basis of UV DNA-Damage

- Recognition by the DDB1-DDB2 Complex Supplemental Tables Table S1 : Data collection and refinement statistics for hsDDB1-drDDB2 complexes, *Cell*. 135 (2008) 1213–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.045>.
- [40] K. Sugasawa, Y. Okuda, M. Saijo, R. Nishi, N. Matsuda, G. Chu, T. Mori, S. Iwai, K. Tanaka, K. Tanaka, F. Hanaoka, UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex, *Cell*. 121 (2005) 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.035>.
- [41] H. Naegeli, K. Sugasawa, The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality., *DNA Repair (Amst)*. 10 (2011) 673–83. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.019>.
- [42] W.L. De Laat, N.G.J. Jaspers, J.H.J. Hoeijmakers, Molecular mechanism of nucleotide excision repair Molecular mechanism of nucleotide excision repair, *Genes Dev*. 13 (1999) 768–785. <https://doi.org/10.1101/gad.13.7.768>.
- [43] M. Fousteri, L.H. Mullenders, Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects, *Cell Res*. 18 (2008) 73–84. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.6>.
- [44] M. Goldstein, M.B. Kastan, The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy, *Annu. Rev. Med*. 66 (2015) 129–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-081313-121208>.
- [45] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease., *Nature*. 461 (2009) 1071–8. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.
- [46] W.J. Cannan, D.S. Pederson, Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin, *J. Cell. Physiol*. 231 (2016) 3–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>.
- [47] M.M. Vilenchik, A.G. Knudson, Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 100 (2003) 12871–12876. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135498100>.
- [48] K.K. Chiruvella, Z. Liang, T.E. Wilson, Repair of double-strand breaks by end joining., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 5 (2013) 1–21.



- <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012757>.
- [49] K. Karanam, R. Kafri, A. Loewer, G. Lahav, Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase, *Mol. Cell.* 47 (2012) 320–329.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052>.
- [50] H.H.Y. Chang, N.R. Pannunzio, N. Adachi, M.R. Lieber, Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2017). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>.
- [51] M.R. Lieber, The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway., *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010) 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>.
- [52] N.R. Pannunzio, G. Watanabe, M.R. Lieber, Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 10512–10523.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>.
- [53] A. Beucher, J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A.A. Goodarzi, A. Krempler, P.A. Jeggo, M. Löbrich, ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2, *EMBO J.* 28 (2009) 3413–3427. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.276>.
- [54] A.N. Blackford, S.P. Jackson, ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response, *Mol. Cell.* 66 (2017) 801–817.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
- [55] A.A. Goodarzi, Y. Yu, E. Riballo, P. Douglas, S.A. Walker, R. Ye, C. Härer, C. Marchetti, N. Morrice, P.A. Jeggo, S.P. Lees-Miller, DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity., *EMBO J.* 25 (2006) 3880–9.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601255>.
- [56] H.H.Y. Chang, G. Watanabe, M.R. Lieber, Unifying the DNA End-processing Roles of the Artemis Nuclease, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 24036–24050.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680900>.
- [57] H.H.Y. Chang, M.R. Lieber, Structure-Specific nuclease activities of Artemis and

- the Artemis: DNA-PKcs complex, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 4991–4997.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw456>.
- [58] E. Riballo, M. Kühne, N. Rief, A. Doherty, G.C.M. Smith, M.-J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A.R. Parker, S.P. Jackson, A. Gennery, P.A. Jeggo, M. Löbrich, A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to  $\gamma$ -H2AX Foci, *Mol. Cell.* 16 (2004) 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.029>.
- [59] A. Kurosawa, H. Koyama, S. Takayama, K. Miki, D. Ayusawa, M. Fujii, S. Iizumi, N. Adachi, The Requirement of Artemis in Double-Strand Break Repair Depends on the Type of DNA Damage, *DNA Cell Biol.* 27 (2008) 55–61.  
<https://doi.org/10.1089/dna.2007.0649>.
- [60] Y. Ma, H. Lu, B. Tippin, M.F. Goodman, N. Shimazaki, O. Koiwai, C.-L. Hsieh, K. Schwarz, M.R. Lieber, A Biochemically Defined System for Mammalian Nonhomologous DNA End Joining, *Mol. Cell.* 16 (2004) 701–713.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.017>.
- [61] B. Bertocci, A. De Smet, J.-C. Weill, C.-A. Reynaud, Nonoverlapping Functions of DNA Polymerases Mu, Lambda, and Terminal Deoxynucleotidyltransferase during Immunoglobulin V(D)J Recombination In Vivo, *Immunity.* 25 (2006) 31–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.013>.
- [62] J. Gu, H. Lu, B. Tippin, N. Shimazaki, M.F. Goodman, M.R. Lieber, XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps, *EMBO J.* 26 (2007) 1010–1023. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601559>.
- [63] J. Gu, H. Lu, B. Tippin, N. Shimazaki, M.F. Goodman, M.R. Lieber, XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps, *EMBO J.* 26 (2007) 1010–1023. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601559>.
- [64] J.M. Pryor, C.A. Waters, A. Aza, K. Asagoshi, C. Strom, P.A. Mieczkowski, L. Blanco, D.A. Ramsden, Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E4537–E4545.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1505805112>.
- [65] H.H.Y. Chang, G. Watanabe, C.A. Gerodimos, T. Ochi, T.L. Blundell, S.P.

- Jackson, M.R. Lieber, Different DNA End Configurations Dictate Which NHEJ Components Are Most Important for Joining Efficiency, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 24377–24389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752329>.
- [66] R. Ceccaldi, B. Rondinelli, A.D. D'Andrea, Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break, *Trends Cell Biol.* 26 (2016) 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>.
- [67] M. Krajewska, R.S.N. Fehrmann, E.G.E. de Vries, M.A.T.M. van Vugt, Regulators of homologous recombination repair as novel targets for cancer treatment, *Front. Genet.* 6 (2015) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00096>.
- [68] A. Xie, A. Kwok, R. Scully, Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 814–818. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1640>.
- [69] S. Zha, C. Boboila, F.W. Alt, Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 798–800. <https://doi.org/10.1038/nsmb0809-798>.
- [70] T.T. Paull, Mechanisms of ATM Activation, *Annu. Rev. Biochem.* 84 (2015) 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>.
- [71] R.S. Williams, G.E. Dodson, O. Limbo, Y. Yamada, J.S. Williams, G. Guenther, S. Classen, J.N.M. Glover, H. Iwasaki, P. Russell, J.A. Tainer, Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair, *Cell.* 139 (2009) 87–99. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.07.033>.
- [72] J. Lloyd, J.R. Chapman, J.A. Clapperton, L.F. Haire, E. Hartsuiker, J. Li, A.M. Carr, S.P. Jackson, S.J. Smerdon, A Supramodular FHA/BRCT-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage, *Cell.* 139 (2009) 100–111. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.07.043>.
- [73] U. Rass, S.A. Compton, J. Matos, M.R. Singleton, S.C.Y. Ip, M.G. Blanco, J.D. Griffith, S.C. West, Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein, *Genes Dev.* 24 (2010) 1559–1569. <https://doi.org/10.1101/gad.585310>.
- [74] K. Zakharyevich, Y. Ma, S. Tang, P.Y.-H. Hwang, S. Boiteux, N. Hunter,

- Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand break resection and resolution of double Holliday junctions., *Mol. Cell.* 40 (2010) 1001–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.032>.
- [75] S.E. Tsutakawa, J. Lafrance-Vanasse, J.A. Tainer, The cutting edges in DNA repair, licensing, and fidelity: DNA and RNA repair nucleases sculpt DNA to measure twice, cut once, *DNA Repair (Amst)*. 19 (2014) 95–107. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2014.03.022>.
- [76] P. Cejka, DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination., *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 22931–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.675942>.
- [77] E. Cannavo, P. Cejka, S.C. Kowalczykowski, Relationship of DNA degradation by *Saccharomyces cerevisiae* Exonuclease 1 and its stimulation by RPA and Mre11-Rad50-Xrs2 to DNA end resection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) E1661–E1668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305166110>.
- [78] W.-D. Heyer, K.T. Ehmsen, J. Liu, Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes, *Annu. Rev. Genet.* 44 (2010) 113–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>.
- [79] E. Mladenov, S. Magin, A. Soni, G. Iliakis, DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation, *Semin. Cancer Biol.* 37–38 (2016) 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.003>.
- [80] M.J. McIlwraith, A. Vaisman, Y. Liu, E. Fanning, R. Woodgate, S.C. West, S.C. West, Human DNA Polymerase  $\eta$  Promotes DNA Synthesis from Strand Invasion Intermediates of Homologous Recombination, *Mol. Cell.* 20 (2005) 783–792. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.001>.
- [81] S.C.Y. Ip, U. Rass, M.G. Blanco, H.R. Flynn, J.M. Skehel, S.C. West, Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast, *Nature*. 456 (2008) 357–361. <https://doi.org/10.1038/nature07470>.
- [82] E.P. Mimitou, L.S. Symington, Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination, *Trends Biochem. Sci.* 34 (2009) 264–272.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.01.010>.

- [83] M. Seki, T. Nakagawa, T. Seki, G. Kato, S. Tada, Y. Takahashi, A. Yoshimura, T. Kobayashi, A. Aoki, M. Otsuki, F.A. Habermann, H. Tanabe, Y. Ishii, T. Enomoto, Bloom Helicase and DNA Topoisomerase III Are Involved in the Dissolution of Sister Chromatids, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 6299–6307.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.00702-06>.
- [84] M.A. Rodríguez-Sastre, E. Rojas, M. Valverde, Assessing the impact of As-Cd-Pb metal mixture on cell transformation by two-stage Balb/c 3T3 cell assay., *Mutagenesis.* 29 (2014) 251–7. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu013>.
- [85] E. Martínez-Baeza, E. Rojas, M. Valverde, Metal mixture (As–Cd–Pb)-induced cell transformation is modulated by OLA1, *Mutagenesis.* 31 (2016) 463–473.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/gew010>.
- [86] H.S. Kim, Y.J. Kim, Y.R. Seo, An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention, *J. Cancer Prev.* 20 (2015) 232–240. <https://doi.org/10.15430/jcp.2015.20.4.232>.
- [87] E.F. Madden, The role of combined metal interactions in metal carcinogenesis: A review, *Rev. Environ. Health.* 18 (2003) 91–109.  
<https://doi.org/10.1515/REVEH.2003.18.2.91>.
- [88] D. Hanahan, R. a. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [89] M. Martínez-Pacheco, A. Hidalgo-Miranda, S. Romero-Córdoba, M. Valverde, E. Rojas, mRNA and miRNA expression patterns associated to pathways linked to metal mixture health effects, *Gene.* 533 (2014) 508–514.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.049>.
- [90] L. Ding, J. Ni, F. Yang, L. Huang, H. Deng, Y. Wu, X. Ding, J. Tang, Promising therapeutic role of miR-27b in tumor, *Tumor Biol.* 39 (2017).  
<https://doi.org/10.1177/1010428317691657>.
- [91] W.J. Kent, C.W. Sugnet, T.S. Furey, K.M. Roskin, T.H. Pringle, A.M. Zahler, a. D. Haussler, The Human Genome Browser at UCSC, *Genome Res.* 12 (2002) 996–

1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>.
- [92] AOPEP aminopeptidase O (putative) [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84909#summary> (accessed December 1, 2022).
- [93] M. Zech, K.R. Kumar, S. Reining, J. Reunert, M. Tchan, L.G. Riley, A.P. Drew, R.J. Adam, R. Berutti, S. Biskup, N. Derive, S. Bakhtiari, S.C. Jin, M.C. Kruer, T. Bardakjian, P. Gonzalez-Alegre, I.J. Keller Sarmiento, N.E. Mencacci, S.J. Lubbe, M.A. Kurian, F. Clot, A. Méneret, J.M. de Sainte Agathe, V.S.C. Fung, M. Vidailhet, M. Baumann, T. Marquardt, J. Winkelmann, S. Boesch, Biallelic AOPEP Loss-of-Function Variants Cause Progressive Dystonia with Prominent Limb Involvement, *Mov. Disord.* 37 (2022) 137–147. <https://doi.org/10.1002/MDS.28804>.
- [94] F. Liu, S. Zhang, Z. Zhao, X. Mao, J. Huang, Z. Wu, L. Zheng, Q. Wang, MicroRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer, *Oncotarget.* 7 (2016) 19666–79. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7531>.
- [95] Y. Wang, R. Rathinam, A. Walch, S.K. Alahari, ST14 (suppression of tumorigenicity 14) gene is a target for miR-27b, and the inhibitory effect of ST14 on cell growth is independent of miR-27b regulation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 23094–23106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.012617>.
- [96] L. Chen, H. Li, L. Han, K. Zhang, G. Wang, Y. Wang, Y. Liu, Y. Zheng, T. Jiang, P. Pu, C. Jiang, C. Kang, Expression and function of miR-27b in human glioma, *Oncol. Rep.* 26 (2011) 1617–1621. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1458>.
- [97] Y. Goto, S. Kojima, R. Nishikawa, H. Enokida, T. Chiyomaru, T. Kinoshita, M. Nakagawa, Y. Naya, T. Ichikawa, N. Seki, The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer., *Oncotarget.* 5 (2014) 7748–59. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4202158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed October 12, 2015).

- [98] J. Ye, X. Wu, D. Wu, P. Wu, C. Ni, Z. Zhang, Z. Chen, F. Qiu, J. Xu, J. Huang, miRNA-27b Targets Vascular Endothelial Growth Factor C to Inhibit Tumor Progression and Angiogenesis in Colorectal Cancer, *PLoS One*. 8 (2013) e60687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060687>.
- [99] J. Tao, X. Zhi, X. Zhang, M. Fu, H. Huang, Y. Fan, W. Guan, C. Zou, MiR-27b-3p suppresses cell proliferation through targeting receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1 in gastric cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34 (2015) 139. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0253-3>.
- [100] T. Chiyomaru, N. Seki, S. Inoguchi, T. Ishihara, H. Mataka, R. Matsushita, Y. Goto, R. Nishikawa, S. Tatarano, T. Itesako, M. Nakagawa, H. Enokida, Dual regulation of receptor tyrosine kinase genes EGFR and c-Met by the tumor-suppressive microRNA-23b/27b cluster in bladder cancer, *Int. J. Oncol.* 46 (2015) 487–496. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2752>.
- [101] J. Jiang, X. Lv, L. Fan, G. Huang, Y. Zhan, M. Wang, H. Lu, MicroRNA-27b suppresses growth and invasion of NSCLC cells by targeting Sp1, *Tumor Biol.* 35 (2014) 10019–10023. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2294-1>.
- [102] S.C. Eastlack, S. Dong, C. Ivan, S.K. Alahari, Suppression of PDHX by microRNA-27b deregulates cell metabolism and promotes growth in breast cancer, *Mol. Cancer.* 17 (2018). <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0851-8>.
- [103] J.-J. Lee, A. Drakaki, D. Iliopoulos, K. Struhl, MiR-27b targets PPAR $\gamma$  to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells., *Oncogene.* 31 (2012) 3818–25. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.543>.
- [104] M.J. Weber, New human and mouse microRNA genes found by homology search, *FEBS J.* 272 (2005) 59–73. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04389.x>.
- [105] I. Faraoni, F.R. Antonetti, J. Cardone, E. Bonmassar, miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792 (2009) 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013>.
- [106] M.N. Nikiforova, G.C. Tseng, D. Steward, D. Diorio, Y.E. Nikiforov, MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic

- utility., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 1600–8.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-2696>.
- [107] M. V Iorio, M. Ferracin, C.-G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Ménard, J.P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, C.M. Croce, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer., *Cancer Res.* 65 (2005) 7065–70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>.
- [108] S. Volinia, G.A. Calin, C.-G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, C.M. Croce, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 2257–2261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>.
- [109] X. Wang, S. Tang, S.-Y. Le, R. Lu, J.S. Rader, C. Meyers, Z.-M. Zheng, Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth., *PLoS One.* 3 (2008) e2557.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002557>.
- [110] J.L. Eun, Y. Gusev, J. Jiang, G.J. Nuovo, M.R. Lerner, W.L. Frankel, D.L. Morgan, R.G. Postier, D.J. Brackett, T.D. Schmittgen, Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer, *Int. J. Cancer.* 120 (2007) 1046–1054.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.22394>.
- [111] J.R. Czocho, P. Sulkowski, P.M. Glazer, miR-155 Overexpression Promotes Genomic Instability by Reducing High-fidelity Polymerase Delta Expression and Activating Error-Prone DSB Repair, *Mol. Cancer Res.* 14 (2016) 363–373.  
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0399>.
- [112] N. Valeri, P. Gasparini, M. Fabbri, C. Braconi, A. Veronese, F. Lovat, B. Adair, I. Vannini, F. Fanini, A. Bottoni, S. Costinean, S.K. Sandhu, G.J. Nuovo, H. Alder, R. Gafa, F. Calore, M. Ferracin, G. Lanza, S. Volinia, M. Negrini, M.A. McIlhatton, D. Amadori, R. Fishel, C.M. Croce, Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 6982–6987.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1002472107>.



- [113] P. Gasparini, F. Lovat, M. Fassan, L. Casadei, L. Cascione, N.K. Jacob, S. Carasi, D. Palmieri, S. Costinean, C.L. Shapiro, K. Huebner, C.M. Croce, Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 4536–4541. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402604111>.
- [114] M.A. Chaudhry, H. Sachdeva, R.A. Omaruddin, Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways., *DNA Cell Biol.* 29 (2010) 553–61. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0978>.
- [115] S. Alivernini, E. Gremese, C. McSharry, B. Toluoso, G. Ferraccioli, I.B. McInnes, M. Kurowska-Stolarska, MicroRNA-155-at the critical interface of innate and adaptive immunity in arthritis, *Front. Immunol.* 8 (2018) 1932. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01932>.
- [116] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method., *Methods.* 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [117] M. Aeschbacher, C.A. Reinhardt, G. Zbinden, A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry, *Cell Biol. Toxicol.* 2 (1986) 247–255. <https://doi.org/10.1007/BF00122693>.
- [118] J.L. Jarnagin, D.W. Luchsinger, The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria, *Biotech. Histochem.* 55 (1980) 253–258. <https://doi.org/10.3109/10520298009067249>.
- [119] P.L. Olive, R.E. Durand, Heterogeneity in DNA damage using the comet assay, *Cytom. Part A.* 66 (2005) 1–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20154>.
- [120] The Gene Ontology Consortium, Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D331–D338. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1108>.
- [121] H. Dweep, N. Gretz, miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions., *Nat. Methods.* 12 (2015) 697. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3485>.
- [122] B. Jassal, L. Matthews, G. Viteri, C. Gong, P. Lorente, A. Fabregat, K.

- Sidiropoulos, J. Cook, M. Gillespie, R. Haw, F. Loney, B. May, M. Milacic, K. Rothfels, C. Sevilla, V. Shamovsky, S. Shorser, T. Varusai, J. Weiser, G. Wu, L. Stein, H. Hermjakob, P. D'Eustachio, The reactome pathway knowledgebase, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) D498–D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>.
- [123] D. Szklarczyk, A.L. Gable, K.C. Nastou, D. Lyon, R. Kirsch, S. Pyysalo, N.T. Doncheva, M. Legeay, T. Fang, P. Bork, L.J. Jensen, C. von Mering, The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) D605–D612. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1074>.
- [124] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations., *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>.
- [125] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- [126] H. Nilsen, T. Lindahl, *DNA Base Excision Repair*, 2nd ed., Elsevier Inc., 2004. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00618-6>.
- [127] S.M. Peterson, J.A. Thompson, M.L. Ufkin, P. Sathyanarayana, L. Liaw, C.B. Congdon, Common features of microRNA target prediction tools, *Front. Genet.* 5 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00023>.
- [128] A.C. Drohat, A. Maiti, *DNA Glycosylases: Mechanisms*, 2nd ed., Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00279-6>.
- [129] J.K. Horton, M. Watson, D.F. Stefanick, D.T. Shaughnessy, J.A. Taylor, S.H. Wilson, XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks, *Cell Res.* 18 (2008) 48–63. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.7>.
- [130] A.L. Lu, X. Li, Y. Gu, P.M. Wright, D.Y. Chang, Repair of oxidative DNA damage: Mechanisms and functions, *Cell Biochem. Biophys.* 35 (2001) 141–170. <https://doi.org/10.1385/CBB:35:2:141>.

- [131] M. Dizdaroglu, A. Karakaya, P. Jaruga, G. Slupphaug, H.E. Krokan, Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 418–422. <https://doi.org/10.1093/nar/24.3.418>.
- [132] Z. Zhang, H. Huo, K. Liao, Z. Wang, Z. Gong, Y. Li, C. Liu, G. Hu, RPA1 downregulation enhances nasopharyngeal cancer radiosensitivity via blocking RAD51 to the DNA damage site, *Exp. Cell Res.* 371 (2018) 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.08.025>.
- [133] Z. Zou, M. Ni, J. Zhang, Y. Chen, H. Ma, S. Qian, L. Tang, J. Tang, H. Yao, C. Zhao, X. Lu, H. Sun, J. Qian, X. Mao, X. Lu, Q. Liu, J. Zen, H. Wu, Z. Bao, S. Lin, H. Sheng, Y. Li, Y. Liang, Z. Chen, D. Zong, miR-30a can inhibit DNA replication by targeting RPA1 thus slowing cancer cell proliferation., *Biochem. J.* 473 (2016) 2131–9. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160177>.
- [134] Y. Liu, M.B. Smolka, TOP BP1 takes RADical command in recombinational DNA repair, *J. Cell Biol.* 212 (2016) 263–266. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601028>.
- [135] A. Lal, Y. Pan, F. Navarro, D.M. Dykxhoorn, L. Moreau, E. Meire, Z. Bentwich, J. Lieberman, D. Chowdhury, MiR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 492–498. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1589>.
- [136] C.E. Tambini, K.G. Spink, C.J. Ross, M.A. Hill, J. Thacker, The importance of XRCC2 in RAD51-related DNA damage repair, *DNA Repair (Amst)*. 9 (2010) 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.01.016>.
- [137] Y. Zhang, J.-H. An, Y.-X. Liu, X.-C. Wu, S.-S. Han, X. Ren, C.-J. Qin, XRCC2-Deficient Cells are Highly Sensitive to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer, *Cell. Physiol. Biochem.* 43 (2017) 1207–1219. <https://doi.org/10.1159/000481762>.
- [138] D.S. Patel, S.M. Misenko, J. Her, S.F. Bunting, BLM helicase regulates DNA repair by counteracting RAD51 loading at DNA double-strand break sites, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 3521–3534. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703144>.
- [139] R. Baskaran, L.D. Wood, L.L. Whitaker, C.E. Canman, S.E. Morgan, Y. Xu, C. Barlow, D. Baltimore, A. Wynshaw-Boris, M.B. Kastan, J.Y.J. Wang, Ataxia

- telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation, *Nature*. 387 (1997) 516–519. <https://doi.org/10.1038/387516a0>.
- [140] S. Kharbanda, P. Pandey, S. Jin, S. Inoue, A. Bharti, Z.M. Yuan, R. Weichselbaum, D. Weaver, D. Kufe, Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage, *Nature*. 386 (1997) 732–735. <https://doi.org/10.1038/386732a0>.
- [141] Z.M. Yuan, Y. Huang, T. Ishiko, S. Nakada, T. Utsugisawa, S. Kharbanda, R. Wang, P. Sung, A. Shinohara, R. Weichselbaum, D. Kufe, Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3799–3802. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3799>.
- [142] N. Foray, D. Marot, V. Randrianarison, N.D. Venezia, D. Picard, M. Perricaudet, V. Favaudon, P. Jeggo, Constitutive Association of BRCA1 and c-Abl and Its ATM-Dependent Disruption after Irradiation, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 4020–4032. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.12.4020-4032.2002>.
- [143] K. Yoshida, K. Komatsu, H.-G. Wang, D. Kufe, c-Abl Tyrosine Kinase Regulates the Human Rad9 Checkpoint Protein in Response to DNA Damage, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 3292–3300. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.10.3292-3300.2002>.
- [144] L. Zeng, Y. Hu, B. Li, Identification of TopBP1 as a c-Abl-interacting protein and a repressor for c-Abl expression, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 29374–29380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503016200>.
- [145] V. Meltser, M. Ben-Yehoyada, Y. Shaul, C-Abl tyrosine kinase in the DNA damage response: Cell death and more, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 2–4. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.132>.
- [146] W.R. Taylor, A. Grabovich, Targeting the Cell Cycle to Kill Cancer Cells, in: *Pharmacology*, Elsevier Inc., 2009: pp. 429–453. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00017-8>.
- [147] X. Liu, Z.W. Zhou, Z.Q. Wang, The DNA damage response molecule MCPH1 in brain development and beyond, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 48 (2016) 678–685. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw048>.

- [148] J.L. Wood, N. Singh, G. Mer, J. Chen, MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 35416–35423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705245200>.
- [149] L. Mai, F. Yi, X. Gou, J. Zhang, C. Wang, G. Liu, Y. Bu, C. Yuan, L. Deng, F. Song, The overexpression of MCPH1 inhibits cell growth through regulating cell cycle-related proteins and activating cytochrome c-caspase 3 signaling in cervical cancer, *Mol. Cell. Biochem.* 392 (2014) 95–107. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2022-6>.
- [150] S.Y. Lin, R. Rai, K. Li, Z.X. Xu, S.J. Elledge, BRIT1/MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 15105–15109. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507722102>.
- [151] X. Wu, G. Mondal, X. Wang, J. Wu, L. Yang, V.S. Pankratz, M. Rowley, F.J. Couch, Microcephalin regulates BRCA2 and Rad51-associated DNA double-strand break repair, *Cancer Res.* 69 (2009) 5531–5536. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4834>.
- [152] M.C. Hollander, Q. Zhan, I. Bae, A.J. Fornace, Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 13731–13737. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13731>.
- [153] H. Zou, T.J. McGarry, T. Bernal, M.W. Kirschner, Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis, *Science* (80-. ). 285 (1999) 418–421. <https://doi.org/10.1126/science.285.5426.418>.
- [154] Y.H. Hsu, L.J. Liao, C.H. Yu, C.P. Chiang, J.R. Jhan, L.C. Chang, Y.J. Chen, P.J. Lou, J.J. Lin, Overexpression of the pituitary tumor transforming gene induces p53-dependent senescence through activating DNA damage response pathway in normal human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 22630–22638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096255>.
- [155] T. Bohgaki, M. Bohgaki, R. Hakem, DNA double-strand break signaling and human disorders, *Genome Integr.* 1 (2010). <https://doi.org/10.1186/2041-9414-1->

15.

- [156] T. Zhou, F. Yi, Z. Wang, Q. Guo, J. Liu, N. Bai, X. Li, X. Dong, L. Ren, L. Cao, X. Song, The Functions of DNA Damage Factor RNF8 in the Pathogenesis and Progression of Cancer, *Int. J. Biol. Sci.* 15 (2019) 909–918. <https://doi.org/10.7150/ijbs.31972>.
- [157] L. Li, M.J. Halaby, A. Hakem, R. Cardoso, S. El Ghamrasni, S. Harding, N. Chan, R. Bristow, O. Sanchez, D. Durocher, R. Hakem, Rnf8 deficiency impairs class switch recombination, spermatogenesis, and genomic integrity and predisposes for cancer, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 983–997. <https://doi.org/10.1084/jem.20092437>.
- [158] S. Gupta, Aplastic Anemia, in: *Pathobiol. Hum. Dis. A Dyn. Encycl. Dis. Mech.*, Elsevier Inc., 2014: pp. 1446–1461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07901-6>.
- [159] T. Pejovic, M.L. Anderson, K. Odunsi, Ovarian Cancer, in: *Genomic Pers. Med.*, Elsevier Inc., 2013: pp. 714–721. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382227-7.00061-6>.
- [160] A. Benitez, W. Liu, A. Palovcak, G. Wang, J. Moon, K. An, A. Kim, K. Zheng, Y. Zhang, F. Bai, A. V. Mazin, X.H. Pei, F. Yuan, Y. Zhang, FANCA Promotes DNA Double-Strand Break Repair by Catalyzing Single-Strand Annealing and Strand Exchange, *Mol. Cell.* 71 (2018) 621–628.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.030>.
- [161] R.P. Rastogi, Richa, A. Kumar, M.B. Tyagi, R.P. Sinha, Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair, *J. Nucleic Acids.* 2010 (2010). <https://doi.org/10.4061/2010/592980>.
- [162] C.L. Limoli, E. Giedzinski, W.M. Bonner, J.E. Cleaver, UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA doublestrand breaks,  $\gamma$ -H2AX formation, and Mre11 relocalization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 233–238. <https://doi.org/10.1073/pnas.231611798>.
- [163] C. Barckhausen, W.P. Roos, S.C. Naumann, B. Kaina, Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-

- triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair, *Oncogene*. 33 (2014) 1964–1974. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.141>.
- [164] J.A. Marteijn, H. Lans, W. Vermeulen, J.H.J. Hoeijmakers, Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>.
- [165] M. Dannemann, K. Prüfer, E. Lizano, B. Nickel, H.A. Burbano, J. Kelso, Transcription factors are targeted by differentially expressed miRNAs in primates, in: *Genome Biol. Evol.*, Oxford University Press, 2012: pp. 552–564. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs033>.
- [166] C.J. Stavast, S.J. Erkeland, The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation, *Cells*. 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/cells8111465>.
- [167] R. Ramchandran, P. Chaluvally-Raghavan, miRNA-mediated RNA activation in mammalian cells, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer New York LLC, 2017: pp. 81–89. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4310-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4310-9_6).
- [168] E.R. Parrilla-Castellar, S.J.H. Arlander, L. Karnitz, Dial 9-1-1 for DNA damage: The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex, *DNA Repair (Amst)*. 3 (2004) 1009–1014. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.032>.
- [169] T. Yasuhara, R. Kato, Y. Hagiwara, B. Shiotani, M. Yamauchi, S. Nakada, A. Shibata, K. Miyagawa, Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair, *Cell*. 175 (2018) 558-570.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.056>.
- [170] L.B. Pulzová, T.A. Ward, M. Chovanec, XPA: DNA repair protein of significant clinical importance, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21062182>.
- [171] M.E. Peter, Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: The next step, *Oncogene*. 29 (2010) 2161–2164. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.59>.
- [172] F. Ghini, C. Rubolino, M. Climent, I. Simeone, M.J. Marzi, F. Nicassio, Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation, *Nat. Commun.* 9 (2018).

- <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05182-9>.
- [173] L. Salmena, L. Poliseno, Y. Tay, L. Kats, P.P. Pandolfi, A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language?, *Cell*. 146 (2011) 353–358.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>.
- [174] T. M. Witkos, E. Koscianska, W. J. Krzyzosiak, Practical Aspects of microRNA Target Prediction, *Curr. Mol. Med.* 11 (2011) 93–109.  
<https://doi.org/10.2174/156652411794859250>.
- [175] M. Gyöngyösi, D. Lukovic, K. Zlabinger, A. Spannauer, A. Gugerell, N. Pavo, D. Traxler, D. Pils, G. Maurer, A. Jakab, M. Riesenhuber, A. Pircher, J. Winkler, J. Bergler-Klein, Liposomal doxorubicin attenuates cardiotoxicity via induction of interferon-related DNA damage resistance, *Cardiovasc. Res.* 116 (2020) 970–982. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz192>.
- [176] S. AbuHammad, M. Zihlif, Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line, *Genomics*. 101 (2013) 213–220.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.11.009>.
- [177] K.M. McSweeney, W.P. Bozza, W.L. Alterovitz, B. Zhang, Transcriptomic profiling reveals p53 as a key regulator of doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Cell Death Discov.* 5 (2019) 102. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0182-6>.
- [178] S. AbuHammad, M. Zihlif, Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line, *Genomics*. 101 (2013) 213–220.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.11.009>.
- [179] A.S. Flynt, E.C. Lai, Biological principles of microRNA-mediated regulation: Shared themes amid diversity, *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 831–842.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2455>.
- [180] L. Ding, J. Ni, F. Yang, L. Huang, H. Deng, Y. Wu, X. Ding, J. Tang, Promising therapeutic role of miR-27b in tumor, *Tumor Biol.* 39 (2017) 101042831769165.  
<https://doi.org/10.1177/1010428317691657>.
- [181] B. Zhang, X. Pan, G.P. Cobb, T.A. Anderson, microRNAs as oncogenes and tumor suppressors, *Dev. Biol.* 302 (2007) 1–12.



<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>.

- [182] A.A. Svoronos, D.M. Engelman, F.J. Slack, OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer, *Cancer Res.* 76 (2016) 3666–3670.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>.
- [183] E.E. Rufino-Palomares, F.J. Reyes-Zurita, J.A. Lupiáñez, P.P. Medina, MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors, in: *MicroRNAs Med.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013: pp. 223–243.  
<https://doi.org/10.1002/9781118300312.ch14>.
- [184] J. Li, Z. Zhang, F. Chen, T. Hu, W. Peng, Q. Gu, Y. Sun, The Diverse Oncogenic and Tumor Suppressor Roles of microRNA-105 in Cancer, *Front. Oncol.* 9 (2019) 518. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00518>.