



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

EFFECTO DEL LNCRNA ANRIL SOBRE LA REPARACIÓN DE DNA EN LÍNEAS
CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. LUIS ABERTO BRITO ELIAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Roberto Eduardo López Urrutia
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Martha Martínez García
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México

Marzo, 2024



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL LNCRNA ANRIL SOBRE LA REPARACIÓN DE DNA EN LÍNEAS
CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. LUIS ABERTO BRITO ELIAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Roberto Eduardo López Urrutia
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Martha Martínez García
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México

Marzo, 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
OFICIO: CGEP/CPCB/ FESI /0103/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **09 de octubre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **BRITO ELIAS LUIS ALBERTO** con número de cuenta **415129196** con la tesis titulada **“Efecto del lncRNA ANRIL sobre la reparación de DNA en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo”**, realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO EDUARDO LÓPEZ URRUTIA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ GÓMEZ
Vocal: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
Vocal: DRA. CLAUDIA FABIOLA MÉNDEZ CATALÁ
Vocal: DR. CRISTIAN GABRIEL OLIVERIO ARRIAGA CANON
Secretario: DR. PEDRO ULISES GUADALUPE OSTOA SALOMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 31 de enero de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/GGM/EARR/ggm



Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo y evolución en el ámbito académico y profesional.

Al CONAHCyT por la beca otorgada CVU: 1101382 y al PAPIIT (Proyecto: IA204620) con el cual nos permitieron desarrollar este proyecto.

A mi tutor, Dr. Eduardo López Urrutia y miembros del comité tutor, Dra. Martha Martínez García y al Dr. Pedro Ulises Osto Saloma.

Agradecimiento a título personal

A mi madre Claudia Ivonne por el increíble apoyo y amor que me ha brindado en esta nueva etapa de mi desarrollo académico, por los consejos y mensajes alentadores que ayudaron a fortalecer habilidades que creía haber perdido y especialmente porque nunca dejaste de confiar en mi, lo que me motivó a seguir adelante en este nuevo mar de aventuras.

A mi familia: Elvira, Laura, Esteban, Frida, Santiago, Elizabeth, Guadalupe, Betsabé, Ximena y Gael, por todo el ánimo que me transmitieron para mejorar como persona y por su apoyo en los momentos más complicados de mi vida.

Al Dr. Carlos Pérez Plasencia por permitirme formar parte del grupo de investigación y por el conocimiento que me brindó para mejorar tanto académica como profesionalmente.

Al Dr. Eduardo López Urrutia por sus consejos, conocimientos, enseñanzas, experiencia, entusiasmo por la ciencia y soporte que aportaron a mi desarrollo académico.

A la Dra. Martha Martínez García y al Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma por sus amplios conocimientos y experiencia que contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Verónica García por la magnífica experiencia que tiene en cultivo celular que ayudaron al progreso del proyecto, por enseñarme a cultivar células y por los consejos que me proporcionaste para el desarrollo profesional.

A los miembros del jurado: Dr. Alfredo de Jesús Rodríguez Gómez, Dra. Gisela Ceballos Cancino, Dra. Claudia Fabiola Méndez Catalá, Dr. Cristián Gabriel Oliverio Arriaga Canon y Dr. Pedro Ulises Guadalupe Ostoa Saloma por su valiosa aportación en las correcciones y sugerencias para mejorar mi tesis.

A mis queridos amigos Gino, Aldo, Jorge y Belem por su increíble amistad, consejos y apoyo en esta nueva etapa de mi vida, por sus múltiples pláticas que me fortalecían para tomar mejores decisiones en este camino tortuoso.

A mis amigos del L11 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) Héctor, José Carlos, Lil, Julio y Alberto por las conversaciones, reflexiones, conocimientos y aprendizaje que me ayudaron a mejorar como persona y por su paciencia para esperarme mientras acababa mis experimentos.

A nuestro grupo de investigación en el INCAN “Genómica Funcional”, David Marin, Jossimar, Sam, Eloy, Carlos, Oliver e Iza por todo el apoyo y observaciones que ayudaron a mejorar el proyecto.

Dedicatoria

A mi mamá Claudia Ivonne y mi abuela Elvira por ser las cuerdas que hacen vibrar mis emociones en infinitos patrones y por el amor que me han ofrecido.

Índice

Resumen-----	1
Abstract -----	2
Introducción-----	3
▶ Cáncer y Hallmarks-----	3
● Cáncer de mama -----	4
● Cáncer de mama triple negativo-----	5
● Tratamiento para TNBC -----	6
● Resistencia a estrategias terapéuticas -----	8
▶ Reparación de DNA en cáncer -----	9
● Reparación por escisión de bases -----	9
● Reparación por apareamiento erróneo -----	10
● Reparación por escisión de nucleótido-----	10
● Reparación por unión de extremos no homólogos-----	11
● Reparación por recombinación homóloga -----	12
● Reparación por alineamiento de cadena sencilla y Unión de extremos alternativos -----	12
▶ Los ncRNAs regulan la reparación de DNA en cáncer-----	14
● RNAs no codificantes como elementos reguladores -----	14
● Función de lncRNAs-----	16
● LncRNAs y asociación con el cáncer -----	17
▶ Long non coding RNA ANRIL -----	19
● ANRIL y cáncer-----	21
● Asociación del lncRNA ANRIL y TNBC -----	22
● ANRIL y la reparación por recombinación homóloga en cáncer -----	22
Hipótesis-----	24
Objetivos -----	24
Metodología-----	25

▶ Cultivo celular -----	25
▶ Plásmidos -----	25
▶ Transfecciones -----	25
▶ Aislamiento de RNA, transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) -----	26
▶ Ensayo de recombinación homóloga mediante luciferasa -----	28
▶ Análisis Estadísticos -----	30
Resultados -----	31
▶ Expresión del lncRNA ANRIL en BT-20, MDA-MB-231 y MCF10A -----	31
▶ Manipulación de la expresión de ANRIL en MDA-MB-231 y BT-20 -----	32
▶ Diseño del sistema reportero de recombinación homóloga R-LuxHR -----	33
▶ Construcción del sistema reportero de recombinación homóloga R-LuxHR -----	35
● Vector pLuc Δ 3ORF -----	35
● Vector pLuc Δ 5ORF -----	41
● Vector ISceI-GR-RFP -----	42
▶ Tasa de reparación por HR en MDA-MB-231 y BT-20 con expresión basal y diferencial de ANRIL -----	43
Discusión -----	45
Conclusión -----	50
Perspectivas -----	50
Referencias bibliográficas -----	51
Anexo -----	66
▶ 1. Primers de ANRIL en BT-20 y MDA-MB-231 -----	66
▶ 2. Predicción de interacción ANRIL-miRNAs -----	67
▶ 3. Predicción de interacción ANRIL-Proteína -----	67
▶ 4. Valores de luminiscencia obtenidos en los experimentos de reparación por recombinación homóloga -----	69
● MDA-MB-231 -----	69
● BT-20 -----	70

Índice de figuras

Figura 1. <i>Hallmarks</i> del cáncer	3
Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial	4
Figura 3. Disposición de la subclasificación de TNBC	5
Figura 4. Opciones de tratamiento en TNBC temprano y metastásico	6
Figura 5. Mecanismos de reparación del DNA	11
Figura 6. Mecanismos de reparación de doble cadena de DNA	13
Figura 7. Regulación de procesos biológicos por lncRNAs	15
Figura 8. Clasificación de lncRNAs	16
Figura 9. Función de lncRNAs	17
Figura 10. LncRNAs y asociación con <i>hallmarks</i> del cáncer	18
Figura 11. Cluster <i>p15/CDKN2B-p16/CDKN2A-p14/ARF-ANRIL</i>	19
Figura 12. Isoformas lineares y circulares de <i>ANRIL</i>	20
Figura 13. Funciones de <i>ANRIL</i> en cáncer	21
Figura 14. Condiciones de RT-PCR para la síntesis de cDNA	27
Figura 15. Condiciones de qPCR para medir la expresión de <i>ANRIL/ACTINA</i>	27
Figura 16. Condiciones de PCR para amplificar <i>ANRIL</i> y <i>ACTINA</i>	28
Figura 17. Condiciones de PCR para la amplificación del <i>g-Block</i> (528 pb)	29
Figura 18. Expresión basal de <i>ANRIL</i> en TNBC	31
Figura 19. Manipulación en la expresión de <i>ANRIL</i>	32
Figura 20. Sistema reportero de recombinación homóloga R-LuxHR	34
Figura 21. pMIR-report	35
Figura 22. Secuencia <i>Linker</i>	36
Figura 23. pMIR- Δ EcoRV	37

Figura 24. pMIR- Δ EcoRV	37
Figura 25. <i>g-Block</i>	38
Figura 26. Secuencia <i>g-Block-XE</i>	39
Figura 27. pLuc Δ 3ORF	40
Figura 28. pLuc Δ 5ORF	41
Figura 29. ISceI-GR-RFP	42
Figura 30. Tasa de reparación por recombinación homóloga en TNBC	44
Figura A1. BLAST de <i>primers</i> Fw/Rv de <i>ANRIL</i> .	66
Figura A2. Especificidad de <i>primers</i> de <i>ANRIL</i> en BT-20 y MDA-MB-231	66
Figura A3 Predicción de interacción ANRIL-proteína	68

Resumen

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) presenta el peor pronóstico respecto a subtipos luminales y se caracteriza por la expresión negativa de los receptores hormonales para estrógenos, progesterona y HER2 lo cual dificulta la implementación de una terapia dirigida. A pesar de esta limitante, es común el uso de quimioterapia, cirugía y radioterapia para mejorar el pronóstico de las pacientes, sin embargo, no todos responden a este tipo de tratamientos debido a mecanismos de resistencia como la reparación de DNA que disminuyen la eficacia terapéutica. Dentro de los mecanismos de reparación, la recombinación homóloga es uno de los mecanismos de resistencia en cáncer, la activación de este tipo de reparación disminuye la efectividad de tratamientos quimioterapéuticos y de radioterapia. Este sistema de reparación de doble cadena puede ser regulado por la expresión de RNAs largos no codificantes (lncRNAs), moléculas de RNA de cadena sencilla incapaces de traducir proteínas y que pueden generar interacciones complejas. En cáncer existe un perfil aberrante en la expresión de lncRNAs que favorecen el desarrollo y progresión de la enfermedad. Un lncRNA con gran potencial de estudio es el lncRNA *ANRIL* sobreexpresado en diversos tipos de cáncer en los que regula el mecanismo de reparación por recombinación homóloga como osteosarcoma y cáncer de pulmón. A pesar de la sobreexpresión de *ANRIL* en TNBC, actualmente no existen estudios que describan la participación de *ANRIL* sobre la regulación de la reparación por recombinación homóloga por lo cual en este proyecto evaluamos la relación de la expresión de *ANRIL* y la activación de la reparación por recombinación homóloga en TNBC. Se evaluó la expresión basal de *ANRIL* en dos líneas de TNBC: MDA-MB-231 y BT-20, posteriormente se manipuló la expresión de *ANRIL*, aumentando la expresión en MDA-MB-231 y disminuyéndola en BT-20. Para medir la reparación por recombinación homóloga en ambas líneas de TNBC se diseñó y construyó un sistema reportero de recombinación homóloga basado en la expresión de la luciferasa, denominado "**R-LuxHR**". Ambas líneas de TNBC mostraron la sobreexpresión del lncRNA respecto a la línea no tumoral MCF10A. La transfección de pcDNA_3.1+ANRIL y shRNAs aumentaron y disminuyeron la expresión de *ANRIL* en MDA-MB-231 y BT-20 respectivamente. En los ensayos de reparación, la transfección de **R-LuxHR** en MDA-MB-231 y BT-20 con expresión basal de *ANRIL* mostró que BT-20 tiene una mayor activación en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga respecto a MDA-MB-231. La cotransfección de **R-LuxHR** en MDA-MB-231 con el aumento de expresión de *ANRIL* y en BT-20 con la disminución de la expresión del lncRNA, aumenta y disminuye respectivamente, la tasa de reparación por recombinación homóloga en TNBC. La expresión del lncRNA *ANRIL* podría modular la reparación por recombinación homóloga en líneas celulares derivadas de TNBC.

Abstract

Triple negative breast cancer (TNBC) has the worst prognosis compared to luminal subtypes and is characterized by the absence of hormonal receptors to estrogen, progesterone and HER2, which limits the implementation of targeted therapies. Despite this limitation, chemotherapy, surgery and radiotherapy are commonly used to improve the prognosis of patients. However, not everyone responds to these treatments due to resistance mechanisms that decrease therapeutic efficiency. DNA repair through homologous recombination is a mechanism of resistance in cancer, the activation of this kind of repair decreases the efficiency of chemotherapy and radiotherapy. This double strand DNA repair mechanism can be regulated by long non coding RNAs (lncRNAs), single strand RNA molecules that do not encode proteins generating complex interactions. Cancer has lncRNA aberrant expression profiles that improve disease development and progression. A lncRNA with promising potential is *ANRIL*, it is upregulated in many types of cancer and regulates the homologous recombination repair in osteosarcoma and lung cancer. Despite reported *ANRIL* upregulation in TNBC, at the moment there are no studies describing *ANRIL*'s function over homologous recombination repair regulation in this type of cancer. In this project we evaluated *ANRIL* expression and its relationship to homologous recombination repair activation in TNBC. *ANRIL* basal expression was evaluated in two TNBC cell lines: MDA-MB-231 and BT-20. Subsequently *ANRIL* expression was manipulated, over-expressing it in MDA-MB-231 cells and decreasing it in BT-20 cells. To measure homologous recombination repair in both TNBC cell lines, an homologous recombination reporter system based in luciferase expression gene called "**R-LuxHR**" was designed and constructed. Both TNBC cell lines showed *ANRIL* upregulation compared to MCF10A. The pcDNA_3.1+*ANRIL* and shRNAs transfection overexpressed and decreased *ANRIL* expression in MDA-MB-231 and BT-20 respectively. In the DNA repair assays, **R-LuxHR** transfection in MDA-MB-231 and BT-20 with basal *ANRIL* expression showed that BT-20 cells had a higher homologous recombination repair activation than in MDA-MB-231. The **R-LuxHR** cotransfection with increased *ANRIL* expression in MDA-MB-231 and with decreased *ANRIL* expression in BT-20 increased and decreased the homologous recombination rate in each TNBC-derived line, respectively. The lncRNA *ANRIL* expression could modulate homologous recombination repair in TNBC-derived cell lines.

Introducción

► Cáncer y *Hallmarks*

El cáncer es una enfermedad genética multifactorial (Hanahan & Weinberg 2011) caracterizada por la proliferación celular descontrolada (Spiegel, 2007) que es desencadenada por alteraciones genéticas y epigenéticas que dan como resultado la inactivación de genes supresores tumorales que favorecen la activación de oncogenes, afectando la homeostasis celular para promover el desarrollo y progresión de la enfermedad (Vogelstein & Kinzler, 2004; Hanahan & Weinberg 2011).

Las células cancerosas se caracterizan por diversos “*hallmarks*” que le confieren la capacidad de generar y desarrollar un tumor maligno. Entre esas características se encuentran: mantener la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, evasión de la destrucción inmune, inmortalidad replicativa, promoción de inflamación tumoral, invasión y metástasis, inducción de la vasculatura, inestabilidad genómica y mutaciones, resistencia a la muerte celular, desregulación del metabolismo, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos, desbloqueo de la plasticidad fenotípica y senescencia celular (Fig.1) (Hanahan, 2022).

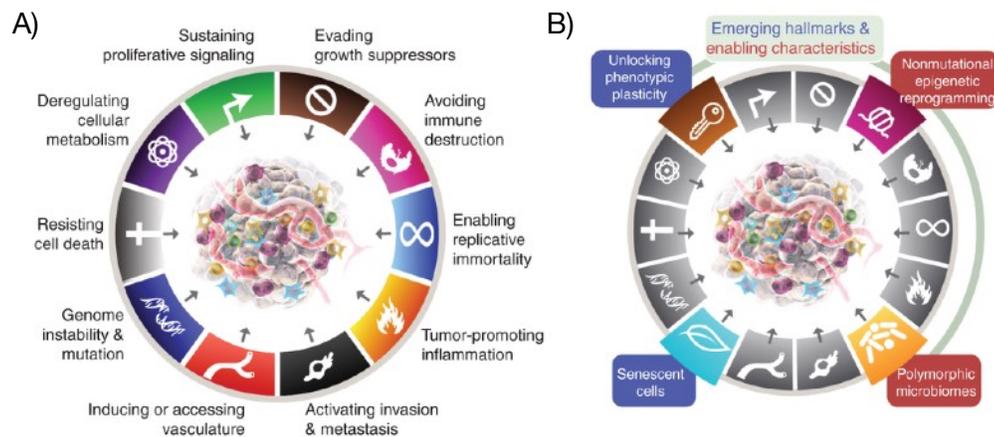


Figura 1. *Hallmarks* del cáncer. A) Características de las células tumorales: Evasión de supresores de crecimiento (*Evading growth suppressors*), Evasión de la destrucción inmune (*Avoiding immune destruction*), Habilidad de la inmortalidad replicativa (*Enabling replicative immortality*), Promoción de inflamación tumoral (*Tumor-promoting inflammation*), Activación de invasión y metástasis (*Activating invasion and metastasis*), Inducción o acceso de vasculatura (*Inducing or accessing vasculature*), Inestabilidad genómica y mutaciones (*Genome instability and mutation*), Resistencia a la muerte celular (*Resisting cell death*), Desregulación del metabolismo celular (*Deregulating cellular metabolism*) y Mantenimiento de la señalización proliferativa (*Sustaining proliferative signaling*) B) *Hallmarks* emergentes: Desbloqueo de la plasticidad fenotípica (*Unlocking phenotypic plasticity*) y Células senescentes (*Senescent cells*). Características habilitadas: Reprogramación epigenética no mutacional (*Nonmutational epigenetic reprogramming*) y Microbiomas polimórficos (*Polymorphic microbiomes*) (Hanahan, 2022).

● Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea multifactorial asociada a factores genéticos y no genéticos que facilitan la proliferación de las células y el desarrollo neoplásico (Bianchini et al., 2016; Meyer et al 2020). El avance de la enfermedad comienza en las células epiteliales (basales o luminales) de los ductos lobulares de la mama (Perou et al., 2000). Actualmente, el cáncer de mama es la enfermedad con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial en mujeres seguido del cáncer de colon, pulmón, cérvix, tiroides, estómago, ovario, hígado y linfoma no Hodgkin (Fig. 2) (Sung et al., 2021).

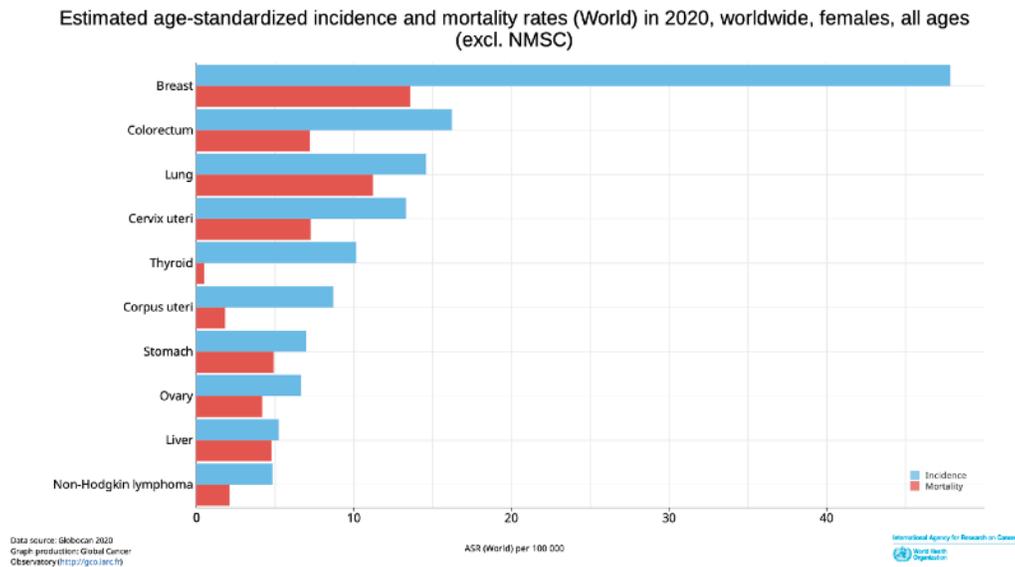


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial. Cáncer de mama como la principal enfermedad con los valores más altos de incidencia y mortandad en mujeres respecto al cáncer de colon, pulmón, cérvix, tiroides, endometrial, estómago, ovario, hígado y linfoma No-Hodgkin (Sung et al., 2021).

Aproximadamente el 10% de los diversos tipos de cáncer de mama se deben a causas genéticas o relacionadas con la historia familiar. Las mutaciones en este tipo de cáncer afectan principalmente a los genes supresores tumorales *BRCA1* y *BRCA2* (Chen & Parmigiani, 2007; Kuchenbaecker et al., 2017; Loibl et al., 2021) además, existe la posibilidad de la alteración en otros genes de predisposición a cáncer de mama como: *PALB2*, *ATM*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* y *TP53* (Xia et al., 2006; Graffeo et al., 2022).

A nivel molecular, el cáncer de mama se clasifica en 4 subtipos dependiendo de la expresión (+) o ausencia (-) de receptores de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor 2 del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2) en: Luminal A (ER-, PR- HER2+), Luminal B (ER+, PR+/-, HER2+), HER2 enriquecido (ER-, PR-, HER2+) y Triple negativo/Basal-like (ER-, PR-, HER2-) (Llombart-Cussac et al., 2017).

● Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es una enfermedad heterogénea que representa del 10 al 20% de todos los casos diagnosticados de cáncer de mama, es un carcinoma de alto grado (rápida capacidad proliferativa) con gran inestabilidad genómica y altos niveles de heterogeneidad intra e intertumoral (Geyer et al., 2017; Bai et al., 2021; Zagami & Carey, 2022). Se caracteriza por la ausencia de la expresión de receptores hormonales (ER-, PR-, HER2-), mayor metástasis (puede dirigirse al cerebro y pulmones) y recurrencia, baja supervivencia, mayor agresividad (biológica del TNBC) y una peor prognosis respecto a subtipos luminales, estas características pueden ser resultado de la existencia de una mayor inestabilidad cromosómica en la células de TNBC (Carter et al., 2006; Kumar & Aggarwal, 2015; Lehmann et al., 2016; Zagami & Carey, 2022).

El TNBC se subclasifica en 4 tipos basado en datos genómicos y moleculares: Basal-Like 1 (BL1) presenta una expresión elevada de genes asociados al ciclo celular y de respuesta de daño a DNA; Basal-Like 2 (BL2) se favorece la señalización de factores de crecimiento; Mesenquimal (M), existe la activación de vías asociadas a la transición epitelio mesénquima y factores de crecimiento como las vías *PI3K* y *JAK* que favorecen la metástasis; Receptor de andrógenos luminal (LAR), tiene una alta expresión de receptores de andrógenos y un alto grado metabólico de esta hormona (Fig. 3) (Lehmann et al., 2016; da Silva et al., 2020; Bai et al., 2021).

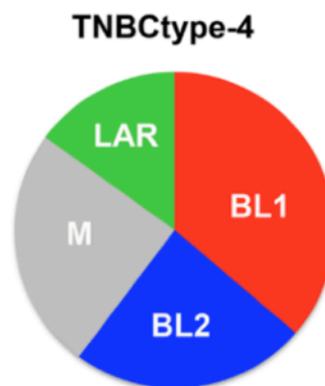


Figura 3. Disposición de la subclasificación de TNBC. BL1 (*Basal-Like 1*) 35%, BL2 (*Basal-Like 2*) 22%, M (*Mesenchymal*) 25%, LAR (*Luminal Androgen Receptor*) 16%, sin clasificación 2% (Lehmann et al., 2016).

Esta subclasificación junto a procesos biológicos que se activan específicamente en cada subtipo de TNBC puede ser empleada para detectar marcadores moleculares y mejorar las terapias empleadas, ya que actualmente, las opciones de tratamiento son limitadas agravado la prognosis de los pacientes (da Silva et al., 2020; Zagami & Carey, 2022). Por consiguiente, el uso de biopsias y clasificarlas de acuerdo a datos moleculares debe ser rutinario en la clínica para aumentar la precisión del diagnóstico en los pacientes.

● Tratamiento para TNBC

Las opciones terapéuticas para mejorar la prognosis de los pacientes con TNBC son limitadas, no obstante, el uso de estrategias como la cirugía combinada con quimioterapia citotóxica o radioterapia se han implementado en la clínica como tratamientos rutinarios para aumentar la supervivencia de los pacientes, sin embargo, aún con el uso de este tipo de estrategias un tratamiento eficaz contra el TNBC es impreciso (Fig. 4) (Wahba & El-Hadaad, 2015; Zagami & Carey, 2022).

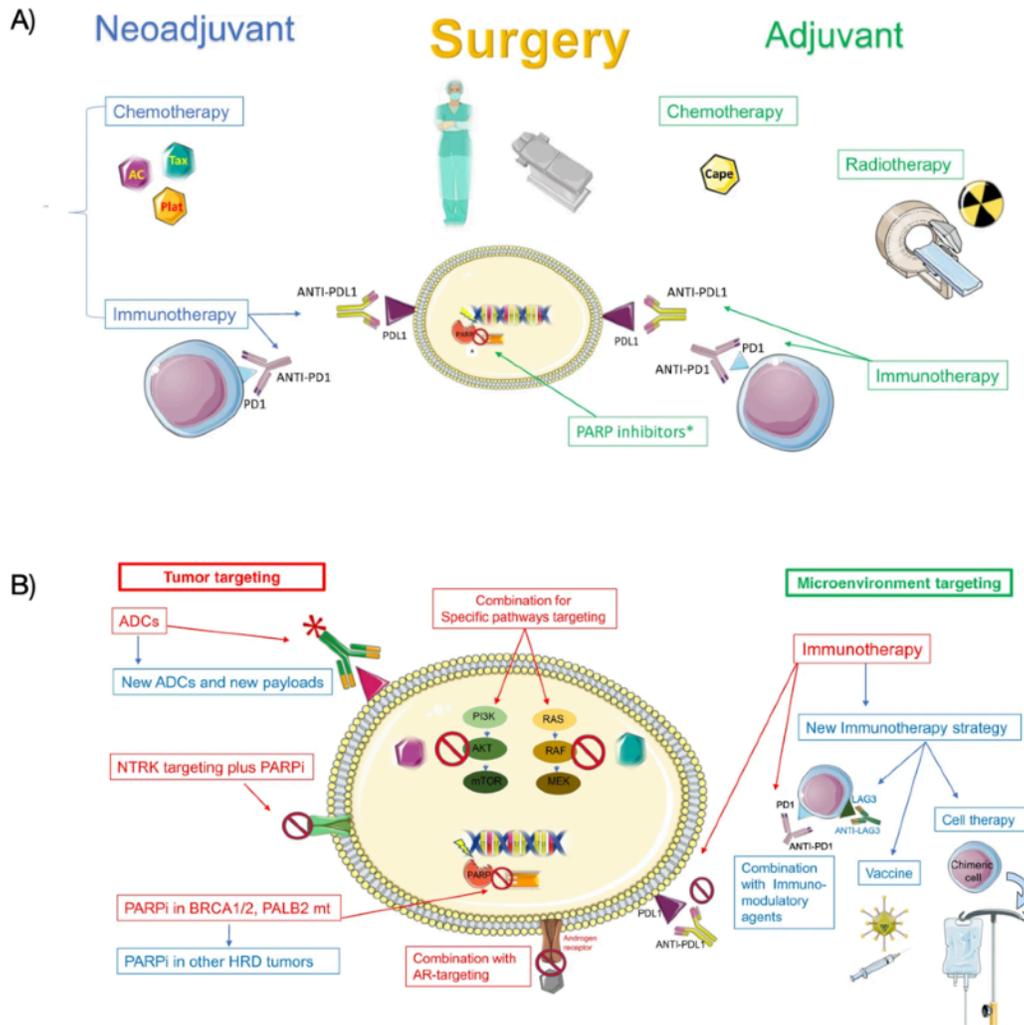


Figura 4. Opciones de tratamiento en TNBC temprano y metastásico. A) Opciones de tratamiento para TNBC temprano. En el tratamiento neoadyuvante son empleadas la quimioterapia e inmunoterapia posteriormente puede ser empleada la cirugía y finalizar con tratamientos adyuvantes como la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia, los inhibidores de *PARP* son empleados cuando existen mutaciones en genes *BRCA1/2* (*). B) Opciones de tratamiento para TNBC metastásico. Las estrategias de tratamiento en rojo se emplean actualmente en la clínica mientras que las estrategias de tratamiento en color azul representan formas terapéuticas que pueden desarrollarse en la clínica. ADC (*Antibody Drug Conjugate*), HRD (*Homologous recombination deficiency*), PARPi (*Poly-ADP Ribose Polymerase inhibitors*), AR (*Androgen Receptor*) (Zagami & Carey, 2022).

El uso cirugía de manera aislada, en específico la terapia conservatoria de seno como terapia local, podría ser una opción para mejorar la prognosis de las pacientes debido a que el tumor en estadio temprano se observa como una masa monofocal con márgenes definidos en la imagen de resonancia magnética que facilitan la disección del tumor, sin embargo, estudios han mostrado que en TNBC existe una alta recurrencia local respecto a tumores positivos para receptores hormonales empleando esta estrategia y esta recurrencia asociarse a que el TNBC se caracteriza por tener mayor riesgo de metástasis temprana respecto a tumores luminales lo que limita aún más las opciones terapéuticas (Yagata et al., 2011; He et al., 2021).

La radioterapia es una estrategia terapéutica que utiliza la inducción de radiación ionizante (IR, por sus siglas en inglés) e.g. rayos X, rayos gamma, partículas α y β , iones de carbono, haces de protones, neutrones y electrones (Giulietti, 2017; Malouff et al., 2020) que favorecen la erradicación del cáncer. Esta estrategia puede afectar directa o indirectamente a las células transformadas para mejorar el diagnóstico de los pacientes: de manera directa provoca diversos daños en el DNA como roturas de cadena sencilla (*Single Strand Break*, SSB) y de doble cadena (*Double Strand Break*, DSB) aumentando la inestabilidad genómica para promover la apoptosis celular; de manera indirecta, las células son expuestas a grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS) que son producidas por la exposición entre la IR y el agua para formar diversas lesiones en el DNA, modificación de proteínas y lípidos para provocar la muerte celular programada (Lomax et al., 2013; Hatzi et al., 2015; Sridharan et al., 2015).

Por último, dentro de estas estrategias, la quimioterapia citotóxica se ha utilizado en etapas tempranas como avanzadas de la enfermedad de forma neoadyuvante y adyuvante como primer línea de tratamiento (Bianchini et al., 2016; Lehmann et al., 2016) mostrando una respuesta favorable respecto a otros subtipos de cáncer de mama (Carey et al., 2007) disminuyendo la recurrencia, progresión, mortalidad de los pacientes y mejorando la supervivencia libre de eventos (*Event-free survival*, EFS) y de supervivencia global (*Overall survival*, OS) (Huang et al., 2020). Los agentes quimioterapéuticos empleados para el tratamiento del cáncer presentan diferentes mecanismos de acción que permiten la erradicación de las células e.g. los agentes alquilantes, promueven aductos en el DNA afectando la proliferación de las células o el uso de inhibidores de topoisomerasas, provocando alteraciones en el DNA que generan SSBs y DSBs en la biomolécula (Tsang & Tse, 2023).

Actualmente, en pacientes que han sido diagnosticados con TNBC, se ha implementado el uso de antraciclinas como la doxorubicina y taxanos como paclitaxel administrados de manera neoadyuvante y adyuvante como parte de la estrategia sistémica. El uso de paclitaxel unido a Albumina (nab-paclitaxel) junto con un agente a base de platino (carboplatino) mejora la supervivencia libre de progresión (*Progression-free survival*, PFS) y la tasa de supervivencia (OS) en TNBC metastásico. La administración de antraciclinas ha mostrado tener un alto grado de respuesta no obstante, esta terapia se asocia con mayor recurrencia, cardiotoxicidad, mielotoxicidad, alopecia, náusea, vómito y baja supervivencia (Yardley et al., 2018; Chowdhury et al., 2021; Sarno et al., 2023).

El uso de la quimioterapia en TNBC tiene un alto grado de sensibilidad que mejora la supervivencia de los pacientes, no obstante, la respuesta del tumor a este tipo de terapia es variable mostrando un alto grado de recurrencia y muerte por la adquisición de mecanismos de resistencia en el tumor que

promueven el desarrollo y evolución de la enfermedad (Tsang & Tse, 2023). Se estima que cerca del 50% de los pacientes desarrollarán recurrencia en los primeros 3 años y alrededor del 37% fallecerán dentro de los primeros 5 años posterior a terapias como cirugía y quimioterapia (Lee et al., 2020; Yin et al., 2020). Debido a la compleja heterogeneidad en TNBC, la comprensión y correcta subclasificación molecular es necesaria para mejorar la efectividad de diversas estrategias terapéuticas incluida la quimioterapia (Lehmann et al., 2011).

● Resistencia a estrategias terapéuticas

Existen diversos mecanismos en TNBC que favorecen la resistencia a estrategias terapéuticas empleadas en la clínica y que comprometen el pronóstico de las pacientes. En la quimioterapia, la generación de quimioresistencia puede estar mediada por la activación de transportadores de eflujo, en específico el *cassette* de transportadores de unión a ATP (*ATP Binding Cassette*, ABC) tiene la capacidad de utilizar ATP para expulsar diversos sustratos y fármacos fuera de la célula e impedir que ejerzan su mecanismo de acción (Sharom, 2007; Sissung et al., 2010). En TNBC es conocido que existe una expresión aberrante de diversos transportadores como ABCC1, ABCG2 y ABCC11 respecto a subtipos luminales, y contribuyen a la quimioresistencia (Yamada et al., 2013; Xu et al., 2017a).

Un mecanismo de resistencia a terapias está dado en función de las células troncales cancerosas (*Cancer stem cells*), estas células tienen la propiedad de diferenciarse en diversos linajes celulares y poseen una capacidad autorenovatoria y proliferativa (*stemness*) generando un enriquecimiento de estas células, que tienen funciones cruciales en la tumorigénesis que impulsan la capacidad metastásica e invasiva en TNBC. Actualmente, estrategias terapéuticas como la quimioterapia no están dirigidas específicamente a inhibir este tipo de células lo que aumenta el riesgo de recurrencia tumoral, quimioresistencia, peor pronóstico y evolución tumoral (He et al., 2021; Tsang & Tse, 2023).

La reparación de DNA es otro de los mecanismos altamente relacionados con la resistencia a quimioterapia y radioterapia. En las células cancerosas, su activación es crucial para mantener el desarrollo transformante y disminuir la efectividad de terapias a base de energía ionizante y fármacos alquilantes. En la reparación de DNA, la expresión de *MGMT* (O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase) permite transferir grupos alquilo de la guanina en la posición O⁶ al sitio activo de la metiltransferasa, evitando la generación de aductos en la biomolécula para disminuir la agregación de grupos alquilo y potenciar la quimioresistencia (Fumagalli et al., 2012; Raguz et al., 2013; Bai et al., 2021).

► Reparación de DNA en cáncer

La respuesta a daño a DNA (*DNA Damage Response*, DDR) es un proceso fundamental para mantener la integridad genómica y supervivencia celular, este mecanismo es desencadenado por la detección de una o múltiples lesiones en el DNA que modifican la secuencia, distorsionan y alteran su estructura ocasionados por agentes exógenos y endógenos, activando vías de señalización para la reparación en una o ambas cadenas de DNA. Los factores exógenos que promueven roturas en el DNA son: luz UV, radiación ionizante, rayos X y agentes quimioterapéuticos mientras que los factores endógenos se componen de: ROS, errores en la replicación, hidrólisis, oxidación y alquilación (Hakem, 2008; Blackford & Jackson, 2017; Li et al., 2021).

Los diversos tipos de lesiones que distorsionan y modifican al DNA se componen por: roturas de cadena sencilla de DNA (*Single Strand Break*, SSB), roturas de doble cadena de DNA (*Double Strand Break*, DSB), entrecruzamiento DNA-proteína (*DNA Protein Crosslink*, DPC), aductos, apareamiento erróneo de bases y desaminaciones (Perry & Ghosal, 2022). Estas lesiones, pueden modificar aleatoriamente la secuencia de nucleótidos asociándose con la inactivación y funcionamiento erróneo de las proteínas codificadas afectando la homeostasis de la célula y promoviendo la inestabilidad genómica, factor que aumenta el desarrollo y progresión de enfermedades como el cáncer (Hakem, 2008; Alhmod et al., 2020).

Las vías de la DDR empleadas por células normales dependiendo del tipo de lesión en el DNA son: reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER), reparación por apareamiento erróneo (*Mismatch Repair*, MMR) y reparación por escisión de nucleótido (*Nucleotide Excision Repair*, NER) para mutaciones, aductos y SSBs; reparación por unión de extremos no homólogos (*Non Homologous End Joining*, NHEJ) y reparación por recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR) para DSBs (Fig. 5). La activación de las vías de respuesta de daño a DNA son empleadas por células cancerosas para aumentar la supervivencia, favorecer el desarrollo tumoral y limitar la eficiencia de estrategias terapéuticas adquiriendo mecanismos de resistencia que empeoran el pronóstico de los pacientes (Huang et al., 2022; Gillespie et al., 2023; Moon et al., 2023).

● Reparación por escisión de bases

BER se activa por lesiones como SSB, oxidación de bases y sitios apurínicos/apirimídicos (AP). Las enzimas clave que participan en este mecanismo son: DNA glicosilasa, endonucleasa AP, DNA polimerasa y DNA ligasa. El mecanismo BER comienza con la ruptura o escisión de la base que ha sido dañada por medio de una DNA glicosilasa generando un sitio AP, posteriormente, la enzima APE detecta y corta en el sitio AP para generar extremos 3'OH y 5' deoxiribofosfato (dRP). Subsecuentemente, la DNA polimerasa B sintetiza la base o bases removidas y rompe el extremo dRP para producir un extremo 5' fosfato que será ligado mediante una DNA ligasa, (Fig. 5) (Hegde, Hazra & Mitra, 2008).

● Reparación por apareamiento erróneo

MMR permite reparar la unión errónea entre nucleótidos generada por errores en procesos biológicos como la replicación del DNA durante la mitosis celular y la recombinación genética, para evitar la adquisición y acumulación de mutaciones. Las enzimas esenciales en este sistema son: MSH2, MSH6, EXO1, RPA, PCNA, DNA polimerasa δ y DNA ligasa I. La identificación de la alteración inicia por el complejo MSH2-MSH6 reconociendo uniones incorrectas base-base y errores de 1 a 2 nucleótidos, subsecuentemente, MLH1 heterodimeriza con la enzima PMS2 y PCNA con MSH2/MLH1/MSH6/MSH3, se recluta EXO1 con actividad exonucleasa 5'-3' 3'-5' y genera un corte en la región de la lesión, RPA protege las cadenas sencillas de DNA expuestas y la DNA Pol δ sintetiza y completa el *gap* generado, finalmente la DNA ligasa I une cada nucleótido sintetizado (Fig. 5) (Lyer et al., 2006; Li, 2007).

● Reparación por escisión de nucleótido

NER es empleada principalmente para reparar lesiones generadas por luz UV como dímeros de timina así como aquellas generadas por mutágenos químicos que modifican significativamente la estructura helicoidal del DNA. Las enzimas que modulan la vía global (*Global Genome NER*, GG-NER) comprenden: XPC-RAD23B, TFIIH, XPA, RPA, XPG, XPF-ERCC1, RFC, PCNA, DNA polimerasa δ o ϵ y DNA ligasa I. El sistema de reparación se inicia por la detección de la distorsión mediante el complejo XPC-RAD23B, posteriormente es reclutado TFIIH y junto con XPG forman un complejo para desencadenar la función de helicasa para separar la cadena doble del DNA y exponer el sitio de daño, la subunidad XPD de TFIIH junto con XPA detectan la lesión mientras RPA protege las hebras que no presentan alteración y se recluta XPF-ERCC1 que genera una incisión 5' adyacente a la lesión, se activa XPG y promueve un corte en la hebra 3' a la lesión permitiendo disectar la región dañada con un rango de 22 a 30 nucleótidos de longitud, posteriormente PCNA reconoce la escisión y recluta a la DNA polimerasa δ para la síntesis de nucleótidos y reconstituir el *gap* generado, finalmente la DNA ligasa I completa la ligación entre nucleótidos. Esta vía tiene una modalidad acoplada a la transcripción (*Transcription-Coupled NER*, TC-NER), detecta lesiones en la cadena codificante de los genes transcritos por la RNA polimerasa II (*RNA Polymerase II*, RNAPII). Las enzimas específicas de este sistema son: CSA/CSB con capacidad para desplazar a la RNAPII y favorecer el reconocimiento del daño por TFIIH para resolver la reparación del DNA similar a GG-NER (Fig. 5) (Shuck, Short & Turchi, 2008; Dexheimer, 2013; Marteijin et al., 2014).

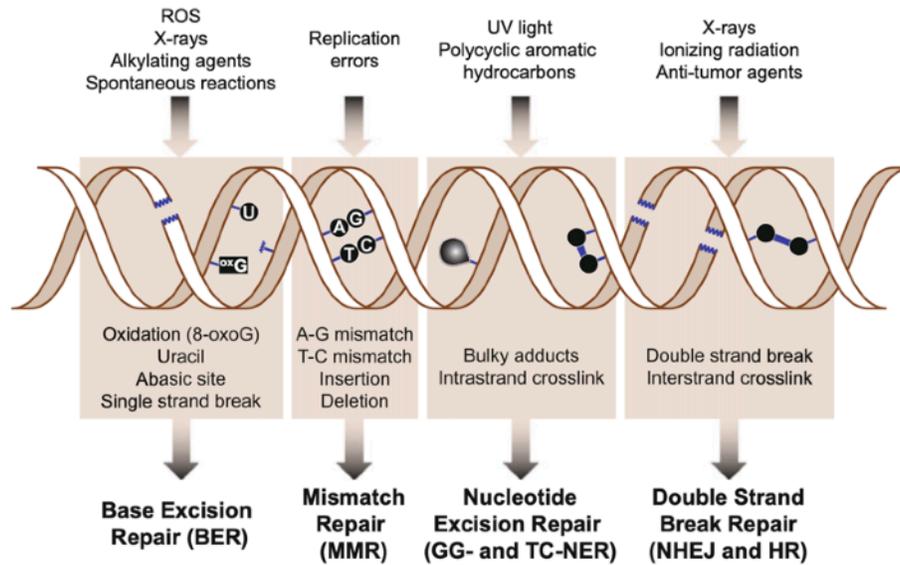


Figura 5. Mecanismos de reparación del DNA. Mecanismos de reparación asociados a lesiones en una cadena de DNA: reparación por escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER), reparación por apareamiento erróneo (*Mismatch Repair*, MMR) y reparación por escisión de nucleótido (*Nucleotide Excision Repair*, NER). Reparación por lesiones de doble cadena (*Double Strand Break Repair*): reparación por unión de extremos no homólogos (*Non Homologous End Joining*, NHEJ) y reparación por recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR). La activación de los mecanismos de reparación son el resultado de la exposición del DNA a factores exógenos y endógenos: ROS, Rayos X (*X-rays*), Agentes alquilantes (*Alkylating agents*), Reacciones espontáneas (*Spontaneous reactions*), Errores en la replicación (*Replication errors*), Luz UV (*UV light*), Hidrocarburos aromáticos policíclicos (*Polycyclic aromatic hydrocarbons*), Agentes anti tumorales (*Anti-tumor agents*) (Dexheimer, 2013).

● Reparación por unión de extremos no homólogos

La NHEJ repara eventos de roturas de doble cadena (DSB) de DNA, se encuentra activo en todas las fases del ciclo celular no obstante y ejerce su función principalmente en fase G1. La NHEJ favorece la ligación de extremos romos (*Blunt ends*) de las DSB en el DNA de manera independiente a una secuencia homóloga para lograr la reparación de la biomolécula mediante la cinética acelerada del mecanismo, manteniendo la estabilidad genética (Ceccaldi et al., 2016; Sishc & Davis, 2017; Huang et al., 2022).

Este mecanismo es conocido por ocasionar errores en la reparación generando mutaciones al ligar directamente las secuencias de DNA, sin embargo, es un sistema efectivo y versátil en los eventos de reparación de doble cadena (Bétermier et al., 2014; Blackford & Jackson, 2017) por lo cual, la célula emplea este mecanismo en la mayoría de los casos para mantener la integridad genómica en la célula normal y la supervivencia como la progresión del cáncer mediante la inestabilidad genómica (Parrella et al., 2006; Groelly et al., 2022). Las enzimas clave del sistema de reparación son: KU70/KU80, DNA-PKcs y DNA ligasa IV (Ceccaldi et al., 2016). Como primer paso, Ku70/Ku80 reconocen y se unen a la DSB del DNA y posteriormente reclutan a la enzima DNA-PKcs para generar el complejo DNA-PK con actividad cinasa permitiendo la autofosforilación. Los complejos que catalizan el

procesamiento de los extremos terminales del DNA son los factores: Artemis, DNA polimerasa μ y DNA polimerasa λ . Finalmente el complejo encargado de ligar ambos extremos del DNA es llevado a cabo por DNA ligasa IV/XRCC4/XLF (Fig. 6) (Sishc & Davis, 2017; Zhao et al., 2020).

● Reparación por recombinación homóloga

La HR es un mecanismo conservado e imprescindible para mantener la estabilidad, integridad y duplicación genómica en las células, este sistema repara la secuencia del DNA de manera precisa a su estado basal (Wyman et al., 2004; Lord & Ashworth., 2016). La HR se encuentra activa principalmente en las fases S/G2 del ciclo celular y se caracteriza por utilizar una cadena homóloga o molde como referencia para reparar DBS del DNA manteniendo la integridad de la secuencia (Thompson & Schild, 2001; Spies et al., 2021).

Las enzimas que participan en este mecanismo son: MRE11-RAD50-NBS1 (forman el complejo MRN), CtIP, EXO1, RPA, BRCA1, PALB2, BRCA2 y RAD51. La reparación por HR se inicia cuando el complejo MRN detecta la lesión de doble cadena y es reclutado CtIP para iniciar un proceso llamado resección dejando expuestas cadenas sencillas con extremos 3' de la doble cadena de DNA (sí la resección es más extensa se requieren nucleasas como BLM, DNA2 y EXO1). Subsecuentemente, RPA cubre las cadenas sencillas para estabilizar la lesión evitando la generación de estructuras secundarias. El complejo conformado por BRCA1, BRCA2 y PALB2 facilitan el desplazamiento de RPA por RAD51 que genera filamentos nucleoproteicos para comenzar la invasión de cadenas usando como secuencia molde una cromátida hermana y reparar la lesión sin la alteración de la secuencia (Fig. 6) (Dueva & Iliakis, 2020; Groelly et al., 2022).

● Reparación por alineamiento de cadena sencilla y Unión de extremos alternativos

La reparación por alineamiento de cadena sencilla (*Single strand annealing*, SSA) se activa cuando la resección de la doble cadena de DNA es muy extensa lo que permite que RAD52 se localice en el sitio de daño favoreciendo la alineación de secuencias homólogas en cada una de las cadena sencillas 3' flap de DNA expuestas que serán reconocidas por ERCC1 y XPF, la resolución de la reparación es procesada por LIG1. La activación del sistema de reparación por unión de extremos alternativos (*Alternative end joining*, alt-EJ) comienza si la resección ocasionada en el DNA tiene una longitud reducida, lo que permite que la lesión sea reconocida por la DNA polimerasa θ (POLQ) causando la alineación de las pequeñas secuencias expuestas por la resección, síntesis de nucleótidos y la subsecuente ligación de los ácidos mediante LIG1/LIG3 (Fig. 6) (Groelly et al., 2022).

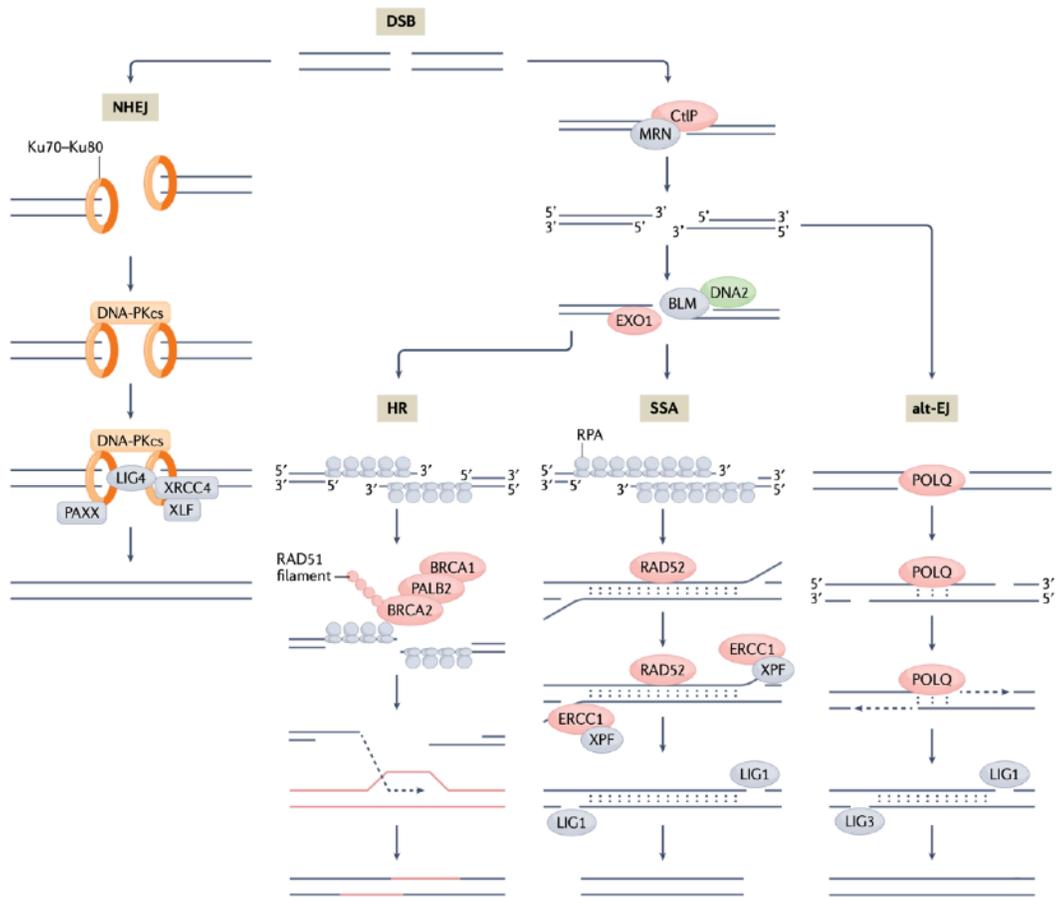


Figura 6. Mecanismos de reparación de doble cadena de DNA. Activación de mecanismos de reparación por lesiones en la doble cadena de DNA: reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), reparación por recombinación homóloga (HR), alineamiento de cadena sencilla (SSA) y unión de extremos alternativos (alt EJ). La activación de estos mecanismos está sujeta a fases ordenadas específicas del ciclo celular y a la extensión de la resección de ambos extremos en las cadenas de DNA procesadas (Groelly et al., 2022).

► Los ncRNAs regulan la reparación de DNA en cáncer

● RNAs no codificantes como elementos reguladores

Los RNAs no codificantes (*Non-coding RNAs*, ncRNAs) son moléculas de RNA que no codifican para proteínas y representan más del 90% de los RNAs transcritos mientras que los RNAs que codifican proteínas constituyen el 2% de moléculas transcritas. Los ncRNAs regulan diversos procesos como la expresión génica, reclutamiento de diferentes proteínas y funciones biológicas a nivel transcripcional y post transcripcional tanto en células normales como en el proceso de transformación neoplásica (Yang et al., 2016; Slack & Chinnaiyan, 2019; Wang et al., 2019; Latronico & Silveira., 2019; Winkle et al., 2021).

Los ncRNAs pueden ser clasificados de acuerdo a su tamaño y función en: *microRNAs* (miRNAs), *small PIWI-interacting RNAs* (piRNAs), *small nuclear RNAs* (snoRNAs), *transfer RNAs* (tRNAs), *ribosomal RNAs* (rRNAs), *small interfering RNAs* (siRNAs), *circular RNAs* (circRNAs) y *long non coding RNAs* (lncRNAs) (Vishnubalaji et al., 2020; Shaath et al., 2022). Los dos tipos de ncRNAs que han sido más estudiados por su función en múltiples procesos biológicos comprenden a miRNAs, transcritos pequeños de ~22 nucleótidos que regulan la expresión de múltiples RNAs mediante el acomplamiento a la región 3' UTR (*3'Untranslated Regions*) de los mRNAs y su posterior degradación o inhibición del proceso traduccional y el segundo tipo más estudiado son los lncRNAs (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Winkle et al., 2021).

Estos transcritos (miRNAs y lncRNAs) han tenido relevancia clínica debido a que en cáncer presentan una desregulación en su perfil de expresión actuando sobre diversos *hallmarks* del cáncer para favorecer el desarrollo tumoral (Slack & Chinnaiyan, 2019; Winkle et al., 2021). Por ejemplo, en cáncer gástrico, la sobreexpresión del miR-616-3p favorece la angiogénesis, migración, invasión, metástasis y transición epitelio mesénquima por medio de la subexpresión del gen supresor tumoral *PTEN* permitiendo activación de la vía de señalización AKT/mTOR (Wu et al., 2018); en cáncer de mama, la sobreexpresión del lncRNA *LINC00511* promueve la proliferación, migración e invasión mediante la inhibición por complementariedad del *miR-150*, activando la transcripción del oncogén *MMP15* (Shi et al., 2021).

Los lncRNAs son moléculas complejas de RNA de cadena sencilla de >200 nucleótidos que no codifican proteínas, están involucrados en múltiples procesos biológicos como: regulación de la cromatina, regulación transcripcional, RNA endógeno competitivo (*Competitive endogenous RNA*, ceRNA), *splicing*, traducción, degradación, modificación del RNA y modificaciones proteicas, generando interacciones espaciales complejas con RNA, DNA y proteínas (Fig. 7) (Esteller, 2011; Guttman & Rin, 2012; Cheng et al., 2019; Chen et al., 2021). Sin embargo, aún cuando estas moléculas no codifican para proteínas, existen lncRNAs que se transcriben para generar micropéptidos (Anderson et al., 2015).

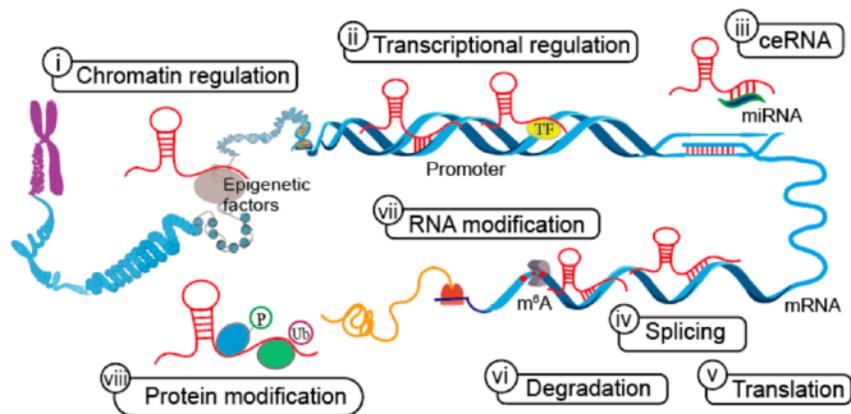


Figura 7. Regulación de procesos biológicos por lncRNAs. En la célula se generan diversos procesos biológicos que son fundamentales para la homeostasis celular como: (i) regulación de la cromatina, (ii) regulación transcripcional, (iii) ceRNA, (iv) *splicing*, (v) traducción, (vi) degradación, (vii) modificación del RNA y (viii) modificaciones proteicas, estos procesos son regulados por ncRNAs como los lncRNAs (Cheng et al., 2019).

La mayoría de los lncRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) mientras que la transcripción de otros lncRNAs puede generarse a partir de la RNA polimerasa I (Pol I) y de la RNA polimerasa III (Pol III). De manera similar a los RNA mensajeros (mRNAs), varios lncRNAs sufren procesos para la estabilización molecular como la adición de una 7-metil guanosina (m^7g) en la región 5', poliadenilación en la región 3' y eventos de *splicing* generados por el spliceosoma, no obstante, algunos lncRNAs no son procesados con m^7g y cola de poli-A (Yin et al., 2012; Wu et al., 2016; Klingerberg et al., 2017; Wu et al., 2017; Statello et al., 2020; Mattick et al., 2023).

Los lncRNAs pueden clasificarse de acuerdo a su biogénesis y ubicación genómica en: **sentido**, moléculas que se transcriben en la misma dirección que los genes codificantes adyacentes, estas moléculas pueden tener uno o diversos exones y pueden sobreponerse directamente con las regiones codificantes; **antisentido**, su transcripción se genera en dirección opuesta a los genes codificantes adyacentes y pueden tener una o varias regiones exónicas; **intrónicos**, lncRNAs generados de las regiones no codificantes (intrones) de los genes que traducen proteínas, estas moléculas no contienen exones y pueden ser de dos tipos, sentido o antisentido; **bidireccionales**, lncRNAs que tienen un origen a partir de la cadena opuesta de los genes codificantes de proteínas y se encuentran alejados ~1 Kb del promotor, sin solapamiento; **intergénicos**, lncRNAs que se transcriben entre 2 genes distintos, estas moléculas no se solapan con las secuencias de los genes codificantes (Fig. 8) (Liu et al., 2015; Dykes & Emanuelis, 2017; Yousefi et al., 2020).

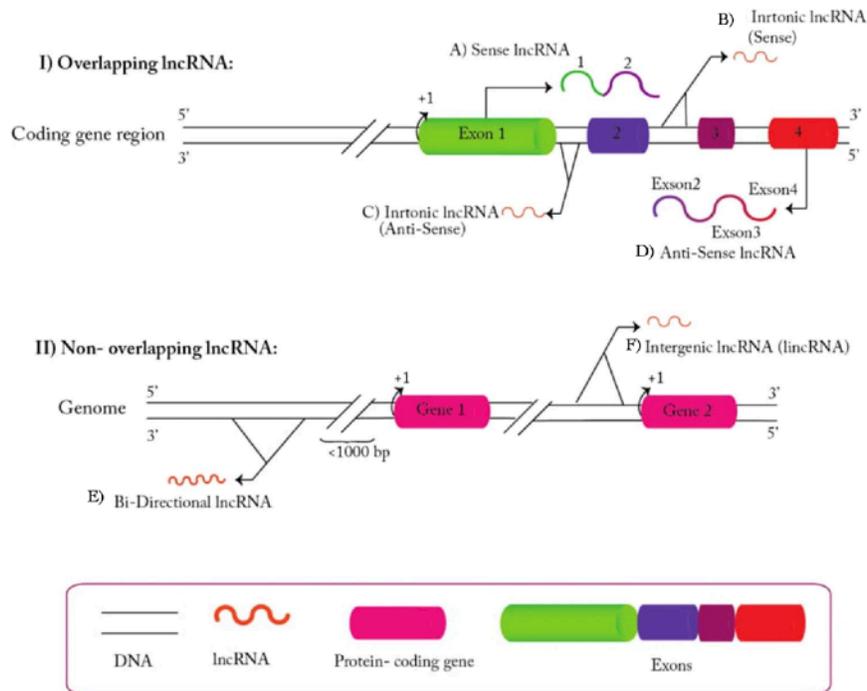


Figura 8. Clasificación de lncRNAs. I) lncRNA Sobrelapado (*Overlapping lncRNA*) A) lncRNA Sentido (*Sense lncRNA*) B) lncRNA Intrónico (Sentido) (*Intronic lncRNA (Sense)*) C) lncRNA Intrónico (Anti-sentido) (*Intronic lncRNA (Anti-Sense)*) D) lncRNA Anti-sentido (*Anti-Sense lncRNA*). II) lncRNA No Sobrelapado (*Non-overlapping lncRNA*) E) lncRNA Bidireccional (*Bi-Directional lncRNA*) F) lncRNA Intergénico (*lincRNA*). ADN (*DNA*), lncRNA, Proteína-gen codificante (*Protein-coding gene*), Exones (*Exons*), Exón (*Exon*), Gen (*Gene*). (Yousefi et al., 2020).

● Función de lncRNAs

Debido a la regulación de la actividad transcripcional y post transcripcional ejercida por la función de lncRNAs en la célula, estos pueden dividirse en 4 categorías: **señal** (*Signal*), lncRNAs que se expresan en regiones y tiempos específicos en la célula, regulando la expresión de diversos genes río abajo de una vía de señalización; **señuelo** (*Decoy*), moléculas que interactúan con factores de transcripción u otras proteínas, secuestrándolas del sitio canónico de acción generando una regulación negativa; **guías** (*Guides*), lncRNAs que pueden unirse directamente a proteínas y factores de transcripción para direccionarlas a sitios específicos en una secuencia, modulando la dinámica transcripcional de la expresión génica, esta regulación puede llevarse a cabo en *cis* (genes contiguos) o en *trans* (genes distantes); **andamios** (*Scaffolds*), lncRNAs que sirven como “plataformas centrales” permitiendo la unión de proteínas para formar y estabilizar complejos proteicos que participan en diversas vías de señalización, favoreciendo la activación de diversos procesos biológicos en la célula (Fig. 9) (Wang & Chang, 2011; Cheng et al., 2019; Gao et al., 2020; Zhang et al., 2020b).

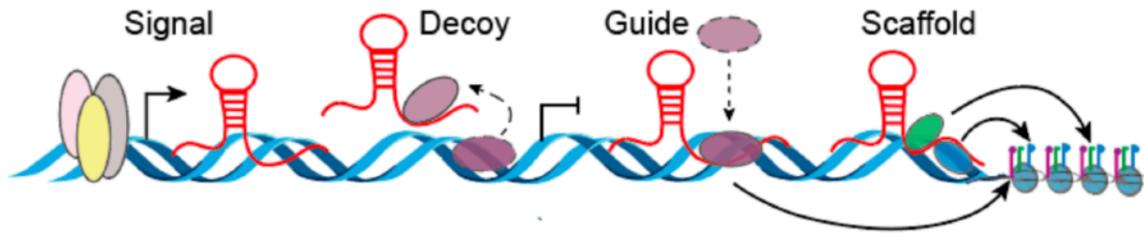


Figura 9. Función de lncRNAs. En la célula la función de lncRNA permite la regulación de diversos procesos biológicos mediante interacciones RNA-DNA, RNA-RNA y RNA-Proteína, estos se clasifican en: Señal (*Signal*), Señuelo (*Decoy*), Guía (*Guide*) y Andamio (*Scaffold*) (Cheng et al., 2019).

● LncRNAs y asociación con el cáncer

Al regular múltiples procesos biológicos en la célula, la expresión aberrante y alteración de lncRNAs está asociada a diversos tipos de enfermedades como: Alzheimer, Parkinson, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Mercer et al., 2009; Gesualdo et al., 2014). En cáncer, existe una desregulación en la expresión de diversos lncRNAs respecto a células normales, pueden tener la capacidad de ser supresores tumorales, proto-oncogenes y conductores (*Drivers*) esenciales en el proceso de transformación y desarrollo neoplásico regulando procesos a nivel transcripcional, post-transcripcional y epigenético (Meng et al., 2014; Huarte, 2015).

La expresión aberrante de diversos lncRNAs en cáncer se asocia con la activación de los “*hallmarks*” del cáncer. Por ejemplo, el lncRNA *GAS5* regula la evasión de supresores de crecimiento, lncRNA *HIFa* participa en la angiogénesis, lncRNA *MALAT1* en la invasión y metástasis, lncRNA *MEG5* favorece la resistencia apoptótica y la señalización proliferativa, mientras que lncRNA *TERC* favorece habilitación de inmortalidad replicativa entre muchos otros revisados por autores como Gesualdo y colaboradores (Fig. 10) (Fang & Fullwood, 2016).

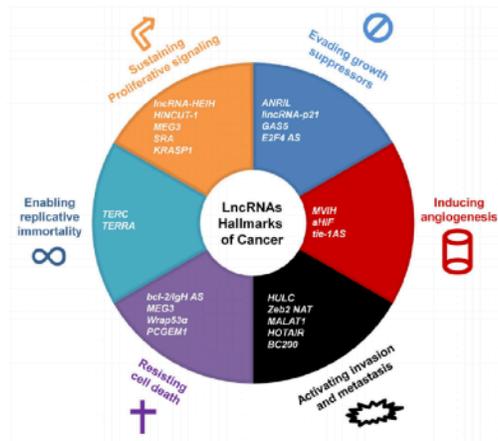


Figura 10. LncRNAs y asociación con *hallmarks* del cáncer. Diversos lncRNAs participan en las características o *hallmarks* que definen al cáncer para promover el desarrollo y evolución de la enfermedad: Evasión de supresores de crecimiento (*Evading growth suppressors*): *ANRIL*, *lincRNA-p21*, *GAS5*, *E2F4-AS*; Inducción de angiogénesis (*Inducing angiogenesis*): *MVIH*, *aHIF*, *tie-1AS*; Activación de invasión y metástasis (*Activating invasion and metastasis*): *HULC*, *Zeb2-NAT*, *MALAT1*, *HOTAIR*, *BC200*; Resistencia a la muerte celular (*Resisting cell death*): *bcl-2/IgH-AS*, *MEG3*, *Wrap53a*, *PCGEM1*; Habilitando inmortalidad replicativa (*Enabling replicative immortality*): *TERC*, *TERRA*; Manteniendo señalización proliferativa (*Sustaining proliferative signaling*): *lncRNA-HEIH*, *HINCUT-1*, *MEG3*, *SRA*, *KRASP1* (Gesualdo et al., 2014).

Además, la expresión aberrante de lncRNAs en cáncer puede regular la activación de mecanismos de reparación de doble cadena como la NHEJ y HR. Por ejemplo, el lncRNA *LINPI* con función de andamio estabiliza la proteína Ku80 y complejo DNA-PKc aumentando la activación de la NHEJ (Zhang et al., 2016); los lncRNAs *CUPIDI1* y *CUPIDI2* regulan el proceso de resección de DNA y son capaces de reclutar a pRPA y RAD51 en el proceso de la HR (Betts et al., 2017). Por lo cual, la regulación de los mecanismos de reparación por lncRNAs son indispensables para mantener la integridad genómica en cáncer (Statello et al., 2020).

► Long non coding RNA *ANRIL*

CDKN2B-AS1 o *ANRIL* (“Antisense Non coding RNA in the INK4 Locus”) es un RNA largo no codificante antisentido de 3.8 Kb (Kilobases) localizado en la región cromosómica 9p21 que se transcribe en dirección opuesta al gen *CDKN2A* que codifica para los supresores tumorales *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}* y *CDKN2B* que codifica para el supresor *p15^{INK4b}*. Este lncRNA comparte un promotor bidireccional con el gen *p14^{ARF}* debido a que la región 5’ del primer exón de *ANRIL* se encuentra alrededor de 300 pb río arriba de la región intergénica (promotor) del marco de lectura abierto (*Open reading frame*, ORF) de *p14^{ARF}*. Los genes *p15^{INK4b}* y *p16^{INK4a}* son inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que tienen un papel clave en el arresto del ciclo celular, su expresión inhibe directamente a las cinasas *CDK4/6* evitando la fosforilación (inactivación) del supresor tumoral retinoblastoma (RB), mientras que *p14^{ARF}* modula la actividad de *p53* mediante la degradación del inhibidor *MDM2* (Fig. 11) (Sato et al., 2010; Pasmant et al., 2011; Kong et al., 2018; Lou et al., 2020). La sobreexpresión de este lncRNA está asociada con el desarrollo de diversas enfermedades como diabetes tipo 2, enfermedades coronarias y el cáncer (Zhang et al., 2020a).

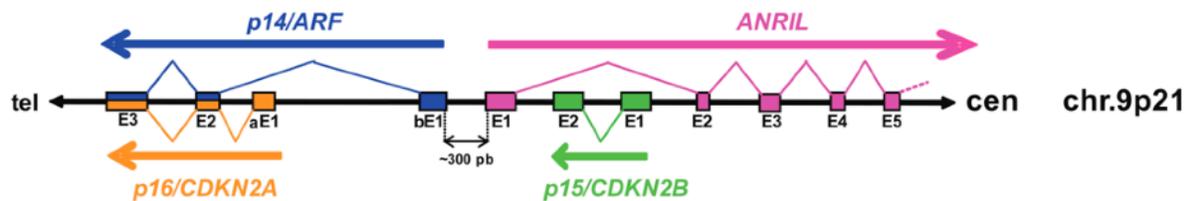


Figura 11. Cluster *p15/CDKN2B-p16/CDKN2A-p14/ARF-ANRIL*. Localización espacial de la transcripción antisentido de *ANRIL*. Los exones 1 y 2 se comparten entre en lncRNA y *p15^{INK4b}*, así como un promotor bidireccional para la transcripción de *p14^{ARF}* y *ANRIL* (Pasmant et al., 2011).

Al igual que la mayoría de los lncRNAs, *ANRIL* se transcribe por la RNA polimerasa II generando múltiples isoformas lineares y circulares por medio de *splicing* alternativo y *back splicing* respectivamente, a partir de una isoforma lineal de 21 exones se han reportado: 14 isoformas lineares y 10 isoformas circulares. Las isoformas lineares tienen una localización nuclear con funciones asociadas con la regulación de la expresión génica mientras que las isoformas circulares modulan la actividad post transcripcional (Kong et al., 2018). La estructura tridimensional de *ANRIL* es generada por su conformación heterogénea de elementos repetitivos LINE (*Long Interspaced Nuclear Element*) o SINE (*Short Interspaced Nuclear Element*) como *Alu* (Fig. 12) (Burd et al., 2010; Holdt et al., 2016; Bencivenga et al., 2022).

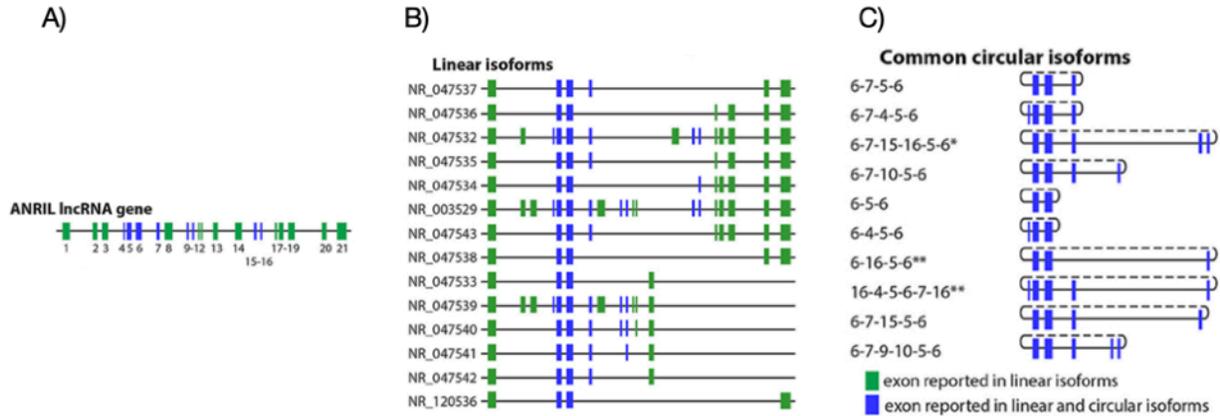


Figura 12. Isoformas lineares y circulares de ANRIL. A) Exones de ANRIL B) Isoformas lineares de ANRIL C) Isoformas circulares de ANRIL. Ambas isoformas de ANRIL convergen tanto en el núcleo como citoplasma de la célula, no obstante las isoformas circulares predominan en citoplasma (Sarkar et al., 2017; Kong et al., 2018).

ANRIL tiene formas regulación en *cis* y en *trans* para modular la expresión de diversos genes: en *cis*, es capaz de regular la expresión de genes contiguos a su transcripción como *CDKN2A* y *CDKN2B* mediante modificaciones de la cromatina e histonas, en *trans*, puede regular genes distantes a su transcripción y es dependiente de los motivos *Alu* para llevar a cabo este proceso. Ambas formas de regulación requieren la interacción con el complejo de represión polycomb (*Polycomb Repressive Complex*, PRC) específicamente los complejos PRC1/PRC2 (Congrains et al., 2012; Holdt et al., 2013; Naemura et al., 2015).

En células normales que se encuentran en un proceso tardío de la activación de los mecanismos de reparación de DNA la transcripción de ANRIL es necesaria para la homeostasis celular, proceso dependiente del factor de transcripción *E2F1* acoplado a la activación de *ATM*, para inhibir a los genes *p14^{ARF}*, *p15^{INK4b}* y *p16^{INK4a}* involucrados en el arresto del ciclo celular (Wan et al., 2013).

La expresión exacerbada de ANRIL está altamente asociada con la adquisición de diversos *hallmarks* del cáncer como la inhibición apoptótica, proliferación, invasión, migración y procesos biológicos como la autofagia promoviendo el desarrollo neoplásico y empeorando el pronóstico clínico disminuyendo la tasa de supervivencia (Liu et al., 2022).

● *ANRIL* y cáncer

Diversos tipos de cáncer como: cáncer de pulmón (Nie et al., 2015), cáncer de ovario (Miao et al., 2019), cáncer cervical (Zhang et al., 2017), cáncer gástrico (Zhang et al., 2014), cáncer de próstata (Zhao et al., 2018), cáncer de vejiga (Zhu et al., 2015) y cáncer de mama (Mehta-Mujoo et al., 2019), muestran la adquisición de la sobreexpresión del lncRNA *ANRIL* lo cual favorece el progreso de la enfermedad y empeora el diagnóstico clínico (Zhang et al., 2017).

En cáncer, *ANRIL* tiene diversas funciones que promueven el desarrollo de la enfermedad, como la capacidad de ser: **señuelo (esponja de miRNAs/ceRNA)**, interaccionando con miRNAs mediante complementariedad de secuencias regulando los perfiles de expresión génica; **señal**, activando vías de señalización como PI3K/AKT, MAPK y mTOR aumentando la supervivencia celular; **andamio**, interaccionado y estabilizando complejos proteicos asociados a la regulación epigenética como las subunidades CBX7/PRC1 y SUZ12/PRC2; **guía**, dirigiendo complejos proteicos a sitios de acción específicos (Fig. 13) (Lou et al., 2020; Sanchez et al., 2023).

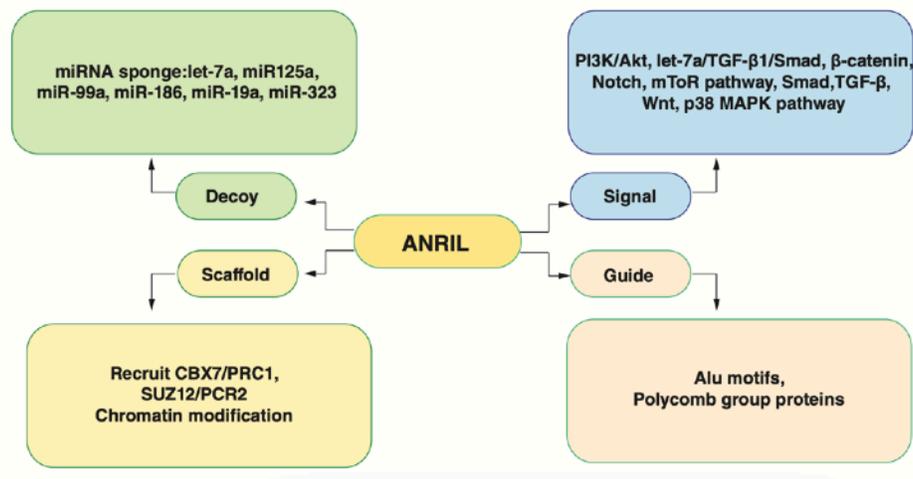


Figura 13. Funciones de *ANRIL* en cáncer. *ANRIL* presenta 4 funciones en conjunto de los lncRNAs: Señuelo (*Decoy*): Esponja de miRNA (*miRNA sponge*), Señal (*Signal*), Andamio (*Scaffold*) y Guía (*Guide*) convirtiendo a este lncRNA como una molécula altamente compleja en cáncer (Lou et al., 2020).

En cáncer gástrico, la expresión de *ANRIL* aumenta la activación de la vía NF-κB mediante la interacción con p65 para facilitar su entrada al núcleo celular y activar genes asociados a la proliferación, metástasis y supervivencia tumoral (Deng et al., 2019). En cáncer de vejiga, la sobreexpresión de *ANRIL*, promueve la proliferación celular y resistencia apoptótica mediante la regulación de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Zhu et al., 2015). En cáncer colorrectal, la expresión aberrante de *ANRIL* genera una respuesta quimiorresistente al 5-FU (5-fluorouracilo) y oxaliplatino regulando la expresión del transportador ABCC1 (perteneciente a la familia de

transportadores ABC) mediante la función ceRNA (esponja/*decoy*) de *ANRIL* sobre el *miR Let-7a* que tiene como blanco al gen *ABCC1*, manteniendo la capacidad proliferativa y migratoria de las células tumorales (Zhang et al., 2018b). En carcinoma hepatocelular, la sobreexpresión de *ANRIL* promueve la invasión, proliferación y migración mediante la activación de las vías de señalización NF-kB/Wnt/B-catenina regulando la expresión del *miR-191* (Huang et al., 2018).

● Asociación del lncRNA *ANRIL* y TNBC

En TNBC, Iranpour y colaboradores describieron una firma molecular constituida por 4 lncRNAs oncogénicos sobreexpresados: *ANRASSF1*, *PTPRG-AS1*, *SOX2OT* y *ANRIL* que pueden favorecer la tumorigénesis (Iranpour et al., 2016), posteriormente, otra firma molecular fue expuesta a partir del plasma de pacientes con TNBC constituida por tres lncRNAs sobreexpresados: *HIF1A-AS2*, *UCA1* y *ANRIL* con capacidad de utilizarse en el diagnóstico clínico para discriminar a pacientes con TNBC y sanos (Liu et al., 2017). Ambas firmas comparten la sobreexpresión del lncRNA *ANRIL* en TNBC por lo que su expresión es de relevancia para este subtipo molecular de cáncer de mama.

Hasta la fecha de redacción de esta tesis solo existen tres estudios en TNBC que muestran formas de regulación del lncRNA *ANRIL* para el desarrollo y evolución tumoral. En TNBC la sobreexpresión de *ANRIL* disminuye la expresión del *miR-199a* mediante la función ceRNA (esponja) del lncRNA, aumentando la proliferación e inhibiendo la apoptosis en el proceso carcinogénico (Xu et al., 2017b). La sobreexpresión de *ANRIL* en TNBC promueve la proliferación y migración celular mediante el aumento en la expresión de *SPC25* (correlación positiva lncRNA-mRNA) posiblemente interactuando con proteínas microtubulares del proceso mitótico permitiendo el desarrollo del TNBC (Deng et al., 2022) y por último, la sobreexpresión de *ANRIL* en TNBC favorece el estado quimiorresistente a doxorubicina por el aumento en la expresión de *ENO1* a través de la inhibición por complementariedad del *miR-125a* regulando la actividad glicolítica, aumentando la recurrencia en los pacientes (Ma et al., 2022). Estos estudios demuestran que el lncRNA *ANRIL* favorece la evolución tumoral y podría emplearse como un biomarcador en el diagnóstico clínico en TNBC.

● *ANRIL* y la reparación por recombinación homóloga en cáncer

ANRIL es una molécula con funciones diversas y esenciales en la regulación del ciclo celular, apoptosis y en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga. Al igual que en diversos tipos de cáncer, en células de osteosarcoma está presente la sobreexpresión de *ANRIL*, esta expresión es desencadenada por el factor de transcripción *E2F1* a través de la activación de *ATM* en respuesta de roturas de doble cadena de DNA ocasionadas por el antibiótico tumoral neocarzinostatina, la inducción de *ANRIL* contribuye directamente en la reparación del DNA por el mecanismo de recombinación homóloga (Wan et al., 2013; Guan et al., 2018).

Otro ejemplo es en cáncer de pulmón el cual tiene una expresión aberrante (sobreexpresión) de *ANRIL*, su inducción es desencadenada en respuesta a la radiación ionizante aplicada directamente en la molécula de DNA para generar lesiones de doble cadena. La expresión del lncRNA permite estabilizar a ATR y facilita la formación del complejo RAD51/RPA2 componente esencial en la reparación por recombinación homóloga, evitando que las células de cáncer de pulmón sean eliminadas y desarrollen un perfil radioresistente (Liu et al., 2021).

El TNBC al igual que en células de osteosarcoma y cáncer de pulmón presenta la sobreexpresión del lncRNA *ANRIL* que correlaciona con la evolución y desarrollo de la enfermedad, sin embargo, en TNBC no se conoce si *ANRIL* modula la reparación por recombinación homóloga que funciona como un mecanismo de resistencia a la quimioterapia como lo visto en células de osteosarcoma y cáncer de pulmón. Por tanto en este proyecto es de nuestro interés conocer si existe una relación entre el lncRNA *ANRIL* y la HR en TNBC.

Hipótesis

El lncRNA *ANRIL* modula el mecanismo de reparación por recombinación homóloga en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo.

Objetivos

► Objetivo General

Evaluar el efecto del lncRNA *ANRIL* en la tasa de recombinación homóloga en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo.

► Objetivos Particulares

*Disminuir y sobreexpresar el lncRNA *ANRIL* en líneas celulares BT-20 y MDA-MB-231.

*Generar un sistema reportero de recombinación homóloga en las líneas celulares de TNBC.

*Analizar la tasa de recombinación homóloga en las líneas celulares derivadas de TNBC con expresión diferencial de *ANRIL*.

Metodología

▶ Cultivo celular

Se utilizó la línea celular no tumoral MCF10A y líneas celulares de cáncer de mama triple negativo BT-20 y MDA-MB-231 (MDA-231) adquiridas de ATCC (HTB-19 y HTB-26). Las líneas de TNBC fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12) y suplementadas con 10% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) usando una incubadora Thermofisher a 37°C con 5% de CO₂ con atmósfera húmeda. Para los experimentos de expresión endógena de *ANRIL*, las células BT-20, MDA-231 y MCF10A fueron sembradas en cajas p100 con una confluencia mínima del 80%. Para los experimentos de subexpresión y sobreexpresión de *ANRIL* en BT-20 y MDA-231 respectivamente, se utilizaron placas de 6 pozos con 400,000 células por pozo; En el ensayo de HR en ambas líneas celulares, se usaron placas de 6 pozos con 500,000 células por pozo, en ambos casos, suplementado con 2ml de medio DMEM/F12 + 10% de FBS.

▶ Plásmidos

Los vectores empleados fueron: pcDNA_3.1 (Control negativo) (Thermofisher), ligado a una secuencia aleatoria con función de *scrambled*; pcDNA_3.1+*ANRIL* (Thermofisher) para sobreexpresar al lncRNA, contiene la secuencia (3829 pb) del lncRNA *ANRIL* (la isoforma principal); pSilencer 2.1-U6 neo (Control negativo) (Ambion), presenta una secuencia aleatoria de 60 pb con función de *scrambled*; pSilencer+shRNA1 y pSilencer+shRNA2, cada vector contiene una secuencia de 60pb para disminuir la expresión de *ANRIL* (Xu et al., 2017b); ISceI-GR-RFP (Addgene #17654), codifica para la meganucleasa ISce-I; pMIR-report (Ambion), codifica para la enzima luciferasa de luciérnaga, en adelante solo llamada luciferasa; pLucΔ3ORF, contiene una secuencia que trunca el ORF de la luciferasa; pLucΔ5ORF, presenta una deleción en el ORF de la luciferasa que impide su transcripción y pGL4 (Promega #E6651), codifica para la luciferasa de *Renilla* y se emplea para normalizar la emisión de luz de la luciferasa.

▶ Transfecciones

Para sobreexpresar a *ANRIL* en MDA-231 se utilizaron 500 ng del vector pcDNA_3.1+*ANRIL* y para subexpresar a *ANRIL* en BT-20 se utilizaron 3 µg de pSilencer+shRNA1/2 (1.5 µg de shRNA1+ 1.5 µg de shRNA2) (Tabla 1), las transfecciones se realizaron por 24hrs. Se utilizaron 4 µL de Lipofectamina 3000 por cada µg de DNA en las transfecciones y se siguieron las instrucciones del fabricante (Thermofisher). (Tranfecciones de 0 a 1 µg de DNA se utilizó 4 µL de Lipofectamina 3000 y transfecciones >1 µg de DNA se utilizaron 4 µL de Lipofectamina 3000 por cada µg de DNA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermofisher).

Para los ensayos de reparación, los controles de la HR en ambas líneas celulares fueron transfectados individualmente: 300 ng de pLucΔ3ORF + 2 ng de pGL4, 3 µg de pLucΔ5ORF + 2 ng de pGL4, 500 ng de ISceI-GR-RFP + 2 ng de pGL4 y 300 ng de pMIR-report + 2 ng de pGL4 por 24 hrs.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>
shRNA-1 <i>Forward</i> (Fw)	5'-GATCCGCAAATTGGTACAAACCAATTTTCAAGAGAAATTGGTTTGTACCAATTTGCTTTA-3'
shRNA-1 <i>Reverse</i> (Rv)	5'-AGCTAAAGCAAATTGGTACAAACCAATTTCTCTTGAAAATTGGTTTGTACCAATTTGCG-3'
shRNA-2 <i>Forward</i> (Fw)	5'-GATCCCCAATCAACGGAGCCAAGCTTTTCAAGAGAAAGCTTGGCTCCGTTGATTGGTTTA-3'
shRNA-2 <i>Reverse</i> (Rv)	5'-AGCTAAACCAATCAACGGAGCCAAGCTTTCTCTTGAAAAGCTTGGCTCCGTTGATTGGG-3'

Tabla 1. Secuencia de shRNAs para reprimir la expresión de *ANRIL* en BT-20.

Para medir la HR con expresión endógena de *ANRIL* en las dos líneas celulares, se realizó una transfección reversa con 500 ng de ISceI-GR-RFP, 24hr después se realizó una cotransfección de los plásmidos en conjunto: pLucΔ3ORF+pLucΔ5ORF+ pGL4 (Masa total: 3302 ng) por 24 hrs.

La medición de HR con la manipulación de la expresión de *ANRIL* se hizo de la siguiente forma: Para MDA-231, se realizó una transfección reversa con 500 ng de ISceI-GR-RFP por 24 hrs y una cotransfección con los plásmidos pLucΔ3ORF+pLucΔ5ORF+ **pcDNA_3.1+ANRIL** +pGL4 (cantidad total de DNA: 3802 ng) por 24 hrs. Para BT-20, se hizo una transfección reversa con 500 ng de ISceI-GR-RFP por 24 hrs y una cotransfección con los plásmidos pLucΔ3ORF+pLucΔ5ORF+ **pSilencer+shRNA-1/2** +pGL4 (cantidad total de DNA: 6302 ng). Para las transfecciones se utilizaron 4 μL de Lipofectamina 3000 por cada μg de DNA, y se siguieron las instrucciones del fabricante (Thermofisher). Las cantidades de pSilencer se estandarizó previamente en el grupo de trabajo.

► Aislamiento de RNA, transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

El RNA total fue aislado de células MCF10A, BT-20 y MDA-231 sembradas en cajas p100 o en placas de 6 pozos para la manipulación de la expresión de *ANRIL*. Se utilizó el reactivo con TRizol®(Invitrogen) usando las siguientes cantidades: Cajas p100, Trizol: 1 ml, cloroformo: 500 ul, isopropanol 100%: 1 ml, Etanol 75%: 1 ml y la pastilla de RNA fue resuspendida en 34 μl de H₂OQ (agua miliQ). Placas de 6 pozos; Trizol: 250 μl, cloroformo: 50 μl, Isopropanol 100%: 125 μl, Etanol 75%: 250 μl y la pastilla de RNA se resuspendió en 34 μl de H₂OQ, la cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Epoch (Biotek Instruments).

Para la síntesis de cDNA, se utilizó 1 μ g de RNA de la línea no tumoral como de líneas TNBC con expresión basal, sobreexpresión y subexpresión de *ANRIL*, empleando el kit High-Capacity (Applied Biosystems) en un termociclador Verti (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción se muestran en la Fig. 14. El nivel de expresión basal, la sobreexpresión y subexpresión de *ANRIL* se evaluaron por qPCR usando el kit TB Green Advantage qPCR Premix (Takara) y las condiciones de la Fig. 15 con el termociclador QIAquant 96 *5plex* (Qiagen). Los niveles de expresión de *ANRIL* fueron normalizados con el gen constitutivo ACTINA usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Las secuencia de los *primers* de *ANRIL*/ACTINA para la qPCR se muestran en la Tabla 2 y las condiciones para evaluar la especificidad se muestran en la Fig. 16.

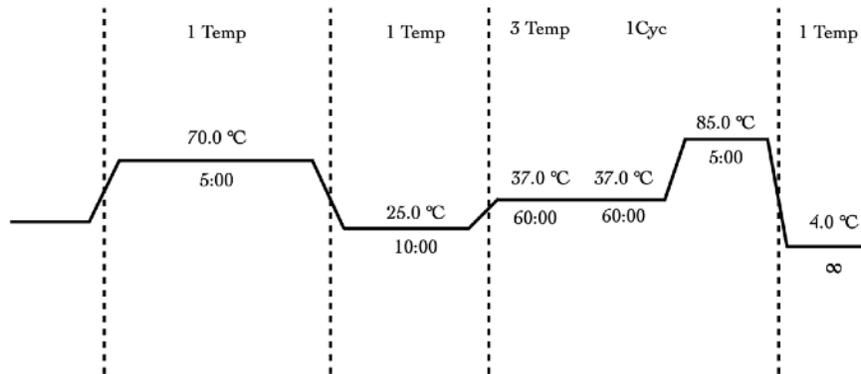


Figura 14. Condiciones de RT-PCR para la síntesis de cDNA

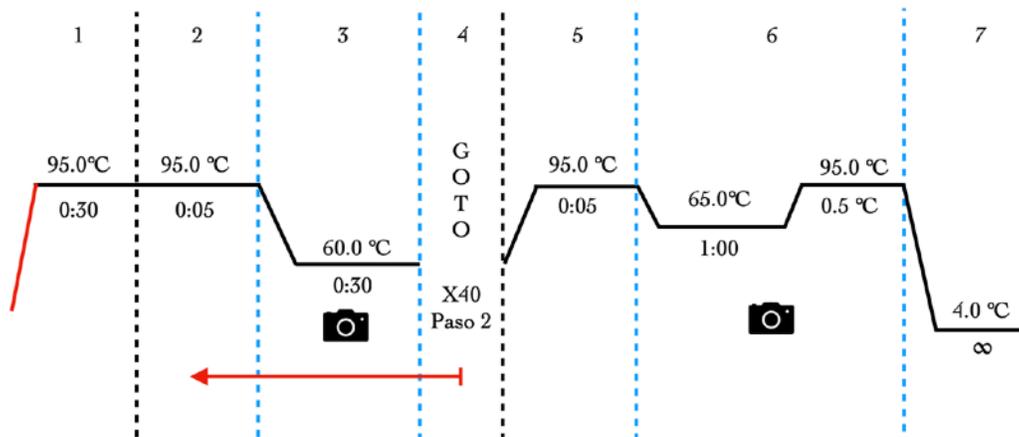


Figura 15. Condiciones de qPCR para medir la expresión de *ANRIL*/ACTINA.

Primer	Secuencia	Tamaño de amplicón
<i>ANRIL</i> Fw	5' ACACACATCAAAGGAGAATTTT 3'	167 pb
<i>ANRIL</i> Rv	5' CCGTCTCTACTGTTACCTC 3'	
ACTINA Fw	5' CTCACCCTGAAGTACCCCATC 3'	230 pb
ACTINA Rv	5' GATAGCACAGCCTGGATAGCAA 3'	

Tabla 2. *Primers* de *ANRIL* y ACTINA para PCR punto final y qPCR.

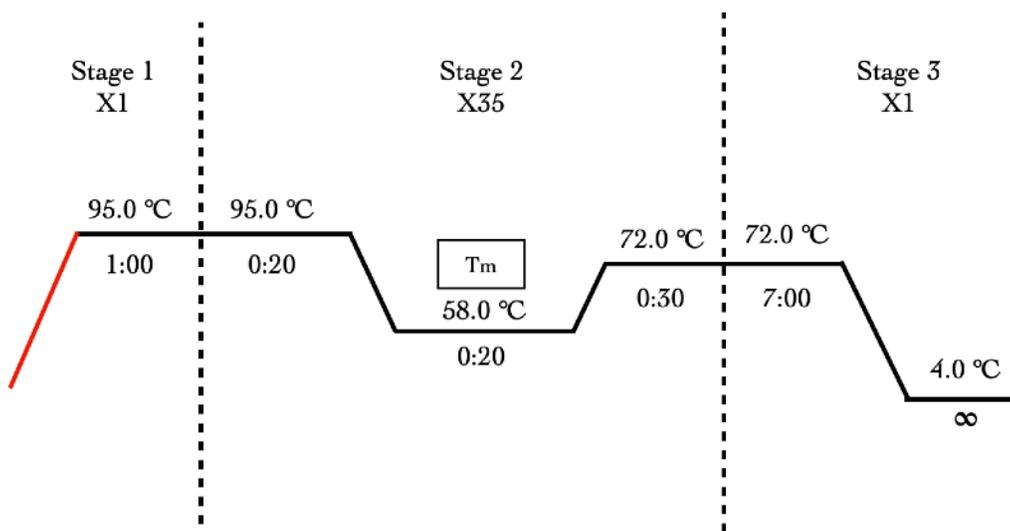


Figura 16. Condiciones de PCR para amplificar *ANRIL* y ACTINA.

► Ensayo de recombinación homóloga mediante luciferasa

A. Construcción del sistema de recombinación homóloga (R-LuxHR)

El sistema reportero R-LuxHR se compone de tres vectores, dos de ellos derivados de pMIR-report. El primero, pLucΔ5ORF, tiene función de secuencia donadora y el segundo, pLucΔ3ORF incorpora dos sitios de corte para la meganucleasa I-SceI en el extremo 3' del marco abierto de lectura (ORF) de la luciferasa que interrumpen la codificación del gen. El tercer vector del sistema, ISceI-GR-RFP, codifica para la meganucleasa I-SceI que generará roturas de doble cadena de DNA específicamente en el ORF de la luciferasa presente en pLucΔ3ORF.

Para la construcción del vector pLucΔ5ORF, se linealizaron 2 μg de pMIR-report con la enzima de restricción EcoRI. Este vector digerido se visualizó en un gel de agarosa al 0.8%, se purificó mediante el kit PureLink “Quick Gel Extraction Kit” (Invitrogen) y se cuantificó con un Epoch (BioTek Instruments). Posteriormente, se re-ligaron 100 ng de plásmido linealizado con la enzima DNA T4 ligasa.

Para la construcción del vector pLucΔ3ORF se linealizaron y purificaron 2 µg de pMIR-report con las enzimas HindIII/EcoRV, posteriormente se ligó una secuencia *Linker* (Tabla 3) al pMIR-report linealizado para eliminar un sitio de restricción de EcoRV y obtener el vector “pMIR-ΔEcoRV”. Esta nueva construcción fue linealizada y purificada con las enzimas XhoI/EcoRV, después fue ligado un *g-Block* (DNA de doble cadena sintetizado químicamente por *Integrated DNA Technologies*) con sitios de restricción para la enzima I-SceI (Tabla 3). El *g-Block* se amplificó por PCR con las condiciones de la Fig. 17 y se visualizó en un gel de agarosa al 1%, la banda de interés (528 pb) se purificó con el Kit PureLink “Quick Gel Extraction Kit” de Invitrogen[™] y se cuantificó con un Epoch.

Subsecuentemente, se realizó un ensayo de restricción doble y purificación de 1 µg de *g-Block* con las enzimas XhoI/EcoRV. La ligación de pMIR-report y *Linker* fue a una relación 7:1 mientras que la ligación pMIR-ΔEcoRV y *g-Block* fue a una relación 5:1. Ambas construcciones fueron transformadas en cepas *E. coli* no recombinantes SURE (*Stop Unwanted Rearrangement Events*). El plásmido resultante pLucΔ3ORF fue secuenciado para corroborar la obtención de la construcción.

Para el alineamiento de los *primers* Fw y Rv (*Linker*, shRNA1 y shRNA2) se ajustó la concentración de alícuotas de *primers* a 1 µg/µL, posteriormente se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5ml: 2 µg (2 µL) de *primer* Fw + 2 µg (2 µL) de *primer* Rv + 46 µL de Buffer de alineación de DNA 1X (reacción total 50 µL, masa total 4 µg), se homogenizó la muestra y se colocó en un termoblock a 90 °C por 3 min y subsecuentemente a 37 °C por 1hr.

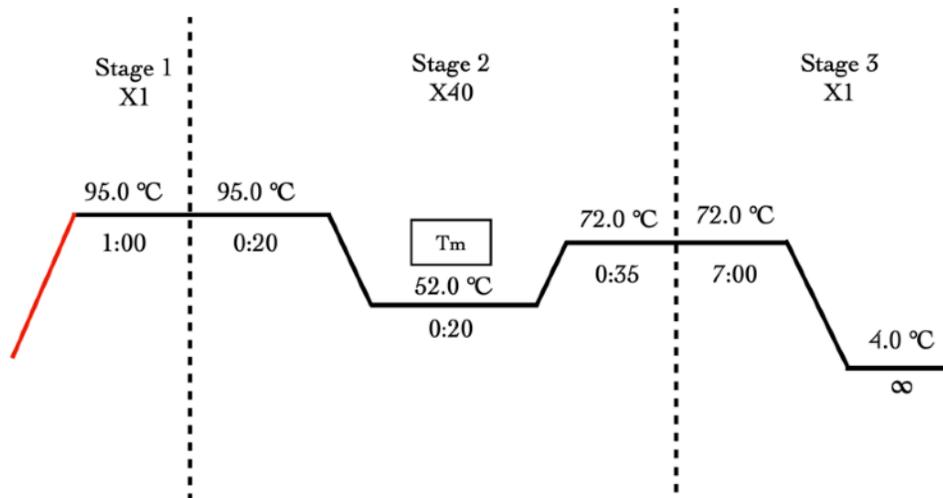


Figura 17. Condiciones de PCR para la amplificación del *g-Block* (528 pb)

Primer	Secuencia
<i>Linker</i> Fw	5'-AGCTTAACTGTTTAAACCCCTTTCATCACTCGAGCAATTCCAATTCAGCGGGCCACCTGAT-3'
<i>Linker</i> Rv	5'-ATCAGGTGGCCCGCTGAATTGGAATTGCTCGAGTGATGAAAGGGTTTAAACAGTTA-3'
<i>g-Block</i> (Doble cadena)	5'_GGGCCCACGCACGCGTCTATGCCGGCCTATGAGCTCCCTCACTAGTGCGCAGCTTTCATCACTCG AGCAATTTGGACTTTCGGCCCTTCTTGGCCTTATGAGGATCTCTCTGATTTTTCTTGGCTCGAGTTT TCCGGTAAGACCTTTCGGTACTTCGTCCACAAACACAACCTCCTCCGCGCAACTTTTTCGCGGTTGTTA CTTGACATAGGGATAACAGGGTAATGTAAGCTTGTTCATTTGCACCTAGTATGTAAGGTCAATTCTGTT CATTTGCATAGGAGATAATCATAGGAATCCCAAATTAATACACTCTTGTGCTGACTTACCAGATGGGAC ACTCTAAGATTTCTGCATAGTAGGAGATAATTTACTCAACTAAAATTAAGCTAATTACCCTGTTATCCC TAAAAGTTCACCGCGTCATCGTCCGGAAGACCTGCCACGCCCGCTCGAAGATGTTGGGGTGTG TAACAATATCGATTCCAATTCAGCGGGGGCCACCTGATATCATGA_3'
<i>g-Block</i> Fw	5'-AATTAATAGGGCCACGCACGC-3'
<i>g-Block</i> Rv	5'-GGGCCACCTGATATCATGA-3'

Tabla 3. Secuencias “*Linker*” y “*g-Block*” para la construcción del sistema reportero de recombinación homóloga.

B. Medición de la reparación por recombinación homóloga con el sistema reportero en TNBC

Para medir la tasa de reparación por recombinación con la expresión basal de *ANRIL* en ambas líneas de TNBC, se introdujo la nucleasa I-Sce-I por transfección reversa y cotransfectaron los plásmidos pLuc Δ 3ORF+pLuc Δ 5ORF+pGL4. Posteriormente se realizó la lisis celular en un equipo Labnet Rocker (Shaker) por 15 min a 120 rpm con el kit Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente se midió la actividad relativa de la luciferasa con un luminómetro GloMax[®] Navigator (Promega) en una placa opaca con fondo transparente, 20 μ L de muestra y el protocolo *Dual-Luciferase Reporter Assay System* con la configuración por default, que consiste en la inyección de 100 μ L de Buffer *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) y 10 s de lectura de luminiscencia (Luciferasa), seguidos de la inyección de 100 μ L de Buffer *Stop e³ Glo* y 10 s de lectura de luminiscencia (*Renilla*). Para medir la tasa de reparación con la manipulación de la expresión de *ANRIL*, se utilizó la misma metodología antes mencionada incorporando en BT-20 el vector pSilencer+shRNA1/2 y en MDA-231 el vector pcDNA_3.1+ANRIL.

Los triplicados biológicos de luminiscencia emitidos por *Luciferasa/Renilla* en cada experimento (pMIR-report, pLuc Δ 3ORF, pLuc Δ 5ORF, ISceI-GR-RFP, R-LuxHR, R-LuxHR+pcDNA3.1_ANRIL y R-LuxHR+shRNA1/2) fueron promediados, seguido de una división del promedio de *Luciferasa* entre el promedio de *Renilla*, finalmente cada resultado se dividió entre el dato resultante del control transfectado con pMIR-report. e.g. MDA-231: 2.13E-04/1.03E-01 y en BT-20: 1.18E-04/5.37E-02. Todos los datos se reportan en el Anexo 4 (Tabla A2 y A3).

► Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Graphpad Prism 10. Las barras de error mostradas en cada gráfica corresponden a la media \pm la desviación estándar. La expresión basal, sobreexpresión y subexpresión de *ANRIL* se analizaron mediante T-student con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Resultados

► Expresión del lncRNA *ANRIL* en BT-20, MDA-MB-231 y MCF10A

Tanto en BT-20 como en MDA-231 se amplificó por PCR el lncRNA *ANRIL* para comprobar la especificidad de los *primers* Fw y Rv del lncRNA. El ensayo de PCR punto final resultó en la amplificación de una banda única de 167 pb en ambas líneas celulares de TNBC mostrando la especificidad de los *primers* en la amplificación de *ANRIL* (Anexo 1) (Fig. A1 y A2). Posteriormente, se midió la expresión basal de *ANRIL* en la línea no tumoral MCF10A y líneas derivadas de TNBC: BT-20 y MDA-231 mediante RT-qPCR. Evaluar estas líneas celulares permitió tener un sistema para comparar los efectos en la recombinación homóloga (HR) con alta y baja expresión de *ANRIL*. La expresión de *ANRIL* en BT-20 y MDA-231 fue de 519.1 y 4.04 veces más respecto a MCF10A mostrando la sobreexpresión del lncRNA en TNBC y dentro de las líneas tumorales una mayor expresión de *ANRIL* en BT-20 respecto a MDA-231 (Fig.18).

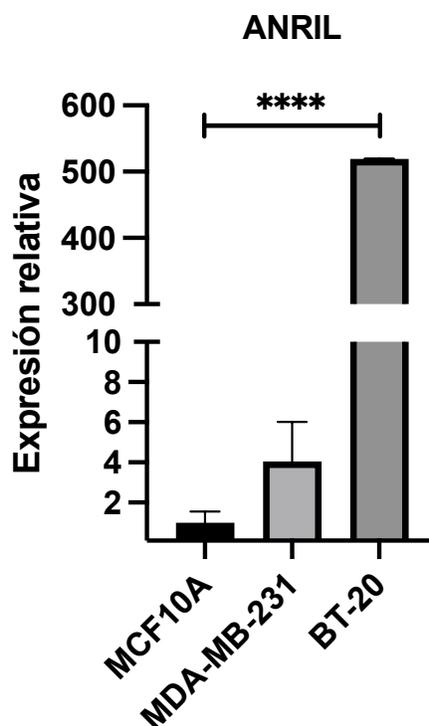


Figura 18. Expresión basal de *ANRIL* en TNBC. Expresión relativa del lncRNA *ANRIL* en línea no tumoral MCF10A y líneas celulares tumorales BT-20 y MDA-MB-231. La expresión del lncRNA fue normalizada con el *housekeeping gene* ACTINA y sometida al método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Triplicado biológico en MDA-231/BT-20 y duplicado biológico en MCF10A. La gráfica muestra el promedio +/- la desviación estándar.

► Manipulación de la expresión de *ANRIL* en MDA-MB-231 y BT-20

Una vez conocida la expresión basal de *ANRIL* en ambas líneas de TNBC, se manipuló la expresión del lncRNA. El uso de shRNAs en BT20 mostró la inhibición de la expresión de *ANRIL* (Fig.19A) y en MDA-231 con el plásmido pcDNA_3.1+*ANRIL* la sobreexpresión del lncRNA (Fig.19B), la evaluación de la expresión relativa de *ANRIL* se verificó mediante RT-qPCR.

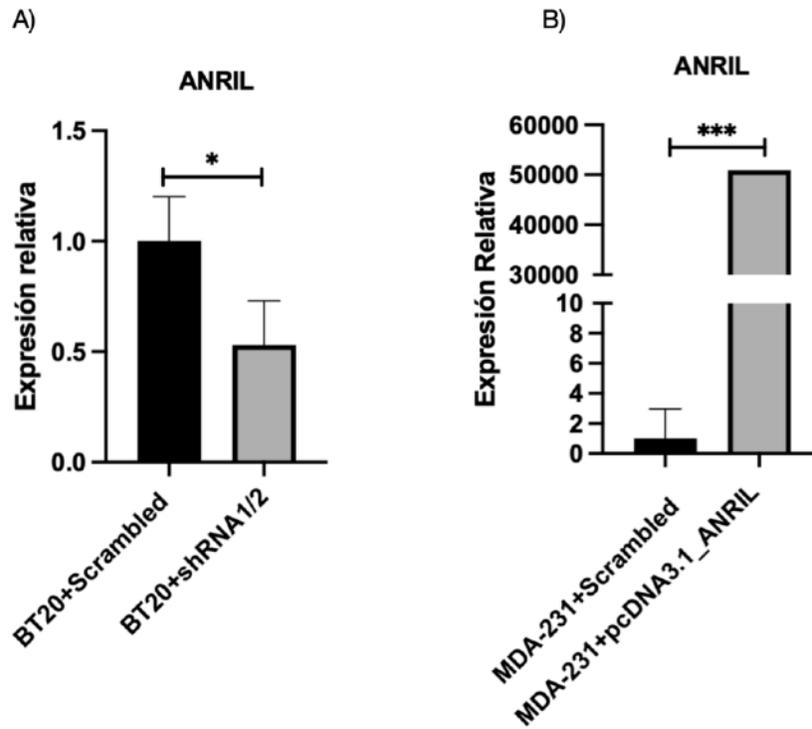


Figura 19. Manipulación en la expresión de *ANRIL*. A) Subexpresión de *ANRIL* mediante shRNA1+2 en BT-20. El control empleado en BT-20 fue un scrambled de pSilencer ligado a una secuencia aleatoria mientras que en MDA-MB-231 se usó pcDNA_3.1 circularizado. B) Sobreexpresión de *ANRIL* con el plásmido pcDNA_3.1+*ANRIL* en MDA-231. La expresión del lncRNA en ambos casos se normalizó con el *housekeeping gene* ACTINA empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Triplicado biológico en MDA-231/BT-20. Las gráficas muestran el promedio \pm la desviación estándar.

► Diseño del sistema reportero de recombinación homóloga R-LuxHR

El sistema reportero R-LuxHR se compone de 3 plásmidos: **pLuc Δ 3ORF**, **pLuc Δ 5ORF** e **ISceI-GR-RFP** (Fig. 20). De este conjunto de plásmidos, **pLuc Δ 3ORF** y **pLuc Δ 5ORF** provienen de la modificación de pMIR-report (Fig. 20A).

El plásmido **pLuc Δ 3ORF** tiene una modificación en la región 3' del ORF de la luciferasa, presenta dos sitios de corte para la meganucleasa I-SceI flanqueados por dos secuencias homólogas requeridas en la reparación por HR, esta modificación trunca el ORF de la luciferasa anulando la actividad de la enzima (Fig. 20B). El plásmido **pLuc Δ 5ORF** presenta una delección completa de la región promotora de la luciferasa y de 661 pb en la región 5' del ORF del gen impidiendo la transcripción y traducción de la enzima, la función de esta molécula es servir como una secuencia molde para la reparación por HR (Fig. 20C); El plásmido **ISceI-GR-RFP** codifica para la nucleasa I-SceI y su función es generar cortes de doble cadena en el DNA (Fig. 20D).

El sistema reportero R-LuxHR funciona de la siguiente manera: El plásmido **pLuc Δ 3ORF** codifica para una luciferasa trunca en su extremo carboxi-terminal, incapaz de degradar el sustrato de luciferina y emitir luminiscencia.

Al transcribirse y traducirse el plásmido **ISceI-GR-RFP** en la célula, la enzima I-SceI reconoce los sitios que se encuentran específica y exclusivamente en el plásmido **pLuc Δ 3ORF** para provocar dos lesiones en la cadena doble de DNA, dejando expuestas dos secuencias homólogas (brazos homólogos) que serán reconocidas por el mecanismo de reparación por HR, este mecanismo ejercerá una "búsqueda" de secuencias homólogas que han sido dañadas, la única fuente de regiones idénticas se encuentran en el plásmido **pLuc Δ 5ORF** (Fig. 20E), por lo que el sistema de reparación por HR lo usará como secuencia molde para reparar los daños ejercidos por la enzima de restricción I-SceI y reconstituir el ORF de la luciferasa generando una enzima capaz de degradar el sustrato y emitir luminiscencia (Fig. 20F).

Entonces, la actividad relativa de la luciferasa será el mecanismo para medir cuantitativamente la tasa de reparación por HR en las líneas celulares de TNBC pues es proporcional a la reconstitución del ORF mediante HR, es decir, entre mayor tasa de HR mayor señal de luciferasa.

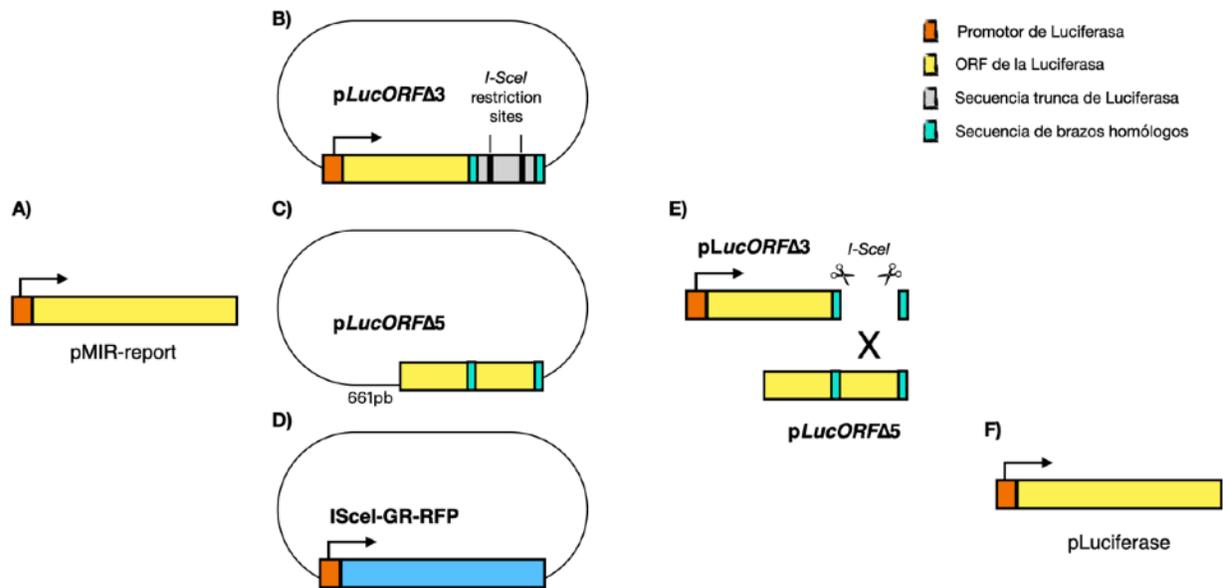


Figura 20. Sistema reportero de recombinación homóloga R-LuxHR. A) pMIR-report, plásmido sin modificación en el ORF de la luciferasa. B) pLuc Δ 3ORF, plásmido con modificación de la región carboxi-terminal incorporando sitios de corte I-SceI para truncar el ORF de la luciferasa. C) pLuc Δ 5ORF, plásmido con función de molde, presenta la delección del promotor y de 661 pb del ORF de la luciferasa. D) ISceI-GR-RFP, plásmido que codifica la meganucleasa I-SceI. E) Funcionamiento del sistema reportero R-LuxHR. F) Reconstitución del ORF de la luciferasa de pLuc Δ 3ORF mediante reparación por HR.

► Construcción del sistema reportero de recombinación homóloga R-LuxHR

● *Vector pLucΔ3ORF*

Para generar el plásmido **pLucΔ3ORF**, primero pMIR-report fue digerido con las enzimas HindIII/EcoRV para producir un extremo cohesivo y un extremo romo en la molécula (Fig. 21).

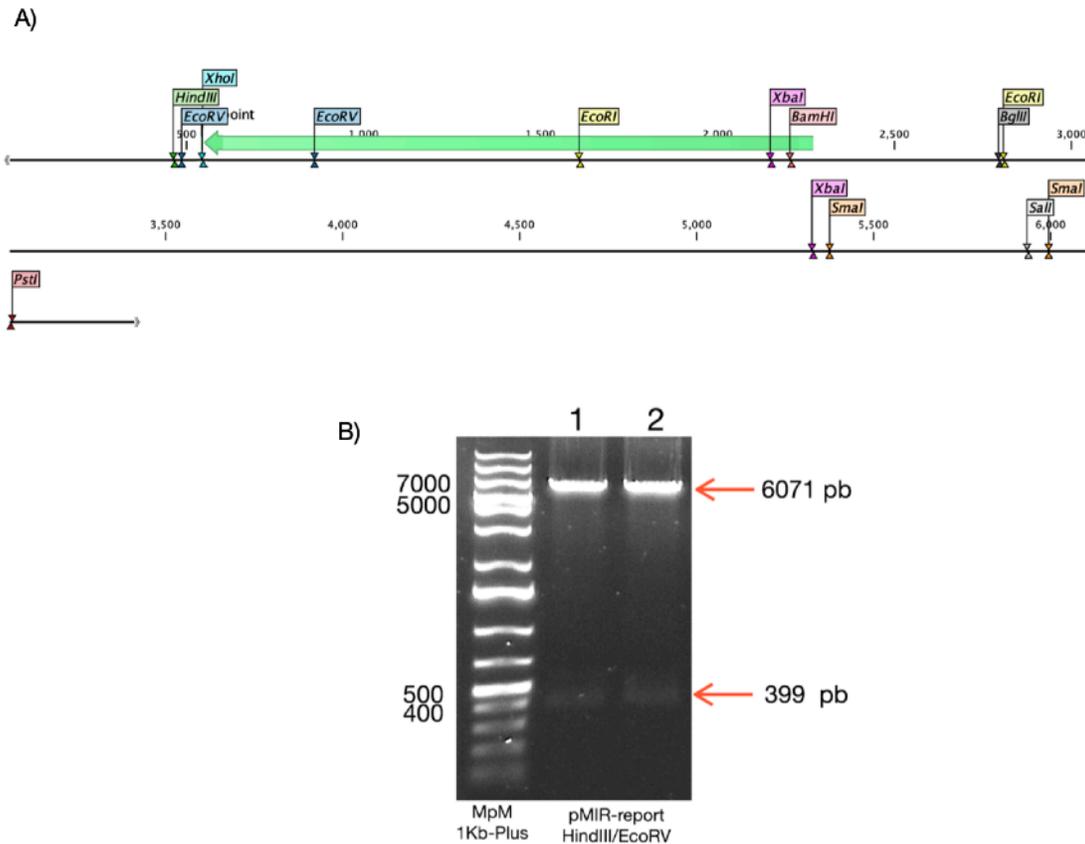


Figura 21. pMIR-report. A) ORF de la luciferasa (verde) y sitios de restricción enzimática en pMIR-report (6470 pb). B) Digestión de pMIR-report con enzimas HindIII/EcoRV generando una banda de 6071 pb y liberando un fragmento de 399 pb para eliminar un sitio de restricción EcoRV (1, 2). MpM (Marcador de peso molecular).

Posteriormente, se ligó una secuencia *Linker* con extremos 5' y 3' compatibles con los sitios de corte para HindIII/EcoRV generados en pMIR-report (Fig. 22).

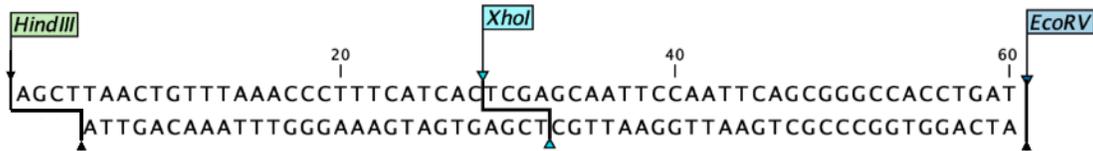


Figura 22. Secuencia *Linker*. Secuencia de doble cadena de DNA (60 pb) con sitio de corte Xho-I flanqueado por extremos 5' HindIII (*Sticky end*, Cohesivo) y 3' EcoRV (*Blunt end*, Romo)

La ligación del *Linker* a pMIR-report permitió mantener el sitio de restricción Xho-I y eliminar el sitio de restricción EcoRV que se encuentra flanqueado por HindIII y Xho-I para obtener el plásmido **pMIR-ΔEcoRV** (Fig. 23).

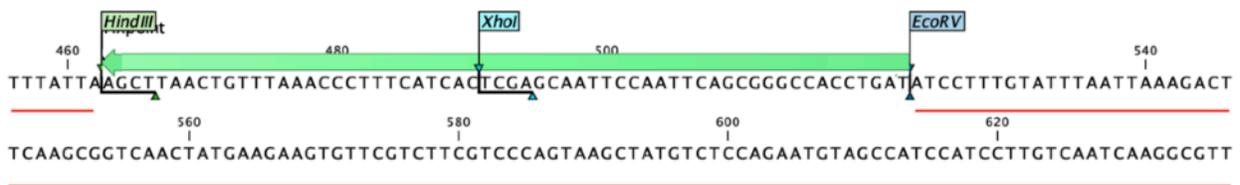


Figura 23. pMIR-ΔEcoRV. Modificación de pMIR-report eliminando un sitio de restricción de EcoRV mediante la ligación del *Linker*. Secuencia *Linker* (Verde), pMIR-report (Rojo).

Esté nuevo plásmido (**pMIR-ΔEcoRV**) fue sometido a un ensayo de restricción doble con las enzimas Xho-I/EcoRV para generar extremos cohesivo y romo, además se realizaron ensayos de restricción independientes con las enzimas Xho-I y EcoRV para comprobar la obtención y modificación del mismo (Fig. 24).

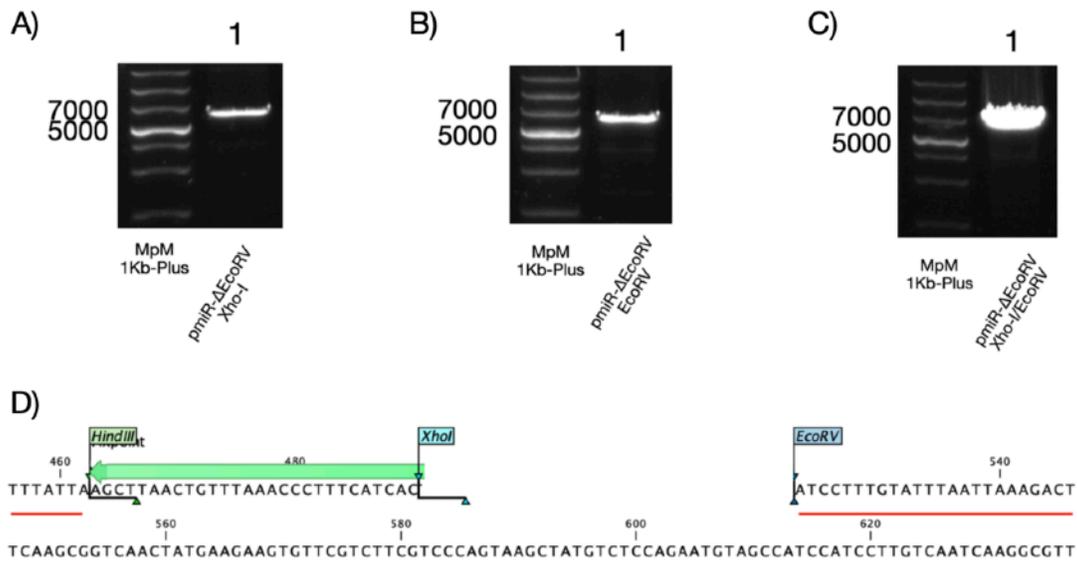
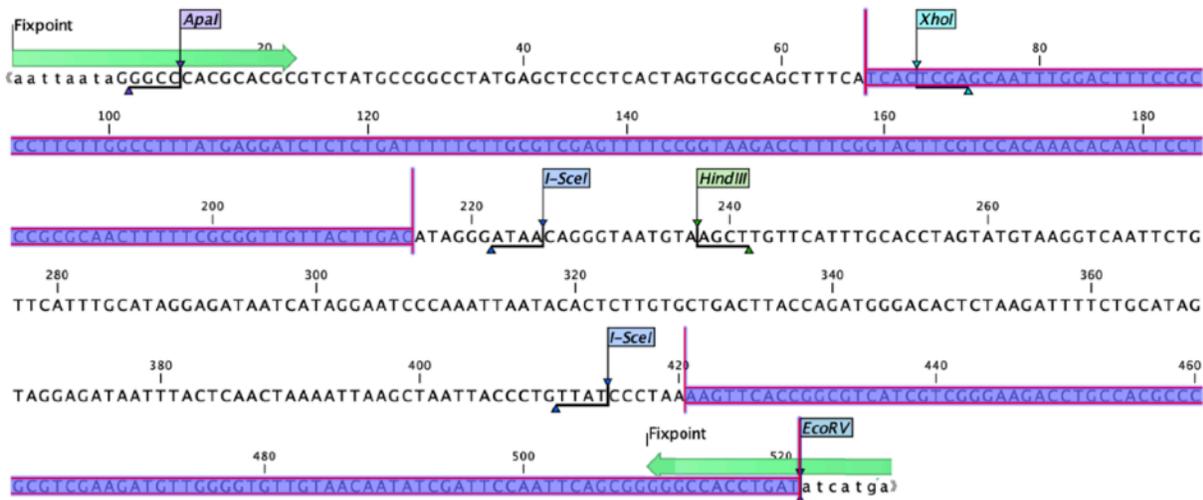


Figura 24. pMIR-ΔEcoRV. A y B) Plásmido **pMIR-ΔEcoRV** sometido a un ensayo de restricción sencillo con Xho-I y EcoRV generando una banda de 6131pb. C y D) Ensayo de restricción doble Xho-I/EcoRV obteniendo una banda de 6099 pb para generar extremos cohesivo/romo y la eliminación de 32 pb del *Linker*. Secuencia *Linker* interrumpida por ensayo de restricción doble Xho-I/EcoRV (Verde), pMIR-report (Rojo). MpM (Marcador de peso molecular).

Por otra parte, se amplificó por PCR punto final una secuencia de 528 pb (*g-Block*) que contiene 2 sitios de restricción para la nucleasa I-SceI flanqueados por 2 secuencias homólogas del gen constitutivo de la luciferasa (Fig. 25) subsecuentemente, el amplicón fue procesado con un ensayo de restricción doble Xho-I/EcoRV generando extremos 5' cohesivo y 3' romo, obteniendo la secuencia *g-Block-XE* (Fig. 26).

A)



B)

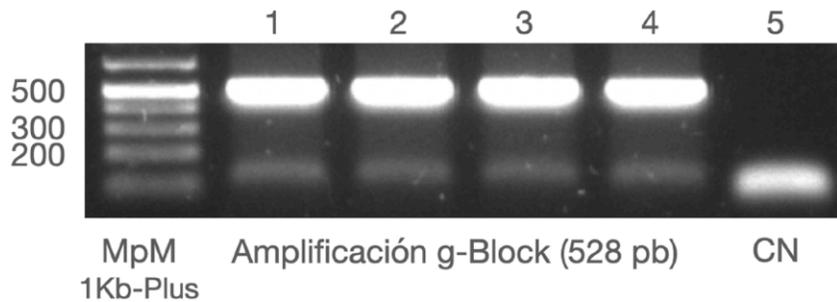


Figura 25. *g-Block*. A) Secuencia del *g-Block* (528 pb) con 2 sitios de corte para la meganucleasa I-SceI flanqueado por 2 secuencias homólogas del gen constitutivo luciferasa. B) Amplicón de 528 pb del *g-Block* mediante PCR punto final (1-4). *Primer Fw y Rv* (Verde), *Secuencias homólogas* (Morado), MpM (Marcador de peso molecular), CN (Control negativo).

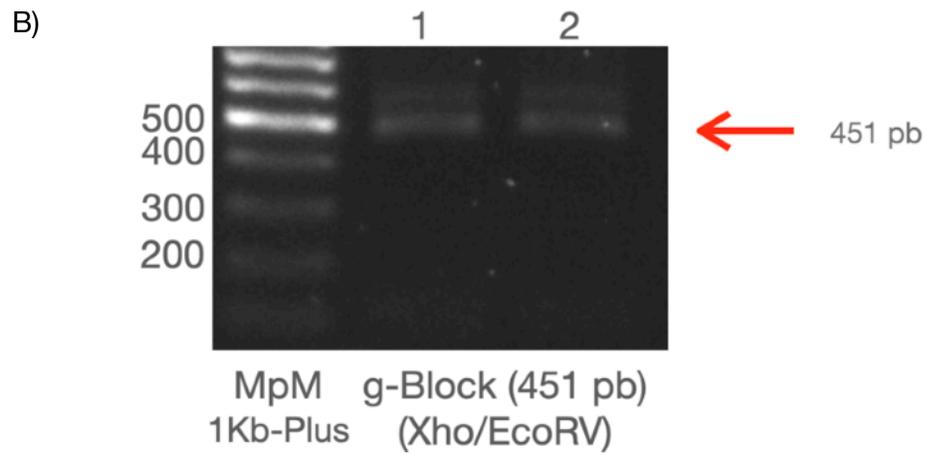
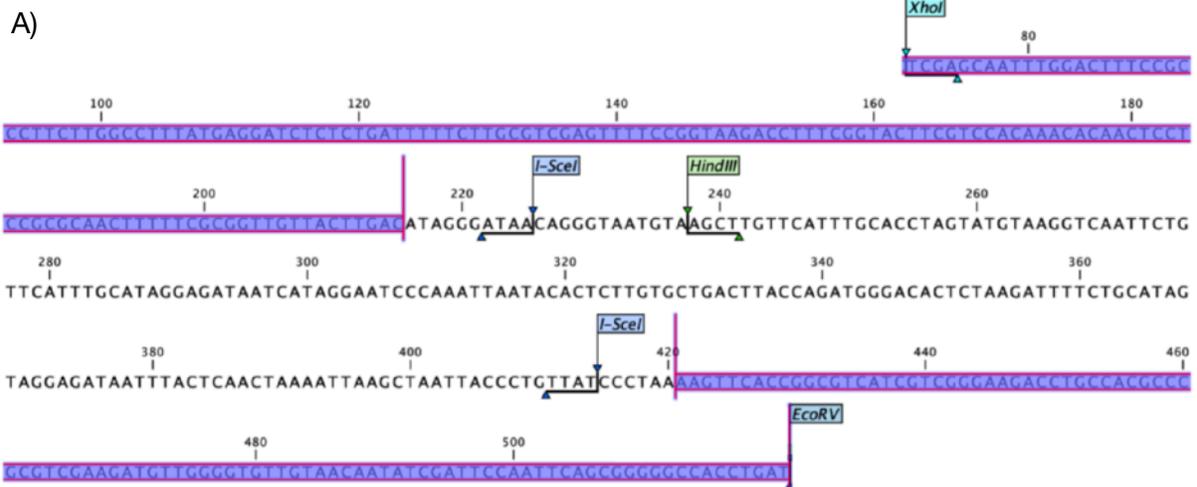


Figura 26. Secuencia *g-Block-XE* A) Mapa de *g-Block-XE* procesada con enzimas XhoI/EcoRV. B) Ensayo de restricción doble XhoI/EcoRV de *g-Block* liberando una banda de 451 pb (1-2). MpM (Marcador de peso molecular), Secuencias homólogas (Morado).

Finalmente se ligó la secuencia **gBlock-XE** con el plásmido **pMIR-ΔEcoRV** para obtener el plásmido **pLucΔ3ORF**. La ligación del gBlock permitió integrar dos sitios de corte para la mega nucleasa I-SceI, dos secuencias homólogas y un nuevo sitio de restricción HindIII. Los plásmidos procedentes de las colonias positivas fueron sometidos a un ensayo de restricción con la enzima HindIII liberando un fragmento de 199 pb y un ensayo de restricción doble con las enzimas XhoI/EcoRV liberando un fragmento de 451 pb; subsecuentemente, se realizó la secuenciación de las muestras. Estos 2 ensayos permitieron demostrar la obtención del plásmido **pLucΔ3ORF** del sistema reportero R-LuxHR (Fig. 27).

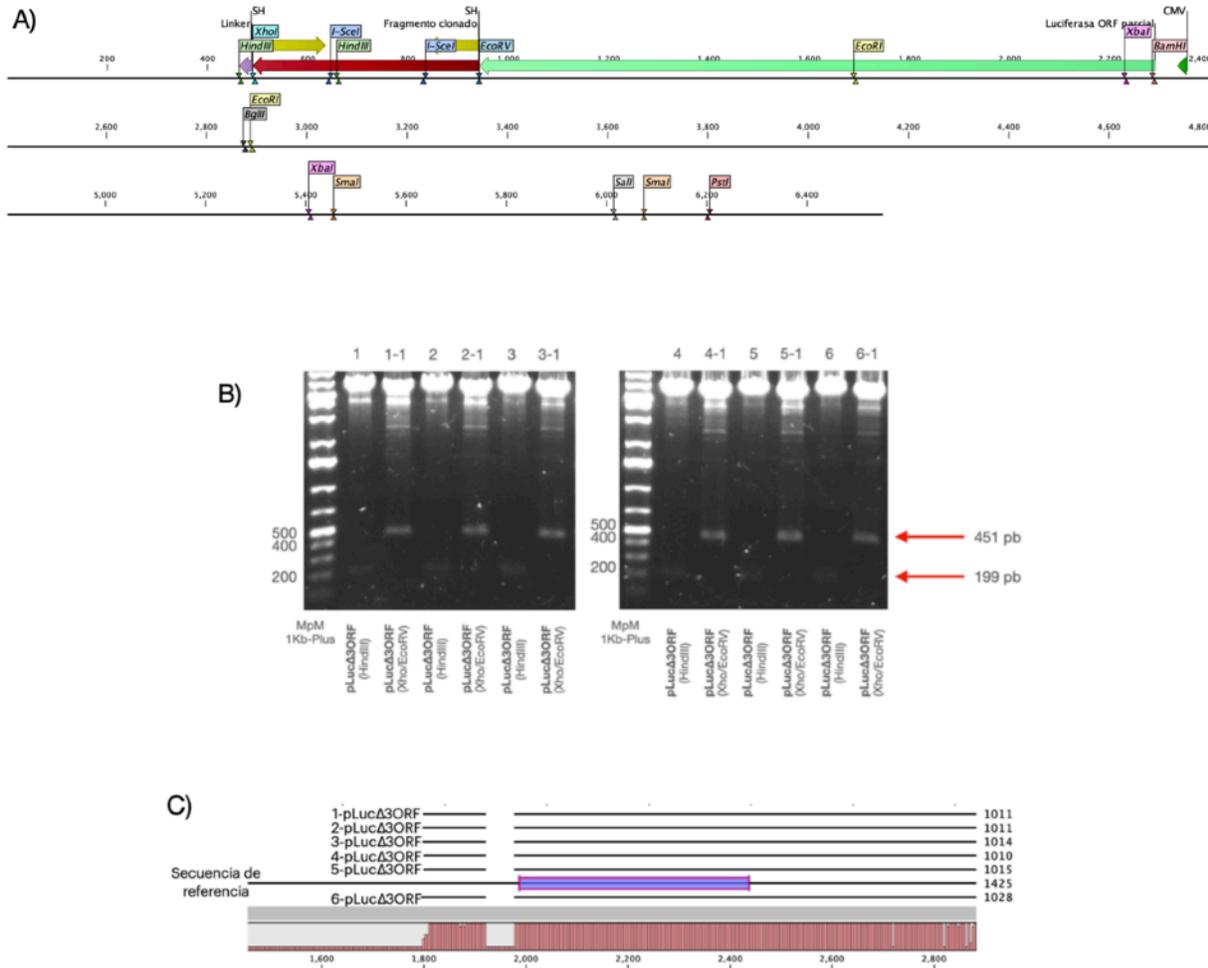


Figura 27. pLucΔ3ORF. A) Mapa de la secuencia y sitios de restricción de **pLucΔ3ORF**. ORF trunco de la luciferasa (Verde), gBlock/fragmento clonado (Rojo), Linker (Morado), Secuencias homólogas (Amarillo), CMV promotor. B) Ensayos de restricción con HindIII en muestras positivas 1 a 6, liberación de un fragmento de 199 pb y ensayo de restricción doble con XhoI/EcoRV liberando un fragmento de 451 pb en muestras 1-1 a 6-1. C) Alineación de muestras de secuenciación 1-6 **pLucΔ3ORF** con secuencia de referencia (color morado).

© Vector *pLucΔ5ORF*

Para generar el plásmido *pLucΔ5ORF*, *pMIR-report* fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* para eliminar la región promotora y 660 pb de la región 5' del ORF de la luciferasa, una vez digerido, el plásmido fue ligado para recircularizar la molécula y generar el segundo plásmido del sistema reportero. Para comprobar la obtención del mismo, el plásmido fue sometido a un ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* (Fig. 28).

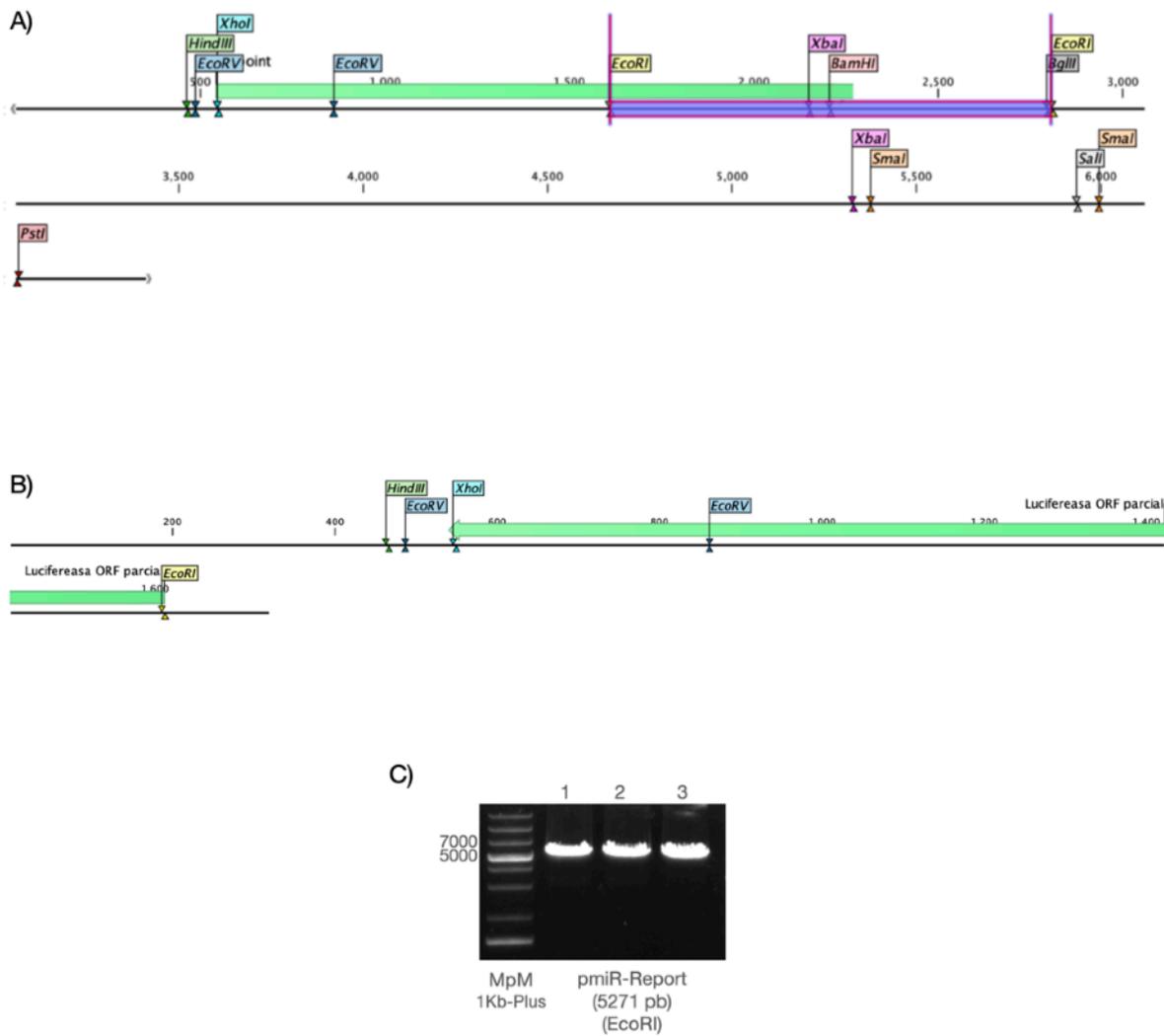


Figura 28. *pLucΔ5ORF*. A) Región de 1199 pb a deletar en *pMIR-report* con *EcoRI* (Morado). ORF del gen de la luciferasa (Verde). B) *pLucΔ5ORF*, marco de lectura parcial de la luciferasa por corte con *EcoRI*. ORF parcial de la luciferasa (Verde). C) Ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* para verificar la obtención del plásmido del sistema reportero, linealización de la molécula (5271 pb) (1-3). MpM (Marcador de peso molecular).

© *Vector ISceI-GR-RFP*

El plásmido **ISceI-GR-RFP Addgene** fue clonado y se realizó un ensayo de restricción con la enzima XhoI linealizando la molécula, generando una banda con un peso de 6276 pb, comprobando la obtención del plásmido **ISceI-GR-RFP** (Fig. 29).

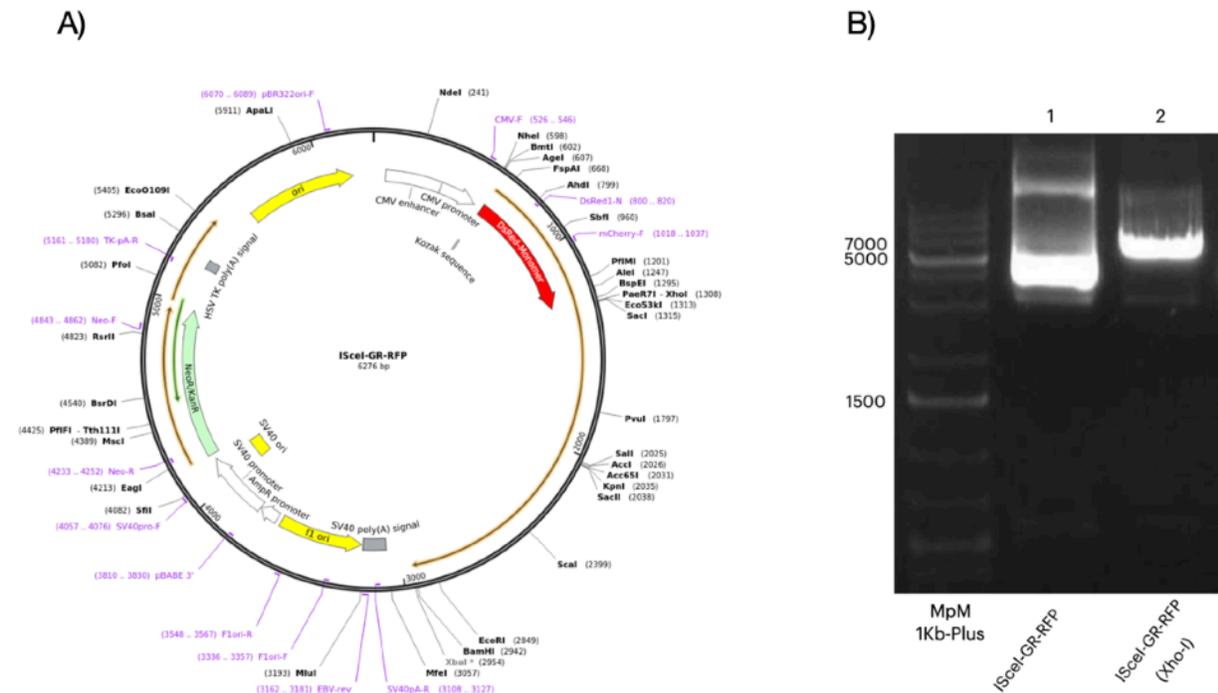


Figura 29. ISceI-GR-RFP. A) Mapa molecular del plásmido ISceI-GR-RFP. B) Versión circular del plásmido (1) y linealización con la enzima de restricción XhoI obteniendo 6276 pb correspondientes al tamaño del plásmido (2). MpM (Marcador de peso molecular).

Debido a que este es el primer trabajo en el que se desarrolla y construye un sistema reportero a base de luciferasa para medir la tasa de recombinación homóloga en líneas celulares, se realizó la solicitud para registro de patente del vector **R-LuxHR** ante la Coordinación de Vinculación y Transferencia Tecnológica, Dirección de Transferencia Tecnológica, Coordinación de Propiedad Intelectual de la UNAM. Área que se encarga de revisar la información, previo al ingreso ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

► Tasa de reparación por HR en MDA-MB-231 y BT-20 con expresión basal y diferencial de *ANRIL*

Para determinar si el lncRNA *ANRIL* modula la recombinación homóloga en las líneas de TNBC, primero se midió la tasa de reparación con expresión basal de *ANRIL* utilizando el sistema reportero R-LuxHR. Para comprobar la especificidad del sistema reportero y medir la reparación en BT-20 y MDA-MB-231, se utilizaron 4 controles: pMIR-report, pLuc Δ 3ORF, pLuc Δ 5ORF e ISceI-GR-RFP.

El primero fue el plásmido pMIR-report sin modificaciones en el ORF de la luciferasa, la transfección en ambas líneas mostró niveles de actividad que se consideraron como basales, asignándoles un valor de 1. Posteriormente, se transfectaron independientemente los plásmidos **pLuc Δ 3ORF**, **pLuc Δ 5ORF** e **ISceI-GR-RFP** en ambas líneas celulares. **pLuc Δ 3ORF** al tener una modificación en la región 3' del ORF de la luciferasa, la actividad de la misma en ambas líneas de TNBC fue nula. **pLuc Δ 5ORF** sin promotor y con una deleción en la región 5' del ORF de la luciferasa muestra el mismo comportamiento que **pLuc Δ 3ORF** para ambas líneas. La transfección del plásmido **ISceI-GR-RFP** no mostró actividad de luciferasa pues este vector solo codifica para la meganucleasa I-SceI (Fig 30A-B).

Por último, la transfección del sistema reportero completo R-LuxHR (**pLuc Δ 3ORF** + **pLuc Δ 5ORF** + **ISceI-GR-RFP**) en MDA-231 con expresión basal de *ANRIL* mostró una actividad relativa de **0.0589** mientras que en BT-20 una actividad de **1.29**. Este resultado corresponde a la capacidad de reparación por recombinación homóloga en ambas líneas celulares, mostrando que BT-20 presenta una mayor activación del mecanismo de reparación respecto a MDA-231 (Fig. 30).

Una vez conocida la capacidad que tienen ambas líneas celulares para activar la reparación por recombinación homóloga con expresión basal de *ANRIL*, se manipuló la expresión del lncRNA con pcDNA_3.1+ANRIL y shRNA1/2 para sobreexpresar y subexpresar al lncRNA en las líneas MDA y BT20, respectivamente. La transfección de pcDNA_3.1+ANRIL en MDA-231 aumentó la HR 4.5 veces respecto a la expresión basal del *ANRIL* alcanzando un valor de **0.323** respecto a la actividad basal de pMIR-report. En BT-20 la transfección de shRNA1+2 disminuyó la HR mas de 18 veces respecto a la expresión basal del *ANRIL* y alcanzó un valor de **0.0704** respecto a la actividad basal de pMIR-report. De esta forma, se comprobó que la manipulación de la expresión del lncRNA *ANRIL* en líneas celulares de TNBC modifica la activación del mecanismo de reparación por HR (Fig 30).

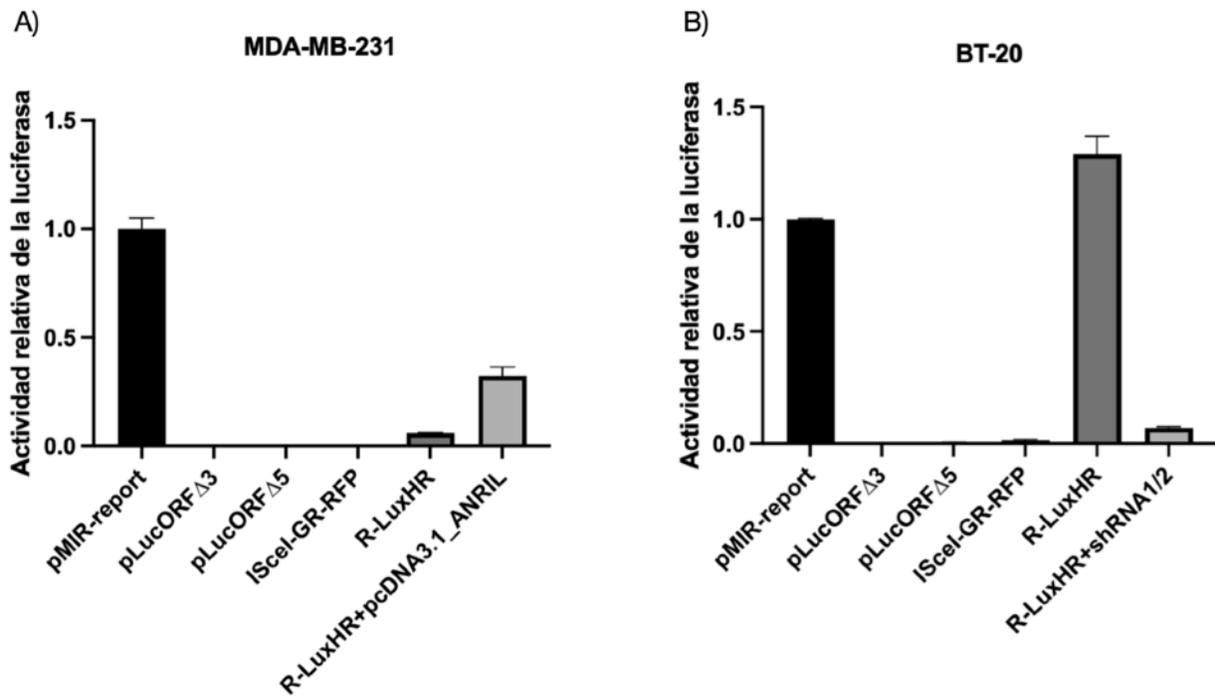


Figura 30. Tasa de reparación por recombinación homóloga en TNBC. A y B) Controles del sistema reportero R-LuxHR: actividad de pMIR-report con valor de 1, pLuc Δ 3ORF sin actividad, pLuc Δ 5ORF sin actividad e ISceI-GR-RFP sin actividad. A) MDA-MB-231: tasa de HR con expresión basal de *ANRIL* 0.0589 (R-LuxHR) y con sobreexpresión del lncRNA 0.323 (R-LuxHR+pcDNA3.1_ANRIL). B) BT-20: tasa de HR con expresión basal de *ANRIL* 1.29 (R-LuxHR) y con la subexpresión del ncRNA 0.0704 (R-LuxHR+shRNA1/2). Triplicado biológico de cada experimento en MDA-231 y BT-20. Las gráficas muestran el promedio +/- la desviación estándar.

Discusión

Este trabajo constituye el primer avance para analizar el papel del lncRNA no codificante *ANRIL* en la reparación de DNA por recombinación homóloga (HR). Primero, se demostró que se sobreexpresa en las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-20 respecto a la línea celular no tumoral MCF10A y que se expresa diferencialmente entre ellas. En seguida, con el objetivo de cuantificar la HR, se realizó el diseño y construcción de un sistema reportero para medir la reparación por recombinación homóloga (R-LuxHR) a partir de la cuantificación de la actividad relativa de la luciferasa. Empleando este sistema, se observó una relación directa entre los niveles de expresión de *ANRIL* y la tasa de reparación por recombinación homóloga en ambas líneas celulares. Este es el primer trabajo en el que se desarrolla y utiliza un sistema para evaluar cuantitativamente la reparación por recombinación homóloga a través de luminometría.

La sobreexpresión de *ANRIL* que se observó en las líneas de TNBC de este proyecto concuerda con estudios ya reportados que muestran la misma expresión aberrante (sobreexpresión) del lncRNA en distintas líneas celulares de TNBC: MDA-MB-231, BT549 y HS578T respecto a MCF10A además, este mismo patrón de expresión de *ANRIL* se observa en tejidos de TNBC (Ma et al., 2022).

En este proyecto se observó que existe una amplia diferencia de expresión del lncRNA *ANRIL* entre BT-20 y MDA-MB-231, esto puede ser resultado de los perfiles de expresión que son específicos en cada línea asociados a la clasificación de subtipos moleculares dentro del TNBC (Andreopoulou et al., 2015). Respecto a los subtipos, se ha reportado que MDA-MB-231 pertenece al subtipo *Mesenchymal Stem Like* (MSL) y BT-20 al subtipo *Basal-like 1* (BL1) (Lawrence et al., 2015; Espinosa et al., 2020), otros autores clasifican a MDA-MB-231 en la categoría Basal B donde se encuentran los subtipos *Mesenchymal* (M) y MSL, mientras que BT-20 lo catalogan como Basal A asociado con los subtipos BL1/BL2 (Kosok et al., 2020).

El subtipo M depende de la activación de genes que se asocian con la motilidad y adhesión celular, se favorecen diversos factores de crecimiento, está presente la sobreactivación de vías como TGF β y que promueven la transición epitelio mesenquima (*Epithelial Mesenchymal Transition*, EMT). Mientras tanto, el subtipo BL1 presenta activación potenciada de vías asociadas con los checkpoints del ciclo celular y depende de la activación de genes relacionados con la reparación de DNA (Marra et al., 2020).

Ambos subtipos M y BL1, presentan una carga mutacional elevada en contraste a subtipos BL2 y LAR, que provocan la deficiencia en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga e incrementan la inestabilidad genómica. A pesar de las alteraciones elevadas, han mostrado el aumento en la expresión de proteínas asociadas a la reparación del DNA y transición G2/M del ciclo celular (Lehmann et al., 2021).

La deficiencia en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga está altamente asociada al TNBC y es prevalente en cerca del 50% de los tumores, además, mutaciones esporádicas y germinales en *BRCA1/2* están presentes en ~15% de todos los casos de TNBC (Lee et al., 2020). No obstante, *BRCA1* inactivo por mutaciones en TNBC, puede ser susceptible a mutaciones de reversión (mutaciones secundarias) generadas durante el tratamiento quimioterapéutico que reconstituyen el ORF para generar una proteína funcional. Se ha reportado la identificación de una mutación de

reversión en *BRCA1* que genera la delección de 14 aminoácidos que sobrelapa con la delección de 2 nucleótidos del ORF original de *BRCA1* para corregir el marco del gen en TNBC y disminuir la sensibilidad de las quimioterapias a base de sales de platino (Afghahi et al., 2017). Al igual que en *BRCA1*, *BRCA2* puede ser susceptible a mutaciones secundarias que restablecen la función proteica para desarrollar resistencia a inhibidores de PARP en cáncer de próstata y en cáncer de ovario (Quigley et al., 2017).

Por lo tanto, la reconstitución del ORF en los genes *BRCA* y otros involucrados en la DDR por reversión de mutaciones a partir de estrategias terapéuticas podría generar la reactivación de mecanismos de reparación como la recombinación homóloga en TNBC para favorecer el progreso de la enfermedad, empeorar el pronóstico de la paciente y desencadenar una resistencia a tratamientos que tienen como mecanismo de acción el daño al DNA.

El sistema reportado diseñado y construido en este trabajo ofrece una alternativa respecto a aproximaciones similares. En 1999 Pierce y colaboradores desarrollaron el sistema reportero DR-GFP para medir la reparación por recombinación homóloga a base de la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP) como método semicuantitativo, este sistema consiste en un vector que presenta 2 regiones alteradas del ORF de la GFP distantes una de otra por un gen de resistencia a puomicina (pgk-pur), la primer región alterada del ORF de la GFP (sceGFP) presenta un sitio de restricción para la meganucleasa I-SceI que generará roturas de doble cadena y la segunda región (iGFP) presenta 812 pb del gen constitutivo de la GFP, la resolución de la rotura de doble cadena dará como resultado la reparación y reconstitución del ORF de la GFP mediante HR, la cantidad de fluorescencia emitida por las células serán eventos de reparación por recombinación homóloga (Pierce et al., 1999).

A partir de la creación de este sistema reportero, diversos autores han empleado esta estrategia a base de GFP (con algunas variantes metodológicas) como una opción para medir específicamente la tasa de HR en las células por la reconstitución del ORF de la GFP (Kiziltepe et al., 2005; Nakanishi et al., 2011; Bindra et al., 2013; Wan et al., 2013; Dillon et al., 2022) sin embargo, medir la cantidad de fluorescencia en las células tiene limitantes respecto a la luminiscencia.

El sistema reportero R-LuxHR tiene como finalidad la reconstitución del ORF de la luciferasa mediante HR, una enzima de 61 kDa que se une al sustrato luciferina con ATP para generar una molécula intermedia luciferil-AMP y en contacto con O₂ formar oxyluciferina para lograr la emisión de fotones por medio de una reacción química exotérmica como estado de alta energía.

En ensayos de *high throughput screening* (HTS) donde miden la actividad transcripcional utilizando la cuantificación de la actividad relativa de la luciferasa como gen reportero tienen la ventaja de tener niveles bajos de fondo celular, son altamente sensibles, no es necesario introducir fotones a la muestra ya que estos se generan por una reacción química, además, el gen reportero puede incorporarse a diversas células a través de vectores virales, transfección química o electroporación. En ensayos que utilizan la fluorescencia e.g GFP, donde se requiere la absorción de luz para obtener estados excitados, tienden a generar resultados de fluorescencia muy brillantes ya que existe un alto grado de fotones externos que pueden ser incorporados a la muestra y pueden haber fluoróforos de interferencia, disminuyendo la sensibilidad del ensayo y aumentando el fondo celular. Este tipo de ensayos ha sido

más empleado ya que pueden implementarse fácilmente en el desarrollo experimental y el mecanismo de acción es más conocido entre la comunidad científica (Fan & Wood, 2007).

Respecto a la forma de reparación y reconstitución del ORF de la luciferasa con el sistema R-LuxHR, el ORF no se reconstituye o su reconstitución es casi nula para generar una enzima funcional por medio de otros mecanismos de reparación de doble cadena. Por ejemplo, la unión de extremos mediada por microhomología (*Micro-Homology Mediated End Joining*, MMEJ) puede generar deleciones al unir secuencias de DNA resectadas y así provocar translocaciones cromosómicas o fusiones teloméricas generando inestabilidad genómica en la célula. Se ha reportado que el uso del sistema reportero a base de GFP para medir la HR con sitios de restricción I-SceI se encuentra activa de 8 a 9 veces respecto a MMEJ para lograr la reconstitución del ORF de la proteína verde fluorescente (Truong et al., 2013) por lo cual, el uso de la vía MMEJ para la reparación del sistema R-LuxHR es muy poco probable y se favorece la vía HR.

Otro posible mecanismo de reparación es SSA, este sistema puede causar mutaciones y es capaz de deletar regiones de genes como *BRCA1*, *BTK*, *FANCA* y *SPAST* (Blasiak, 2021; Van de Kooij et al., 2022). Van de Kooij y colaboradores en el 2022 han mostrado que existe una mayor activación de SSA (20 al 25%) en células HEK 293T y U2OS respecto a la HR (0.5 a 5%) utilizando el sistema reportero *DSB-Spectrum_V3* para medir la activación de las vías de reparación mut-Ej, SSA y HR a partir de la expresión de 3 genes reporteros: *Blue Fluorescent Protein* (BFP), *mCherry* y GFP respectivamente. Se reporta que una mayor activación de SSA en el sistema *DSB-Spectrum_V3* puede estar asociada a que existe una gran cantidad de secuencias homólogas del propio sistema próximas a los sitios de roturas de doble cadena lo que favorece la activación de SSA. Finalmente, los autores mostraron que son necesarios los factores Exo1/DNA2 y se requieren 3 Kb entre la región homóloga y los sitios de corte para una óptima reparación mediante SSA a diferencia de los 200 a 300 nucleótidos de resección generados mediante Mre11 y CtIP requeridos en la HR (Exo1/DNA2 no son reguladores de HR)

A pesar de que existe una mayor activación de SSA respecto a HR en HEK 293T y U2OS, los autores midieron independientemente la expresión de los 3 genes reporteros para diferenciar entre los mecanismos de reparación de DNA. Es posible que la alta cantidad de secuencias homólogas transfectadas en las líneas celulares de TNBC activen la SSA y logren reparar el sistema reportero R-LuxHR sin embargo, la distancia de nucleótidos entre la región homóloga y los sitios de corte para I-SceI en R-LuxHR son variables debido a que el sistema reportero se compone de 3 vectores disminuyendo la eficiencia para reparar mediante SSA. Es necesario que, dentro de la optimización del sistema reportero R-LuxHR que se tiene planeada en nuestro grupo de trabajo, asegurar que el mecanismo de reparación activado sea mediante HR.

En este proyecto se demostró que podría existir una correlación entre la expresión de *ANRIL* en TNBC y la reparación por recombinación homóloga. Diversos reportes han mostrado la misma asociación de *ANRIL* y la recombinación homóloga en cáncer, Liu y colaboradores en el 2021 observaron que la expresión de *ANRIL* en respuesta a lesiones en el DNA generadas por radiación ionizante (IR) modula el eje ATM-Chk1/RPA2 que regula vías de señalización asociadas al arresto del ciclo celular y reparación por recombinación homóloga lo que sugiere la participación de *ANRIL* en la HR para favorecer la radioresistencia en cáncer de pulmón (Liu et al., 2021).

Posteriormente en el 2023, el mismo grupo de investigación continuó el proyecto en cáncer de pulmón para esclarecer mediante qué proteínas y ncRNAs, *ANRIL* puede regular la HR: Du y colaboradores comprobaron al igual que en el artículo de Liu en el 2021 que la inducción de *ANRIL* es desencadenada en respuesta a roturas de doble cadena en el DNA por radiación ionizante (IR) e inhibe al *miR-7-5p* favoreciendo la expresión de PARP1 indispensable en la HR para formar un complejo con BRCA1/RAD51 generando un eje de interacción *ANRIL/miR-7-5p*/PARP1/BRCA1/RAD51 que facilita la radioresistencia del cáncer de pulmón (Du et al., 2023), la limitación de ese proyecto es la inexistencia de un ensayo funcional que demuestre específicamente que *ANRIL* modula la HR y complete la evaluación de los niveles de expresión de proteínas asociadas a la HR como PARP1.

Por otro lado, Wan y colaboradores, observaron que *ANRIL* se expresa en células de osteosarcoma por medio del factor de transcripción *E2F1* y la activación de ATM como sensor de daño a DNA por roturas de doble cadena para modular la reparación del DNA por HR. Así, la inhibición de *ANRIL* disminuye la tasa de reparación por recombinación homóloga que los autores evaluaron mediante el sistema reportero DR-GFP (Wan et al., 2013).

Lee y colaboradores en el 2020 evaluaron diversos mecanismos de reparación de DNA (BER, NER, MMR, NHEJ y HR) en líneas celulares de TNBC con *BRCA1 Wild Type*: MDA-MB-231, MDA-MB-157, HCC1806 y MDA-MB-468. Dentro de estas líneas, MDA-MB-231, obtuvo una tasa de reparación de HR de alrededor del 50% respecto a MDA-MB-468 y HCC1806, estos datos son atribuidos a que el nivel de proteína de BRCA1 en MDA-MB-231 respecto a HCC1806 se encontraba disminuido por lo que el nivel de BRCA1 modificó la HR en TNBC al no haber otro tipo de deficiencia a nivel proteico o de expresión asociado a la HR (Lee et al., 2020). El subtipo de MDA-MB-231, MDA-MB-468 y HCC1806 del estudio anterior, corresponde a MSL, BL1 y BL2 respectivamente (Espinosa et al., 2020; Lehmann et al., 2021). Estos datos de reparación son consistentes con los resultados obtenidos en este proyecto donde MDA-MB-231 (MSL) obtuvo una tasa de reparación por recombinación homóloga más baja respecto a BT20 (BL1/BL2) con valores elevados de HR.

Con base en lo anterior se podría sugerir el mecanismo de regulación por el cual *ANRIL* modula la HR en TNBC y desarrollar mecanismos de quimio y radioresistencia. *ANRIL* podría estabilizar proteínas sensoras de daño a DNA como ATM/ATR e inhibir por complementariedad al *miR-7-5p* (función ceRNA de *ANRIL*) para favorecer la expresión de *PARP1* estabilizado el complejo proteico BRCA1/2, PARP1, RAD51 (función andamio de *ANRIL*) para dirigirlo (función guía de *ANRIL*) a regiones donde existen lesiones de doble cadena de DNA para su reparación, se requieren más experimentos para validar los datos.

En el 2022 Liang y colaboradores reportaron que en la línea de TNBC MDA-MB-231 se encuentra subexpresado el *miR-7-5p* (Liang et al., 2022) por lo que puede existir una regulación negativa del microRNA con la sobreexpresión de *ANRIL*. Respecto a PARP1, en TNBC se ha mostrado que existe un aumento a nivel proteico en las líneas celulares con mutaciones en *BRCA*: SUM149, SUM1315, HCC1937 y MX-1 mientras que en SUM159 y MDA-MB-231 sin mutaciones en *BRCA*, un menor nivel proteico en PARP1 (Boerner et al., 2015), estas líneas han sido subclasificadas de la siguiente manera: SUM149 (BL2), MDA-MB-231 (MSL) (Chou et al., 2021) HCC1937 (BL1/BL2) (Espinosa et al., 2020; Lehmann et al., 2021) y SUM159 (MSL) (Giordano et al., 2019) por lo cual el subtipo

basal en TNBC respecto al MSL tiene una dependencia específica a genes de reparación, mismos datos que se han mostrado en este proyecto.

En nuestro grupo de investigación, se realizó un ensayo *in silico* por medio del programa TANRIC (Anexo 2) para predecir la interacción *ANRIL*-miRNAs asociada a la regulación de la reparación por recombinación homóloga, el resultado mostró una interacción de regulación negativa entre *ANRIL* y el *miR-195b* (Fig. A2), también involucrado en la reparación de DNA (Li et al., 2015).

El *miR-195b* regula a genes *BRCA1*, *BRCA2* y *RAD51* involucrados en la HR (Thapar, 2018) y se encuentra subexpresado en TNBC, específicamente en la línea celular MDA-MB-231 (Yang et al., 2014) por lo cual, puede existir un eje de interacción *ANRIL/miR-195b/BRCA1/BRCA2/RAD51* para mantener activo el mecanismo de reparación por recombinación homóloga en TNBC.

Además, se realizó un ensayo *in silico* con el programa SFPEL-LPI (Anexo 3) para predecir la interacción lncRNA-Proteína y conocer con qué proteínas de reparación de DNA es capaz de unirse *ANRIL*, este ensayo mostró la interacción de *ANRIL* con la proteína HuR (ELAVL1)(Fig. A3) (Zhang et al., 2018a). Se conoce que HuR se encuentra sobreexpresado en líneas de TNBC MDA-MB-231 y HS578T para regular las proteínas ATM, DNA-PK, Ku80 y RAD51 asociadas a la HR y NHEJ (Mehta et al., 2016). Jain y colaboradores, mostraron que la inhibición de HuR en adenocarcinoma ductal pancreático disminuye la tasa de HR (Jain et al., 2022). Ambos estudios muestran que HuR es una proteína esencial en el proceso de reparación por recombinación homóloga por lo cual, la predicción de interacción *ANRIL/HuR* podría ser uno de los diversos mecanismos para regular la reparación por recombinación homóloga en TNBC.

Los datos obtenidos en este proyecto podrían contribuir a elucidar la importancia de la sobreexpresión de *ANRIL* en TNBC sobre la reparación por recombinación homóloga, generando diversas interacciones espaciales con proteínas, ncRNAs y mRNAs, convirtiéndolo en un regulador central de reparación en este suptipo molecular.

Conclusión

- El lncRNA *ANRIL* se encuentra sobreexpresado en las líneas celulares de TNBC MDA-MB-231 y BT-20.
- La línea celular BT-20 podría presentar una mayor tasa de HR respecto a MDA-MB-231 con expresión basal de *ANRIL*.
- El lncRNA *ANRIL* podría modular el mecanismo de reparación por recombinación homóloga en líneas celulares derivadas de cáncer de mama triple negativo.
- Se obtuvo la construcción del sistema reportero de recombinación homóloga **R-LuxHR** no obstante se requiere optimizarlo y compararlo contra el sistema reportero DR-GFP.

Perspectivas

- Evaluar en TNBC la regulación de *ANRIL* sobre el *miR-7-5p*, *miR-193b* y sus blancos.
- Generar mediante ensayos *in silico* una red de interacción entre *ANRIL*/miRNAs/mRNAs y predecir con que moléculas se asocia *ANRIL* para modular la HR.
- Optimizar el sistema reportero de recombinación homóloga **R-LuxHR** en un mayor número de líneas celulares.

Referencias bibliográficas

1. Afghahi, A., Timms, K. M., Vinayak, S., Jensen, K. C., Kurian, A. W., Carlson, R. W., Chang, P. J., Schackmann, E., Hartman, A. R., Ford, J. M., & Telli, M. L. (2017). Tumor BRCA1 Reversion Mutation Arising During Neoadjuvant Platinum-Based Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Is Associated with Therapy Resistance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(13), 3365. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2174>
2. Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., al Moustafa, A. E., & Malki, M. I. (2020). DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12041050>
3. Anderson, D. M., Anderson, K. M., Chang, C. L., Makarewich, C. A., Nelson, B. R., McAnally, J. R., Kasaragod, P., Shelton, J. M., Liou, J., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, 160(4), 595–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009>
4. Andreopoulou, E., Schweber, S. J., Sparano, J. A., & Mcdaid, H. M. (2015). Therapies for triple negative breast cancer. *Https://Doi.Org/10.1517/14656566.2015.1032246*, 16(7), 983–998. <https://doi.org/10.1517/14656566.2015.1032246>
5. Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., & Li, Y. (2021). Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel? *Cancer Letters*, 497, 100–111. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.10.016>
6. Bencivenga, D., Stampone, E., Vastante, A., Barahmeh, M., Ragione, F. della, & Borriello, A. (2022). An Unanticipated Modulation of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: The Role of Long Non-Coding RNAs. *Cells*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/CELLS11081346>
7. Bétermier, M., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2014). Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *PLoS Genetics*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004086>
8. Betts, J. A., Moradi Marjaneh, M., Al-Ejeh, F., Lim, Y. C., Shi, W., Sivakumaran, H., Tropée, R., Patch, A. M., Clark, M. B., Bartonicek, N., Wiegmanns, A. P., Hillman, K. M., Kaufmann, S., Bain, A. L., Gloss, B. S., Crawford, J., Kazakoff, S., Wani, S., Wen, S. W., ... French, J. D. (2017). Long Noncoding RNAs CUPID1 and CUPID2 Mediate Breast Cancer Risk at 11q13 by Modulating the Response to DNA Damage. *American Journal of Human Genetics*, 101(2), 255–266. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2017.07.007>
9. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 13(11), 674. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2016.66>
10. Bindra, R. S., Goglia, A. G., Jasin, M., & Powell, S. N. (2013). Development of an assay to measure mutagenic non-homologous end-joining repair activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 41(11), e115–e115. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT255>

11. Blackford, A. N., & Jackson, S. P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, 66(6), 801–817. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.05.015>
12. Blasiak, J. (2021). Single-Strand Annealing in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/IJMS22042167>
13. Boerner, J. L., Nechiporchik, N., Mueller, K. L., Polin, L., Heilbrun, L., Boerner, S. A., Zoratti, G. L., Stark, K., LoRusso, P. M., & Burger, A. (2015). Protein Expression of DNA Damage Repair Proteins Dictates Response to Topoisomerase and PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *PLOS ONE*, 10(3), e0119614. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0119614>
14. Burd, C. E., Jeck, W. R., Liu, Y., Sanoff, H. K., Wang, Z., & Sharpless, N. E. (2010). Expression of Linear and Novel Circular Forms of an INK4/ARF-Associated Non-Coding RNA Correlates with Atherosclerosis Risk. *PLOS Genetics*, 6(12), e1001233. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1001233>
15. Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., Harris, L. N., & Szallasi, Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nature Genetics* 2006 38:9, 38(9), 1043–1048. <https://doi.org/10.1038/ng1861>
16. Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L., & Perou, C. M. (2007). The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(8), 2329–2334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>
17. Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, 26(1), 52. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.07.009>
18. Chen, Y., Li, Z., Chen, X., & Zhang, S. (2021). Long non-coding RNAs: From disease code to drug role. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11, 340–354. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.001>
19. Chen, S., & Parmigiani, G. (2007). Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(11), 1329. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.1066>
20. Cheng, J. T., Wang, L., Wang, H., Tang, F. R., Cai, W. Q., Sethi, G., Xin, H. W., & Ma, Z. (2019). Insights into Biological Role of LncRNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 1178, 8(10), 1178. <https://doi.org/10.3390/CELLS8101178>
21. Chou, C. W., Huang, Y. M., Chang, Y. J., Huang, C. Y., & Hung, C. S. (2021). Identified the novel resistant biomarkers for taxane-based therapy for triple-negative breast cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 18(12), 2521. <https://doi.org/10.7150/IJMS.59177>
22. Chowdhury, P., Ghosh, U., Samanta, K., Jaggi, M., Chauhan, S. C., & Yallapu, M. M. (2021). Bioactive nanotherapeutic trends to combat triple negative breast cancer. *Bioactive Materials*, 6(10), 3269–3287. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.02.037>

23. da Silva, J. L., Cardoso Nunes, N. C., Izetti, P., de Mesquita, G. G., & de Melo, A. C. (2020). Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 145. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2019.102855>
24. Congrains, A., Kamide, K., Katsuya, T., Yasuda, O., Oguro, R., Yamamoto, K., Ohishi, M., & Rakugi, H. (2012). CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(4), 612–616. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.02.050>
25. Deng, N., Chen, K., Fan, H., & Jin, F. (2022). The synergistic effect of CDKN2B-AS1 and SPC25 on triple-negative breast cancer. *Annals of Translational Medicine*, 10(14), 783–783. <https://doi.org/10.21037/ATM-22-2900>
26. Deng, W., Zhang, Y., Cai, J., Zhang, J., Liu, X., Yin, J., Bai, Z., Yao, H., & Zhang, Z. (2019). LncRNA-ANRIL promotes gastric cancer progression by enhancing NF-κB signaling. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 244(12), 953–959. <https://doi.org/10.1177/1535370219860207>
27. Dexheimer, T. S. (2013). DNA Repair Pathways and Mechanisms. *DNA Repair of Cancer Stem Cells*, 19–32. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4590-2_2
28. Dillon, K. M., Bekele, R. T., Sztupinszki, Z., Hanlon, T., Rafiei, S., Szallasi, Z., Choudhury, A. D., & Mouw, K. W. (2022). PALB2 or BARD1 loss confers homologous recombination deficiency and PARP inhibitor sensitivity in prostate cancer. *Npj Precision Oncology* 2022 6:1, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00291-7>
29. Du, Z., Zhang, F., Liu, L., Shen, H., Liu, T., Jin, J., Yu, N., Wan, Z., Wang, H., Hu, X., Chen, Y., & Cai, J. (2023). LncRNA ANRIL promotes HR repair through regulating PARP1 expression by sponging miR-7-5p in lung cancer. *BMC Cancer*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-023-10593-Z>
30. Dueva, R., & Iliakis, G. (2020). Replication protein A: a multifunctional protein with roles in DNA replication, repair and beyond. *NAR Cancer*, 2(3). <https://doi.org/10.1093/NARCAN/ZCAA022>
31. Dykes, I. M., & Emanuelli, C. (2017). Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 15(3), 177–186. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2016.12.005>
32. Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006 6:4, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>
33. Espinosa Fernandez, J. R., Eckhardt, B. L., Lee, J., Lim, B., Pearson, T., Seitz, R. S., Hout, D. R., Schweitzer, B. L., Nielsen, T. J., Rayne Lawrence, O., Wang, Y., Rao, A., & Ueno, N. T. (2020). Identification of triple-negative breast cancer cell lines classified under the same molecular subtype using different molecular characterization techniques: Implications for translational research. *PLoS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0231953>

34. Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* 2011 12:12, 12(12), 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
35. Fan, F., & Wood, K. v. (2007). Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay and Drug Development Technologies*, 5(1), 127–136. <https://doi.org/10.1089/ADT.2006.053>
36. Fang, Y., & Fullwood, M. J. (2016). Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(1), 42. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2015.09.006>
37. 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>
38. Gao, N., Li, Y., Li, J., Gao, Z., Yang, Z., Li, Y., Liu, H., & Fan, T. (2020). Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers. *Frontiers in Oncology*, 10, 2903. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.598817/BIBTEX>
39. Gesualdo, F. di, Capaccioli, S., & Lulli, M. (2014). A pathophysiological view of the long non-coding RNA world. *Oncotarget*, 5(22), 10976. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2770>
40. Geyer, F. C., Pareja, F., Weigelt, B., Rakha, E., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., & Reis-Filho, J. S. (2017). The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions. *The American Journal of Pathology*, 187(10), 2139. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2017.03.016>
41. Gillespie, M. S., Ward, C. M., & Davies, C. C. (2023). DNA Repair and Therapeutic Strategies in Cancer Stem Cells. *Cancers* 2023, Vol. 15, Page 1897, 15(6), 1897. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15061897>
42. Giordano, A., Liu, Y., Armeson, K., Park, Y., Ridinger, M., Erlander, M., Reuben, J., Britten, C., Kappler, C., Yeh, E., & Ethier, S. (2019). Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibition synergizes with taxanes in triple negative breast cancer. *PLoS One*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0224420>
43. Giulietti, A. (2017). Laser-driven particle acceleration for radiobiology and radiotherapy: where we are and where we are going. In K. W. D. Ledingham (Ed.), *Medical Applications of Laser-Generated Beams of Particles IV: Review of Progress and Strategies for the Future* (Vol. 10239, p. 1023904). SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2270945>
44. Graffeo, R., Rana, H. Q., Conforti, F., Bonanni, B., Cardoso, M. J., Paluch-Shimon, S., Pagani, O., Goldhirsch, A., Partridge, A. H., Lambertini, M., & Garber, J. E. (2022). Moderate penetrance genes complicate genetic testing for breast cancer diagnosis: ATM, CHEK2, BARD1 and RAD51D. *The Breast: Official Journal of the European Society of Mastology*, 65, 32. <https://doi.org/10.1016/J.BREAST.2022.06.003>

45. Groelly, F. J., Fawkes, M., Dagg, R. A., Blackford, A. N., & Tarsounas, M. (2022). Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2022, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00535-5>
46. Guan, H., Mei, Y., Mi, Y., Li, C., Sun, X., Zhao, X., Liu, J., Cao, W., Li, Y., & Wang, Y. (2018). Downregulation of lncRNA ANRIL suppresses growth and metastasis in human osteosarcoma cells. *OncoTargets and Therapy*, 11, 4893. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170293>
47. Guttman, M., & Rinn, J. L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* 2012 482:7385, 482(7385), 339–346. <https://doi.org/10.1038/nature10887>
48. Hajjari, M., & Salavaty, A. (2015). HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biology & Medicine*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.7497/J.ISSN.2095-3941.2015.0006>
49. Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO Journal*, 27(4), 589. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.15>
50. 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>
51. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
52. Hatzi, V. I., Laskaratou, D. A., Mavragani, I. v., Nikitaki, Z., Mangelis, A., Panayiotidis, M. I., Pantelias, G. E., Terzoudi, G. I., & Georgakilas, A. G. (2015). Non-targeted radiation effects in vivo: A critical glance of the future in radiobiology. *Cancer Letters*, 356(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.018>
53. He, L., Wick, N., Germans, S. K., & Peng, Y. (2021). The Role of Breast Cancer Stem Cells in Chemoresistance and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, 13(24). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13246209>
54. Hegde, M. L., Hazra, T. K., & Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research* 2008 18:1, 18(1), 27–47. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.8>
55. Holdt, L. M., Hoffmann, S., Sass, K., Langenberger, D., Scholz, M., Krohn, K., Finstermeier, K., Stahringer, A., Wilfert, W., Beutner, F., Gielen, S., Schuler, G., Gäbel, G., Bergert, H., Bechmann, I., Stadler, P. F., Thiery, J., & Teupser, D. (2013). Alu Elements in ANRIL Non-Coding RNA at Chromosome 9p21 Modulate Atherogenic Cell Functions through Trans-Regulation of Gene Networks. *PLoS Genetics*, 9(7), 1003588. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003588>
56. Holdt, L. M., Stahringer, A., Sass, K., Pichler, G., Kulak, N. A., Wilfert, W., Kohlmaier, A., Herbst, A., Northoff, B. H., Nicolaou, A., Gäbel, G., Beutner, F., Scholz, M., Thiery, J., Musunuru, K., Krohn, K., Mann, M., & Teupser, D. (2016). Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms12429>

57. Huang, D., Bi, C., Zhao, Q., Ding, X., Bian, C., Wang, H., Wang, T., & Liu, H. (2018). Knockdown long non-coding RNA ANRIL inhibits proliferation, migration and invasion of HepG2 cells by down-regulation of miR-191. *BMC Cancer*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-018-4831-6>
58. Huang, J. L., Chang, Y. T., Hong, Z. Y., & Lin, C. S. (2022). Targeting DNA Damage Response and Immune Checkpoint for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS23063238>
59. Huang, M., O'Shaughnessy, J., Zhao, J., Haiderali, A., Cortes, J., Ramsey, S. D., Briggs, A., Hu, P., Karantza, V., Aktan, G., Qi, C. Z., Gu, C., Xie, J., Yuan, M., Cook, J., Untch, M., Schmid, P., & Fasching, P. A. (2020). Association of pathologic complete response with long-term survival outcomes in triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Research*, *80*(24), 5427–5434. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1792/662474/AM/ASSOCIATION-OF-PATHOLOGICAL-COMPLETE-RESPONSE-WITH>
60. Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature Medicine* *21*:11, *21*(11), 1253–1261. <https://doi.org/10.1038/nm.3981>
61. Iranpour, M., Soudyab, M., Geranpayeh, L., Mirfakhraie, R., Azargashb, E., Movafagh, A., & Ghafouri-Fard, S. (2016). Expression analysis of four long noncoding RNAs in breast cancer. *Tumor Biology*, *37*(3), 2933–2940. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-4135-2>
62. Jain, A., McCoy, M., Coats, C., Brown, S. Z., Addya, S., Pelz, C., Sears, R. C., Yeo, C. J., & Brody, J. R. (2022). HuR Plays a Role in Double-Strand Break Repair in Pancreatic Cancer Cells and Regulates Functional BRCA1-Associated-Ring-Domain-1(BARD1) Isoforms. *Cancers*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14071848>
63. Kiziltepe, T., Yan, A., Dong, M., Jonnalagadda, V. S., Dedon, P. C., & Engelward, B. P. (2005). Delineation of the Chemical Pathways Underlying Nitric Oxide-Induced Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Chemistry & Biology*, *12*(3), 357–369. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2004.12.011>
64. Klingenberg, M., Matsuda, A., Diederichs, S., & Patel, T. (2017). Non-coding RNA in hepatocellular carcinoma: Mechanisms, biomarkers and therapeutic targets. *Journal of Hepatology*, *67*(3), 603–618. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2017.04.009>
65. Kong, Y., Hsieh, C. H., & Alonso, L. C. (2018). ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B Locus With Roles in Cancer and Metabolic Disease. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(JUL), 405. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00405>
66. Kosok, M., Alli-Shaik, A., Bay, B. H., & Gunaratne, J. (2020). Comprehensive Proteomic Characterization Reveals Subclass-Specific Molecular Aberrations within Triple-negative Breast Cancer. *IScience*, *23*(2). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.100868>
67. Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K.-A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., Leeuwen, F. E. van, Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., Consortium, and the B. and B. C., McGuffog, L., Evans, D. G., Barrowdale, D., ... Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast

- Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317(23), 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.7112>
68. Kumar, P., & Aggarwal, R. (2015). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2015 293:2, 293(2), 247–269. <https://doi.org/10.1007/S00404-015-3859-Y>
69. Latronico, A. C., & Silveira, L. F. (2019). Genetic and Epigenetic Control of Puberty. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 126–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65226-1>
70. Lawrence, R. T., Perez, E. M., Hernández, D., Miller, C. P., Haas, K. M., Irie, H. Y., Lee, S. I., Blau, A. C., & Villén, J. (2015). The proteomic landscape of triple-negative breast cancer. *Cell Reports*, 11(4), 630. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.03.050>
71. Lee, K. J., Mann, E., Wright, G., Piett, C. G., Nagel, Z. D., & Gassman, N. R. (2020). Exploiting DNA repair defects in triple negative breast cancer to improve cell killing. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12. https://doi.org/10.1177/1758835920958354/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1758835920958354-FIG2.JPEG
72. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
73. Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. v., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PloS One*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0157368>
74. Lehmann, B. D., Colaprico, A., Silva, T. C., Chen, J., An, H., Ban, Y., Huang, H., Wang, L., James, J. L., Balko, J. M., Gonzalez-Ericsson, P. I., Sanders, M. E., Zhang, B., Pietenpol, J. A., & Chen, X. S. (2021). Multi-omics analysis identifies therapeutic vulnerabilities in triple-negative breast cancer subtypes. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26502-6>
75. Li, G. M. (2007). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* 2008 18:1, 18(1), 85–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>
76. Li, J., Han, L., Roebuck, P., Diao, L., Liu, L., Yuan, Y., Weinstein, J. N., & Liang, H. (2015). TANRIC: An interactive open platform to explore the function of lncRNAs in cancer. *Cancer Research*, 75(18), 3728–3737. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0273/651858/AM/TANRIC-AN-INTERACTIVE-OPEN-PLATFORM-TO-EXPLORE-THE>
77. Li, L. Y., Guan, Y. di, Chen, X. S., Yang, J. M., & Cheng, Y. (2021). DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 2520. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.629266/BIBTEX>
78. Liang, Z., Liu, L., Gao, R., Che, C., & Yang, G. (2022). Downregulation of exosomal miR-7-5p promotes breast cancer migration and invasion by targeting RYK and participating in the atypical

- WNT signalling pathway. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/S11658-022-00393-X>
79. Liu, Y., Sharma, S., & Watabe, K. (2015). *Roles of lncRNA in breast cancer*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5651513/>
 80. Liu, M., Xing, L. Q., & Liu, Y. J. (2017). A three-long noncoding RNA signature as a diagnostic biomarker for differentiating between triple-negative and non-triple-negative breast cancers. *Medicine*, 96(9). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006222>
 81. Liu, L., Chen, Y., Huang, Y., Cao, K., Liu, T., Shen, H., Cui, J., Li, B., Cai, J., Gao, F., & Yang, Y. (2021). Long non-coding RNA ANRIL promotes homologous recombination-mediated DNA repair by maintaining ATR protein stability to enhance cancer resistance. *Molecular Cancer*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-021-01382-Y>
 82. Liu, Y., Zhu, L., Zhao, W., Zhou, Y., & Shao, S. (2022). High expression of ANRIL correlated with the poor prognosis in patients with cancer: A meta-analysis. *Medicine (United States)*, 101(36), E30531. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000030531>
 83. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
 84. Llombart-Cussac, A., Cortés, J., Paré, L., Galván, P., Bermejo, B., Martínez, N., Vidal, M., Pernas, S., López, R., Muñoz, M., Nuciforo, P., Morales, S., Oliveira, M., de la Peña, L., Peláez, A., & Prat, A. (2017). HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 18(4), 545–554. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30021-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30021-9)
 85. Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C., & Curigliano, G. (2021). Breast cancer. *Lancet (London, England)*, 397(10286), 1750–1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32381-3)
 86. Lord, C. J., & Ashworth, A. (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer* 2016 16:2, 16(2), 110–120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>
 87. Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clinical Oncology*, 25(10), 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.06.007>
 88. Lou, N., Liu, G., & Pan, Y. (2020). Long noncoding RNA ANRIL as a novel biomarker in human cancer. *Future Oncology (London, England)*, 16(35), 2981–2995. <https://doi.org/10.2217/FON-2020-0470>
 89. Lyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., & Modrich, P. L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(2), 302–323. <https://doi.org/10.1021/CR0404794>

90. Ma, J., Zhao, W., Zhang, H., Chu, Z., Liu, H., Fang, X., & Tang, D. (2022). Long non-coding RNA ANRIL promotes chemoresistance in triple-negative breast cancer via enhancing aerobic glycolysis. *Life Sciences*, *506*, 120810. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.120810>
91. Malouff, T. D., Mahajan, A., Mutter, R. W., Krishnan, S., Hoppe, B. S., Beltran, C., Trifiletti, D. M., & Vallow, L. A. (2020). Carbon ion radiation therapy in breast cancer: a new frontier. *Breast Cancer Research and Treatment*, *181*(2), 291–296. <https://doi.org/10.1007/S10549-020-05641-2>
92. Marra, A., Trapani, D., Viale, G., Criscitiello, C., & Curigliano, G. (2020). Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. *Npj Breast Cancer* *2020 6:1*, *6*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41523-020-00197-2>
93. Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2014 15:7*, *15*(7), 465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>
94. Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2023*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
95. Mehta, M., Basalingappa, K., Griffith, J. N., Andrade, D., Babu, A., Amreddy, N., Muralidharan, R., Gorospe, M., Herman, T., Ding, W. Q., Ramesh, R., & Munshi, A. (2016). HuR silencing elicits oxidative stress and DNA damage and sensitizes human triple-negative breast cancer cells to radiotherapy. *Oncotarget*, *7*(40), 64820. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11706>
96. Mehta-Mujoo, P. M., Cunliffe, H. E., Hung, N. A., & Slatter, T. L. (2019). Long Non-coding RNA ANRIL in the Nucleus Associates With Periostin Expression in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.00885>
97. Meng, J., Li, P., Zhang, Q., Yang, Z., & Fu, S. (2014). A four-long non-coding RNA signature in predicting breast cancer survival. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *33*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13046-014-0084-7/FIGURES/6>
98. Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(3), 155–159. <https://doi.org/10.1038/NRG2521>
99. Meyer, F., Becker, S., Classen, S., Parplys, A. C., Mansour, W. Y., Riepen, B., Timm, S., Ruebe, C., Jasin, M., Wikman, H., Petersen, C., Rothkamm, K., & Borgmann, K. (2020). Prevention of DNA Replication Stress by CHK1 Leads to Chemoresistance Despite a DNA Repair Defect in Homologous Recombination in Breast Cancer. *Cells*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/CELLS9010238>
100. Miao, J. T., Gao, J. H., Chen, Y. Q., Chen, H., Meng, H. Y., & Lou, G. (2019). LncRNA ANRIL affects the sensitivity of ovarian cancer to cisplatin via regulation of let-7a/HMGA2 axis. *Bioscience Reports*, *39*(7), 20182101. <https://doi.org/10.1042/BSR20182101>

101. Moon, J., Kitty, I., Renata, K., Qin, S., Zhao, F., & Kim, W. (2023). DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS24054741>
102. Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H, Kotake Y. (2015). Long Noncoding RNA ANRIL Regulates Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer and Cervical Cancer Cells. *Anticancer Res*; 35(10):5377-82. PMID: 26408699.
103. Nakanishi, K., Cavallo, F., Brunet, E., & Jasin, M. (2011). Homologous Recombination Assay for Interstrand Cross-Link Repair. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.j.)*, 745, 283. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-129-1_16
104. Nie, F. Q., Sun, M., Yang, J. S., Xie, M., Xu, T. P., Xia, R., Liu, Y. W., Liu, X. H., Zhang, E. B., Lu, K. H., & Shu, Y. Q. (2015). Long noncoding RNA ANRIL promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(1), 268–277. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0492>
105. Parrella, P., Mazzarelli, P., Signori, E., Perrone, G., Marangi, G. F., Rabitti, C., Delfino, M., Prencipe, M., Gallo, A. P., Rinaldi, M., Fabbrocini, G., Delfino, S., Persichetti, P., & Fazio, V. M. (2006). Expression and heterodimer-binding activity of Ku70 and Ku80 in human non-melanoma skin cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 59(11), 1181. <https://doi.org/10.1136/JCP.2005.031088>
106. Pasmant, E., Sabbagh, A., Vidaud, M., & Bièche, I. (2011). ANRIL , a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS . *The FASEB Journal*, 25(2), 444–448. <https://doi.org/10.1096/FJ.10-172452>
107. Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschlkov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 406:6797, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
108. Perry, M., & Ghosal, G. (2022). Mechanisms and Regulation of DNA-Protein Crosslink Repair During DNA Replication by SPRTN Protease. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.916697>
109. Pierce, A. J., Johnson, R. D., Thompson, L. H., & Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Development*, 13(20), 2633. <https://doi.org/10.1101/GAD.13.20.2633>
110. Quigley, D., Alumkal, J. J., Wyatt, A. W., Kothari, V., Foye, A., Lloyd, P., Aggarwal, R., Kim, W., Lu, E., Schwartzman, J., Beja, K., Annala, M., Das, R., Diolaiti, M., Pritchard, C., Thomas, G., Tomlins, S., Knudsen, K., Lord, C. J., ... Feng, F. Y. (2017). Analysis of Circulating Cell-Free DNA Identifies Multiclonal Heterogeneity of BRCA2 Reversion Mutations Associated with Resistance to PARP Inhibitors. *Cancer Discovery*, 7(9), 999–1005. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0146>

111. Raguz, S., Adams, C., Masrour, N., Rasul, S., Papoutsoglou, P., Hu, Y., Cazzanelli, G., Zhou, Y., Patel, N., Coombes, C., & Yagüe, E. (2013). Loss of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase confers collateral sensitivity to carmustine in topoisomerase II-mediated doxorubicin resistant triple negative breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, *85*(2), 186–196. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2012.10.020>
112. Sanchez, A., Lhuillier, J., Grosjean, G., Ayadi, L., & Maenner, S. (2023). The Long Non-Coding RNA ANRIL in Cancers. *Cancers* *2023*, Vol. *15*, Page 4160, *15*(16), 4160. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15164160>
113. Sarkar, D., Oghabian, A., Bodiya badu, P. K., Joseph, W. R., Leung, E. Y., Finlay, G. J., Baguley, B. C., & Askarian-Amiri, M. E. (2017). Multiple Isoforms of ANRIL in Melanoma Cells: Structural Complexity Suggests Variations in Processing. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS18071378>
114. Sarno, F., Dell'aversana, C., Cappetta, D., Megchelenbrink, W. L., Obidiro, O., Battogtokh, G., & Akala, E. O. (2023). Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. *Pharmaceutics* *2023*, Vol. *15*, Page 1796, *15*(7), 1796. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15071796>
115. Sato K, Nakagawa H, Tajima A, Yoshida K, Inoue I. (2010). ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1. *Oncol Rep*;24(3):701-7. doi: 10.3892/or_00000910.
116. Shaath, H., Vishnubalaji, R., Elango, R., Kardousha, A., Islam, Z., Qureshi, R., Alam, T., Kolatkar, P. R., & Alajez, N. M. (2022). Long non-coding RNA and RNA-binding protein interactions in cancer: Experimental and machine learning approaches. *Seminars in Cancer Biology*, *86*, 325–345. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2022.05.013>
117. Sharom, F. J. (2007). ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/14622416.9.1.105*, *9*(1), 105–127. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.1.105>
118. Shi, G. H., Cheng, Y. F., Zhang, Y., Guo, R., Li, S., & Hong, X. (2021). Long non-coding RNA LINC00511/miR-150/MMP13 axis promotes breast cancer proliferation, migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1867*(3), 165957. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165957>
119. Shuck, S. C., Short, E. A., & Turchi, J. J. (2008). Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Research* *2008* *18*:1, *18*(1), 64–72. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.2>
120. Sishc, B. J., & Davis, A. J. (2017). The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. *Cancers*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/CANCERS9070081>
121. Sissung, T. M., Baum, C. E., Kirkland, C. T., Gao, R., Gardner, E. R., & Figg, W. D. (2010). Pharmacogenetics of Membrane Transporters: An Update on Current Approaches. *Molecular Biotechnology*, *44*(2), 152. <https://doi.org/10.1007/S12033-009-9220-6>

122. Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, 179(5), 1033–1055. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.10.017>
123. Spiegel, D. (2007). Cancer. *Encyclopedia of Stress*, 378–384. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00066-0>
124. Spies, J., Polasek-Sedlackova, H., Lukas, J., & Somyajit, K. (2021). Homologous Recombination as a Fundamental Genome Surveillance Mechanism during DNA Replication. *Genes*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/GENES12121960>
125. Sridharan, D. M., Asaithamby, A., Bailey, S. M., Costes, S. v., Doetsch, P. W., Dynan, W. S., Kronenberg, A., Rithidech, K. N., Saha, J., Snijders, A. M., Werner, E., Wiese, C., Cucinotta, F. A., & Pluth, J. M. (2015). Understanding Cancer Development Processes after HZE-Particle Exposure: Roles of ROS, DNA Damage Repair and Inflammation. *Radiation Research*, 185(1), 1–26. <https://doi.org/10.1667/RR13804.1>
126. Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2020). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:2, 22(2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
127. 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>
128. Thapar, R. (2018). Regulation of DNA Double-Strand Break Repair by Non-Coding RNAs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23112789>
129. Thompson, L. H., & Schild, D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1–2), 131–153. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00115-4)
130. Truong, L. N., Li, Y., Shi, L. Z., Hwang, P. Y. H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M. W., & Wu, X. (2013). Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), 7720–7725. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1213431110/-/DCSUPPLEMENTAL>
131. Tsang, J. Y., & Tse, G. M. (2023). Update on triple-negative breast cancers – highlighting subtyping update and treatment implication. *Histopathology*, 82(1), 17–35. <https://doi.org/10.1111/HIS.14784>
132. Van de Kooij, B., Kruswick, A., van Attikum, H., & Yaffe, M. B. (2022). Multi-pathway DNA-repair reporters reveal competition between end-joining, single-strand annealing and homologous recombination at Cas9-induced DNA double-strand breaks. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32743-w>

133. Vishnubalaji, R., Shaath, H., Elango, R., & Alajez, N. M. (2020). Noncoding RNAs as potential mediators of resistance to cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, *65*, 65–79. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.11.006>
134. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, *10*(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/NM1087>
135. Wahba, H. A., & El-Hadaad, H. A. (2015). Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biology & Medicine*, *12*(2), 106. <https://doi.org/10.7497/J.ISSN.2095-3941.2015.0030>
136. Wan, G., Mathur, R., Hu, X., Liu, Y., Zhang, X., Peng, G., & Lu, X. (2013). Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2B-AS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway. *Cellular Signalling*, *25*(5), 1086–1095. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2013.02.006>
137. Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell*, *43*(6), 904–914. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>
138. Wang, W. T., Han, C., Sun, Y. M., Chen, T. Q., & Chen, Y. Q. (2019). Noncoding RNAs in cancer therapy resistance and targeted drug development. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-019-0748-Z>
139. Winkle, M., El-Daly, S. M., Fabbri, M., & Calin, G. A. (2021). Noncoding RNA therapeutics – challenges and potential solutions. *Nature Reviews Drug Discovery* *2021* *20*:8, *20*(8), 629–651. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00219-z>
140. Wu, H., Yin, Q. F., Luo, Z., Yao, R. W., Zheng, C. C., Zhang, J., Xiang, J. F., Yang, L., & Chen, L. L. (2016). Unusual Processing Generates SPA LncRNAs that Sequester Multiple RNA Binding Proteins. *Molecular Cell*, *64*(3), 534–548. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.10.007>
141. Wu, H., Yang, L., & Chen, L. L. (2017). The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation. *Trends in Genetics: TIG*, *33*(8), 540–552. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2017.05.004>
142. Wu, Z. H., Lin, C., Liu, C. C., Jiang, W. W., Huang, M. Z., Liu, X., & Guo, W. J. (2018). MiR-616-3p promotes angiogenesis and EMT in gastric cancer via the PTEN/AKT/mTOR pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *501*(4), 1068–1073. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.05.109>
143. Wyman, C., Ristic, D., & Kanaar, R. (2004). Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair*, *3*(8–9), 827–833. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2004.03.037>
144. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F. J., & Livingston, D. M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular Cell*, *22*(6), 719–729. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2006.05.022>
145. Xu, L., Zhao, Z., Wang, K., Zhou, H., & Xing, C. (2017a). Expression of aldehyde dehydrogenase 1 and ATP-binding cassette superfamily G member 2 is enhanced in primary foci and metastatic lymph node from patients with triple-negative breast cancer. *Biomedical Research*, *28*(11). Retrieved April 17, 2023, from <https://www.alliedacademies.org/articles/expression-of->

[aldehyde-dehydrogenase-1-and-atpbinding-cassette-superfamily-g-member-2-is-enhanced-in-primary-foci-and-metastatic-l.html](#)

146. Xu, S. T., Xu, J. H., Zheng, Z. R., Zhao, Q. Q., Zeng, X. S., Cheng, S. X., Liang, Y. H., & Hu, Q. F. (2017b). Long non-coding RNA ANRIL promotes carcinogenesis via sponging miR-199a in triple-negative breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *96*, 14–21. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.09.107>
147. Yagata, H., Kajiura, Y., & Yamauchi, H. (2011). Current strategy for triple-negative breast cancer: Appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. *Breast Cancer*, *18*(3), 165–173. <https://doi.org/10.1007/S12282-011-0254-9/FIGURES/6>
148. Yang, J. X., Rastetter, R. H., & Wilhelm, D. (2016). Non-coding RNAs: An Introduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *886*, 13–32. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7417-8_2
149. Yang, Z., He, M., Wang, K., Sun, G., Tang, L., & Xu, Z. (2014). Tumor suppressive microRNA-193b promotes breast cancer progression via targeting DNAJC13 and RAB22A. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(11), 7563. [/pmc/articles/PMC4270560/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/270560/)
150. Yamada, A., Ishikawa, T., Ota, I., Kimura, M., Shimizu, D., Tanabe, M., Chishima, T., Sasaki, T., Ichikawa, Y., Morita, S., Yoshiura, K. I., Takabe, K., & Endo, I. (2013). High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, *137*(3), 773. <https://doi.org/10.1007/S10549-012-2398-5>
151. Yardley, D. A., Coleman, R., Conte, P., Cortes, J., Brufsky, A., Shtivelband, M., Young, R., Bengala, C., Ali, H., Eakel, J., Schneeweiss, A., de La Cruz-Merino, L., Wilks, S., O'Shaughnessy, J., Glück, S., Li, H., Miller, J., Barton, D., & Harbeck, N. (2018). nab-Paclitaxel plus carboplatin or gemcitabine versus gemcitabine plus carboplatin as first-line treatment of patients with triple-negative metastatic breast cancer: results from the tnAcity trial. *Annals of Oncology*, *29*(8), 1763–1770. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDY201>
152. Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research: BCR*, *22*(1). <https://doi.org/10.1186/S13058-020-01296-5>
153. Yin, Q. F., Yang, L., Zhang, Y., Xiang, J. F., Wu, Y. W., Carmichael, G. G., & Chen, L. L. (2012). Long Noncoding RNAs with snoRNA Ends. *Molecular Cell*, *48*(2), 219–230. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.07.033>
154. Yousefi, H., Maheronnaghsh, M., Molaei, •, Fatemeh, Mashouri, L., Amir, •, Aref, R., Majid Momeny, •, Suresh, •, & Alahari, K. (2020). Long noncoding RNAs and exosomal lncRNAs: classification, and mechanisms in breast cancer metastasis and drug resistance. *Oncogene*, *39*, 953–974. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1040-y>
155. Zagami, P., & Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *Npj Breast Cancer* *2022 8:1*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>

156. Zhang, C., Ge, S., Gong, W., Xu, J., Guo, Z., Liu, Z., Gao, X., Wei, X., & Ge, S. (2020a). LncRNA ANRIL acts as a modular scaffold of WDR5 and HDAC3 complexes and promotes alteration of the vascular smooth muscle cell phenotype. *Cell Death & Disease* 2020 11:6, 11(6), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2645-3>
157. Zhang, D., Sun, G., Zhang, H., Tian, J., & Li, Y. (2017). Long non-coding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of cervical cancer and promotes carcinogenesis via PI3K/Akt pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 85, 511–516. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.11.058>
158. Zhang, E., Kong, R., Yin, D., You, L., Sun, M., Han, L., Xu, T., Xia, R., Yang, J., De, W., Chen, J. fei, Zhang, E., Kong, R., Yin, D., You, L., Sun, M., Han, L., Xu, T., Xia, R., & Chen, J. fei. (2014). Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a. *Oncotarget*, 5(8), 2276–2292. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.1902>
159. Zhang, T. N., Wang, W., Yang, N., Huang, X. M., & Liu, C. F. (2020b). Regulation of Glucose and Lipid Metabolism by Long Non-coding RNAs: Facts and Research Progress. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 457. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.00457/BIBTEX>
160. Zhang, W., Yue, X., Tang, G., Wu, W., Huang, F., & Zhang, X. (2018a). SFPEL-LPI: Sequence-based feature projection ensemble learning for predicting LncRNA-protein interactions. *PLoS Computational Biology*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1006616>
161. Zhang, Y., He, Q., Hu, Z., Feng, Y., Fan, L., Tang, Z., Yuan, J., Shan, W., Li, C., Hu, X., Tanyi, J. L., Fan, Y., Huang, Q., Montone, K., Dang, C. v., & Zhang, L. (2016). Long noncoding RNA LINP1 regulates repair of DNA double-strand breaks in triple-negative breast cancer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(6), 522–530. <https://doi.org/10.1038/NSMB.3211>
162. Zhang, Z., Feng, L., Liu, P., & Duan, W. (2018b). ANRIL promotes chemoresistance via disturbing expression of ABCC1 by regulating the expression of Let-7a in colorectal cancer. *Bioscience Reports*, 38(6), 20180620. <https://doi.org/10.1042/BSR20180620>
163. Zhao, B., Rothenberg, E., Ramsden, D. A., & Lieber, M. R. (2020). The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(12), 765. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-00297-8>
164. Zhao, B., Lu, Y. L., Yang, Y., Hu, L. B., Bai, Y., Li, R. Q., Zhang, G. Y., Li, J., Bi, C. W., Yang, L. B., Hu, C., Lei, Y. H., Wang, Q. L., & Liu, Z. M. (2018). Overexpression of lncRNA ANRIL promoted the proliferation and migration of prostate cancer cells via regulating let-7a/TGF-[... formula ...]1/ Smad signaling pathway. *Cancer Biomarkers*, 21(3), 613. <https://doi.org/10.3233/CBM-170683>
165. Zhu, H., Li, X., Song, Y., Zhang, P., Xiao, Y., & Xing, Y. (2015). Long non-coding RNA ANRIL is up-regulated in bladder cancer and regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis through the intrinsic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(2), 223–228. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.10.002>

Anexo

► 1. *Primers* de *ANRIL* en BT-20 y MDA-MB-231

BLAST de *primers* Fw/Rv de *ANRIL* mediante el programa Primer Designing Tool-NCBI utilizando la isoforma más larga de *ANRIL* (3829 pb) como secuencia molde.

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACACACATCAAAGGAGAATTTT	Plus	22	1095	1116	54.45	31.82	4.00	4.00
Reverse primer	CCGTCTCTACTGTTACCTC	Minus	19	1261	1243	53.76	52.63	3.00	0.00
Product length	167								

Figura A1. BLAST de *primers* Fw/Rv de *ANRIL*. El uso de ambos *primers* muestra la amplificación de un fragmento de 167 pb de *ANRIL* requerido para evaluar la expresión basal, sobreexpresión y disminución del lncRNA en líneas BT-20 y MDA-231.

Amplificación de *ANRIL* mediante PCR punto final con *primers* Fw/Rv específicos en las líneas MDA-231 y BT-20 (Fig. A1).

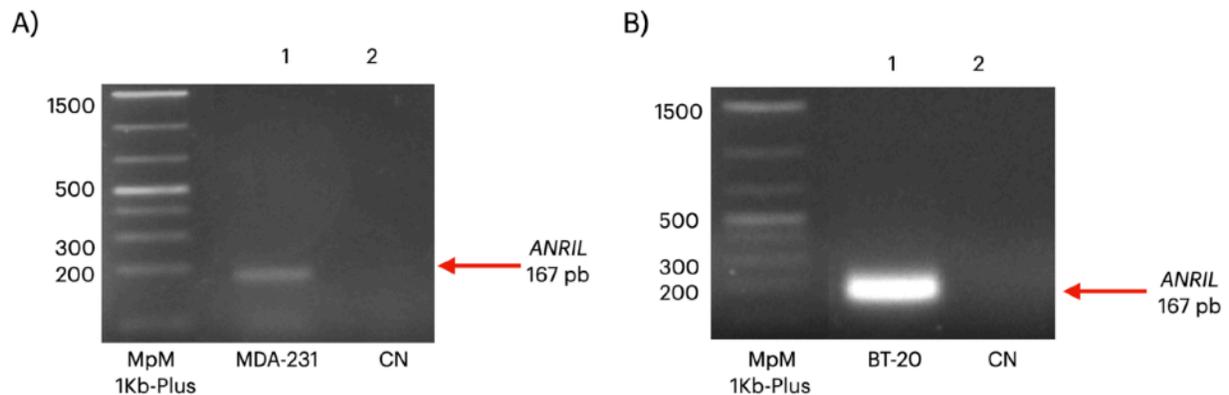


Figura A2. PCR punto final *ANRIL*. A) PCR punto final de *ANRIL* en MDA-231, amplicón de 167 pb. B) PCR punto final de *ANRIL* en BT-20, amplicón de 167 pb. MpM (Marcador de peso molecular), CN (Control negativo).

► 2. Predicción de interacción ANRIL-miRNAs

Para predecir la interacción lncRNA-miRNAs y elucidar la función ceRNA de *ANRIL* sobre miRNAs asociados a la regulación de la reparación por HR se utilizó el programa TANRIC (Li et al., 2015). En el campo “Query by Annotation” se utilizó *CDKN2B-AS1* y en “Select a sample list” la opción Basal, los campos restantes se mantuvieron por default. El programa TANRIC predijo la interacción de *ANRIL* con el *miRNA-193b* mostrando una correlación negativa con valor de -0.3307199 y un P-value de 0.003243253 (Fig. A2).

Cancer	Position/Annotation	Gene Symbol	Correlation	P-value	Plot
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-let-7c	-0.3615498	0.001225849	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-106a	0.4566699	0.00003240472	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-10b	-0.3626121	0.001183473	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-125b-1	-0.373032	0.0008330278	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-125b-2	-0.317695	0.004761376	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-17	0.3646607	0.001105487	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-193a	-0.4905348	0.000006842374	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-193b	-0.3307199	0.003243253	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-19b-1	0.3047712	0.006863505	+
TCGA-BRCA	ENSG00000240498.2	hsa-mir-20a	0.3317821	0.003141087	+

Tabla A1. Predicción de interacción ANRIL-miRNAs. El ensayo *in silico* con el programa TANRIC predijo la interacción de *ANRIL* con 26 miRNAs, entre ellos el miRNA-193b mostrando una correlación negativa sobre la expresión del lncRNA (Li et al., 2015).

► 3. Predicción de interacción ANRIL-Proteína

Para predecir la interacción lncRNA-Proteína y conocer las posibles proteínas con las que puede interactuar *ANRIL* para modular la HR se utilizó el programa SFPEL-LPI (Zhang et al., 2018a), la secuencia utilizada de *ANRIL* fue de 3857 pb. El gen de *ANRIL* (*CDKN2B-AS1*) se obtuvo de la base de datos NCBI Gene (ID:100048912) y se empleó la isoforma con mayor número de bases (3857 bp) GenBank ID: NR_NR_003529.3

El programa SFPEL-LPI predijo la interacción de *ANRIL* con 5 proteínas: ELAV-like Protein 1 (9606.ENSP00000385269) con score de 0.9989, Insuline-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 (9606.ENSP00000258729) con score de 0.6716, Insuline-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (9606.ENSP00000371634) con score de 0.5471, RNA-binding protein FUS (9606.ENSP00000254108) con score de 0.5313 e Insuline Insuline-like growth factor 2 mRNA-binding 1 (9606.ENSP00000290341) con score de 0.5291 (Fig. A1).

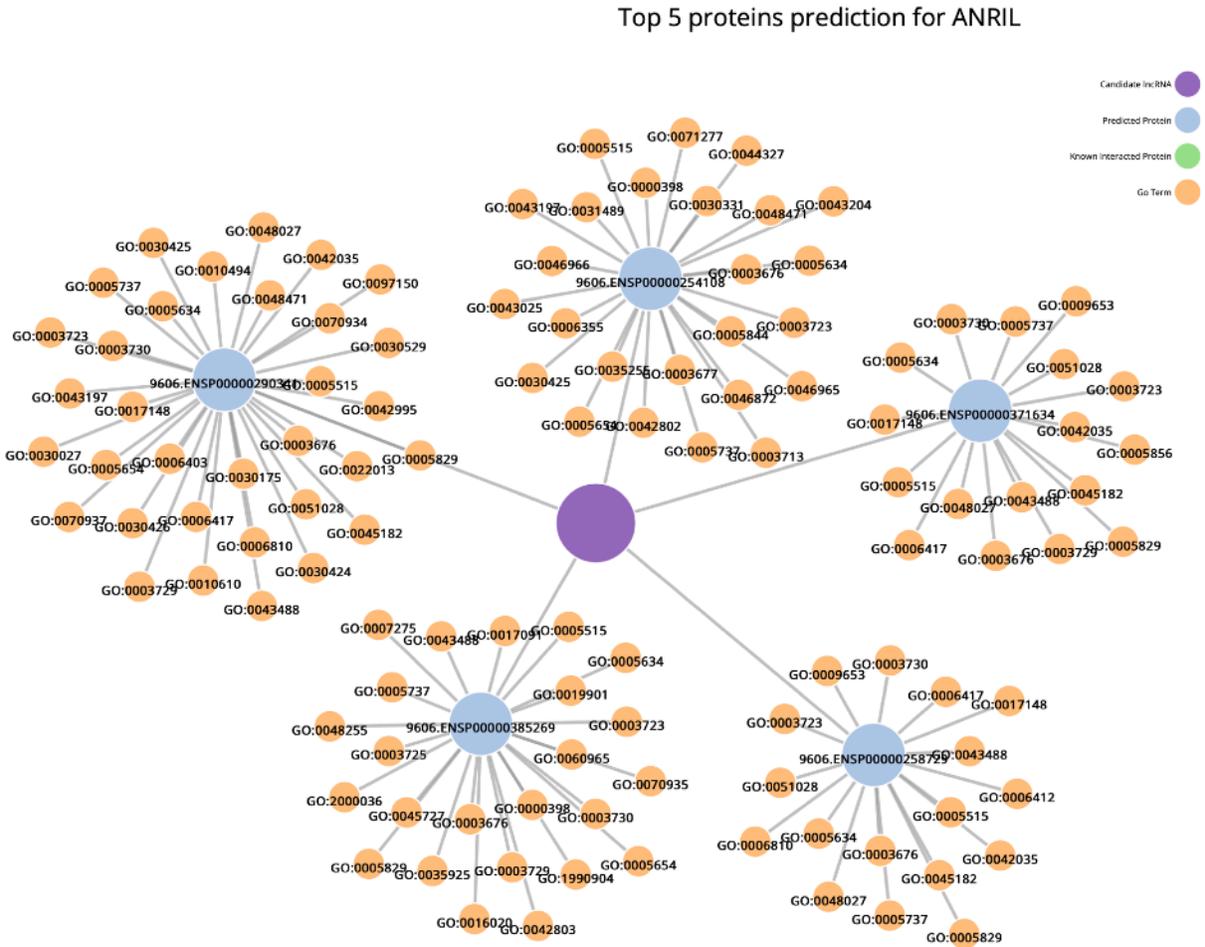


Figura A3. Predicción de interacción ANRIL-proteína. *ANRIL* podría estar interaccionando con 5 proteínas, dentro de ellas, ELAV-like Protein 1 (9606.ENSP00000385269) con el score más alto de 0.9989. Candidate lncRNA (lncRNA candidato: *ANRIL*), Predicted protein (Proteína predicha), Known interacted protein (Interacción proteica conocida), Go Term (Término Go) (Zhang et al., 2018a).

► 4. Valores de luminiscencia obtenidos en los experimentos de reparación por recombinación homóloga

© MDA-MB-231

	pMIR-report	pLucΔ3ORF	pLucΔ5ORF	ISceI-GR-RFP	R-LuxHR	RLuxHR+pcDNA3.1_ANRIL
Luciferasa	4E+02	4.00E+00	1.00E+01	6.00E+00	1.69E+02	554
	2.57E+03	7.00E+00	1.80E+01	5.00E+00	2.02E+02	425
	1.83E+03	8.00E+00	1.25E+01	5.00E+00	1.23E+02	369
Promedio	2E+03	6E+00	1E+01	5E+00	2E+02	449.333
Desviación S. Luciferasa	1093.009	2.081665	4.092676	0.57735	39.67786	94.87008
Renilla	2E+03	1E+02	1.33E+05	1.56E+04	6E+03	1.12E+04
	4.81E+03	4.55E+04	1.28E+05	1.30E+04	5E+03	1.57E+04
	4.04E+04	4.37E+04	1.67E+05	8.13E+03	7.09E+04	1.38E+04
Promedio	2E+04	3E+04	1E+05	1E+04	3E+04	1.36E+04
Desviación S. Renilla	21497.729	25699.190	21060.468	3812.7461	37798.433	2259.0558
Luciferasa Promedio/ Renilla Promedio	1.03E-01	2.13E-04	9.45E-05	4.35E-04	6.04E-03	3.31E-02
Normalización (Tasa de reparación)	1.00E+00	2.07E-03	9.21E-04	4.24E-03	5.89E-02	3.23E-01

Tabla A2. Actividad relativa de la luciferasa en MDA-MB-231. Triplicado biológico de la actividad relativa de Luciferasa y Renilla en pMIR-report/ pLucΔ3ORF/ pLucΔ5ORF/ ISceI-GR-RFP/ R-LuxHR/ RLuxHR+shRNA1/2. La normalización de la reparación se obtuvo respecto al valor de pMIR-report.

	pMIR-report	pLucΔ3ORF	pLucΔ5ORF	ISceI-GR-RFP	R-LuxHR	R-LuxHR	RLuxHR+shRNA1/2
Luciferasa	2.10E+03	5.00E+00	1.20E+01	5.8E+01	8.15E+03	120	25
	1.86E+03	5.00E+00	8.00E+00	8.00E+00	46	179	17
	2.12E+03	4.00E+00	8.00E+00	8.00E+00	87	208	17
Promedio	2.03E+03	4.67E+00	9.33E+00	2.47E+01	1465		19.6666666666667
Desviación S. Luciferasa	144.6835	0.5773502	2.3094010	28.867513	3275.501		4.618802154
Renilla	9E+04	3.83E+04	2.11E+04	3.15E+04	2E+03	1.82E+04	6.24E+03
	2E+04	4.64E+04	4.16E+04	4.22E+04	8.22E+03	3.82E+04	4.35E+03
	3E+04	3.44E+04	5.20E+04	3.55E+04	1.34E+04	4.70E+04	5.02E+03
Promedio	3.77E+04	3.97E+04	3.82E+04	3.64E+04	2.12E+04		5.20E+03
Desviación S. Renilla	4.58E+04	6.12E+03	1.57E+04	5.39E+03	17635.766		9.58E+02
Luciferasa Promedio/ Renilla Promedio	5.37E-02	1.18E-04	2.44E-04	6.77E+04	6.91E-02		3.78E+03
Normalización (Tasa de reparación)	1.00E+00	2.19E-03	4.55E-03	1.26E-02	1.29E+00		7.04E-02

Tabla A3. Actividad relativa de la luciferasa en BT-20. Triplicado biológico de la actividad relativa de Luciferasa y Renilla en pMIR-report/ pLucΔ3ORF/ pLucΔ5ORF/ ISceI-GR-RFP/ RLuxHR+shRNA1/2 y 6 repeticiones biológicas de la actividad relativa de luciferasa y Renilla en R-LuxHR. La normalización de la reparación se obtuvo respecto al valor de pMIR-report.

