



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS  
MICRORNAS MIR-142-3P Y MIR-139-5P ASOCIADOS  
A LA RESPUESTA AL DAÑO AL DNA (DDR) EN  
LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER DE  
MAMA TRIPLE NEGATIVO (TNBC)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BÍOLOGO**

**P R E S E N T A:**

**LUIS ALBERTO ARANZA MARTÍNEZ**



Facultad de Estudios Superiores  
**IZTACALA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. EDUARDO LÓPEZ URRUTIA**

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO  
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.



Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM) bajo la dirección del Dr. Eduardo López Urrutia.

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IA204620.

## Agradecimientos

A mis padres, por su cariño y paciencia, por apoyarme en cada obstáculo y alentarme a cumplir cada objetivo, por brindarme todas las herramientas para lograr lo que me proponga.

A mi abuela por siempre estar a mi lado, por enseñarme la importancia del esfuerzo y la resiliencia, y por siempre esperar que de lo mejor de mí.

A mis hermanos por ser mis guías, apoyarme incondicionalmente, motivarme, escucharme y aconsejarme cuando lo necesito.

A mi tío Mario por ser un ejemplo a seguir, por tus consejos y tus regaños, por haberme apoyado y siempre haber creído en mí.

A mi familia por siempre estar ahí para mí, por su apoyo y su confianza, y por siempre tratar de mantenernos unidos.

A Julio y Daniel, mis mejores amigos, por siempre impulsarme a hacer cosas nuevas, por ser mis panas de aventuras y por hacerme una mejor persona.

A mis amigos por hacer todas las clases divertidas y por hacer que los trabajos en equipo hechos al último minuto siempre fueran un éxito.

A mis amigos del L-11: Lil, Luis y Héctor. Por todas las risas que compartí con ustedes, por las comidas de diputado de todos los días y por apoyarme en el desarrollo de mi proyecto.

Al Dr. Eduardo por sus enseñanzas, su paciencia y su guía a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Por sus consejos y por mostrarme que la curiosidad y la pasión son lo más importante para un científico.

A la Dra. Verónica por dejarme aprender cultivo, orientarme, tenerme paciencia y por mostrarme la importancia del orden, la disciplina y el compromiso en un laboratorio.

Al Dr. Carlos por permitirme formar parte de su equipo de investigación, guiarme y cuestionarme para desarrollarme mejor como científico.

A la Dra. Sonia y la Dra. Mónica por sus observaciones y sugerencias sobre este trabajo.

## **Abreviaturas**

**3'-UTR** – Región no traducida 3'

**AR** – Receptor de Andrógeno

**BER** – Reparación por escisión de bases

**BL1** – Tipo Basal 1

**BL2** – Tipo Basal 2

**DDR** – Respuesta al Daño al DNA

**DMEM/F12** – Gibco Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12

**DSBs** – Rupturas de doble cadena de DNA

**EGF** – Factor de Crecimiento Endotelial

**ER** – Receptor de Estrógeno

**FDR** – False Discovery Rate

**GEO** – Gene Expression Omnibus

**GGR** – Reparación genómica global

**HER2** – Receptor del factor de crecimiento epidermal

**HR** – Recombinación Homóloga

**HRD** – Recombinación Homóloga Deficiente

**LAR** – Receptor de Andrógeno Luminal

**lncRNAs** – RNAs Largos no codificantes

**M** - Mesenquimal

**m<sup>6</sup>G** – O<sup>6</sup>-Metilguanina

**MGMT** – O<sup>6</sup>-Metilguanina-DNA Metiltransferasa

**miRNAs** - MicroRNAs

**mRNAs** – RNAs mensajeros

**NCBI** – National Center for Biotechnology Information

**ncRNAs** – RNAs no codificantes

**NER** – Reparación por escisión de nucleótidos

**NHEJ** – Unión de Extremos No Homólogos

**PARPi** – Inhibidores de PARP

**PR** – Receptor de Progesterona

**RISC** – Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA

**RNA Pol II** – RNA Polimerasa II

**RNU6** – U6 small nuclear RNA

**RPA** – Proteínas de Replicación A

**SSBs** – Rupturas de una sola cadena de DNA

**TCR** – Reparación acoplada a la transcripción

**TNBC** – Cáncer de Mama Triple Negativo

# Índice

<b>Resumen</b> .....	12
<b>Introducción</b> .....	13
Cáncer .....	13
Cáncer de mama.....	14
Cáncer de mama Triple Negativo .....	15
Terapias contra el cáncer de mama .....	15
Mecanismos de respuesta al daño al DNA .....	18
Rupturas de una sola cadena (SSBs) .....	18
Rupturas de Doble Cadena (DSBs) .....	20
Otros tipos de reparación.....	21
Regulación de los mecanismos de DDR .....	23
RNAs no codificantes (ncRNAs).....	24
microRNAs .....	25
ncRNAs en TNBC.....	27
miR-142-3p .....	28
miR-139-5p .....	29
<b>Hipótesis</b> .....	31
<b>Objetivos</b> .....	31
Específicos.....	31
<b>Materiales y Método</b> .....	32



Cultivo Celular.....	32
Aislamiento de RNA .....	32
Diseño de Primers.....	33
Evaluación de la expresión de miRNAs.....	35
Stem-Loop RT de los miRNAs.....	36
RT-PCR de los miRNAs.....	38
RT-qPCR de los miRNAs.....	40
Evaluación de la expresión de los genes blanco de los miRNAs.....	42
Retrotranscripción de los genes blanco de los miRNAs .....	42
RT-PCR de los genes blanco.....	44
RT-qPCR de los genes blanco.....	45
Análisis estadístico.....	47
Análisis de la estructura secundaria de los mRNAs de los genes blanco .....	48
Análisis <i>in silico</i> de la expresión de miRNAs y mRNAs en pacientes de TNBC .....	48
<b>Resultados</b> .....	50
Expresión relativa de miR-142-3p y miR-139-5p. ....	50
Expresión relativa de BRCA2 en TNBC.....	53
Análisis del sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de BRCA2 .....	54
Expresión relativa de MGMT en TNBC.....	56
Análisis del sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de MGMT .....	57
Expresión relativa de XRCC5 en TNBC .....	59
Análisis del sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de XRCC5 .....	60

Expresión relativa de RAD54L en TNBC .....	62
Análisis del sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de RAD54L.....	63
Análisis <i>in silico</i> de la expresión de los miRNAs en pacientes de TNBC .....	65
Análisis <i>in silico</i> de la expresión de los genes blanco en pacientes de TNBC .....	67
<b>Discusión</b> .....	69
<b>Conclusiones</b> .....	73
<b>Perspectivas</b> .....	73
<b>Literatura citada</b> .....	74

## Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias y Primers de miR-142-3p, miR-139-5p y RNU6.....	34
Tabla 2. Primers Actina, BRCA2, MGMT, XRCC5 y RAD54L. ....	35
Tabla 3. RT miRNAs Master Mix 1.....	37
Tabla 4. RT miRNAs Master Mix 2.....	37
Tabla 5. RT-PCR RNU6.....	38
Tabla 6. RT-PCR miRNAs. ....	39
Tabla 7. RT-qPCR. ....	41
Tabla 8. RT Master Mix 1.....	43
Tabla 9. RT Master Mix 2.....	43
Tabla 10. RT-PCR genes blanco. ....	44
Tabla 11. RT-qPCR. ....	46

## Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de daño al DNA y los mecanismos de Respuesta al Daño al DNA .....	22
Figura 2. Mecanismos de regulación de los mecanismos de Respuesta al Daño al DNA	24
Figura 3. Clasificación de los ncRNAs .....	25
Figura 4. Biogénesis y mecanismos de regulación de los miRNAs .....	26
Figura 5. Protocolo de Aislamiento de RNA con TRIzol. ....	33
Figura 6. Stem-Loop RT-PCR y RT-qPCR de los miRNAs.....	36
Figura 7. Perfil de temperaturas de la retrotranscripción para los miRNAs. ....	37
Figura 8. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de RNU6. ....	39
Figura 9. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de los miRNAs.....	40
Figura 10. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de RNU6. ....	41
Figura 11. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de los miRNAs.....	42
Figura 12. Perfil de temperaturas de la Retrotranscripción de los genes blanco. ....	43
Figura 13. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de Actina, MGMT, XRCC5 y RAD54L...	45
Figura 14. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de BRCA2. ....	45
Figura 15. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de Actina, MGMT, XRCC5 y RAD54L.	47
Figura 16. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de BRCA2. ....	47
Figura 17. Validación de las condiciones de amplificación de los miRNAs mediante Stem- Loop RT-PCR en líneas celulares derivadas de TNBC .....	51
Figura 18. Expresión relativa de miR-142-3p en líneas celulares derivadas de TNBC. ....	52
Figura 19. Expresión relativa de miR-139-5p en líneas celulares derivadas de TNBC. ....	52

Figura 20. Validación de las condiciones de amplificación de BRCA2 en líneas celulares derivadas de TNBC.....	53
Figura 21. Expresión relativa de BRCA2 en líneas celulares derivadas de TNBC.....	54
Figura 22. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la región 3'-UTR del mRNA de BRCA2. ....	55
Figura 23. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la estructura secundaria predicha del mRNA de BRCA2 .....	55
Figura 24. Validación de las condiciones de amplificación de MGMT en líneas celulares derivadas de TNBC.....	56
Figura 25. Expresión relativa de MGMT en líneas celulares derivadas de TNBC.....	57
Figura 26. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la región 3'-UTR del mRNA de MGMT. ....	58
Figura 27. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la estructura secundaria predicha del mRNA de MGMT .....	58
Figura 28. Validación de las condiciones de amplificación de XRCC5 en líneas celulares derivadas de TNBC.....	59
Figura 29. Expresión relativa de XRCC5 en líneas celulares derivadas de TNBC.....	60
Figura 30. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la región 3'-UTR del mRNA de XRCC5. ....	61
Figura 31. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la estructura secundaria predicha del mRNA de XRCC5.....	61
Figura 32. Validación de las condiciones de amplificación de RAD54L en líneas celulares derivadas de TNBC.....	62

Figura 33. Expresión relativa de RAD54L en líneas celulares derivadas de TNBC. ....	63
Figura 34. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la región codificante (CDS) del mRNA de RAD54L.....	64
Figura 35. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la estructura secundaria predicha del mRNA de RAD54L.....	64
Figura 36. Expresión diferencial de miR-142-3p y miR-139-5p. ....	66
Figura 37. Expresión diferencial de los posibles genes blanco de miR-142-3p y miR-139-5p. ....	68

## Resumen

El Cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia en el mundo, y la principal causa de muerte asociada al cáncer en mujeres. A diferencia de los otros tipos de cáncer de mama, el Cáncer de Mama Triple Negativo carece de la expresión de receptores hormonales y del receptor HER2, limitando las opciones de tratamiento contra TNBC. En la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos se han identificado a los mecanismos de Respuesta al Daño al DNA (DDR) como posibles blancos. Se ha observado que los ncRNAs participan en la regulación de múltiples procesos en la carcinogénesis, particularmente, algunos reportes sugieren que los microRNAs (miRNAs) miR-142-3p y miR-139-5p tienen la capacidad de regular la expresión de múltiples blancos involucrados en diferentes mecanismos de DDR, interactuando con los RNAs mensajeros (mRNAs), provocando su degradación o impidiendo la traducción.

En este trabajo se evaluó la expresión relativa de miR-142-3p y miR-139-5p en líneas celulares derivadas de TNBC y la de sus posibles blancos, mediante RT-qPCR. Se analizaron los posibles sitios de unión de los miRNAs en los mRNAs de sus posibles genes blanco. Adicionalmente, se realizó un análisis *in silico* de la expresión de los miRNAs y de sus posibles genes blanco en pacientes de TNBC. Se observó que los posibles sitios de unión no se encuentran disponibles para la interacción; del mismo modo, el análisis *in silico* sugiere que no existe correlación entre la expresión de los miRNAs y sus posibles genes blanco. En conclusión, los resultados no muestran una correlación entre la expresión de los miRNAs y sus posibles genes blanco.

## **Introducción**

### **Cáncer**

El cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia y una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con aproximadamente 19.3 millones de nuevos casos y alrededor de 10 millones de muertes en 2020 (Sung et al., 2021). El cáncer es una enfermedad de origen genético provocada por la acumulación de mutaciones que afectan el funcionamiento y expresión de genes conocidos como Oncogenes y Genes Supresores de Tumores (Nenclares & Harrington, 2020). Por un lado, los oncogenes son los genes responsables de promover la carcinogénesis, estos se originan a partir de la alteración, ya sea de forma estructural o funcional, de genes denominados proto-oncogenes que, en células normales, tienen un papel fundamental en la regulación de múltiples procesos celulares, como el crecimiento celular y la proliferación. Por otro lado, los genes supresores de tumores se encargan de garantizar el desarrollo adecuado de la célula, evitando la carcinogénesis, sin embargo, su ausencia o inactivación, como producto de mutaciones, puede conducir al desarrollo y progresión del cáncer (Kontomanolis et al., 2020). La acumulación de estas alteraciones en el funcionamiento celular conduce al desarrollo y progresión de la carcinogénesis, mediante la adquisición de nuevas características y habilidades que van desde la evasión de supresores del crecimiento y el mantenimiento de la proliferación celular, hasta la angiogénesis e invasión y metástasis (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

## **Cáncer de mama**

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia en el mundo, con aproximadamente 2.3 millones de nuevos diagnósticos; y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo, con aproximadamente 685,000 muertes en 2020 (Sung et al., 2021). El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, a nivel molecular se clasifica principalmente en cuatro grupos, de acuerdo con los niveles de expresión de tres biomarcadores principales: los receptores hormonales de estrógeno (ER) y de progesterona (PR), y el receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER2). Luminal A, las células del tumor son positivas (+) a la expresión de ER, PR y negativas (-) para HER2 (ER+, PR+ y HER2-). Luminal B, puede ser ER+, PR-/± y HER2+. El tercer grupo comprende los tipos de cáncer de mama que únicamente expresan HER2, denominados como HER2+. El cuarto grupo comprende los tipos de cáncer de mama que son negativos para los tres marcadores mencionados (ER-, PR- y HER2-), denominados como Cáncer de Mama Triple Negativo (TNBC) (Provenzano et al., 2018). Aproximadamente el 75% de los casos de cáncer de mama presentan una alta expresión de receptores hormonales, correspondiente a los tipos luminales, mientras que el resto corresponde a los subtipos HER2 y TNBC. La subtipificación del cáncer de mama permite evaluar la prognosis y seleccionar las terapias más adecuadas con base en las características moleculares de cada subtipo (Tsang & Tse, 2020).



## **Cáncer de mama Triple Negativo**

El TNBC, a su vez, se subdivide en cuatro subtipos: Tipo Basal 1 (BL1), Tipo Basal 2 (BL2), Mesenquimal (M) y Receptor de Andrógeno Luminal (LAR), que de igual forma presentan patrones de expresión específicos de cada subtipo (Lehmann et al., 2016). Al ser un tipo de cáncer de mama altamente heterogéneo y sumamente agresivo, suele asociarse a un mayor riesgo de metástasis y una tasa de supervivencia mucho menor comparada con los otros tipos de cáncer de mama; adicionalmente, al carecer de biomarcadores como los receptores hormonales (ER y PR) y HER2, las opciones de tratamiento son limitadas (Manjunath & Choudhary, 2021).

## **Terapias contra el cáncer de mama**

En los últimos años se han hecho avances significativos en las terapias contra el cáncer de mama, por un lado, las aproximaciones quirúrgicas, apoyadas por los constantes avances en los campos de la genética, la biología molecular y las técnicas de imagenología, han permitido el desarrollo de nuevas terapias, cada vez menos invasivas, que hacen posible la conservación de una mayor porción del seno, que a su vez representa una mejoría considerable en la calidad de vida de las pacientes (Magnoni et al., 2021).

Si bien la intervención quirúrgica ha resultado ser efectiva para el tratamiento del cáncer de mama, esta es acompañada de radioterapia o quimioterapia,

dependiendo de la clasificación del tumor. La radioterapia se enfoca en reducir el tamaño del tumor y provocar la muerte a las células de cáncer remanentes de la cirugía, por medio de la inducción de daño al DNA y la producción de radicales libres (Baskar et al., 2012). Al igual que los tratamientos quirúrgicos, la radioterapia se ha enfocado en disminuir los efectos adversos para las pacientes, mediante el desarrollo de técnicas que disminuyan, tanto la cantidad de radiación, como el tamaño del área irradiada, garantizando resultados similares a los tratamientos más agresivos (Hausmann et al., 2020).

La quimioterapia se ha consolidado como la primera opción en el tratamiento en los casos más agresivos de la enfermedad, el uso de agentes citotóxicos (como la Ciclofosfamida), antraciclinas (como la Doxorrubicina y la Epirubicina), taxanos (como el Docetaxel y el Paclitaxel) como fármacos quimioterapéuticos, ha mostrado ser efectivo para el tratamiento del cáncer de mama (Hassan, 2010). Sin embargo, los fármacos empleados en la quimioterapia suelen estar asociados a numerosos efectos secundarios, como alteraciones en la función cardíaca, neurotoxicidad y el desarrollo de neoplasias secundarias (Tao et al., 2015). No obstante, se han desarrollado nuevas terapias enfocadas a la regulación de procesos como el ciclo celular, u otras vías de señalización, además de la implementación de conjugados fármaco-anticuerpo y de nanopartículas, con el objetivo de mejorar el pronóstico de las pacientes (Barzaman et al., 2020).

La identificación de biomarcadores como los receptores hormonales y HER2 han sido de particular interés para el desarrollo y aplicación de terapias orientadas al tratamiento de cada subtipo de cáncer de mama (Waks & Winer, 2019).

Las terapias empleadas contra los subtipos de cáncer de mama dependientes de la expresión de receptores hormonales consisten en moduladores de la expresión de ER y su vía de señalización (Yip & Rhodes, 2014). Los tratamientos dirigidos a pacientes HER2+ se basan en la administración fármacos combinados con anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio extracelular de HER2, como Trastuzumab, adicionalmente se ha sugerido su combinación con inhibidores de vías de señalización involucradas en la proliferación celular, como PI3K y mTOR (Loibl & Gianni, 2017).

En contraste, el TNBC ha demostrado ser más sensible a la quimioterapia en comparación con los otros subtipos de cáncer de mama, por lo que permanece como la base de los tratamientos contra TNBC; sin embargo, debido a su alta heterogeneidad y a la adquisición de resistencia a los agentes citotóxicos en la mayoría de los tumores de TNBC, ha sido necesaria la identificación de marcadores moleculares, que permitan el desarrollo de nuevas terapias dirigidas (Nedeljković & Damjanović, 2019). En TNBC, se han observado alteraciones en genes involucrados en la regulación de procesos como los mecanismos de respuesta al daño al DNA (DDR), la proliferación y el ciclo celular (Sporikova et al., 2018). Vías de señalización involucradas en la regulación del proceso carcinogénico, como las vías de señalización de AKT, EGFR, el receptor de andrógeno (AR) y los mecanismos de DDR han sido propuestas como blancos terapéuticos (Singh & Yadav, 2021; Vagia et al., 2020).

## **Mecanismos de respuesta al daño al DNA**

Las deficiencias observadas en la expresión de algunos genes involucrados en los mecanismos de respuesta al daño al DNA han sido de particular interés para la búsqueda de blancos terapéuticos en TNBC (Ribeiro et al., 2013). La interacción del DNA con agentes dañinos, ya sean endógenos o exógenos, puede conducir al surgimiento de múltiples tipos de lesiones el DNA que afectan la estructura y funcionamiento de los genes, sin embargo, los mecanismos de DDR se encargan de detectar y reparar el daño al DNA, preservando la integridad del material genético. Los principales mecanismos de DDR son: La reparación de rupturas de una sola cadena y la reparación de rupturas de doble cadena (N. Chatterjee & Walker, 2017) (Figura 1).

### *Rupturas de una sola cadena (SSBs)*

El mecanismo de reparación de SSBs consiste en detectar el daño mediante la unión de PARP1 al sitio de daño, permitiendo el reclutamiento de complejos de proteínas, particularmente XRCC1 juega un papel importante, permitiendo la unión y activación de múltiples enzimas involucradas en el mecanismo de reparación de SSBs. Posteriormente, se lleva a cabo la reparación de los extremos dañados de la cadena de DNA, por medio de una gran variedad de enzimas específicas para cada tipo de daño. Después, las DNA polimerasas se encargan de la síntesis del fragmento dañado, finalmente, el fragmento se une al resto de la cadena por medio de una ligasa (Caldecott, 2008).

La reparación por escisión de nucleótidos (NER) es el mecanismo mediante el cual se reparan deformaciones en la estructura del DNA, provocadas por alteraciones en la composición de los nucleótidos de una de las hebras (Spivak, 2015). Esta consiste en la identificación del daño mediante dos mecanismos: en la reparación genómica global (GGR) se da mediante el reclutamiento del complejo proteínas XPC-HR23b en la región dañada (Sugasawa et al., 1998). Mientras que, en la reparación acoplada a la transcripción (TCR), el arresto de la RNA Polimerasa II (RNA Pol II) en la zona de la lesión es la encargada de la detección del daño (Spivak & Ganesan, 2014). Posteriormente, se llevan a cabo cortes en las regiones adyacentes a la lesión, liberando el fragmento y permitiendo la reparación mediante la síntesis de un nuevo fragmento utilizando la cadena complementaria. Finalmente, una ligasa se encarga de unir el nuevo fragmento con el resto de la cadena (Spivak, 2015).

De forma similar, la reparación por escisión de bases (BER) es la encargada de corregir alteraciones en las bases nitrogenadas que no impliquen deformaciones de la cadena de DNA, esta puede llevarse a cabo en una o varias bases. Las bases dañadas son detectadas y escindidas por una DNA glicosilasa, específica para cada tipo de lesión, mientras que el sitio abásico es procesado por una AP Endonucleasa, que se encarga de remover el resto del nucleótido y preparar los extremos de los nucleótidos adyacentes. Finalmente, se lleva a cabo la síntesis del fragmento dañado y se une por medio de una ligasa (Krokan & Bjoras, 2013).

### *Rupturas de Doble Cadena (DSBs)*

Las DSBs suelen ser reparadas por dos mecanismos principales: la Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ) y la Recombinación Homóloga (HR) (N. Chatterjee & Walker, 2017). La NHEJ es la vía de reparación de DSBs más utilizada por la célula, sin embargo, esta suele comprometer la integridad del DNA, debido a su bajo grado de homología, con respecto a otras vías de reparación de DSBs (Pannunzio et al., 2018). Las DSBs son reconocidas por el heterodímero formado por las proteínas Ku70 y Ku80, propiciando la unión de este a los extremos dañados, a su vez, el complejo Ku promueve el reclutamiento de DNA-PKcs al sitio del daño (Scully et al., 2019). Más tarde, los extremos son modificados hasta lograr la complementariedad entre ellos, ya sea mediante la adición o remoción de bases (Pannunzio et al., 2018). Finalmente, estos son unidos por medio del reclutamiento del complejo XRCC4-LIG4-XLF (Ahnesorg et al., 2006).

Se ha observado una sobreexpresión de Ku70/Ku80 en la ausencia de proteínas involucradas en la HR, como BRCA1 y Rad51. Adicionalmente, la expresión de Ku70/Ku80 en el núcleo está asociada a un intervalo libre de enfermedad más extenso (Alshareeda et al., 2013).

En contraste con la NHEJ, la HR depende enteramente del reconocimiento de secuencias homólogas, utilizadas como moldes, garantizando una mayor fidelidad de la reparación. El reconocimiento de la ruptura se da mediante la unión del complejo MRN a los extremos del sitio del daño, al mismo tiempo, este se encarga de la resección de los extremos libres de la cadena de DNA, y del reclutamiento de

ATM. Posteriormente, el recubrimiento de la sección de cadena sencilla por las Proteínas de Replicación A (RPA) permiten el reclutamiento de mediadores de Rad51 (Y. Sun et al., 2020). Los mediadores como BRCA2 y BRCA1, son los encargados de facilitar la sustitución de las RPA por Rad51 (Wright et al., 2018). Adicionalmente se ha observado que la unión de Rad54 al filamento de Rad51 ayuda a estabilizar la interacción entre Rad51 y la cadena de DNA (Mazin et al., 2003). Una vez formado el complejo sináptico, encargado de la identificación e invasión de la secuencia homóloga, comienza la formación del D-Loop, que consiste en el entrelazamiento de las hebras dañadas con sus secuencias homólogas. Finalmente, se llevan a cabo la síntesis de la región dañada y la unión con la cadena complementaria (Wright et al., 2018).

Se ha reportado que cerca del 20% de casos de TNBC están asociados a mutaciones en BRCA1 y BRCA2 (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Del mismo modo, se ha observado que las deficiencias en la HR pueden ser determinantes en el desarrollo del TNBC, la respuesta al tratamiento y la tasa de supervivencia (Belli et al., 2019).

#### *Otros tipos de reparación*

Existen otros tipos de reparación de daño al DNA encargados de reparar alteraciones en las bases nitrogenadas (N. Chatterjee & Walker, 2017). La O<sup>6</sup>-Metilguanina-DNA Metiltransferasa (MGMT) es la encargada de la reparación de la O<sup>6</sup>-Metilguanina (m<sup>6</sup>G), mediante la remoción del grupo metilo formando un

complejo con MGMT que provoca la inactivación de esta, que a su vez conduce a su degradación por ubiquitinación. Adicionalmente, se ha observado que MGMT es capaz de reparar una gran variedad de lesiones en el DNA asociadas a metilación (Pegg, 2000).

Se ha observado que existe una menor expresión de MGMT en TNBC que en otros tipos de cáncer de mama. Adicionalmente, se ha observado que la alteración en la expresión de MGMT puede ser indicador de una menor supervivencia (Alkam et al., 2013). Por otro lado, se ha sugerido que la pérdida de función de MGMT está asociada a fenotipos de cáncer de mama más agresivos y a un mayor riesgo de metástasis (Asiaf et al., 2015).

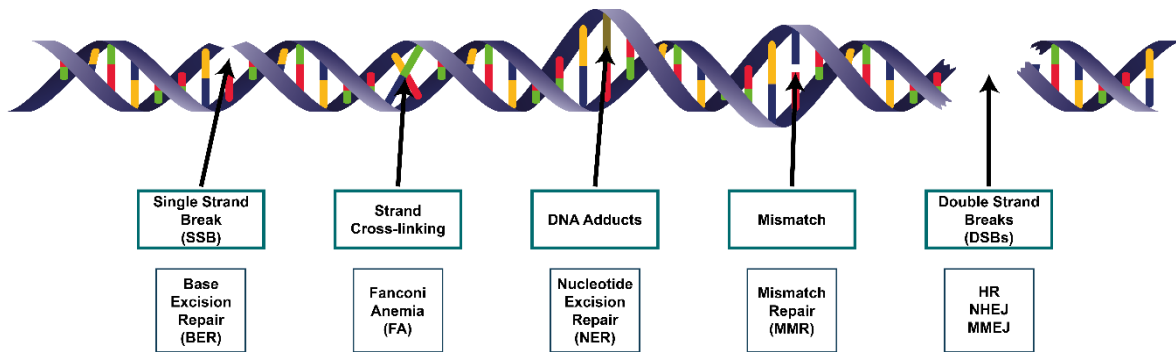


Figura 1. Tipos de daño al DNA y los mecanismos de Respuesta al Daño al DNA (Carusillo & Mussolino, 2020).

Se han identificado a las vías de señalización de AKT-CHEK1-Wee1 y la Recombinación Homóloga, como posibles blancos para el desarrollo de terapias dirigidas. Los inhibidores de PARP (PARPi) forman una parte importante del tratamiento contra TNBC. Estos actúan mediante la acumulación de rupturas de doble cadena de DNA en células con HR deficiente (HRD) conduciendo a la muerte



celular por medio de la letalidad sintética. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a los PARPi ha hecho evidente la necesidad de nuevos marcadores (Jin et al., 2021).

### *Regulación de los mecanismos de DDR*

La regulación de la actividad de los mecanismos de DDR depende en gran parte de modificaciones en la estructura de la cromatina y de vías de señalización involucradas en dicho proceso, como los eventos de fosforilación, ubiquitinación y PARilación (Stadler & Richly, 2017) Adicionalmente se ha observado que los RNAs no codificantes pequeños y los RNAs largos no codificantes cumplen funciones regulatorias de los mecanismos de DDR. Particularmente, en los mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena, se ha reportado su participación en procesos como la regulación y la expresión de proteínas, y la estabilización de los extremos dañados para la resección (Shaw & Gullerova, 2021) (Figura 2). Del mismo modo, los elementos regulatorios como enhancers, promotores, insulators y silencers juegan un papel importante en la modulación de múltiples mecanismos celulares. Se ha observado que estas redes regulatorias están involucradas en el surgimiento de enfermedades como el cáncer (S. Chatterjee & Ahituv, 2017).

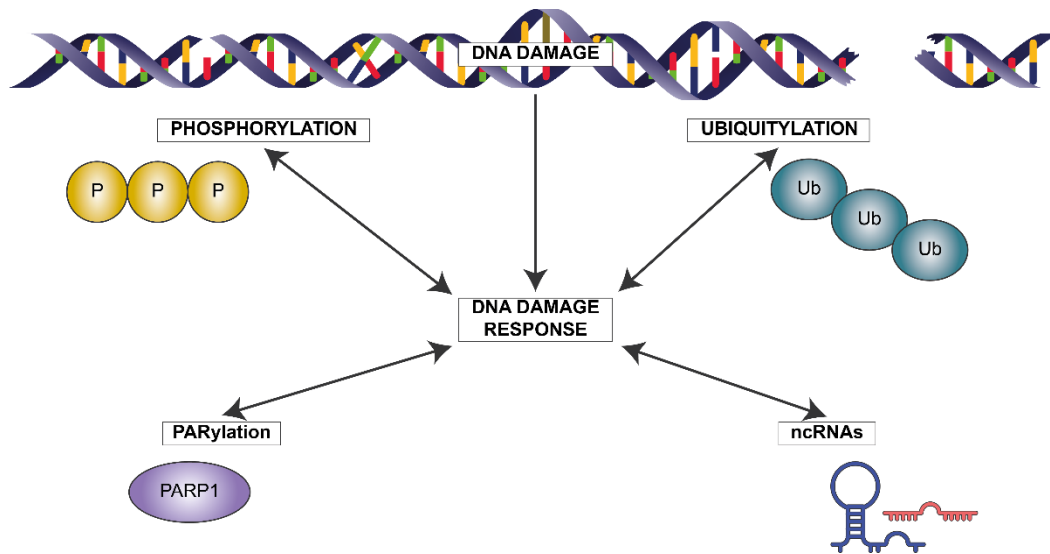


Figura 2. Mecanismos de regulación de los mecanismos de Respuesta al Daño al DNA (Stadler & Richly, 2017).

### RNAs no codificantes (ncRNAs)

Los RNAs no codificantes (ncRNAs), participan en la regulación de múltiples procesos en la célula, que van desde la regulación de genes, hasta modificaciones en la cromatina (Mattick & Makunin, 2006). Los ncRNAs constituyen la mayor parte del transcriptoma, entre los que destacan los Micro RNAs (miRNAs) y los RNAs Largos no codificantes (lncRNAs) como principales ncRNAs regulatorios (Kondetimmerhalli et al., 2018) (Figura 3). Por un lado, los lncRNAs pueden cumplir múltiples funciones regulatorias, ya sea actuando como señales, señuelos, guías o andamios (C. Zhang & Peng, 2015). Mientras que los miRNAs se encargan de la regulación de la expresión de genes a nivel postranscripcional (Adams et al., 2014).

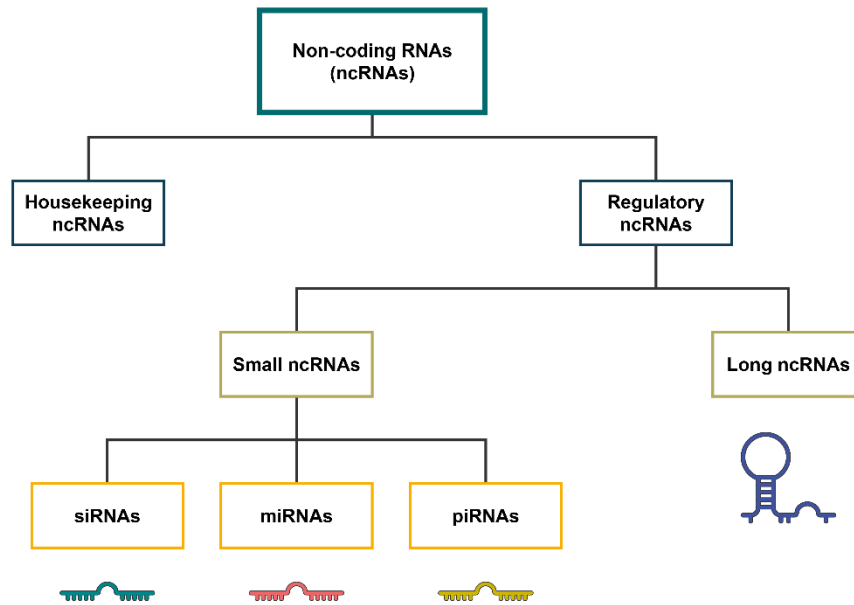


Figura 3. Clasificación de los ncRNAs de acuerdo con su función (ncRNAs constitutivos y ncRNAs regulatorios) y su tamaño (ncRNAs pequeños y lncRNAs) (Hombach & Kretz, 2016).

### *microRNAs*

Los miRNAs se originan a partir de transcritos de genes codificantes o a partir de genes independientes. Comúnmente, la maduración del transcrito se lleva a cabo por medio de la llamada vía canónica de maduración, donde los complejos de proteínas DROSHA y Dicer se encargan de la formación del duplex del miRNA (O'Brien et al., 2018). Posteriormente, el duplex del miRNA junto con las proteínas AGO, se encargan de formar el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC), donde una de las cadenas del duplex será seleccionada para guiar al complejo RISC a su blanco para inducir su degradación, mientras que la cadena no

seleccionada será expulsada del complejo. Por lo general, los miRNAs regulan la expresión a nivel postranscripcional mediante la interacción con los RNAs mensajeros (mRNAs), en su mayoría mediante la unión de la denominada secuencia semilla del miRNA con la región no traducible 3' (3'-UTR), provocando la degradación del mRNA o impidiendo la traducción (Figura 4). Sin embargo, se ha observado que algunos miRNAs tienen la capacidad de interactuar con otras regiones del mRNA (Iwakawa & Tomari, 2022).

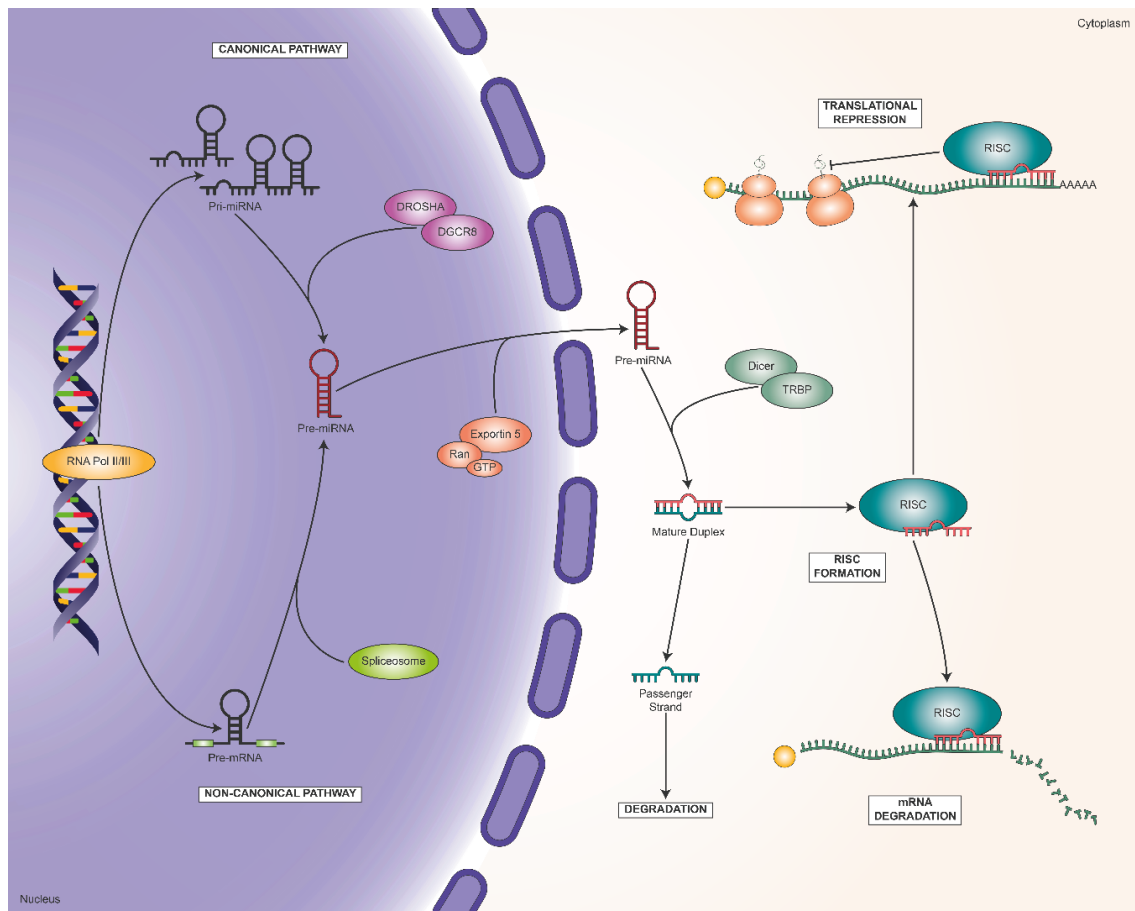


Figura 4. Biogénesis y mecanismos de regulación de los miRNAs (Saliminejad et al., 2019).

## *ncRNAs en TNBC*

Se ha reportado la participación de ncRNAs en la regulación múltiples vías de señalización en TNBC, como la invasión y metástasis, y los mecanismos de DDR (Aranza-Martínez et al., 2021). Los lncRNAs desregulados pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumores en TNBC, regulando procesos como la diferenciación, proliferación, apoptosis y el metabolismo. Adicionalmente, se ha observado que pueden estar involucrados en la adquisición de resistencia a tratamientos (Thakur et al., 2021).

El lncRNA MALAT1 juega un papel importante en el desarrollo de TNBC y la adquisición de resistencia al paclitaxel y a la doxorubicina como tratamiento neoadyuvante (Shaath et al., 2021). El lncRNA RMST se encuentra subexpresado en tejidos de TNBC y que inhibe la proliferación celular y la apoptosis inducida en líneas celulares derivadas de TNBC, además se sugiere que podría participar en la regulación del ciclo celular y la migración e invasión celular (L. Wang et al., 2018). Por otro lado, se ha observado que el lncRNA ADAMTS9-AS2 podría participar en la regulación de los mecanismos de proliferación, apoptosis, metástasis y el efecto Warburg mediante la regulación de la vía de señalización TGF- $\beta$  por medio de la interacción con la proteína RPL22 en células de TNBC (Ni et al., 2021).

Del mismo modo, en TNBC se ha observado que los miRNAs pueden tener un papel fundamental en la regulación de procesos como la carcinogénesis, la progresión del cáncer y la metástasis, asumiendo el papel de oncogenes o genes supresores de tumores (Sabit et al., 2021). Por ejemplo, miR-211 podría promover la metástasis

temprana a cerebro mediante la regulación de SOX11 y NGN2, adicionalmente, se ha atribuido la capacidad de miR-211 de inducir la metástasis temprana a cerebro, a su capacidad de incrementar las propiedades de “stemness” de células derivadas de TNBC (Pan et al., 2021).

Las redes de interacción entre ncRNAs han sido de interés para el desarrollo de nuevas terapias para TNBC (Volovat et al., 2020). Wang et al. (2021) reportaron que la red de interacción circWAC/miR142/WWP podría modular la quimiosensibilidad en células de TNBC mediante la regulación de la vía de señalización PI3K/AKT. De la misma forma, se reportó que el lncRNA podría regular el crecimiento tumoral y la metástasis interactuando con el eje de señalización miR-221-5p/HOXA9 (S.-M. Wang et al., 2021). Adicionalmente, se ha observado que el eje de señalización GSEC/miR-202-5p/AXL podría estar involucrado en la progresión de TNBC, regulando la proliferación, la invasión y la metástasis (J. Zhang et al., 2021).

### **miR-142-3p**

Particularmente, se ha observado que existen alteraciones en la expresión de miR-142-3p en líneas celulares derivadas de cáncer de mama y en tejidos de etapas avanzadas de cáncer mama. Por otro lado, se ha sugerido que miR-142-3p podría tener un papel importante en la carcinogénesis mediante la regulación de la expresión de HMGA2. Adicionalmente, podría participar en la regulación de la vía de señalización de AKT/ERK/STAT3, modulando la proliferación celular y las propiedades de las células troncales (Mansoori et al., 2021). En la misma línea, se

ha sugerido que el eje de señalización de miR-142-3p/HMGB1 podría promover la apoptosis por medio de la regulación de la autofagia y se ha observado que podría promover la sensibilidad a fármacos, en células de cáncer de mama (Liang et al., 2020). Otro estudio revela que miR-142-3p podría regular las propiedades de las células troncales en células derivadas de cáncer de mama, además se ha sugerido su participación en la adquisición de radioresistencia, probablemente mediante la interacción con Bod1, BRCA1 y BRCA2, y KLF4 (Troschel et al., 2018). De manera similar, se ha encontrado una correlación negativa entre la expresión de miR-142-3p y la expresión de la proteína MGMT en células derivadas de glioblastoma. Además, se observó una disminución en la viabilidad celular en células de glioblastoma tratadas con agentes alquilantes, como resultado de la sobreexpresión de miR-142-3p (Lee et al., 2018).

### **miR-139-5p**

Estudios en varios tipos de cáncer muestran alteraciones en la expresión de miR-139-5p en comparación con tejidos sanos, además, se ha observado que miR-139-5p podría participar en la regulación de múltiples genes blanco y sus respectivas vías de señalización (Khalili et al., 2020). En la misma línea, se ha encontrado una disminución en la expresión de miR-139-5p en diferentes subtipos de cáncer de mama, además se observó un incremento en la expresión de FBN2, MEX3A y TPD52, sugiriendo la participación de miR-139-5p en la regulación de dichos genes (H. Sun et al., 2022). De igual forma, se ha observado una disminución en la

expresión de miR-139-5p en muestras de TNBC y en muestras de cáncer de mama invasivo, sugiriendo su participación en el proceso metastásico. Por el contrario, la sobreexpresión de miR-139-5p en líneas celulares derivadas de TNBC disminuyó las capacidades invasivas y migratorias de las células, confirmando la participación de miR-139-5p en la metástasis. Adicionalmente, se reportó la participación de miR-139-5p en la regulación de la expresión de genes involucrados en la tumorigénesis, la migración celular y la invasión (Krishnan et al., 2013). Otro estudio muestra una asociación entre la expresión de miR-139-5p y la reincidencia de cáncer de mama posterior a la radioterapia, sugiriendo la participación de miR-139-5p en la respuesta a la radioterapia. En la misma línea, se observó una disminución significativa en la reparación de daño al DNA, así como un incremento en el estrés oxidativo, como resultado de la sobreexpresión de miR-139-5p en células sometidas a radiación. Por otro lado, se identificaron a los genes POLQ, TOP1, TOP2A, RAD54L y XRCC5, involucrados en los mecanismos de DDR, y al gen MAT2A, involucrado a la respuesta al estrés oxidativo, como posibles blancos de miR-139-5p. Por lo tanto, se sugirió la participación de miR-139-5p en la respuesta a la radioterapia, mediante la regulación de genes asociados a los mecanismos de DDR y la respuesta al estrés oxidativo en cáncer de mama (Pajic et al., 2018).

En este trabajo nos proponemos mostrar la participación de los microRNAs miR-142-3p y miR-139-5p en la regulación de genes involucrados en los mecanismos de respuesta al daño al DNA.



## **Hipótesis**

Los microRNAs miR-142-3p y miR-139-5p participan en la regulación de genes involucrados en los mecanismos de respuesta al daño al DNA en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo.

## **Objetivos**

General: Evaluar la expresión de miR-142-3p y miR-139-5p y la regulación que ejerce sobre genes involucrados en los mecanismos de respuesta al daño al DNA en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo.

## **Específicos**

- Evaluar la expresión relativa de miR-142-3p y de miR-139-5p en líneas celulares derivadas de TNBC.
- Evaluar la expresión relativa de los posibles genes blanco de miR-142-3p y miR-139-5p en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo.
- Evaluar *in silico* la expresión de miR-142-3p y miR-139-5p en muestras de tejido sano y tejido tumoral.
- Evaluar *in silico* la expresión de los posibles genes blanco de miR-142-3p y miR-139-5p en muestras de tejido sano y tejido tumoral.

## **Materiales y Método**

### **Cultivo Celular**

Las líneas celulares de TNBC BT20 (ATCC HTB-19™) y MDA-MB-231 (ATCC HTB-26™) se cultivaron en medio Gibco Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F-12) suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino y 1% Penicilina/Estreptomicina. La línea celular no tumoral MCF-10A (ATCC CRL-10317™) se cultivó en medio DMEM/F-12 suplementado con 10 U/mL de Insulina, 0.2 mg/mL de Factor de Crecimiento Endotelial (EGF), 0.2 µg/mL de Hidrocortisona, 10 % Suero Fetal Bovino y 1% Penicilina/Estreptomicina. Todas la células fueron cultivadas en cajas P-100 a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **Aislamiento de RNA**

Se extrajo RNA total de los cultivos celulares de BT20 y MDA-MB-231 con un 80% de confluencia, mediante el método de Isotiocianato de Guanidina-Fenol-Cloroformo utilizando el reactivo TRIzol™ (Ambion™). Se utilizó 1 mL de TRIzol para las cajas P-100 y se siguieron las recomendaciones del fabricante (Figura 5).

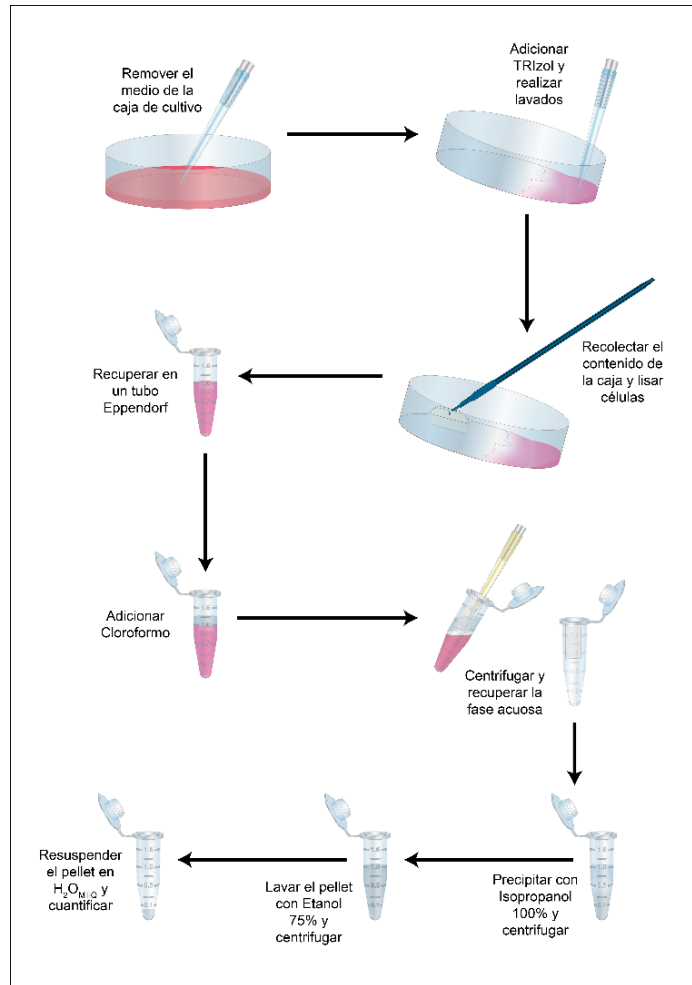


Figura 5. Protocolo de Aislamiento de RNA con TRIzol.

## Diseño de Primers

El diseño de Primers para la detección de miR-142-3p y miR-139-5p (Tabla 1) se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Varkonyi-Gasic et al. (2007) para la detección y cuantificación de miRNAs. Por otro lado, para la detección de BRCA2, MGMT, XRCC5 y RAD54L el diseño de primers (Tabla 2) se llevó a cabo utilizando la herramienta Primer-BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabla 1. Secuencias y Primers de miR-142-3p, miR-139-5p y RNU6.

<b>miR-142-3p</b>	Secuencia	5'- UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA -3'
	RT Loop	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC TGGATACGACTCCATAA -3'
	Primer Fw	5'- GCGGCGGTGTAGTGTTCCTACT -3'
<b>miR-136-5p</b>	Secuencia	5'- UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU -3'
	RT Loop	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC TGGATACGACACTGGAGA -3'
	Primer Fw	5'- GCGGCGGTCTACAGTGCACGTGTC -3'
<b>U6 small nuclear RNA (RNU6)</b>	Secuencia	5'- GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGA ACGATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCCTGCGCAAG GATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTT -3'
	RT Loop	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC TGGATACGACAAAATATGG -3'
	Primer Fw	5'- GTGCTCGCTTCGGCAGCACAT -3'
<b>Primer</b>		
<b>miRNA Rv</b>		5'- GTGCAGGGTCCGAGGT -3'
<b>Universal</b>		

Tabla 2. Primers Actina, BRCA2, MGMT, XRCC5 y RAD54L.

<b>Actina</b>	Primer Fw	5'- CTCACCCTGAAGTACCCCATC -3'
	Primer Rv	5'- GATAGCACAGCCTGGATAGCAA -3'
<b>BRCA2</b>	Primer Fw	5'- AAATCAGGCCTTCTTACTTT -3'
	Primer Rv	5'- TGATAAAGGACTTTGATAAT -3'
<b>MGMT</b>	Primer Fw	5'- CCTGGCTGAATGCCTATTTTC -3'
	Primer Rv	5'- TGTCTGGTGAACGACTCTTG -3'
<b>XRCC5</b>	Primer Fw	5'- TTGTACAGCGACAGGTGTTT -3'
	Primer Rv	5'- GAATCACATCCATGCTCACG -3'
<b>RAD54L</b>	Primer Fw	5'- TAGGCCCCAGGATGAGGAG -3'
	Primer Rv	5'- AGACAAGGTGGTTGATTGGT -3'

### Evaluación de la expresión de miRNAs

La evaluación de la expresión relativa de los miRNAs se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo propuesto por Varkonyi-Gasic et al. (2007). Se diseñaron Stem-Loop RT Primers específicos para cada miRNA, con siete bases complementarias a la secuencia de miRNA, para su unión a este, para llevar a cabo la retrotranscripción. Posteriormente, el Stem-Loop RT Primer unido al cDNA se extiende permitiendo la unión del Forward Primer específico del miRNA y el Universal Reverse Primer para la amplificación por PCR o qPCR (Figura 6).

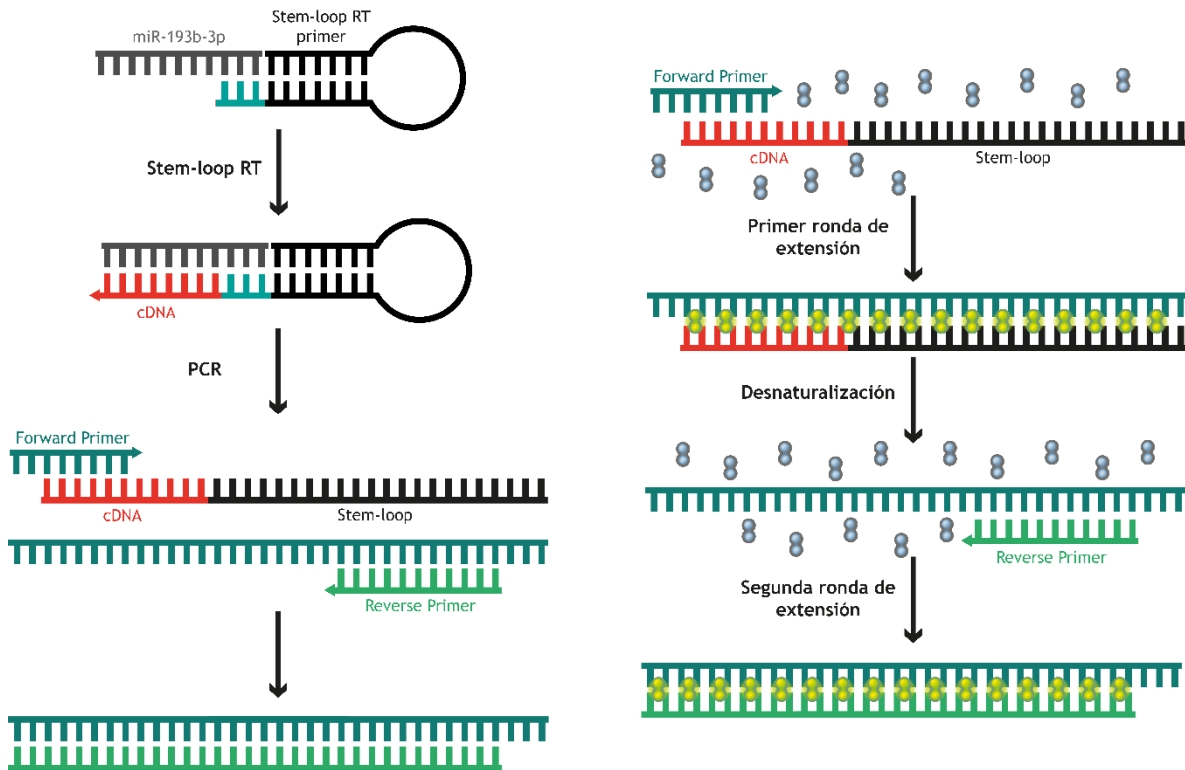


Figura 6. Stem-Loop RT-PCR y RT-qPCR de los miRNAs (Varkonyi-Gasic et al., 2007).

### *Stem-Loop RT de los miRNAs*

La síntesis de cDNA de los miRNAs se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Varkonyi-Gasic et al. (2007) modificado acorde a las especificaciones del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

Se utilizaron 2 µg de RNA en una reacción de 10 µL, para la cual se preparó el Master Mix 1 (Tabla 3) y se incubó a 65°C durante 5 min y después a 4°C durante 2 min. Posteriormente, se agregaron 3 µL de Master Mix 2 (Tabla 4) a cada reacción. La reacción se llevó a cabo con las condiciones mostradas en la Figura 7.

Tabla 3. RT miRNAs Master Mix 1.

	Volumen por reacción [μL]
<b>Stem-Loop miRNA 1 μM</b>	1
<b>dNTPs 10 mM</b>	0.5
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	-
<b>RNA (2 μg)</b>	-
<b>Volumen Total</b>	<b>7</b>

Tabla 4. RT miRNAs Master Mix 2.

	Volumen por reacción [μL]
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	1
<b>RT Buffer 10x</b>	1
<b>Inhibidor de RNAsa</b>	0.5
<b>Multiscribe RT</b>	0.5
<b>Volumen Total</b>	<b>3</b>

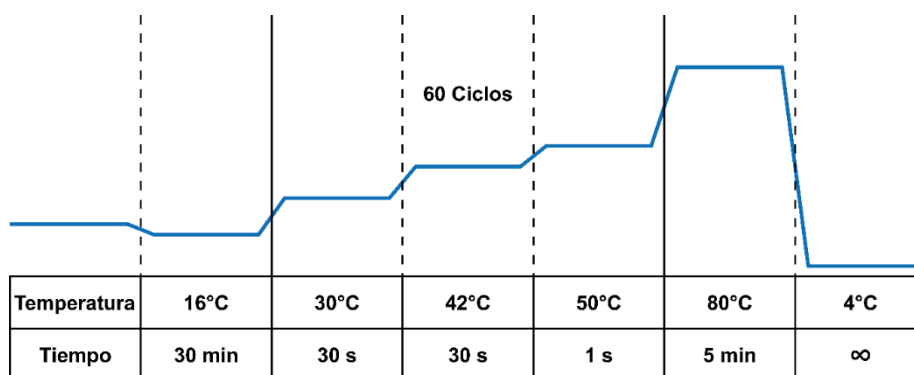


Figura 7. Perfil de temperaturas de Retrotranscripción de miRNAs.

### *RT-PCR de los miRNAs*

La reacción de RT-PCR se realizó con la DNA Polimerasa GoTaq® (Promega). Para RNU6 la reacción se preparó de acuerdo con la Tabla 5. Mientras que para miRNAs las reacciones se prepararon de acuerdo con la Tabla 6.

Tabla 5. RT-PCR RNU6.

	<b>Volumen por reacción [μL]</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	15.125
<b>Buffer PCR 5x</b>	5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2
<b>dNTPs 10 mM</b>	0.625
<b>Primer Fw RNU6 10 μM</b>	0.5
<b>Primer miRNA Universal Rv 10 μM</b>	0.5
<b>GoTaq® DNA Polymerase</b>	0.25
<b>cDNA</b>	1
<b>Volumen Total</b>	<b>25</b>



Tabla 6. RT-PCR miRNAs.

	Volumen por reacción [μL]
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	15.625
<b>Buffer PCR 5x</b>	5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2
<b>dNTPs 10 mM</b>	0.625
<b>Primer Fw miRNAs 10 μM</b>	0.25
<b>Primer miRNA Universal Rv 10 μM</b>	0.25
<b>GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase</b>	0.25
<b>cDNA</b>	1
<b>Volumen Total</b>	<b>25</b>

Para RNU6, la reacción se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones mostradas en la Figura 8.

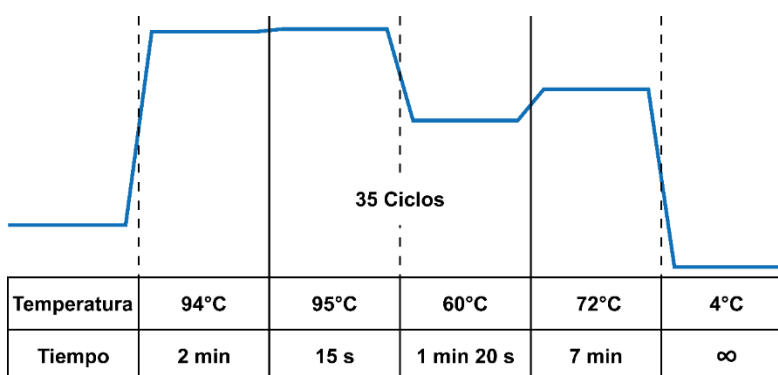


Figura 8. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de RNU6.

La reacción para la identificación de miRNAs se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones mostradas en la Figura 9.

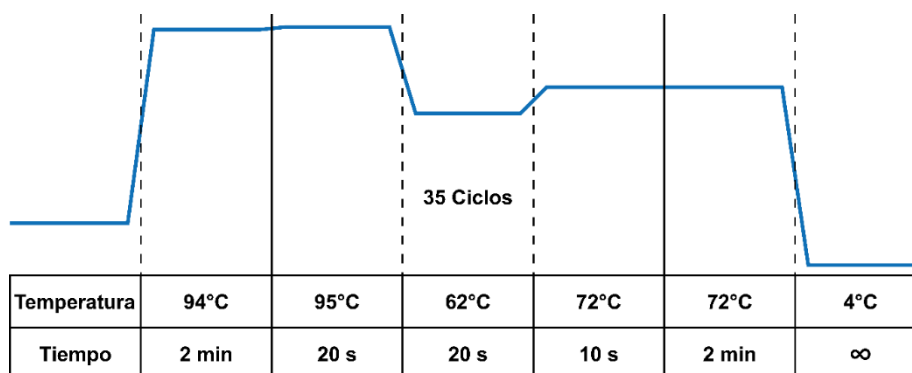


Figura 9. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de los miRNAs.

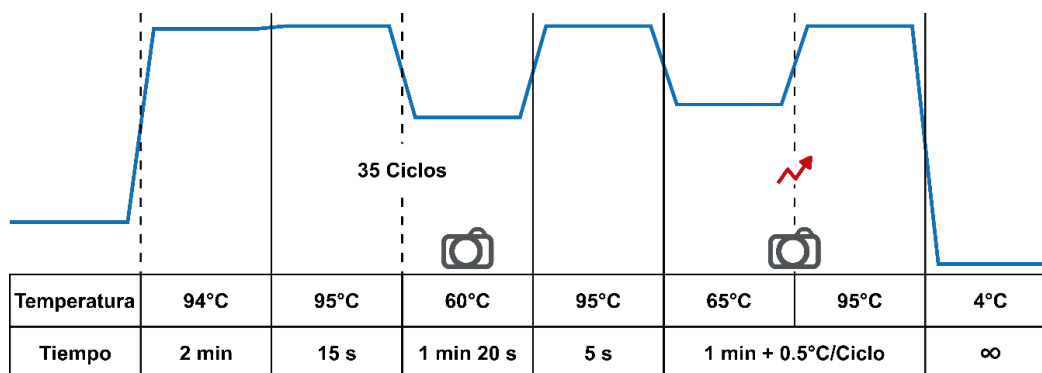
Finalmente, para validar las condiciones de amplificación se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 2.5% con Bromuro de Etidio y Marcador de Peso Molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™).

### *RT-qPCR de los miRNAs*

La evaluación de la expresión relativa de miR-142-3p y de miR-139-5p se llevó a cabo mediante RT-qPCR utilizando el kit TB Green™ Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc.) en el termociclador QIAquant 96 (QIAGEN). Las reacciones se prepararon de acuerdo con la Tabla 7. La expresión relativa de miR-142-3p y miR-139-5p se normalizó con respecto a RNU6 utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). La reacción de RT-qPCR de RNU6 se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones mencionadas en la Figura 10, mientras que para miRNAs se utilizaron las condiciones mencionadas en la Figura 11.

Tabla 7. RT-qPCR.

	Volumen por reacción [μL]
<b>TB Green</b>	5
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	3.5
<b>Primer Fw 10 μM</b>	0.25
<b>Primer Rv 10 μM</b>	0.25
<b>cDNA</b>	1
<b>Volumen Total</b>	<b>10</b>

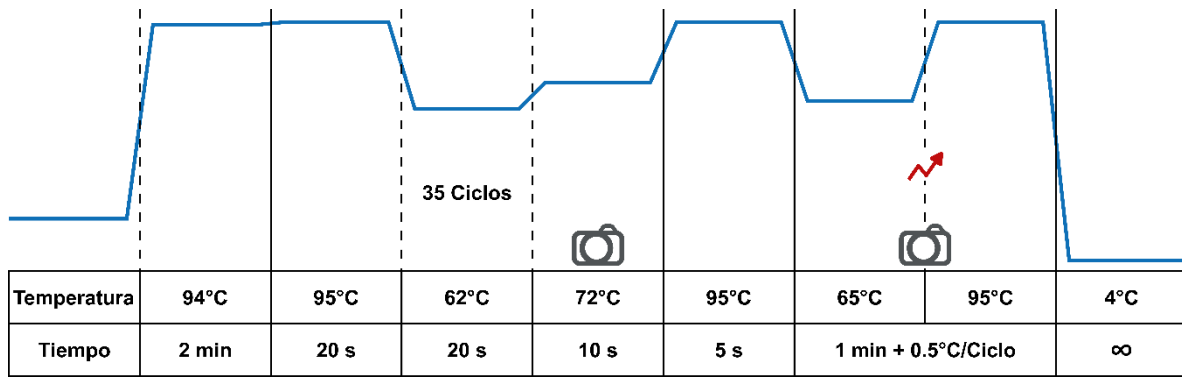


Lectura óptica para la cuantificación o para el análisis de melting curve.



Rampa de temperatura.

Figura 10. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de RNU6.



Lectura óptica para la cuantificación o para el análisis de melting curve.



Rampa de temperatura.

Figura 11. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de los miRNAs.

## Evaluación de la expresión de los genes blanco de los miRNAs

### *Retrotranscripción de los genes blanco*

La síntesis de cDNA para el análisis de los genes blanco de los miRNAs se realizó con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Se utilizó 1 µg de RNA en una reacción de 20 µL. Se preparó el Master Mix 1 (Tabla 8) y se incubó a 70°C durante 5 min en el termociclador, posteriormente, se agregaron 8 µL de Master Mix 2 (Tabla 9) a cada reacción. La reacción se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones mostradas en la Figura 12.

Tabla 8. RT Master Mix 1

	Volumen por reacción [μL]
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	-
<b>Random Primers 10x</b>	2
<b>RNA (1 μg)</b>	-
<b>Volumen Total</b>	<b>12</b>

Tabla 9. RT Master Mix 2

	Volumen por reacción [μL]
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	4.2
<b>RT Buffer 10x</b>	2
<b>dNTPs 10 mM</b>	0.8
<b>Multiscribe RT</b>	1
<b>Volumen Total</b>	<b>8</b>

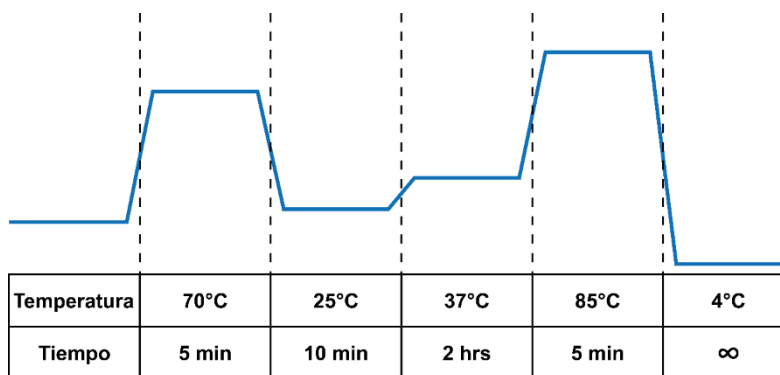


Figura 12. Perfil de temperaturas de la Retrotranscripción de los genes blanco.

### *RT-PCR de los genes blanco*

La reacción de RT-PCR se realizó con la DNA Polimerasa GoTaq® (Promega). Las reacciones se prepararon de acuerdo con la Tabla 10.

Tabla 10. RT-PCR genes blanco.

	<b>Volumen por reacción [μL]</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	15.125
<b>Buffer PCR 5x</b>	5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2
<b>dNTPs 10 mM</b>	0.625
<b>Primer Fw 10 μM</b>	0.5
<b>Primer Rv 10 μM</b>	0.5
<b>GoTaq® DNA Polymerase</b>	0.25
<b>cDNA</b>	1
<b>Volumen Total</b>	<b>25</b>

Las reacciones de RT-PCR de Actina, MGMT, XRCC5 y RAD54L se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones mostradas en la Figura 13. Por otro lado, la reacción de RT-PCR de BRCA2 se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones mostradas en la Figura 14.

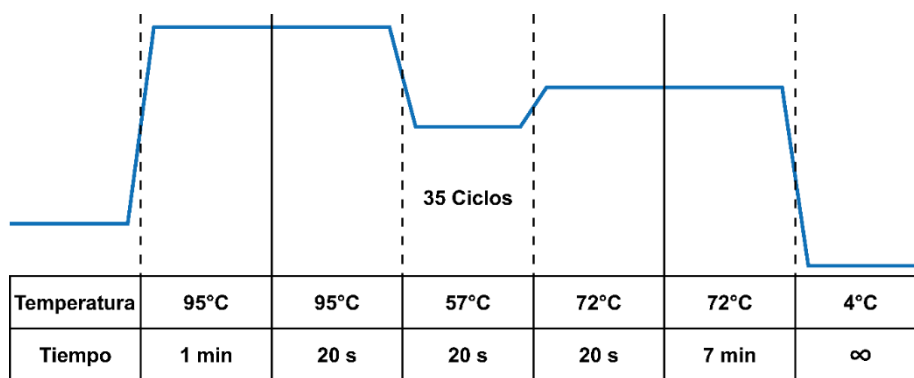


Figura 13. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de Actina, MGMT, XRCC5 y RAD54L.

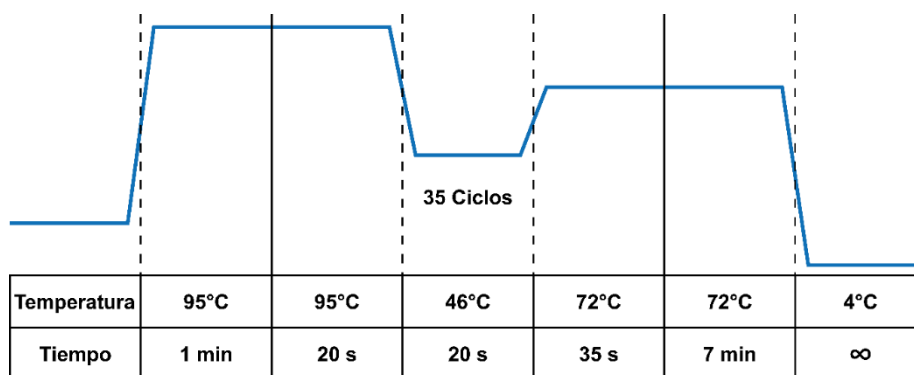


Figura 14. Perfil de temperaturas de la RT-PCR de BRCA2.

Finalmente, para validar las condiciones de amplificación se realizó mediante una electroforesis en gel de Agarosa al 2% con Bromuro de Etidio y Marcador de Peso Molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™).

#### *RT-qPCR de los genes blanco*

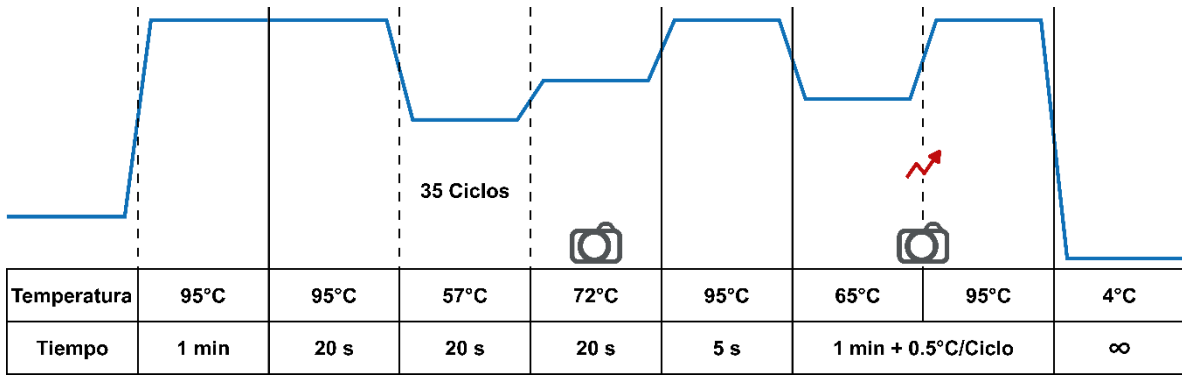
La evaluación de la expresión relativa de los genes blanco se llevó a cabo mediante RT-qPCR utilizando el kit TB Green™ Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc.) en el termociclador QIAquant 96 (QIAGEN). Las reacciones se prepararon de acuerdo

con la Tabla 11. La expresión relativa de los genes blanco se normalizó con respecto a la de B-Actina utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Para B-Actina, MGMT, XRCC5 y RAD54L se utilizaron las condiciones mostradas en la Figura 15, finalmente, para BRCA2, se utilizaron las condiciones mencionadas en la Figura 16.

Tabla 11. RT-qPCR.

	<b>Volumen por reacción [μL]</b>
<b>TB Green</b>	5
<b>H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub></b>	3.5
<b>Primer Fw 10 μM</b>	0.25
<b>Primer Rv 10 μM</b>	0.25
<b>cDNA</b>	1
<b>Volumen Total</b>	<b>10</b>



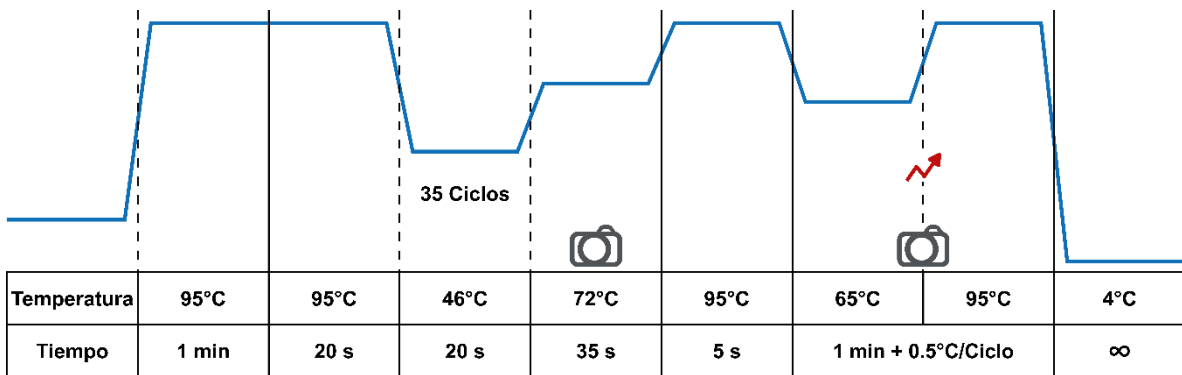


Lectura óptica para la cuantificación o para el análisis de melting curve.



Rampa de temperatura.

Figura 15. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de Actina, MGMT, XRCC5 y RAD54L.



Lectura óptica para la cuantificación o para el análisis de melting curve.



Rampa de temperatura.

Figura 16. Perfil de temperaturas de la RT-qPCR de BRCA2.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de expresión se llevó a cabo utilizando Excel y GraphPad Prism 8. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. La

expresión relativa se muestra como  $\Delta\Delta Ct \pm SD$ . Se llevaron a cabo pruebas de *t* de Student para comparar la expresión relativa entre líneas celulares. Se consideraron P-values < 0.05 como estadísticamente significativos.

### **Análisis de la estructura secundaria de los mRNAs de los genes blanco**

Se emplearon las secuencias de los mRNA de los genes blanco en formato FASTA obtenidas del NCBI para el análisis. Se alinearon las secuencias de los miRNAs con las secuencias de los mRNAs blanco en la herramienta IntaRNA de la Albert-Ludwigs-Universität Freiburg para identificar los posibles sitios de unión de los miRNAs (Mann et al., 2017). Los posibles sitios de unión se seleccionaron de acuerdo con su localización, el tipo de unión de la secuencia semilla y su energía ( $\Delta G$ ). Posteriormente, se cargaron las secuencias de los mRNAs de BRCA2, MGMT, XRCC5 y RAD54L a la herramienta RNA Folding Form del software UNAFold para obtener las estructuras secundarias de los mRNAs (Zuker, 2003). Se seleccionaron las estructuras secundarias con el  $\Delta G$  más bajo. Finalmente, se identificaron los posibles sitios de unión de los miRNAs en las estructuras secundarias obtenidas.

### **Análisis *in silico* de la expresión de miRNAs y mRNAs en pacientes de TNBC**

Se utilizaron datos de expresión de miRNAs y mRNAs en pacientes de TNBC obtenidos de sets de datos de microarreglos disponibles en el Gene Expression

Omnibus (GEO) del NCBI para el análisis. La búsqueda se realizó utilizando las siguientes palabras clave: Triple Negative Breast Cancer y TNBC. Se utilizó el set de datos GSE45498 ( $n = 536$ ; Cascione et al., 2013) para el análisis. Las plataformas GPL16231 y GPL16299 se emplearon para el análisis de miRNAs y mRNAs, respectivamente. Los datos se analizaron directamente con la herramienta GEO2R del NCBI (Smyth, 2005). Se definieron los grupos a comparar, donde se seleccionaron las muestras correspondientes a cada grupo, los grupos se definieron de la siguiente manera: “Normal”, “Primary Tumor” y “Metastatic”. Se consideraron los P-values  $< 0.05$  como estadísticamente significativos, se utilizaron valores de FDR (False Discovery Rate)  $< 0.05$  como estadísticamente significativos (Benjamini & Hochberg, 1995), los datos de la plataforma GPL16299 se transformaron a Log2, mientras que los de la plataforma GPL16231 se analizaron directamente, para ambos sets de datos se utilizó el método “vooma” (Law et al., 2014). Se descargaron las tablas de datos normalizados y de resultados.

Por otro lado, se generaron Volcano Plots a partir de los “Log2 (Fold Change)” y los “-Log10 (FDR)” de cada gen. Con los datos se crearon archivos de texto delimitados por tabulaciones y se cargaron a la herramienta VolcaNoseR (Goedhart & Luijsterburg, 2020). Se consideraron valores de Log2 (Fold Change)  $< -1$  como disminuidos y valores de Log2 (Fold Change)  $> 1$  como incrementados. Se consideraron valores de -Log10 (FDR)  $> 1.3010299957$  (equivalente a un adj. P-value de 0.05) como estadísticamente significativos. Finalmente, se resaltaron los genes de interés en cada gráfica.

## **Resultados**

**La expresión relativa de miR-142-3p y miR-139-5p es diferencial en líneas celulares derivadas de TNBC.**

La validación de condiciones de amplificación de los miRNAs se llevó a cabo mediante Stem-Loop RT-PCR en la línea celular MCF-10A y en las líneas celulares derivadas de TNBC (BT20 y MDA-MB-231). Se observó un producto único del peso molecular esperado tanto para el amplicón de miR-142-3p como para el de miR-139-5p. La banda correspondiente a miR-142-3p en la línea celular MDA-MB-231 tuvo una mayor intensidad con respecto a la línea celular BT20 y la línea celular no tumoral. Los resultados muestran una intensidad similar en las bandas correspondientes a miR-139-5p en ambas líneas celulares derivadas de TNBC (Figura 17).

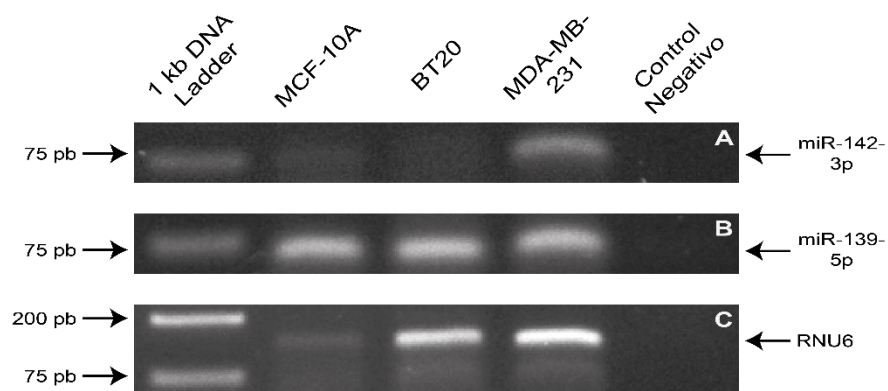


Figura 17. Validación de las condiciones de amplificación de los miRNAs mediante Stem-Loop RT-PCR en líneas celulares derivadas de TNBC (Electroforesis en Gel de Agarosa). A. miR-142-3p (74 pb). B. miR-139-5p (74 pb). C. RNU6 (149 pb).

Para evaluar la expresión relativa de miR-142-3p y de miR-139-5p se llevó a cabo una Stem-Loop RT-qPCR. La expresión de miR-142-3p es significativamente mayor en la línea celular MDA-MB-231 comparado con la línea celular MCF-10A, por otro lado, la expresión de miR-142-3p es menor en la línea celular BT20 (Figura 18).

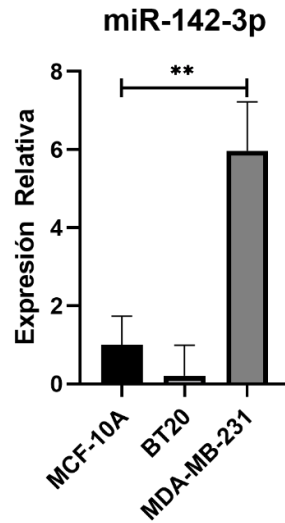


Figura 18. Expresión relativa de miR-142-3p en líneas celulares derivadas de TNBC.

Del mismo modo, la expresión de miR-139-5p es significativamente mayor en la línea celular MDA-MB-231, mientras que en la línea celular BT20 no se observó amplificación (Figura 19).

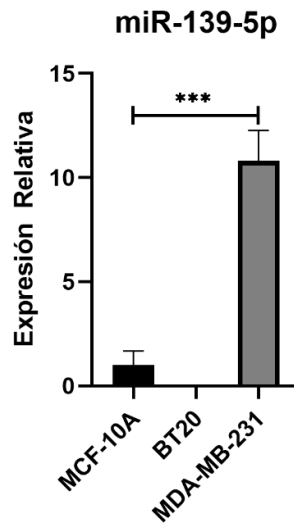


Figura 19. Expresión relativa de miR-139-5p en líneas celulares derivadas de TNBC.

## BRCA2 se encuentra sobreexpresado en líneas celulares derivadas de TNBC.

Se validaron las condiciones de amplificación de BRCA2, uno de los posibles blancos de miR-142-3p mediante RT-PCR en la línea celular MCF-10A y en las líneas celulares derivadas de TNBC (MDA-MB-231 y BT20). Se observó un producto único del peso molecular esperado para el amplicón de BRCA2. Las bandas correspondientes a las líneas celulares derivadas de TNBC tuvieron una mayor intensidad en comparación con la línea celular no tumoral (Figura 20).

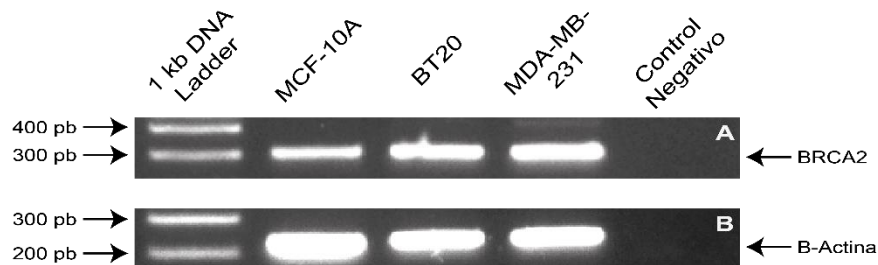


Figura 20. Validación de las condiciones de amplificación de BRCA2 en líneas celulares derivadas de TNBC (Electroforesis en Gel de Agarosa). A. BRCA2 (300 pb). B. Actina (230 pb).

La expresión relativa de BRCA2 se evaluó mediante RT-qPCR. Se confirmó que BRCA2 se encuentra significativamente sobreexpresado en líneas celulares de TNBC comparado con la línea celular no tumoral MCF-10A (Figura 21).

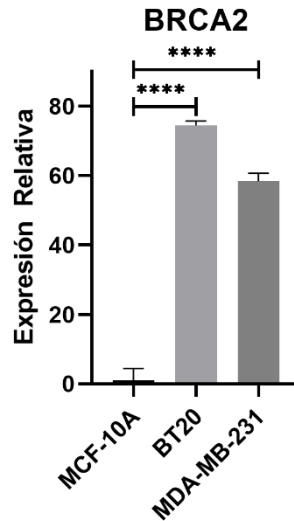


Figura 21. Expresión relativa de BRCA2 en líneas celulares derivadas de TNBC.

**El análisis de las estructuras secundarias predichas sugiere que el sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de BRCA2 podría estar disponible para la interacción.**

Se identificó el posible sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de BRCA2 con ayuda de la herramienta IntaRNA (Figura 22). Posteriormente se identificó el sitio de unión de miR-142-3p en la estructura secundaria de BRCA2 predicha en la herramienta mFold (Figura 23). Se observó que el posible sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de BRCA2 se encontraba en una región de cadena sencilla, sugiriendo que el sitio está disponible para la interacción.



```

Target (top)      : BRCA2
Query (bottom)   : hsa-miR-142-3p

          10875      10881
          |         |
5'-GGC..UUGAU      AGUAU..CUG-3'
          CACUACA
          |||||
          GUGAUGU
3'-AGG..CCUUU
          |         |
          7         1

Energy           : -7.35 kcal/mol
Hybridization Energy : -8.84 kcal/mol
Unfolding Energy - Target : 0.91 kcal/mol
Unfolding Energy - Query  : 0.58 kcal/mol

```

Figura 22. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la región 3'-UTR del mRNA de BRCA2.

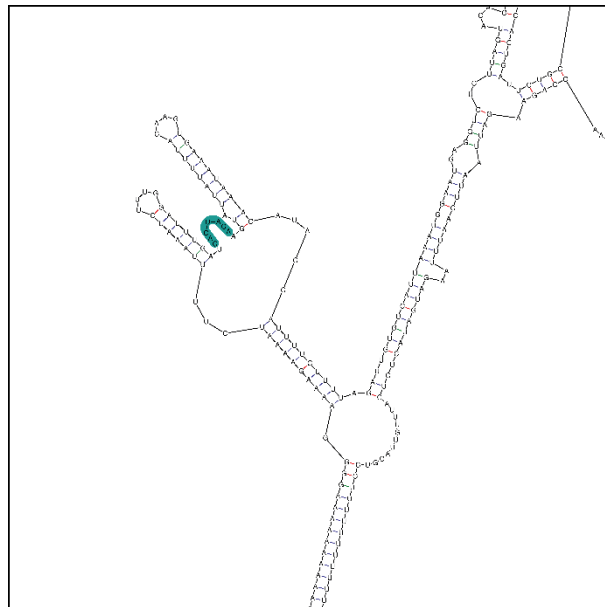


Figura 23. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la estructura secundaria predicha del mRNA de BRCA2 resaltado en azul.

**La expresión de MGMT se encuentra por debajo del umbral de detección en líneas celulares derivadas de TNBC.**

Se validaron las condiciones de amplificación de MGMT, uno de los posibles blancos de miR-142-3p mediante RT-PCR en la línea celular MCF-10A y en las líneas celulares derivadas de TNBC (MDA-MB-231 y BT20). Se observó un producto único del peso molecular esperado para el amplicón de MGMT. Únicamente se observó la banda correspondiente a la línea celular MCF-10A, mientras que en las líneas celulares derivadas de TNBC no se observó amplificación (Figura 24), sugiriendo que no existe correlación entre la expresión de miR-142-3p y MGMT.

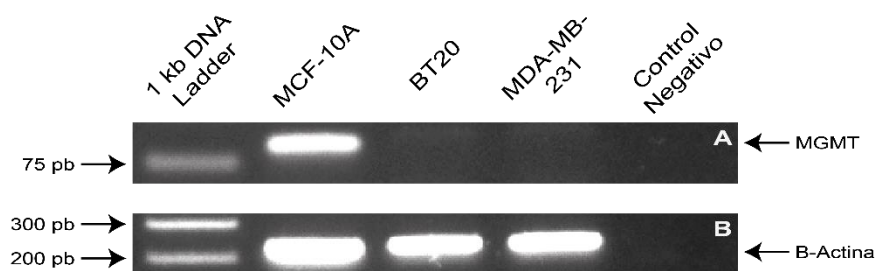


Figura 24. Validación de las condiciones de amplificación de MGMT en líneas celulares derivadas de TNBC (Electroforesis en Gel de Agarosa). A. MGMT. B. Actina (230 pb).

Se evaluó la expresión relativa de MGMT mediante RT-qPCR. Únicamente se observó amplificación en la línea celular MCF-10A, mientras que en las líneas celulares derivadas de TNBC no se observó amplificación, sugiriendo que la expresión de MGMT se encuentra por debajo del umbral de detección en las líneas celulares derivadas de TNBC (Figura 25).

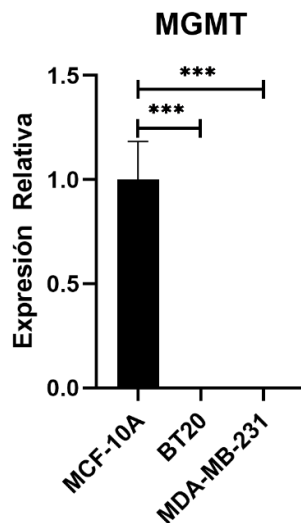


Figura 25. Expresión relativa de MGMT en líneas celulares derivadas de TNBC.

**El análisis de las estructuras secundarias predichas sugiere que el sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de MGMT podría no estar disponible para la interacción.**

Se identificó el posible sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de MGMT con ayuda de la herramienta IntaRNA (Figura 26). Posteriormente se identificó el sitio de unión de miR-142-3p en las estructuras secundarias de MGMT predichas en la herramienta mFold (Figura 27). Se observó que el posible sitio de unión de miR-142-3p en el mRNA de MGMT se encontraba en regiones de doble cadena, por lo tanto, el sitio podría no estar disponible para la interacción.

```

Target (top)      : MGMT
Query (bottom)   : hsa-miR-142-3p

      887      894
      |        |
5'-AAC..UCUCU      CCUUG..UGU-3'
      AACGCUGC
      |||||
      UUGUGAUG
3'-AGG..AUCCU      U-5'
      |        |
      9        2

Energy              : -6.83 kcal/mol
Hybridization Energy : -8.88 kcal/mol
Unfolding Energy - Target : 1.47 kcal/mol
Unfolding Energy - Query  : 0.58 kcal/mol

```

Figura 26. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la región 3'-UTR del mRNA de MGMT.

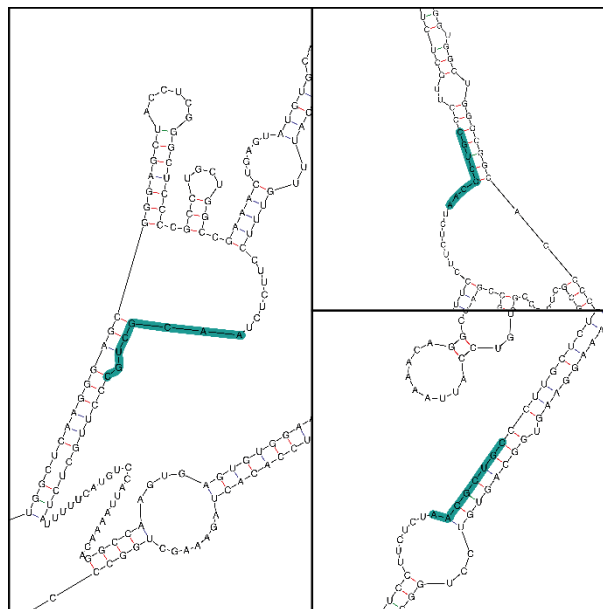


Figura 27. Posible sitio de unión de miR-142-3p en la estructura secundaria predicha del mRNA de MGMT resaltado en azul.

## La expresión relativa de XRCC5 es similar en líneas celulares derivadas de TNBC.

Se validaron las condiciones de amplificación de XRCC5, uno de los posibles blancos de miR-139-5p mediante RT-PCR en la línea celular MCF-10A y en las líneas celulares derivadas de TNBC (MDA-MB-231 y BT20). Se observó un producto único del peso molecular esperado para el amplicón de XRCC5. Se observó una intensidad similar, tanto en las bandas correspondientes a las líneas celulares derivadas de TNBC, como en la línea celular no tumoral (Figura 28).

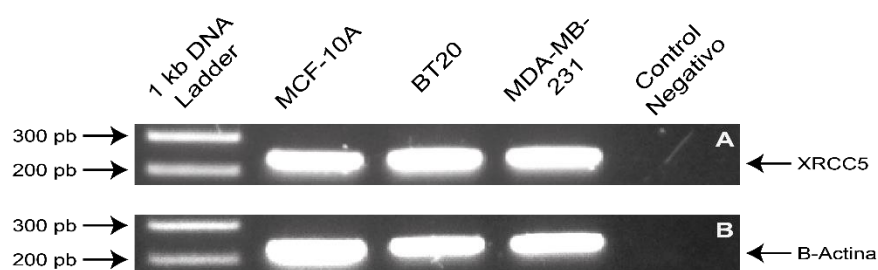


Figura 28. Validación de las condiciones de amplificación de XRCC5 en líneas celulares derivadas de TNBC (Electroforesis en Gel de Agarosa). A. XRCC5 (234 pb). B. Actina (230 pb).

La expresión relativa de XRCC5 se evaluó mediante RT-qPCR. No se encontraron diferencias significativas entre la expresión de ambas líneas celulares y la línea celular no tumoral, sugiriendo que no existe correlación entre la expresión de miR-139-5p y XRCC5 en líneas celulares derivadas de TNBC (Figura 29). Por lo tanto, se sugiere que no existe una correlación entre la expresión de miR-139-5p y XRCC5.

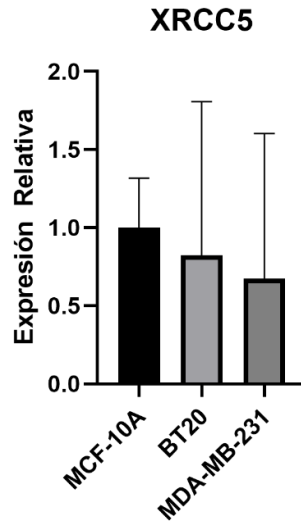


Figura 29. Expresión relativa de XRCC5 en líneas celulares derivadas de TNBC.

**El análisis de las estructuras secundarias predichas sugiere que el sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de XRCC5 podría no estar disponible para la interacción.**

De la misma forma, se identificó el posible sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de XRCC5 (Figura 30). Se identificó el sitio de unión de miR-139-5p en la estructura secundaria de XRCC5 predicha (Figura 31). Se observó que el posible sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de XRCC5 se encontraba en una región de doble cadena, por lo tanto, el sitio podría no estar disponible para la interacción.

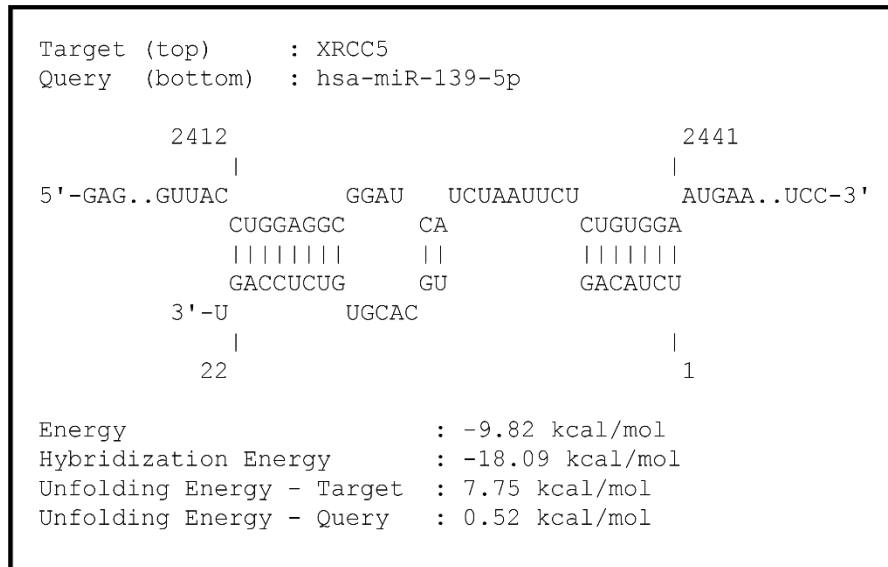


Figura 30. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la región 3'-UTR del mRNA de XRCC5.

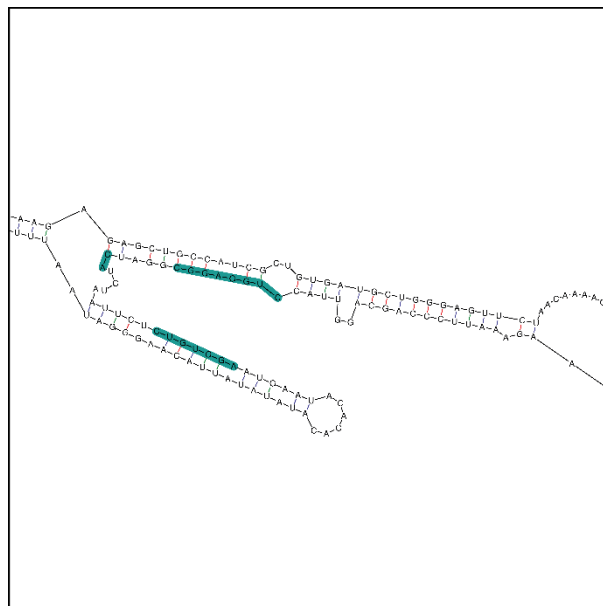


Figura 31. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la estructura secundaria predicha del mRNA de XRCC5 resaltado en azul.

## **RAD54L se encuentra sobreexpresado en líneas celulares derivadas de TNBC.**

Se validaron las condiciones de amplificación de RAD54L uno de los posibles blancos de miR-139-5p mediante RT-PCR en la línea celular MCF-10A y en las líneas celulares derivadas de TNBC (MDA-MB-231 y BT20). Se observó un producto único del peso molecular esperado para el amplicón de RAD54L. Se observó una intensidad similar, tanto en las bandas correspondientes a las líneas celulares derivadas de TNBC, como en la línea celular no tumoral (Figura 32).

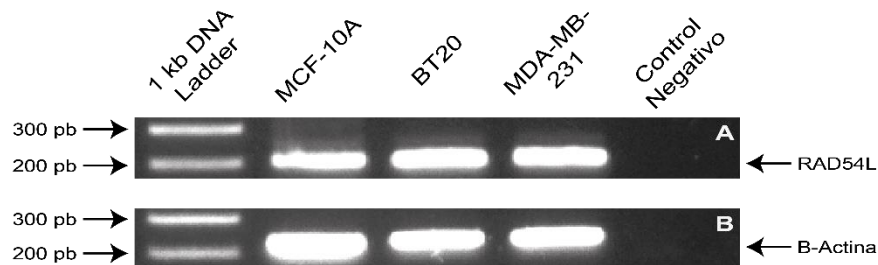


Figura 32. Validación de las condiciones de amplificación de RAD54L en líneas celulares derivadas de TNBC (Electroforesis en Gel de Agarosa). A. RAD54L (204 pb). B. Actina (230 pb).

De igual forma, la expresión relativa de RAD54L se evaluó mediante RT-qPCR en MDA-MB-231 y BT20. Se observó un incremento significativo en la expresión de RAD54L en las líneas celulares derivadas de TNBC en comparación con la línea celular no tumoral (Figura 33). Sin embargo, no se observa correlación entre la expresión de miR-139-5p y RAD54L.



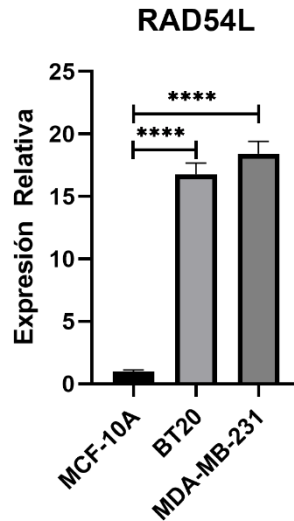


Figura 33. Expresión relativa de RAD54L en líneas celulares derivadas de TNBC.

**El análisis de las estructuras secundarias predichas sugiere que el sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de RAD54L podría no estar disponible para la interacción.**

Se identificó el posible sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de RAD54L (Figura 34). Posteriormente, se identificó el sitio de unión de miR-139-5p en las estructuras secundarias de RAD54L predichas (Figura 35). Se observó que el posible sitio de unión de miR-139-5p en el mRNA de RAD54L se ubicaba en la región codificante (CDS), adicionalmente, se encontraba en regiones de doble cadena, por lo tanto, el sitio podría no estar disponible para la interacción.

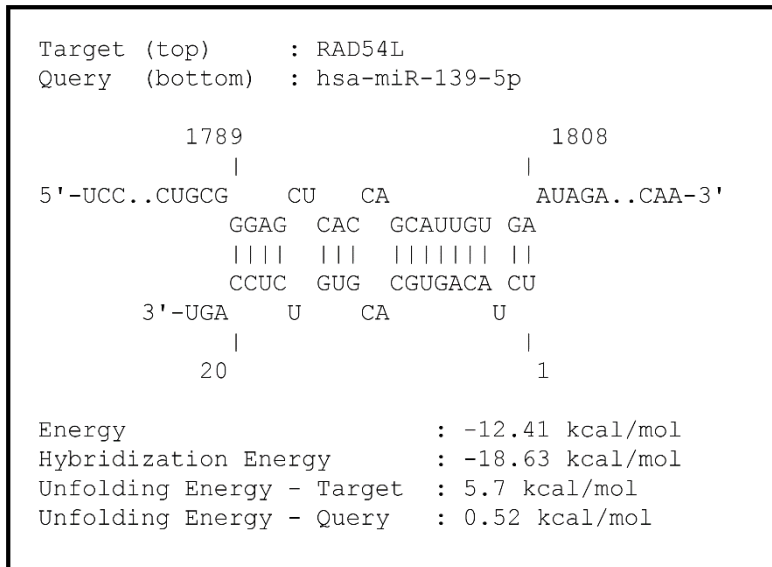


Figura 34. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la región codificante (CDS) del mRNA de RAD54L.

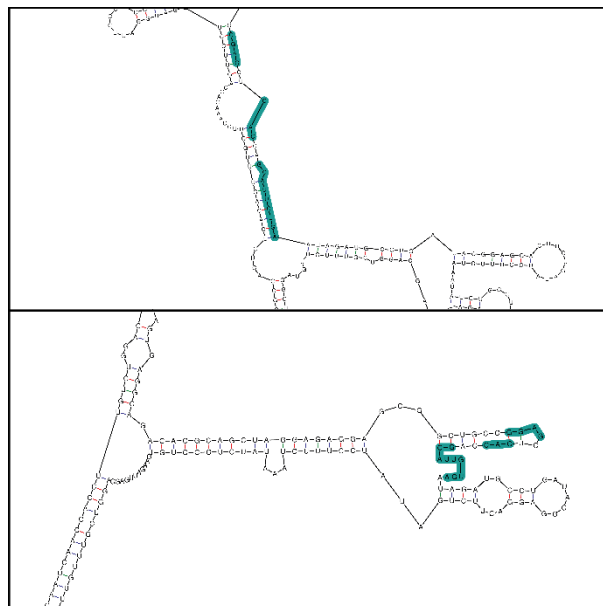


Figura 35. Posible sitio de unión de miR-139-5p en la estructura secundaria predicha del mRNA de RAD54L resaltado en azul.

### **miR-142-3p se encuentra sobreexpresado en tumores primarios de TNBC**

Se analizó la expresión de miR-142-3p y miR-139-5p en datos obtenidos de pacientes (Cascione et al., 2013). Se observó que miR-142-3p se encuentra significativamente sobreexpresado en tejido de tumores primarios de TNBC en comparación con el tejido sano (Figura 36A). En el caso de las muestras de invasión a nodo linfático se observó una expresión aún mayor de miR-142-3p en comparación con el tejido sano (Figura 36B). Finalmente, se encontró una mayor expresión de miR-142-3p en muestras de invasión a nodo linfático comparado con el tejido de tumores primarios de TNBC (Figura 36C). En el caso de miR-139-5p no se observaron cambios significativos en ninguna de las comparaciones.

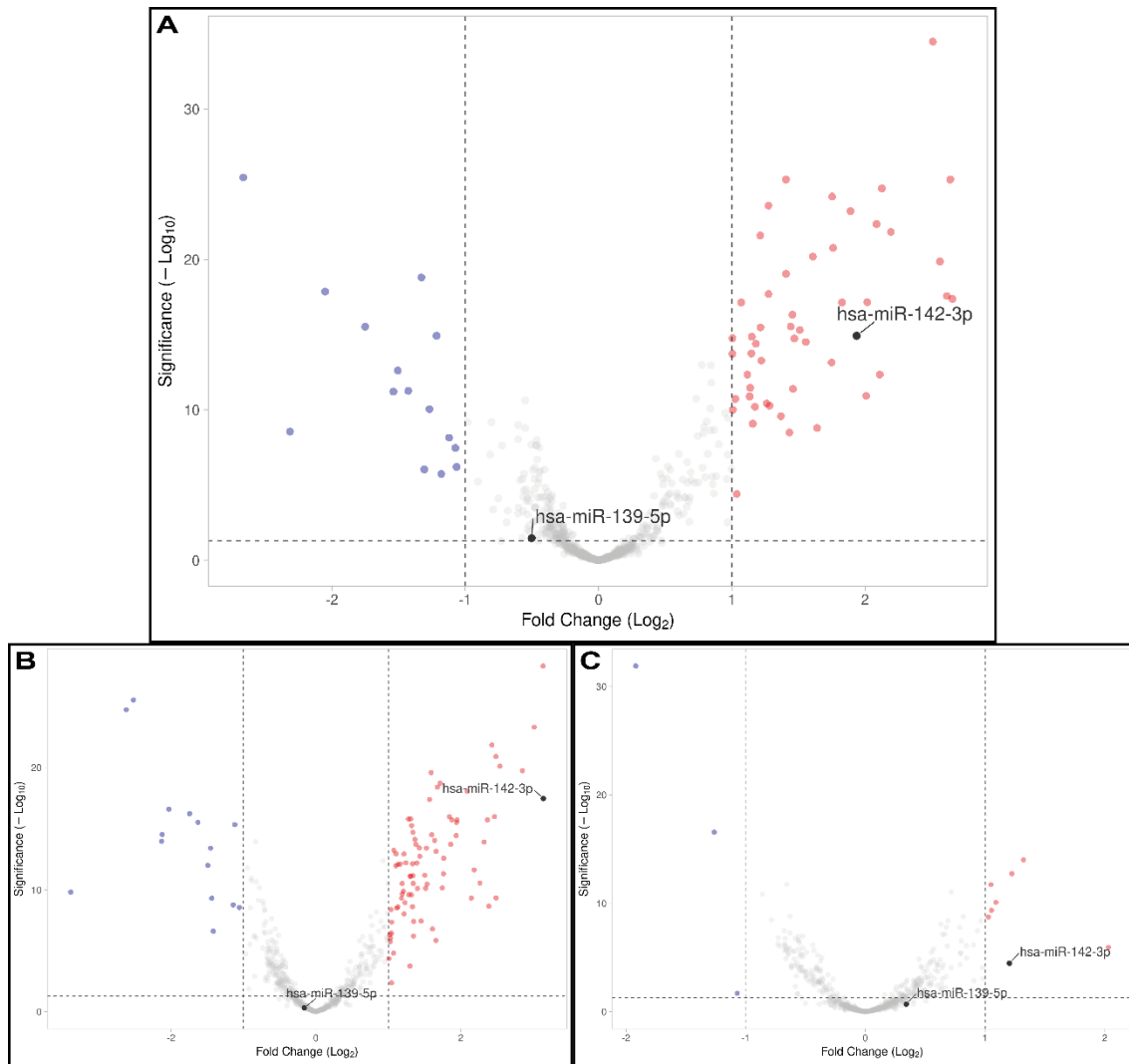


Figura 36. Gráfica de Volcán mostrando la expresión diferencial de miR-142-3p y miR-139-5p. A. Muestras de tejido de tumores primarios de TNBC contra muestras de tejido sano. B. Muestras de invasión a nodo linfático contra muestras de tejido sano. C. Muestras de invasión a nodo linfático contra muestras de tejido de tumores primarios de TNBC. Se consideraron valores de  $-\log_{10}$  (adj. P-value)  $> 1.3010299957$  como significativos. Se consideraron valores de  $\log_2$  (Fold Change)  $< -1$  como disminuidos y valores de  $\log_2$  (Fold Change)  $> 1$  como incrementados.

## **BRCA2, XRCC5 y RAD54L se encuentran sobreexpresados en tumores primarios de TNBC**

Se analizó la expresión de los mRNAs de los genes blanco de miR-142-3p y miR-139-5p en datos obtenidos de pacientes (Cascione et al., 2013). BRCA2, blanco de miR-142-3p, se encontró significativamente sobreexpresado en muestras de tumores primarios de TNBC y en muestras de invasión a nodo linfático comparado con las muestras de tejido sano (MGMT no se incluyó en el análisis debido a que el set de datos seleccionado únicamente incluía genes asociados a la supervivencia celular). Por otro lado, se observaron cambios significativos en la expresión de XRCC5 y RAD54L, blancos de miR-139-5p, tanto en muestras de tejido de tumores primarios de TNBC como en muestras de invasión a nodo linfático en comparación con las muestras de tejido sano (Figuras 37A y 37B). No se encontraron cambios significativos en la expresión de BRCA2, XRCC5 y RAD54L en muestras de invasión a nodo linfático comparadas contra muestras de tumores primarios de TNBC (Figura 37C).

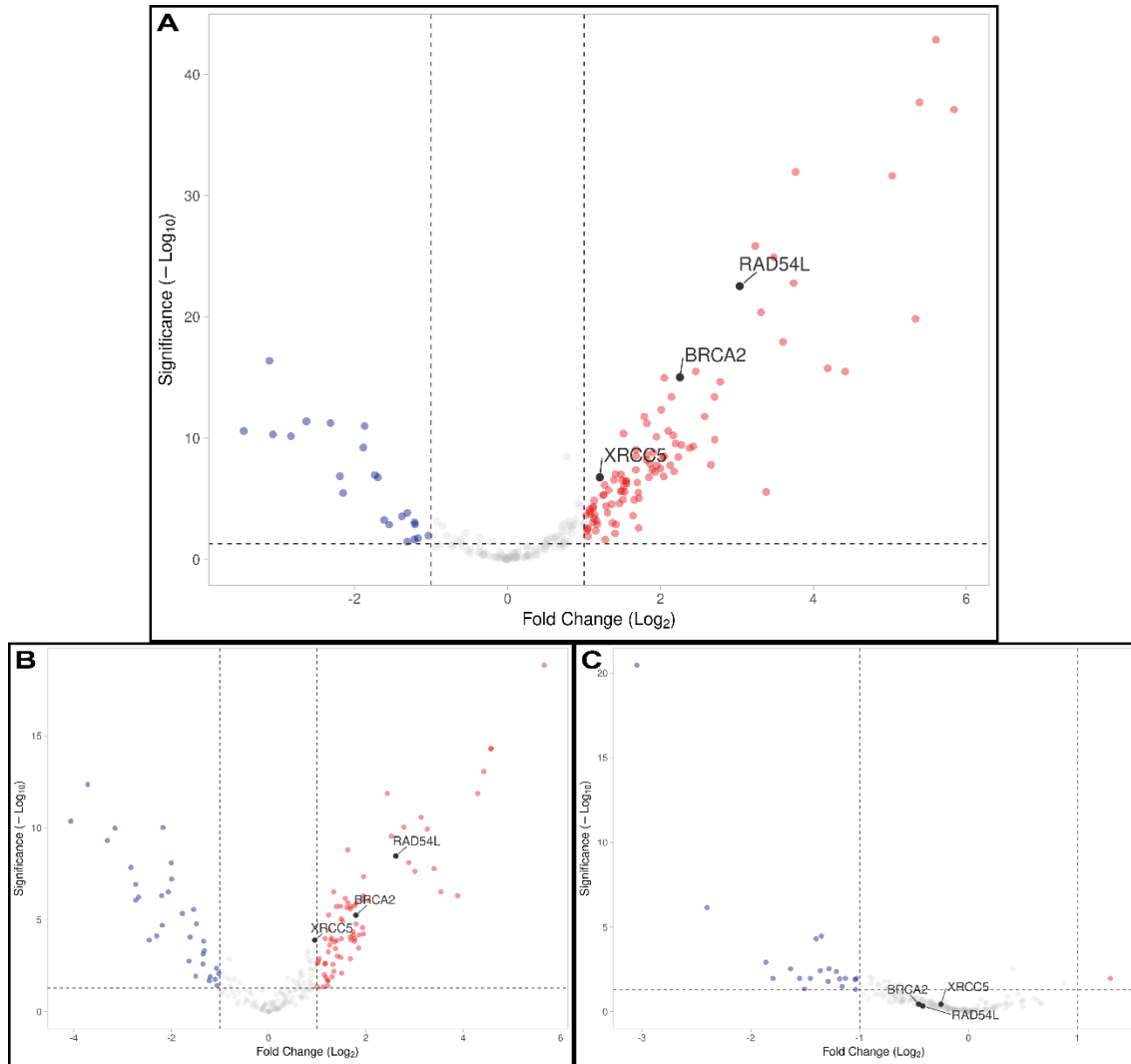


Figura 37. Gráfica de Volcán mostrando la expresión diferencial de los posibles genes blanco de miR-142-3p y miR-139-5p. A. Muestras de tejido de tumores primarios de TNBC contra muestras de tejido sano. B. Muestras de invasión a nodo linfático contra muestras de tejido sano. C. Muestras de invasión a nodo linfático contra muestras de tejido de tumores primarios de TNBC. Se consideraron valores de  $-\log_{10}(\text{adj. P-value}) > 1.3010299957$ . Se consideraron valores de  $\log_2(\text{Fold Change}) < -1$  como disminuidos y valores de  $\log_2(\text{Fold Change}) > 1$  como incrementados.

## Discusión

En este estudio se evaluó la expresión relativa de miR-142-3p y miR-139-5p y su posible participación en los mecanismos de DDR en líneas celulares derivadas de TNBC mediante la evaluación de la expresión de sus posibles genes blanco, involucrados en los mecanismos de DDR. Se encontró una expresión diferencial de miR-142-3p y miR-139-5p entre las líneas celulares derivadas de TNBC; los resultados sugieren que miR-139-5p podría estar ausente en la línea celular BT20.

Estudios previos muestran una disminución en la expresión de miR-142-3p en etapas avanzadas de cáncer de mama (Mansoori et al., 2021). De forma similar, se ha observado una disminución en la expresión de miR-139-5p en cáncer de mama (H. Sun et al., 2022). En contraste, el análisis *in silico* de la expresión de miR-142-3p en tumores primarios de TNBC muestra una sobreexpresión significativa de este en comparación con el tejido sano. Por otro lado, miR-139-5p mostró una disminución no significativa en su expresión en tumores primarios.

En cuanto a los posibles genes blanco de miR-142-3p, BRCA2 y MGMT, se observó un incremento en la expresión de BRCA2 en las líneas celulares derivadas de TNBC, mientras que no se observó expresión de MGMT. El análisis *in silico* revela una ligera sobreexpresión de BRCA2 en tumores primarios de TNBC. Del mismo modo, se ha reportado una mayor expresión de BRCA2 en TNBC comparado con otros subtipos de cáncer de mama (Satyananda et al., 2021).

Acorde con nuestros resultados, se ha reportado la pérdida de la función de MGMT en BC como resultado de la metilación del promotor de MGMT (Asiaf et al., 2015). Adicionalmente, se ha observado una disminución de la expresión de MGMT como

resultado de la hipermetilación del promotor de MGMT en pacientes de TNBC (Fumagalli et al., 2012). Por otro lado, en células de glioblastoma con sobreexpresión de miR-142-3p, se observó una disminución de la expresión de MGMT a nivel de proteína, sin embargo, no se observó una correlación en la expresión de MGMT a nivel de mRNA, sugiriendo una inhibición a nivel de traducción, mediante una interacción no canónica entre miR-142-3p y el mRNA de MGMT (Lee et al., 2018). Por lo tanto, se sugiere que no existe correlación entre la expresión de miR-142-3p y sus posibles blancos.

Por otro lado, se evaluó la expresión relativa de los posibles genes blanco de miR-139-5p, XRCC5 y RAD54L en líneas celulares derivadas de TNBC. En el caso de XRCC5 se encontró una expresión similar entre las líneas celulares MDA-MB-231 y BT20. Por el contrario, el análisis *in silico* muestra un incremento significativo en la expresión de XRCC5 en muestras de TNBC. En la misma línea, se ha observado que existe una mayor expresión del dímero formado por la proteína Ku80 (codificada por el gen XRCC5) y la proteína Ku70, en el núcleo de células invasivas de cáncer de mama (Alshareeda et al., 2013).

En el caso de RAD54L, se observó una expresión similar de RAD54L en líneas celulares derivadas de TNBC, por otro lado, observamos una sobreexpresión significativa de RAD54L en muestras de tumores primarios de TNBC en comparación con tejido sano analizadas *in silico*, lo que concuerda con la sobreexpresión de RAD54L en muestras de cáncer de mama comparado con muestras de tejido sano, adicionalmente, se ha reportado una sobreexpresión de RAD54L en muestras de TNBC comparado con muestras correspondientes a otros



subtipos de cáncer de mama (Suo et al., 2020). Por lo tanto, se sugiere que no existe correlación entre la expresión de miR-139-3p y sus posibles blancos.

Estudios previos muestran la capacidad de un solo miRNA de participar en la regulación de múltiples vías de señalización. Se ha observado la participación de miR-200c en la modulación de la respuesta a la radiación en células de cáncer de mama por medio de la interacción con la proteína TBK1 (Lin et al., 2013). Otro estudio muestra la participación de miR-200c en la proliferación celular en cáncer de mama mediante la regulación de las vías de señalización de AKT y ERK por medio de la interacción con KRAS (Song et al., 2015). Por otro lado, se ha sugerido que miR-185 regula de forma indirecta la expresión de BRCA1 en cáncer de mama por medio de DNMT1 y E2F6, modulando el crecimiento tumoral (Tang et al., 2014). y en la respuesta a la radiación ionizante en cáncer de riñón a través de la modulación de la vía de señalización de ATR (J. Wang et al., 2013).

En contraste, nuestros resultados sugieren que miR-142-3p y miR-139-5p no cumplen la función de marcadores en los mecanismos de DDR en TNBC mediante la regulación de más de un mecanismo de reparación de manera simultánea. Sin embargo, varios estudios reportan la participación de miR-142-3p en la regulación de múltiples procesos. Se ha reportado la participación de miR-142-3p en la regulación de la resistencia a la Doxorrubicina en cáncer de mama a través de la inhibición de la autofagia mediante la interacción con HMGB1 (Liang et al., 2020). Otro estudio muestra el papel de miR-142-3p en la regulación de procesos como el crecimiento celular, la migración e invasión y la metástasis, a través de la regulación de RAC1, provocando la activación de la vía de señalización de PAK1 (Xu et al.,

2020). Por otro lado, miR-139-5p también participa en la regulación de múltiples procesos en otros tipos de cáncer. Se ha encontrado que miR-139-5p juega un papel importante en la progresión del Cáncer de Cervix mediante la regulación de la vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -Catenina a través de la regulación de TCF4 (Ji et al., 2019). Se ha sugerido que miR-139-5p participa como un supresor de tumor inhibiendo la invasión y migración en células de glioblastoma mediante la regulación de ZEB1 y ZEB2 (Yue et al., 2015). Sin embargo, aún es necesario profundizar en los mecanismos de regulación de los miRNAs para determinar su posible participación en TNBC (Sabit et al., 2021).

Las discordancias entre los datos obtenidos de manera experimental y los obtenidos mediante al análisis *in silico* podrían asociarse a la alta heterogeneidad entre subtipos de TNBC, reportada previamente (Bareche et al., 2018). En la misma línea, se han identificado factores que podrían influir en los patrones de expresión tanto de un tumor primario, como de una línea celular, como la pureza de las muestras obtenidas de tumores, o las condiciones de cultivo de una línea celular (Yu et al., 2019). La presencia de infiltrados de células inmunes en muestras de tumores primarios influye en la variación de la expresión de genes asociados en procesos inmunes. Se ha sugerido que los niveles de expresión de miR-142-3p en muestras de pacientes de TNBC están asociados a la presencia de infiltrados de células inmunes (Volinia et al., 2012), lo que permite suponer que la expresión reportada en el set de datos procede de infiltrados de células inmunes, que no están presentes en los cultivos celulares. Adicionalmente, se han encontrado variaciones en las tasas de mutación entre muestras de tumores y líneas celulares derivadas de cáncer

de mama, así como diferencias en la expresión de algunas proteínas (Jiang et al., 2016).

Nuestros resultados sugieren que los posibles sitios de interacción de miR-142-3p y miR-139-5p se ubican en regiones de doble cadena en la estructura secundaria de los mRNAs de sus respectivos blancos, a excepción del mRNA de BRCA2. Reportes previos sugieren que la forma de unión del miRNA con su blanco puede disminuir la eficiencia de la interacción, adicionalmente, se ha sugerido que la conformación estructural de un mRNA influye directamente en la capacidad de interacción del complejo RISC (Becker et al., 2019).

## **Conclusiones**

Los microRNAs miR-139-5p y miR-142-3p no participan en la regulación de genes involucrados en los mecanismos de DDR en líneas celulares derivadas de TNBC.

## **Perspectivas**

En estudios subsecuentes se propone identificar nuevos miRNAs involucrados en la regulación de los mecanismos de DDR. Además, se sugiere verificar la participación de miRNAs, como miR-185, en la regulación de más de un gen asociado a los mecanismos de DDR. Finalmente, proponemos profundizar en el mecanismo de regulación de los ncRNAs en los mecanismos de DDR en TNBC.

## Literatura citada

- Adams, B. D., Kasinski, A. L., & Slack, F. J. (2014). Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Current Biology*, 24(16), R762–R776.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.043>
- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Cell*, 124(2), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.031>
- Alkam, Y., Mitomi, H., Nakai, K., Himuro, T., Saito, T., Takahashi, M., Arakawa, A., Yao, T., & Saito, M. (2013). Protein expression and methylation of DNA repair genes hMLH1, hMSH2, MGMT and BRCA1 and their correlation with clinicopathological parameters and prognosis in basal-like breast cancer. *Histopathology*, 63(5), n/a-n/a.  
<https://doi.org/10.1111/his.12220>
- Alshareeda, A. T., Negm, O. H., Albarakati, N., Green, A. R., Nolan, C., Sultana, R., Madhusudan, S., benHasouna, A., Tighe, P., Ellis, I. O., & Rakha, E. A. (2013). Clinicopathological significance of KU70/KU80, a key DNA damage repair protein in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(2), 301–310.  
<https://doi.org/10.1007/s10549-013-2542-x>
- Aranza-Martínez, A., Sánchez-Pérez, J., Brito-Elias, L., López-Camarillo, C., Cantú de León, D., Pérez-Plasencia, C., & López-Urrutia, E. (2021). Non-Coding RNAs Associated With Radioresistance in Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.752270>
- Asiaf, A., Ahmad, S. T., Malik, A. A., Aziz, S. A., Rasool, Z., Masood, A., & Zargar, M. A. (2015). Protein expression and methylation of MGMT, a DNA repair gene and their

correlation with clinicopathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumor Biology*, 36(8), 6485–6496. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3339-9>

Bareche, Y., Venet, D., Ignatiadis, M., Aftimos, P., Piccart, M., Rothe, F., & Sotiriou, C. (2018). Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(4), 895–902. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy024>

Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84, 106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>

Becker, W. R., Ober-Reynolds, B., Jouravleva, K., Jolly, S. M., Zamore, P. D., & Greenleaf, W. J. (2019). High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2. *Molecular Cell*, 75(4), 741-755.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.012>

Belli, C., Duso, B. A., Ferraro, E., & Curigliano, G. (2019). Homologous recombination deficiency in triple negative breast cancer. *The Breast*, 45, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.02.007>

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society:*

*Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 619–631. <https://doi.org/10.1038/nrg2380>

Carusillo, A., & Mussolino, C. (2020). DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells*, 9(7), 1665. <https://doi.org/10.3390/cells9071665>

Cascione, L., Gasparini, P., Lovat, F., Carasi, S., Pulvirenti, A., Ferro, A., Alder, H., He, G., Vecchione, A., Croce, C. M., Shapiro, C. L., & Huebner, K. (2013). Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PloS One*, 8(2), e55910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055910>

Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>

Chatterjee, S., & Ahituv, N. (2017). Gene Regulatory Elements, Major Drivers of Human Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 18(1), 45–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035537>

Fumagalli, C., Pruneri, G., Possanzini, P., Manzotti, M., Barile, M., Feroce, I., Colleoni, M., Bonanni, B., Maisonneuve, P., Radice, P., Viale, G., & Barberis, M. (2012). Methylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter gene in triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 134(1), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1945-9>

- Goedhart, J., & Luijsterburg, M. S. (2020). VolcaNoseR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Scientific Reports*, *10*(1), 20560. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76603-3>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hassan. (2010). Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncology Reports*, *24*(5). [https://doi.org/10.3892/or\\_00000963](https://doi.org/10.3892/or_00000963)
- Hausmann, J., Corradini, S., Nestle-Kraemling, C., Bölke, E., Njanang, F. J. D., Tamaskovics, B., Orth, K., Ruckhaeberle, E., Fehm, T., Mohrmann, S., Simiantonakis, I., Budach, W., & Matuschek, C. (2020). Recent advances in radiotherapy of breast cancer. *Radiation Oncology*, *15*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13014-020-01501-x>
- Hombach, S., & Kretz, M. (2016). *Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning* (pp. 3–17). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1)
- Iwakawa, H., & Tomari, Y. (2022). Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular Cell*, *82*(1), 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.026>

- Ji, X., Guo, H., Yin, S., & Du, H. (2019). miR-139-5p functions as a tumor suppressor in cervical cancer by targeting TCF4 and inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *OncoTargets and Therapy*, 12, 7739–7748. <https://doi.org/10.2147/OTT.S215796>
- Jiang, G., Zhang, S., Yazdanparast, A., Li, M., Pawar, A. V., Liu, Y., Inavolu, S. M., & Cheng, L. (2016). Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. *BMC Genomics*, 17(S7), 525. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2911-z>
- Jin, J., Tao, Z., Cao, J., Li, T., & Hu, X. (2021). DNA damage response inhibitors: An avenue for TNBC treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1875(2), 188521. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188521>
- Khalili, N., Nouri-Vaskeh, M., Hasanpour Segherlou, Z., Baghbanzadeh, A., Halimi, M., Rezaee, H., & Baradaran, B. (2020). Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of miR-139-5p in cancers. *Life Sciences*, 256, 117865. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117865>
- Kondetimmerahalli, R., Gharpure, K. M., Wu, S. Y., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2018). Noncoding RNAs. In *Cancer and Noncoding RNAs* (pp. 447–459). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811022-5.00024-3>
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., NTOUNIS, T., & FASOULAKIS, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
- Krishnan, K., Steptoe, A. L., Martin, H. C., Pattabiraman, D. R., Nones, K., Waddell, N., Mariasegaram, M., Simpson, P. T., Lakhani, S. R., Vlassov, A., Grimmond, S. M., &



- Cloonan, N. (2013). miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer. *RNA*, *19*(12), 1767–1780. <https://doi.org/10.1261/rna.042143.113>
- Krokan, H. E., & Bjoras, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), a012583–a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, *15*(2), R29. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Lee, Y.-Y., Yarmishyn, A. A., Wang, M.-L., Chen, H.-Y., Chiou, S.-H., Yang, Y.-P., Lin, C.-F., Huang, P.-I., Chen, Y.-W., Ma, H.-I., & Chen, M.-T. (2018). MicroRNA-142-3p is involved in regulation of MGMT expression in glioblastoma cells. *Cancer Management and Research*, *10*, 775–785. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S157261>
- Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietersen, J. A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLOS ONE*, *11*(6), e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>
- Liang, L., Fu, J., Wang, S., Cen, H., Zhang, L., Mandukhail, S. R., Du, L., Wu, Q., Zhang, P., & Yu, X. (2020). MiR-142-3p enhances chemosensitivity of breast cancer cells and inhibits autophagy by targeting HMGB1. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *10*(6), 1036–1046. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.11.009>
- Lin, J., Liu, C., Gao, F., Mitchel, R. E. J., Zhao, L., Yang, Y., Lei, J., & Cai, J. (2013). miR-200c enhances radiosensitivity of human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *114*(3), 606–615. <https://doi.org/10.1002/jcb.24398>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loibl, S., & Gianni, L. (2017). HER2-positive breast cancer. *The Lancet*, 389(10087), 2415–2429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5)
- Magnoni, F., Alessandrini, S., Alberti, L., Polizzi, A., Rotili, A., Veronesi, P., & Corso, G. (2021). Breast Cancer Surgery: New Issues. *Current Oncology*, 28(5), 4053–4066. <https://doi.org/10.3390/curroncol28050344>
- Manjunath, M., & Choudhary, B. (2021). Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies (Review). *Oncology Letters*, 22(1), 512. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12773>
- Mann, M., Wright, P. R., & Backofen, R. (2017). IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W435–W439. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx279>
- Mansoori, B., Duijf, P. H. G., Mohammadi, A., Safarzadeh, E., Ditzel, H. J., Gjerstorff, M. F., Cho, W. C.-S., & Baradaran, B. (2021). MiR-142-3p targets HMGA2 and suppresses breast cancer malignancy. *Life Sciences*, 276, 119431. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119431>
- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, 15(suppl\_1), R17–R29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
- Mazin, A. V., Alexeev, A. A., & Kowalczykowski, S. C. (2003). A Novel Function of Rad54 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14029–14036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212779200>

- Nedeljković, M., & Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. *Cells*, *8*(9), 957. <https://doi.org/10.3390/cells8090957>
- Nenclares, P., & Harrington, K. J. (2020). The biology of cancer. *Medicine*, *48*(2), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001>
- Ni, K., Huang, Z., Zhu, Y., Xue, D., Jin, Q., Zhang, C., & Gu, C. (2021). The lncRNA ADAMTS9-AS2 Regulates RPL22 to Modulate TNBC Progression via Controlling the TGF- $\beta$  Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.654472>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Pajic, M., Froio, D., Daly, S., Doculara, L., Millar, E., Graham, P. H., Drury, A., Steinmann, A., de Bock, C. E., Boulghourjian, A., Zaratzian, A., Carroll, S., Toohey, J., O'Toole, S. A., Harris, A. L., Buffa, F. M., Gee, H. E., Hollway, G. E., & Molloy, T. J. (2018). miR-139-5p Modulates Radiotherapy Resistance in Breast Cancer by Repressing Multiple Gene Networks of DNA Repair and ROS Defense. *Cancer Research*, *78*(2), 501–515. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3105>
- Pan, J.-K., Lin, C.-H., Kuo, Y.-L., Ger, L.-P., Cheng, H.-C., Yao, Y.-C., Hsiao, M., & Lu, P.-J. (2021). MiR-211 determines brain metastasis specificity through SOX11/NGN2 axis in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, *40*(9), 1737–1751. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01654-3>

- Pannunzio, N. R., Watanabe, G., & Lieber, M. R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10512–10523. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>
- Pegg, A. E. (2000). Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(2–3), 83–100. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00017-X)
- Provenzano, E., Ulaner, G. A., & Chin, S.-F. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics*, 13(3), 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>
- Ribeiro, E., Ganzinelli, M., Andreis, D., Bertoni, R., Giardini, R., Fox, S. B., Brogini, M., Bottini, A., Zanoni, V., Bazzola, L., Foroni, C., Generali, D., & Damia, G. (2013). Triple Negative Breast Cancers Have a Reduced Expression of DNA Repair Genes. *PLoS ONE*, 8(6), e66243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066243>
- Sabit, H., Cevik, E., Tombuloglu, H., Abdel-Ghany, S., Tombuloglu, G., & Esteller, M. (2021). Triple negative breast cancer in the era of miRNA. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103196. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103196>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Satyananda, V., Oshi, M., Endo, I., & Takabe, K. (2021). High BRCA2 Gene Expression is Associated with Aggressive and Highly Proliferative Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 28(12), 7356–7365. <https://doi.org/10.1245/s10434-021-10063-5>

- Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>
- Shaath, H., Vishnubalaji, R., Elango, R., Khattak, S., & Alajez, N. M. (2021). Single-cell long noncoding RNA (lncRNA) transcriptome implicates MALAT1 in triple-negative breast cancer (TNBC) resistance to neoadjuvant chemotherapy. *Cell Death Discovery*, 7(1), 23. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00383-y>
- Shaw, A., & Gullerova, M. (2021). Home and Away: The Role of Non-Coding RNA in Intracellular and Intercellular DNA Damage Response. *Genes*, 12(10), 1475. <https://doi.org/10.3390/genes12101475>
- Singh, D. D., & Yadav, D. K. (2021). TNBC: Potential Targeting of Multiple Receptors for a Therapeutic Breakthrough, Nanomedicine, and Immunotherapy. *Biomedicines*, 9(8), 876. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080876>
- Smyth, G. K. (2005). limma: Linear Models for Microarray Data. In R. Gentleman, V. J. Carey, W. Huber, R. A. Irizarry, & S. Dudoit (Eds.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* (pp. 397–420). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0\\_23](https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0_23)
- Song, C., Liu, L.-Z., Pei, X.-Q., Liu, X., Yang, L., Ye, F., Xie, X., Chen, J., Tang, H., & Xie, X. (2015). miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. *Oncotarget*, 6(33), 34968–34978. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5198>
- Spivak, G. (2015). Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair*, 36, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.003>

- Spivak, G., & Ganesan, A. K. (2014). The complex choreography of transcription-coupled repair. *DNA Repair*, 19, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.025>
- Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., & Hajduch, M. (2018). Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 18(5), e841–e850. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.023>
- Stadler, J., & Richly, H. (2017). Regulation of DNA Repair Mechanisms: How the Chromatin Environment Regulates the DNA Damage Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1715. <https://doi.org/10.3390/ijms18081715>
- Sugasawa, K., Ng, J. M. Y., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P. M., Hanaoka, F., Bootsma, D., & Hoeijmakers, J. H. J. (1998). Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Molecular Cell*, 2(2), 223–232. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80132-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80132-X)
- Sun, H., Dai, J., Chen, M., Chen, Q., Xie, Q., Zhang, W., Li, G., & Yan, M. (2022). miR-139-5p Was Identified as Biomarker of Different Molecular Subtypes of Breast Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.857714>
- Sun, Y., McCorvie, T. J., Yates, L. A., & Zhang, X. (2020). Structural basis of homologous recombination. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(1), 3–18. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03365-1>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

- Suo, H., Tao, Z., Zhang, L., Jin, Z., Li, X., Ma, W., Wang, Z., Qiu, Y., Jin, F., Chen, B., & Cao, Y. (2020). Coexpression Network Analysis of Genes Related to the Characteristics of Tumor Stemness in Triple-Negative Breast Cancer. *BioMed Research International*, 2020, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2020/7575862>
- Tang, H., Liu, P., Yang, L., Xie, X., Ye, F., Wu, M., Liu, X., Chen, B., Zhang, L., & Xie, X. (2014). miR-185 suppresses tumor proliferation by directly targeting E2F6 and DNMT1 and indirectly upregulating BRCA1 in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(12), 3185–3197. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0243>
- Tao, J. J., Visvanathan, K., & Wolff, A. C. (2015). Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *The Breast*, 24, S149–S153. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.035>
- Thakur, K. K., Kumar, A., Banik, K., Verma, E., Khatoon, E., Harsha, C., Sethi, G., Gupta, S. C., & Kunnumakkara, A. B. (2021). Long noncoding RNAs in triple-negative breast cancer: A new frontier in the regulation of tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 236(12), 7938–7965. <https://doi.org/10.1002/jcp.30463>
- The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Troschel, F. M., Böhly, N., Borrmann, K., Braun, T., Schwickert, A., Kiesel, L., Eich, H. T., Götte, M., & Greve, B. (2018). miR-142-3p attenuates breast cancer stem cell characteristics and decreases radioresistance in vitro. *Tumor Biology*, 40(8), 101042831879188. <https://doi.org/10.1177/1010428318791887>

- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35.  
<https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- Vagia, E., Mahalingam, D., & Cristofanilli, M. (2020). The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers*, 12(4), 916. <https://doi.org/10.3390/cancers12040916>
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Volinia, S., Galasso, M., Sana, M. E., Wise, T. F., Palatini, J., Huebner, K., & Croce, C. M. (2012). Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8), 3024–3029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200010109>
- Volovat, S. R., Volovat, C., Hordila, I., Hordila, D.-A., Mirestean, C. C., Miron, O. T., Lungulescu, C., Scripcariu, D. V., Stolniceanu, C. R., Konsoulova-Kirova, A. A., Grigorescu, C., Stefanescu, C., Volovat, C. C., & Augustin, I. (2020). MiRNA and LncRNA as Potential Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer: A Review. *Frontiers in Oncology*, 10, 526850. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.526850>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wang, J., He, J., Su, F., Ding, N., Hu, W., Yao, B., Wang, W., & Zhou, G. (2013). Repression of ATR pathway by miR-185 enhances radiation-induced apoptosis and proliferation inhibition. *Cell Death & Disease*, 4(6), e699. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.227>



- Wang, L., Liu, D., Wu, X., Zeng, Y., Li, L., Hou, Y., Li, W., & Liu, Z. (2018). Long non-coding RNA (LncRNA) RMST in triple-negative breast cancer (TNBC): Expression analysis and biological roles research. *Journal of Cellular Physiology*, 233(10), 6603–6612. <https://doi.org/10.1002/jcp.26311>
- Wang, L., Zhou, Y., Jiang, L., Lu, L., Dai, T., Li, A., Chen, Y., & Zhang, L. (2021). CircWAC induces chemotherapeutic resistance in triple-negative breast cancer by targeting miR-142, upregulating WWP1 and activating the PI3K/AKT pathway. *Molecular Cancer*, 20(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01332-8>
- Wang, S.-M., Pang, J., Zhang, K.-J., Zhou, Z.-Y., & Chen, F.-Y. (2021). lncRNA MIR503HG inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in TNBC cells via the miR-224-5p/HOXA9 axis. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 21, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.03.009>
- Wright, W. D., Shah, S. S., & Heyer, W.-D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10524–10535. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>
- Xu, T., He, B., Pan, B., Pan, Y., Sun, H., Liu, X., Xu, X., Chen, X., Zeng, K., Xu, M., & Wang, S. (2020). MiR-142-3p functions as a tumor suppressor by targeting RAC1/PAK1 pathway in breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4928–4940. <https://doi.org/10.1002/jcp.29372>
- Yip, C.-H., & Rhodes, A. (2014). Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncology*, 10(14), 2293–2301. <https://doi.org/10.2217/fon.14.110>
- Yu, K., Chen, B., Aran, D., Charalel, J., Yau, C., Wolf, D. M., van 't Veer, L. J., Butte, A. J., Goldstein, T., & Sirota, M. (2019). Comprehensive transcriptomic analysis of cell lines

as models of primary tumors across 22 tumor types. *Nature Communications*, 10(1), 3574. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11415-2>

Yue, S., Wang, L., Zhang, H., Min, Y., Lou, Y., Sun, H., Jiang, Y., Zhang, W., Liang, A., Guo, Y., Chen, P., Lv, G., Wang, L., Zong, Q., & Li, Y. (2015). miR-139-5p suppresses cancer cell migration and invasion through targeting ZEB1 and ZEB2 in GBM. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(9), 6741–6749. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3372-8>

Zhang, C., & Peng, G. (2015). Non-coding RNAs: An emerging player in DNA damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 763, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.11.003>

Zhang, J., Du, C., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, J. (2021). lncRNA GSEC Promotes the Progression of Triple Negative Breast Cancer (TNBC) by Targeting the miR-202-5p/AXL Axis. *OncoTargets and Therapy*, Volume 14, 2747–2759. <https://doi.org/10.2147/OTT.S293832>

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>