



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA



DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DE LA SOBRE-EXPRESION DE miR-27b SOBRE LA
REPARACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS DE CÁNCER CÉRVICO-
UTERINO (HeLa) TRATADAS CON DOXORRUBICINA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLÓGO

PRESENTA: CRUZ TORRES ERICK LEONEL

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ROJAS DEL CASTILLO EMILIO

ASESORES:
DR. RODRIGUEZ MERCADO JUAN JOSE
DR. MATEOS NAVA RODRIGO ANIBAL

CIUDAD DE MÉXICO, 14, ENERO, 2025.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo por abrirme las puertas de su laboratorio en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Agradezco su conocimiento, confianza y paciencia, que fueron fundamentales para la elaboración de esta tesis. Cada una de sus historias hizo que creciera más mi pasión por la ciencia, el aprendizaje y por forjar nuevas metas.

A la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez quien confió en mi potencial desde el primer día, brindándome todo su conocimiento y atención. Gracias por los consejos académicos y personales, y por sus charlas que hicieron más amena mi estancia dentro del IIBO.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado, Dr. Aníbal Mateos Nava, Mtro. Alan Mejía Alcántara y a la Dra. Lucila Barrera por ayudarme a pulir mi trabajo escrito y por mostrarme esta rama de la biología, sobre la cual mi interés no ha dejado de crecer.

A los dos pilares de mi vida, María Fernanda Santiago Torres por ser mi mejor amiga y compañera de bromas. Erika Jazmín Torres Atilano mi compañera de vida y primer amor. Sé que no ha sido fácil criar a un hijo como yo, pero estoy completamente agradecido por tu presencia en cada etapa de mi vida, por apoyarme en cada decisión que he tomado aunque no estés de acuerdo, por la educación que me has brindado y el esfuerzo que haces día con día por mi hermana y por mí. Te amo, madre.

A mí abuelo Liborio que desde el cielo siempre me ha cuidado y acompañado. Hoy en día atesoro y pongo en práctica todos tus consejos que no supe valorar cuando niño.

A mis grandes amigos Alan, Alejandro, Brenda, Erik, Franky, Hugo, Karen, Mari, Mauricio, Sergio y Yamil que me han escuchado en todo momento, por cada segundo compartido. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las no tan buenas. Guardo con mucho cariño cada aventura vivida y cada risa compartida.

A Bryan, Gerardo y Germán a los que considero mis hermanos mayores y a su vez mis maestros, agradezco todo su apoyo que me ha hecho crecer dentro del trabajo y por cuidar de mí. Cada risa generada hizo que la jornada laboral fuera menos pesada.

Agradezco a cada una de las personitas que he conocido, que aunque con presencia efímera, han aportado mucho en mi crecimiento personal.

Finalmente, Al Alma mater por otorgarme un lugar, darme la facilidad de continuar mi formación profesional y permitirme conocer grandes personas que me han acompañado en mi camino.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Reparación por escisión de bases	4
Reparación por escisión de nucleótidos	6
Reparación de bases mal apareadas	9
Reparación por recombinación homóloga	11
Reparación por unión de extremos no homólogos	13
Marco teórico	15
Biogénesis de los miRNA	15
Doxorrubicina	18
Justificación	21
Hipótesis	21
Objetivo principal	21
Objetivos particulares	21
Metodología	22
Compuestos químicos	22
Línea celular	22
Transfección	22
Extracción y cuantificación de RNA	23
Determinación de la expresión de miR-27b-3p	23
Tratamiento	23
Ensayo cometa	23
Electroforesis pH 8 y pH >13	24
Análisis	24
Ciclo celular	24
Análisis estadístico	25
Resultados	26
Extracción de RNA	26
Viabilidad celular	27
Evaluación del daño a pH>13	28
Evaluación del daño a pH 8	30
Ciclo celular	32

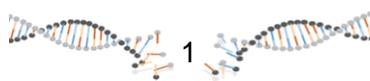
Discusión	35
Conclusión	38
Referencias bibliográficas	39

Lista de abreviaciones

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATM	Ataxia Telangectasia Mutada
BER	Reparación por Escisión de Base (Base Excision Repair)
BrEt	Bromuro de Etidio
DDR	Respuesta de Daño al ADN (Damage DNA Response)
DOX	Doxorrubicina
DSB	Rotura de Doble Cadena (Double strand break)
FDA	Diacetato de fluoresceína
GGR	Reparación Global del Genoma
HRR	Reparación por Recombinación Homóloga (Homologous Recombination Repair)
NER	Reparación por Escisión de Nucleótido (Nucleotide Excision Repair)
NHEJ	Reparación por Extremos no Homólogos (Non-Homologous End Joining)
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SSB	Rotura de Cadena Sencilla (single strand break)
TCR	Reparación Acoplada a la Transcripción (Transcription-coupled repair)

Resumen

Los microRNAs son pequeñas secuencias de RNA presentan una secuencia de ~ 22 nts y se encuentran involucrados en varios procesos de la célula, sin embargo, en algunas enfermedades como lo es el cáncer estos pueden estar alterados, siendo uno de estos la reparación del ADN. Previo a este trabajo se observó que miR-27b-3p afecta de manera negativa los mecanismos de reparación de doble hebra en fibroblastos embrionarios murinos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue conocer el papel que juega el miR-27b-3p en la reparación del ADN en un modelo celular transformado como lo es la línea celular HeLa. El interés fue evidenciar si la inestabilidad genética que tiene un modelo transformado altera el patrón de regulación del miR-27b-3p. Para poder llevar a cabo nuestro objetivo, se transfectaron células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) con miR-27b-3p, se trataron con clorhidrato de Doxorrubicina y se evaluó el daño generado a través de la técnica “Single Cell Gel Electrophoresis” o ensayo Cometa, en su versión alcalina y neutra, además, se analizó el ciclo celular para evaluar el efecto de miR-27b-3p en la progresión de las células tratadas. La funcionalidad de la reparación del daño al ADN se determinó por su persistencia a través de una cinética de 0 a 48 h. Los resultados del ensayo cometa en este modelo de estudio muestran que la sobreexpresión con miR-27b-3p *per se* no induce daño al ADN. La doxorrubicina induce rompimientos en el ADN significativos persistentes a las 24 h, 36 h y se reparan a las 48 h. En las células HeLa transfectadas con miR-27b-3p hay persistencia del daño a través del tiempo (0 a 48 h) señalando la pérdida de capacidad de reparación. Mientras que las células transfectadas y tratadas mostraron un arresto en la fase S/G₂ del ciclo celular a las 24, 36 y 48 h. Los hallazgos de este trabajo indican que miR-27b-3p es un regulador negativo de los mecanismos de reparación del ADN inducido por doxorrubicina en la línea celular transformada HeLa.



Abstract

MicroRNAs are small RNA molecules approximately 22 nucleotides long that play crucial roles in various cellular processes. However, in diseases such as cancer, these processes can be dysregulated, including DNA repair mechanisms. Previous studies have demonstrated that miR-27b-3p negatively impacts the double-strand break repair mechanism in murine embryonic fibroblast. Therefore, the objective of this study was to know the role of miR-27b-3p in DNA repair in a transformed model, specifically HeLa cells. We aimed to determine whether the genetic instability of a transformed model affects the regulation of miR-27b-3p. HeLa cells were transfected with a mimic sequence of miR-27b-3p and treated with doxorubicin hydrochloride. DNA damage was assessed using the “Single Cell Gel Electrophoresis” (comet assay) under both alkaline and neutral conditions, and cell cycle analysis was performed. The functionality of DNA damage repair was evaluated using the comet assay over a time course from 0 to 48 h. Also, the cell cycle was analyzed to evaluate the effect of miR-27b-3p in treated cells progression. The results showed that overexpression of miR-27b-3p alone does not induce DNA damage. However, doxorubicin significantly induce DNA breaks that persist at 24 h and 36 h but are repaired by 48 h in non-transfected cells. In contrast, cells transfected with miR-27b-3p exhibited persistent DNA damage throughout the time course (0 a 48 h), suggesting a loss of DNA repair capacity. However, the transfected and treated cells showed arrest in S/G₂ phase of the cell cycle at 24, 36 and 48 h. The findings indicate that miR-27b-3p negatively regulates the repair mechanism of doxorubicin induced double strand breaks in HeLa cells.



Introducción

Los microRNAs (miRNA) son pequeñas moléculas de RNA, no codificantes que presentan una longitud aproximada de 22 nucleótidos (Xu *et al.*,2018). Son capaces de regular procesos celulares como el desarrollo embrionario, el metabolismo, la expresión de genética, la proliferación, la división celular, la reparación de daños al ADN, por mencionar algunos.

La regulación y el mantenimiento del genoma juegan un papel importante, día con las células están expuestas a factores extrínsecos e intrínsecos. En los primeros se encuentra la amplia gama de agentes xenobióticos, las radiaciones y algunos agentes biológicos como los virus; en tanto que en los intrínsecos están las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el propio metabolismo celular. Estos xenobióticos pueden dar origen a lesiones en el ADN, que comúnmente incluyen modificaciones en bases y azúcares, **roturas de una y doble cadena** (SSB y DSB respectivamente por sus siglas en inglés), sitios libres de bases y entrecruzamientos tanto de proteínas y ADN y ADN a ADN (Acunzo *et al.*, 2015; Dexheimer, 2013).

Para poder proteger el genoma de estos daños, las células inician una cascada de eventos altamente coordinados como respuesta al daño al ADN (DDR por sus siglas en inglés) que detecta las lesiones, promueve la reparación o activa el proceso de muerte celular programada (Peraza-Vega *et al.*, 2021; Dexheimer, 2013). La reparación del ADN es fundamental para la vitalidad de las células, por lo que se han descrito diferentes mecanismos los cuales son: **reparación por escisión de bases** (BER), **reparación por escisión de nucleótidos** (NER), **reparación de bases mal apareadas** (MMR) y para las roturas de doble cadena podemos encontrar la **unión de extremos no homólogos** (NHEJ) y la **reparación por recombinación homóloga** (HR). El mecanismo empleado dependerá del tipo de lesión en el ADN, la fase del ciclo celular donde ocurra y el grado de diferenciación celular (Whitaker *et al.*, 2017). Los procesos de reparación difieren en su naturaleza y complejidad. Algunas vías solo requieren una enzima para restaurar la secuencia original del ADN, otras funcionan mediante la acción coordinada de varias (Schärer, 2003).



Reparación por escisión de bases

BER es una de las vías empleadas en la reparación del ADN, encargada de corregir lesiones en bases y daños no voluminosos que pueden ser causados por oxidación, desaminación o metilación. Esta vía tiene su lugar de acción dentro del núcleo y en las mitocondrias (Krokan y Bjørås, 2013), está activo principalmente en la fase G1 del ciclo celular (Chatterjee y Walker, 2017) y cuenta con dos rutas por las cuales se pueden reparar las lesiones, la elección del camino a seguir dependerá de la glicosilasa específica y el estado fisiológico de la célula.

Esta vía tiene varias etapas, las cuales consisten en el reconocimiento de la base dañada, incisión de sitio abásico (AP, apurínicos o apirimídicos), la síntesis de ADN restante a través de la polimerasa y la ligación del ADN (Kim y Wilson, 2012).

El primer paso en la reparación es el reconocimiento de la base dañada por una glicosilasa, la cual dará paso a un proceso conocido como “*flipping base*”, que es un proceso que siguen la mayoría de las glicosilasas (mono y bifuncionales) en donde la base se gira al exterior de la hélice permitiendo el acoplamiento del sitio activo de la enzima y el corte N-glucosídico. El resultado de este paso da un sitio AP, que es tratado a través de las glicosilasas bifuncionales, o en el caso de las monofuncionales se emplea a APE1 que escinde en el esqueleto del ADN, dejando un espacio intermediario con un hidroxilo en la región 3' y una desoxirribosa fosfato 5' (dRP), al término del corte se obtiene la rotura de cadena sencilla (Wallace *et al.*, 2012). Posteriormente es tratada a través de la pol β que su dominio N-terminal va a actuar sobre sobre la cadena del ADN eliminando el sitio 5' dRP, dando como resultado el espacio 5' fosfato que va a permitir a que la polimerasa inserte los nucleótidos faltantes. Este paso es conocido como “parche corto” (short-patch) BER, sin embargo, cuando la síntesis va desde 2 a 12 nucleótidos se le conoce como “parche largo” (long-patch) BER y se lleva a cabo por la Pol δ y la Pol ϵ (Whitaker *et al.*, 2017).

Para poder terminar el mecanismo de BER, los nucleótidos insertados tienen que estar sellados a la hebra. El cual será llevado a cabo por la ligasa III (LIG3), esta molécula deberá estar en asociación con algunas proteínas dependiendo la vía. En el caso de short-patch se hace el complejo LIG 3/XRCC1 (complemento cruzado de



reparación de rayos X 1) y en la vía long-patch se asocia **LIG 3/LIG 1** (ADN-ligasa 1) **figura 1** (Peraza-Vega, 2023; Hernández *et al*, 2009).

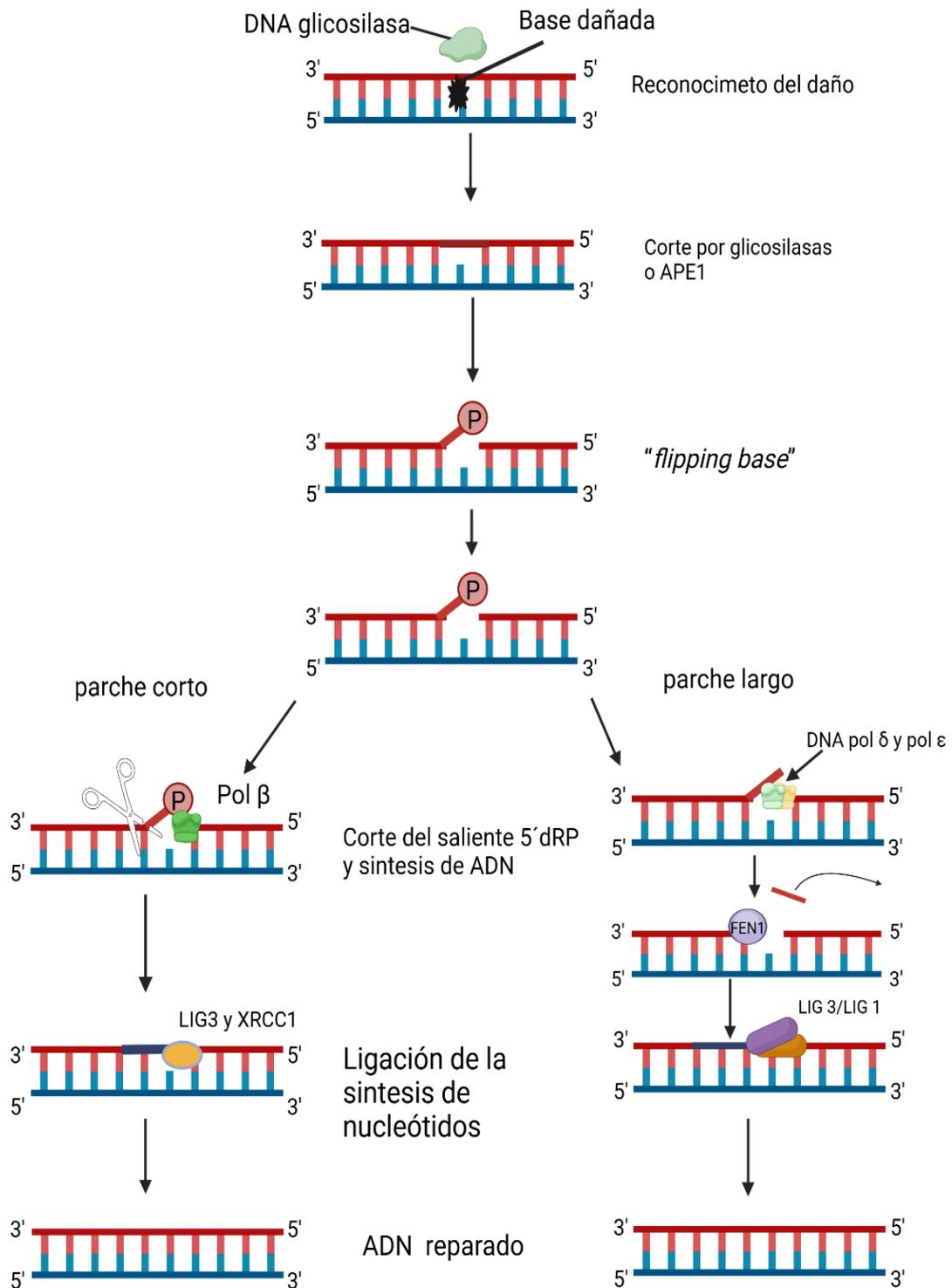


Figura 1. Muestra el esquema general del mecanismo de reparación por escisión de bases. Creada en BioRender.com.



Reparación por escisión de nucleótidos

NER, también está involucrado en la reparación de lesiones monocatenarias, la diferencia en esta vía es por las lesiones que detecta y la presencia de daños voluminosos, los cuales distorsionan la estructura del ADN y bloquean el flujo del ciclo celular. Los sustratos comunes en los que NER va a actuar son: En dímeros de ciclobutano-pirimidina (CDP), productos de pirimidina-(6,4)-pirimidona (6-4PP) que son generados por la radiación ultravioleta, entre otros. La exposición a agentes alquilantes como lo son los hidrocarburos aromáticos policíclicos que pueden formar aductos voluminosos, estos pueden estar presentes en algunos productos de consumo humano: el humo del cigarro o la carne carbonizada. Se le atribuye participación en enlaces entrecruzados inter e intra-cadena que son generados por algunos fármacos (Peraza-Vega, 2023).

Dentro de esta vía se puede reconocer caminos por los cuales los daños son reparados, uno de ellos es la **reparación acoplada a la transcripción** (TCR) que es selectiva para lesiones presentes en la cadena transcrita y la **reparación del genoma global** (GGR). Las dos vías difieren en los tiempos de acción, ya que TCR puede reparar los daños en la cadena que está siendo transcrita por la RNA polimerasa II, por lo que estas zonas en transcripción se reparan más rápido que las de otras regiones del genoma. Sin embargo, la tasa de reparación en GGR también depende del tipo de lesión. Esto hace que sea considerado un proceso relativamente lento y algo más ineficiente, ya que escanea todo el genoma en busca de daños en el ADN, independientemente si está activo o no transcripcionalmente (Melis *et al.*, 2013).

Para TCR la detección del daño será indicado a través de la RNA polimerasa III (Pol III) que se encuentra detenida en algún punto de la transcripción y comienza a reclutar factores como la subunidad del complejo de ubiquitina ligasa (CSA) y el factor de remodelación de la cromatina (CSB). Estas serán las encargadas de remover el estancamiento de la RNA pol II. En GGR el reconocimiento de las lesiones se da por una proteína de unión al ADN específica 1 (XPE) que está constituida por dos subunidades específicas de daño DDB1 y DDB2 estas están encargadas de reconocer el daño para poder transferirlo al complejo (XPC), esta molécula posee la capacidad de reconocer alteraciones estructurales de manera tridimensional (Peraza-Vega, 2023).



Posteriormente, tanto en GGR-NER como en TCR-NER, seguirán los mismos pasos, la maquinaria de NER va a reclutar el complejo abierto conocido como (XPA) en las proximidades de la lesión. Esto hará que interactúe con algunos factores como lo son TFIIH, RPA y XPG. XPA se encarga de realizar un segundo reconocimiento que permite proteger al ADN no dañado de ser reparado por escisión. La unión de XPA y la proteína de replicación (RPA) dará paso a la estabilización y extensión de la hebra para poder llevar a cabo el corte en la posición 5´ y 3´ de la lesión dejando el espacio de ~30 nucleótidos. Esta será realizada por las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1. La ADN polimerasa δ o ϵ sintetiza los nucleótidos restantes, usando como molde la hebra hermana y para dar paso final a esta vía la ligasa I sellara el corte **Figura 2** (Dexheimer, 2013; Costa *et al.*, 2003).



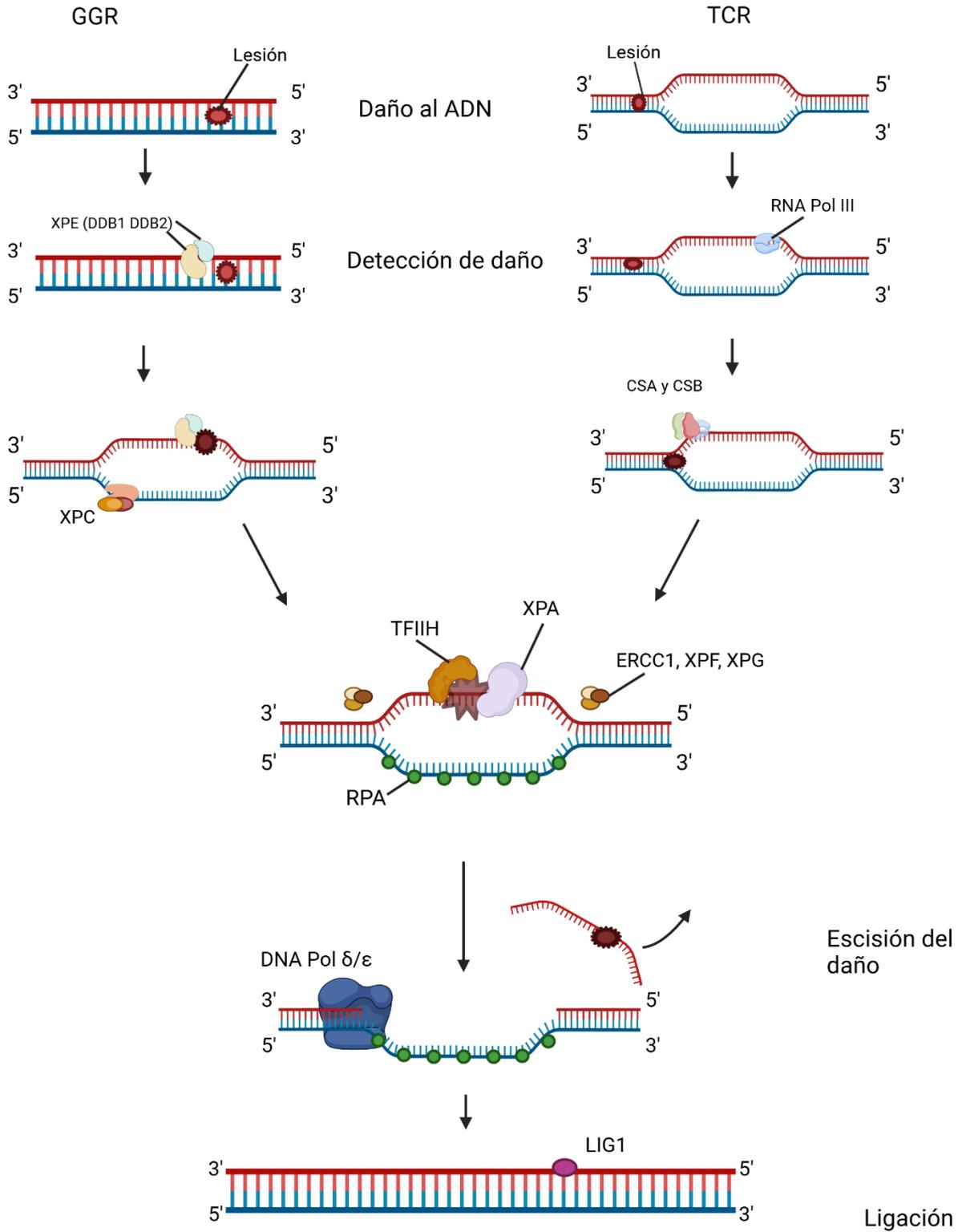


Figura 2. Panorama general del mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos. Se muestran ambas vías por las que se pueden reparar las lesiones GG-NER (Reparación del Genoma Global) y TCR-NER (Reparación Acoplada a la Transcripción). Creada en BioRender.com.

Reparación de bases mal apareadas

Los errores generados en la replicación de ADN, son reparados a través de la vía MMR la cual corrige los desajustes base-bases y de inserción-delección que surgen en la incorporación incorrecta o en el deslizamiento de la polimerasa sobre la hebra Hsieh, (2001). estos tipos de errores ocurren con una tasa de de ~ 1 en 10^8 pares de bases durante la biosíntesis del ADN (Kunkel y Erie, 2005).

La vía MMR se puede simplificar en tres pasos reconocimiento y reclutamiento, escisión y síntesis. Para el reconocimiento, en las células humanas se ha descrito el heterodímero MutS α conformado por hMSH2 y hMSH6, se encarga de reconocer el error, cuando lo encuentra, el heterodímero cambia su conformación dependiente de ATP para poder hacer el complejo MutS α :ADN. El Antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA) ayuda a reclutar la maquinaria de MMR, como lo es el heterodímero MutL α (MLH1 y PMS2) que es el mediador de los demás procesos para llevar a cabo la escisión de la base errónea (Olave y Graham, 2022; Kunkel y Erie, 2005; Stojic y jiricny, 2004). MutS y MutL interactúan para poder reclutar y activar el homodímero MutH, quien se encarga de reconocer y cortar la secuencia hemimetilada dGATC, en la hebra recién sintetizada, este paso se ha descrito en *E. coli*, aunque en humanos no se ha encontrado su homólogo (Li, 2008).

Para la escisión, se recluta al factor de replicación C (RFC) que junto con PCNA activan a EXO 1 para realizar el corte en 3' y RPA se encarga de desplazar la base cortada y de proteger el saliente resultante en el ADN. (Kunkel y Erie, 2005; Stojic y jiricny, 2004).

La ADN pol α se encarga de rellenar las bases faltantes para poder sellar la muesca a través de la ADN ligasa **figura 3** (Olave y Graham, 2022).



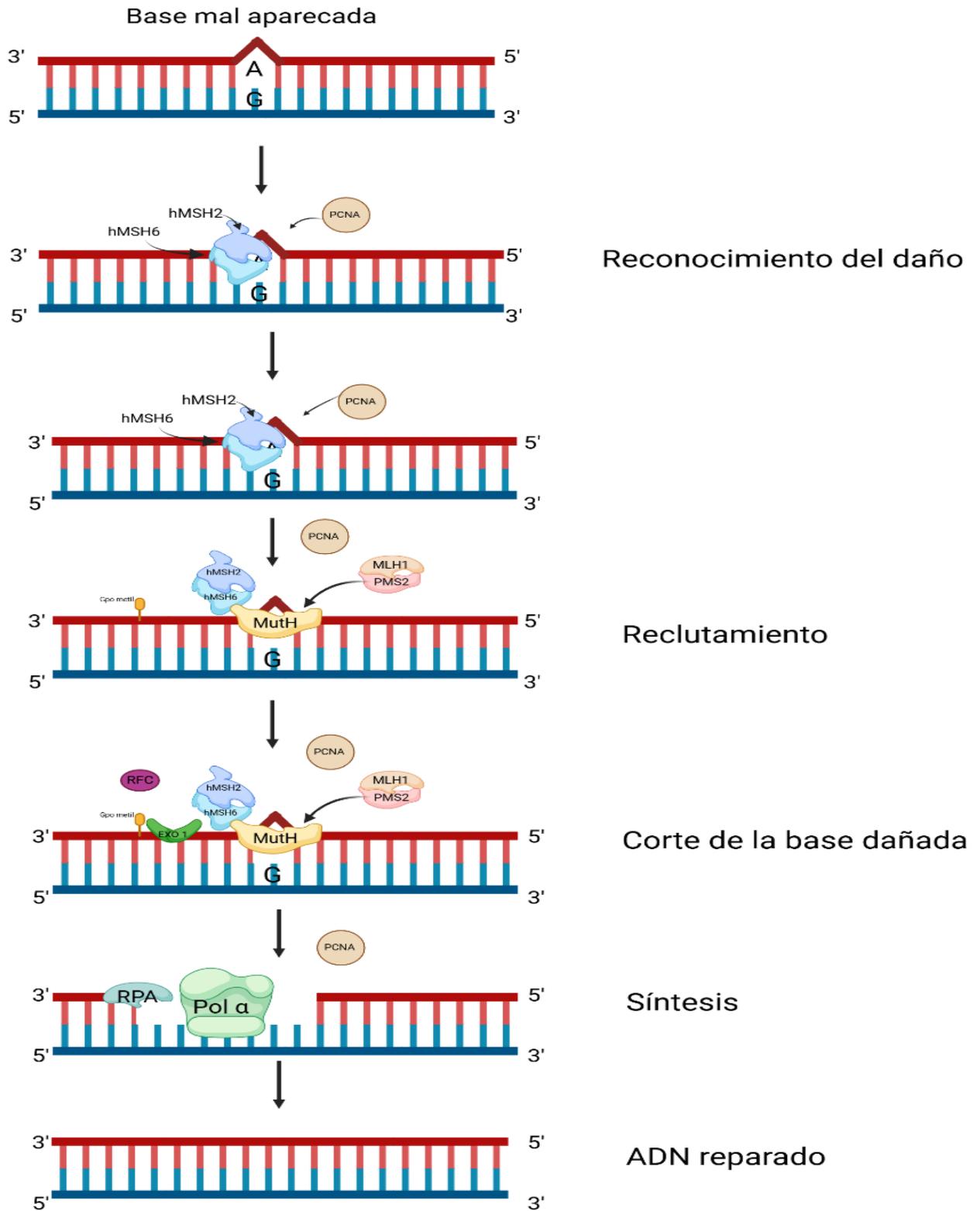


Figura 3. Esquema de la vía de reparación de bases mal apareadas. Creada en BioRender.com.

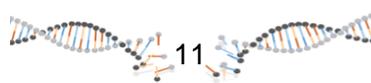
Reparación por recombinación homóloga

Esta vía es conocida por ser libre de errores, debido a la reparación de DSB a través de las cromátidas hermanas no dañadas usándolas como plantilla, por lo que su participación es principalmente en las etapas S tardía y en G₂ del ciclo celular. (Krajewska *et al*, 2015).

El primer paso para activar esta vía es el reconocimiento de la DSB a través del complejo heterotrimérico MRN que está compuesto por Mre11 que tiene actividad de endonucleasa y exonucleasa, NBS1 juega un papel de señalización en presencia de las DSB para la activación de ATM y el comienzo DDR y Rad50 estimula la unión a ADN y la actividad nucleasa (Peraza-Vega, 2023).

Después de que ha ocurrido el reconocimiento del daño, se da paso a el procesamiento de los extremos adyacentes a la rotura de doble cadena con dirección 5' y 3' que es dirigida por MRN junto con Ctlp, que ayuda a la degradación nucleofílica de las hebras, la helicasa BLM (síndrome de Bloom) y la exonucleasa 1 (Exo1) ayuda a terminar la resección de las colas monocatenarias y hace posible la unión RPA en la región 3' de las hebras, para llevar a cabo la degradación de las estructuras secundarias en los salientes, la presencia de RPA no permite la unión del filamento de la nucleoproteína (Rad51) que es la encargada de la búsqueda de ADN homólogo, por lo que se reclutan a sus parálogos RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 y XRCC3. Las proteínas mediadoras como Rad52 y BRCA2 ayudan a la eliminación de RPA y hacen posible la unión de Rad51 en las colas de ADN (Dexheimer, 2013; Nimonkar *et al.*, 2008).

La unión del saliente 3' y Rad51 forman un complejo conocido como bucle D, que ayuda al desplazamiento y la extensión de la hebra invasora sobre la secuencia homóloga, mientras la ADN polimerasa ϵ comienza la síntesis nucleótidos y el segundo extremo queda unido con la hebra desplazada por el bucle D, posteriormente, ambos ADN son sellados por la ligasa I y esto produce la formación de uniones Holliday. Las hebras recombinadas interactúan a través de una doble unión Holliday y para poder ser removidas se reportan tres caminos, los cuales van a procesar los enlaces intermedios generados en las bifurcaciones de replicación, la



eliminación por disolución emplea a la Top III α y BLM **figura 4** (Peraza-Vega, 2023; Wyatt y West, 2014; Masayuki *et al.*, 2006).

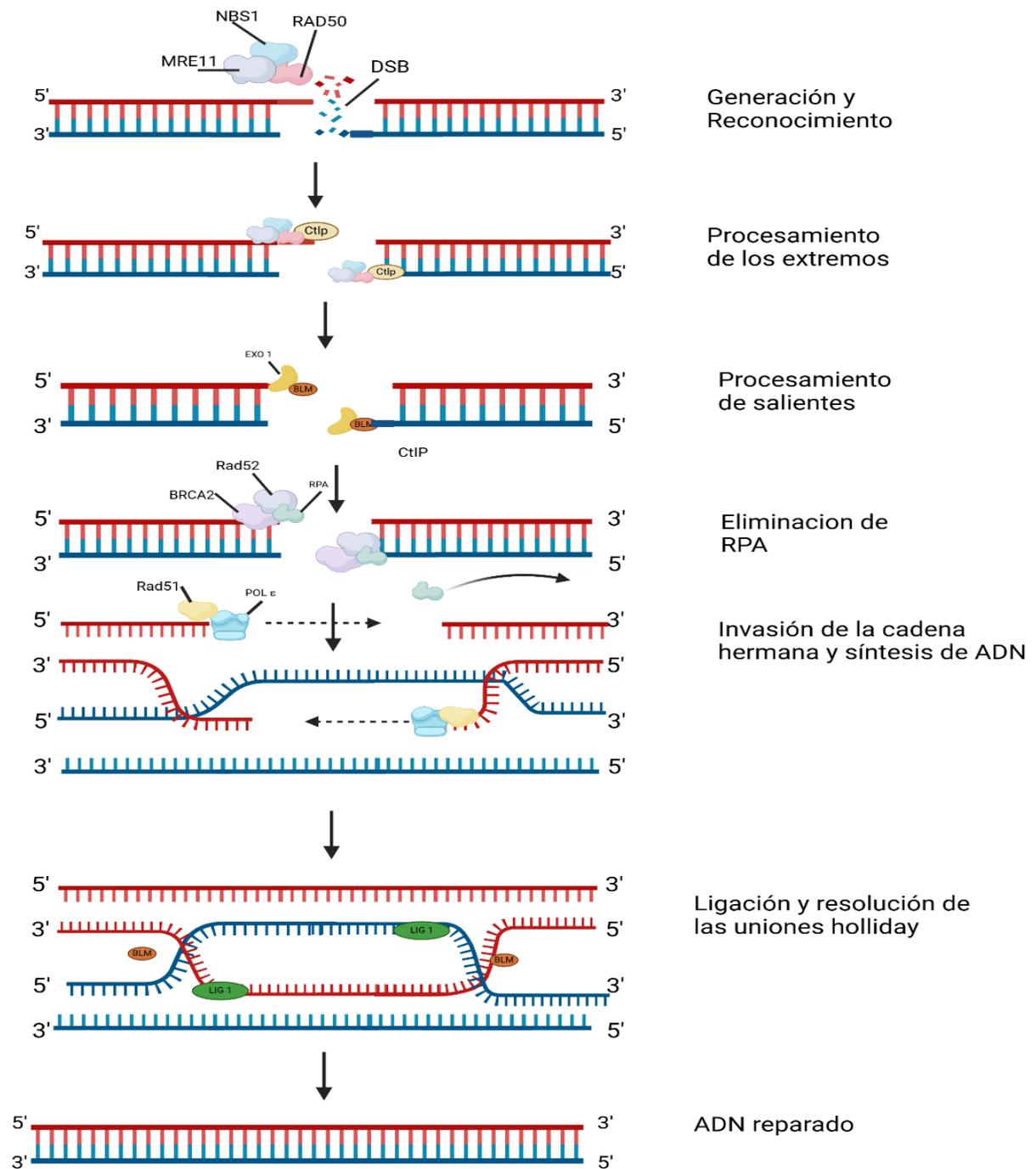


Figura 4. Esquema del mecanismo de Reparación por Recombinación Homóloga (HRR), vía libre de errores por la cual se reparan las DSB. Creada en BioRender.com.

Reparación por unión de extremos no homólogos

NHEJ es una de las rutas por las cuales se reparan las roturas de doble hebra, mediado por una cantidad pequeña de factores, siguiendo el mismo camino que los demás mecanismos. Las lesiones reparadas por esta vía son altamente genotóxicas y la ligación directa es propensa a presentar errores (Chiruvella *et al.*, 2013).

Después de ser reconocido el daño, es indispensable la unión del heterodímero ku70/ku80 (Ku) en los extremos salientes de las hebras, Ku adopta la forma de un anillo que rodea completamente la doble hélice del ADN. Al formarse el complejo ku/ADN promueve el reclutamiento de los demás factores en las regiones de ADN expuestas, como la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PKcs) donde va a interactuar con el dominio C carboxilo terminal de la subunidad ku80. ADN-PKcs se fosforila a sí mismo, y permite que los extremos se vuelvan más accesibles (Chiruvella *et al.*, 2013; Lieber *et al.*, 2010).

El siguiente paso es el procesamiento de las hebras, la modificación va a depender del tipo del daño y la complejidad de la lesión. En las roturas se pueden encontrar protuberancias de ADN monocatenario, las cuales son escindidas o usadas como plantilla para la formación de microhomologías. (Dexheimer, 2013).

Al término de la fosforilación, en el mecanismo de escisión o resección del ADN se recluta a la exo-endonucleasa Artemis conocida como reparación de enlaces cruzados de ADN 1C (DRCL1C) que puede cortar endonucleolíticamente regiones de los extremos 3' y 5'. Las polimerasas de baja fidelidad de la familia X; Pol μ y Pol λ están involucradas en la resíntesis, pueden depender o no de una plantilla. La Pol μ , puede tener más protagonismo ya que promueve la ligación de extremos 3' no compatibles creando microhomologías en los salientes. Sin embargo, la Pol λ se ve más involucrada en la ligación con regiones que ya presentan homologías en los extremos y solo necesitan llenar los espacios vacíos. La unión de las hebras se consigue a través de la asociación de la ligasa IV (LIG 4), el gen de reparación de rayos X complemento cruzado 4 (XRCC4) y el factor 1 de unión de extremos no homólogos (XLF) **figura 5** (Peraza-Vega, 2023; Chiruvella *et al.*, 2013; Lieber *et al.*, 2010).



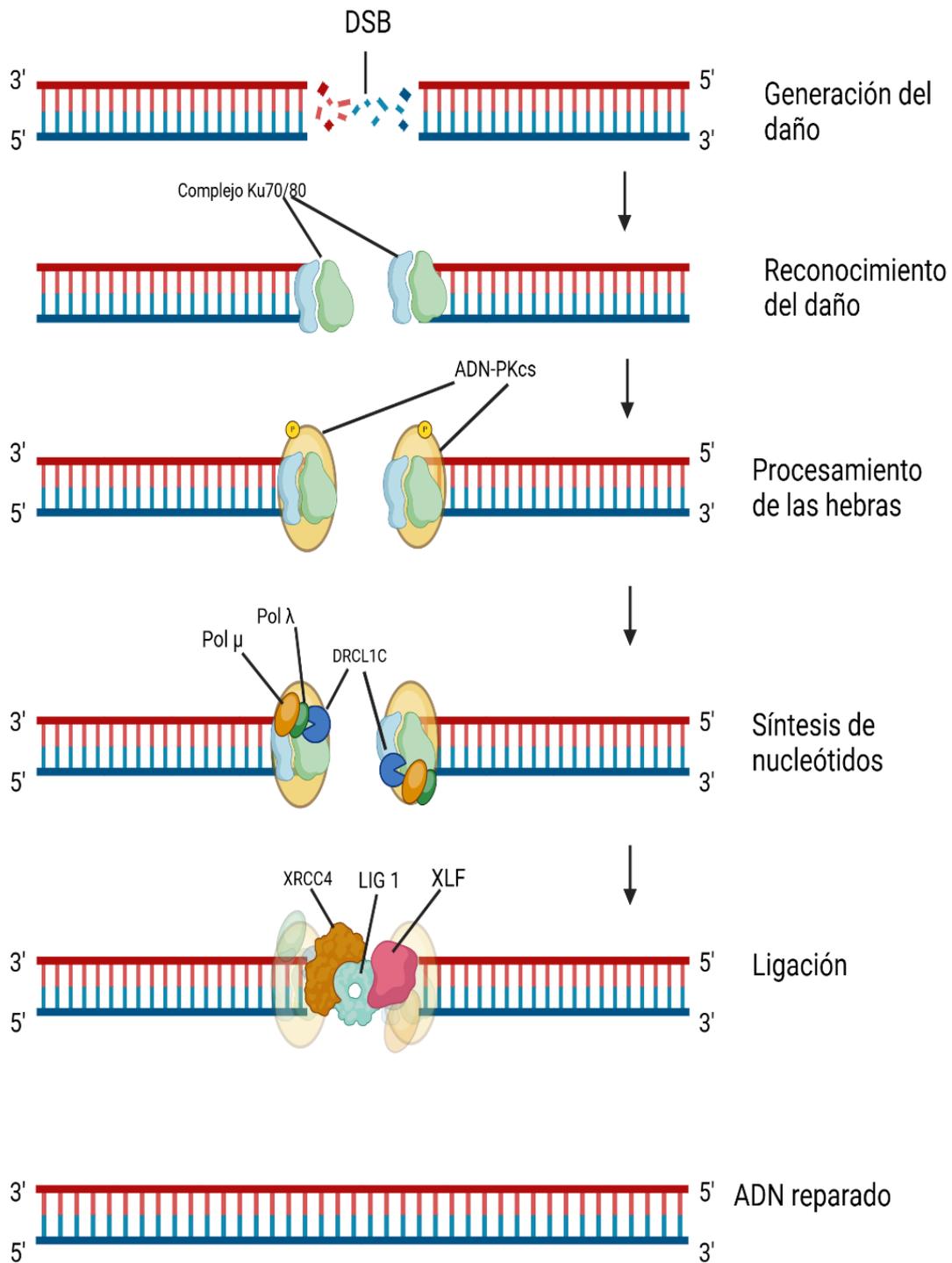


Figura 5. Muestra el mecanismo de Unión por Extremos No Homólogos (NHEJ). Creada en BioRender.com.

Estas vías de reparación son reguladas por una gran cantidad de miRNAs, específicamente se sabe que en los mecanismos de reparación de doble hebra hay aproximadamente 275 miRNAs relacionados con NHEJ y 210 miRNAs asociados con HR. Dentro de estos, se observó que el microRNA miR-27b-3p puede controlar la expresión de genes que están involucrados en este último mecanismo. (Peraza-Vega *et al.*, 2022).

Por lo que el objetivo de este trabajo es conocer el papel que juega miR-27b-3p en la reparación del ADN en un modelo transformado como lo es las células HeLa. Y si la inestabilidad genética que tiene un modelo transformado altera la función del miR-27b-3p (Tang, 2019, Kushwah *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).

Marco teórico

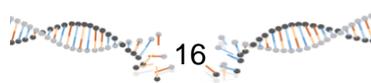
Biogénesis de los miRNA

Los miRNA son secuencias no codificantes que funcionan como moléculas guía en el silenciamiento del RNA. Su biogénesis tiene un control estricto. La mayoría de los miRNA canónicos están codificados por regiones intrónicas transcripcionales codificantes o no codificantes, también existen los miRNAs que están codificados por regiones exónicas (Ha *et al.*, 2014). Desempeñan un papel importante en la regulación génica y en múltiples facetas de las actividades celulares. En donde su producción y maduración están reguladas en múltiples niveles, por la transcripción, el procesamiento y el transporte al citoplasma (Wan *et al.*, 2011).

La mayoría de los miRNA se transcriben a partir de secuencias de ADN en miRNA primarios (pri-miRNA) y finalmente, en miRNAs maduros. La producción de estas secuencias cortas va a depender de las ubicaciones, donde se pueden transcribir a través de dos diferentes rutas, la intergénica y la intrónica/exónica: Los miRNAs intergénicos son transcritos a través de la polimerasa II que resulta en un pri-miRNA. Sin embargo, los miRNA intrónicos o exónicos se transcriben juntos con los genes huéspedes y están regulados por sus propios promotores (Ha *et al.*, 2014).



Los pri-miRNAs están protegidos y poliadenilados, estos son escindidos por el complejo nuclear tipo RNAsa tipo III Drosha-DGCR8 conocido como microprocesador dando como resultado una forma de horquilla llamada pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos con una estructura de tallo-bucle (25 a 30 pares de bases). La exportina 5 es un transportador nuclear dependiente de RanGTP donde su función es llevar del núcleo al citoplasma el pre-miRNA donde Dicer, una endorribonucleasa de la familia RNase III, escinde los pre-miRNA dando un dúplex de aproximadamente 20–25 nucleótidos donde se diferencia la cadena funcional y la pasajera dando como resultado a los miRNA maduros y las proteínas Argonauta forman el complejo silenciador inducido por RNA(RISC) que media el silenciamiento génico postranscripcional. El miRNA maduro guía el complejo RISC para reprimir la expresión génica inhibiendo la traducción e induciendo la degradación del mRNA **figura 6** (Wan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2007).



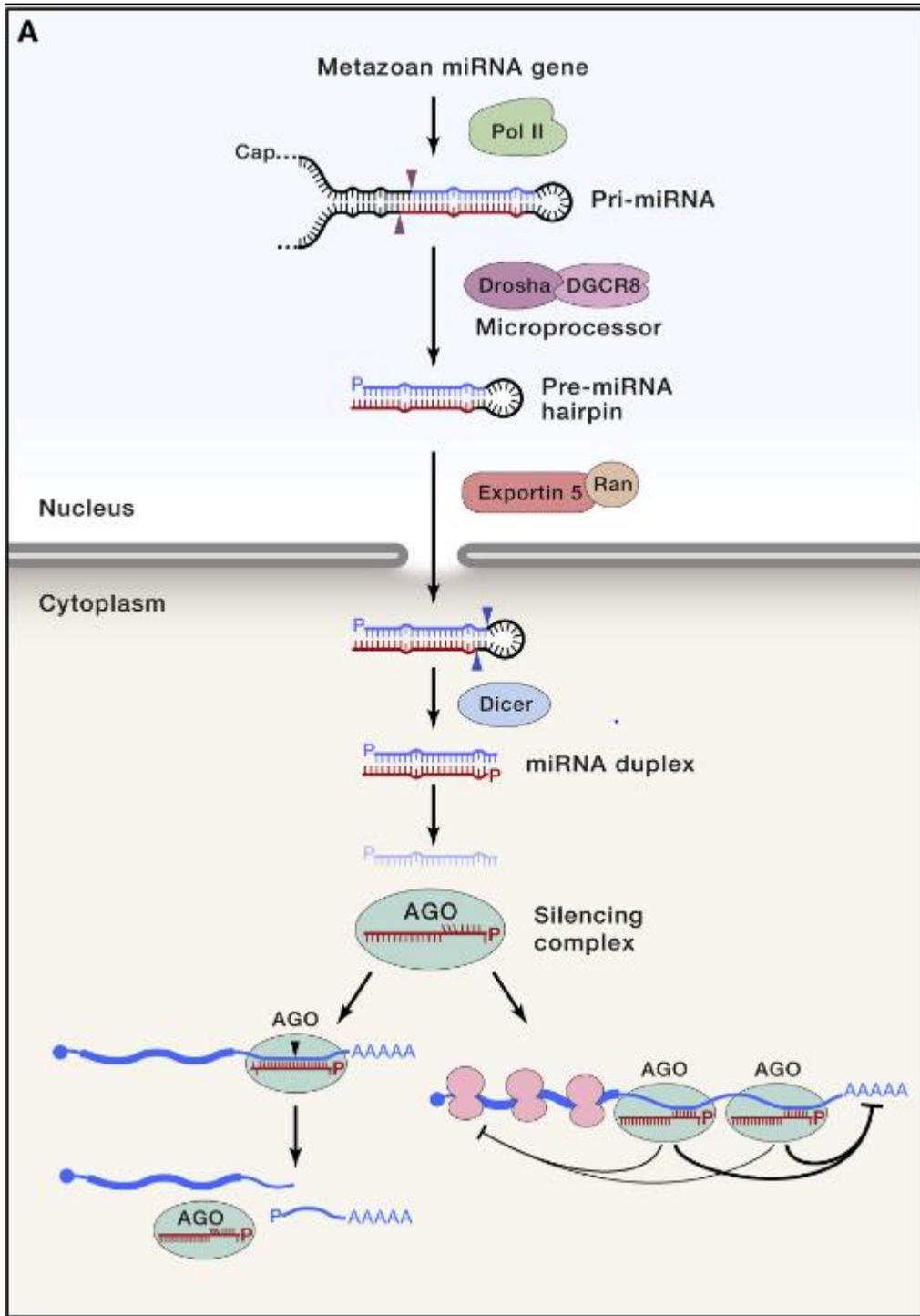


Figura 6. Esquema de la biogénesis de los miRNA. Argonauta (AGO). Tomado de Bartel, 2018.

Los miRNAs pueden regular muchos objetivos de mRNA y varios miRNA pueden regular un solo mRNA, también están involucrados en procesos como: transiciones del desarrollo, patrones neuronales, metabolismo de la adipogénesis, por mencionar algunos. Dentro de la literatura se ha demostrado que hay una posible

asociación de los miRNA con varias neoplasias malignas y enfermedades infecciosas en humanos (Chhabra *et al.*, 2010).

miR-27b se encuentra ubicado en la familia de los miR-23-27-24, el cual se divide en dos grupos: miR-23a~27a~24-2 y miR-23b-27b-24-1. El miR-27b se encuentra ubicado dentro del decimocuarto intrón del gen huésped C9orf3 humano en el cromosoma 9. El procesamiento del dúplex por Drosha y Dicer resulta en cadenas con diferente longitud, los brazos 3p maduros de miR-27a y miR-27b difieren en un nucleótido y comparten RNAm objetivo, mientras que los brazos 5p tienen 5 nucleótidos de diferencia entre ellos, la cadena 5p del RNA de miR-27b mide 22 nucleótidos de longitud mientras que la cadena 3p cuenta con 21 nucleótidos. La cadena 3p de miR-27b tiene un número de genes blanco muy superior al de la cadena 5p (Peraza-Vega *et al.*, 2023; Granados *et al.*, 2017).

Peraza-Vega (2023) menciona que la expresión aberrante de los miRNA es conocida dentro de diferentes patologías como lo es en el cáncer, los datos reportados no siempre se pueden correlacionar debido a la adaptabilidad que desarrolla en diferentes tejidos, se ha asociado la expresión de miR-27b-3p en diferentes tipos de cáncer, también se ha observado que la sobreexpresión de miR-27b se ve involucrado en la promoción a la sensibilidad a los taxanos (Docetaxel) en diferentes líneas celulares que han presentado resistencia a fármaco, mientras que en su parálogo miR-27a hace más sensible las células tumorales que presentan resistencia a la doxorubicina (Konoshenko y Laktionov, 2022).

Doxorrubicina

La Doxorubicina o adriamicina (Dox) es de las antraciclinas más utilizadas para combatir los tumores sólidos y líquidos. Este fármaco fue descubierto en 1969 por un grupo italiano que utilizó como precursor la daunorrubicina que es extraída de la cepa *Streptomyces peucetius* (Nobili *et al.*, 2009). Con una fórmula química $C_{27}H_{29}NO_{11}$ y cuyo peso molecular es de 579.98/mol. Presenta una estructura tetracíclica unida por un enlace glucosídico al azúcar daunosamina (Blanco, 2016).

La absorción de la Dox por la célula es por difusión pasiva, una vez que se encuentra en la zona plasmática el mecanismo de acción tiene como primer paso la asociación con el proteosoma uniéndose en la subunidad 20s para poder translocarse



sobre los poros nucleares, la Dox tiene una afinidad por el ADN nuclear, por lo que se disocia fácilmente del proteosoma. Aunque se ha reportado que también puede interactuar con el ADN mitocondrial (Tacar *et al.*, 2013).

La Dox tiene varios mecanismos por los cuales genera daño al ADN, de los cuales Zhu *et al.* (2016) y Yang *et al.* (2014) describen:

- La formación de aductos es el resultado de la interacción de la Dox con el ADN en las regiones con pares de CG adyacentes, a través del enlace covalente mediado por formaldehído y un enlace de hidrógeno.
- La generación de ROS se da a través de la oxidación de la estructura quinona de la Dox a semiquinona, esta interactúa con el oxígeno para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻).
- La inhibición de la topoisomerasa II se da al estabilizar el complejo ADN-Topoisomerasa II, lo que impide la religación de las hebras que fueron cortadas dando como resultado roturas en el ADN e inhibiendo la replicación, siendo este su efecto más relevante. **Figura 7.**



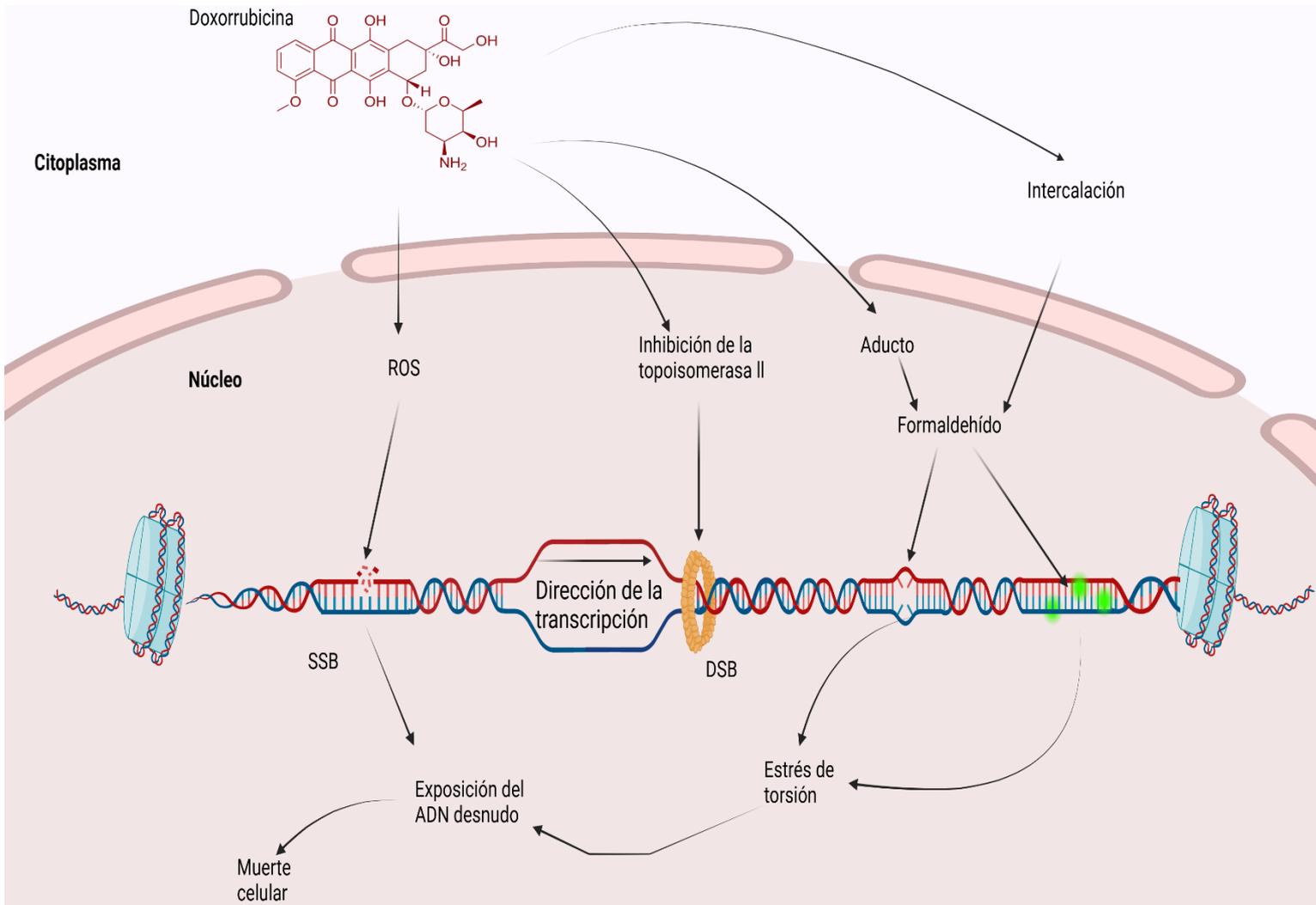


Figura 7. Representa los mecanismos de daño generados en el ADN inducidos por Dox donde describen la inhibición de la topoisomerasa II, formación de aductos, generación de ROS, estrés por torsión entre otros. Creada en BioRender.com.

Justificación

Actualmente se ha reportado que el parólogo miR-27b-3p se encuentra desregulado en distintos tipos de cáncer, mediando actividades como proliferación, migración, por mencionar algunos. Peraza-Vega *et al.* (2021) reportaron que la sobreexpresión de miR-27b-3p en la línea celular Balb/c-3T3 regula negativamente los mecanismos de reparación del ADN, siendo la Dox el xenobiótico con el que se obtuvieron resultados altamente significativos.

En los últimos años la deficiencia de efectividad de algunos antineoplásicos se ha vuelto muy notoria debido a la resistencia que ha generado esta enfermedad. Se han observado mejoras al asociar estos fármacos con miRNAs. Sin embargo, hay escasa información acerca del papel que juega miR-27b-3p en la reparación del ADN en células cancerígenas.

Hipótesis

Al sobreexpresar miR-27b-3p en una línea celular de cáncer como lo es HeLa, disminuirá su capacidad de reparación del daño al ADN, esto permitirá que no se reparen los rompimientos de doble hebra generados por la Dox.

Objetivo principal

Evaluar la capacidad de reparación del ADN cuando miR-27b-3p se encuentra sobre expresado en la línea celular HeLa tratada con Dox.

Objetivos particulares

- Determinar la expresión de miR-27b-3p.
- Evaluar la viabilidad de las células transfectadas y no transfectadas.
- Analizar la cinética de reparación en células HeLa con miR-27b-3p sobreexpresado a través de ensayo cometa en su versión alcalina y neutra.
- Analizar el efecto de la Dox en el ciclo celular de células HeLa con miR-27b-3p sobreexpresado.



Metodología

Compuestos químicos

Ácido bórico pureza 99.99 % (Cat. 0084), ácido clorhídrico pureza 99.99 % (Cat. 3624-01), cloruro de sodio (cat. 3624-01) de J. T. Baker (México), tritón X- 100 (Cat. T-9284), agarosa bajo punto de fusión (Cat. A-9414), agarosa regular 0.5 % (Cat. A-6877), bromuro de etidio (Cat. E-8751), clorhidrato de doxorubicina (Cat. D-1515), diacetato de fluoresceína (Cat. F-7378)), dimetil sulfóxido (DMSO) (Cat. D-5879), ácido etilendiaminotetraacético sal disódica dihidrato (EDTA) (Cat. E-5134) de Sigma-Aldrich (EUA), antibiótico-antimicótico (Cat. 15240062), dulbecco's modified eagle's medium de alta glucosa (Cat. 12100046) adquiridos a través de ThermoFisher Scientific, hidróxido de sodio (pureza 99 %, Cat. 106462) de Merck (Alemania), suero fetal bovino (SFB) (Cat. 1524006), tris-base Base (Cat. H5131) adquirido de Promega (EUA).

Línea celular

Se empleó la línea celular epitelial de cuello uterino (HeLa) adquirida a través de la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC, CRM-CCL-2). La cual fue criopreservada en medio de cultivo, Dulbecco's Modified Eagle's Medium de alta glucosa suplementado con 5 % de DMSO. Mientras que en los ensayos los cultivos se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico, dentro de la incubadora se encontraban a 37 °C 95 % de O₂ y 5 % de CO₂.

Transfección.

En la transfección celular se empleó el agente mimic hsa-miR-27-b-3p (3'-UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC-5') del kit TaqMan® MicroRNA Assay (Applied Biosystems™, EUA). Como vehículo se utilizó siPORT™ NeoFX™ proveniente de Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Lituania. Para la transfección se siguió el protocolo del fabricante y el protocolo de Peraza-Vega (2023); se emplearon placas de 6 pozos y en cada pozo se sembraron 2.4x10⁵ células, todos los pozos se aforaron a 2.5 mL y así obtener una concentración de 75 µM de la secuencia imitadora. Se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 h.



Extracción y cuantificación de RNA

Al término de las 24 h post-transfección se extrajo el RNA de las transfectadas y no transfectadas con la secuencia imitadora. Para normalizar los valores de la sobreexpresión se uso el gen constitutivo U6. De acuerdo al protocolo del fabricante se eliminó el ADN con DNasa I, se utilizó el kit LEV simplyRNA Cells (Promega). Al finalizar la extracción del RNA fue cuantificado con el equipo Multiskan GO (ThermoFisher).

Determinación de la expresión de miR-27b-3p

Después de las 24 h post-transfección se determinó la sobreexpresión de miR-27-b-3p comparando los valores de las células control con respecto a las transfectadas usando RT-qPCR. Se empleó el termociclador TC-512 (Techne) para reacción de transcripción reversa y síntesis de cDNA y el termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) para PCR en tiempo real.

Tratamiento

Al término de las 24 h post-transfección se aplicó el tratamiento (100 μ M) con Dox partiendo de un stock de 10 mg/1 mL, esta concentración fue determinada a través de una curva concentración-respuesta (Datos no mostrados). El fármaco fue aplicado durante 1 h a los controles (células con vehículo) y a las células transfectadas, se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. Al término del tratamiento se cambió el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium de alta glucosa suplementado con 10 % de SFB y se guardaron las cajas en la incubadora durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta los tiempos de cosecha.

Ensayo cometa

Los tiempos a los cuales se realizaron las cosechas fueron establecidos a través del trabajo de Peraza-Vega (2023) donde el tiempo promedio de generación era de 30 h. Una vez concluidas las 24 h post-tratamiento se cosecharon las células en intervalos de 12 h.

Una vez alcanzados cada uno de los tiempos, en portaobjetos de 25 x 75 x 1 mm (globe Scientific INC., EUA.) previamente cubiertos con Agarosa Regular 0.5 %, 

las células fueron suspendidas en Agarosa bajo punto de fusión (ALMP) 0.5 %. Posteriormente se agregaron 75 μ L de muestra y se extendieron sobre una laminilla colocando un cubreobjetos de 24 x 50 mm (Corning™) y se dejan en frio hasta polimerizar. Se agregó una segunda capa de ALMP 0.5 % (75 μ L) y se extendió con el mismo cubreobjetos y se dejó en frio hasta solidificar. Las laminillas fueron llevadas a un vaso Koplín protegido de la luz con lisis (40 mL de solución stock de pre-lisis NaCl 2.5 M, EDTA disódico 100mM y Tris Base 10 mM pH 10, 4 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) y 400 μ L de Tritón X-100 previamente fría a 4 °C durante 24 h.

Electroforesis pH 8 y pH >13

La cámara de electroforesis se montó sobre una cama de hielo y se colocaron las laminillas con las células lisadas, para pH 8 el tiempo de desenrollamiento del ADN en el buffer neutro, es de 2 h, y en electroforesis 45 min, manteniendo 25 volts (V) y 25 miliamperios (mA) con 0.9 V/cm. Mientras que en pH > 13 el tiempo de desenrollamiento es de 10 min y 10 min de electroforesis a 0.9 V/cm, manteniendo 25 V y 300 mA. Las laminillas que estuvieron en buffer alcalino se neutralizaron con buffer de Trizma base pH 7.5 (0.4 M) durante 5 min previamente a ser deshidratadas. Por ultimo las laminillas de ambos pH se deshidrataron con etanol 96 % durante 5 min.

Análisis

Previo al análisis se tiñeron las laminillas con 20 μ L de bromuro de etidio [2 μ g/mL]. La evaluación de los cometas se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia Olympus Bx60, la medición se realizó con ayuda del programa informático “Komet V 5.0” leyendo 50 cometas por laminilla, utilizando “%TailDNA” (porcentaje de ADN en la cola) como parámetro.

Ciclo celular

Para observar el comportamiento del ciclo celular se siguió el protocolo del fabricante MUSE™, para cada tiempo de cosecha se fijaron las células con etanol al 70 % y se almacenaron a -4 °C por al menos 3 h antes de su tinción. Una vez terminado el tiempo de fijación, las muestras se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min descartando el sobrenadante, para resuspender con 250 μ L de PBS 1X, se



centrifugaron una segunda vez a 1200 rpm durante 5 min descartando el sobrenadante, para la tinción se usó el kit MUSE™ Cell Cycle Reagent y se dejó en incubación por 30 min a TA y protegidas de la luz. El análisis se realizó en el equipo MUSE™ Cell Analyzer.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se representaron como la media \pm el error estándar (EE) de 3 experimentos independientes para el ensayo cometa, 5 para ciclo celular y 6 para viabilidad. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de un post-test de Bonferroni. En el análisis de expresión de miR-27b-3p se utilizó una prueba t de student utilizando el programa STAT (GraphPADStat software V1.14, San Diego, USA). Se usaron los valores de confianza $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.



Resultados

Extracción de RNA

Se analizaron los niveles de expresión de RNA en células transfectadas y no transfectadas y se compararon con respecto al nivel basal. La **Figura 8** representa el nivel de expresión de miR-27b-3p (Fold change) con respecto a los valores basales el cual muestra una sobreexpresión de casi 20 veces.

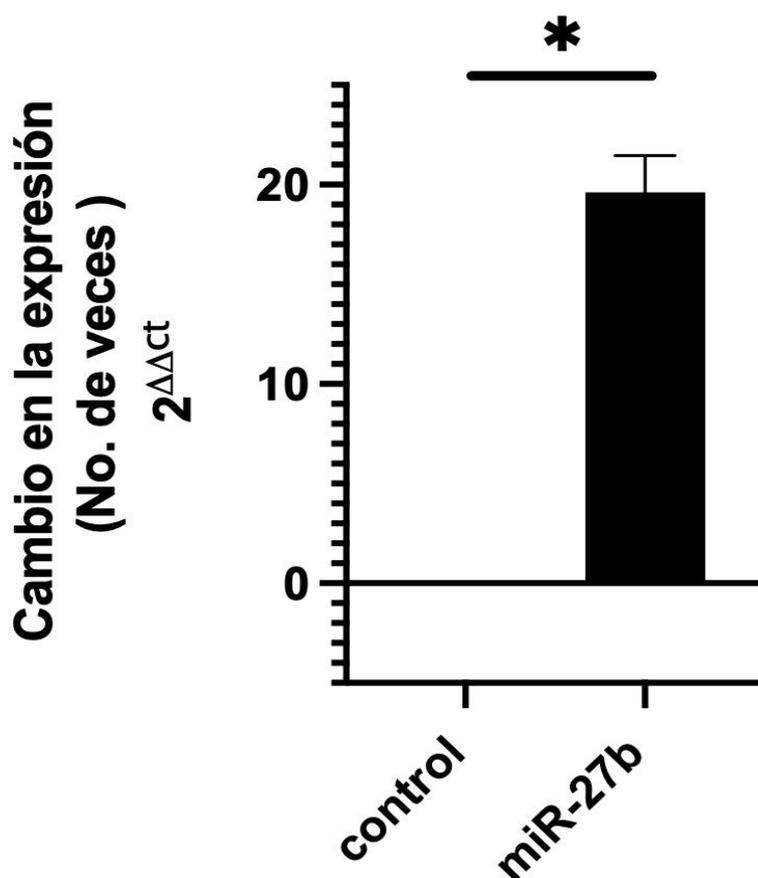


Figura 8 Expresión de miR-27b-3p. Se muestran los cambios en la expresión de miR-27b-3p en células HeLa (Fold Change) calculado como el $2^{-\Delta\Delta Ct}$, representado con \pm el EE. (*) Diferencia estadística significativa $p < 0.05$ (t de student).



Viabilidad celular

La **Figura 9** muestra las viabilidades de cada una de las condiciones a los tiempos de 0, 24, 36 y 48 h. Cada una de las condiciones fue ajustada con respecto a su control considerándolo el 100%, por lo que, el comportamiento en grafica de las células que fueron tratadas con Dox 100 μ M no tuvieron un efecto citotóxico.

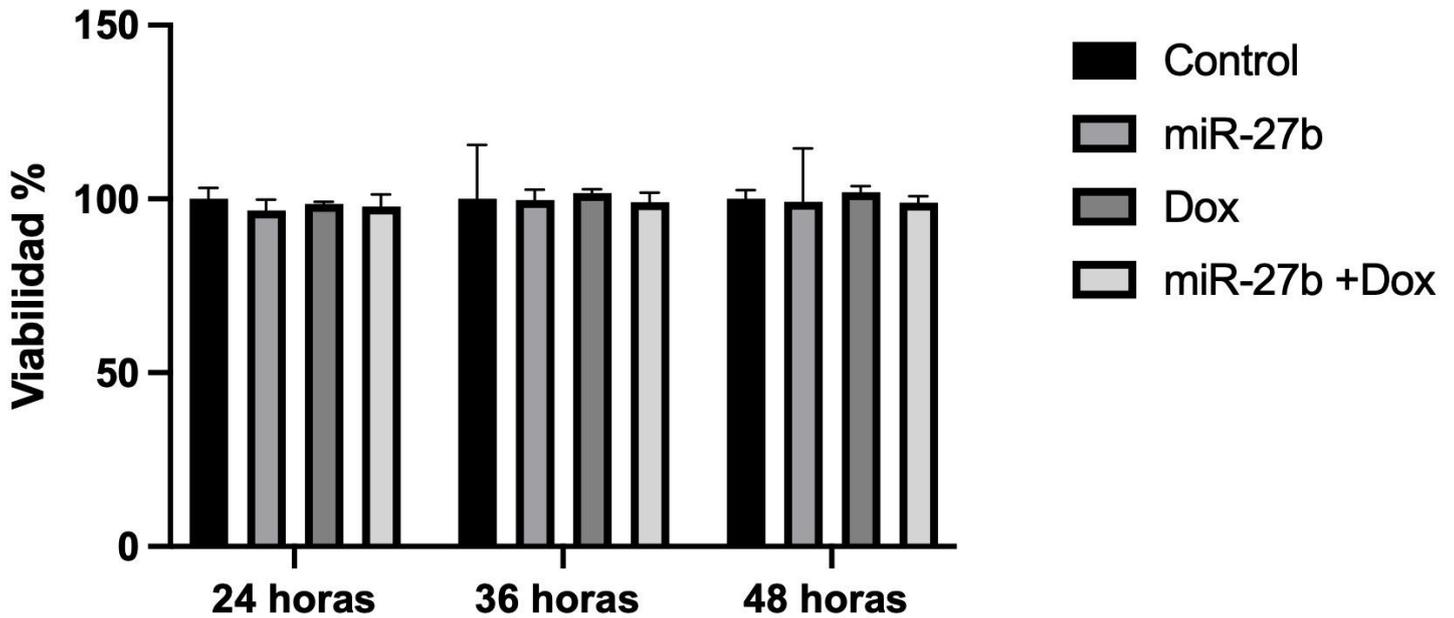


Figura 9. Viabilidad celular. Se contaron 100 células de cada experimento por cada tratamiento (n=6) que fueron teñidas con BrEt y FDA. Los datos se presentan como las medias \pm error estándar.



Evaluación del daño a pH>13

La **figura 10** representa la cinética con los datos obtenidos del ensayo cometa, se muestra el daño en el ADN a lo largo del tiempo. Los controles que corresponden a los colores naranja y negro no pasa del 10 % de daño en la cola, considerado como daño basal, por lo que los agentes de transfección con miR-27b-3p no inducen daño al ADN. Las células tratadas con Dox 100 μ M aumentaron el porcentaje de daño al ADN en comparación con los controles negativos desde las 24 h, sin embargo, a las 48 h se ve una reducción alcanzando valores cercanos a los controles indicando que hay una reparación del daño generado por el fármaco. Por otro lado, en las células que fueron transfectadas con el miR-27b-3p y tratadas con Dox, a las 24 y 36 h alcanzan valores semejantes a los de Dox (rojo), sin embargo, a las 48 h se observa un incremento en el daño al ADN **Figura 11**.

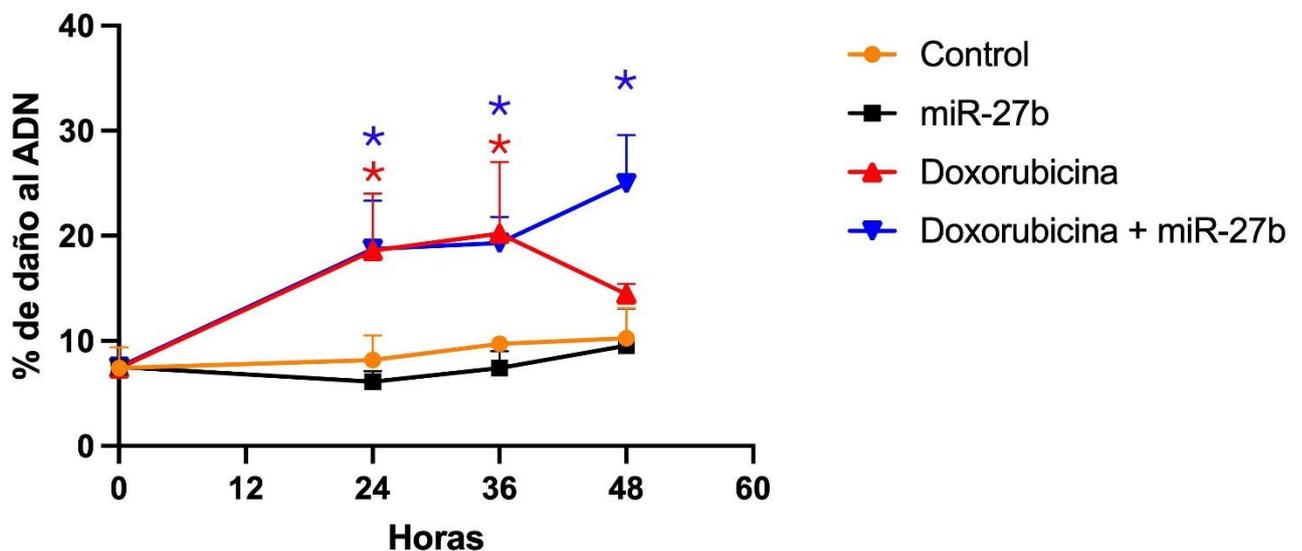
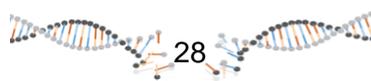


Figura 10. Cinética de reparación de la versión alcalina del ensayo cometa. Comparación de daño de células HeLa tratadas con Dox y transfectadas con miR-27b-3p (azul), HeLa Dox (rojo), HeLa miR-27b-3p (negro) y HeLa con vehículo de transfección (naranja). El daño del ADN fue evaluado utilizando valores los Tail DNA (porcentaje de daño en la cola). Los datos se presentan como las medias \pm EE de 3 experimentos independientes. (*) Diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$ (ANOVA seguida de la prueba de Bonferroni).



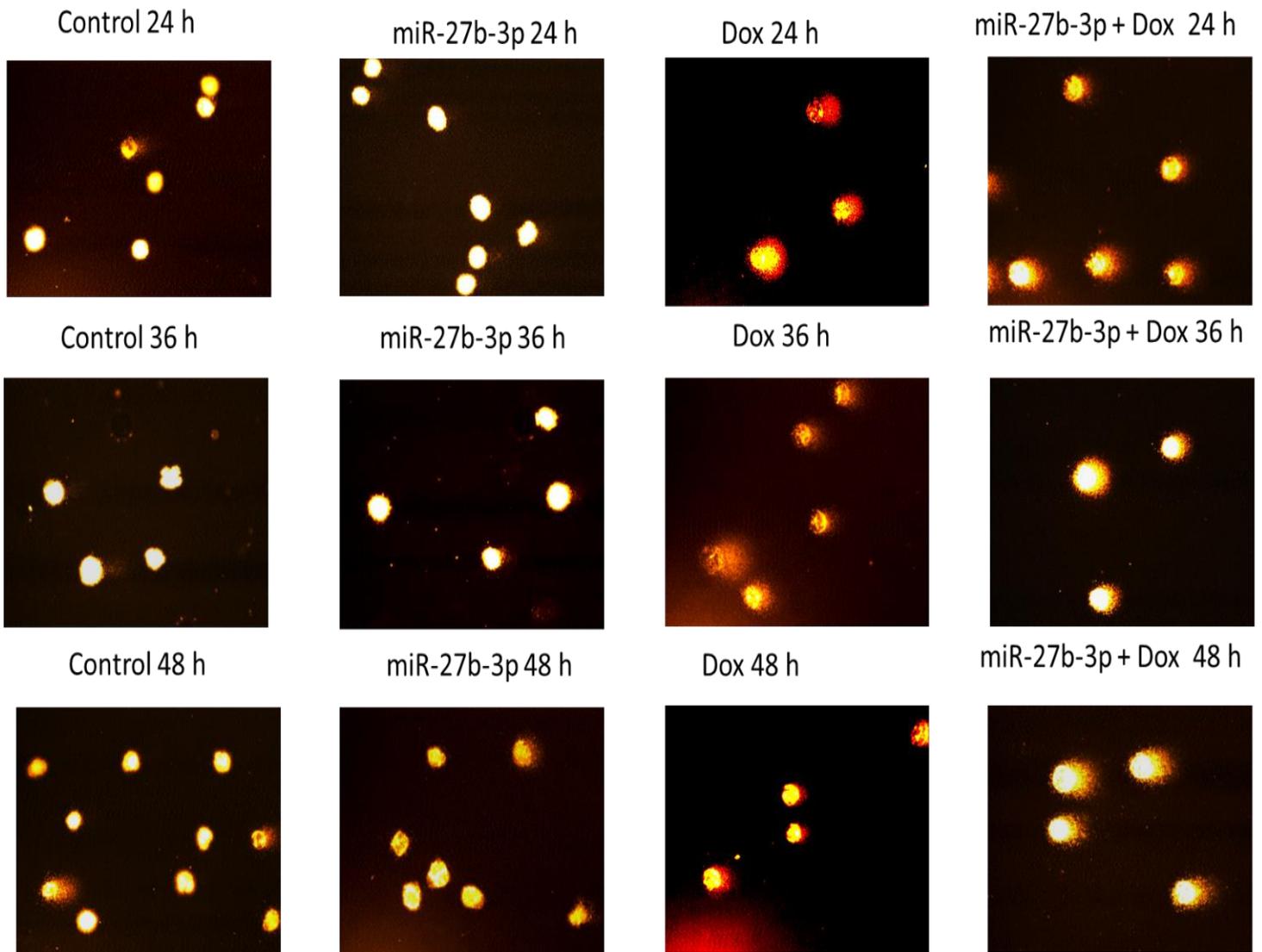


Figura 11. Cometas de la versión alcalina ($\text{pH} > 13$) capturados a través del programa Komet V5.0, en microscopio de fluorescencia Olympus Bx60 a 40x. Cosechas realizadas a las 24, 36 y 48 h de la prueba alcalina.

Evaluación del daño a pH 8

La versión neutra del ensayo cometa **figura 12** permite evaluar las DSB, siendo estas las lesiones más genotóxicas para la célula si llegan a persistir. La inducción del daño se ve reflejado a las 24 h en las células tratadas con Dox al paso del tiempo el daño generado es reparado haciendo que los valores disminuyan. Caso contrario a las células tratadas y transfectadas con miR-27b-3p (azul), donde a las 24 h alcanzan valores semejantes a los de Dox (rojo), aunque el daño persiste a las 36 h y 48 h, (**Figura 13**) debido a que la actividad de los mecanismos de reparación de doble hebra (NHEJ y HRR) se ve afectada por la sobreexpresión de miR-27b-3p.

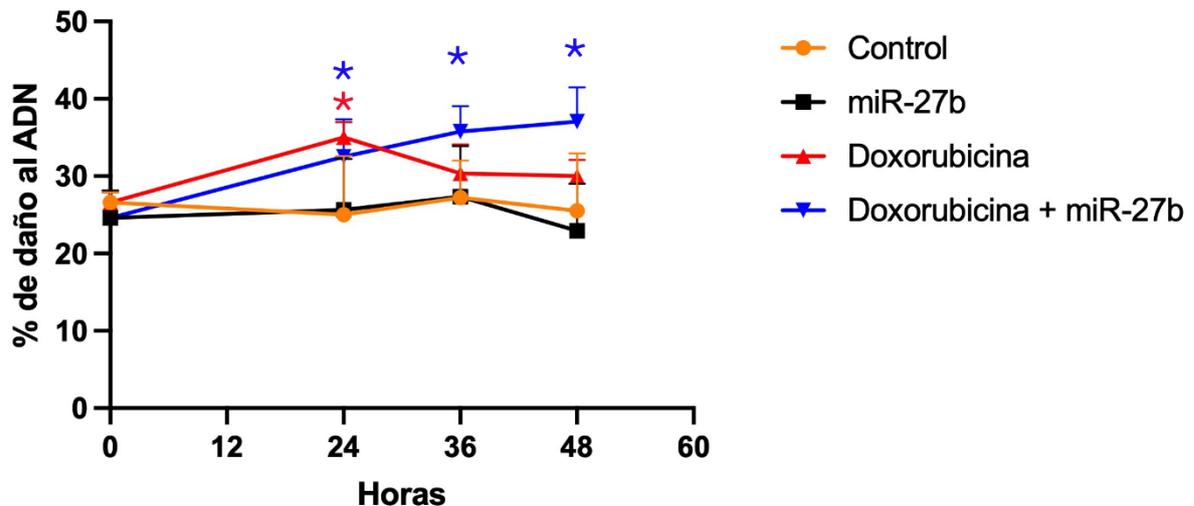
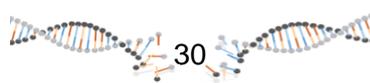


Figura 12. Cinética de reparación de la versión neutra del ensayo cometa. Comparación de daño de células HeLa tratadas con Dox y transfectadas con miR-27b-3p (azul), HeLa Dox (rojo), HeLa miR-27b-3p (negro) y HeLa con vehículo de transfección (naranja). El daño del ADN fue evaluado utilizando valores de Tail DNA (porcentaje de daño en la cola). Los datos se presentan como las medias \pm EE de 3 experimentos independientes. (*) Diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$ (ANOVA seguida de la prueba de Bonferroni).



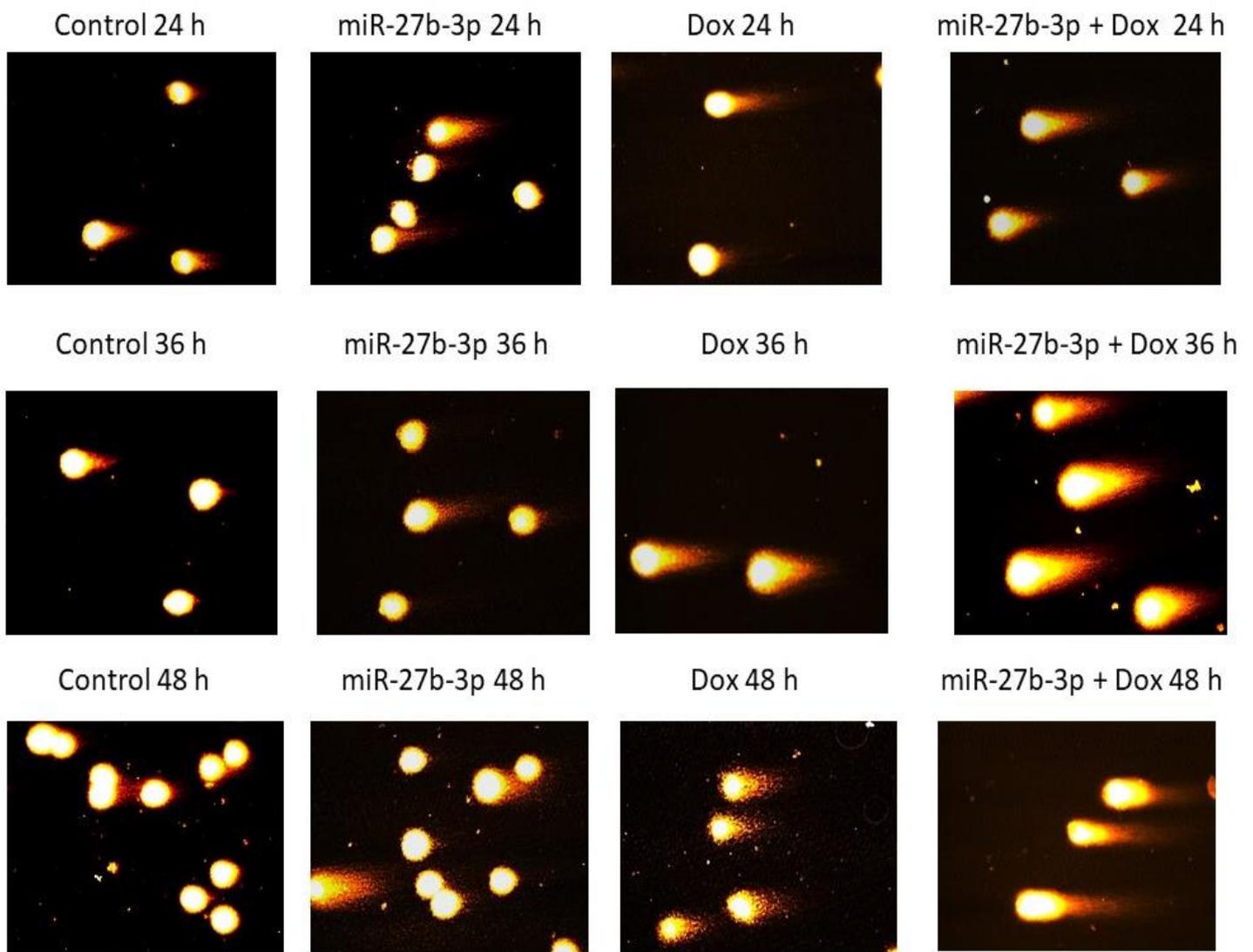
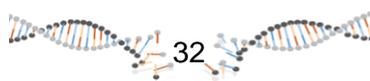


Figura 13. Cometas de la versión neutra (pH 8) capturados a través del programa Komet V5.0, en microscopio de fluorescencia Olympus Bx60 a 40x. Cosechas realizadas a las 24, 36 y 48 h de la versión neutra.

Ciclo celular

Para conocer el comportamiento del ciclo celular de HeLa con miR-27b-3p sobre expresado, se realizó la medición del ADN contenido en las células a los controles y tratamientos en cada tiempo de cosecha. La **Figura 14** muestra la comparación de las tres etapas del ciclo (G_0/G_1 , S y G_2/M), La fase G_0/G_1 en los controles presentan valores similares en el tiempo de 0, 24 y 36 h observando incremento a las 48 h, lo que indica que la progresión del ciclo celular no está interrumpido. Caso contrario a los tratados con Dox donde se observa la reducción en los valores de G_0/G_1 , a las 24 y 36 horas dando como consecuencia el incremento en los niveles de la fase S y G_2 , muestra que hay arresto en el ciclo celular, a las 48 h en los tratados **Figura 15**.



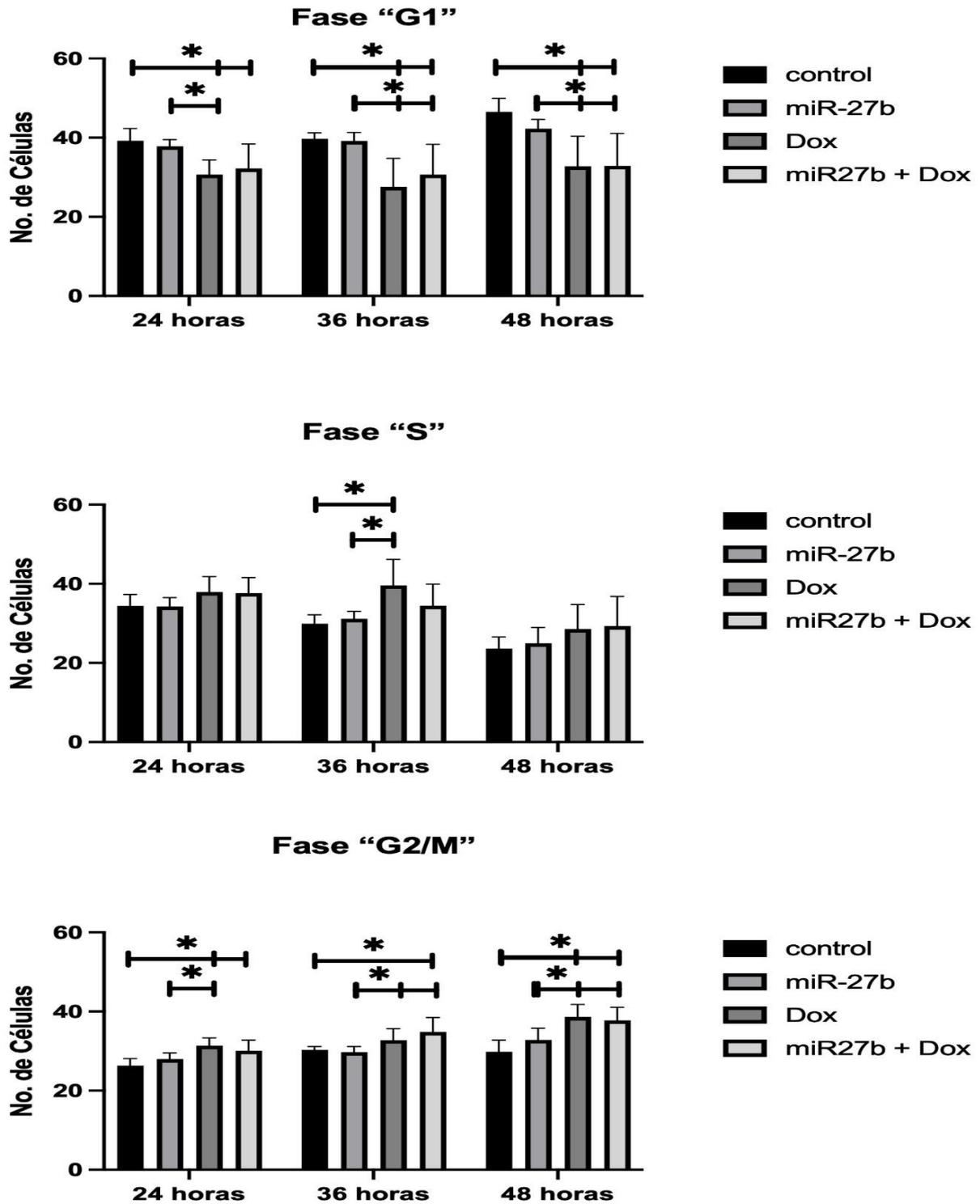
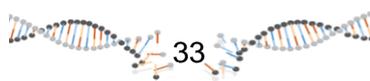


Figura 14. Estimación de las fases del ciclo celular G0/G1, S, y G2/M de cada una de las condiciones en los tiempos de 0, 24, 36, y 48 h. Los datos se presentan como las medias \pm el EE del contenido de ADN en las células de 5 experimentos independientes. (*) Diferencia significativa con respecto a las condiciones control y miR-27b de cada tiempo $p < 0.05$ (ANOVA seguida de la prueba de Bonferroni).



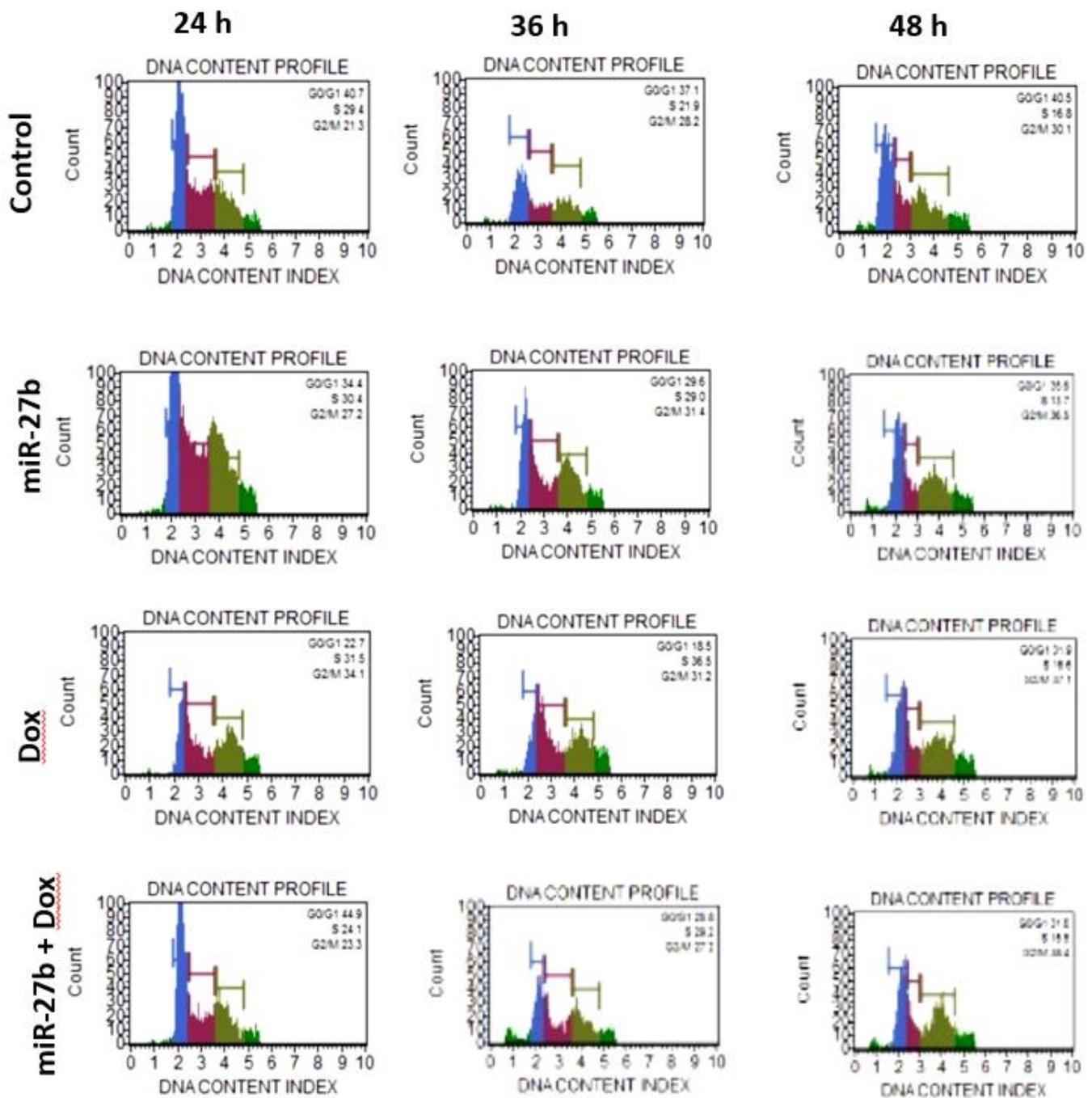


Figura 15. Histogramas de ciclo celular obtenidos a través del equipo MUSE™.

Discusión

La prueba de viabilidad juega un papel importante, ya que nos permite medir la vitalidad de los cultivos celulares. Dentro de la industria farmacéutica, esta prueba es fundamental para conocer la respuesta de la célula ante los fármacos desarrollados. Para determinar la viabilidad se pueden utilizar criterios como la asimetría de membrana, permeabilidad de membrana, ensayos de función de las mitocondrias, por mencionar algunos (Kamiloglu *et al.*, 2020). Dentro de los criterios a seguir para poder realizar ensayo cometa es tener una viabilidad por arriba del 70–80% (Tice *et al.*, 2000). En este estudio se usó el ensayo fluorimétrico, empleando la tinción dual de BrEt y FDA, los resultados obtenidos no muestran un cambio en la viabilidad celular en ningún tiempo de cosecha, por lo cual no hay efecto citotóxico por parte de la Dox 100 μ M.

El objetivo de este trabajo fue conocer si miR-27b-3p afectaba la reparación del ADN en el modelo transformado de células HeLa. Así como evidenciar si la inestabilidad genética que tiene el modelo altera el patrón de regulación del miR-27b-3p (Tang, 2019, Kushwah *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024). Para poder conocer la funcionalidad de la reparación del daño al ADN se determinó por su persistencia a través de una cinética de 0 a 48 h, utilizando el ensayo cometa en su versión a pH>13 en el cual se pueden evaluar rompimientos de una y de doble hebra, así como sitios alkali-lábiles y sitios retardados de la reparación (Collins *et al.*, 2023) y la versión neutra (pH 8), el ADN se mantiene bicatenario y así se pueden evaluar los rompimientos de doble hebra (Singh *et al.*, 1988).

La Dox es un antineoplásico el cual puede tener varios mecanismos de acción para generar daño al ADN, este fármaco puede producir SSB a través de la generación de ROS, intercalación de ADN, aunque se ha reportado que el mecanismo principal de la Dox es la inhibición de la topoisomerasa II, el cual puede producir DSB (Kcicuk *et al.*, 2023).

En la **Figura 10** se observan los resultados, obtenidos de la electroforesis a pH>13 los cuales muestran valores significativos a las 48 h ($p<0.05$) en las células transfectadas y tratadas con Dox, demostrando que miR-27b-3p afecta la reparación



de ADN, por otra parte las células que únicamente fueron tratadas con Dox muestran reparación del daño producido en el ADN.

Así mismo se realizó el ensayo cometa en su versión neutra y los resultados muestran que en los tiempos de 36 y 48 h tienen valores significativos ($p < 0.05$) en las células que sobre expresan miR-27b-3p y tratados con Dox, lo cual indica disfunción en los mecanismos de reparación de doble hebra, siendo estos principalmente NHEJ y HR. En la **Figura 12**, las células que únicamente fueron tratadas con Dox, a partir de las 36 h se observa reducción en los valores de Tail DNA, a las 48 h alcanza niveles de daño similares a los controles. Esto muestra que los mecanismos de reparación funcionan adecuadamente. En las células transfectadas y tratadas se encontró que desde la inducción del daño hasta las 48 h se muestra perdida en la capacidad de reparar las roturas generadas, la baja actividad de las vías promovió la acumulación del daño en las células. Caso contrario con miR-27b *per se*, el cual no presentó cambios significativos a lo largo del tiempo. En un análisis *in sillico* realizado por Peraza-Vega y colaboradores (2023) observó que miR-27b-3p está relacionado a HR y a la vía de anemia de Fanconi, afectando de manera negativa el funcionamiento de las proteínas involucradas en la reparación, por lo cual puede que también se vean afectadas estas vías en el modelo de HeLa transformado y eso promueva la acumulación de daño, principalmente DSB.

Por lo que respecta al análisis del ciclo celular, en la **Figura 14**, la expresión de miR-27b *per se* no presenta efecto sobre la progresión del ciclo celular desde 0 a 48 h, los tratamientos a las 36 h presentaron mayor cantidad de células en la fase S, a las 48 h las células transfectadas y tratadas mostraron arresto en la fase G₂/M impidiendo a las células continuar con el ciclo, el daño generado y no reparado puede conducir a la inestabilidad genómica aumentada. Mu y colaboradores (2015), observaron que miR-27b y Dox aumentan la sensibilidad en células de hepatoblastoma, donde la actividad sinérgica con miR-27b mejora el arresto en la fase S. La participación de los mecanismos de reparación de doble hebra dependerá del estadio de la célula, la actividad de la vía HR predomina en la fase S y G₂/M la cual se ve atenuada por miR-27b, dentro del ciclo celular, se observa que hay un arresto en la fase G₂/M desde las 36 h y persistente a las 48 h, posiblemente esto se deba a la incapacidad de no restaurar las DSB a través de HR.



Por otra parte el daño producido no pudo ser detenido en la fase G₁ del ciclo ya que, en las células sanas el arresto en G₁ puede llevarse a cabo por p53, la expresión de la oncoproteína E6 en la línea celular HeLa promueve la degradación de p53 a través de la vía de ubiquitina, aunque en los puntos S y G₂ que son independientes de p53, las células deficientes de esta proteína conservan estos puntos del ciclo, (Gately *et al.*, 1998; Kaufmann y Paules, 1996; Scheffner *et al.*, 1990).

Dentro de la literatura los estudios sobre miR-27b-3p son escasos. Se sabe que puede intervenir en diferentes procesos como la supresión de la proliferación celular (Tao *et al.*, 2015), Crecimiento, invasión (Wang *et a.*, 2020) y la metástasis (Liu *et al.*, 2019), apoptosis (Li *et al.*, 2021) entre otros. Se ha descrito que puede estar regulado al alza en cánceres humanos como lo es el de: glioma, cuello uterino y mama; además puede estar regulado a la baja en: cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, gástrico y en leucemia mieloide aguda (Peraza-Vega, 2022). Sin embargo, hasta ahora se desconocía el efecto de su sobre expresión en sobre la capacidad de reparación del daño al ADN en células HeLa. Lo observado en este trabajo complementa la literatura respecto a miR-27b y nos conduce a generar nuevas interrogantes. Una de las perspectivas sería el estudio de los genes predichos a la sobreexpresión de miR-27b-3p, como los reportados por Peraza-Vega (2023), específicamente en HeLa, involucrados en la reparación por recombinación homóloga.



Conclusión

Los resultados obtenidos ayudan a complementar el estudio previo realizado por nuestro equipo de trabajo y ayuda a conocer más el papel que tiene la sobreexpresión de miR-27b-3p sobre la reparación del ADN, en este caso en una línea celular transformada. Por parte de la viabilidad la Dox 100 μ M no mostró un efecto citotóxico, pero sí genotóxico. En el ensayo cometa se observó que las células transfectadas y tratadas fueron incapaces de reparar las lesiones generadas perdurando hasta las 48 h, por lo que se puede concluir que miR-27b-3p es un regulador negativo de los mecanismos de reparación de rompimientos de doble hebra, los cuales al no ser reparados impiden la progresión del ciclo celular dando como resultado el arresto en la fase S/G₂.

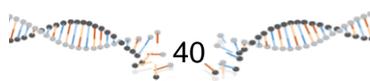


Referencias bibliográficas

- Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D. y Croce, C. M. (2015). MicroRNA and cancer— a brief overview. *Advances in Biological Regulation*, 57, 1-9.
- Ahmad, A., Li, Y., Bao, B., Sarkar, F. (2013). Resistance and DNA Repair Mechanisms of Cancer Stem Cells: Potential Molecular Targets for Therapy. In: Mathews, L., Cabarcas, S., Hurt, E. (eds) DNA Repair of Cancer Stem Cells. Springer, Dordrecht.
- Blanco, J. S. P. (2016). *Farmacocinética clínica de doxorubicina en pacientes diagnosticados de Linfoma No Hodgkin* (Doctoral dissertation, Universidad de Salamanca).
- Chatterjee, N. y Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263.
- Chhabra, R., Dubey, R. Y Saini, N. (2010). Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~ 27a~ 24-2 cluster and its implication in human diseases. *Molecular Cancer*, 9, 1-16.
- Chiruvella, K. K., Liang, Z. y Wilson, T. E. (2013). Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5).
- Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., y Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature protocols*, 18(3), 929-989.
- Costa, RM, Chiganças, V., da Silva Galhardo, R., Carvalho, H. y Menck, CF (2003). La vía de reparación por escisión de nucleótidos eucariotas. *Biochimie*, 85(11), 1083-1099.
- Dexheimer, T. S. (2013). DNA repair pathways and mechanisms. *DNA repair of cancer stem cells*, 19-32.
- Gately, D. P., Hittle, J. C., Chan, G. K., y Yen, T. J. (1998). Characterization of ATM expression, localization, and associated DNA-dependent protein kinase activity. *Molecular biology of the cell*, 9(9), 2361-2374.
- Granados-López, A. J., Ruiz-Carrillo, J. L., Servín-González, L. S., Martínez-Rodríguez, J. L., Reyes-Estrada, C. A., Gutiérrez-Hernández, R. y López, J. A. (2017). Use of mature miRNA strand selection in miRNAs families in cervical cancer development. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 407.



- Ha, M. y Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509-524.
- Hernández-Franco, P., Valverde, M. y Rojas, E. (2009). Los metales como inhibidores del sistema de reparación del ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 12(2), 75-82.
- Honegger, A., Schilling, D., Bastian, S., Sponagel, J., Kuryshev, V., Sültmann, H. y Hoppe-Seyler, F. (2015). Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004712.
- Hsieh, P. (2001). Mecanismos moleculares de reparación de errores de apareamiento del ADN. *Mutation Research/DNA Repair*, 486 (2), 71-87.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., y Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- Kaufmann, W. K., y Paules, R. S. (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *The FASEB journal*, 10(2), 238-247.
- Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., Celik, I., y Kontek, R. (2023). Doxorubicin an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*, 12(4), 659.
- Kim, Y. J. y Wilson, D. M., 3rd (2012). Overview of base excision repair biochemistry. *Current molecular pharmacology*, 5(1), 3–13.
- Kim, Y. K. y Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*, 26(3), 775-783.
- Konoshenko, M. y Laktionov, P. (2022). The miRNAs involved in prostate cancer chemotherapy response as chemoresistance and chemosensitivity predictors. *Andrology*, 10(1), 51-71.
- Krajewska, M., Fehrmann, R. S., De Vries, E. G. y van Vugt, M. A. (2015). Regulators of homologous recombination repair as novel targets for cancer treatment. *Frontiers in Genetics*, 6, 96.
- Krokan, H. E. y Bjørås, M. (2014). Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a012583.
- Kunkel, T. A., y Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annual Review Biochemistry*. 74(1), 681-710.



- Kushwah, A. S., Masood, S., Mishra, R., y Banerjee, M. (2024). Genetic and epigenetic alterations in DNA repair genes and treatment outcome of chemoradiotherapy in cervical cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 194, 104240.
- Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*, 18(1), 85-98.
- Liu, L., Hu, J., Yu, T., You, S., Zhang, Y., & Hu, L. (2019). miR-27b-3p/MARCH7 regulates invasion and metastasis of endometrial cancer cells through Snail-mediated pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 51(5), 492-500.
- Li, L., Qi, C., Liu, Y., Shen, Y., Zhao, X., Qin, H., ... & Yu, T. (2021). MicroRNA miR-27b-3p regulate microglial inflammation response and cell apoptosis by inhibiting A20 (TNF- α -induced protein 3). *Bioengineered*, 12(2), 9902-9913.
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 181-211.
- Liu, F., Zhang, S., Zhao, Z., Mao, X., Huang, J., Wu, Z., y Wang, Q. (2016). MicroRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer. *Oncotarget*, 7(15), 19666.
- Melis, J. P., van Steeg, H. y Luijten, M. (2013). Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxidants y redox signaling*, 18(18), 2409-2419.
- Menon, V., y Povirk, L. (2014). Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: multifaceted Roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ). *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*, 321-336.
- Mu, W., Hu, C., Zhang, H., Qu, Z., Cen, J., Qiu, Z., y Hui, L. (2015). miR-27b synergizes with anticancer drugs via p53 activation and CYP1B1 suppression. *Cell research*, 25(4), 477-495.
- Nimonkar, A. V., Özsoy, A. Z., Genschel, J., Modrich, P., y Kowalczykowski, S. C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), 16906-16911.
- Nobili, S. Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., y Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*, 59 (6), 365-378.



- Olave, M. C., y Graham, R. P. (2022). Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 61(6), 314-321.
- Peraza Vega, R. I. (2023). Papel de los microRNAs 27b y 155 en la regulación de la reparación del daño al ADN. Tesis doctoral, UNAM. México.
- Peraza-Vega RI, Valverde M, Rojas E. (2021). miR-27b-3p a Negative regulator of DSB-DNA repair. *Genes (Basel)*, 12(9).
- Peraza-Vega, R. I., Valverde, M., y Rojas, E. (2022). Interactions between miRNAs and double-strand breaks DNA repair genes, pursuing a fine-tuning of repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3231.
- Reynolds, P., Cooper, S., Lomax, M., y O'Neill, P. (2015). Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions. *Nucleic acids research*, 43(8), 4028-4038.
- Schärer, O. D. (2003). Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(26), 2946-2974.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., y Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *cell*, 63(6), 1129-1136.
- Seki, M., Nakagawa, T., Seki, T., Kato, G., Tada, S., Takahashi, Y., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Aoki, A., Otsuki, M., Habermann, F. A., Tanabe, H., Ishii, Y., y Enomoto, T. (2006). Bloom helicase and DNA topoisomerase III α are involved in the dissolution of sister chromatids. *Molecular and Cellular Biology*, 26 (16), 6299-6307.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Stojic, L., Brun, R., y Jiricny, J. (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA repair*, 3(8-9), 1091-1101.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., y Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 65(2), 157-170.
- Tang, L. (2019). Investigating heterogeneity in HeLa cells. *Nature Methods*, 16(4), 281-281.
- Tao, J., Zhi, X., Zhang, X., Fu, M., Huang, H., Fan, Y., & Zou, C. (2015). miR-27b-3p suppresses cell proliferation through targeting receptor tyrosine kinase like



- orphan receptor 1 in gastric cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 34, 1-13.
- Tice, R., Aurel, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. y Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221
- Wallace, S. S., Murphy, D. L., y Sweasy, J. B. (2012). Base excision repair and cancer. *Cancer letters*, 327(1-2), 73-89.
- Wan, G., Mathur, R., Hu, X., Zhang, X., y Lu, X. (2011). miRNA response to DNA damage. *Trends in biochemical sciences*, 36(9), 478-484.
- Wang, Z., Jiang, Z., Zhou, J., & Liu, Z. (2020). circRNA RNF111 regulates the growth, migration and invasion of gastric cancer cells by binding to miR-27b-3p. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(5), 1873-1885.
- Whitaker, A. M., Schaich, M. A., Smith, M. R., Flynn, T. S., y Freudenthal, B. D. (2017). Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 22(9), 1493–1522.
- Wilpe, S., Tolmeijer, S. H., Koornstra, R. H., de Vries, I. J. M., Gerritsen, W. R., Ligtenberg, M., y Mehra, N. (2021). Homologous recombination repair deficiency and implications for tumor immunogenicity. [Imagen]. *Cancers*, 13(9), 2249.
- Wu, R., Liu, W., Sun, Y., Shen, C., Guo, J., Zhao, J., y Du, G. (2020). Nanoscale insight into chromatin remodeling and DNA repair complex in HeLa cells after ionizing radiation. *DNA repair*, 96, 102974.
- Wyatt, H. D., y West, S. C. (2014). Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9), a023192.
- Xu, Y., Han, Y. F., Ye, B., Zhang, Y. L., Dong, J. D., Zhu, S. J., y Chen, J. (2018). miR-27b-3p is involved in Doxorubicin resistance of human anaplastic thyroid cancer cells via targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Basic y Clinical Pharmacology y Toxicology*, 123(6), 670-677.
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., y Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1845(1), 84-89.



Zhang, S., Liu, F., Mao, X., Huang, J., Yang, J., Yin, X., y Wang, Q. (2015). Elevation of miR-27b by HPV16 E7 inhibits PPAR γ expression and promotes proliferation and invasion in cervical carcinoma cells. *International journal of oncology*, 47(5), 1759-1766.

Zhu, H., Sarkar, S., Scott, L., Danelisen, I., Trush, M. A., Jia, Z., y Li, Y. R. (2016). Doxorubicin redox biology: redox cycling, topoisomerase inhibition, and oxidative stress. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, 1(3), 189.

