

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“ASOCIACIÓN ENTRE VARIACIÓN GERMINAL EN MIRNAS
Y SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN
POBLACIÓN CHILENA Y SU ROL EN LA TRANSFORMA-
CIÓN CELULAR”**

SEBASTIAN FELIPE MORALES PISON

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Directores de Tesis

Dra. Lilian Elena Jara Sosa y Dr. Héctor Ruberly Contreras Muñoz

2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

Sebastian Felipe Morales Pison

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 11 de enero de 2021.

Prof. Lilian Jara Sosa
Director de Tesis
Programa de Genética Humana
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Prof. Héctor Ruberly Contreras
Director de Tesis
Dpto. de Oncología Básico Clínico
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. OSCAR CERDA

PROF. DRA. VERONICA BURZIO

PROF. DR. JORGE FERREIRA

PROF. DRA. CARMEN ROMERO
Presidenta Comisión de Examen

DEDICATORIA

A mi familia, que incondicionalmente me acompañaron en este proceso lleno de emociones y complejidades.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a mi familia quienes participaron en cada etapa de mi crecimiento profesional y en esta aventura también que fue el llegar a esta etapa de mi formación. Por todos los momentos buenos y malos que tuvieron que pasar conmigo durante este camino, por todos los consejos y el apoyo que me brindaron, por toda la paciencia que han tenido todo este tiempo, por todo esto y más, estoy y estaré eternamente agradecido.

A la Dra. Lilian, quien vio en mi capacidades y fortalezas más allá de las que yo sabía que era capaz. Por las extenuantes horas de trabajo que finalmente me hicieron crecer y aprender tanto sobre cosas de vida como profesionales, por toda la confianza que depositó en mí por los desafíos que puso en mi camino que hicieron de mí la persona que soy, por todo esto y muchas cosas más, estaré eternamente agradecido. Sin duda, no hubiese logrado alcanzar este punto de mi vida profesional si no fuera por usted.

Agradezco al Dr. Héctor Contreras quien me brindó su apoyo y también me ayudó durante este camino final de desarrollo de tesis, gracias por abrirme las puertas a su laboratorio donde me sentí muy acogido. Al Dr. Julio Tapia quien también me recibió y acogió con mucho cariño en su laboratorio, le agradezco todo el tiempo que brindó para darme consejos tanto profesionales como de vida y por todo su apoyo durante este camino. Al Dr. Edio Maldonado con quien colaboramos durante mucho tiempo y con quien tuve el gusto de compartir laboralmente, le agradezco toda la confianza que depositó en mí permitiéndome participar en sus trabajos científicos. Al Dr. Ricardo Fernández, gran amigo y tutor quien estuvo en mis inicios en pregrado, agradezco todo tu apoyo y compañía ya que estuviste desde que me inicié como profesional y compartimos grandes momentos desde entonces.

A Patricia Carvajal y María Antonieta, agradezco su amistad y compañía durante este camino que recorrimos juntos. Agradezco a María José Torres quien siempre estuvo presente para darme consejos y escucharme cuando lo necesitaba. A Cecilia Carter, agradezco todo tu apoyo y disposición incondicional que siempre me brindaste cuando tenía que acudir a ti para resolver todos los problemas con los que llegaba por cosas del Doctorado. A mi comisión de revisión, Dr. Oscar Cerda, Dra. Verónica Burzio y Dra. Carmen Romero, les agradezco todas las presentaciones que tuvieron que aguantar y por todas sus sugerencias que acogí de muy buena forma. A todas las increíbles personas que conocí y que me ayudaron durante este proceso, no tengo más que agradecimientos infinitos.

A mis amigos de la vida (colegio, universidad y otros) que siempre se preocuparon y me apoyaron constantemente, les agradezco en el alma ya que siempre han estado ahí desde el inicio e hicieron que todo este camino fuera mucho más agradable por más difícil que algunas veces se veía. Finalmente, a muchas personas que conocí durante este camino y que por alguna razón nos distanciamos, pero aún siguen ahí, y otras, que por razones de vida ya no lo están, les agradeceré siempre el apoyo que me dieron.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. Cáncer de mama	3
3.1.1. <i>Epidemiología del cáncer de mama</i>	3
3.1.2. <i>Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama</i>	4
3.2. Predisposición genética al cáncer de mama.....	7
3.3. Panorama emergente de la susceptibilidad al cáncer de mama: modelo poligénico, genes y variantes.	8
3.4. MicroRNAs	11
3.5. Variación genética SNPs en secuencias precursoras de miRNAs o miRNAs maduros y su asociación con susceptibilidad a cáncer de mama	13
3.5.1. <i>microRNAs y su relación con cáncer</i>	13
3.5.2. <i>microRNAs y su relación con cáncer de mama</i>	15
3.5.3. <i>Polimorfismos de nucleótido único en genes de microRNAs y asociación con susceptibilidad al cáncer de mama</i>	16
3.5.4. <i>miRNA-423 (rs6505162) y su rol en tumorigénesis mamaria</i>	18
3.5.5. <i>miRNA-27a (rs895819) y su rol en tumorigénesis mamaria</i>	19
3.5.6. <i>miRNA-182 (rs4541843) y su rol en tumorigénesis mamaria</i>	21
4. HIPOTESIS	23
5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	23
6. METODOLOGÍA Y PACIENTES	25
6.1. <i>Casos con CM hereditario (CMH) (Grupo A, n=440)</i>	25
6.2. <i>Controles (Grupo B, n=1048)</i>	25
6.3. <i>Fuente de obtención de muestras</i>	25
6.4. <i>Validación de los tamaños muestrales</i>	26
6.5. <i>Extracción de DNA</i>	26
6.6. <i>Detección de mutaciones puntuales en las secuencias codificantes completas de los genes BRCA1 y BRCA2</i>	27
6.7. <i>Genotipificación del SNP rs4541843 pri-miR-182</i>	27
6.8. <i>Líneas celulares</i>	27
6.9. <i>Construcción de los vectores de expresión</i>	28
6.10. <i>Transfección de los vectores de expresión recombinantes</i>	30
6.11. <i>Extracción de RNAs pequeños</i>	30
6.12. <i>Transcripción Reversa</i>	31
6.13. <i>Análisis de expresión de los miR-423, miR-27a y miR-182 por qPCR</i>	31
6.14. <i>Ensayo de proliferación celular</i>	32
6.15. <i>Ensayo de viabilidad y quimioresistencia</i>	32

6.16. Análisis de apoptosis	33
6.16. Ensayo de invasión y migración	34
6.17. Análisis estadístico	34
7. RESULTADOS	35
7.1. Características de las familias incluidas en este estudio.	35
7.2. Estudio de asociación entre el rs4541843:C>T y riesgo de cáncer de mama.	35
7.3. Rol del rs6505162 (pre-miR-423) en la tumorigénesis mamaria	38
7.3.1. El miR-423 se sobreexpresa en presencia del alelo A del rs6505162 en líneas celulares de cáncer de mama	38
7.3.2. El pre-miR-423-A aumenta la proliferación de las células de cáncer de mama	39
7.3.3. La expresión del pre-miR-423-A promueve la resistencia al cisplatino en células de cáncer de mama	40
7.3.4. La expresión del pre-miR-423-A disminuye la apoptosis inducida por cisplatino en las células de cáncer de mama.....	41
7.3.5. La expresión del pre-miR-423-A aumenta la invasión y migración de células de cáncer de mama	42
7.4. Rol del rs895819 (pre-miR-27a) en la tumorigénesis mamaria	45
7.4.1. La expresión del miR-27a es modulado diferencialmente por la presencia del alelo G del rs895819 en líneas celulares de cáncer de mama	45
7.4.2. El pre-miR-27a-G disminuye la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo.....	47
7.4.3. La expresión del pre-miR-27a-G disminuye la resistencia al cisplatino en células de cáncer de mama triple negativo.....	48
7.4.4. La expresión del pre-miR-27a-G aumenta la apoptosis inducida por cisplastino en células de cáncer de mama triple negativo	49
7.4.5. La expresión del pre-miR-27a-G disminuye la invasión y migración en células de CM triple negativa y regula positivamente estos procesos en células del subtipo luminal A.....	50
7.5. Rol del rs4541843 (pre-miR-182) en la tumorigénesis mamaria.....	53
7.5.1. El miR-182-3p es sobreexpresado por la presencia del alelo C del rs4541843:C>T en líneas celulares de cáncer de mama.....	53
7.5.2. La expresión pre-miR-182-C aumenta la proliferación de células de cáncer de mama	54
7.5.3. La expresión del pre-miR-182-C promueve la resistencia al cisplatino en células de cáncer de mama	55
7.5.4. La expresión del pri-miR-182-C disminuye la apoptosis inducida por cisplastino en células de cáncer de mama	56
7.5.5. La expresión del pri-miR-182-C aumenta la invasión y migración de células de cáncer de mama.....	57
8. DISCUSIÓN.....	61
8.1 El rs4541843:C>T se asocia con riesgo de desarrollar cáncer de mama en población chilena	61
8.2. El alelo A del rs6505162 (pre-miR-423) aumenta los procesos tumorigénicos del cáncer de mama	63
8.3. El alelo G del rs895819 (pre-miR-27a) tiene un rol diferencial dependiente del subtipo de cáncer de mama	67
8.4. El alelo C del rs4541843 (pri-miR-182) aumenta los procesos tumorigénicos del cáncer de mama.....	72
9. CONCLUSIONES.....	77
10. PERSPECTIVAS FUTURAS	80
11. REREFENCIAS	81

12. ANEXOS.....	87
12.1. Cuestionario para pacientes con CM.....	87
12.2. Cuestionario para mujeres sanas	97
11.3. Aprobación de Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos	99
12.4. Consentimiento Informado para casos de CM.....	102
12.5. Consentimiento Informado para Individuos Sanos.....	107
12.6. Consentimiento Informado para el estudio de otros genes	111
12.7. Figuras.....	113
12.8 Artículos científicos generados del trabajo de Tesis.....	115

1. RESUMEN

En Chile, el cáncer de mama (CM) presenta la primera tasa de mortalidad por cáncer en mujeres (16.6/100,000 mujeres). El principal factor de riesgo para el desarrollo de CM es la predisposición genética y las mutaciones en los genes *BRCA1/2* son responsables en promedio de un 16-20% del riesgo para CM familiar. Se ha propuesto que otros alelos de susceptibilidad denominados de moderada y baja penetrancia podrían ser responsables del 80% restante de los casos de CM familiar *BRCA1/2*-negativo. Evidencia reciente ha postulado a los microRNAs (miRNAs) como genes candidatos de baja penetrancia para susceptibilidad a CM. Diferentes estudios han mostrado que los miRNAs se expresan de forma aberrante en cáncer, y que la presencia de variantes genéticas en la secuencia del pre-miRNA o del miRNA maduro podría ser la causa de su desregulación. De acuerdo a lo anterior, en esta tesis se evaluó la asociación del SNP rs4541843, ubicado en el pri-miR-182, con riesgo de CM familiar a través de un diseño caso-control. Además, utilizando líneas celulares de CM, se evaluó en el rol funcional de los SNPs rs6505162 (pre-miR-423), rs895819 (pre-miR-27a) y rs4541843 en la tumorigénesis mamaria. Los resultados de asociación mostraron que el alelo T del rs4541843 se asoció con aumento del riesgo de desarrollar CM en pacientes chilenas *BRCA1/2* negativo, siendo este el primer estudio que evalúa la asociación del rs4541843 con alguna patología humana. En un estudio previo, se determinó que el alelo A del rs6505162 aumenta el riesgo de CM en población chilena y que el alelo G del rs895819 tendría un efector protector, disminuyendo el riesgo de desarrollar CM. El estudio funcional desarrollado en esta tesis mostró que el alelo A del rs6505162 aumenta la proliferación, migración e invasión celular, además, promueve la resistencia a cisplatino y disminuye la apoptosis confirmando que este alelo correspondería al alelo de riesgo. Por otra parte, el alelo G del rs895819 mostró actuar de forma diferencial en los procesos tumorigénicos mamaros dependiendo del subtipo de CM, participando como un supresor tumoral en el subtipo de CM triple negativo y como oncogén en el subtipo luminal A. Finalmente, se observó que el alelo C del rs4541843 tendría un rol oncogénico aumentando la proliferación, migración e invasión celular, promoviendo la resistencia a cisplatino y disminuyendo la apoptosis, demostrando que este alelo sería el alelo de riesgo y no el alelo T. Estos resultados son los primeros en caracterizar el rol funcional de los SNPs rs6505162, rs895819 y rs4541843 en la tumorigénesis mamaria.

2. ABSTRACT

In Chile, breast cancer (BC) has the highest cancer mortality rate in women (16.6/100,000 women). The main risk factor for BC development is genetic predisposition. Mutations in the BRCA1/2 genes are responsible for 40–50% of familial BC risk on average. It has been proposed that other so-called moderate- and low-penetrance susceptibility alleles could be responsible for the remaining 50% of BRCA1/2-negative familial BC cases. Recent evidence suggests that microRNAs (miRNAs) are candidate low-penetrance genes for BC susceptibility. Various studies have shown that miRNAs are aberrantly expressed in cancer and that the presence of genetic variants in the pre-miRNA or mature miRNA sequence could be the cause of their dysregulation. Given the above, this study assessed the association of SNP rs4541843, located in the pri-miR-182, with risk of familial BC using a case-control design. Furthermore, BC cell lines were used to evaluate the functional roles of SNPs rs6505162 (pre-miR-423), rs895819 (pre-miR-27a), and rs4541843 in mammary tumorigenesis. The association results showed that the rs4541843 T allele was linked to increased risk of developing BC in BRCA1/2-negative Chilean patients. This is the first study to evaluate an association between rs4541843 and any human pathology. A previous study determined that the rs6505162 A allele increased BC risk in a Chilean population and that the rs895819 G allele had a protective effect, reducing the risk of developing BC. Here, the functional study based on this concept showed that the rs6505162 A allele increased cell proliferation, migration, and invasion. In addition, the A allele promoted resistance to cisplatin and decreases apoptosis, confirming its role as a risk allele. On the other hand, the rs895819 G allele was found to function differentially in mammary tumorigenic processes depending on BC subtype, participating as a tumor suppressor in the triple-negative BC subtype but as an oncogene in the luminal A subtype. Finally, it was observed that the rs4541843 C allele had an oncogenic role, increasing cell proliferation, migration, and invasion, as well as promoting resistance to cisplatin and decreasing apoptosis. These results indicate that the risk allele was the C allele, not the T allele. These findings are the first to characterize the functional role of SNPs rs6505162, rs895819, and rs4541843 in mammary tumorigenesis.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad en la que se alteran factores genéticos y epigenéticos los que desencadenan una desregulación de funciones celulares claves tales como crecimiento, división celular, apoptosis y migración celular [1]. Actualmente, el cáncer es un problema de salud pública siendo la primera causa de muerte a nivel mundial [2]. En hombres, los cánceres más frecuentes incluyen a cáncer de pulmón, próstata, colon, estomago e hígado. En el caso de las mujeres, los cánceres más prevalentes corresponden a cáncer de mama, cervicouterino, colon, pulmón y tiroides [2]. Por lo anterior, existe gran interés en investigar en la temática “genómica del cáncer” con el objeto de descubrir nuevos: blancos terapéuticos, terapia farmacológica, tratamientos biológicos, biomarcadores que se utilicen para identificar población en riesgo, asesoramiento genético en las formas hereditarias del cáncer y marcadores de diagnóstico temprano, entre otros.

3.1. Cáncer de mama

3.1.1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es el cáncer más común en mujeres en el mundo. Cada año se diagnostican 1,15 millones de nuevos casos los que representan el 23% del total de casos de cáncer en mujeres [3, 4]. Aproximadamente 1 de cada 8 mujeres desarrollará CM a lo largo de su vida [5]. En Chile, el CM actualmente presenta la mayor tasa de mortalidad por cáncer en mujeres, la que ha ido en aumento desde 1990 a la fecha [6]. Los últimos datos del *World Health Organization* (WHO) indican que, en el año 2020 el CM causó 1.674 muertes que corresponden a una tasa de mortalidad de 17,3 por cada 100.000 mujeres (Figura 1) [6]. Respecto de la incidencia, también se ha observado un constante aumento [6]. Pese a lo anterior, en los últimos 30 años la supervivencia por CM ha mejorado considerablemente, debido en parte al diagnóstico temprano a través de la mamografía y ecografía mamaria. Si bien la imagenología es útil en el diagnóstico precoz del cáncer ya establecido, no permite identificar población con elevado riesgo de desarrollar CM. La identificación de la población de riesgo es fundamental para el éxito del monitoreo y toma de decisiones clínicas que pueden evitar que las mujeres desarrollen la enfermedad

o que la detecten en etapas tempranas en las cuales los tumores son pequeños y la cirugía mamaria puede ser 100% curable. En consecuencia, uno de los mayores desafíos de la investigación oncológica actual es identificar modalidades de prevención asociadas a los factores de riesgo de desarrollar CM, y de esta forma, reducir la morbilidad y mortalidad.

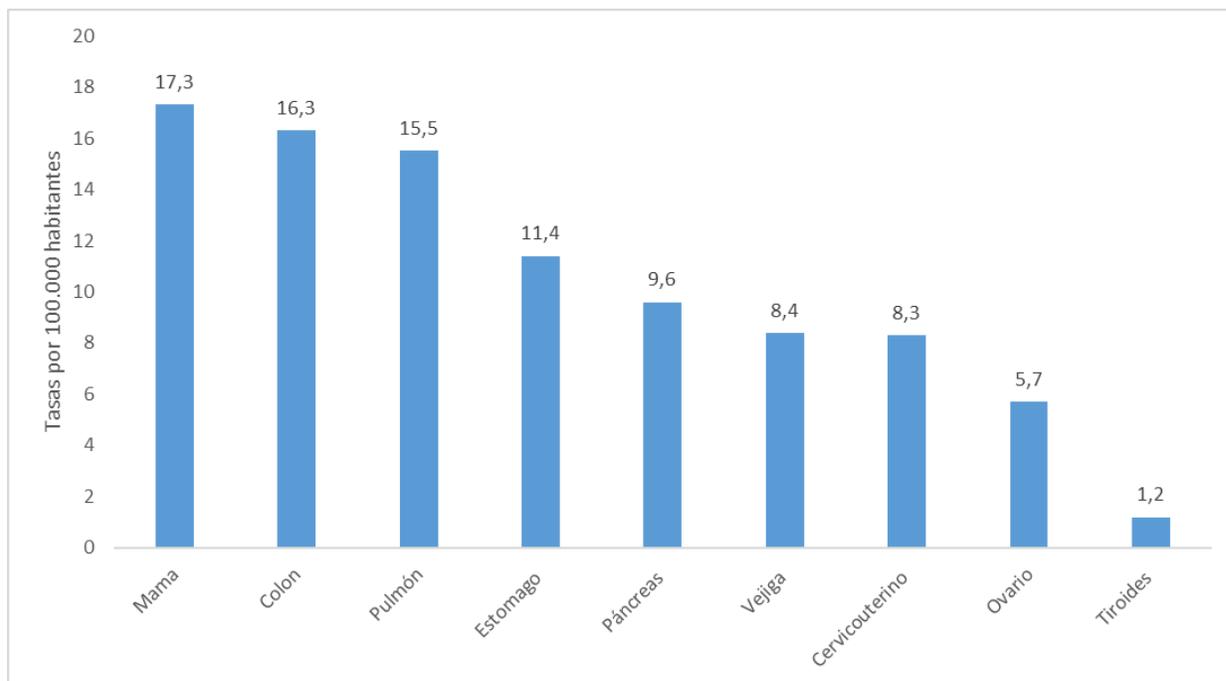


Figura 1. Mortalidad por tumores malignos en mujeres durante el año 2020 en Chile (modificado del WHO 2020)

3.1.2. Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama

Existen diferentes factores de riesgo que se han asociado al desarrollo del CM (Tabla 1). De acuerdo al riesgo relativo (RR), que corresponde al riesgo para un individuo expuesto a un factor de riesgo versus el riesgo para un individuo no expuesto a dicho factor, podemos mencionar los siguientes factores de riesgo:

- **Género:** Las mujeres tienen mayor riesgo a desarrollar CM que los hombres, siendo 100 veces mayor la probabilidad de que la enfermedad ocurra en mujeres respecto de los varones, de los cuales, el 1% desarrolla la enfermedad [7].
- **Edad:** Diversos estudios han demostrado que la incidencia de CM aumenta con la edad. El riesgo de desarrollar CM para una mujer de 30 años es de 1 en 258, en cambio, a los 50 años,

1 de cada 38 mujeres desarrollará CM. Si se comparan mujeres menores de 65 años con mujeres mayores de esta edad, el RR de CM asociado con el aumento de la edad es 5.8 [8].

- **Factores hormonales:** Las hormonas reproductivas influyen en el riesgo de desarrollar CM debido a su efecto sobre la proliferación celular. Por lo anterior, las menarquias tempranas y las menopausias tardías influyen en el riesgo de desarrollar CM, debido a la exposición prolongada a hormonas ováricas. Alternativamente, la Terapia de Reemplazo de Hormonas (TRH) la que es utilizada para aliviar los síntomas de la menopausia y prevenir la osteoporosis aumenta el riesgo de desarrollar CM en un 24%, el cual se eleva aún más si la TRH combina el uso de estrógeno y progesterona respecto de utilizar solo estrógeno [9].
- **Factores reproductivos:** Se relacionan con el número de ciclos menstruales ovulatorios que experimenta una mujer a lo largo de su vida [8]. El inicio de la menstruación antes de los 12 años o una menopausia tardía después de los 55 años, aumenta el riesgo de CM [7]. Del mismo modo, la nuliparidad o tener el primer hijo después de los 35 años otorga dos veces mayor riesgo de CM en comparación a mujeres que tienen uno o más hijos antes de los 35 años [9].
- **Factores nutricionales y modo de vida:** Dentro de estos factores podemos mencionar el sobrepeso y la obesidad, los cuales son más relevantes en mujeres postmenopáusicas debido a que si bien los ovarios dejan de producir estrógeno, el tejido adiposo es una fuente extragonadal de esta hormona. En consecuencia, las mujeres con sobrepeso u obesas tienen niveles más elevados de esta hormona lo cual aumenta el riesgo de desarrollar CM [7, 10]. Además, diferentes estudios sugieren que la obesidad y la inactividad física son determinantes importantes de la hiperinsulinemia y de la resistencia a insulina, lo que lleva a un aumento de los niveles de esta hormona contribuyendo a un mayor crecimiento tumoral. Por otra parte, la obesidad aumenta los niveles del factor de crecimiento similar a insulina (IGF) donde se ha demostrado que IGF-1 participa en el desarrollo, la progresión y la metástasis del CM [11]. Otro factor en esta categoría corresponde al consumo de alcohol. El consumo de dos a tres vasos de alcohol diarios aumenta en un 20% el riesgo de CM [7, 12].

- **Factores genéticos:** La predisposición o susceptibilidad genética corresponde al factor que otorga mayor RR al desarrollo de CM. La susceptibilidad genética es responsable de alrededor del 20% de los casos de CM con historia familiar para este cáncer [8]. Este riesgo se calcula en función del número de familiares afectados por cáncer de mama y de ovario, el grado de parentesco con estos familiares y la edad de diagnóstico de la enfermedad. El RR a consecuencia de factores genéticos puede aumentar hasta 3.6 veces respecto de la población general [8, 11].

De los factores de riesgo antes mencionados, el más importante corresponde a la predisposición o susceptibilidad genética, y se ha estimado que es responsable del 5-15% de todos los CM y de aproximadamente el 25% de los casos de CM en mujeres de 30 años [7].

Tabla 1. Factores de riesgo para cáncer de mama (extraído de Singletary S., 2003 [8])

Risk Factor	Category at Risk	Comparison Category	Relative Risk
Alcohol intake ⁷	2 drinks per day	Nondrinker	1.2
Body Mass Index ¹¹	80 th percentile, age 55 or greater	20 th percentile	1.2
Hormone replacement therapy with estrogen and progesterone ²³	Current user for at least 5 years	Never used	1.3
Radiation exposure ^{25,26}	Repeated fluoroscopy	No exposure	1.6
	Radiation therapy for Hodgkin's disease	No exposure	5.2
Early menarche ²⁷	Younger than 12 years	Older than 15 years	1.3
Late menopause ^{27,30}	Older than 55 years	Younger than 45	1.2-1.5
Age at first childbirth ^{28,29,31}	Nulliparous or 1st child after 30	1st child before 20	1.7-1.9
Current age ²	65 or older	Less than 65	5.8
Past history of breast cancer ^{33,34}	Invasive breast carcinoma	No history of invasive breast carcinoma	6.8
Other histologic findings ^{38,39}	Lobular carcinoma in situ	No abnormality detected	16.4
	Ductal carcinoma in situ	No abnormality detected	17.3
Breast biopsy ⁴⁰	Hyperplasia without atypia*	No hyperplasia	1.9
	Hyperplasia with atypia	No hyperplasia	5.3
	Hyperplasia with atypia and positive family history	No hyperplasia, negative family history	11
Cytology (fine-needle aspiration, nipple aspiration fluid) ^{41,42}	Proliferation without atypia*	No abnormality detected	2.5
	Proliferation with atypia	No abnormality detected	4.9-5
	Proliferation with atypia and positive family history	No abnormality detected	18.1
Family history ⁴⁷	1st-degree relative 50 years or older with postmenopausal breast cancer	No 1st- or 2nd-degree relative with breast cancer	1.8
	1st-degree relative with premenopausal breast cancer	No 1st- or 2nd-degree relative with breast cancer	3.3
	2nd-degree relative with breast cancer	No 1st- or 2nd-degree relative with breast cancer	1.5
	Two 1st-degree relatives with breast cancer	No 1st- or 2nd-degree relative with breast cancer	3.6
Germline mutation ⁴⁵	Heterozygous for BRCA1, age <40	Not heterozygous for BRCA1, age <40	200†
	Heterozygous for BRCA1, age 60-69	Not heterozygous for BRCA1, age 60-69	15†

3.2. Predisposición genética al cáncer de mama.

Las características de la predisposición genética incluyen: herencia autosómica dominante, alta penetrancia, es decir, un portador de mutación genética tiene un 67% de riesgo de desarrollar CM a los 70 años y un 80% de riesgo a los 80 años, y frecuencia de portadores de 0.006 [13]. Estos datos indican que 1 de cada 20 mujeres con CM son portadoras de predisposición genética y 1 de cada 200 mujeres sanas en la población general. Estas frecuencias indican que el CM es una de las patologías hereditarias más ampliamente distribuidas en el mundo.

La existencia de un gen o de genes responsables de la predisposición genética fue sugerida hace más de un siglo. En los años 1994 y 1995, se identificaron dos genes de susceptibilidad para el CM: *BRCA1* (MIM 113705) [14] y *BRCA2* (MIM 600185) [15]. Estos genes son actualmente considerados genes autosómicos dominantes de alta penetrancia para susceptibilidad al CM [3, 16]. El gen *BRCA1* se encuentra en el cromosoma 17q21 y tiene como función la reparación de rupturas de doble cadena del DNA, la regulación de los puntos de control del ciclo celular, la ubiquitinación de proteínas y la remodelación de la cromatina. Por otra parte, el gen *BRCA2* se ubica en el cromosoma 13q12.3 y cumple una función dual activando o inhibiendo el proceso de reparación por recombinación homóloga (RH) [17]. Se ha reportado que mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* pueden además aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de mama, ovario, próstata y otros cánceres [18].

Aproximadamente el 25% de los casos de CM familiar se atribuyen a mutaciones en *BRCA1/2* [19]. De hecho, la identificación de mutaciones en *BRCA1/2* se ha convertido en un análisis de gran importancia en genética clínica oncológica, ya que ha permitido mejorar la prevención y el tratamiento de mujeres de alto riesgo en todo el mundo [20]. A la fecha, no se ha encontrado un gen *BRCAX* con características similares a *BRCA1/2*. En consecuencia, hay un gran porcentaje de casos de CM familiar cuya etiología genética no se conoce

3.3. Panorama emergente de la susceptibilidad al cáncer de mama: modelo poligénico, genes y variantes.

En la actualidad, existe consenso de que las mutaciones en los genes *BRCA1/2* son responsables en promedio del 25% del riesgo de CM hereditario (CMH) [21, 22]. Los análisis de ligamiento de genoma completo utilizando familias *BRCA1/2*-negativas de gran tamaño no han logrado mapear otros loci de susceptibilidad de alta penetrancia [23]. Por lo tanto, una gran parte del componente genético de estas familias permanece sin identificar. Ford et al. [24], propusieron que otros alelos de susceptibilidad, denominados de moderada y baja penetrancia, podrían ser responsables de un porcentaje significativo del CMH en familias *BRCA1/2*-negativas.

Para explicar la agregación familiar de casos de CMH *BRCA1/2*-negativos, se han aplicado varios análisis de segregación, incluidos modelos recesivos y poligénicos. Antoniou et al. [25], estudiaron familias con múltiples casos y concluyeron que el modelo recesivo no se ajusta a la forma de segregación. Posteriormente, Pharoah et al. [26], realizaron un análisis poblacional en pacientes con CM y encontraron que el modelo poligénico es el que mejor se ajusta a la segregación familiar de CM. El modelo poligénico asume la existencia de diversos genes que actúan de forma aditiva para explicar la distribución gaussiana del riesgo observado en la población. Por lo tanto, el modelo más ampliamente aceptado actualmente plantea que la susceptibilidad al CM es el resultado de un pequeño número de mutaciones en genes de alta penetrancia (*BRCA1* y *BRCA2*) y un número mucho mayor de variantes en genes de penetrancia moderada o baja (modelo poligénico) [27, 28]. Los genes de penetrancia moderada y baja se definen como aquellos en los que las variaciones de secuencia y/o polimorfismos se asocian con un aumento moderado o pequeño en el riesgo relativo de CM. Por lo tanto, actualmente se consideran tres categorías de alelos de susceptibilidad para CM: alelos raros de alta penetrancia, alelos raros de moderada penetrancia y alelos comunes de baja penetrancia. Estas categorías de alelos confieren diferentes niveles de riesgo y tienen diferentes frecuencias poblacionales (Figura 2). La contribución de cada categoría de genes a la predisposición al CM se está investigando con gran interés, al igual que las correlaciones entre las características fenotípicas de los tumores, las vías de interacción génica y las aplicaciones clínicas [27].

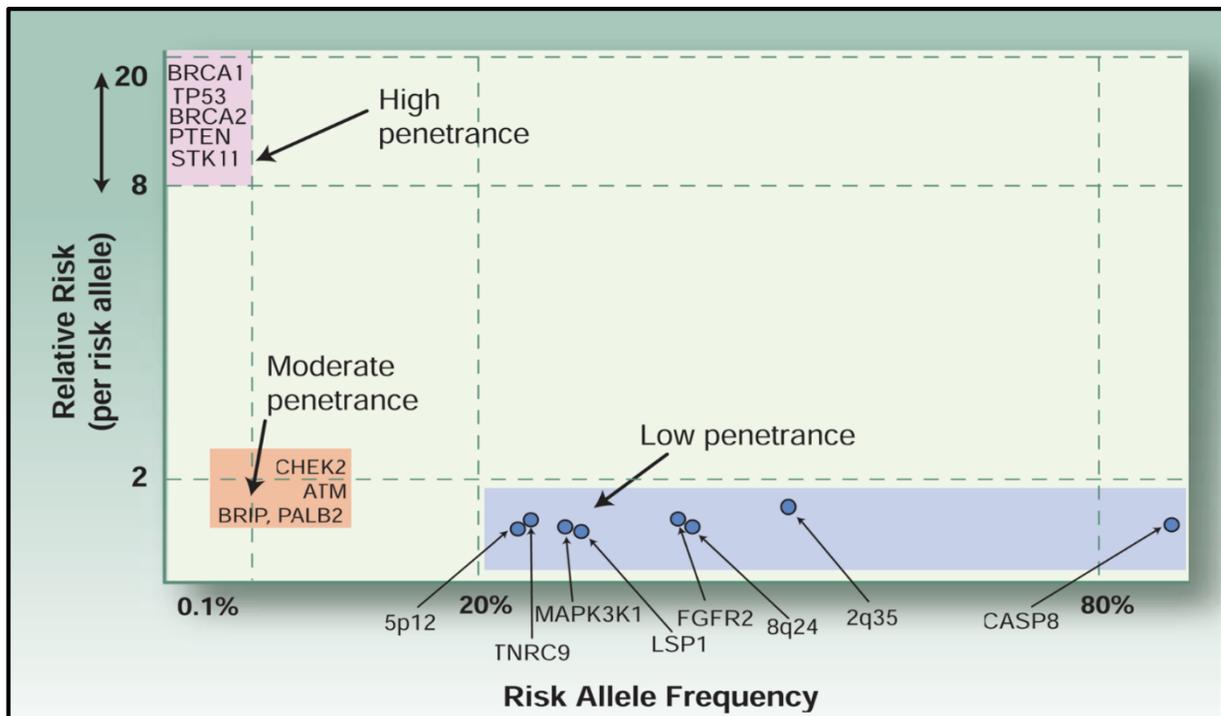


Figura 2. Loci de susceptibilidad al cáncer de mama según su riesgo relativo asociado (por alelo de riesgo) y la frecuencia del alelo de riesgo. Esta figura muestra que la mayoría de las variantes de baja penetrancia caen en la esquina inferior derecha (frecuencias superiores al 20% y riesgo relativo inferior a 1.3), y que los alelos de riesgo asociados con un riesgo relativo más alto (esquina superior derecha), son menos frecuentes. Si bien es poco probable que se produzcan mutaciones adicionales en genes de alta penetrancia; La identificación de variantes de moderada y baja penetrancia en un futuro próximo se vuelve cada vez más probable a medida que mejoren los estudios de genoma completo utilizando tamaños muestrales más grandes. (extraído de Garcia-Closas & Chanock, 2008 [29]).

- **Genes de alta penetrancia**

Las mutaciones en genes de susceptibilidad de alta penetrancia corresponden principalmente a cambios en la secuencia de nucleótidos que generan proteínas truncadas. Este tipo de variantes tienen muy baja frecuencia poblacional ($\leq 0,1\%$) sin embargo, otorgan un alto RR de alrededor de 10 a 20 veces [27]. Los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53*, son considerados genes de alta penetrancia. Las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* confieren aproximadamente un 25% de riesgo de desarrollar CM en individuos pertenecientes a familias de alto riesgo para CM [30].

- **Genes de moderada penetrancia**

La frecuencia de la población portadora de variantes en genes de moderada penetrancia corresponde a $\leq 0,6\%$, con un RR de 2 a 4 veces. Por lo anterior, se estima que estas variantes otorgarían ~3% del RR de CM familiar [31]. Se han clasificado como genes de moderada penetrancia

los siguientes: *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *PALB2*, *XRCC2*, *FGFR2*, *MAP3K1*, entre otros. Mujeres portadoras de estas variantes tienen un riesgo de 6-10% de desarrollar CM a los 60 años, en comparación con el 3% de riesgo de la población general [27].

- **Genes de baja penetrancia**

Las variantes en genes de baja penetrancia son las más frecuentes en las poblaciones (5% al 50%) [27]. Sin embargo, este tipo de variantes otorgan un RR bajo, entre 1,25 en condición heterocigota y 1,65 veces en condición homocigótica. Dentro de este grupo se encuentran los polimorfismos de nucleótido único (SNPs): rs2981582 (*FGFR2*), rs3803662 (*TOX3*), rs889312 (*MAP3K1*), rs3817198 (*LSP1*), rs13281615 (8q), rs13387042 (2q), entre otros. Las variantes en genes de baja penetrancia explicarían aproximadamente el 16% de los casos de CMH [32].

Actualmente se plantea que todos los genes de susceptibilidad conocidos para CM son responsables del 50% de los casos de CMH (Figura 3) [16]. Sin embargo, los genes responsables del ~50% restante aún no han sido determinados. De acuerdo con el modelo actual de tumores hereditarios, se ha postulado que una combinación desfavorable de variantes genéticas polimórficas en genes de susceptibilidad de baja o moderada penetrancia daría cuenta del exceso del riesgo del CMH [27]. Entre estos genes, evidencia reciente apunta a variaciones en secuencias precursoras de microRNAs o microRNAs maduros como posibles candidatos.

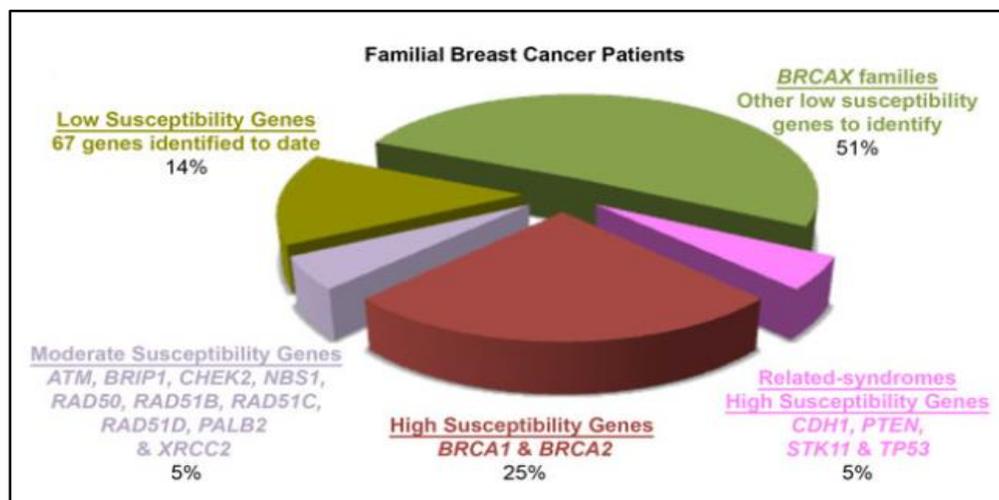


Figura 3. Distribución de los genes identificados en CMH. Aproximadamente la mitad de los genes causales de CMH aún no han sido identificados. (extraída de Melchor L, Benítez J. 2013).

3.4. MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNA endógeno, no codificantes y de hebra simple con un tamaño aproximado de 20 a 25 nucleótidos. Los miRNAs son capaces de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional al unirse a la región 3' no traducida (UTR) del RNA mensajero (mRNA) diana [33]. Los miRNAs que se unen con una alta complementariedad a la secuencia del mRNA blanco inducen la degradación de los mRNA. Sin embargo, la mayoría de los miRNAs se unen con una complementariedad parcial a la región 3'UTR del mRNA blanco inhibiendo la expresión del gen a nivel traduccional [34]. Desde su descubrimiento por Lee et al. [35], en sus trabajos con *Caenorhabditis elegans*, se ha reportado la existencia de aproximadamente 2.300 miRNAs en el genoma humano, pero solo ~1100 de estos miRNAs han sido validados experimentalmente [36]. El 30% de los genes humanos son regulados por miRNAs [37, 38]. En la célula, los miRNAs pueden influir sobre diferentes vías y procesos biológicos que incluyen desarrollo, proliferación celular, diferenciación y apoptosis [39, 40].

Los miRNAs se transcriben desde genes individuales o desde clúster. Se ha reportado que el 25% de los genes de miRNA humanos se encuentran organizados en clúster, lo que corresponde a genes ubicados adyacentes entre sí en el cromosoma [41]. Los genes de miRNAs que se organizan en clúster se transcriben en un transcrito policistrónico, el cual es procesado, dando como resultado miRNAs maduros individuales [41, 42].

El procesamiento de los miRNAs comprende dos vías, que corresponden a la vía canónica y no canónica, siendo la primera la predominante en el procesamiento de estos RNAs [43]. La vía canónica de biogénesis de los miRNAs es un proceso que se inicia en el núcleo y finaliza en el citoplasma (Figura 4). Los miRNAs, son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) generándose un transcrito primario (pri-miRNA) el cual es procesado en el núcleo por el microprocesador formado por la enzima RNasa III (Drosha) y la proteína de unión a RNA de doble cadena (DGCR8) formando un precursor de miRNA (pre-miRNA) de ~70 nucleótidos. Posteriormente, los pre-miRNAs son exportados al citoplasma por Exportina 5, transportador dependiente de GTP. En el citoplasma los pre-miRNA son clivados por la RNasa II (Dicer) liberando un miRNA dúplex de ~22 nucleótidos. Finalmente, las hebras del dúplex se separan generando dos

hebras simples denominadas 5p y 3p. Una de las hebras generadas se asocia a la proteína Argonauta (AGO), formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) el cual ejerce la función regulatoria sobre el gen blanco, mientras que la otra hebra es degradada. Para cualquier miRNA dado, la interacción entre las hebras 5p o 3p con el complejo AGO varía según el tipo de célula o el ambiente celular. En general, la hebra con menor estabilidad termodinámica dado por el extremo 5' o uracilo en 5' se carga preferentemente en el complejo AGO y se considera la hebra guía. La hebra que no es cargada al complejo AGO se denomina hebra pasajera, la cual se separará de la hebra guía a través de diferentes mecanismos basados en el grado de complementariedad [42-45]. La biogénesis de miRNAs no canónica se puede agrupar en vías independientes de Drosha/DGCR8 e independientes de Dicer [43]. Un ejemplo de miRNAs procesados por la vía independiente de Drosha/DGCR8 corresponde a los mirtrones, los cuales se originan a partir de intrones que, una vez removidos por corte y empalme, funcionan como pre-miRNAs [42].

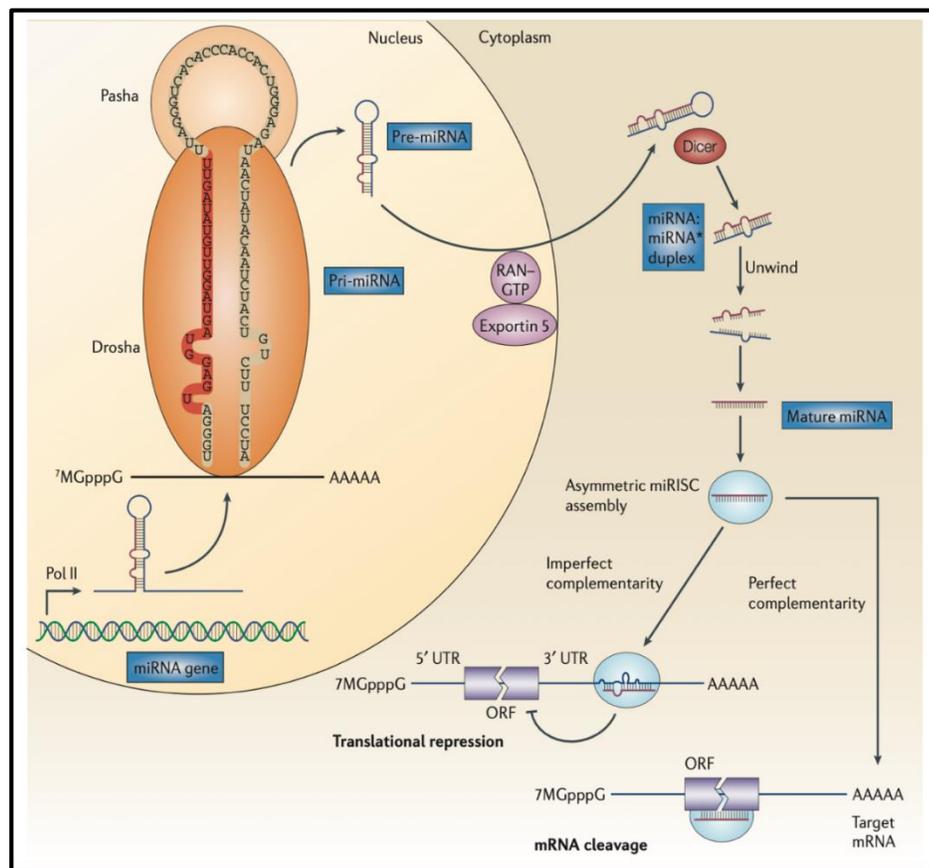


Figura 4. Vía canónica de biogénesis de los microRNA. La imagen corresponde a un diagrama representativo del procesamiento de miRNAs por la vía canónica de la biogénesis. Se observa los primeros pasos de la vía que se desarrollan en el núcleo, continuando el procesamiento en el citoplasma, que da como resultado al miRNA maduro, el cual va a ejercer su función regulatoria (Extraído de Esquela-Kerscher & Slack, 2006 [34]).

3.5. Variación genética SNPs en secuencias precursoras de miRNAs o miRNAs maduros y su asociación con susceptibilidad a cáncer de mama

3.5.1. microRNAs y su relación con cáncer

Los miRNAs participan en diversas enfermedades humanas, tales como patologías cardiovasculares, desordenes psiquiátricos y condiciones neurodegenerativas, entre otras. Se ha demostrado que los miRNAs están mutados o se expresan en forma aberrante en el cáncer [38]. Una de las primeras evidencias que asoció la expresión aberrante de miRNAs y cáncer fue informada por Calin et al. [46], quienes demostraron una disminución de la expresión de los miRNA-15a y miRNA-16-1 en pacientes con leucemia linfocítica crónica. En tumores sólidos, el grupo de Michael et al. [47], identificaron 28 miRNAs cuya expresión era diferente en adenocarcinoma de colon respecto de mucosa normal, y también encontraron disminución de los niveles de expresión de los miRNA-413 y miRNA-145 en tejido tumoral respecto de su correspondiente tejido normal. Los estudios de expresión de genoma completo han demostrado que casi todos los tipos de cáncer presentan perfiles específicos de genes de miRNA sobreexpresados y reprimidos. Diferentes estudios han descrito perfiles específicos de expresión de miRNAs en CM, glioblastoma primario, carcinoma hepatocelular, carcinoma papilar de tiroides y cáncer de pulmón. En un amplio estudio que analizó los perfiles de expresión en 540 muestras de 5 tumores sólidos (pulmón, mama, próstata, colon, y páncreas), se encontró que un grupo de 43 miRNAs estaban desregulados en comparación a tejidos normales [48]. La Tabla 2 muestra la alteración de los perfiles de expresión que han sido detectados en diferentes tipos de tumores humanos [49].

Tabla 2. MicroRNAs más frecuentemente sobreexpresados (negrilla) y reprimidos (cursiva) en cánceres humanos (extraído de Negrini M. 2009 [49]).

Rank ^a	MicroRNA	Cluster	Chrom	Host gene	Associated cancer
1	miR-221	mir-221/mir-222	X	Intergenic	Stomach, colon, pancreas, liver, bladder, thyroid ca, glioblastoma
2	miR-21	–	17	TMEM49-005—exon 12	Breast, ovarian, tongue, liver, lung thyroid ca, glioblastoma
3	miR-191	mir-191/mir-425	3	C3orf60; intron 1	Breast, prostate, stomach, colon, pancreas, lung ca
4	miR-210	–	11	Intergenic	Breast, prostate, liver, lung ca
5	miR-155	–	21	AP000223.5-001—exon 4	Breast, tongue, lung, thyroid ca
6	miR-222	mir-221/mir-222	X	Intergenic	Stomach, colon, pancreas, liver, bladder, thyroid ca
7	miR-34a	–	1	Intergenic	Breast, tongue, liver, thyroid, ca
8	miR-181b-1	mir-181a-1/mir-181b-1	1	RP11-31E23.1-001—intron 2	Breast, prostate, pancreas, liver, thyroid ca
9	miR-103-1	–	5	PANK3; intron 5	Breast, stomach, colon, pancreas, bladder ca
10	miR-181a-1	mir-181a-1/mir-181b-1	1	RP11-31E23.1-001—intron 2	Breast, tongue, liver, thyroid ca
1	<i>miR-145</i>	<i>mir-143/mir-145</i>	5	Intergenic	Breast, ovary, prostate, colon, liver, lung ca
2	<i>miR-199a-1-5p</i>	–	19	<i>DNM2</i> —intron 15	Ovary, prostate, colon, liver, lung ca
3	<i>miR-143</i>	<i>mir-143/mir-145</i>	5	Intergenic	Breast, ovary, prostate, colon, liver, lung ca
4	<i>miR-125a</i>	<i>mir-99b/let-7e/mir-125a</i>	19	Intergenic	Breast, ovary, prostate, liver, lung ca
5	<i>miR-125b-1</i>	<i>mir-125b-1/let7a-2/mir-100</i>	11	Intergenic	Breast, ovary, prostate, tongue, liver ca
6	<i>let-7d</i>	<i>let-7a-1/let-7f-1/let-7d</i>	9	Intergenic	Breast, ovary, prostate, colon, liver ca
7	<i>miR-101</i>	–	1	Intergenic	Breast, ovary, prostate, colon, liver, lung ca
8	<i>miR-138-2</i>	–	16	Intergenic	Tongue, stomach, colon, pancreas, thyroid ca
9	<i>miR-199a-2-5p</i>	<i>mir-214/mir-199a-2</i>	1	<i>DNM3</i> —intron 14	Ovary, tongue, liver ca
10	<i>miR-218-2</i>	–	5	<i>SLIT3</i> ; intron 14	Prostate, stomach, colon, lung ca

^a Rank was assessed on the basis of the number of published papers reporting the deregulation of the miRNA from 2002 to 2008.

Evidencia creciente muestra que los miRNAs pueden actuar como oncogenes cuando su blanco son moléculas oncosupresoras o como supresores tumorales cuando su blanco son oncogenes (Figura 5) [49, 50]. Además, un mismo miRNA puede funcionar como oncogén o supresor tumoral dependiendo del tipo de cáncer y del contexto celular [51]. En diferentes tipos de cáncer se ha reportado dualidad de función para muchos miRNAs. Un ejemplo es el caso del miRNA-125b, el cual presenta disminución de su expresión en carcinoma ovárico, de tiroides, cáncer de mama y carcinoma de células escamosas, en todos estos cánceres, el miRNA actúa como supresor tumoral [52], Por el contrario, el miRNA-125b actúa como oncogén en glioblastoma, cáncer de próstata y neuroblastoma. También se ha descrito dualidad de función en diferentes tipos de cáncer para los miRNA-181a, miRNA-181c y miRNA-220 [53].

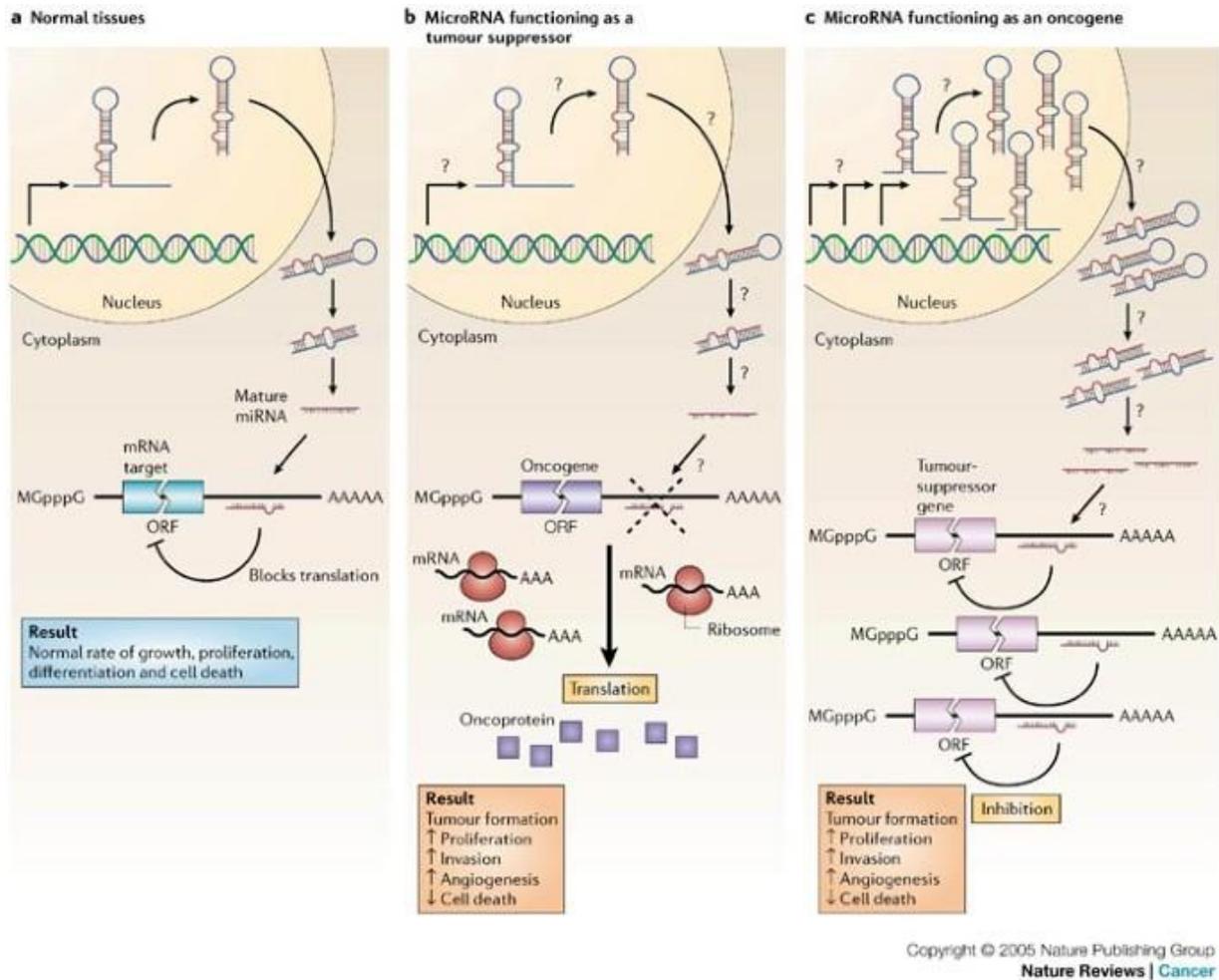


Figura 5. MicroRNAs como supresores de tumores y oncogenes. (a) En células normales, la transcripción, procesamiento y unión de miRNAs a secuencias mRNA blanco conduce a la represión de sus genes diana, ya sea por inhibición de la traducción del mRNA o degradación del mRNA. (b) La expresión reducida de un miRNA que actúa como supresor de tumores, como resultado de una delección cromosómica o defectos en cualquier etapa de la biogénesis del miRNA (indicado por signos de interrogación) conduce a un aumento de la síntesis de la oncoproteína blanco (cuadrados violetas), gatillando el desarrollo de un fenotipo oncogénico. (c) El aumento de la expresión de un miRNA que actúa como oncogén, como resultado de la amplificación o sobreexpresión del gen del miRNA, conduce a la represión de un gen supresor de tumores (rosa), favoreciendo el desarrollo de un fenotipo oncogénico. ORF: marco de lectura abierto; mGpppG: 7-metilguanósina (extraído de Esquela-Kerscher & Slack, 2006 [34]).

3.5.2. microRNAs y su relación con cáncer de mama

La variación en los niveles de expresión de distintos miRNAs maduros se ha asociado al desarrollo y progresión de múltiples cánceres humanos [34, 54]. El uso de microarreglos conteniendo todos los miRNAs humanos conocidos ha permitido identificar a los miRNAs que presentan

expresión diferencial entre muestras de tejido normal y tumoral. Esta estrategia ha ayudado a identificar a los miRNAs involucrados en los cánceres humanos. Respecto al CM, Iorio et al. [55], utilizando un microarreglo de miRNAs, evaluó el perfil de expresión de miRNAs en 10 tejidos normales y en 76 de CM. Los autores identificaron 29 miRNAs cuya expresión estaba significativamente desregulada ($p < 0.05$) e identificaron un grupo pequeño conformado por 15 miRNAs cuya expresión diferencial permitió predecir correctamente si la muestra correspondía a tejido mamario normal o tumoral con un 100% de precisión. Entre los miRNAs diferencialmente expresados, los que presentaron desregulación consistente en CM fueron los miRNA-10b, miRNA-125b, miRNA-145, miRNA-21 y miRNA-155. Tres de estos, miRNA-10b, miRNA-125b y miRNA-145 mostraron disminución de su expresión, y los otros dos estuvieron sobreexpresados, sugiriendo que estos miRNAs actúan como supresores tumorales y oncogenes respectivamente. Además, estos autores identificaron en muestras tumorales, miRNAs cuya expresión se correlacionó con características biopatológicas específicas del CM, como expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) (miRNA-30), metástasis en ganglios linfáticos (let-7f-1, let-7a-3 y let-7a-2) y alto índice proliferativo (let-7c y let-7d). Blenkiron et al. [56], a través de técnicas de perfiles de expresión de miRNAs, identificó 133 miRNAs que permitieron clasificar distintos subtipos moleculares de tumores mamarios: Luminal A (RE+/RP+/Her2-), Luminal B (RE+/RP+/Her2+), tipo Her2(+) (RE-/RP-/Her2+), tipo Basal (triple negativo) (RE-/RP-/Her2-), y normal. Iyevleva et al. [57], demostraron que los miRNA-21, miRNA-10b y miRNA-31 se encontraban sobreexpresados en CM bilateral respecto de CM unilateral ($p=0,0001$, $p=0,0004$ y $p=0,0002$, respectivamente).

3.5.3. Polimorfismos de nucleótido único en genes de microRNAs y asociación con susceptibilidad al cáncer de mama

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) son la forma más común de variación presente en el genoma humano. Los SNPs presentes en genes de miRNA pueden alterar su expresión o maduración llevando a una regulación aberrante, o alterando la afinidad y especificidad de su unión a su mRNA blanco [58]. Muchos estudios epidemiológicos han evaluado la asociación de SNPs en miRNAs con susceptibilidad al CM en casos de población europea, asiática, arábiga y judía [54].

Chen et al. [58], estudiaron la asociación entre el SNP rs2910164:G>C, ubicado en el miRNA-146a, y edad de diagnóstico del CM. Los autores informaron que los casos con CM/CO *BRCA1/2*-negativos portadores de los genotipos GC o CC, presentaron un diagnóstico significativamente más temprano que aquellos con genotipo GG (homocigoto común). En un análisis posterior, Hu et al. [59], en mujeres chinas de etnia Han, encontraron que el miR-196a2 rs11614913:T>C y miR-499 rs3746444:A>G se asociaron con mayor riesgo de CM (OR =1.23; [IC del 95% 1.02-1.48] y OR=1.25 [IC del 95% 1.02-1.51], respectivamente) en una forma dosis dependiente (*p-trend* 0.010 y 0.037, respectivamente). Además, los ORs para genotipos combinados TC/CC del rs11614913 y AG/GG del rs3746444 fueron mayores en los casos más jóvenes correspondiendo a 1.32 (IC de 95% 1.03-1.70) y 1.34 (IC del 95%, 1.04-1.07), respectivamente. Los autores sugirieron que estos SNPs podrían contribuir a la susceptibilidad del CM, siendo esta, la primera evidencia de que SNPs en miRNA podrían utilizarse como biomarcadores para susceptibilidad al CM. Sin embargo, las asociaciones previamente informadas fueron negadas por Catucci et al. [60], quienes reportaron ausencia de asociación entre los SNP rs2910164, rs11614913 y rs3746444 y riesgo de CM, o edad de inicio del CM en pacientes alemanes e italianos con CM *BRCA1/2*-negativos. Pastrello et al. [61], en pacientes italianas con cáncer de mama y ovario familiar *BRCA1/2*-negativo sugirió que miR-146 rs2910164 puede afectar la edad de inicio del cáncer. Considerando que los resultados de los estudios de asociación entre los SNPs rs11614913 y rs2910164 y riesgo de CM no son concluyentes, Gao et al. [62], realizaron un meta análisis que incluía estudios de casos y controles de poblaciones alemanas, italianas y chinas. Los autores encontraron que los individuos portadores del genotipo CC del SNP rs11614913 (miR-196a2) se asoció con un mayor riesgo de CM (OR=1.30 [IC del 95%, 1.01-1.68]). Sin embargo, no se observó una asociación significativa entre el rs2910164 (miR-146a) y riesgo de CM en todos los modelos genéticos testeados. Además, el grupo de García et al. [63], no encontraron asociación del SNP rs2910164:G>C con riesgo de CM en portadores de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2*, y concluyeron que es poco probable que este SNP tenga sea importante para el riesgo de CM. Posteriormente, el meta análisis realizado por Lian et al. [64], mostró que en población europea, el genotipo homocigoto CC del rs2910164:G>C se asoció con mayor riesgo de CM en condición homocigota y modelo recesivo. Sin embargo, el meta análisis realizado por Srivastava et al. [65], informó asociación entre el rs11614913 y riesgo de CM. Alshatwi et al. [66], evaluaron la asociación de los SNPs rs11614913, rs2910164 y

rs3746444 con el riesgo de CM en un estudio caso-control en una población de Arabia Saudita. Los autores encontraron una asociación significativa entre los rs11614953 y rs3746444 y riesgo de CM. Sin embargo, no se encontró asociación entre el rs2910164 y riesgo de CM.

A la fecha, los SNPs más estudiados incluyen a los rs11614913 (miR-196a2), rs3746444 (miR-499), rs895819 (miR-27a), rs2910164 (miR-146a) y rs6505162 (miR-423), lo cuales se han realizado en casos de poblaciones europeas, asiáticas, árabes y judías. Además, la mayoría de los estudios han sido realizados en casos de CM esporádico. Con la excepción de un estudio en población brasileña, la variación en miRNAs no se ha estudiado en poblaciones Latinoamericanas. Teniendo en cuenta que la variación intrapoblacional es específica, para utilizar un miRNA como biomarcador de susceptibilidad para CM, es necesario conocer previamente su variación en una población específica.

3.5.4. miRNA-423 (rs6505162) y su rol en tumorogénesis mamaria

Evidencia reciente ha mostrado que el miRNA-423 (miR-423) juega un rol importante en la tumorogénesis mamaria. El grupo de Dai et al. [67], mostró que el miR-423 aumenta la invasión de células de CM a través de la vía de señalización NF- κ B, dando indicios del posible uso del miR-423 como un marcador pronóstico y terapéutico para el CM metastásico. El trabajo de Xia et al. [68], demostró que el miR-423 actúa como un oncogén promoviendo la proliferación y migración de células tumorales de mama a través de la inhibición de la expresión de ZFP36.

El rs6505162:C>A, se ubica en el cromosoma 17q11.2, específicamente se localiza en la región del pre-miR-423 a 12 pb del extremo 3' terminal del miR-423 maduro. Diferentes estudios han evaluado la asociación entre el rs6505162 y riesgo de desarrollar CM. Kontorovich et al. [69], mostraron que, en población judía, el rs6505162 se asoció con un aumento significativo de CM y de ovario (OR=2.84 [IC del 95% 1.17-6.85] $p=0.021$ y OR=2.77 [IC del 95% 1.11-6.9] $p=0.028$, respectivamente). Por el contrario, Smith et al. [90], en mujeres australianas caucásicas, informaron que el rs6505162 reduce el riesgo de CM esporádico (OR=0.5 [IC del 95% 0.27-0.92] $p=0.03$). Un meta-análisis publicado por Chen et al. [58], que incluyó diferentes SNPs, mostró que no hay asociación entre el SNP rs6505162 y riesgo de CM. Sin embargo, este

meta-análisis incluyó solo dos estudios de asociación del SNP rs6505162, lo cual es una importante limitación para interpretar los resultados. Morales et al. [70], publicaron los resultados de asociación entre el rs6505162 y CMH en población chilena, estos mostraron que el SNP rs6505162:C>A aumenta el riesgo de CM en familias con fuerte historia familiar de CM. En estas familias, el genotipo homocigoto AA se asoció con aumento del riesgo de CM (OR=1.7 [95% IC 1.0-2.0] $p=0.05$).

Los estudios de asociación requieren de estudios funcionales que validen las asociaciones encontradas y establezcan el rol de un SNP específico en la tumorigénesis. En relación con el rol del SNP rs6505162 en la tumorigénesis mamaria, estudios preliminares realizados por Zhao et al. [71], informaron que el rs6505162 alelo A: a) afecta la expresión del miRNA maduro; b) que en células tumorales de CM se expresan ambas hebras del miRNA 3p y 5p, y c) que la hebra 3p es la que podría tener un rol potencialmente oncogénico en la tumorigénesis del CM. A la fecha, no se han publicados otros estudios funcionales que informen acerca del rol del rs6505162C>A en el CM.

3.5.5. *miRNA-27a (rs895819) y su rol en tumorigénesis mamaria*

Diferentes estudios han demostrado que el miRNA-27a (miR-27a) muestra actividad oncogénica regulando factores de transcripción específicos que activan expresión génica. Tang et al. [72], demostraron que la sobreexpresión del miR-27a se asocia con menor sobrevida en pacientes con CM, lo que sugiere que el miR-27a podría ser un marcador de progresión para este cáncer. Jiang et al. [73], realizaron un estudio en células de CM que confirmó por primera vez que el miR-27a se une al mRNA de gen F-box y dominio de repetición WD 7 (FBXW7). Los resultados de este estudio concluyeron que el miR-27a cumple un rol fundamental en la regulación de la metástasis del CM inhibiendo la expresión de FBXW7, y proporcionando evidencia del posible uso del miR-27a en la terapia del CM. Alternativamente, existe evidencia reciente que sugiere un rol protector del miR-27a en la tumorigénesis mamaria. El trabajo realizado por Ljepoja et al. [74], informó que el miR-27a sensibiliza las células de CM luminal A al tratamiento con moduladores selectivos del receptor de estrógenos. Los autores determinaron que los pacientes con CM RE positivo sometidos a tratamientos endocrinos y con elevados niveles de expresión del miR-27a, presentaban mayor sobrevida al CM. Ueda et al. [75], utilizando

perfiles de expresión de miRNAs, determinaron que el miR-27a funciona como un regulador negativo de la supervivencia y quimioresistencia de células troncales de CM.

El rs895819:A>G se localiza a 40 pb respecto del primer nucleótido de la secuencia madura del miR-27a. Se ha demostrado que este SNP podría afectar la estructura secundaria del pre-miR-27a, alterando el procesamiento y/o la maduración del miR-27a [76]. En el miR-27a sólo se han realizado estudios de asociación entre SNP rs895819 y riesgo de CM, siendo esta variante una de las más estudiadas en miRNAs (Figura 6). Estos se han realizado en 3 de los 5 continentes (Asia, Europa y América). En Asia, se han realizado estudios en Chima, Irán e Israel; en Europa, en Alemania e Italia; y en América solo en Chile [77]. En familias alemanas con CM familiar, el MAF (alelo G) mostró un efecto protector en: a) casos con edad de diagnóstico <50 años (OR=0.83 [95 % IC 0.7–0.9] $p=0.03$) y b) casos con CM bilateral (OR=0.70 [95% IC 0.5–0.9] $p=0.02$) [78]. Sin embargo, los resultados obtenidos por Catucci et al. [79] en familias italianas con CM, no mostraron asociación del rs895819 con riesgo de CM. En población China, Zhang et al. [80], informaron que, en CM esporádico, solo en mujeres jóvenes (<48 años) portadoras del alelo G (A/G+G/G) se observó reducción significativa del riesgo de CM (OR=0.5 [95% IC 0.3–0.8] $p=0.01$). En población iraní, los estudios de Mashayekhi et al. [81] y Parchami-Barjui et al. [82] determinaron que el alelo G del rs895819 disminuye el riesgo de desarrollar CM sugiriendo que este SNP podría tener un efecto protector para el desarrollo de CM. En población chilena, Morales et al. [70], mostraron que el genotipo G/G del rs895819:A>G (pre-miR-27a) reduce el riesgo de CM en casos *BRCA1/2*-negativos pertenecientes a familias con moderada historia familiar de CM.

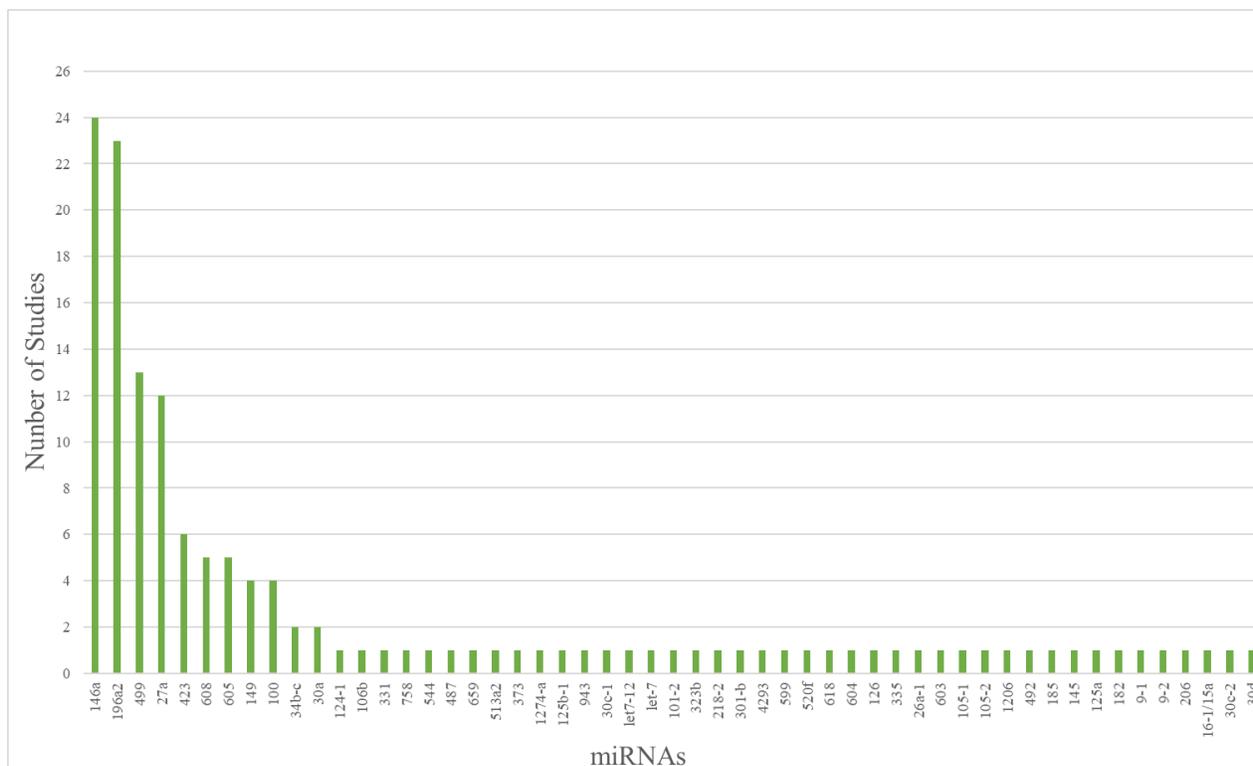


Figura 6. Número de estudios de asociación realizados en miRNAs (extraído de Arancibia, T. 2021 [77]).

3.5.6. miRNA-182 (rs4541843) y su rol en tumorogénesis mamaria

El miRNA-182 (miR-182) es uno de los tres miRNAs que pertenecen al cluster miRNA-183/96/182, el cual se ubica en 7q32.2 [83]. Varios estudios han confirmado que los miRNAs pertenecientes a este cluster muestran alteración de su expresión en algunos tipos de cánceres [84]. Específicamente, se ha observado que el miR-182 se sobreexpresa en diferentes subtipos de CM, funcionando como un miRNA oncogénico, promoviendo la proliferación y migración de las células tumorales mamarias [85]. Moskwa et al. [86], reportaron que el complejo Argonauta/miR-182 se asocia selectivamente con el transcrito BRCA1 y que el miR-182 regula negativamente la expresión de BRCA1. Por lo tanto, la sobreexpresión del miR-182 reduce los niveles de la proteína BRCA1 disminuyendo la eficiencia del proceso de RH, el cual está involucrado en la reparación de fracturas de doble hebra del DNA. Krishnan et al. [87], experimentalmente validaron que el miR-182 interrumpe el proceso de RH, ya que se une a varios mRNAs blancos que codifican para proteínas de esta vía.

El rs4541843:C>T se localiza muy cerca del pre-miR-182, específicamente en la región del pri-miR-182. El estudio de Mansouri et al. [88], evaluó la asociación entre el rs4541843:C>T y el riesgo de CM en población iraní, informando que el alelo T del rs4541843 disminuye el riesgo de desarrollar CM (OR=0.5, $p=0.01$). Los autores también indicaron que el rs4541843 podría influir en el procesamiento del miR-182 maduro al afectar el sitio de corte de la enzima Drosha. Este estudio es el segundo que ha evaluado la asociación del rs4541843:C>T con una patología humana.

A la fecha, en el mundo y en Chile, el 70% de las familias con CM son *BRCA1/2*-negativas, los genes de susceptibilidad conocidos solo explican el 50% de los casos de CM *BRCA1/2*-negativos. Se ha planteado que parte del 50% restante podrían ser consecuencia de la desregulación génica producto de la variabilidad genética existente en los miRNAs que regulan genes esenciales para el desarrollo de CM. Considerando la información precedente, en esta tesis se evaluará: 1) la asociación del rs4541843 (pri-miR-182) con CM familiar y con CM esporádico con diagnóstico temprano, en pacientes chilenos con CM y negativos para mutaciones en los genes *BRCA1/2*; y 2) el posible rol funcional en la tumorigénesis mamaria de los SNPs en miRNAs rs6505162 (pre-miR-423), rs895819 (pre-miR-27a) y rs4541843 (pri-miR-182).

Los resultados de esta tesis podrían permitir: a) Establecer si el rs4541843 se asocia con riesgo de CM en pacientes chilenas *BRCA1/2*-negativo, y b) determinar si las variantes genéticas rs6505162, rs895819 y rs4541843 podrían desregular la expresión de los miRNAs maduros e inducir tumorigénesis. La validación del rol funcional de un SNP específico en un miRNA específico asociado con riesgo de CM familiar, permitiría evaluar su uso como marcador diagnóstico o de pronóstico.

4. HIPOTESIS

En población chilena, el SNP rs4541843 (pri-miR-182) se asocia con susceptibilidad al CM familiar *BRCA1/2*-negativo y los SNPs rs6505162 (pre-miR-423), rs895819 (pre-miR-27a) y rs4541843 (pri-miR-182) participan en la tumorigénesis mamaria.

5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo General 1

Determinar si el SNP rs4541843 (pri-miR-182) se asocia con riesgo de CM en pacientes con CM familiar y negativas para mutaciones en *BRCA1/2*.

Objetivos específicos para el Objetivo General 1

Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del rs4541843 en 440 casos con CM *BRCA1/2*-negativos y en 1048 controles.

Comparar estadísticamente las frecuencias alélicas y genotípicas del rs4541843 en casos y controles.

Determinar la asociación del rs4541843 con riesgo de CM en casos *BRCA1/2*-negativos.

Objetivo General 2

Determinar *in vitro* el rol de los SNPs rs6505162, rs895819 y rs4541843 en la tumorigénesis mamaria evaluando los niveles de expresión de los miRNAs, la proliferación, apoptosis, migración e invasión celular.

Objetivos específicos para el Objetivo General 2

Evaluar el efecto de los rs6505162, rs895819 y rs4541843 en los niveles de expresión del miR-423-3p, miR-423-5p, miR-27a-3p, miR-27a-5p, miR-182-3p y miR-182-5p en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A.

Determinar el efecto de los rs6505162, rs895819 y rs4541843 sobre el índice de proliferación y apoptosis en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

Determinar el efecto de los rs6505162, rs895819 y rs4541843 sobre la migración e invasión en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

6. METODOLOGÍA Y PACIENTES

6.1. Casos con CM hereditario (CMH) (Grupo A, n=440)

Los criterios de selección para los casos con CMH corresponden a los establecidos en la literatura [19, 89, 90]. Estos criterios fueron los siguientes: 1) existencia en la familia de al menos dos familiares de primer grado con CM y/o cáncer de ovario (CO) diagnosticados a cualquier edad; 2) existencia en la familia de al menos dos familiares de primer o segundo grado con CM diagnosticado antes de los 50 años; 3) existencia en la familia de al menos tres familiares de primer o segundo grado con CM con al menos uno diagnosticado antes de los 40 años; 4) existencia en la familia de al menos un familiar con CO diagnosticado antes de los 50 años y al menos un familiar con CO diagnosticado a cualquier edad; 5) existencia en la familia de al menos un familiar varón con CM diagnosticado a cualquier edad y al menos una mujer familiar diagnosticada de CM a cualquier edad; 6) existencia en la familia de al menos un familiar diagnosticado con CM antes de los 30 años; y 7) existencia en la familia de al menos un familiar con CM bilateral y otro familiar de primer o segundo grado con CM.

6.2. Controles (Grupo B, n=1048)

Este grupo incluyó individuos sanos sin antecedentes familiares de CM. Los controles fueron emparejados con los casos por edad, sexo y residencia.

6.3. Fuente de obtención de muestras

Los pacientes con CMH (Grupo A) fueron seleccionados por el grupo de la Dra. Lilian Jara desde los registros de las clínicas públicas y privadas del Área Metropolitana. Todos los pacientes tenían diagnóstico y estudio histológico confirmado. Los pacientes seleccionados fueron contactados por teléfono e invitados a conocer los objetivos del estudio, los beneficios potenciales, los procedimientos involucrados y las implicaciones del estudio genético. A los pacientes incluidos en el estudio, se les solicitó: a) completar un cuestionario que incluyó preguntas sobre su historial médico y reproductivo, etnia y factores de riesgo (Anexos); b) firmar un formulario

de consentimiento informado en el que se detallan todos los procedimientos del estudio (Anexos), y c) donar una muestra de sangre periférica. Con los datos obtenidos del cuestionario, se reconstruyó la genealogía de las familias.

Los individuos del grupo control (Grupo B) fueron reclutados de diferentes fuentes a las cuales tienen acceso las mujeres que cumplían con los criterios de inclusión. Los individuos del grupo control también completaron un cuestionario y firmaron el formulario de consentimiento informado (Anexos).

Los participantes del estudio fueron informados de que podían conocer los resultados de la prueba genética cuando correspondiera solicitándola al investigador responsable del proyecto. Toda la información recopilada se ha mantenido en absoluta confidencialidad en el laboratorio. Este trabajo de Tesis forma parte del proyecto FONDECYT vigente N°1200049 el cual fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Comité de Ética de la Investigación en Humanos) (Anexos).

6.4. Validación de los tamaños muestrales

Con el objetivo de aumentar el poder estadístico ($1-\beta$) para las pruebas aplicadas, se utilizó un tamaño muestral de 400 casos para el grupo A y de 1000 para el grupo B, a lo menos 2 controles por caso. El tamaño muestral se validó utilizando el programa Quanto 1.2 [91], el cual fue diseñado para determinar el tamaño muestral requerido para estudios de asociación.

6.5. Extracción de DNA

Cada participante donó 10 mL de sangre periférica, la cual fue recolectada en un vacutainer con EDTA como anticoagulante. El DNA fue extraído mediante técnicas estándar [92]. Se determinó la concentración del DNA obtenido y el grado de pureza mediante absorbancia a 280/260 nm en un equipo de cuantificación Nanodrop.

6.6. *Detección de mutaciones puntuales en las secuencias codificantes completas de los genes BRCA1 y BRCA2*

La presencia de mutaciones puntuales en todos los exones y regiones adyacentes de los genes *BRCA1/2* se realizó mediante secuenciación de SANGER. El grupo de la Dra. Lilian Jara posee en sus registros 650 muestras de pacientes con CM que fueron analizadas para la detección de mutaciones puntuales en los genes *BRCA1/2*. De estas 650 muestras, 500 fueron negativas para mutaciones en *BRCA1/2* y fueron seleccionadas para el estudio de otros genes de susceptibilidad.

6.7. *Genotipificación del SNP rs4541843 pri-miR-182*

Para genotipificar el SNP rs4541843 (pri-miR-182), en casos (n=440) y controles (n=1048), se diseñó un ensayo TaqMan (Applied Biosystem, Foster City, CA), lo cual fue parte de la Tesis Doctoral del Dr. Tomás de Mayo. Este ensayo TaqMan personalizado, fue diseñado para amplificar específicamente la región del rs4541843 ubicado en el pri-miR-182 y el diseño se envió a la empresa Thermo Fisher para su fabricación. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 µl conteniendo 5 ng de ADN genómico, 1X de *TaqMan Genotyping Master Mix* y 1X de *TaqMan SNP Genotyping Assay* y se llevó a cabo en un equipo de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los ciclos de amplificación fueron iniciados con 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos, cada uno de: 92°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. Cada ciclo de genotipado incluyó DNA control de los genotipos homocigotos CC y TT confirmados por secuenciación de Sanger. Los alelos fueron asignados utilizando el software StepOne V2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Como control de calidad se repitió la genotipificación en ~10% de las muestras.

6.8. *Líneas celulares*

La línea celular epitelial no tumoral de mama (MCF-10A) y las líneas celulares de CM (MCF-7 y MDA-MB-231) se adquirieron en la *American Type Culture Collection* (Manassas, EE.

UU.). La línea celular MCF-10A es una línea no tumorigénica y es el modelo de células mamarias normales más comúnmente utilizado. La línea celular MCF-7 es RE +, PR + y HER2 -, por lo tanto, se puede clasificar como subtipo luminal A. La línea celular MDA-MB-231 es una línea triple negativa, es decir, RE -, RP - y HER2 -. Además, ambas líneas celulares de CM son negativas para mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Las células MCF-10A se cultivaron en *Dulbecco's minimal essential medium* F-12 (DMEM/F-12) suplementado con suero de caballo al 5% (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron sembradas en DMEM con alto contenido de glucosa y suplementado con suero fetal de bovino al 10% (SFB Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada y con una concentración de CO₂ al 5%. Las células fueron recolectadas cuando alcanzaron una confluencia del 70-80% para su uso en experimentos posteriores.

6.9. Construcción de los vectores de expresión

Se diseñaron 3 pares de partidores, para la amplificación por PCR convencional de los pre-miR-423, pre-miR-27a y pri-miR-182 (Tabla 3) a partir de DNA genómico extraído de pacientes homocigotos CC y AA para el rs6505162, AA y GG para el rs895819, y CC y TT para el rs4541843. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1%, desde los cuales las bandas correspondientes a cada miRNA fueron cortadas y purificadas utilizando el kit de purificación *Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo* (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Cada amplificado fue insertado en el vector de expresión pcDNA3.3 TOPO-TA (Figura 7) utilizando el kit *pcDNATM3.3-TOPO® TA Cloning* (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para lo anterior, se prepararon tres mezclas de transformación con los siguientes reactivos: 4 µl de cada producto de PCR, 1 µl de solución salina y 1 µl de vector TOPO®. Cada mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Para la reacción de transformación, se añadieron 2 µl de cada mezcla de transformación a un shot de bacterias *E. coli* quimiocompetentes suministradas en el kit, y luego estas fueron sometidas a un golpe de calor por 30 sec a 42°C. Una vez realizado el golpe de calor, las bacterias fueron inmediatamente transferidas a un recipiente con hielo. Posteriormente, se añadieron 250 µl de medio S.O.C, a temperatura ambiente, a cada shot de bacterias y se incubaron

en agitación por 1 h a 37°C. Finalmente, se sembraron 4 placas de agar LB suplementado con 1x de ampicilina, cada una con 4 volúmenes diferentes (10 µl, 20 µl, 30 µl y 40 µl) de bacterias transformadas y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las placas en las cuales crecieron colonias bacterianas, fueron seleccionadas y amplificadas en medio LB líquido suplementando con 1x de ampicilina en un matraz de 200 ml durante toda la noche para su posterior extracción con el kit midiprep *NucleoBond™ Xtra Midi Plus* (Macherey-Nagel, Duren, Germany). La correcta inserción de los pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G, pri-miR-182-C y pri-miR-182-T en el vector de expresión se confirmó mediante secuenciación de SANGER.

Tabla 3. Partidores para la amplificación de los pre- y pri-miRNA

	Hebra	Secuencia	Tamaño producto de PCR
Pre-miR-423	Sentido	5'-CCGAAGTTTGTAGGGAGAAACT-3'	195 pb
	Antisentido	3'-CCCTCTAAGGAAGCCAGGAA-5'	
Pre-miR-27a	Sentido	5'-AGCTCTGCCACCGAGGAT-3'	300 pb
	Antisentido	3'-CAAGGCCAGAGGAGGTGAG-5'	
Pri-miR-182	Sentido	5'-CCTGCAGGAAGGACCTTGT-3'	336 pb
	Antisentido	3'-ATGCAGGGAAACACAGAGTG-5'	

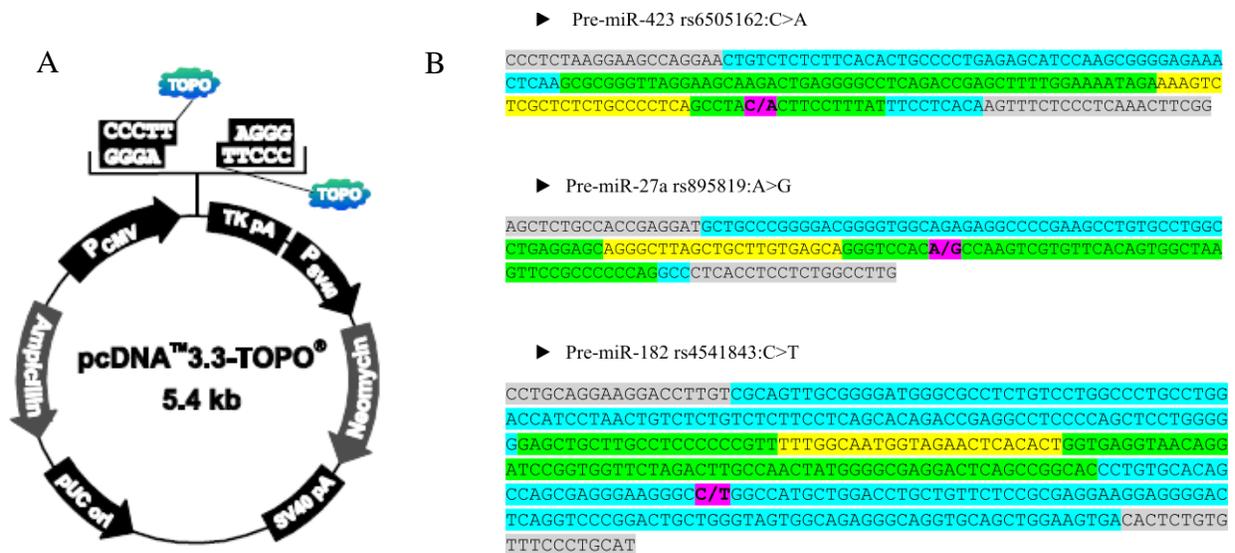


Figura 7. Esquema del vector pcDNA 3.3-TOPO y secuencias insertadas en el vector de expresión. (A) El vector posee un promotor fuerte de citomegalovirus (P_{CMV}), un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección para clonación y un gen de resistencia para neomicina como marcador de selección para transfección estable. (B) Las tres secuencias insertadas en el vector se muestra de acuerdo a los colores: secuencia de unión de primers (gris), secuencias flanqueantes (cian), pre-miRNA (verde), miRNA maduro (amarillo) y posición del SNP (lila).

6.10. Transfección de los vectores de expresión recombinantes

Para la transfección de los vectores de expresión recombinantes, las líneas celulares MCF-10A, MCF-7 y MDA-MB-231 se sembraron 3×10^6 células de cada línea celular en placas de 60 mm y se incubaron durante toda la noche a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . Finalizada la incubación, para cada línea celular se prepararon 7 mezclas de transfección conteniendo 1,5 ug (15 μl) de cada vector de expresión recombinante (pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G, pri-miR-182-C y pri-miR-182-T o vector vacío), 4 μl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), y 181 μl de medio de cultivo optimem (Invitrogen), el cual facilita la transfección celular. Cada mezcla de transfección fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, las células fueron lavadas con 2 veces con PBS 1x y el medio de cultivo fue reemplazado por 3 ml de DMEM sin SFB, A cada una de las placas de células sembradas se le añadieron 200 μl de cada mezcla de transfección y 3 ml medio de cultivo se incubaron con a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 durante 6 h. Posterior al tiempo de incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x y se incubaron con 3 ml de medio de cultivo DMEM con SFB durante 48 h. Posteriormente, las células transfectadas fueron tratadas durante tres semanas con Neomicina G418 (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), para seleccionar las células que mantienen el plásmido el cual contiene un gen de resistencia a este antibiótico. Luego de este tiempo las células que sobrevivieron se consideraron células estables. Se generaron siete grupos de poblaciones de células estables para cada línea celular que corresponden a las siguiente: pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G, pri-miR-182-C, pri-miR-182-T y vector vacío.

6.11. Extracción de RNAs pequeños

A partir de las células de CM y de las células normales transfectadas, se extrajeron los RNAs pequeños totales utilizando el kit mirVana (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las células transfectadas estables fueron lisadas con 400 μl de buffer de lisis suministrado en el kit y luego se añadió 1/10 de volumen de solución aditiva homogenizada. El

lisado se incubó durante 10 min en hielo y posteriormente se añadieron 400 µl de fenol:cloroformo. La solución final se homogenizó vigorosamente en un vortex durante 1 min y se centrifugó por 5 min a 10.000 x g. Se extrajo la fase acuosa (fase en la que se encuentra el RNA) y se agregó 1/3 de volumen de etanol, posteriormente la mezcla se cargó en una primera columna con un filtro de fibra de vidrio obteniéndose un eluido que contenía los RNAs totales. Para enriquecer la fracción de RNAs pequeños (<200 pb) dentro del cual se encuentran los miRNAs, se agregaron 2/3 de volumen de etanol y se realizó una segunda filtración en una columna con filtro de vidrio. La concentración de RNA se determinó utilizando NanoDrop y la fracción de elución conteniendo los RNAs pequeños se almacenó a -80°C.

6.12. Transcripción Reversa

La transcripción reversa de los RNAs pequeños a DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando el kit *TaqMan microRNA Reverse-Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Se preparó una solución de master mix la que contiene para una reacción: 0,15 µl de dNTPs 100mM; 1,00 µl de transcriptasa reversa Multiscribe®; 1,50 µl buffer 10X; 0,19 µl inhibidor de RNasa y 4,16 µl de agua libre de nucleasa, la cual se mantuvo en hielo hasta la preparación de la solución de reacción final. Para cada mezcla de reacción de transcripción reversa se utilizó 5 µl de RNAs pequeños a una concentración total de 10 ng, 7 µl de master mix y 3 µl de primers incluidos en el kit *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) para las hebras 3p y 5p de los miR-423, miR-27a y miR-182. La reacción de transcripción reversa se realizó en un termociclador Veriti aplicando el siguiente protocolo: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C y 10 min a 4°C. El cDNA obtenido a partir de los miRNAs en estudio se almacenó a -20°C.

6.13. Análisis de expresión de los miR-423, miR-27a y miR-182 por qPCR

Para determinar los niveles de expresión de las hebras 3p y 5p de los miR-423, miR-27a, y miR-182, se utilizaron ensayos de microRNA TaqMan específicos para cada miRNAs adquiridos a Applied Biosystems. Se preparó una solución de mastermix para las hebras 3p y 5p de los miRNAs en estudio. El mastermix incluyó 10 µl de TaqMan® Universal Master Mix II, sin UNG, 7.67 µl de agua libre de nucleasa, 1.0 µl de sonda TaqMan incluida en el kit *TaqMan® MicroRNA*

Assay y 1.33 μ l de cDNA. La qPCR se realizó en un equipo de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) siguiendo el siguiente protocolo: 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Como control endógeno se utilizó el RNA pequeño U6 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los niveles de expresión de miRNAs se midieron en función del ciclo umbral (Ct) y los niveles de expresión relativa se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [93]. Todas las reacciones se llevaron a cabo en triplicado

6.14. Ensayo de proliferación celular

Para evaluar el efecto de los SNPs rs6505162:C>A, rs895819:A>G y rs4541843:C>T sobre la proliferación de líneas celulares de CM, se utilizó el kit *CFSE Cell Division Tracker* (BioLegend Way, San Diego, CA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas estables con los vectores de expresión recombinantes pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G, pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o vector vacío, se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo DMEM, se colocaron 10 μ l en una placa de conteo y se contaron en un contador automatizado TC20 (BIORAD). Luego, 1×10^6 células se marcaron con carbocifluoresceína (CFSE) a una concentración de 5 μ M y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min. Para detener la reacción de marcaje, se añadieron 5 volúmenes de DMEM frío. Las células marcadas se plaquearon a una densidad de 1×10^5 en placas de multipocillo y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 24 y 48 h. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo BD FACSVersé™ (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.). El índice de proliferación se analizó utilizando el software FlowJo V.10.1 (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.). El programa calcula el índice de proliferación sumando las células de todas las generaciones, dividida por el número calculado de células parentales originales. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

6.15. Ensayo de viabilidad y quimioresistencia

Para determinar el efecto de los SNPs rs6505162:C>A, rs895819:A>G y rs4541843:C>T sobre la viabilidad y quimioresistencia de células de CM, se realizó ensayo de MTS utilizando el kit

CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Clones de células estables de MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los vectores pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G, pri-miR-182-C, pri-miR-182-T y vector vacío se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo DMEM, se colocaron 10 µl en una placa de conteo y se contaron en un contador automatizado TC20 (BIORAD). Luego, 5×10^4 células se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron por 24 h. Finalizada la incubación, se agregaron diferentes concentraciones de cisplatino (0, 40 y 80 µM) y las células se cultivaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Posteriormente, se añadieron 100 µl de reactivo de MTS a cada pocillo y se incubó durante 4 h. Finalizada la incubación, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (BioTek Instrument, Inc, Winooski, VT, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

6.16. Análisis de apoptosis

La apoptosis celular fue evaluada midiendo la actividad de caspasas 3/7 utilizando el kit *Caspase-Glo 3/7 Assay System* (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se sembraron clones de células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas estables con los vectores pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G, pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o vector vacío, se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo DMEM, se colocaron 10 µl en una cámara de conteo y se contaron en un contador de células automatizado TC20 (BIORAD). Luego, 1×10^4 células se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche a 37°C en una incubadora humidificada conteniendo 5% de CO₂. Posteriormente, para inducir apoptosis, a cada pocillo se agregó una concentración de 0 o 100 µg/ml de cisplatino y las células se incubaron durante 24 y 48 h a 37°C en una incubadora humidificada conteniendo 5% de CO₂. Una vez finalizada la incubación, a cada pocillo se le añadió 100 µl de reactivo Caspase-Glo 3/7 (Promega Corporation) y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente con agitación suave. Para medir la actividad de caspasas 3/7, se midió luminiscencia en un lector de placas (BioTek Instrument, Inc, Winooski, VT, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron tres veces por triplicado.

6.16. Ensayo de invasión y migración

Para determinar el impacto de los SNPs rs6505162:C>A, rs895819:A>G y rs4541843:C>T sobre la invasión y migración de líneas celulares de CM, se realizaron ensayos de invasión y migración celular en placas Transwell de 24 pocillos. Para el ensayo de invasión, la cámara superior de los pocillos Transwells fue recubierta con 100 μ l de Matrigel (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a una concentración de 20 μ g/ml. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 estables transfectadas con los vectores pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G, pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o vector vacío se resuspendieron en 200 μ l de medio de cultivo sin SFB y 1×10^5 células se sembraron en la cámara superior de los pocillos Transwell. Luego, se añadieron 700 μ l de medio de cultivo suplementado con SFB al 10% a la cámara inferior de cada pocillo. Las células se incubaron durante 12 a 16 h a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo CO₂ al 5%. Finalizado la incubación, las células restantes de la cámara superior (no migratorias) se retiraron con un hisopo de algodón y las células de la cámara inferior se tiñeron con cristal violeta al 0,1% mezclado con metanol al 20% durante 1 h a temperatura ambiente. Las células invasivas y migratorias se contaron bajo microscopía óptica a un aumento de 40 X en diez campos seleccionados al azar. Como control se utilizaron células de CM transfectadas con el vector vacío. Todos los experimentos se realizaron en triplicado.

6.17. Análisis estadístico

El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó para la población control utilizando la prueba de chi-cuadrado (función HW Chisq, paquete “HardyWeinberg” v1.4.1). Para establecer la asociación entre el grupo de casos y controles, se utilizó test exacto de Fisher y para estimar la fuerza de asociación se calcularon los *Odds ratios* (OR) con un 95% de confianza (IC). Para calcular los *Odds ratios* y el test exacto de Fisher se utilizó el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.). Los análisis estadísticos para los estudios funcionales también se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism. Los datos se encuentran presentados como promedio \pm DE y graficados mediante diagramas de caja. Se aplicó prueba de ANOVA unidireccional o bidireccional para analizar las diferencias significativas entre grupos. Se consideró que un valor de $p < 0,05$ indica diferencias estadísticamente significativas.

7. RESULTADOS

OBJETIVO GENERAL 1: Determinar si el SNP rs4541843 (pri-miRNA-182) se asocia con riesgo de CM en pacientes con CM familiar negativas para mutaciones en los genes *BRCA1/2*.

7.1. Características de las familias incluidas en este estudio.

La Tabla 4 muestra las características de las familias incluidas en este estudio de acuerdo a los criterios de inclusión. Todas las familias auto-reportaron tener ancestría chilena desde varias generaciones atrás, la que fue confirmada en las entrevistas sostenidas con varios miembros de la familia. Del total de las familias, el 16% (70/440) presentaron CM bilateral, 9% (40/440) correspondieron a casos con CM y CO, y 1.1% (5/440) correspondieron a familias en las cuales había casos de CM varón. El promedio de edad de diagnóstico para los casos de CM fue de 42.1 años y el 75.2% de los casos presentaron diagnóstico temprano a edades menores o iguales 50 años.

Tabla 4. Características de las familias de acuerdo a los criterios de inclusión

Criterios de Inclusión	Número de Familias (%)
Tres o más miembros de la familia con CM y/o CO	121 (27.5%)
Dos miembros de la familia con CM y/o CO	148 (33.6%)
Un afectado con CM y diagnóstico temprano (≤ 35 años)	87 (19.8%)
Un afectado con CM y diagnóstico entre 36 a 50 años	84 (19.1%)
TOTAL	440 (100%)

CM: Cáncer de mama; **CO:** Cáncer de ovario

7.2. Estudio de asociación entre el rs4541843:C>T y riesgo de cáncer de mama.

En el marco de la Tesis Doctoral del Dr. Tomás de Mayo (2018) realizada en el laboratorio de la Dra. Lilian Jara, se detectó el rs4541843:C>T ubicado en el pri-miR-182 a través de secuenciación de SANGER de 100 casos con CM pertenecientes a familias 3 o más casos de CM. Este SNP se localiza específicamente en la posición 138 río abajo respecto del extremo 5' del pre-miR-182.

Para el estudio de asociación, la muestra de casos de CM fue subdivida en 2 subgrupos, individuos pertenecientes a familias con 2 o más miembros con CM y/o CO (n=269) (subgrupo A), e individuos sin historia familiar de CM y/o CO, pero con diagnóstico temprano de CM (\leq a 50 años) (n=171) (subgrupo B). El subgrupo A excluye los casos del subgrupo B.

Los resultados del estudio de asociación, mostraron que al comparar el grupo completo de casos de CM o el subgrupo B con los controles, no se observaron diferencias significativas en la distribución alélica ni en la distribución genotípica ($p > 0.05$). Sin embargo, en los casos con CM familiar (subgrupo A), el alelo T (MAF), presentó mayor frecuencia en los casos (0.46) que en los controles (0.41) siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.01$) (Tabla 5). Además, en el subgrupo A los homocigotos T/T y los portadores del alelo T (C/T + T/T) presentaron un aumento significativo del riesgo de CM (OR=1.5 [95% IC 1.0-2.2] $p = 0.03$ y OR=1.2 [95% IC 1.0-1.5] $p = 0.01$, respectivamente) (Tabla 5). Cuando se analizó el efecto del alelo T de acuerdo al número de casos de CM en la familia, no se observó asociación entre el rs4541843 y el riesgo de CM (Tabla 6). Tampoco se observó asociación entre el SNP rs4541843 y riesgo de CM en casos con edad de diagnóstico temprano (\leq a 50 años) (Tabla 6). Los resultados obtenidos permiten concluir que el alelo T se asocia con un aumento del riesgo de CM y que los homocigotos T/T y portadores del alelo T (C/T + T/T) aumentan el riesgo de CM en los casos con CM familiar. Es importante destacar que este es el primer estudio de asociación realizado entre el SNP rs4541843:C>T y riesgo de una enfermedad humana.

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs4541843 en casos *BRCA1/2* negativo y en controles.

Genotipos y alelos	Controles (%) (n=1048)	Casos de CM totales (n=440)			Casos familiares con ≥ 2 CM y/o CO (n=269)			Un solo caso de CM con diagnóstico temprano ≤ 50 años (n=171)		
		Casos CM (%)	pvalue ^a	OR [95% IC]	Casos CM (%)	Pvalue ^a	OR [95% IC]	Casos CM (%)	pvalue ^a	OR [95% IC]
rs4541843 (Pri-miR-182)										
C/C	386 (37%)	150 (34%)	-	1.0 (Ref)	81 (30%)	-	1.0 (ref)	69 (40%)	-	1.0 Ref
C/T	473 (45%)	205 (47%)	0.4	1.1 [0.8-1.4]	127 (47%)	0.1	1.2 [0.9-1.7]	78 (46%)	0.6	0.9 [0.6-1.3]
T/T	189 (18%)	85 (19%)	0.4	1.5 [0.8-1.5]	61 (23%)	0.03	1.5 [1.0-2.2]	24 (14%)	0.1	0.7 [0.4-1.1]
C/T+T/T	662 (63%)	290 (66%)	0.3	1.1 [0.8-1.4]	188 (70%)	0.04	1.3 [1.0-1.8]	102 (60%)	0.3	0.8 [0.6-1.1]
Alelo C	1245 (0.59)	505 (0.57)	-	1.0 (Ref)	289 (0.54)	-	1.0 (ref)	216 (0.63)	-	1.0 (Ref)
Alelo T	851 (0.41)	375 (0.42)	0.3	1.0 [0.9-1.2]	249 (0.46)	0.01	1.2 [1.0-1.5]	126 (0.37)	0.2	0.8 [0.6-1.0]

CM Cáncer de mama, CO Cáncer de Ovario, OR odds ratio, IC Intervalo de confianza; ^aTest exacto de Fisher's; Valores en negrilla son estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$).

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs4541843 de acuerdo al número de miembros de la familia con CM *BRCA1/2* negativo y en controles

Genotipos y alelos	Controles (%) (n=1048)	Familias con 2 casos de CM y/o OC (n=148)			Familias con ≥ 3 CM y/o CO (n=121)		
		Casos CM (%)	pvalue ^a	OR [95% IC]	Casos CM (%)	pvalue ^a	OR [95% IC]
rs4541843 (Pri-miR-182)							
C/C	386 (%)	45 (30%)	-	1.0 (Ref)	36 (30%)	-	1.0 (Ref)
C/T	473 (%)	70 (47%)	0.2	1.2 [0.8-1.8]	57 (47%)	0.2	1.2 [0.8-1.9]
T/T	189 (%)	33 (22%)	0.1	1.4 [0.8-2.4]	28 (23%)	0.09	1.5 [0.9-2.6]
C/T+T/T	662 (%)	103 (69%)	0.1	1.3 [0.9-1.9]	85 (70%)	0.1	1.3 [0.9-2.0]
Alelo C	1245 (0.59)	160 (0.54)	-	1.0 (Ref)	129 (0.53)	-	1.0 (Ref)
Alelo T	851 (0.41)	136 (0.46)	0.09	1.8 [1.4-2.3]	113 (0.47)	0.07	1.2 [0.9-1.6]

CM Cáncer de mama, CO Cáncer de Ovario, OR odds ratio, IC Intervalo de confianza; ^aTest exacto de Fisher's; Valores en negrilla son estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$).

OBJETIVO GENERAL 2: Determinar *in vitro* el rol de los SNPs rs6505162, rs895819 y rs4541843 en la tumorigénesis mamaria evaluando los niveles de expresión de los miRNAs, proliferación, apoptosis, migración e invasión celular.

7.3. Rol del rs6505162 (pre-miR-423) en la tumorigénesis mamaria

7.3.1. El miR-423 se sobreexpresa en presencia del alelo A del rs6505162 en líneas celulares de cáncer de mama

En un artículo previamente publicado por el grupo de la Dra. Jara [70], se determinó que el alelo A (MAF) del rs6505162:C>A ubicado en el pre-miR-423 aumentaba el riesgo de CM familiar. Para validar el resultado del estudio de asociación obtenido era necesario realizar estudios funcionales. En consecuencia, en esta tesis, se propuso evaluar el efecto del rs6505162:C>A sobre la expresión de las hebras 3p y 5p del miR-423 maduro en la línea celular de epitelio mamario normal (MCF-10A) y en las líneas celulares de CM MCF-7 y MDA-MB-231. La Figura 8A muestra que en la línea celular MCF-10A, los niveles de expresión de los miR-423-3p y miR-423-5p fueron bajos y similares en las células transfectadas con los vectores pre-miR-423-C o pre-miR-423-A. En cambio, en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, los niveles de expresión de los miR-423-3p y miR-423-5p aumentaron significativamente cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-423-A con respecto a las células transfectadas con el pre-miR-423-C (Figuras 8B y 8C). Estos resultados sugieren que, en células de CM, tanto la hebra 3p como la 5p del miR-423 maduro se sobreexpresan por la presencia del alelo A del rs6505162 en el pre-miR-423.

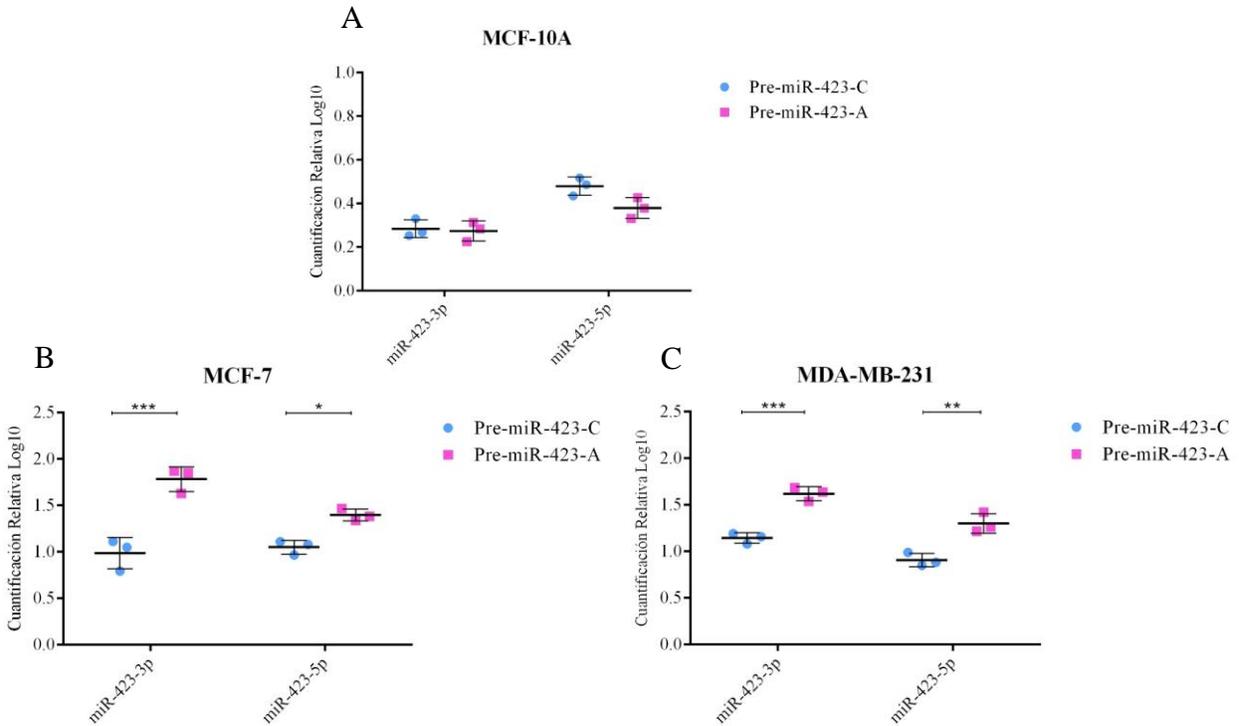


Figura 8. La expresión del miR-423 es regulada diferencialmente por el SNP rs6505162:C>A en células de mama normal y tumorales. Los niveles de expresión de los miRNAs maduros miR-423-3p y miR-423-5p fueron medidos en la línea celular de mama normal MCF-10A (A) y en las líneas celulares de CM MCF-7 (B) y MDA-MB-231 (C). Las tres líneas celulares fueron transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-423-A, pre-miR-423-C o con el vector vacío. Las veces de cambio fueron normalizadas respecto del vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DE) de tres experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001).

7.3.2. El pre-miR-423-A aumenta la proliferación de las células de cáncer de mama

Para evaluar el efecto del rs6505162:C>A sobre la proliferación celular, se utilizaron las líneas celulares de CM MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los vectores pre-miR-423-A, pre-miR-423-C o con el vector vacío. La proliferación de ambas líneas celulares transfectadas estables se evaluó utilizando el ensayo de CFSE a 24 y 48 h. La Figura 9A muestra que no hubo diferencias significativas sobre el índice de proliferación en las células MCF-7 transfectadas con el pre-miR-423-C en comparación con las células transfectadas con el vector vacío después de 24 o 48 h. Sin embargo, el índice de proliferación fue significativamente mayor cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-423-A con respecto a las células transfectadas con el pre-miR-423-C o vector vacío ya sea a 24 o 48 h. La Figura 9B muestra los resultados obtenidos en la línea celular MDA-MB-231. No se observaron diferencias significativas en el índice

de proliferación entre las células transfectadas con el pre-miR-423-A, pre-miR-423-C o con el vector vacío a las 24 h. Sin embargo, a las 48 h, las células transfectadas con el pre-miR-423-A se observó un aumento significativo del índice de proliferación con el respecto a las células transfectadas con el pre-miR-423-C o con el vector vacío ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente) (Figura 9B). Estos resultados sugieren que el pre-miR-423-A aumenta significativamente la proliferación de células de CM luminal A y triple negativo.

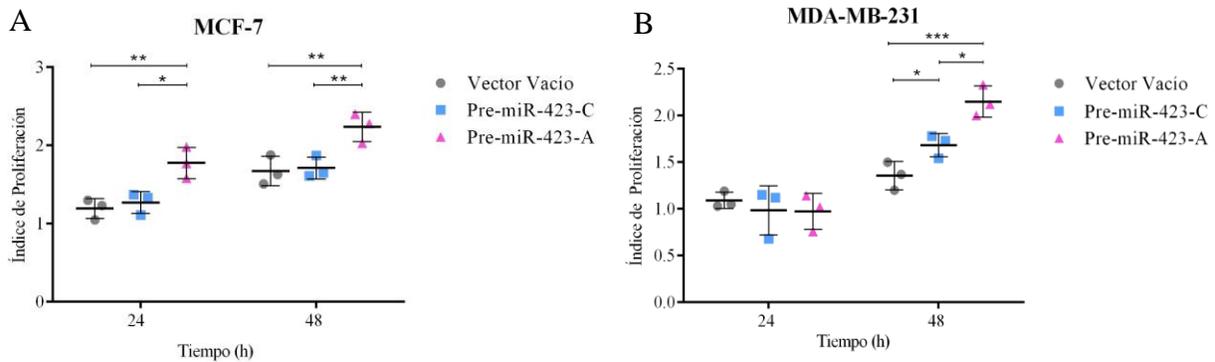


Figura 9: La proliferación celular aumenta en presencia del SNP rs6505162:C>A en células de cáncer de mama luminal A y triple negativo. El índice de proliferación se midió mediante citometría de flujo utilizando el reactivo CFSE en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-423-A, pre-miR-423-C o con el vector vacío a las 24 y 48 h. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

7.3.3. La expresión del pre-miR-423-A promueve la resistencia al cisplatino en células de cáncer de mama

La literatura ha informado que los miRNAs pueden regular la resistencia a los fármacos anti-neoplásicos [94]. Para estudiar los efectos del SNP rs6505162:C>A sobre la sensibilidad al cisplatino, se cultivaron células estables de CM MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los vectores pre-miR-423-A, pre-miR-423-C o con el vector vacío con diferentes concentraciones de cisplatino (0, 40 y 80 μ M) durante 48 h. Posteriormente, se utilizó ensayo de MTS para evaluar la sensibilidad al cisplatino. Los resultados mostraron que las células MCF-7 transfectadas con el pre-miR-423-A la viabilidad fue mayor con respecto a las células transfectadas con el pre-miR-423-C o vector vacío en ambas concentraciones de cisplatino siendo las diferencias estadísticamente significativas (Figura 10A). En la línea celular de CM triple negativa MDA-MB-231, se observó mayor resistencia al cisplatino en las células transfectadas con el pre-miR-

423-C con respecto a las transfectadas con el vector vacío a 40 y 80 μM ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente) (Figura 10B). Los resultados obtenidos son concordantes con el estudio de asociación que indicó que el alelo A del rs6505162 es un alelo de riesgo, ya que la presencia del alelo A en el pre-miR-423 mostró un aumento significativo en la viabilidad y resistencia al cisplatino.

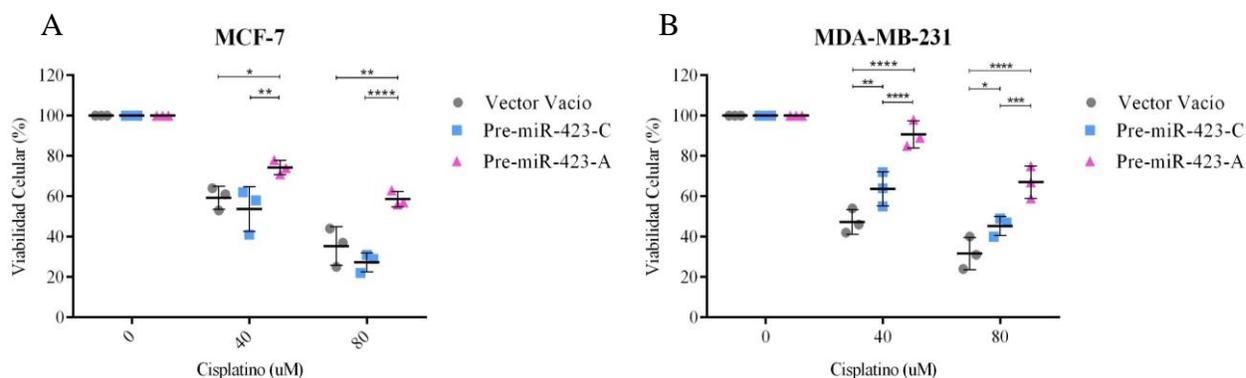


Figura 10: El SNP rs6505162:C>A modula diferencialmente la resistencia al cisplatino en las líneas celulares de cáncer de mama luminal A y triple negativa. La resistencia al cisplatino se midió mediante el ensayo de MTS) en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas estables con los vectores de expresión pre-miR-423-C, pre-miR-423-A o con el vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

7.3.4. La expresión del pre-miR-423-A disminuye la apoptosis inducida por cisplatino en las células de cáncer de mama

Para evaluar la función del SNP rs6505162:C>A en la apoptosis inducida por cisplatino, se cultivaron líneas celulares estables MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los pre-miR-423-C, pre-miR-423-A o con el vector vacío con de 100 μM de cisplatino durante 24 y 48 h. Para evaluar la apoptosis, se midió la actividad de las caspasas 3/7. Las Figuras 11A y 11B muestran una disminución significativa de la apoptosis inducida por cisplatino en células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-423-A en comparación con aquellas transfectadas con el pre-miR-423-C ($p < 0,0001$) o con el vector vacío ($p < 0,0001$) a las 48 h. Estos resultados podrían indicar que la sobreexpresión del miR-423 como consecuencia de la presencia del alelo A del rs6505162 en el pre-miR-423, inhibió la apoptosis inducida por cisplatino al disminuir la actividad de las caspasas 3/7. Los resultados obtenidos son concordantes con los resultados del

estudio de asociación publicado que indicaron que el alelo A del rs6505162:C>A es un alelo de riesgo.

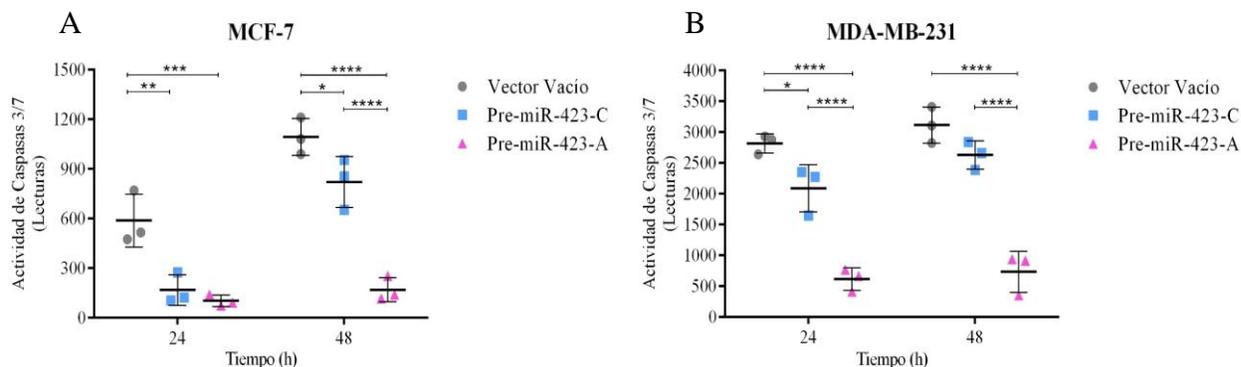


Figura 11: La expresión del pre-miR-423-A disminuye la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama luminal A y triple negativo. La apoptosis se evaluó midiendo la actividad de caspasas 3/7 en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-423-A, pre-miR-423-C o con el vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001).

7.3.5. La expresión del pre-miR-423-A aumenta la invasión y migración de células de cáncer de mama

Para evaluar el efecto de rs6505162:C>A sobre la invasión y migración de células de CM, se realizaron ensayos en placas Transwell utilizando las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-423-C, pre-miR-423-A o con el vector vacío. Las células se sembraron en placas Transwell con o sin Matrigel. Los resultados mostraron que la invasión celular fue significativamente mayor en las células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-423-A en comparación con las transfectadas con el pre-miR-423-C (p <0.01) o vector vacío (p <0.01) (Figura 12A y 12B). Respecto de la migración celular, los resultados también mostraron un aumento significativo de la migración de las células cancerosas, tanto en las células MCF-7 (Figura 13A) como en MDA-MB-231 (Figura 13B) transfectadas con el pre-miR-423-A respecto de las transfectadas con el pre-miR-423-C o con el vector vacío. No se observaron diferencias significativas en la invasión y en la migración de las células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con pre-miR-423-C respecto del vector vacío siendo las diferencias estadísticamente significativas (Figuras 12A, 12B, 13A y 13B). Por lo tanto, los resultados indican que la regulación positiva del miR-423, como resultado de la presencia del alelo A del rs6505162, aumenta la invasión y migración de células de CM de los subtipos luminales A y triple negativo.

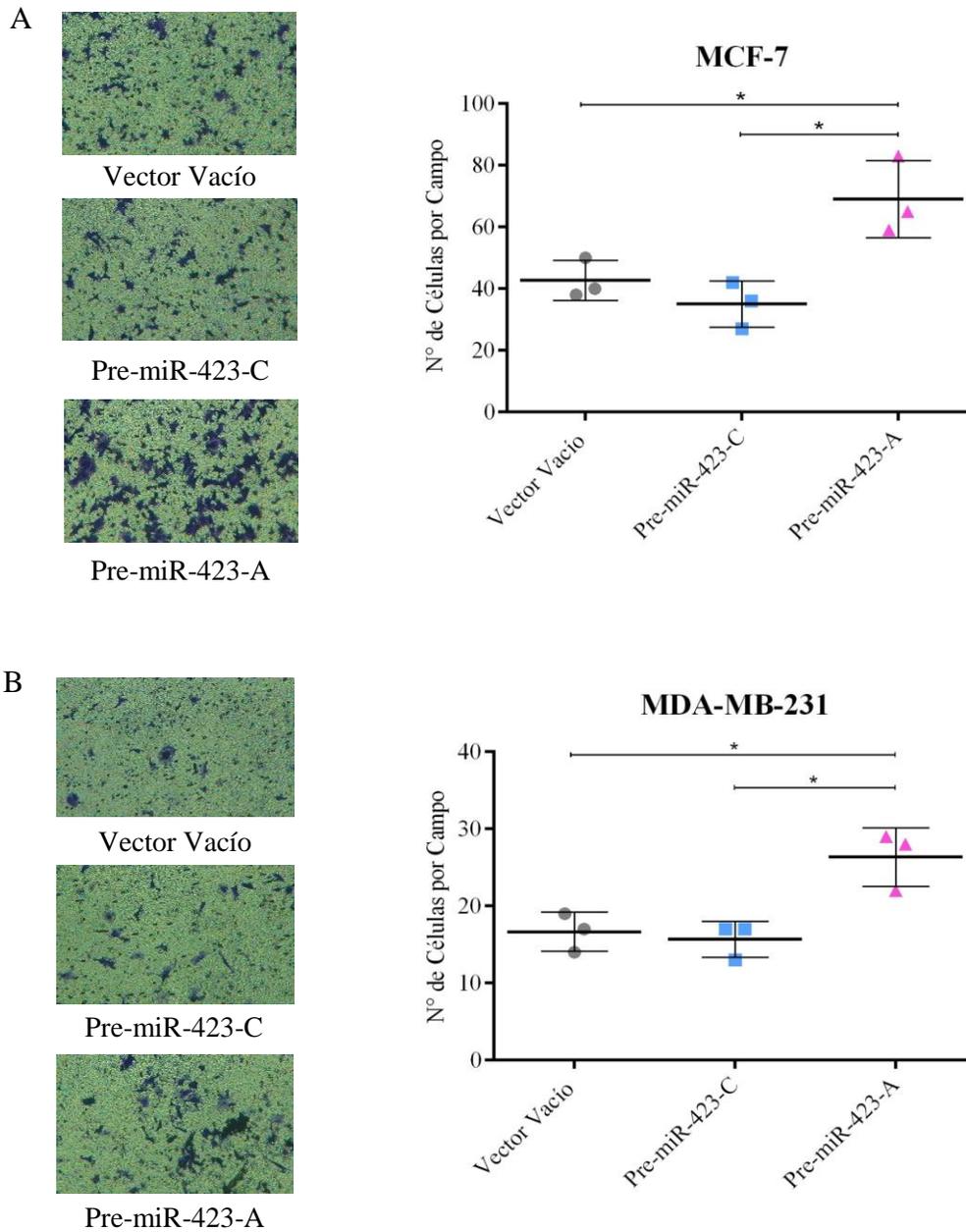


Figura 12: La expresión del SNP rs6505162 alelo A aumenta la invasión de células de CM luminal A y triple negativo. La invasión celular fue evaluada utilizando ensayo Transwell con matrigel en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-423-C, pre-miR-423-A o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes ($*p < 0.05$).

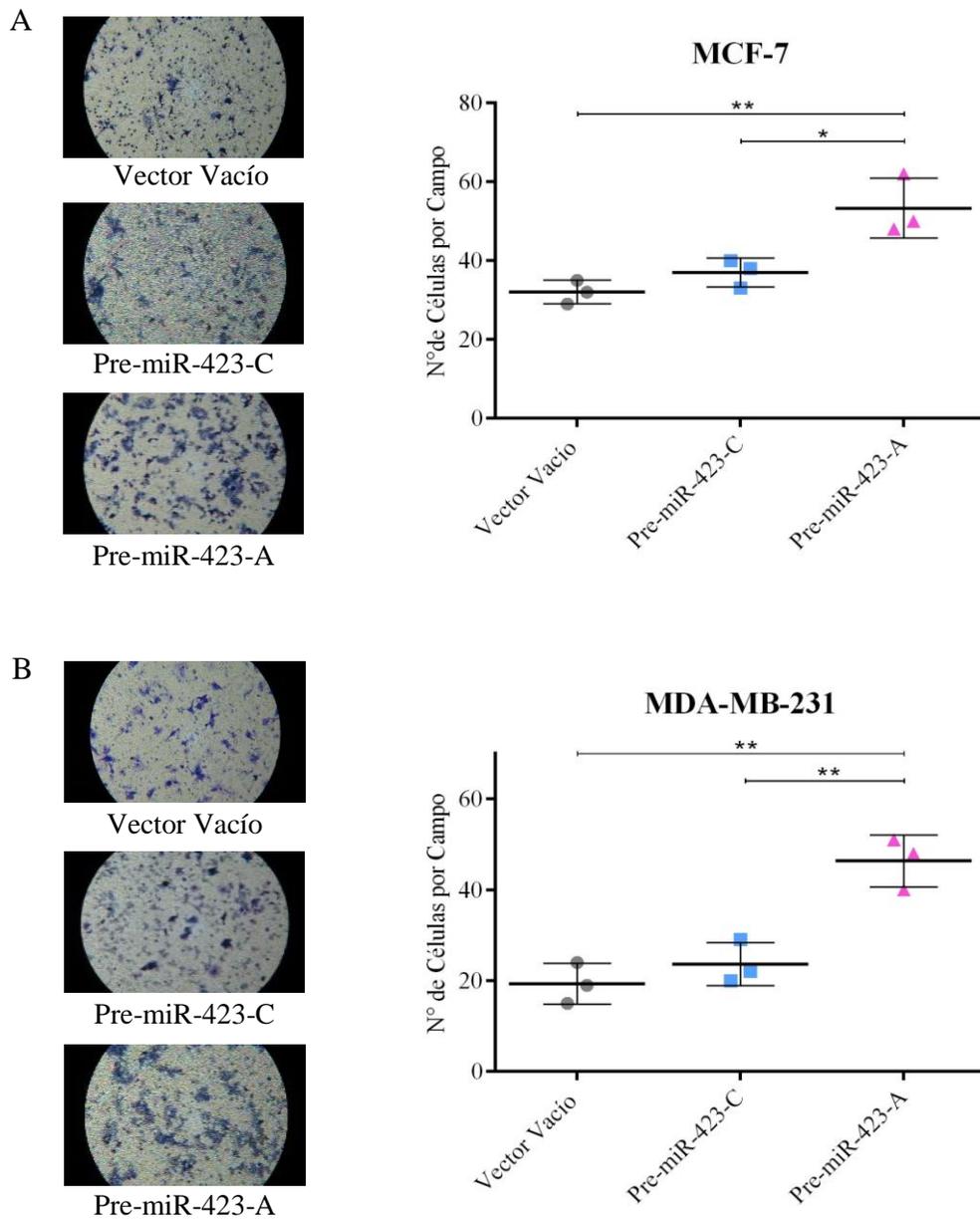


Figura 13: La expresión del SNP rs6505162 alelo A aumenta la migración de células de CM luminal A y triple negativo. La migración celular fue evaluada utilizando ensayo Transwell en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-423-C, pre-miR-423-A o con el vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01).

Tabla 7. Resumen de resultados del rs6505162:C>A (pre-miR-423) y su participación en la tumorigénesis mamaria.

rs6505162	LINEAS CELULARES											
	MCF-7				MDA-MB-231				MCF-10A			
	Alelo C		Alelo A		Alelo C		Alelo A		Alelo C		Alelo A	
Expresión	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p
Expresión	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Proliferación	-	-	↑	↑	-	-	↑	↑	-	-	-	-
Quimioresistencia	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-
Apoptosis	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	-	-	-	-
Invasión	-	-	↑	↑	-	-	↑	↑	-	-	-	-
Migración	-	-	↑	↑	-	-	↑	↑	-	-	-	-

 Desregulación positiva;
  Desregulación positiva media;
  Desregulación positiva baja;
  Desregulación negativa;
  Desregulación negativa media.

Los resultados indican que la presencia del alelo A aumentan significativamente la expresión de las hebras 5p y 3p del miR-423 en las líneas celulares de CM, y que la presencia de este alelo tendría un rol oncogénico en la tumorigénesis mamaria.

7.4. Rol del rs895819 (pre-miR-27a) en la tumorigénesis mamaria

7.4.1. La expresión del miR-27a es modulado diferencialmente por la presencia del alelo G del rs895819 en líneas celulares de cáncer de mama

En mujeres caucásicas, varios estudios han mostrado que la presencia del alelo G del rs895819 reduce el riesgo de desarrollar CM. El estudio de Morales et al. [70], mostró que en población chilena, el alelo G (MAF) del rs895819:A>G ubicado en el pre-miR-27a disminuye el riesgo de desarrollar CM familiar. De acuerdo a lo anterior, en esta tesis, se propuso evaluar el efecto del rs895819:A>G sobre la expresión de las hebras 3p y 5p del miR-27a maduro para validar los resultados de asociación obtenidos. Los resultados mostraron que en la línea celular MCF-10A, los niveles de expresión del miR-27a-3p fueron bajos y no se observaron diferencias significativas entre las células transfectadas con el pre-miR-27a-A respecto de las células transfectadas con el pre-miR-27a-G (Figura 14A). En cambio, los niveles de expresión del miR-27a-5p fueron

significativamente mayor cuando las células fueron transfectadas con el vector pre-miR-27a portador del alelo G con respecto de aquellas transfectadas con el pre-miR-27a portador del alelo A (Figura 14A). La Figura 14B muestra que en línea celular MCF-7 (luminal A) los niveles de expresión tanto del miR-27a-3p y miR-27a-5p fueron significativamente mayores cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-27a-G comparada con las células transfectadas con el pre-miR-27a-A. En cambio, en la línea celular MDA-MB-231 (triple negativa) la expresión de las hebras 3p y 5p del miR-27 maduro disminuye significativamente cuando las células fueron transfectadas con el vector pre-miR-27a-G comparadas con el pre-miR-27a-A (Figura 14C). Estos resultados sugieren que los miR-27a-3p y miR-27a-5p se sobreexpresan por la presencia del alelo G del rs895819 ubicado en el pre-miR-27a en células de CM luminal A, sin embargo, esta expresión disminuye en células de CM triple negativas cuando se encuentra el alelo G presente.

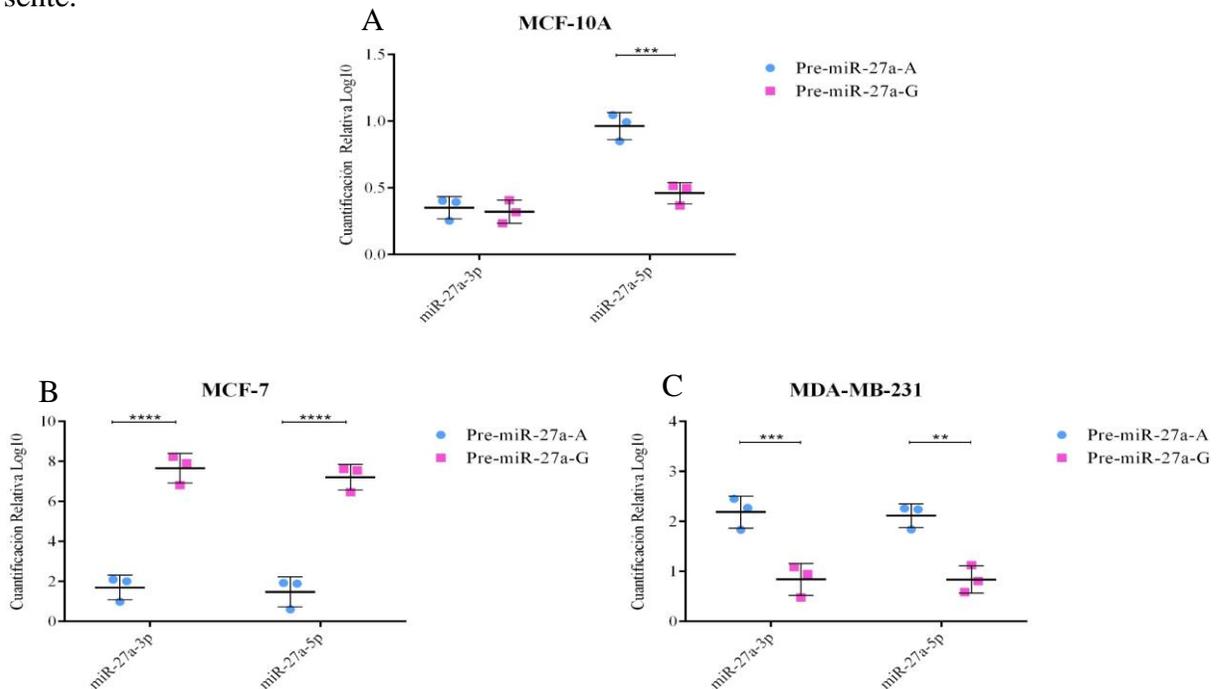


Figura 14. La expresión del miR-27a es regulada diferencialmente por el SNP rs895819:A>G en células de mama normal y tumorales. Los niveles de expresión de los miRNAs maduros miR-27a-3p y miR-27a-5p fueron medidos en la línea celular de mama normal MCF-10A (A) y en las líneas celulares de CM MCF-7 (B) y MDA-MB-231 (C). Las tres líneas celulares fueron transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o vector vacío. Las veces de cambio fueron normalizadas respecto del vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DE) de tres experimentos independientes (** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001).

7.4.2. El pre-miR-27a-G disminuye la proliferación de células de cáncer de mama triple negativo

Para evaluar el efecto del rs895819:A>G sobre la proliferación celular, se utilizaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los vectores pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o vector vacío. Los resultados mostraron que en la línea celular MCF-7, el índice de proliferación aumento significativamente en células transfectadas con el pre-miR-27a-G respecto de aquellas transfectadas con el pre-miR-27a-A ($p<0.01$) o el vector vacío ($p<0.001$) a las 48 h (Figura 15A). En cambio, la línea celular de CM triple negativa MDA-MB-231, mostró disminución de la proliferación cuando las células fueron transfectadas con el vector pre-miR-27a-G en comparación con las células transfectadas con el pre-miR-27a-A ($p<0.01$) o vector vacío ($p<0.05$) a las 48 h (Figura 15B). Estos resultados indican que el alelo G del re895819 aumenta significativamente la proliferación de células de CM subtipo luminal A. Mientras que, en células de CM triple negativas, el índice de proliferación disminuye por la presencia del alelo G del rs895819.

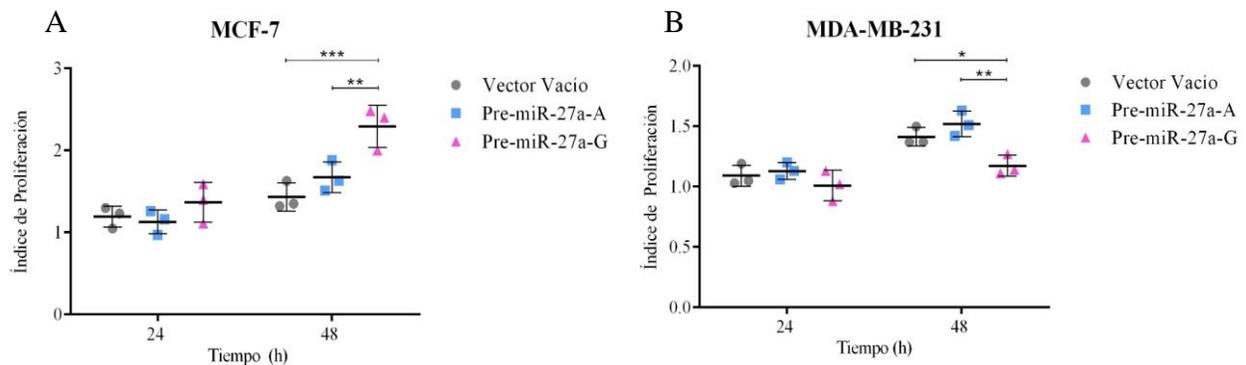


Figura 15: La proliferación celular disminuye en presencia del SNP rs895819:A>G en células de CM triple negativas. El índice de proliferación se midió mediante citometría de flujo utilizando el reactivo CFSE en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o con el vector vacío a las 24 y 48 h. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

7.4.3. La expresión del pre-miR-27a-G disminuye la resistencia al cisplatino en células de cáncer de mama triple negativo

Para evaluar el efecto del SNP rs895819:A>G sobre la sensibilidad al cisplatino, se cultivaron durante 48 h células estables de las líneas CM MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los vectores pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o con el vector vacío en medio de cultivo con diferentes concentraciones de cisplatino (0, 40 y 80 μ M). La Figura 16A muestra que la viabilidad de las células MCF-7 en presencia de cisplatino, 40 u 80 μ M, fue significativamente mayor en células transfectadas con el pre-miR-27a-A o con el pre-miR-27a-G en comparación con el vector vacío. Sin embargo, no hubo diferencias significativas al comparar las células transfectadas con el pre-mir-27a-A con aquellas transfectadas con el pre-miR-27a-G (Figura 16A). Las células MDA-MB-231 de CM triple negativo transfectadas con el pre-miR-27a-G, mostraron un efecto contrario al observado en células MCF-7. La viabilidad celular en presencia de cisplatino de las células transfectadas con el pre-miR-27a-G fue menor en comparación con las células transfectadas con el pre-miR-27a-A o con el vector vacío siendo las diferencias significativas (Figura 16B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio de asociación que indicaron que el alelo G del rs895819 tendría un efecto protector, sin embargo, este efecto solo se observa en células de CM triple negativo. Mientras que en células de CM luminal A, tanto el alelo A como alelo G del rs895819 aumentan la viabilidad y la resistencia al cisplatino.

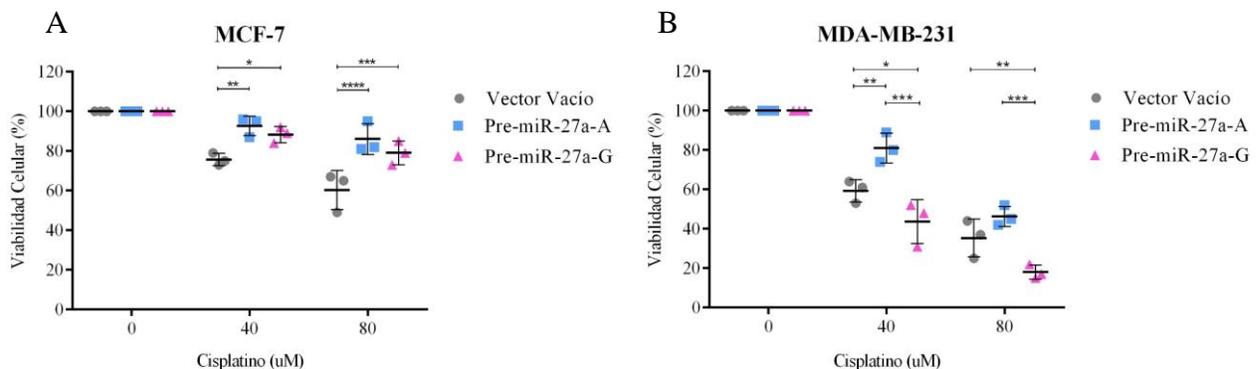


Figura 16: El SNP rs895819:A>G modula diferencialmente la resistencia al cisplatino en las líneas celulares de cáncer de mama luminal A y triple negativa. La resistencia al cisplatino se midió mediante el ensayo de MTS) en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o con el vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001).

7.4.4. La expresión del pre-miR-27a-G aumenta la apoptosis inducida por cisplatino en células de cáncer de mama triple negativo

Para evaluar la función del SNP rs895819:A>G en la apoptosis inducida por cisplatino, se cultivaron por 24 y 48 h, y con una concentración de 100 μ M de cisplatino, líneas celulares estables MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o vector vacío. Las células MCF-7 mostraron una disminución de la apoptosis cuando se transfectaron con el pre-miR-27a-A o con el pre-miR-27a-G en comparación con las células transfectadas con el vector vacío tanto a 24 como a 48 h, siendo las diferencias estadísticamente significativas (Figura 17A). Sin embargo, no se observaron diferencias al comparar las células transfectadas con el pre-miR-27a-A con aquellas transfectadas con el pre-miR-27a-G (Figura 17A). Estos resultados indican ambos alelos disminuyen la apoptosis comportándose como alelos de riesgo en el subtipo luminal A. En las células MDA-MB-231 se observó que las células transfectadas con el pre-miR-27a-G mostraron niveles de apoptosis similares a las células transfectadas con el vector vacío (Figura 17B). Al comparar las células triples negativo transfectadas con el pre-miR-27a-A en relación con aquellas transfectadas con el pre-miR-27a-G o con el vector vacío, se observó una disminución de la apoptosis tanto a las 24 como a las 48 h siendo las diferencias significativas (Figura 17B). Estos resultados podrían indicar que el alelo G del rs895819 disminuye la apoptosis en células de CM luminal A, a consecuencia de la sobreexpresión del miR-27a. Mientras que, en células de CM triple negativo, la disminución de la expresión del miR-27a cuando está el alelo G presente, podría tener un efecto protector al aumentar la apoptosis respecto del alelo A.

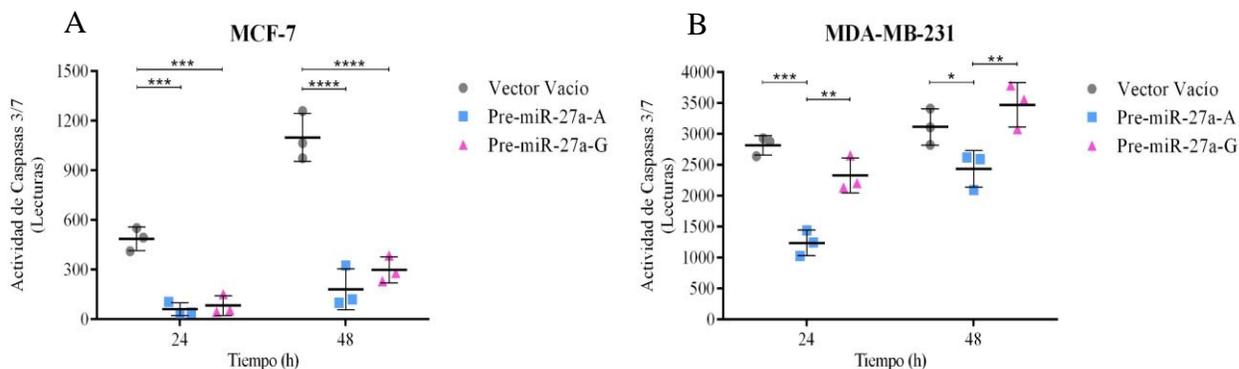


Figura 17: La expresión del pre-miR-27a-G modula diferencialmente la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama luminal A y triple negativo. La apoptosis se evaluó midiendo la actividad de caspasas 3/7 en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas estables con los vectores de expresión pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001).

7.4.5. La expresión del pre-miR-27a-G disminuye la invasión y migración en células de CM triple negativa y regula positivamente estos procesos en células del subtipo luminal A

Para evaluar el efecto de rs895819:A>G sobre la invasión y migración de células de CM, se realizaron ensayos en placas Transwell utilizando las líneas celulares estables MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o con el vector vacío. Las Figuras 18A y 18B muestra que la invasión y migración celular fueron significativamente mayores en las células MCF-7 transfectadas con el pre-miR-27a-G en comparación con aquellas transfectadas con el pre-miR-27a-A o con el vector vacío. Por otra parte, los resultados mostraron una disminución significativa de la invasión y migración celular en células de CM triple negativo MDA-MB-231 transfectadas con el pre-miR-27a-G comparadas con las células transfectadas con el vector pre-miR-27a-A o vector vacío (Figura 19A y 19B). Por lo tanto, los resultados podrían sugerir que la regulación positiva de la expresión del miR-27a en células MCF-7 (luminal A), como consecuencia de la presencia del alelo G del rs895819, aumenta la invasión y migración celular. Mientras que en células triple negativo (MDA-MB-213), el alelo G del rs895819 actuaría como alelo protector al no afectar la expresión del miR-27a maduro y disminuir la invasión y migración de las células triple negativo.

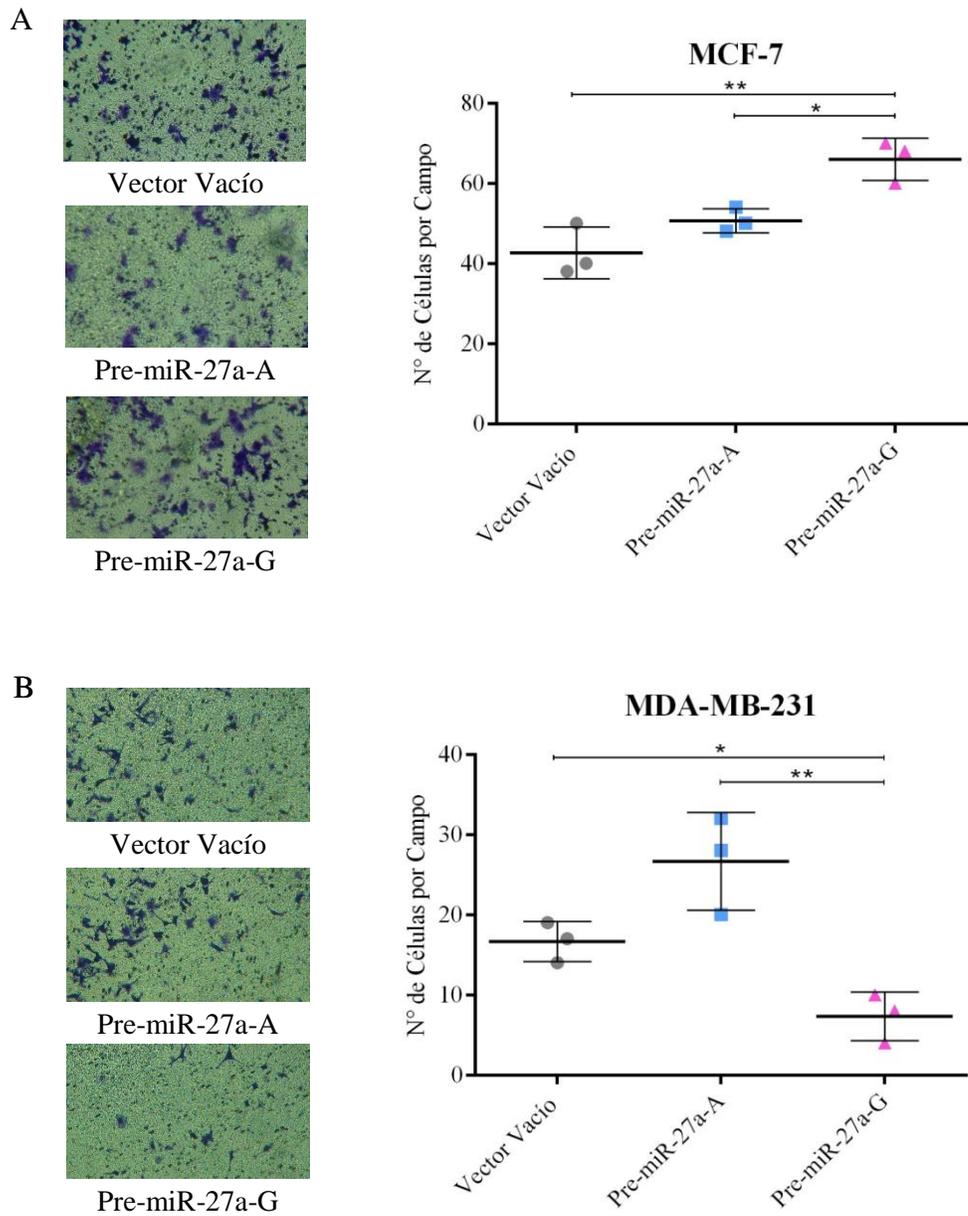


Figura 18: La expresión del SNP rs895819 alelo G modula diferencialmente la invasión de células de CM luminal A y triple negativo. La migración celular fue evaluada utilizando ensayo Transwell en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$).

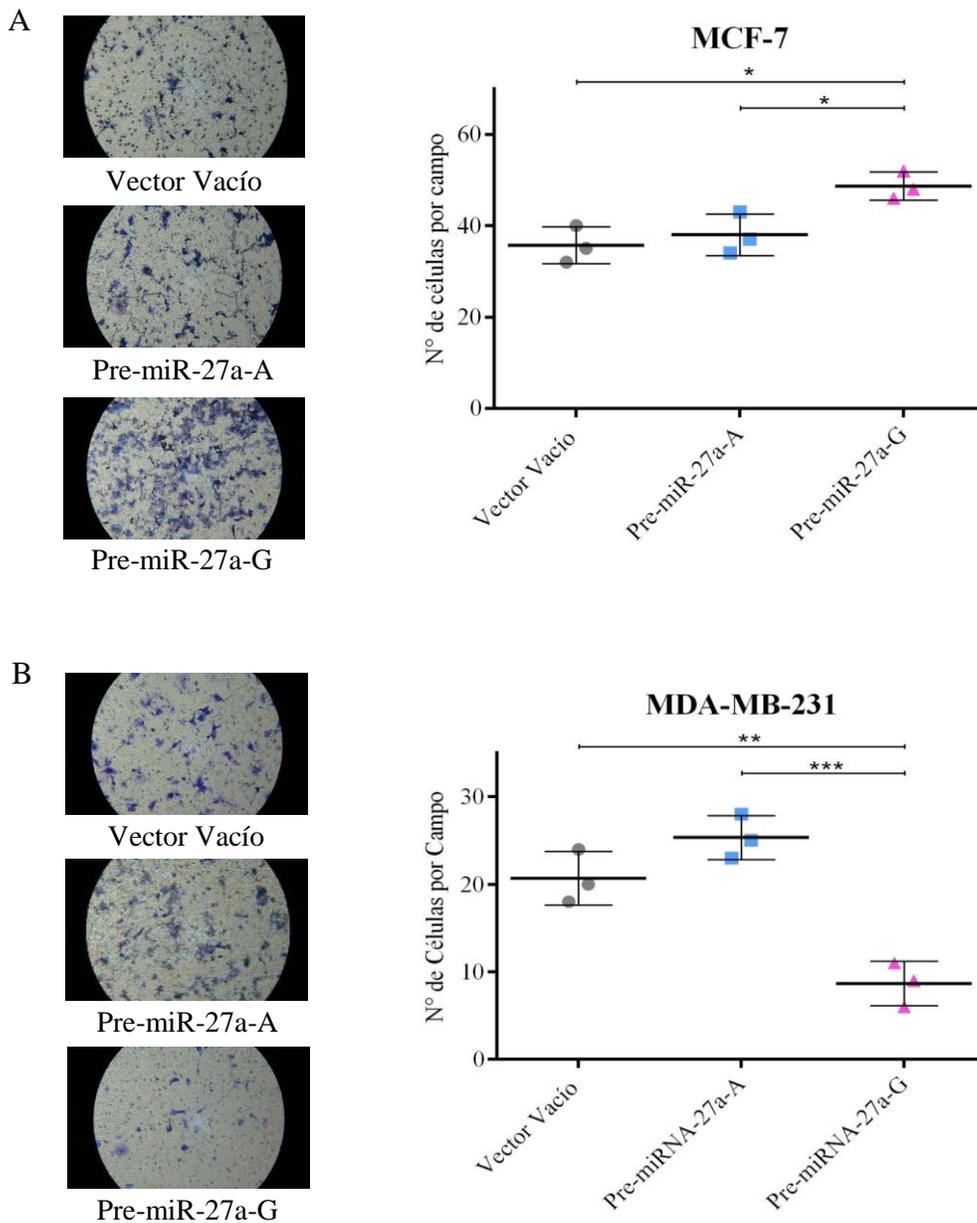


Figura 19: La expresión del SNP rs895819 alelo G modula diferencialmente la migración de células de CM luminal A y triple negativo. La migración celular fue evaluada utilizando ensayo Transwell en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-27a-A, pre-miR-27a-G o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$).

Tabla 8. Resumen de resultados del rs895819 (pre-miR-27a) y su participación en la tumorigénesis mamaria.

rs895819	LINEAS CELULARES											
	MCF-7				MDA-MB-231				MCF-10A			
	Alelo A		Alelo G		Alelo A		Alelo G		Alelo A		Alelo G	
Expresión	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Proliferación	-		↑		-		↓					
Quimioresistencia	↑		↑		↑		↓					
Apoptosis	↓		↓		↓		-					
Invasión	-		↑		-		↓					
Migración	-		↑		-		↓					

 Desregulación positiva;
  Desregulación positiva media;
  Desregulación positiva baja;
  Desregulación negativa;
  Desregulación negativa media.

Los resultados indican que la presencia del alelo G aumentan significativamente la expresión de las hebras 5p y 3p del miR-27a en la línea luminal A MCF-7 y mientras que, en la línea celular triple-negativa, la expresión de las hebras 5p y 3p fueron bajos en presencia del alelo G. Además, los resultados evidenciaron que la presencia del alelo G muestra un efecto dual dependiendo del subtipo del CM.

7.5. Rol del rs4541843 (pre-miR-182) en la tumorigénesis mamaria

7.5.1. El miR-182-3p es sobreexpresado por la presencia del alelo C del rs4541843:C>T en líneas celulares de cáncer de mama

El estudio de asociación realizado en esta tesis entre el rs4541843:C>T y riesgo de desarrollar CM, mostró que el alelo T del SNP se asoció con aumento del riesgo de desarrollar CM en casos con antecedentes familiares de CM en población chilena. En consecuencia, se propuso evaluar el efecto del rs4541843:C>T sobre la expresión de las hebras 3p y 5p del miR-182. Las Figuras 20A y 20B muestran que en las líneas celulares de CM MCF-7 y MDA-MB-231, el miR-182-3p se sobreexpresa en las células transfectadas con el pri-miR-182 portador del alelo C con

respecto de las células transfectadas con el pri-miRNA-182-T siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$ y $p < 0.0001$ respectivamente). Estos resultados indican que en las líneas celulares de CM luminal A y triple negativo, el miR-182-3p se sobreexpresa a consecuencia de la presencia del alelo C del SNP rs4541843:C>T.

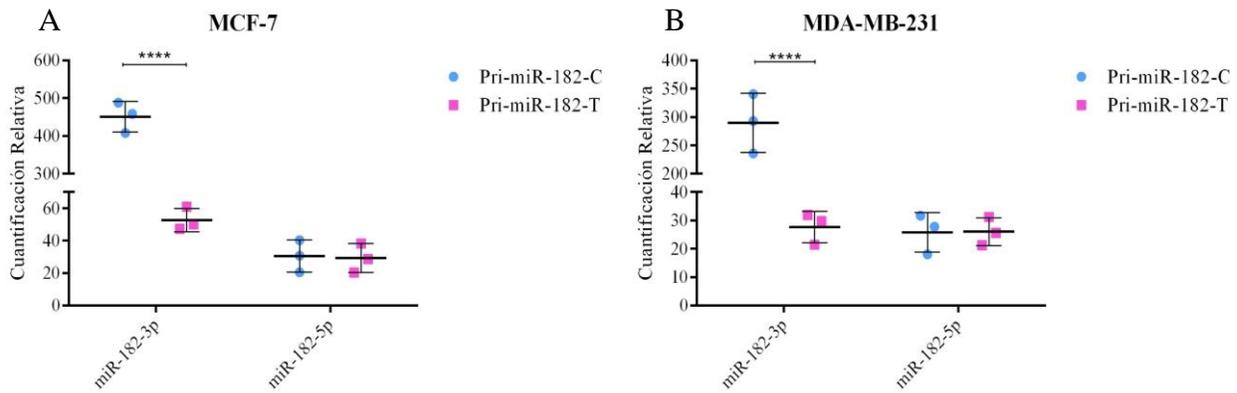


Figura 20. La expresión del miR-182 es regulada diferencialmente por el SNP rs4541843:C>T en células de mama tumorales. Los niveles de expresión de los miRNAs maduros miR-182-3p y miR-182-5p fueron medidos en las líneas celulares de CM MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B). Las dos líneas celulares fueron transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-182-C, pre-miR-182-T o vector vacío. Las veces de cambio fueron normalizadas respecto del vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DE) de tres experimentos independientes (**** $p < 0.0001$).

7.5.2. La expresión pre-miR-182-C aumenta la proliferación de células de cáncer de mama

Las líneas celulares de CM MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas estables con los vectores pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o con el vector vacío fueron utilizadas para evaluar *in vitro* el efecto del rs4541843:C>T sobre la proliferación celular. Las Figuras 21A y 21B muestran que, a las 24 h no existen diferencias significativas en el índice de proliferación entre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o con el vector vacío. Sin embargo, a las 48 h se observó un aumento significativo en el índice de proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el vector pri-miR-182-C respecto de las células transfectadas con el pri-miR-182-T o con el vector vacío (Figura 21A y 21B). Estos resultados indican que el alelo C del rs4541843 aumenta significativamente la proliferación de las células de CM de los subtipos luminal A y triple negativo.

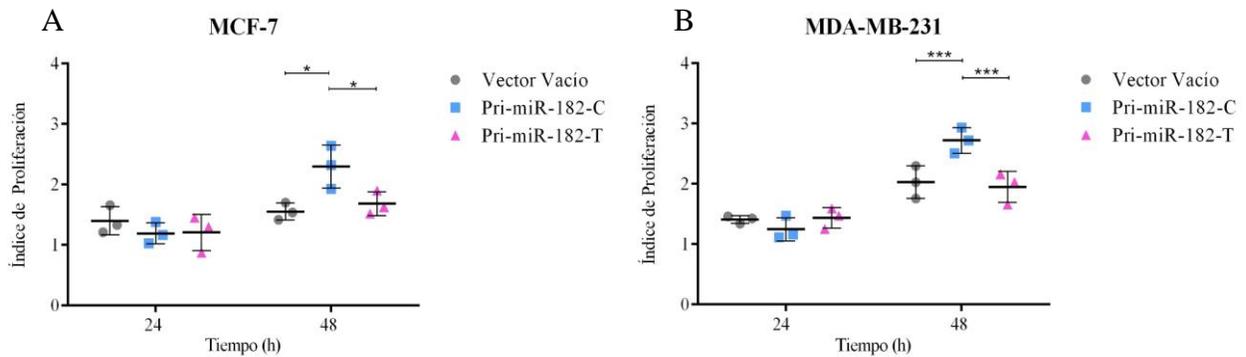


Figura 21: La proliferación celular aumenta en presencia del SNP rs4541843:C>T en células de cáncer de mama luminal A y triple negativo. El índice de proliferación se midió mediante citometría de flujo utilizando el reactivo CFSE en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-182-C, pre-miR-182-T o vector vacío a las 24 y 48 h. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* p <0.05; *** p <0.001).

7.5.3. La expresión del pre-miR-182-C promueve la resistencia al cisplatino en células de cáncer de mama

Para evaluar el efecto del SNP rs4541843:C>T sobre la sensibilidad al cisplatino, se cultivaron durante 48 h, líneas celulares estables de CM MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los vectores pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o con el vector vacío en presencia de diferentes concentraciones de cisplatino (0, 40 y 80 μ M). Los resultados mostraron que la viabilidad celular fue significativamente mayor en las células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pri-miR-182-C con respecto a las células transfectadas con el pri-miR-182-T o con el vector vacío en ambas concentraciones de cisplatino (Figura 22A y 22B). Estos resultados demuestran que el alelo C del rs4541843 aumenta la viabilidad y resistencia al cisplatino en células de CM luminal A y triple negativo.

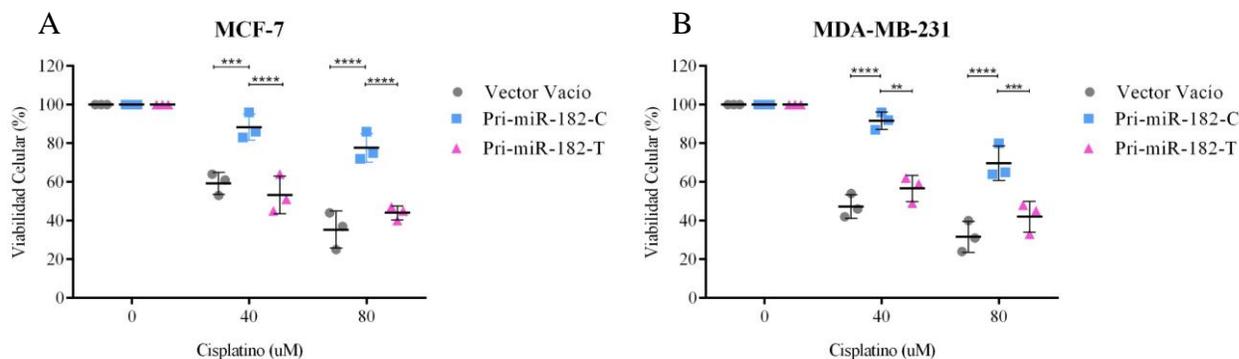


Figura 22: El SNP rs4541843:C>T modula diferencialmente la resistencia al cisplatino en las líneas celulares de cáncer de mama luminal A y triple negativa. La resistencia al cisplatino se midió mediante el ensayo de MTS en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-182-C, pre-miR-182-T o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

7.5.4. La expresión del pri-miR-182-C disminuye la apoptosis inducida por cisplatinato en células de cáncer de mama

Para evaluar el efecto del SNP rs4541843:C>T en la apoptosis inducida por cisplatino, se cultivaron por 24 y 48 h, líneas celulares estables MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con los pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o con el vector vacío y luego incubadas con 100 μ M de cisplatino a. Las Figuras 23A y 23B muestran una disminución significativa de la apoptosis inducida por cisplatino en células MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pri-miR-182-C en comparación con aquellas transfectadas con el pri-miR-182-T ($p < 0,0001$) o con el vector vacío ($p < 0,0001$). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión del miR-182-3p como consecuencia de la presencia del alelo C del rs4541843 en el pri-miR-182, inhibió la apoptosis inducida por cisplatino al disminuir la actividad de las caspasas 3/7.

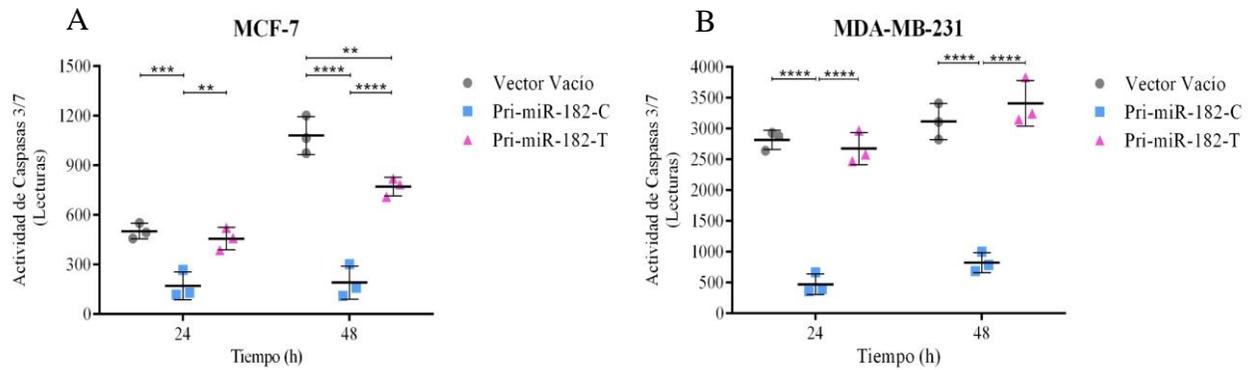


Figura 23: La expresión del pre-miR-182-C disminuye la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama luminal A y triple negativo. La apoptosis se evaluó midiendo la actividad de caspasas 3/7 en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-182-C, pre-miR-182-T o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

7.5.5. La expresión del pri-miR-182-C aumenta la invasión y migración de células de cáncer de mama

Para evaluar el efecto de rs4541843:C>T sobre la invasión y migración de células de CM, se realizaron ensayos en placas Transwell utilizando las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 transfectadas con el pri-miR-182-C, pri-miR-182-T o con el vector vacío. Los resultados mostraron que en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, la invasión celular fue significativamente mayor en las células transfectadas con el pri-miR-182-C en comparación con las transfectadas con el pri-miR-182-T ($p < 0.01$) o con el vector vacío ($p < 0.01$) (Figura 24A y 24B). Resultados similares se obtuvieron para la migración celular, observándose un aumento significativo de la migración celular tanto en células MCF-7 (Figura 25A) como en células MDA-MB-231 (Figura 25B) transfectadas con el pri-miR-182-C respecto de aquellas transfectadas con el pri-miR-182-T o con el vector vacío. Por lo tanto, los resultados indicarían que la regulación positiva del miR-182-3p, aumenta la invasión y migración de células tumorales de mama de los subtipos luminal A y triple negativo, como resultado de la presencia del alelo C del rs4541843.

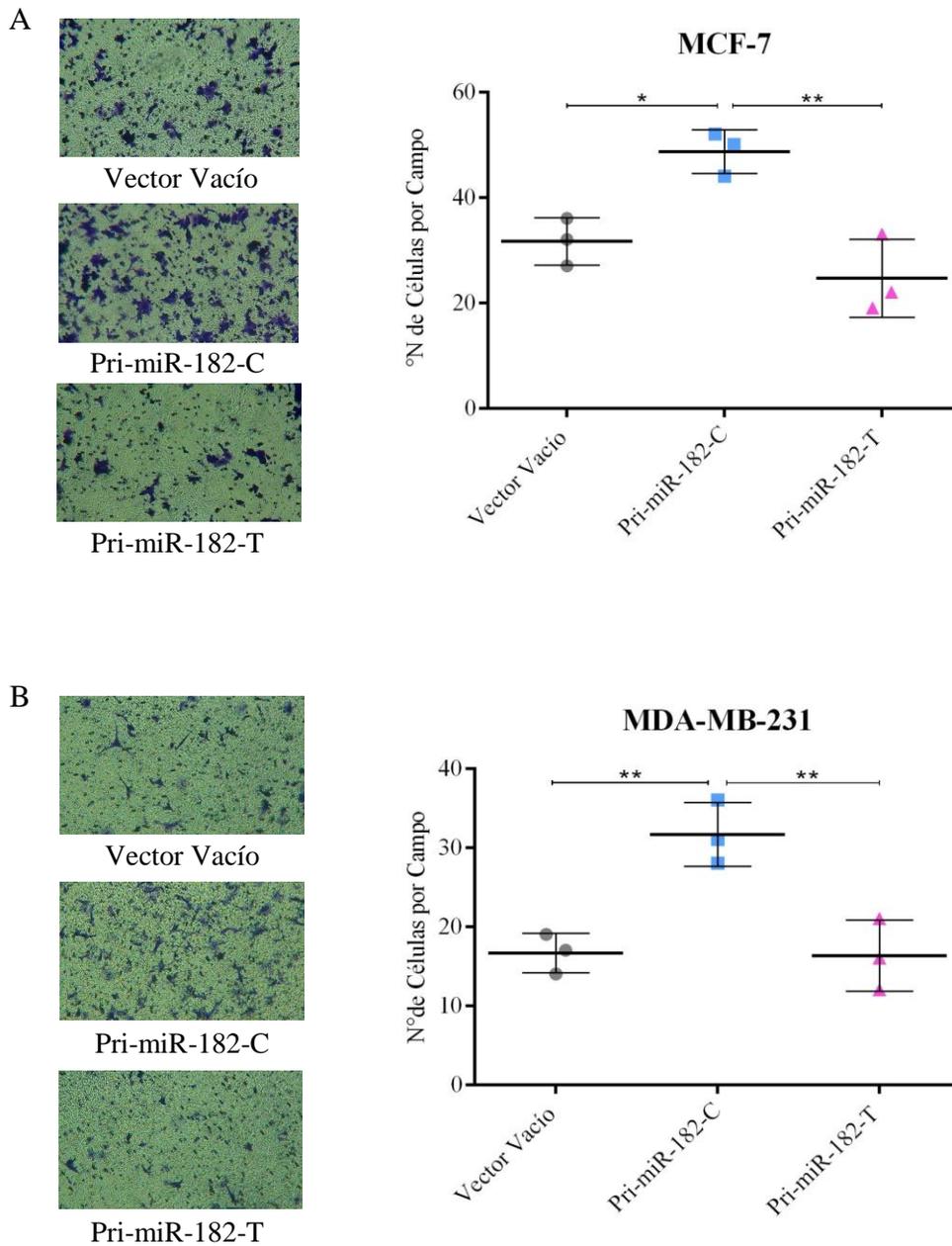


Figura 24: La expresión del SNP rs4541843 alelo C aumenta la invasión de células de CM luminal A y triple negativo. La invasión celular fue evaluada utilizando ensayo Transwell en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-182-C, pre-miR-182-T o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01).

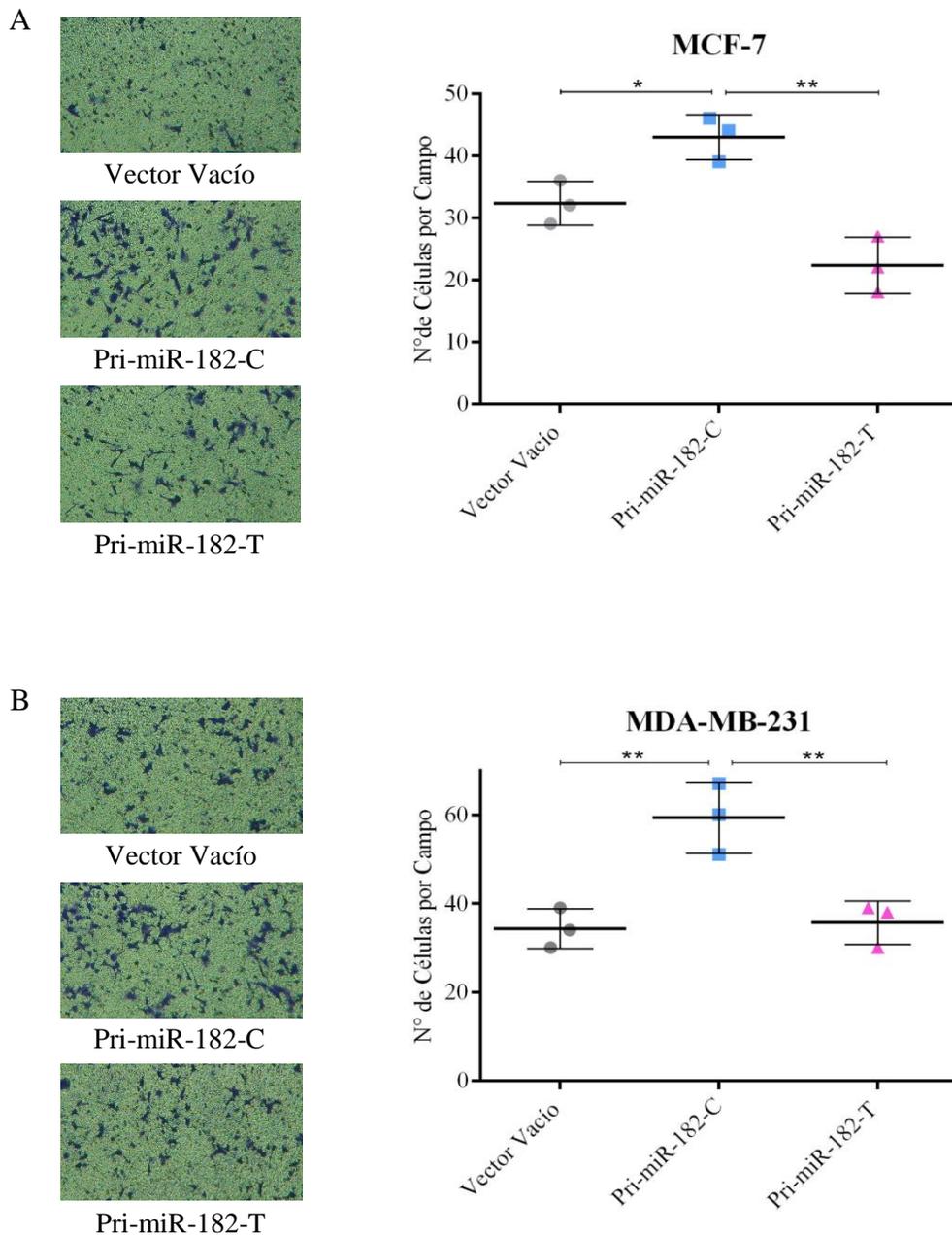


Figura 25: La expresión del SNP rs4541843 alelo C aumenta la migración de células de CM luminal A y triple negativo. La migración celular se evaluó utilizando ensayo Transwell en las líneas celulares de CM luminal A MCF-7 (A) y triple negativo MDA-MB-231 (B), transfectadas con los vectores de expresión pre-miR-182-C, pre-miR-182-T o vector vacío. Los datos representan los promedios (\pm DS) de tres experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.01).

Tabla 9. Resumen de resultados del rs4541843 (pri-miR-182) y su participación en la tumorigénesis mamaria.

rs4541843	LINEAS CELULARES							
	MCF-7				MDA-MB-231			
	Alelo C		Alelo A		Alelo C		Alelo A	
Expresión	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Proliferación	↑		-		↑		-	
Quimioresistencia	↑		-		↑		-	
Apoptosis	↓		-		↓		-	
Invasión	↑		-		↑		-	
Migración	↑		-		↑		-	

 Desregulación positiva;
  Desregulación positiva baja;
  Desregulación negativa;
  Desregulación negativa media.

Los resultados indican que la presencia del alelo C aumentan significativamente la expresión de las hebras 5p y 3p en las líneas celulares de CM, y que la presencia de este alelo tendría un rol oncogénico en la tumorigénesis mamaria.

8. DISCUSIÓN

8.1 El rs4541843:C>T se asocia con riesgo de desarrollar cáncer de mama en población chilena

Existe consenso mundial que las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son responsables de sólo el 16% del riesgo de los cánceres familiares de mama y de ovario [27, 95]. En consecuencia, se ha realizado una intensa búsqueda de nuevos genes de moderada o baja penetrancia que pudieran explicar el gran porcentaje de pacientes *BRCA1/2* negativo con CM familiar.

Los miRNAs se han considerado durante el último tiempo genes de baja penetrancia y diferentes estudios han demostrado que los miRNAs se expresan de forma aberrante en muchos cánceres. Los SNP son la forma más común de variación presente en el genoma humano y se han identificado que SNPs en regiones génicas de miRNAs pueden alterar su transcripción, procesamiento y maduración, así como la afinidad y especificidad de unión a su mRNA diana [58, 96]. Por lo tanto, varios estudios epidemiológicos han evaluado las asociaciones entre SNP de miRNAs y la susceptibilidad al CM [54]. Es importante señalar que la variabilidad genética es específica de la etnia. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios de asociación entre SNPs en miRNAs y riesgo de CM se han realizado en casos de poblaciones europeas, asiáticas, árabes o judías. Por el contrario, en poblaciones latinoamericanas las publicaciones sobre el rol de los SNPs de miRNA en la susceptibilidad al CM son muy escasas. En el presente trabajo de tesis, se evaluó el impacto del SNP rs451843 ubicado en el pri-miR-182 en el riesgo de desarrollar CM familiar y CM de diagnóstico temprano en familias chilenas negativas para mutaciones puntuales en los genes *BRCA1/2*.

El miR-182 es uno de los tres miRNA perteneciente al cluster miR-183/182/96, ubicado específicamente en el cromosoma 7q32.2 [83]. Varios estudios han confirmado que los miRNAs pertenecientes al cluster miR-183/182/96 se expresan de forma anormal en diferentes cánceres y otras enfermedades humanas [84]. Se ha reportado que los miembros de este cluster, y específicamente el miR-182 se encuentra altamente expresado en muchos subtipos de CM. Se ha reportado que el miR-182 funciona como un onco-miRNA, promoviendo la proliferación y

migración de células de CM [85]. Moskwa et al. [86], informaron que el complejo Argonaute/miR-182 se une específicamente al mRNA de BRCA1 y que este miRNA regula negativamente la expresión de BRCA1. Por lo tanto, la sobreexpresión del miR-182 reduce los niveles de la proteína de BRCA1 alterando la reparación del DNA mediada por el proceso de recombinación homóloga (HR). Además, de acuerdo al fenotipo deficiente de BRCA1, las células tumorales de mama que sobreexpresan al miR-182 son hipersensibles a los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa I (PARP1). Krishnan et al. [87], mostraron que el miR-182 se sobreexpresa en varios subtipos moleculares de CM. Además, los autores validaron experimentalmente que el miR-182 afecta el proceso de HR, como consecuencia de su capacidad para unirse a diferentes genes que participan de este proceso. Otros blancos del miR-182 incluyen el mRNA del factor de transcripción TOX3; el mRNA de Nibrin NBN, el cual es un gen miembro del complejo de reparación de rotura de doble hebra MRE11/RAD50, y el mRNA de la proteína 1 del dominio LIM y SH3 (LASP1). Por lo tanto, el miR-182 podría cumplir un rol importante en la regulación de la reparación de roturas de doble hebra.

El SNP rs4541843:C>T se encuentra ubicado en el pri-miR-182. Este SNP está descrito en diferentes bases de datos, sin embargo, no existen estudios en la literatura que evalúen la asociación del rs4541843:C>T con alguna enfermedad humana. Los resultados de esta tesis mostraron que en los portadores homocigotos del genotipo T/T y alelo T (C/T + T/T) se observó un aumento del riesgo de desarrollar CM familiar *BRCA1/2* negativos. Dadas las funciones conocidas de miR-182, se podría plantear la hipótesis de que el rs4541843:C>T induce la sobreexpresión de miR-182, reduciendo los niveles de proteína BRCA1 y alterando las vías implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Sin embargo, un estudio reciente publicado por Mansouri et al. [88] mostró que, en población iraní, el alelo T actuaría como factor protector disminuyendo el riesgo de desarrollar CM. Esta discordancia en los resultados podrían ser consecuencia de las diferencias en los criterios de selección utilizados para pacientes con CM, el n muestral y las frecuencias alélicas y genotípicas presentadas en ambas etnias. Por lo tanto, se necesitan estudios en otras poblaciones para confirmar las asociaciones determinadas en esta tesis y el presentado en población iraní, ya que estos dos estudios son los primeros en evaluar la asociación sobre el rs4541843:C>T y riesgo de CM. Por otra parte, es necesario también realizar estudios funcionales que confirmen los resultados de asociación determinados en esta tesis,

8.2. El alelo A del rs6505162 (pre-miR-423) aumenta los procesos tumorigénicos del cáncer de mama

Existe extensa evidencia sobre la participación de los miRNAs en las etapas iniciales del desarrollo de numerosos tipos de cánceres [94, 97]. En particular, los miRNAs se encuentran con frecuencia en regiones del genoma asociadas al cáncer y regulan gran parte de los genes involucrados en la tumorigénesis [98, 99]. Las mutaciones o SNPs localizadas en regiones precursoras o maduras de los miRNAs pueden afectar la transcripción primaria del miRNA, el procesamiento del miRNA maduro, y las interacciones miRNA-mRNA [100].

Numerosos estudios han indicado que el miR-423 muestra expresión diferencial en distintos tipos de cánceres y que participa en diferentes procesos celulares, entre ellos proliferación, apoptosis, metástasis tumoral y quimiorresistencia [101]. El miR-423 se sobreexpresa en múltiples tipos de cáncer, entre estos, carcinomas hepatocelulares, cánceres de cabeza y cuello, cánceres gástricos, cánceres colorrectales, glioblastomas, cánceres de pulmón, cánceres de ovario, carcinomas de laringe, cánceres de endometrio, carcinomas de próstata y cánceres de mama [101-106].

Durante el procesamiento de los miRNAs, se forman diferentes estructuras conocidas como pre-miRNAs. Se conoce que un pre-miRNA se procesa típicamente en un dúplex de miRNA maduro, donde una de las hebras, denominada miRNA-5p, se incorpora al complejo RISC, mientras que la otra hebra, miRNA-3p, se degrada rápidamente. Sin embargo, el pre-miR-423 puede producir simultáneamente ambas hebras maduras como consecuencia de características estructurales que permiten que ambas hebras maduras se unan al complejo RISC [107]. Se ha informado que las dos secuencias maduras del miR-423, miR-423-3p y miR-423-5p, están implicadas en la tumorigénesis [71]. En el carcinoma de laringe, el miR-423-3p aumenta la proliferación celular, la invasión y la migración a través de la modulación de la expresión del gen *AdipoR2* [108]. En células de cáncer gástrico, el miR-423-5p regula la proliferación celular y la invasión al unirse al mRNA del factor trébol 1 [102], y en el carcinoma hepatocelular, la sobreexpresión del miR-423-3p promueve el crecimiento celular y regula la transición G1/S al inhibir la expresión de *p21Cip/WaF1* el cual es un gen supresor tumoral [107]. En células de glioma,

la sobreexpresión del miR-423-5p induce la regulación positiva de p-ERK1/2 y p-AKT aumentando la proliferación, la angiogénesis y la metástasis, al inhibir la expresión del inhibidor de crecimiento 4 (ING-4) [109]. En el cáncer de pulmón, el miR-423-3p actúa como oncogén y promueve la proliferación celular, la invasión y la migración [110], y en el cáncer de endometrio, el este miRNA promueve la proliferación, migración, invasión y quimiorresistencia [111]. En cáncer de próstata, se ha evidenciado que el miR-423-5p aumenta la proliferación y disminuye la apoptosis celular [101, 112]. En cáncer de mama, Zhao et al. [71], mostraron que, en nueve líneas celulares diferentes de CM, se expresan ambas formas maduras del miR-423. Además, Xia et al. [68], informaron que, en CM, el miR-423 actúa como un oncogén promoviendo la proliferación y migración de las células tumorales e inhibiendo la expresión del gen *ZFP36*. Dai et al. [67], demostraron que la sobreexpresión del miR-423 aumenta la invasión de células tumorales de mama a través de la modulación de la vía de señalización NF- κ B.

Se ha establecido que los SNPs desempeñan un papel crucial en el desarrollo de tumores humanos [113, 114]. Un meta-análisis que incluyó el estudio de SNPs en el miR-423 sugirió que el rs6505162 podría ser un marcador de pronóstico para varios cánceres humanos comunes [101]. El SNP rs6505162:C>A, se ubica en el cromosoma 17q11.2 en la región del pre-miR-423 a 12 pb del extremo 3' del miR-423 maduro [71]. En un estudio previo, Morales et al. [70], informaron que el alelo A del rs6505162 se asocia significativamente con aumento del riesgo de CM en pacientes con fuerte historia familiar de CM (OR=1.7 [95 % IC 1.0–2.0] $p=0.05$). En consecuencia, en esta tesis se evaluó *in vitro* el rol del SNP rs6505162:C>A en diferentes procesos de la tumorigénesis mamaria. Los resultados del presente trabajo mostraron ambas formas maduras miR-423-3p y miR-423-5p en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, lo cual es concordante con lo reportado por Zhao et al. [71]. También se observó expresión de ambos miRNAs maduros (5p y 3p) que en la línea celular de mama normal MCF-10A, sin embargo, los niveles de expresión fueron muy bajos. Además, las líneas celulares de CM transfectadas con el pre-miR-423-A, mostraron niveles de expresión significativamente mayores de las hebras 3p y 5p del miR-423 en comparación con las células transfectadas con el pre-miR-423-C (alelo silvestre). Estos resultados indicarían que, en líneas celulares de CM, el alelo A del rs6505162 afecta la expresión de ambas hebras del miR-423 maduro. Estos hallazgos son consistentes con los

reportados por Zhao et al. [71]. También se evaluó el efecto de rs6505162:C>A sobre la proliferación celular mediante citometría de flujo. Los resultados de esta tesis mostraron que la presencia del alelo A del rs6505162 aumentó el índice de proliferación de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231. Es probable que la sobreexpresión del miR-423, como consecuencia de la presencia del alelo A del rs6505162 aumente la proliferación de células de CM.

El cisplatino es un fármaco anticanceroso comúnmente utilizado en quimioterapia y ha demostrado ser eficaz contra numerosos tipos de tumores malignos [115]. Sin embargo, muchas células tumorales muestran resistencia intrínseca o adquirida a los fármacos quimioterapéuticos [116, 117]. Se ha demostrado que los miRNAs desempeñan funciones esenciales en la sensibilidad a la quimioterapia [118]. Yang et al. [119], informaron que en cáncer de ovario el miR-214 promueve la supervivencia celular e induce resistencia al cisplatino al inhibir la expresión de PTEN. Kong et al. [120], demostraron que la sobreexpresión del miR-155 promueve resistencia al paclitaxel, VP16 y doxorubicina en la línea celular de CM BT-474, mientras que la disminución de la expresión del miR-155 sensibiliza a las células HS578T a la acción de estos fármacos. Yu et al. [121], informaron que en la línea celular de CM MCF-7, la sobreexpresión de los miR-17 y miR-20 aumentan la apoptosis inducida por doxorubicina al inhibir la expresión del gen AKT1. En el presente trabajo se demostró que la sobreexpresión del miR-423, como consecuencia de la presencia del alelo A del rs6505162, aumentó la viabilidad de las células de CM después del tratamiento con cisplatino. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del miR-423 podría inducir la resistencia a fármacos en células tumorales de mama, lo cual está de acuerdo con lo reportado por Xia et al. [68].

La inhibición de la apoptosis puede promover la progresión del tumor, mientras que la inducción de la apoptosis inhibe la progresión tumoral [122]. Li et al. [111] mostraron que el miR-423 inhibe la apoptosis inducida por cisplatino modulando los niveles de expresión de las caspasas 3/7 y Bcl-2 en células de cáncer de endometrio. En células de glioma, la inhibición de la expresión del miR-423-3p conduce a una inducción de la apoptosis celular [123]. Los resultados de esta tesis demostraron que, en células de CM, la sobreexpresión del miR-423, como consecuencia de la presencia del alelo A del rs6505162, inhibió la apoptosis inducida por cisplatino al

disminuir la actividad de las caspasas 3/7, lo que también se ha observado en otros tipos de cánceres.

La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer, siendo los procesos de invasión y migración celular los pasos iniciales de la metástasis [124]. En cáncer de endometrio, la sobreexpresión del miR-423 promueve la metástasis de células cancerosas [111, 125]. En cáncer gástrico y glioma, el miR-423-5p promueve la invasión de células tumorales [109, 126]. Además, el miR-423-3p afecta la metástasis de células tumorales en cánceres de laringe y pulmón aumentando la migración e invasión celular [108, 110, 127]. Por lo tanto, la bibliografía sugiere que la expresión anormal del miR-423 podría influir en la metástasis de células cancerosas en tumores humanos. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que, el alelo A del rs6505162 aumentó la invasión y migración de células de CM como consecuencia de la sobreexpresión del miR-423. Nuestros resultados son consistentes con los resultados publicados en otras neoplasias. En consecuencia, el miR-423 podría ser un marcador de metástasis para CM.

El SNP rs6505162 se encuentra ubicado en la región del pre-miRNA muy cerca del sitio de reconocimiento de la enzima DROSHA (Figura 26). Aunque la presencia del alelo A no afecta la estructura secundaria del pre-miR-423, se podría sugerir que este alelo afectaría el sitio de reconocimiento por DROSHA alterando el procesamiento del pre-miR-423.

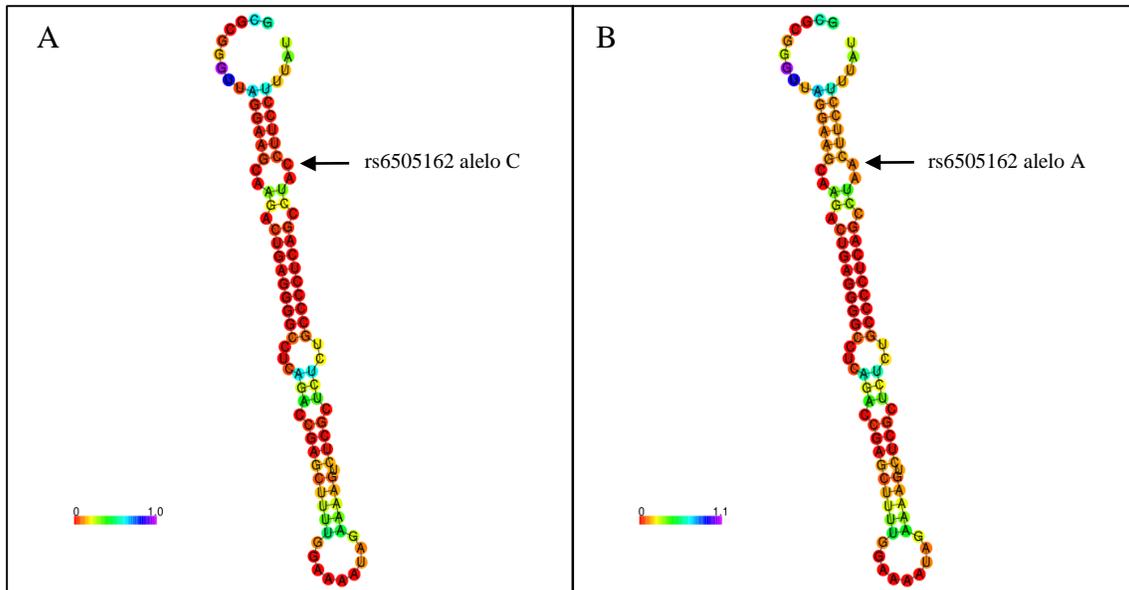


Figura 26. Modelamiento del pre-miRNA-423 en presencia del alelo C (A) y en presencia del alelo A (B). Las estructuras secundarias fueron modeladas a través de la herramienta bioinformática RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Finalmente es importante destacar, los resultados obtenidos en este trabajo son los primeros en informar sobre la caracterización funcional del rs6505162:C>A en la tumorigénesis mamaria.

8.3. El alelo G del rs895819 (pre-miR-27a) tiene un rol diferencial dependiente del subtipo de cáncer de mama

Se ha informado que el miR-27a desempeña un rol vital en el desarrollo tumoral modulando la función de diferentes procesos celulares, incluyendo la proliferación, apoptosis, migración, invasión, y angiogénesis, entre otros. Li et al. [128], mostró que en la línea celular de cáncer colorrectal 786-O, la sobreexpresión del miR-27a inhibe la vía de señalización de EGFR aumentando la proliferación, apoptosis, migración e invasión celular. Tang et al. [72], demostraron que la sobreexpresión del miR-27a se asocia con menor supervivencia en pacientes con CM, lo que sugiere que el miR-27a podría ser un marcador de progresión para este cáncer. Colangelo et al. [129], informó que el miR-27a, actúa como un oncogén en las primeras etapas de la tumorigénesis de colon. De manera similar, el estudio de Wang et al. [130], mostró que la sobreexpresión

del miR-27a podría aumentar significativamente la transformación maligna de células epiteliales bronquiales humanas a través de la regulación negativa de la expresión de FBXW7, sugiriendo que el miR-27a posee un rol oncogénico en la tumorigénesis humana. Alternativamente, existe evidencia que ha informado que el miR-27a podría tener un rol protector en el desarrollo de diferentes tipos de cánceres. Jiang et al. [73] utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* de carcinoma de células escamosas de esófago, demostraron que la sobreexpresión del miR-27a disminuye significativamente la proliferación e invasión celular al inhibir la expresión de KRAS revertiendo el proceso tumorigénico. Li et al. [131], informó que el miR-27a podría funcionar como un supresor tumoral en el CM al inhibir la expresión de TMEM170B suprimiendo la proliferación y la migración celular. Además, Ueda et al. [75], utilizando perfiles de expresión de miRNAs, determinaron que el miR-27a funciona como un regulador negativo de la supervivencia y quimioresistencia de células troncales de CM. Por lo tanto, de acuerdo con la literatura, el miR-27a podría funcionar como un oncogén o supresor tumoral dependiendo del tipo de cáncer y/o del contexto molecular de la célula tumoral.

Diferentes estudios han revelado que el rs895819:A>G, ubicado en la región del pre-miR-27a, se asocia con disminución del riesgo de desarrollar cáncer [78, 80-82]. El estudio de Morales et al. [70], mostró que el rs895819:A>G se asoció con disminución del riesgo de desarrollar CM en pacientes chilenas *BRCA1/2* negativas. Además, se ha sugerido que este SNP podría ejercer un rol protector en la tumorigénesis humana [132]. A la fecha, no existen estudios funcionales que validen los resultados de asociación del rs895819:A>G con ningún tipo de cáncer humano. En consecuencia, en esta tesis se evaluó *in vitro* el rol funcional del SNP rs895819:A>G en diferentes procesos de la tumorigénesis mamaria. Los resultados mostraron que, en la línea celular de CM luminal A MCF-7, la presencia del alelo G en el pre-miR-27a aumenta significativamente la expresión de las hebras 3p y 5p del miR-27a. Sin embargo, en la línea celular triple negativa MDA-MB-231, la expresión de los miR-27a-3p y miR-27a-5p disminuyó cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-27a-G. Estos resultados indican que el rs895819:A>G modula diferencialmente la expresión del miR-27a, aumentando la expresión de las hebras 3p y 5p del miR-27a en células de CM luminal A, y disminuyendo la expresión del miR-27a en células de CM triple negativo.

Al evaluar los resultados de proliferación celular, se observó que en la línea celular luminal A MCF-7, no se observaron diferencias significativas en el índice de proliferación en presencia del SNP rs895819:A>G. Sin embargo, en células triple negativo MDA-MB-231, el índice de proliferación disminuyó significativamente en presencia del alelo G del rs895819. No existe evidencia que demuestre la participación del miR-27a en procesos proliferativos de la tumorigénesis mamaria. Sin embargo, la literatura ha informado que el miR-27a podría tener un rol dual en la proliferación celular de otros tipos de cáncer. El estudio de Wang et al. [130], informó que, en líneas celulares y muestras de tejidos de carcinoma de células escamosas de esófago, la sobreexpresión del miR-27a-3p, aumenta la proliferación al inhibir la expresión del FBXW7. En CM, Jiang et al. [73] mostró que la sobreexpresión del miR-27a podría aumentar la invasión y migración de células de CM al inhibir la expresión del gen FBXW7. Sin embargo, los autores no realizaron ensayos funcionales que expliquen el rol funcional del miR-27a en la tumorigénesis mamaria. En consecuencia, y de acuerdo a los dos últimos antecedentes presentados, se verificó por TargetScan la unión del miR-27a al mRNA de FBXW7 (Figura 1 Anexos). Por lo tanto, se podría sugerir que la sobreexpresión del miR-27a-3p en CM luminal A, como consecuencia de la presencia del alelo G del rs895819, podría aumentar la unión al mRNA de FBXW7, promoviendo la proliferación celular. En cambio, la disminución de la expresión del miR-27a-3p en células de CM triple negativo cuando está presente el alelo G, disminuiría la proliferación celular, mostrando un efecto opuesto al observado en células luminal A.

Diferentes estudios han demostrado que el miR-27a participa en la resistencia celular a fármacos quimioterápicos en diferentes cánceres. Wi et al. [133], mostraron que, en células de cáncer de hígado, la sobreexpresión del miR-27a, aumentó la quimioresistencia al inhibir la expresión de RKIP. En cáncer de vejiga, el trabajo de Drayton et al. [134], informaron que la sobreexpresión del miR-27a regula negativamente la expresión de SLC7A11 aumentando la resistencia al cisplatino. En CM, Zhou et al. [135], utilizando inhibidores de la expresión del miR-27a, observaron aumento significativo de la sensibilidad de las células T-47D al tratamiento con cisplatino (CDDP). Además, los autores mostraron que el efecto observado en esta línea celular de CM, podría ser consecuencia de la regulación positiva del gen BAK al existir menor unión del miR-27a al mRNA blanco. Los resultados de esta tesis mostraron que la quimioresistencia en la línea celular de CM luminal A, se observó aumento de la resistencia al tratamiento con cisplatino

cuando las células fueron transfectadas con el vector pre-miR-27a portador del alelo G. En cambio, la línea celular de CM triple negativo, el tratamiento con cisplatino disminuyó significativamente la viabilidad celular cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-27a-G. De acuerdo a los antecedentes mencionados, se verificó por TargetScan la unión del miR-27a al mRNA del gen BAK1 (Figura 2 Anexos). Por lo tanto, se podría sugerir que la sobreexpresión del miR-27a, a consecuencia de la presencia del alelo G del rs895819 en su región precursora, aumentaría la unión de este miRNA al mRNA blanco del gen BAK1 promoviendo la resistencia al tratamiento al cisplatino. Alternativamente, la disminución de la expresión del miR-27a cuando está presente el alelo G en células de CM subtipo triple negativo, promovería la regulación positiva de la expresión del gen BAK1 debido a la menor unión de este miRNA. Lo anterior podría sugerir un rol dual del miR-27a cuando está presente el alelo G del rs895819 y dependiendo del subtipo molecular de CM.

Se ha informado que el miR27a podría participar en la tumorigénesis de diferentes cánceres a través de la modulación del proceso de apoptosis. En carcinoma de células escamosas de laringe, Tian et al. [136], mostraron que la sobreexpresión del miR-27a promovió el aumento de la viabilidad celular y la formación de colonias, e inhibió la apoptosis temprana y tardía en la línea celular Hep2. Ding et al. [137], realizaron estudios funcionales en células AGS de cáncer de colon, observaron que la sobreexpresión del miR-27a aumentó significativamente la proliferación, migración e invasión y disminuyó la apoptosis celular. En cáncer de ovario, Li et al. [138] utilizando herramientas bioinformáticas y experimentos de luciferasa, mostraron que el factor antiproliferativo BTG 1 (BTG1) es blanco del miR-27a-3p, disminuyendo la expresión de este gen. Además, los autores informaron que la inhibición del miR-27a-3p disminuyó la viabilidad, migración e invasión, y promovió la apoptosis de la línea celular de cáncer de ovario SK-OV-3. En CM, no existen antecedentes respecto del rol funcional del miR-27a sobre el proceso apoptótico en la tumorigénesis mamaria. El análisis de caspasas 3/7 realizado en esta tesis mostró que en células de CM luminal A transfectadas con el vector pre-miR-27a-G, se observó disminución significativa de la apoptosis celular. Mientras que, en la línea celular de CM triple negativo transfectadas con el pre-miR-27a portador del alelo G, la apoptosis celular aumento en comparación a las células transfectadas con el vector pre-miR-27a-A. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis y a los resultados obtenidos en cáncer de ovario, se determinó la unión

del miR-27a al mRNA del gen BTG1 utilizando la herramienta bioinformática TargetScan (Figura 3 Anexos). Por lo tanto, se podría sugerir que, en células de CM subtipo luminal A, la apoptosis celular podría estar reducida significativamente por la inhibición de la expresión de BTG1 al existir mayor expresión del miR-27a-3p cuando el alelo G del rs895819 está presente. Sin embargo, la inhibición de la expresión de BTG1 podría verse revertida en células de CM subtipo triple negativo, a consecuencia de que el alelo G del rs895819 disminuye significativamente la expresión del miR-27a-3p.

Como se mencionó anteriormente, el proceso de metástasis es una de las principales causas de muerte por cáncer y se ha demostrado que el miR-27a podría afectar los procesos de invasión y migración celular en la tumorigénesis de diferentes tipos de cáncer. En CM, el estudio ya mencionado de Jian et al. [73], mostró que al sobreexpresar el miR-27a en la línea celular MDA-MB-231, aumentó la invasión y la migración. Sin embargo, cuando las células MDA-MB-231 fueron tratadas con un inhibidor del miR-27a, los procesos de invasión y migración disminuyeron. Por lo anterior, los autores sugieren que el miR-27a cumple un rol esencial en la regulación de la metástasis del CM inhibiendo la expresión del gen FBXW7, proporcionando evidencia de la posible aplicación del miR-27a en la terapia del CM. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que en la línea celular de CM luminal A, tanto el proceso de invasión como de migración aumentaron cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-27a-G. Sin embargo, un efecto completamente contrario se observó en la línea celular de CM subtipo triple negativo, donde los procesos de invasión y migración disminuyeron significativamente en las células transfectadas con el pre-miR-27a-G. Por lo tanto, estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos por Jian et al. [73]. La sobreexpresión del miR-27a observada en presencia del alelo G del rs895819 en la línea celular de CM subtipo luminal A podría ser la causa del aumento de la invasión y migración celular, al unirse al mRNA del gen FBXW7 e inhibiendo su expresión. En cambio, la regulación negativa del miR-27a observada cuando está el alelo G presente en la línea celular de CM triple negativo podría generar la disminución de los procesos de invasión y migración celular al existir menor unión del miRNA al mRNA de FBXW7, favoreciendo la expresión normal de este gen.

El SNP rs895819 se encuentra ubicado en la región del pre-miRNA, específicamente en la región del *loop* terminal. Este *loop* terminal es parte de la secuencia de reconocimiento de la enzima DICER (Figura 27). Por lo tanto, se podría sugerir que la presencia del alelo G, afectaría el sitio de reconocimiento de DICER al generar un cambio en la estructura secundaria del pre-miR-27a (*loop* terminal más grande).

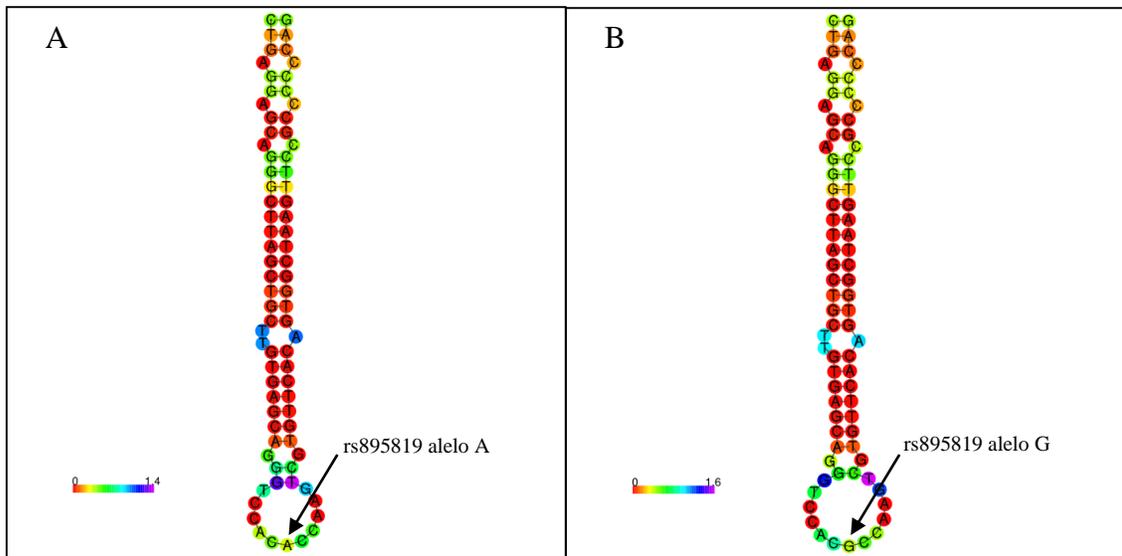


Figura 27. Modelamiento del pre-miRNA-27a en presencia del alelo A (A) y en presencia del alelo G (B). Las estructuras secundarias fueron modeladas a través de la herramienta bioinformática RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

8.4. El alelo C del rs4541843 (pri-miR-182) aumenta los procesos tumorigénicos del cáncer de mama

Varios estudios han evidenciado que el miR-182 tiene un rol oncogénico, afectado diferentes procesos celulares fundamentales como proliferación, apoptosis, invasión y migración celular. En este contexto, Perilli et al. [139], mostraron que el aumento de la expresión de miR-182 podría promover la proliferación celular, suprimir la apoptosis y conferir rasgos agresivos a las células de cáncer colorrectal. El grupo de Suzuki et al. [140], informaron que la inhibición del miR-182 redujo la capacidad proliferativa de células de mesotelioma maligno a través de la regulación positiva de la expresión de FOXO1. Además, los autores observaron que la inhibición del miR-182 redujo significativamente la invasión celular. Zheng et al. [141], mostraron que el miR-182-5p se sobreexpresaba en células de cáncer de hígado. Además, a través de experimentos funcionales, los autores demostraron que el miR-182-5p aumentó la proliferación

en células de cáncer de hígado a través de la regulación negativa del gen RCAN1. En CM, los resultados obtenidos por Zhang et al. [142] indicaron que la sobreexpresión del miR-182 podría tener un rol esencial en el inicio y progresión del CM triple negativo al inhibir la expresión de FOXF2.

El rs4541843:C>T fue identificado por secuenciación de SANGER de 100 pacientes con historia familiar de CM durante el desarrollo de la tesis doctoral del Dr. Tomas de Mayo en el laboratorio de la Dra. Jara. Este SNP se encontraba descrito en bases de datos, sin embargo, no existían estudios que evaluaran la asociación del rs4541843 con riesgo de alguna patología humana. Los resultados de esta tesis mostraron que el alelo T del rs4541843 se asoció con aumento de riesgo de CM. En consecuencia, en el presente trabajo se evaluó el rol del rs4541843:C>T en la tumorigénesis mamaria. Los resultados de expresión de esta tesis mostraron que en ambas líneas celulares de CM MCF-7 (luminal A) y MDA-MB-231 (triple negativo), el miR-182-3p se sobreexpresó por sobre la hebra 5p del miR-128 maduro cuando las células fueron transfectadas con el pri-miR-182-C. Estos resultados sugieren que la presencia del alelo C en el pri-miR-182 favorece la expresión del miR-182-3p maduro, y que posiblemente esta hebra sea la que genera la oncogenicidad en el desarrollo del CM. Además,

De los antecedentes mencionados anteriormente, el trabajo de Perilli et al. [139], mostró que la sobreexpresión del miR-182 aumenta la proliferación de células de cáncer colorrectal. Además, Hirata et al [143], reportaron por primera vez que la sobreexpresión del miR-182-5p está asociada con la progresión del cáncer de próstata al aumentar la proliferación, invasión y migración celular al inhibir la expresión de los genes supresores de tumores FOXF2, RECK y MTSS1. En carcinoma oral de células escamosas (COCE), el trabajo de Li et al. [144], mostró que el miR-182-5p se encontraba sobreexpresado en líneas celulares y muestras clínicas de COCE. Además, a través de ensayos de CCK-8, los autores observaron que el miR-182-5p promovió el crecimiento y proliferación de células de COCE. Chiang et al. [145], mostraron que, en líneas celulares de CM y muestras clínicas de tejido tumoral mamario, el miR-182 se encontraba sobreexpresado significativamente. Además, los autores demostraron funcionalmente que miR-182 promueve la proliferación e invasión celular al aumentar la expresión del eje HIF-1 α -VEGF-A e inhibir la expresión del gen FBXW7. Los resultados de proliferación celular obtenidos en esta

tesis mostraron que ambas líneas celulares de CM luminal A y triple negativo, la proliferación fue significativamente mayor cuando las células fueron transfectadas con el pri-miR-182-C. En consecuencia, y de acuerdo a los antecedentes presentados, se podría sugerir que la sobreexpresión del miR-182-3p, a consecuencia de la presencia del alelo C del rs4541843, aumentaría la proliferación de las células de CM al inhibir la expresión del gen FBXW7 y probablemente modulando positivamente el eje HIF-1 α -VEGF-A.

El cisplatino es uno de los fármacos quimioterapéuticos de uso común para diferentes tipos de cáncer, por lo tanto, es fundamental determinar los mecanismos de resistencia a quimioterápicos para evaluar alternativas complementarias de tratamiento. Qin et al. [146], mostró que la sobreexpresión del miR-182 aumentó significativamente la viabilidad celular, mientras que la inhibición de este miRNA redujo la viabilidad durante el tratamiento con cisplatino. Además, este estudio determinó que en líneas celulares de carcinoma hepatocelular, la sobreexpresión del miR-182 inhibía la expresión del gen supresor de tumores TP53INP1 (proteína nuclear 1 inducida por la proteína tumoral 53). Por lo tanto, los autores proponen que la sobreexpresión del miR-182 promueve la resistencia al cisplatino de las células de carcinoma hepatocelular al inhibir la expresión del gen TP53INP1. Alternativamente, el trabajo realizado por Duan et al. [147] mostró que, en tejidos tumorales y líneas celulares de cáncer de mama, el miR-182-5p presentaba muy bajo niveles de expresión. Además, los autores evaluaron *in vitro* la sobreexpresión de miR-182-5p, determinando que niveles elevados de expresión de este miRNA sensibilizan significativamente las células de cáncer de ovario al cisplatino. En CM, Sharifi et al. [148], mostraron que la inhibición del miR-182-5p reduce la viabilidad de las células de CM MCF-7 debido a la inducción de apoptosis a través de la regulación positiva de la expresión del gen CASP9. En esta tesis, cuando se evaluó el efecto del rs4541843:C>T en la quimioresistencia al cisplatino de células de CM, se observó que en ambas líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, la viabilidad en presencia de cisplatino aumentó significativamente cuando las células fueron transfectadas con el pri-miR-182-C. Por lo tanto, es posible que la sobreexpresión del miR-182-3p como consecuencia de la presencia del alelo G del rs4541843, este participando en la quimioresistencia al cisplatino en la tumorigenesis mamaria. Además, la baja expresión del miR-182-5p observado en las líneas celulares de CM cuando está el alelo C o T presente, podría favorecer también la resistencia al cisplatino como se mostró en el trabajo de Sharifi et al. [148].

Como se ha observado en los antecedentes presentados, el miR-182 afecta la apoptosis celular participando en la tumorigénesis del cáncer. Perilli et al. [139], mostraron que el miR-182 es uno de los miRNA más sobreexpresado en el cáncer colorrectal. Los autores informaron que el aumento de la expresión del miR-182 puede suprimir la apoptosis en líneas celulares de cáncer colorrectal. En CM, el trabajo ya mencionado de Sharifi et al. [148], mostraron que la inhibición del miR-182-5p induce la apoptosis a través de la regulación positiva de la expresión del gen CASP9. Los resultados de esta tesis mostraron que la apoptosis disminuyó significativamente en las células de CM luminal A y triple negativo transfectadas con el pri-miR-182-C. En consecuencia, estos resultados sugieren que la sobreexpresión del miR-182-3p y la baja expresión del miR-182-5p, como consecuencia de la presencia del alelo G del rs4541843, promueven la disminución de la apoptosis celular en la tumorigénesis mamaria.

Existe gran evidencia de que la expresión anormal del miR-182 afecta los procesos de invasión y migración celular. De acuerdo a la literatura, Wallis et al. [149], mostraron que, en cáncer de próstata, la sobreexpresión del miR-182 aumenta la proliferación, migración e invasión de líneas celulares tumorales de próstata mediante la supresión de la expresión de FOXO1. Li et al. [150], informaron que el miR-182-5p se encuentra sobreexpresado en tejidos de cáncer gástrico, mientras que el gen RAB27A muestra bajos niveles de expresión. Los autores sugieren que la regulación positiva de la expresión del miR-182-5p, permite una mayor unión del miRNA al mRNA blanco del gen RAB27A inhibiendo la expresión de este gen y generando como consecuencia aumento significativo de la viabilidad, migración, invasión y mitosis de la línea celular HGC-27. El trabajo de Liu et al. [151], mostró que el miR-182 se encontraba sobreexpresado en células de glioma, mientras que el gen FBXW7 se encontraba disminuido. A través de ensayos funcionales, los autores determinaron que el miR-182 promueve la proliferación celular, la migración, la invasión e inhibe la apoptosis celular en células de glioma al inhibir la expresión del gen FBXW7. En CM, el trabajo ya mencionado de Chiang et al. [145], mostró que, en líneas celulares de CM, la sobreexpresión del miR-182 promueve la proliferación, invasión y migración celular al inhibir la expresión del gen FBXW7. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que en las líneas celulares de CM MCF-7 y MDA-MB-231, la invasión y migración celular aumentaron significativamente en células transfectadas con el pri-miR-182 portador del

alelo C. De acuerdo a los resultados obtenidos y los antecedentes presentados, es posible que la sobreexpresión del miR-182-3p, a consecuencia de la presencia del alelo C del rs4541843, promueva la invasión y migración de células de CM luminal A y triple negativo al inhibir la expresión del gen FBXW7, el cual es un regulador esencial de la metástasis.

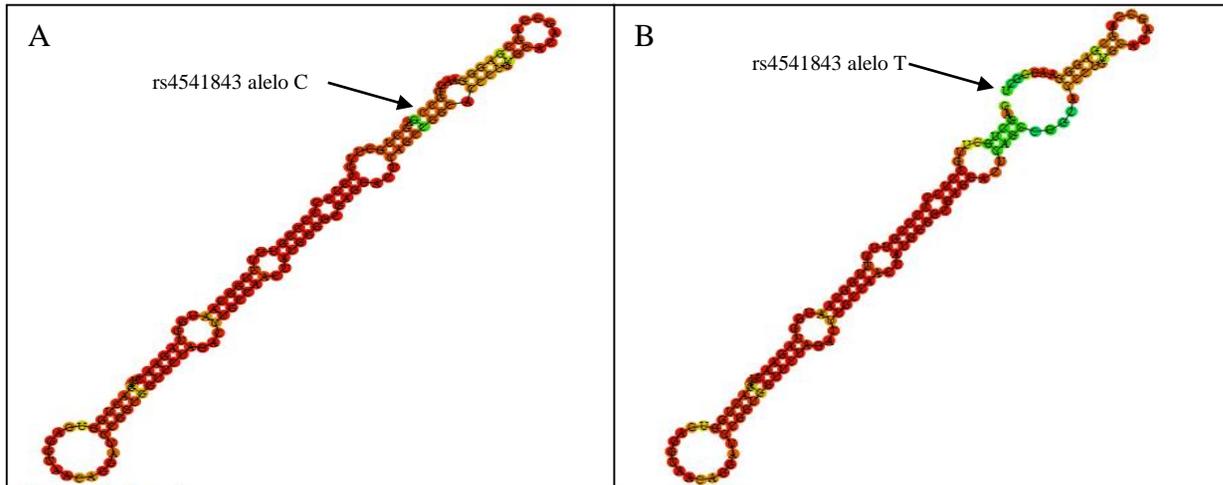


Figura 28. Modelamiento del pri-miRNA-182 en presencia del alelo C (A) y en presencia del alelo T (B). Las estructuras secundarias fueron modeladas a través de la herramienta bioinformática RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

9. CONCLUSIONES

- El estudio funcional demostró que el alelo A del rs6505162:C>A (pre-miR-423) es un alelo de riesgo y participa en la desregulación positiva de diferentes procesos de la tumorigénesis mamaria.

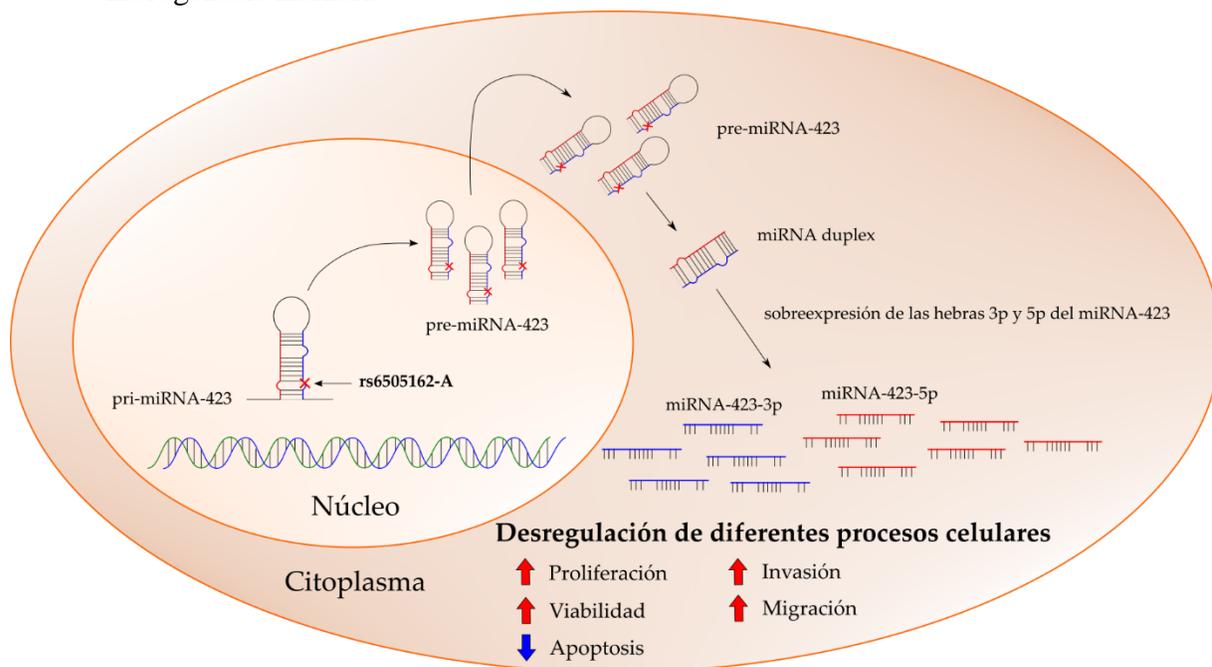


Figura 29. Modelo celular propuesto de los efectos de la presencia del alelo A del rs6505162. La presencia del alelo A aumentaría los niveles de miR-423 maduro 5p y 3p gatillando la desregulación positiva de diferentes procesos funcionales esenciales de la tumorigénesis mamaria.

- El estudio funcional demostró que el alelo G del rs895819:A>G (pre-miR-27a) es un alelo de protección para CM triple-negativo y de riesgo para CM luminal A.

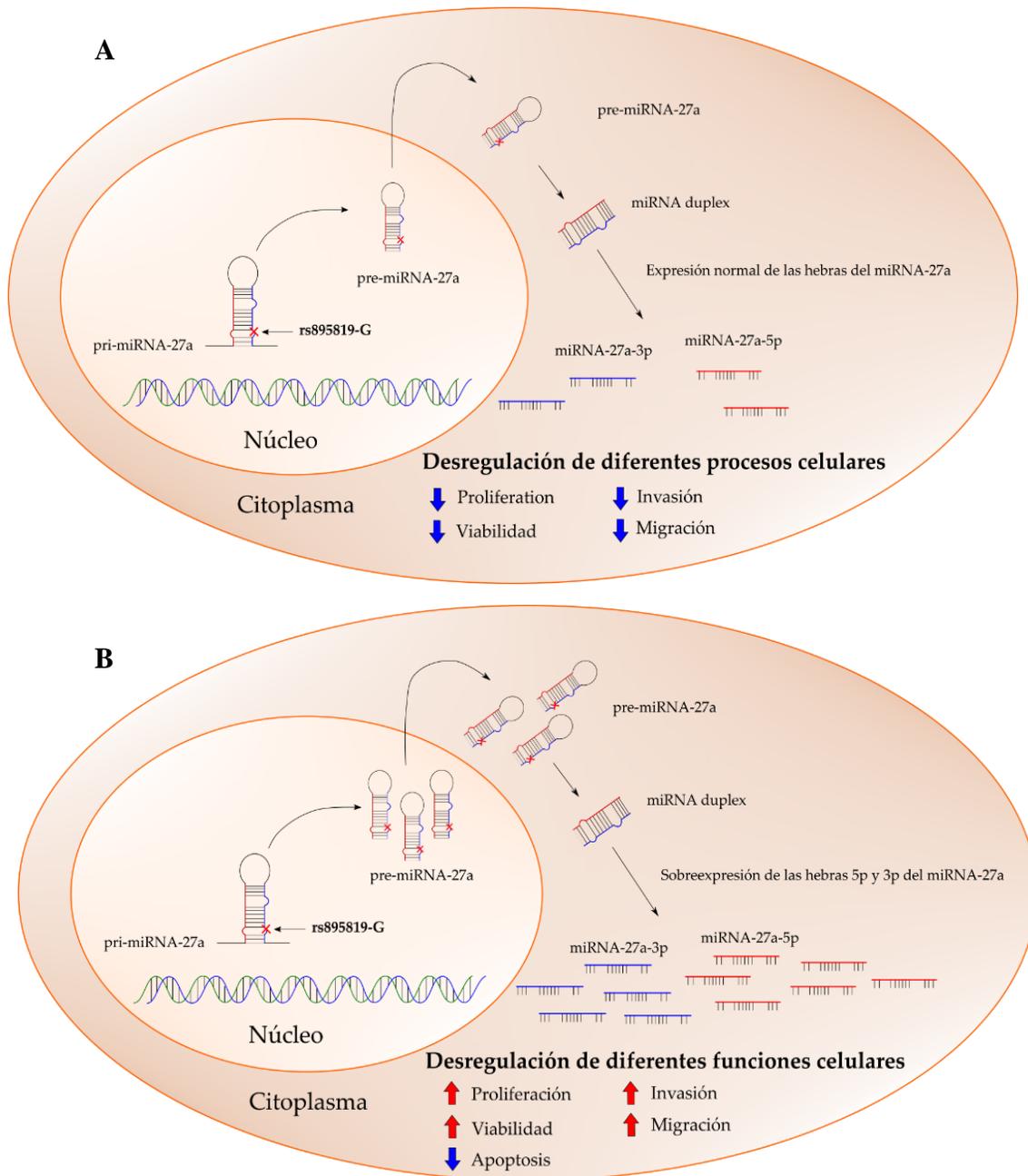


Figura 30. Modelo celular propuesto de los efectos de la presencia del alelo G del rs95819. La presencia del alelo G actuaría de forma dual dependiendo del subtipo molecular CM, desregulando negativamente los procesos funcionales de la tumorigénesis mamaria en CM triple-negativo (A), mientras que este alelo desregula positivamente procesos celulares de la tumorigénesis del CM luminal A (B).

- El estudio funcional demostró que el alelo C del rs4541843:C>T (pri-miR-182) es un alelo de riesgo y participa en diferentes procesos de la tumorigénesis mamaria.

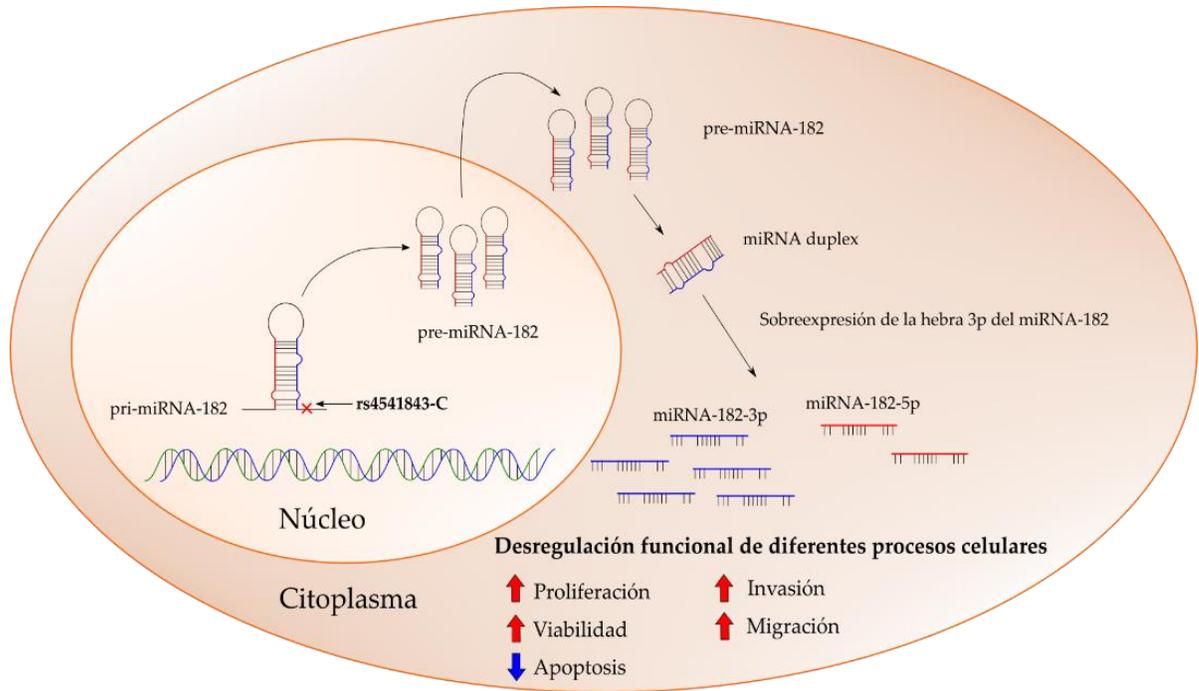


Figura 31. Modelo celular propuesto de los efectos de la presencia del alelo C del rs4541843. La presencia del alelo C aumentaría los niveles de miR-182 maduro 3p gatillando la desregulación positiva de diferentes procesos funcionales esenciales de la tumorigénesis mamaria.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis se podría proponer como estudios futuros los siguientes puntos:

- Caracterizar el rol dual de alelo G del rs895819 en CM luminal A y CM triple-negativo.
- Evaluar los mecanismos por el cuales los SNPs rs6505162, rs895819 y rs4541843 afectan las estructuras precursoras de los miRNAs maduros.
- Evaluar la expresión de posibles genes blancos de los miRNAs miR-423, miR-27a y miR-182 que podrían generar la desregulación de los diferentes procesos celulares.
- Realizar ensayos in vivo para corroborar el efecto de los SNPs rs6505162, rs895819 y rs4541843 observado en las líneas celulares de CM.

11. REREFENCIAS

1. Ginsburg, O., et al., *The role of genomics in global cancer prevention*. Nat Rev Clin Oncol, 2021. **18**(2): p. 116-128.
2. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
3. Oldenburg, R.A., et al., *Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found?* Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **63**(2): p. 125-49.
4. Parkin, D.M. and L.M. Fernandez, *Use of statistics to assess the global burden of breast cancer*. Breast J, 2006. **12 Suppl 1**: p. S70-80.
5. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.
6. Organization, W.H. *Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, Chile, both sexes, all ages*. Cancer Today 2020 [cited 2022 15 of January]; Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=152&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D#collapse-group-0-1.
7. Feng, Y., et al., *Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis*. Genes Dis, 2018. **5**(2): p. 77-106.
8. Singletary, S.E., *Rating the risk factors for breast cancer*. Ann Surg, 2003. **237**(4): p. 474-82.
9. Rojas, K. and A. Stuckey, *Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors*. Clin Obstet Gynecol, 2016. **59**(4): p. 651-672.
10. Ministerio de Salud, G.d.C., *Plan Nacional de Cáncer 2018-2028*, D.d.M.I.d.C.y.o. Tumores, Editor 2019.
11. Coughlin, S.S., *Epidemiology of Breast Cancer in Women*. Adv Exp Med Biol, 2019. **1152**: p. 9-29.
12. Seitz, H.K., et al., *Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012*. Alcohol Alcohol, 2012. **47**(3): p. 204-12.
13. Claus, E.B., N. Risch, and W.D. Thompson, *Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(2): p. 232-42.
14. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
15. Tavtigian, S.V., et al., *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 333-7.
16. Turnbull, C. and N. Rahman, *Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 321-45.
17. Petrovic, N., et al., *MicroRNA in breast cancer: The association with BRCA1/2*. Cancer Biomark, 2017. **19**(2): p. 119-128.
18. Narod, S.A. and W.D. Foulkes, *BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 665-76.
19. Jara, L., et al., *BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American population*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **166**(1): p. 36-45.
20. Easton, D.F., *How many more breast cancer predisposition genes are there?* Breast Cancer Res, 1999. **1**(1): p. 14-7.
21. Jara, L., et al., *Genetic variants in FGFR2 and MAP3K1 are associated with the risk of familial and early-onset breast cancer in a South-American population*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **137**(2): p. 559-69.
22. Gonzalez-Hormazabal, P., et al., *The BARD1 Cys557Ser variant and risk of familial breast cancer in a South-American population*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(8): p. 8091-8.
23. Smith, P., et al., *A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(7): p. 646-55.
24. Ford, D., et al., *Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(3): p. 676-89.

25. Antoniou, A.C., et al., *Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study*. Genet Epidemiol, 2001. **21**(1): p. 1-18.
26. Pharoah, P.D., et al., *Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention*. Nat Genet, 2002. **31**(1): p. 33-6.
27. Stratton, M.R. and N. Rahman, *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. Nat Genet, 2008. **40**(1): p. 17-22.
28. Pharoah, P.D., et al., *Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 850-60.
29. Garcia-Closas, M. and S. Chanock, *Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(24): p. 8000-9.
30. Zavala, V.A., et al., *Genetic Epidemiology of Breast Cancer in Latin America*. Genes (Basel), 2019. **10**(2).
31. Mavaddat, N., et al., *Genetic susceptibility to breast cancer*. Mol Oncol, 2010. **4**(3): p. 174-91.
32. Wendt, C. and S. Margolin, *Identifying breast cancer susceptibility genes - a review of the genetic background in familial breast cancer*. Acta Oncol, 2019. **58**(2): p. 135-146.
33. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
34. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
35. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
36. Alles, J., et al., *An estimate of the total number of true human miRNAs*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(7): p. 3353-3364.
37. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
38. Erson, A.E. and E.M. Petty, *MicroRNAs in development and disease*. Clin Genet, 2008. **74**(4): p. 296-306.
39. Cheng, A.M., et al., *Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(4): p. 1290-7.
40. Xu, P., M. Guo, and B.A. Hay, *MicroRNAs and the regulation of cell death*. Trends Genet, 2004. **20**(12): p. 617-24.
41. Kabekkodu, S.P., et al., *Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018. **93**(4): p. 1955-1986.
42. Treiber, T., N. Treiber, and G. Meister, *Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 5-20.
43. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 402.
44. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
45. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 15004.
46. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
47. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 882-91.
48. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
49. Negrini, M., M.S. Nicoloso, and G.A. Calin, *MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(3): p. 470-9.
50. Iorio, M.V., et al., *Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact*. Breast, 2011. **20** Suppl 3: p. S63-70.
51. Cortez, M.A., et al., *MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(8): p. 467-77.
52. Visone, R., et al., *Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas*. Oncogene, 2007. **26**(54): p. 7590-5.
53. Fabbri, M., et al., *Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(7): p. 1009-19.

54. O'Day, E. and A. Lal, *MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(2): p. 201.
55. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
56. Blenkiron, C., et al., *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol, 2007. **8**(10): p. R214.
57. Iyevleva, A.G., et al., *High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **131**(3): p. 1049-59.
58. Chen, Q.H., Q.B. Wang, and B. Zhang, *Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: a HuGE meta-analysis*. Tumour Biol, 2014. **35**(1): p. 529-43.
59. Hu, Z., et al., *Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women*. Hum Mutat, 2009. **30**(1): p. 79-84.
60. Catucci, I., et al., *Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases*. Hum Mutat, 2010. **31**(1): p. E1052-7.
61. Pastrello, C., et al., *Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients*. Carcinogenesis, 2010. **31**(12): p. 2124-6.
62. Gao, L.B., et al., *The association between two polymorphisms in pre-miRNAs and breast cancer risk: a meta-analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **125**(2): p. 571-4.
63. Garcia, A.I., et al., *The rs2910164:G>C SNP in the MIR146A gene is not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Hum Mutat, 2011. **32**(9): p. 1004-7.
64. Lian, H., L. Wang, and J. Zhang, *Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Hsa-miR-146a Rs2910164 polymorphism in Europeans*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31615.
65. Srivastava, K. and A. Srivastava, *Comprehensive review of genetic association studies and meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50966.
66. Alshatwi, A.A., et al., *Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30049.
67. Dai, T., et al., *miR-423 Promotes Breast Cancer Invasion by Activating NF-kappaB Signaling*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 5467-5478.
68. Xia, W., et al., *MicroRNA-423 Drug Resistance and Proliferation of Breast Cancer Cells by Targeting ZFP36*. Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 769-782.
69. Kontorovich, T., et al., *Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women*. Int J Cancer, 2010. **127**(3): p. 589-97.
70. Morales, S., et al., *Association of single nucleotide polymorphisms in Pre-miR-27a, Pre-miR-196a2, Pre-miR-423, miR-608 and Pre-miR-618 with breast cancer susceptibility in a South American population*. BMC Genet, 2016. **17**(1): p. 109.
71. Zhao, H., et al., *Genetic analysis and preliminary function study of miR-423 in breast cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(6): p. 4763-71.
72. Tang, W., et al., *MIR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51702.
73. Jiang, G., et al., *miR27a promotes human breast cancer cell migration by inducing EMT in a FBXW7dependent manner*. Mol Med Rep, 2018. **18**(6): p. 5417-5426.
74. Ljepoja, B., et al., *MIRNA-27a sensitizes breast cancer cells to treatment with Selective Estrogen Receptor Modulators*. Breast, 2019. **43**: p. 31-38.
75. Ueda, S., et al., *miR-27a ameliorates chemoresistance of breast cancer cells by disruption of reactive oxygen species homeostasis and impairment of autophagy*. Lab Invest, 2020. **100**(6): p. 863-873.
76. Sun, Q., et al., *Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression*. Cancer Sci, 2010. **101**(10): p. 2241-7.
77. Arancibia, T., et al., *Association between single-nucleotide polymorphisms in miRNA and breast cancer risk: an updated review*. Biol Res, 2021. **54**(1): p. 26.
78. Yang, R., et al., *A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **121**(3): p. 693-702.
79. Catucci, I., et al., *The SNP rs895819 in miR-27a is not associated with familial breast cancer risk in Italians*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(2): p. 805-7.
80. Zhang, N., et al., *A genetic variant in pre-miR-27a is associated with a reduced breast cancer risk in younger Chinese population*. Gene, 2013. **529**(1): p. 125-30.

81. Mashayekhi, S., et al., *Effects of miR-27a, miR-196a2 and miR-146a polymorphisms on the risk of breast cancer*. Br J Biomed Sci, 2018. **75**(2): p. 76-81.
82. Parchami Barjui, S., et al., *Study of correlation between genetic variants in three microRNA genes (hsa-miR-146a, hsa-miR-502 binding site, hsa-miR-27a) and breast cancer risk*. Curr Res Transl Med, 2017. **65**(4): p. 141-147.
83. Song, C., et al., *High expression of microRNA-183/182/96 cluster as a prognostic biomarker for breast cancer*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24502.
84. Dambal, S., et al., *The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(15): p. 7173-88.
85. Li, P., et al., *MiR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(6): p. 473.
86. Moskwa, P., et al., *miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors*. Mol Cell, 2011. **41**(2): p. 210-20.
87. Krishnan, K., et al., *MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair*. RNA, 2013. **19**(2): p. 230-42.
88. Mansouri, M., M. Peymani, and P. Mohamadynejad, *A genetic variant in the flanking region of miR-182 could decrease the susceptibility to the breast cancer risk in the Iranian population*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2020. **39**(6): p. 806-817.
89. Jara, L., et al., *Molecular analysis of the eighteen most frequent mutations in the BRCA1 gene in 63 Chilean breast cancer families*. Biol Res, 2004. **37**(3): p. 469-81.
90. Jara, L., et al., *Variants in DNA double-strand break repair genes and risk of familial breast cancer in a South American population*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(3): p. 813-22.
91. Gauderman, W.J., *Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(5): p. 478-84.
92. Jara, L., et al., *[Cleft lip and palate in the Chilean population: association with BamHI polymorphism of the transforming growth factor alpha (TGFA) gene]*. Rev Med Chil, 1993. **121**(4): p. 390-5.
93. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
94. Salzman, D.W. and J.B. Weidhaas, *SNPping cancer in the bud: microRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer*. Pharmacol Ther, 2013. **137**(1): p. 55-63.
95. *Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases*. Anglian Breast Cancer Study Group. Br J Cancer, 2000. **83**(10): p. 1301-8.
96. Ryan, B.M., A.I. Robles, and C.C. Harris, *Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(6): p. 389-402.
97. Chen, P.S., J.L. Su, and M.C. Hung, *Dysregulation of microRNAs in cancer*. J Biomed Sci, 2012. **19**: p. 90.
98. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
99. Nicoloso, M.S., et al., *Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility*. Cancer Res, 2010. **70**(7): p. 2789-98.
100. Yang, W., et al., *Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(1): p. 13-21.
101. Ke, R., et al., *Functional mechanism and clinical implications of MicroRNA-423 in human cancers*. Cancer Med, 2020. **9**(23): p. 9036-9051.
102. Liu, J., et al., *miRNA423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 in gastric cancer cells*. Cancer Lett, 2014. **347**(1): p. 98-104.
103. Hui, A.B., et al., *Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(4): p. 1129-39.
104. Ma, Y., et al., *Identification of miR-423 and miR-499 polymorphisms on affecting the risk of hepatocellular carcinoma in a large-scale population*. Genet Test Mol Biomarkers, 2014. **18**(7): p. 516-24.
105. McDermott, A.M., et al., *Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87032.
106. Xing, J., et al., *Genetic polymorphisms in pre-microRNA genes as prognostic markers of colorectal cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(1): p. 217-27.

107. Lin, J., et al., *MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G(1)/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(11): p. 1641-7.
108. Guan, G., et al., *microRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(9): p. 5683-91.
109. Li, S., et al., *miR-423-5p contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastomas*. *Neuro Oncol*, 2017. **19**(1): p. 55-65.
110. Wang, R., et al., *Overexpression of microRNA-423-3p indicates poor prognosis and promotes cell proliferation, migration, and invasion of lung cancer*. *Diagn Pathol*, 2019. **14**(1): p. 53.
111. Li, J., et al., *MicroRNA-423 promotes proliferation, migration and invasion and induces chemoresistance of endometrial cancer cells*. *Exp Ther Med*, 2018. **16**(5): p. 4213-4224.
112. Lin, H., et al., *Inhibition of miR-423-5p suppressed prostate cancer through targeting GRIM-19*. *Gene*, 2019. **688**: p. 93-97.
113. Tan, H., *The association between gene SNPs and cancer predisposition: Correlation or causality?* *EBioMedicine*, 2017. **16**: p. 8-9.
114. Tan, H., J. Bao, and X. Zhou, *Genome-wide mutational spectra analysis reveals significant cancer-specific heterogeneity*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12566.
115. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **740**: p. 364-78.
116. Zhou, J. and P. Giannakakou, *Targeting microtubules for cancer chemotherapy*. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2005. **5**(1): p. 65-71.
117. Ohtsukasa, S., et al., *Increased expression of CEA and MHC class I in colorectal cancer cell lines exposed to chemotherapy drugs*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003. **129**(12): p. 719-26.
118. Meng, F., et al., *Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(7): p. 2113-29.
119. Yang, H., et al., *MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN*. *Cancer Res*, 2008. **68**(2): p. 425-33.
120. Kong, W., et al., *MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(43): p. 22855.
121. Yu, Z., et al., *miR-17/20 sensitization of breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis requires Akt1*. *Oncotarget*, 2014. **5**(4): p. 1083-90.
122. Zhi, Y., et al., *Regulation and functions of MicroRNA-149 in human cancers*. *Cell Prolif*, 2018. **51**(5): p. e12465.
123. Xu, J., et al., *MicroRNA-423-3p promotes glioma growth by targeting PANX2*. *Oncol Lett*, 2018. **16**(1): p. 179-188.
124. van Zijl, F., G. Krupitza, and W. Mikulits, *Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration*. *Mutat Res*, 2011. **728**(1-2): p. 23-34.
125. Yanokura, M., et al., *MicroRNAs in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications*. *EXCLI J*, 2015. **14**: p. 190-8.
126. Kong, P., et al., *The microRNA-423-3p-Bim Axis Promotes Cancer Progression and Activates Oncogenic Autophagy in Gastric Cancer*. *Mol Ther*, 2017. **25**(4): p. 1027-1037.
127. Chen, X., et al., *TDP-43 regulates cancer-associated microRNAs*. *Protein Cell*, 2018. **9**(10): p. 848-866.
128. Li, Y., et al., *MicroRNA-27a functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by targeting epidermal growth factor receptor*. *Oncol Lett*, 2016. **11**(6): p. 4217-4223.
129. Colangelo, T., et al., *Proteomic screening identifies calreticulin as a miR-27a direct target repressing MHC class I cell surface exposure in colorectal cancer*. *Cell Death Dis*, 2016. **7**: p. e2120.
130. Wang, Q., et al., *Upregulation of miR-27a contributes to the malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by SV40 small T antigen*. *Oncogene*, 2011. **30**(36): p. 3875-86.
131. Li, M., et al., *Transmembrane protein 170B is a novel breast tumorigenesis suppressor gene that inhibits the Wnt/beta-catenin pathway*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(2): p. 91.
132. Li, X., et al., *MiR-27a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Tumors*. *J Cancer*, 2019. **10**(12): p. 2836-2848.
133. Li, W., Z.X. Yu, and B.F. Ma, *The increase of miR-27a affects the role of cisplatin on proliferation and migration capacities of liver cancer cells*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018. **22**(17): p. 5490-5498.
134. Drayton, R.M., et al., *Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine/glutamate exchanger SLC7A11*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(7): p. 1990-2000.

135. Zhou, S., et al., *miR-27a regulates the sensitivity of breast cancer cells to cisplatin treatment via BAK-SMAC/DIABLO-XIAP axis*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(5): p. 6837-45.
136. Tian, Y., et al., *MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 678.
137. Ding, L., et al., *MicroRNA-27a contributes to the malignant behavior of gastric cancer cells by directly targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 2*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017. **36**(1): p. 45.
138. Li, E., K. Han, and X. Zhou, *microRNA-27a-3p Down-regulation Inhibits Malignant Biological Behaviors of Ovarian Cancer by Targeting BTG1*. *Open Med (Wars)*, 2019. **14**: p. 577-585.
139. Perilli, L., et al., *Silencing of miR-182 is associated with modulation of tumorigenesis through apoptosis induction in an experimental model of colorectal cancer*. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 821.
140. Suzuki, R., et al., *miR-182 and miR-183 Promote Cell Proliferation and Invasion by Targeting FOXO1 in Mesothelioma*. *Front Oncol*, 2018. **8**: p. 446.
141. Zheng, J., et al., *mir-182-5p Regulates Cell Growth of Liver Cancer via Targeting RCAN1*. *Gastroenterol Res Pract*, 2021. **2021**: p. 6691305.
142. Zhang, X., et al., *MicroRNA-182 promotes proliferation and metastasis by targeting FOXF2 in triple-negative breast cancer*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(4): p. 4805-4811.
143. Hirata, H., et al., *MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e55502.
144. Li, N., et al., *miR-182-5p Promotes Growth in Oral Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting CAMK2N1*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **49**(4): p. 1329-1341.
145. Chiang, C.H., et al., *MiR-182 promotes proliferation and invasion and elevates the HIF-1alpha-VEGF-A axis in breast cancer cells by targeting FBXW7*. *Am J Cancer Res*, 2016. **6**(8): p. 1785-98.
146. Qin, J., et al., *Upregulated miR-182 increases drug resistance in cisplatin-treated HCC cell by regulating TP53INP1*. *Gene*, 2014. **538**(2): p. 342-7.
147. Duan, L., et al., *MuiR-182-5p functions as a tumor suppressor to sensitize human ovarian cancer cells to cisplatin through direct targeting the cyclin dependent kinase 6 (CDK6)*. *J BUON*, 2020. **25**(5): p. 2279-2286.
148. Sharifi, M. and A. Moridnia, *Apoptosis-inducing and antiproliferative effect by inhibition of miR-182-5p through the regulation of CASP9 expression in human breast cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2017. **24**(2): p. 75-82.
149. Wallis, C.J., et al., *MiR-182 Is Associated with Growth, Migration and Invasion in Prostate Cancer via Suppression of FOXO1*. *J Cancer*, 2015. **6**(12): p. 1295-305.
150. Li, Y., et al., *miR-182-5p improves the viability, mitosis, migration, and invasion ability of human gastric cancer cells by down-regulating RAB27A*. *Biosci Rep*, 2017. **37**(3).
151. Liu, S., et al., *MiR-182 promotes glioma progression by targeting FBXW7*. *J Neurol Sci*, 2020. **411**: p. 116689.

12. ANEXOS

12.1. Cuestionario para pacientes con CM



UNIVERSIDAD DE CHILE

Línea de Investigación: "Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"

Encuesta aplicable a pacientes con cáncer de mama

Ficha N° : _____

Este cuestionario ha sido diseñado para obtener un perfil general de su estado de salud presente y pasado. Le agradeceremos nos conteste las preguntas en la forma más precisa que usted pueda. Si es necesario indíquenos cualquier comentario adicional. Si existe alguna pregunta que no quiera contestar déjela en blanco. Toda su información será mantenida en forma confidencial.

1. Fecha : ____ ____ ____
2. Nombre y apellidos : _____
3. Dirección : _____ Ciudad _____
4. Teléfono : Casa _____ Trabajo _____
5. Fecha de Nacimiento : ____ ____ ____
6. Lugar de Nacimiento : Ciudad _____ País _____

HISTORIA FAMILIAR

7. Aparte de Chile, ¿ Sabe usted de dónde vienen sus ancestros o si hay origen indígena en su familia?

Lado materno: _____ Lado paterno: _____

8. En hoja siguiente

8.	Nombre	Año de nacimiento	Si alguno de sus parientes ha tenido cáncer indique el tipo	Edad del diagnóstico	Año y lugar de defunción
Padre :					
Madre					
Hermanas y Hermanos					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				
Hijos del primer matrimonio					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				
Hijos del segundo matrimonio					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				

8.	Nombre	Fecha de nacimiento	Tipo de cáncer	Edad de diagnóstico	Año y lugar de defunción
	Abuela materna: _____				
	Abuelo materno: _____				
	Abuela paterna: _____				
	Abuelo paterno: _____				
Hermanos y hermanas de su madre					
	1. _____				
	2. _____				
	3. _____				
	4. _____				
	5. _____				
Hermanos y hermanas de su padre					
	1. _____				
	2. _____				
	3. _____				
	4. _____				
	5. _____				
Otros miembros de la familia diagnosticados con Cáncer					
	1. _____				
	2. _____				
	3. _____				

9. Además del cáncer de mama... ¿existen otras enfermedades que ocurran en forma frecuente en su familia? ¿Existe algún familiar que tenga una enfermedad genética?

- Sí No → vaya a la pregunta N° 10

Si su respuesta es Sí, indique el diagnóstico y cuántos miembros de su familia tienen esta enfermedad: _____

HISTORIA CLINICA

10.

- a) Edad de menarquia: _____ años Nunca ha menstruado
- b) Su menarquia fue natural: Sí → Siga en la pregunta 11 No
- c) ¿Por qué razón usted nunca ha menstruado o por que el inicio del período no fue natural?

Si usted nunca ha menstruado pase a la pregunta 15.

11. Las siguientes preguntas son relacionadas con la regularidad de su período menstrual, "Regular" significa que su período ocurre una vez al mes, usted puede predecir más o menos con cuatro días de anticipación y cada período dura más o menos el mismo número de días.

- Siempre ocurre en forma regular
- Son generalmente regulares
- Son generalmente irregulares
- Son siempre irregulares

12. ¿Cuál es su condición menstrual actual?

- Menstruando (premenopáusica)
- Embarazada
- Lactancia
- Amenorrea crónica
- Histerectomía parcial. Edad de la cirugía ____ años
- Histerectomía completa (útero y ovarios removidos). Edad de la cirugía: ____ años
- Menopausia natural Edad ____ años
- Otros (especificar): _____

13. ¿Cuántas veces ha estado usted embarazada, incluyendo nacidos vivos, abortos espontáneos o inducidos, mortinatos, embarazos ectópicos e indique si usted está embarazada actualmente.

_____ Embarazos Nunca → Vaya a la pregunta 14

Conteste las siguientes preguntas para cada uno de sus embarazos:

	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
En qué año comenzó o en qué año finalizó el										
¿Cuántos meses tenía el embarazo?										
Si su embarazo llegó a término fue										
Nacimiento único										
Nacimiento múltiple										
Mortinato										
Aborto										
Embarazo tubario o ectópico										
Aborto terapéutico										
Tuvo DIUC durante su embarazo (S o N)										
Para los nacidos vivos responda lo siguiente										
Sexo (F o M)										
¿Le dio pecho a sus hijos? (S o N)										
Si amamantó, ¿por cuánto tiempo lo hizo?										
¿Intentó usted amamantar, pero tuvo dificultades al hacerlo? (S o N)										

14. a) ¿Ha tenido usted problemas para embarazarse?
- Si No
- b) ¿Le informó a usted un médico que podría tener problemas para embarazarse?
- Si No
- c) ¿Qué conversó con su médico?
- Problemas en los ovarios o en la ovulación
- Obstrucción de trompas
- Problemas en la forma o tamaño del útero
- Endometriosis
- Problemas con el cuello del útero
- Problemas de pareja
- Otros (especificar)
- d) ¿Ha tomado usted medicamentos para embarazarse?
- Si No → Vaya a la pregunta 15
- e) Si es si, por favor dé detalles acerca del tratamiento usado

Nombre del medicamento	Año y fecha del tratamiento		Razones del uso
	Inicio	Final	

15. a) ¿Ha usado anticonceptivos para evitar embarazo o por otras razones, entre estas la regulación del ciclo menstrual?
- Si No → Vaya a la pregunta 16
- b) Si es si, ¿a qué edad los tomó por primera vez?. Si usted ha iniciado, suspendido y reiniciado el tratamiento, ¿por cuánto tiempo en total lo ha usado?
- _____ años _____ meses

16. Muchas mujeres han tomado medicamentos que contienen estrógenos, progestinas u otras hormonas femeninas. Los medicamentos pueden ser administrados como comprimidos, de depósito, cremas o supositorios vaginales. Estos medicamentos son indicados por muchas razones tales como: regular los períodos, detener sangramientos irregulares, aliviar los síntomas menopáusicos o como terapia de reemplazo después de la remoción ovárica, para evitar la osteoporosis. ¿Además de los anticonceptivos, ha tomado usted hormonas femeninas?

Si No → Vaya a la pregunta 17

- b) Si es si, de detalles acerca de las hormonas femeninas que usted ha tomado:

Nombre del medicamento	Año y fecha del tratamiento		Razones del uso
	Inicio	Final	

- c) ¿Qué otras drogas ha utilizado usted para el tratamiento de cáncer de mama?

17. a) ¿Le informó a usted un médico que podría tener un desbalance o problema endocrino?

Si No → Vaya a la pregunta 18

- b) Si es si dé detalles acerca del diagnóstico médico

¿Qué le dijo?	¿Qué edad tenía usted?

18. a) ¿Le informó a usted un médico que tenía cáncer?

Si No → Vaya a la pregunta 19

- b) Si es si, dé detalles acerca del diagnóstico médico

¿Dónde estaba localizado su cáncer?	¿Qué edad tenía usted?

19. a) ¿Le informó a usted un médico que tenía un tumor no canceroso o un nódulo?

Si No

b) Si es si, dé detalles acerca del diagnóstico médico

¿Dónde estaba localizado el tumor?	¿Qué edad tenía usted?

20. a) ¿Le han realizado una biopsia o cirugía mamaria?

Si No → Vaya a la pregunta 21

b) Si es si, dé la siguiente información de cada cirugía mamaria (incluyendo la biopsia)

Fecha de cirugía	Hospital o ciudad	¿Cuál mama?	Resultados de la cirugía (maligna, benigna o incierta)

21. a) ¿Quién es su médico?

Nombre: _____

Dirección: _____ Ciudad: _____

b) ¿Sabe su médico si hay historia familiar de cáncer en su familia?

Si No

22. ¿Tiene usted alguna pregunta o comentario acerca de este estudio o de este cuestionario?

Agentes medioambientales

23. ¿Usted bebe alcohol? Si No
- a) Si es sí, ¿Con qué frecuencia usted bebe? :
- Menos de un trago por semana
 - 1 a 4 tragos por semana
 - 5 a 10 tragos por semana
 - Más de 10 tragos por semana
24. a) ¿Es usted fumadora?
- Nunca ha fumado → Vaya a la pregunta 25
 - Sí, en el pasado, pero ahora no
 - Sí, fumadora frecuente
- b) ¿Cuántos cigarrillos fuma usted al día? _____
- c) ¿Por cuántos años ha fumado? _____
- d) ¿A qué edad empezó a fumar? _____
- e) ¿A qué edad dejó de fumar? _____
25. Exposición a rayos X o a otras radiaciones
- a) ¿Ha trabajado en lugares donde se usen rayos X u otros elementos radioactivos (hospitales, clínicas, clínicas dentales, laboratorios de investigación)
- Si No
- b) Si es sí, ¿Qué tipo de trabajo? _____
- c) Indique las fechas: _____
- d) Ha estado expuesta a rayos X por razones médicas? Si No
- e) Si es sí, explique: _____

26. Exposición a químicos

- a) ¿Se ha expuesto a cancerígenos o a tóxicos químicos? Sí No
- b) Si es sí, ¿a qué compuestos? _____
- c) ¿Bajo qué circunstancias se expuso? _____
- d) Indique las fechas: _____
- e) ¿Por cuánto tiempo se expuso? _____

12.2. Cuestionario para mujeres sanas



UNIVERSIDAD DE CHILE

Línea de Investigación: "Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"
Encuesta aplicable a individuos sanos sin antecedentes de familiares de cáncer

Ficha N° : _____

Esta es una encuesta de carácter CONFIDENCIAL. Le agradeceremos que conteste en la forma más precisa posible. Si tiene alguna duda, por favor pregunte al encuestador. Anote cualquier comentario adicional. Si no desea contestar, deje el espacio en blanco.

1. Fecha : ____ / ____ / _____
2. RUT: : _____ - ____
3. Apellidos y Nombres : _____
4. Dirección : _____ Ciudad _____
5. Teléfonos : Casa _____ Trabajo _____
6. Fecha de Nacimiento : ____ / ____ / _____ Edad _____
7. Lugar de Nacimiento : Ciudad _____ País _____

Encuesta aplicada por: _____

HISTORIA FAMILIAR

8. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido Cáncer de Mama?

Si _____

No _____

9. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido Cáncer de Ovario?

Si _____

No _____

10. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido Cáncer de Próstata?

Si _____

No _____

11. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido otro tipo de cáncer?

Si _____

No _____

12. Si su respuesta es **Si**, complete los siguientes datos:

(1) Nombre de su familiar : _____
Grado de Parentesco : _____
(Ejemplo: Padres, Tíos, etc).
Tipo de Cáncer : _____
Edad al momento del diagnóstico: _____

(2) Nombre de su familiar : _____
Grado de Parentesco : _____
Tipo de Cáncer : _____
Edad al momento del diagnóstico: _____

(3) Nombre de su familiar : _____
Grado de Parentesco : _____
Tipo de Cáncer : _____
Edad al momento del diagnóstico: _____

11.3. Aprobación de Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

(Documento en versión 2 corregida 28.05.2018)

Con fecha 10 de Marzo 2020, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Dra. Lucia Cifuentes O., Médico Genetista, Vicepresidente Subrogante
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular
Dra. Maria Angela Delucchi Bicocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.
Dr. Miguel O’Ryan, Médico Infectólogo
Prof.ª Maria Luz Bascuñán Psicóloga PhD, Prof. Asociado
Sra. Karima Yarmuch G., Abogada
Srta. Javiera Cobo R., Nutricionista, Secretaria Ejecutiva

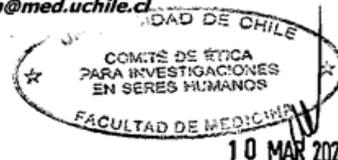
Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **MOLECULAR PROFILING OF BREAST CANCER: SEQUENCE VARIATION IN NEW HEREDITARY BREAST CANCER, DRIVER AND MIRNAS GENES AS BIOMARKERS OF PREDISPOSITION, THERAPEUTICS AND ITS ROLE IN CELL TRANSFORMATION.** Cuyo investigador responsable es la Dra. Lilian Jara Sosa, Quien desarrolla labores en el Programa de Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto Concursable Fondecyt Regular
- Cv del Investigador y Co-investigadores
- Consentimientos Informados
- Carta Compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado este

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl





UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES

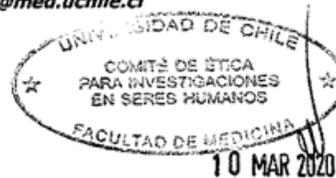
Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población a estudiar (cautivo/no cautiva; investigación terapéutico/no terapéutica: En lo que respecta al estudio con muestras humanas, se presenta un estudio analítico observacional (caso-control), retrospectivo y prospectivo (hay muestras de pacientes y controles ya obtenidas con sus datos clínicos y familiares ya registrados y, además, se reclutarán más pacientes y controles para obtener los datos clínicos, familiares y muestras de sangre).
- b) Utilidad del proyecto: Útil
- c) Riesgos y beneficios: El estudio no es intervencional. Los riesgos son mínimos y consisten en aquellos propios de una toma de muestra de sangre realizada por un/a profesional.
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Sí
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: El estudio no es intervencional. Solo se consideran riesgos asociados a la toma de muestra de sangre que se explicitan y abordan adecuadamente
- f) Compromiso del investigador responsable en la notificación de los resultados del estudio al finalizar el proyecto: Se adjunta carta compromiso firmada por la investigadora responsable.
- g) Requiere seguimiento Visita en terreno: Si No Tiempo estimado:
Nº de vistas:

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó los correspondientes documentos de Consentimiento Informado en su versión modificada recibida el 29 de Enero 2020, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por este CEISH.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl





UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES

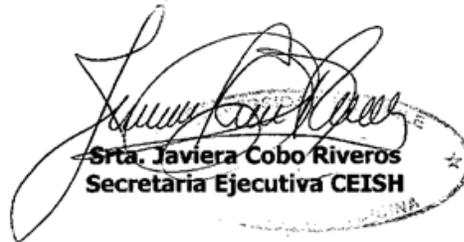
Sin perjuicio de lo anterior, según lo establecido en el artículo 10 bis del D.S N° 114 de 2011, del Ministerio de Salud que aprueba el reglamento de la ley N° 20.120; es preciso recordar que toda investigación científica en seres humanos deberá contar con la autorización expresa del o de los directores de los establecimientos dentro de los cuales se efectúe, la que deberá ser evacuada dentro del plazo de 20 días hábiles contados desde la evaluación conforme del CEISH, siendo de responsabilidad del investigador enviar a este Comité una copia de la misma dentro del plazo señalado.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de **3 años** a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio:

- Programa de Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.


Srta. Javiera Cobo Riveros
Secretaría Ejecutiva CEISH

Santiago, 10 de Marzo de 2020.

Proyecto: N° 222-2019
Archivo acta: N° 193

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



12.4. Consentimiento Informado para casos de CM

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CASOS

TITULO DEL PROYECTO

"PERFÍL MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: Variación de secuencia en nuevos genes para cáncer de mama hereditario, genes driver y genes de microRNAs como biomarcadores de predisposición, tratamiento y su rol en la transformación celular".

Nombre del Investigador principal: Lilian Jara Sosa

R.U.T.: 5.664.521-7

Institución: Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Teléfonos:

Lilian Jara Sosa

Universidad de Chile

Tel.: 229786458

Lilian Jara Sosa

Personal

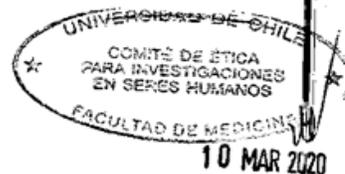
Tel.: 998292094

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación: "PERFÍL MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: Variación de secuencia en nuevos genes para cáncer de mama hereditario, genes driver y genes de microRNAs como biomarcadores de predisposición, tratamiento y su rol en la transformación celular", debido a la necesidad de mejorar los actuales métodos de diagnóstico y tratamientos para esta enfermedad.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivos: realizar un estudio genético para identificar mutaciones en genes que participan en el desarrollo de cáncer de mama. El estudio incluirá un número total de 600 muestras de ADN de individuos con cáncer de mama familiar y un número de 1500 muestras de ADN de individuos sanos sin la enfermedad y sin historia familiar de ciertos tipos de cáncer.

Procedimientos: Si usted acepta participar en este estudio, se le solicitará lo siguiente:

1. Responder una encuesta en la cual se incluyen un conjunto de preguntas relacionadas con su historia médica, historia reproductiva y preguntas relacionadas con factores pronósticos.
2. Si a usted le hubieran diagnosticado algún tipo de cáncer o si ha tenido alguna cirugía profiláctica, le pediremos que firme una autorización para obtener datos clínicos sobre su patología, informes de biopsia y muestras de tejido que hayan sido guardadas en el hospital donde le realizaron la cirugía.



3. Le solicitaremos que done una muestra de sangre, la que será tomada por una enfermera, de una vena de su brazo. Se acordará con usted la fecha y hora de la toma de muestra, la que, si usted lo desea, se podría realizar en su domicilio.

Riesgos:

Riesgo de la Toma de Muestra: La toma de la muestra de sangre puede causar alguna incomodidad. Sin embargo, la enfermera tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades de que esto ocurra.

Tensión y Ansiedad: Es posible que a usted le inquiete discutir su historia médica y familiar respecto al cáncer. Es posible que este estudio nos dé información respecto de las posibilidades de desarrollar cáncer de otros miembros de su familia. Si el resultado indicara presencia o ausencia de una alteración relacionada con probabilidad de desarrollar cáncer, el conocer esta información podría causarle emoción y/o ansiedad. Algunos de los investigadores conversarán con usted para aclarar sus problemas, si existen.

Costos: Los procedimientos que se me realizarán serán gratuitos y corresponden a: una encuesta y la toma de una muestra de sangre.

Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

Beneficios Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento, el propósito de este estudio es examinar el papel que tienen los genes y qué hacen que algunas mujeres sean más susceptibles a enfermar de cáncer de mama que otras. A veces los genes cambian o se alteran. En otros países existen estudios genéticos clínicos que detectan estas alteraciones permitiendo el diagnóstico temprano de la enfermedad. Sin embargo, la genética de los individuos es diferente en cada país y estos estudios podrían no ser efectivos en pacientes chilenos. Los resultados de este estudio suministrarán información sobre la genética del cáncer de mama de pacientes chilenos que podría llevar a la generación de estudios genéticos clínicos específicos para pacientes chilenos permitiendo el diagnóstico más temprano y tratamiento más exitoso de la enfermedad.

Si participa en el estudio, será posible determinar si ha heredado o no un gen alterado.

¿Desea Ud. conocer si el resultado del examen demuestra alguna alteración en los genes que puedan ser responsables de su cáncer?



Si No

Se responderán todas las preguntas que usted realice. La información obtenida será remitida a su médico tratante para que se considere con fines terapéuticos.

Compensación: Por su condición de voluntario Ud. no recibirá ninguna compensación económica directa por el sólo hecho de participar en el estudio.

Confidencialidad: Los datos de la entrevista y los resultados del estudio genético, sólo serán entregados a las personas participantes si lo solicitan y no se entregará información ni a familiares ni a ninguna otra persona. Sólo los miembros del grupo de investigación se contactarán con los participantes y tendrán acceso a la información. Cada participante tendrá un código, el que se establecerá previo a la obtención de los datos. Los archivos se guardan bajo llave. Los datos que se publiquen no revelarán la identidad de los participantes. El personal de colaboración será entrenado para que observe un comportamiento ético respecto de la información. Una vez cumplidos los objetivos de la presente investigación, las muestras serán almacenadas en un contenedor sellado a -80°C.

Información adicional: Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

Voluntariedad: La participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede retirarse de él en cualquier momento que lo desee. Puede no contestar preguntas de la encuesta, si así lo desea. Si una persona se retira del estudio o no desea participar en alguna etapa, no se le negarán los resultados que ya se hayan obtenido. A cada participante se le entregará una copia del consentimiento informado.

Complicaciones: La veno-punción para la toma de muestras de sangre posee consecuencias leves las cuales pueden presentarse como un hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel) y/o punciones múltiples para localizar la vena. Cualquier otro efecto que Ud. considere que pueda derivarse de los procedimientos practicados deberá comunicarlo a la Dra. Lilian Jara, Genetista, ubicada en Avenida Independencia N° 1027, fono fijo 229786458 o 229786166.

Derechos del participante: Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio o bien conocer los resultados puede comunicarse con:

Investigador: Lilian Jara Sosa – fono: 229786458 o 229786166



En el caso de que Ud. necesite realizar el examen genético a un familiar, puede comunicarse con:

Investigador: Lilian Jara Sosa – fono: 229786458 o 229786166

Autoridad de la Institución: Dr. Juan Diego Maya – fono: 229786067

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "PERFÍL MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: Variación de secuencia en nuevos genes para cáncer de mama hereditario, genes driver y genes de microRNAS como biomarcadores de predisposición, tratamiento y su rol en la transformación celular".

Nombre del Participante
Rut.

Firma

Fecha

Nombre de Director
de Institución o Delegado
Art. 11 Ley 20120
Rut.

Firma

Fecha



Nombre del investigador
Rut.

Firma

Fecha

Cuando Corresponda:

LEY 20.584. REGULA LOS DERECHOS Y DEBERES QUE TIENEN LAS PERSONAS EN RELACIÓN CON ACCIONES VINCULADAS A SU ATENCIÓN EN SALUD.

De los derechos de las personas con discapacidad psíquica o intelectual.

Artículo 28.- "Ninguna persona con discapacidad psíquica o intelectual que no pueda expresar su voluntad podrá participar en una investigación científica. En los casos en que se realice investigación científica con participación de personas con discapacidad psíquica o intelectual que tengan la capacidad de manifestar su voluntad y que hayan dado consentimiento informado, además de la evaluación ético científica que corresponda, será necesaria la autorización de la Autoridad Sanitaria competente, además de la manifestación de voluntad expresa de participar tanto de parte del paciente como de su representante legal. En contra de las actuaciones de los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".



12.5. Consentimiento Informado para Individuos Sanos

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INDIVIDUOS SANOS

TITULO DEL PROYECTO

"PERFÍL MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: Variación de secuencia en nuevos genes para cáncer de mama hereditario, genes driver y genes de microRNAs como biomarcadores de predisposición, tratamiento y su rol en la transformación celular".

Nombre del Investigador principal: Lilian Jara Sosa
R.U.T.: 5.664.521-7
Institución: Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Teléfonos:

Lilian Jara Sosa	Universidad de Chile	Tel.: 229786458
Lilian Jara Sosa	Personal	Tel.: 998292094

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación: "PERFÍL MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: Variación de secuencia en nuevos genes para cáncer de mama hereditario, genes driver y genes de microRNAs como biomarcadores de predisposición, tratamiento y su rol en la transformación celular", debido a la necesidad de mejorar los actuales métodos de diagnóstico y tratamientos para esta enfermedad.

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivos: realizar un estudio genético para identificar mutaciones en genes que participan en el desarrollo de cáncer de mama. Para este fin, el estudio incluirá un número total de 600 muestras de ADN de individuos con cáncer de mama familiar y un número de 1500 muestras de ADN de individuos sanos sin la enfermedad y sin historia familiar de ciertos tipos de cáncer.

Procedimientos: Si usted acepta participar en este estudio, se le solicitará lo siguiente:

1. Responder una encuesta en la cual se incluyen un conjunto de preguntas relacionadas con su historia familiar respecto de cáncer, con el objeto de confirmar que Ud. no posee antecedentes familiares de cáncer en su familia.
2. Le solicitaremos que done una muestra de sangre, la que será tomada por una enfermera, de una vena de su brazo. Se acordará con usted la fecha y hora de la toma de muestra, la que, si usted lo desea, se podría realizar en su domicilio.

Riesgos:



Riesgo de la Toma de Muestra: La toma de la muestra de sangre puede causar alguna incomodidad. Sin embargo, la enfermera tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades de que esto ocurra.

Costos: Los procedimientos que se me realizarán serán gratuitos y corresponden a: una encuesta y la toma de una muestra de sangre.

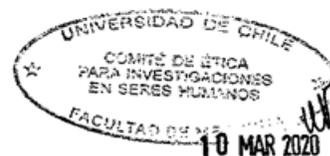
Beneficios Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento, el propósito de este estudio es examinar el papel que tienen los genes y qué hacen que algunas mujeres sean más susceptibles a enfermarse de cáncer de mama que otras. A veces los genes cambian o se alteran. En otros países existen estudios genéticos clínicos que detectan estas alteraciones permitiendo el diagnóstico temprano de la enfermedad. Sin embargo, la genética de los individuos es diferente en cada país y estos estudios podrían no ser efectivos en pacientes chilenos. Los resultados de este estudio suministrarán información sobre la genética del cáncer de mama de pacientes chilenos que podría llevar a la generación de estudios genéticos clínicos específicos para pacientes chilenos permitiendo el diagnóstico más temprano y tratamiento más exitoso de la enfermedad.

Compensación: Por su condición de voluntario Ud. no recibirá ninguna compensación económica directa por el sólo hecho de participar en el estudio.

Confidencialidad: Los datos de la entrevista y los resultados del estudio genético, sólo serán entregados a las personas participantes si lo solicitan y no se entregará información ni a familiares ni a ninguna otra persona. Sólo los miembros del grupo de investigación se contactarán con los participantes y tendrán acceso a la información. Cada participante tendrá un código, el que se establecerá previo a la obtención de los datos. Los archivos se guardan bajo llave. Los datos que se publiquen no revelarán la identidad de los participantes. El personal de colaboración será entrenado para que observe un comportamiento ético respecto de la información. Una vez cumplidos los objetivos de la presente investigación, las muestras serán almacenadas en un contenedor sellado a -80°C.

Voluntariedad: La participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede retirarse de él en cualquier momento que lo desee. Puede no contestar preguntas de la encuesta, si así lo desea. Si una persona se retira del estudio o no desea participar en alguna etapa, no se le negarán los resultados que ya se hayan obtenido. A cada participante se le entregará una copia del consentimiento informado.

Complicaciones: La veno-punción para la toma de muestras de sangre posee consecuencias leves las cuales pueden presentarse como un hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel) y/o punciones múltiples para localizar la vena. Cualquier otro efecto que Ud. considere que pueda derivarse de los



procedimientos practicados deberá comunicarlo a la Dra. Lilian Jara, Genetista, ubicada en Avenida Independencia N° 1027, fono fijo 229786458 o 229786166.

Derechos del participante: Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio o bien conocer los resultados puede comunicarse con:

Investigador: Lilian Jara Sosa – fono: 229786458 o 229786166
Autoridad de la Institución: Dr. Juan Diego Maya – fono: 229786067

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-9789536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "PERFÍL MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: Variación de secuencia en nuevos genes para cáncer de mama hereditario, genes driver y genes de microRNAs como biomarcadores de predisposición, tratamiento y su rol en la transformación celular".

Nombre del Participante
Rut.

Firma

Fecha

Nombre de Director
de Institución o Delegado
Art. 11 Ley 20120
Rut.

Firma

Fecha



Nombre del investigador
Rut.

Firma

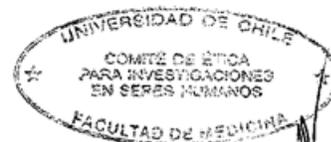
Fecha

Cuando Corresponda:

LEY 20.584. REGULA LOS DERECHOS Y DEBERES QUE TIENEN LAS PERSONAS EN RELACIÓN CON ACCIONES VINCULADAS A SU ATENCIÓN EN SALUD.

De los derechos de las personas con discapacidad psíquica o intelectual.

Artículo 28.- "Ninguna persona con discapacidad psíquica o intelectual que no pueda expresar su voluntad podrá participar en una investigación científica. En los casos en que se realice investigación científica con participación de personas con discapacidad psíquica o intelectual que tengan la capacidad de manifestar su voluntad y que hayan dado consentimiento informado, además de la evaluación ética científica que corresponda, será necesaria la autorización de la Autoridad Sanitaria competente, además de la manifestación de voluntad expresa de participar tanto de parte del paciente como de su representante legal. En contra de las actuaciones de los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".



10 MAR 2020

12.6. Consentimiento Informado para el estudio de otros genes

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE OTROS GENES RELACIONADOS CON CÁNCER DE MAMA

Nombre del Investigador principal: Lilian Jara Sosa
R.U.T.: 5.664.521-7
Institución: Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Teléfonos:

Lilian Jara Sosa	Universidad de Chile	Tel.: 229786458
Lilian Jara Sosa	Personal	Tel.: 998292094

He aceptado participar en el proyecto **“PERFÍL MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: Variación de secuencia en nuevos genes para cáncer de mama hereditario, genes driver y genes de microRNAs como biomarcadores de predisposición, tratamiento y su rol en la transformación celular”** contestando una encuesta y donando una muestra de sangre. Se me ha solicitado que mi muestra sea utilizada para estudiar otros genes vinculados al cáncer de mama, además de los señalados en el presente proyecto de investigación.

- Sí, acepto
- No acepto

Derechos del participante: Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio o bien conocer los resultados puede comunicarse con:

Investigador: Lilian Jara Sosa – fono: 229786458 o 229786166

Autoridad de la Institución: Dr. Juan Diego Maya – fono: 229786067

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del “Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos”, Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.



Nombre del Participante
Rut.

Firma

Fecha

Nombre de Director
de Institución o Delegado
Art. 11 Ley 20120
Rut.

Firma

Fecha

Nombre del investigador
Rut.

Firma

Fecha

Cuando Corresponda:

LEY 20.584. REGULA LOS DERECHOS Y DEBERES QUE TIENEN LAS PERSONAS EN RELACIÓN CON ACCIONES VINCULADAS A SU ATENCIÓN EN SALUD.

De los derechos de las personas con discapacidad psíquica o intelectual.

Artículo 28.- "Ninguna persona con discapacidad psíquica o intelectual que no pueda expresar su voluntad podrá participar en una investigación científica. En los casos en que se realice investigación científica con participación de personas con discapacidad psíquica o intelectual que tengan la capacidad de manifestar su voluntad y que hayan dado consentimiento informado, además de la evaluación ética científica que corresponda, será necesaria la autorización de la Autoridad Sanitaria competente, además de la manifestación de voluntad expresa de participar tanto de parte del paciente como de su representante legal. En contra de las actuaciones de los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".



12.7. Figuras

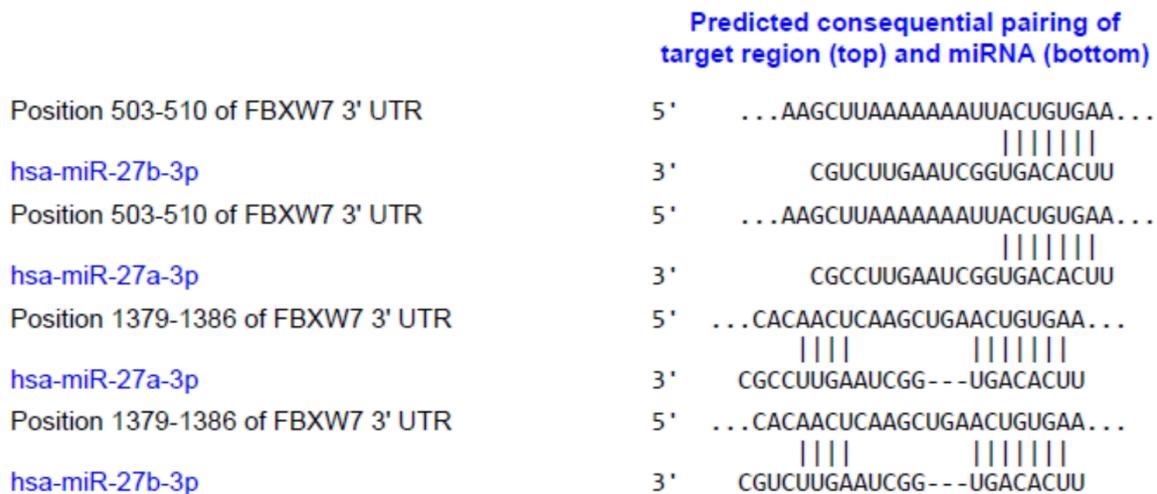


Figura 1. Predicción bioinformática de la unión del miR-27a-3p al mRNA del gen FBXW7 utilizando la base de datos de TargetScan.

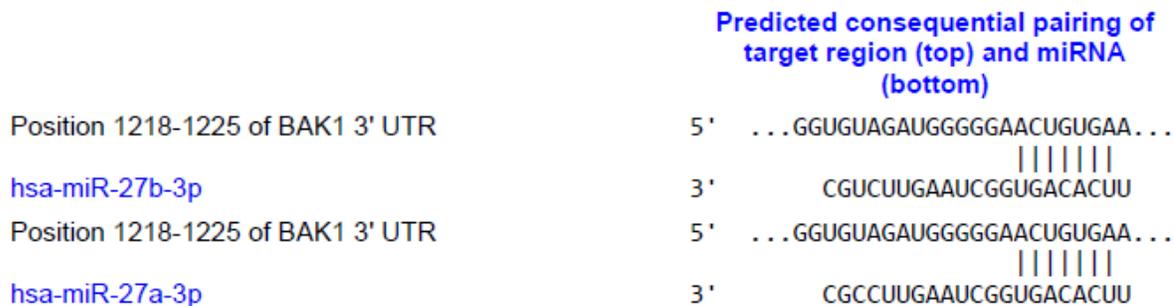


Figura 2. Predicción bioinformática de la unión del miR-27a-3p al mRNA del gen BAK1 utilizando la base de datos de TargetScan.

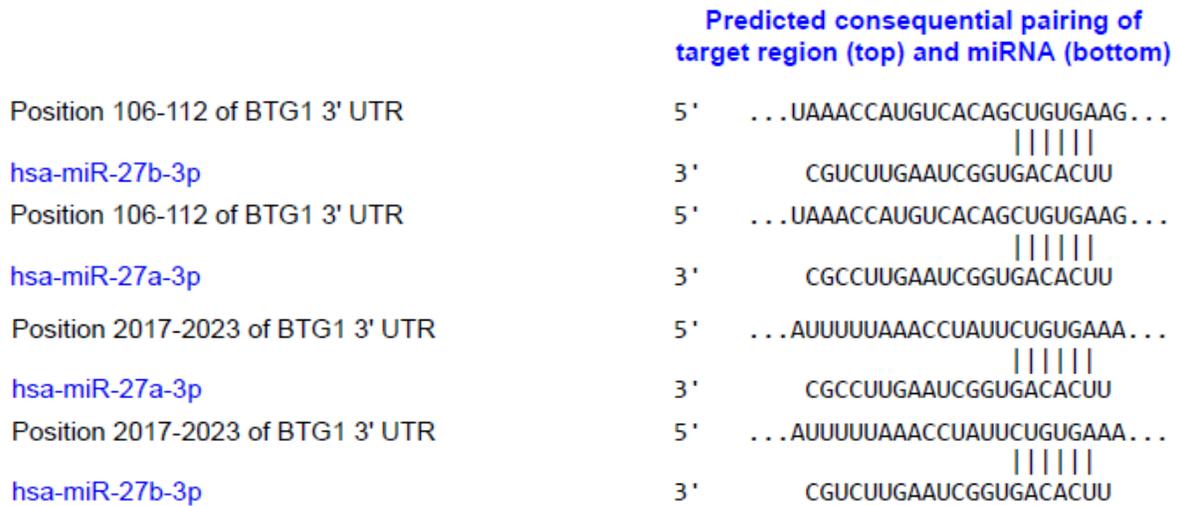


Figura 3. Predicción bioinformática de la unión del miR-27a-3p al mRNA del gen BTG1 utilizando la base de datos de TargetScan.

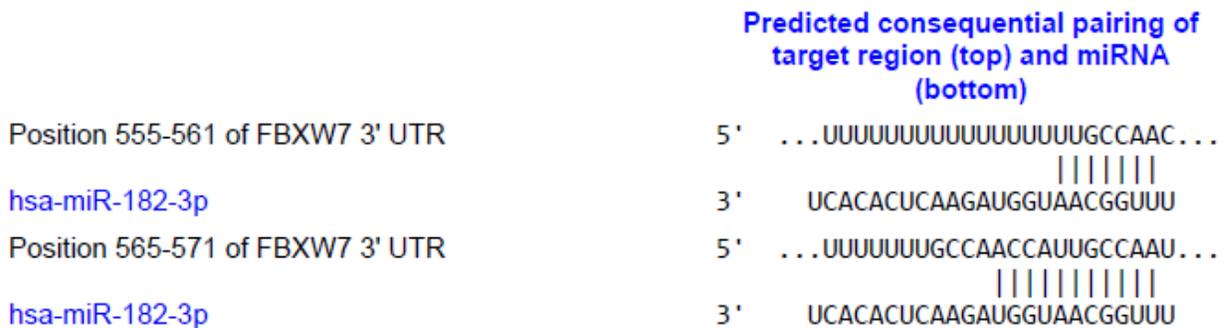


Figura 4. Predicción bioinformática de la unión del miR-182-3p al mRNA del gen FBXW7 utilizando la base de datos de TargetScan.

12.8 Artículos científicos generados del trabajo de Tesis

Article

Genetic Variants in pre-miR-146a, pre-miR-499, pre-miR-125a, pre-miR-605, and pri-miR-182 Are Associated with Breast Cancer Susceptibility in a South American Population

Sebastián Morales ¹, Tomas De Mayo ², Felipe Andrés Gulppi ¹, Patricio Gonzalez-Hormazabal ¹ ,
Valentina Carrasco ¹, José Miguel Reyes ³, Fernando Gómez ⁴, Enrique Waugh ⁴ and Lilian Jara ^{1,*} 

¹ Human Genetics Program, Institute of Biomedical Sciences (ICBM), School of Medicine, University of Chile, Santiago 8380453, Chile; seba.morales.p@gmail.com (S.M.); felipe.gulppi@gmail.com (F.A.G.); pgonzalez@med.uchile.cl (P.G.-H.); valentina.carrasco@gmail.com (V.C.)

² Center for Genetics and Genomics, School of Medicine, Clínica Alemana Universidad del Desarrollo, Santiago 7610658, Chile; tdemayog@udd.cl

³ Clínica Las Condes, Santiago 7591047, Chile; jmreyes@clc.cl

⁴ Clínica Santa María, Santiago 7520378, Chile; fgomez@csm.cl (F.G.); ewaugh@csm.cl (E.W.)

* Correspondence: ljara@gmail.com; Tel.: +562-29786166

Received: 26 June 2018; Accepted: 17 August 2018; Published: 22 August 2018



Abstract: Breast cancer (BC) is one of the most frequent tumors affecting women worldwide. microRNAs (miRNAs) single-nucleotide polymorphisms (SNPs) likely contribute to BC susceptibility. We evaluated the association of five SNPs with BC risk in non-carriers of the *BRCA1/2*-mutation from a South American population. The SNPs were genotyped in 440 Chilean *BRCA1/2*-negative BC cases and 1048 controls. Our data do not support an association between rs2910164:G>C or rs3746444:A>G and BC risk. The rs12975333:G>T is monomorphic in the Chilean population. The pre-miR-605 rs2043556-C allele was associated with a decreased risk of BC, both in patients with a strong family history of BC and in early-onset non-familial BC (Odds ratio (OR) = 0.5 [95% confidence interval (CI) 0.4–0.9] $p = 0.006$ and OR = 0.6 [95% CI 0.5–0.9] $p = 0.02$, respectively). The rs4541843-T allele is associated with increased risk of familial BC. This is the first association study on rs4541843 and BC risk. Previously, we showed that the *TOX3*-rs3803662:C>T was significantly associated with increased risk of familial BC. Given that *TOX3* mRNA is a target of miR-182, and that both the *TOX3* rs3803662-T and pri-miR-182 rs4541843-T alleles are associated with increased BC risk, we evaluated their combined effect. Risk of familial BC increased in a dose-dependent manner with the number of risk alleles (p -trend = 0.0005), indicating an additive effect.

Keywords: familial breast cancer; polymorphisms; microRNA; South American population

1. Introduction

Breast cancer (BC) is one of the most frequent cancers affecting women worldwide. One of every eight women will develop BC in their lifetime [1]. In Chile, BC has the highest mortality rate among cancers (15.69/100,000 women), and its incidence is rising in all of the age groups monitored [2]. The mutations in the *BRCA1/2* genes are responsible for an average of 16–20% of the risk for hereditary BC [3–5]. Moreover, it has been proposed that BC susceptibility alleles can be classified into three categories of penetrance (high, moderate, or low) that reflect the probability of developing the disease [6]. Our group has studied the contribution of moderate- and low-penetrance genes (*PALB2* [7], *BARD1* [8], *ATM* [9], *CHECK2* [10], *FGFR2* [11], *TOX3* [12], *MAP3K1* [11], and *8q24* [12]) to genetic susceptibility to hereditary

BC in the Chilean population. As genetic factors play an important role in BC etiology [13], identifying the genetic alterations involved in breast carcinogenesis is a major priority in the field.

In recent years, evidence has emerged to support a role for microRNAs (miRNAs) in BC development and progression [14,15]. miRNAs are single-stranded RNAs of about 22 nucleotides in length. These molecules can regulate gene expression by degrading or blocking the translation of their specific target mRNAs, mainly by binding to their 3'-untranslated region (UTR) [16,17]. Approximately 30% of all of the human genes are regulated by miRNAs [18,19]. Growing evidence has established that miRNA misexpression and mutations are correlated with various human cancers, including BC [20–22]. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common type of variation in the human genome. The SNPs present in miRNAs can alter the expression, lead to the maturation of aberrant miRNA, and affect the target binding affinity and specificity. Therefore, these variants may contribute to some forms of familial cancer [23]. Many epidemiological studies have examined the association between miRNA SNPs and cancer susceptibility [22]. In BC, several case-control studies and meta-analyses have evaluated the association between the miRNA gene polymorphisms and disease risk in European [24–29], Asian [30,31], Arab [32], Jewish [33], and Iranian populations [34]. With the exception of two studies, one in a Brazilian [35] and the other in Chilean population published by our group [36], the contribution of miRNA gene variants to BC risk among South American women remains unexplored. We have previously studied the contribution of the SNPs rs895819 (pre-miR-27a), rs11614913 (pre-miR-196a2), rs6505162 (pre-miR-423), rs4919510 (miR-608), and rs2682818 (pre-miR-618) to BC susceptibility in the Chilean population, as these were the most-studied SNPs in the BC cases from several populations. Moreover, the genetic variability is ethnicity-specific and appears to influence not only the risk but also the type of BC that develops in an individual. In this study, we selected SNPs in three miRNAs (rs3746444 in pre-miR-499, rs12975333 in pre-miR-125a, and rs2043556 in miR-605), based on the evidence in the literature for a relationship with BC risk [23,24,31,34,37–39]. Another four miRNAs (pre-miR-16, pre-miR-182, pre-miR-192, and pre-miR-146a) were also selected for analysis, as these miRNAs are known to target *BRCA1/2* genes [40–43]. Therefore, in this study, we sequenced the complete coding regions and boundaries of pre-miR-16, pre-miR-182, pre-miR-192, and pre-miR-146a in a population of Chilean BC patients who were negative for *BRCA1* and *BRCA2* mutations, with the aim of identifying new variants. The patients had either a strong family history of BC or of early-onset BC. The SNPs were identified in only two of the miRNAs sequenced, pre-miR-146a (rs2910164) and pri-miR-182 (rs4541843). A case-control designed was used to assess the association between BC risk and SNPs, rs3746444 (pre-miR-499), rs12975333 (pre-miR-125a), rs2043556 (miR-605), rs2910164 (pre-miR-146a), and rs4541843 (pri-miR-182).

The human miR-146a gene at locus 5q34 has been linked with *BRCA1/BRCA2* activity. The SNP rs2910164:G>C, located in the middle of the miRNA stem hairpin, leads to a change from a G:U pair to a C:U mismatch in the stem structure of the precursor molecule, altering the expression of mature miR-146a [44]. This SNP has been associated with the risk of various cancers [45,46], and with cancer-specific and ethnicity-dependent effects [23,37].

The variant rs3746444 in the mature miR-499-3p produces a change from an A:U pair to a G:U mismatch in the stem structure of the precursor molecule, leading to an altered processing and expression of the mature transcript [44], and potentially affecting the binding of the target mRNAs to the mature miRNA-3p [44]. miR-499 can target regulation of *FOXO4*, *PDCD4*, *Sox6*, and *Rod1* expression [47–49], all of which play important roles in the etiology of various cancers [48]. Many studies have explored the association between the rs3746444:A>G SNP and the susceptibility to BC [44], lung cancer [50], gallbladder cancer [51], squamous cell carcinomas of the head and neck [52], liver cancer [53], and colorectal cancer [54]. Studies on the association between this SNP and BC susceptibility have also shown that rs3746444 has different effects on different populations.

miR-125a is located on chromosome 19q13.41 in the human genome. The identified targets of miR-125a include *Lin-28*, *Lin-41*, *ERBB2*, and *ERBB3* mRNAs, all of which are involved in BC tumorigenesis [55–57]. One miRNA profiling study found that miR-125a was downregulated in BC [58]. Other data suggest that

miR-125 may play an important role in BC pathogenesis [59]. The rs12975333:G>T is located at the eighth nucleotide (+8) within the mature miR-125a. An in vivo analysis demonstrated that this SNP significantly blocks the processing of pri-miRNA to pre-miRNA, and reduces the miRNA-mediated translational suppression [59]. This SNP was also strongly associated with BC tumorigenesis in a Belgian population from Antwerp [38], suggesting that miR-125a likely functions as a tumor suppressor gene in human cancer [38]. However, in other populations, this SNP is monomorphic for the wild-type allele [39].

Several studies have investigated the association between miR-605 rs2043556:T>C and cancer risk. A meta-analysis by Hu et al. [60], concluded that there was a significant association between the rs2043556 C allele and an overall risk of human cancer. To date, however, only two association studies have been performed to assess the contribution of miR-605 rs2043556 to BC risk [23,31].

Finally, the rs4541843:C>T located in the boundaries of pre-miR-182 (pri-miR-182 region), and is described in the Ensembl genome browser 90 database. While miR-182 is known to be involved in breast carcinogenesis, there are no association studies in the literature regarding the contribution of rs4541843 to BC susceptibility.

This study was designed to evaluate the association of these SNPs rs2910164 in pre-miR-146a, rs4541843 in pri-miR-182, rs3746444 in pre-miR-499, rs12975333 in pre-miR-125a, and rs2043556 in miR-605 with familial BC and early-onset non-familial BC in non-carriers of *BRCA1/2* mutations from a South American population.

2. Materials and Methods

2.1. Families

A total of 440 BC patients belonging to 440 high-risk, *BRCA1/2*-negative, Chilean families were selected from the files of the Servicio de Salud del Area Metropolitana de Santiago, Corporación Nacional del Cáncer (CONAC), and other private health services in the Metropolitan Region of Santiago. All of the index cases were tested for *BRCA1* and *BRCA2* mutations, as previously described [61]. Pedigrees were constructed from the index case with the highest probability of carrying a deleterious mutation. None of the families studied met the criteria for other known BC-related syndromes, such as Li-Fraumeni, ataxia-telangiectasia, or Cowden disease.

Table 1 shows the specific characteristics of the families selected according to the inclusion criteria. All of the study families had self-reported Chilean ancestry dating from several generations, confirmed by extensive interviews with several family members from different generations. A total of 16% of the families (70/440) had bilateral BC cases, 9.0% (40/440) had both BC and ovarian cancer (OC) cases, and 1.1% (5/440) had male BC cases. The mean age at diagnosis for the BC cases was 42.1 years, and 75.2% were diagnosed at <50 years.

The study was approved by the Institutional Review Board of the University of Chile, School of Medicine (Project code Number 1150117, 1 March 2015). Informed consent was obtained from all of the participants.

Table 1. Inclusion criteria for the families included in this study.

Inclusion Criteria	Families <i>n</i>
Three or more family members with breast and/or ovarian cancer	121 (27.5%)
Two family members with breast and/or ovarian cancer	148 (33.6%)
Single affected individual with breast cancer ≤35 years of age	87 (19.8%)
Single affected individual with breast cancer between 36 and 50 years of age	84 (19.1%)
Total	440 (100%)

2.2. Control Population

The sample of healthy Chilean controls (*n* = 1048) was recruited from CONAC files. Only individuals whose ancestors were Chilean for at least the three previous generations were

included in the study. The DNA samples were taken from unrelated individuals with no personal or family history of cancer, confirmed by interview performed by a geneticist of our research group. All of the participants provided informed consent for anonymous testing. The DNA samples were obtained in compliance with all of the relevant ethical and legal norms. The control sample was matched to cases for age and socioeconomic strata. Over 90% of the cases and controls lived in the city of Santiago.

2.3. Mutation Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes of 440 cases from the selected high-risk families and 1048 controls. The samples were obtained according to the method described by Chomczynski and Sacchi [62].

A complete sequencing study was performed for pre-miR-16 (Chr13:50,048,973–50,049,061), pre-miR-182 (Chr7:129,770,383–129,770,492), pre-miR-192 (Chr11:64,891,137–64,891,246), and pre-miR-146a (Chr5:160,485,352–160,485,450), as well as the boundaries (100 pb to each side) sequence in 99 of the 440 cases. For this analysis, the families were subdivided into those with (a) three or more members with BC and/or OC (43.4%) and (b) index cases with early-onset BC (≤ 35 years) (56.6%). The entire coding sequence and the boundaries of the pre-miRNA(s) sequences were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The primers were designed with Primer3 version 0.4.0 [63]. The sequencing was performed using an ABI 3730xl automated fluorescence-based sequencer and BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The SNPs, rs3746444 (A>G), rs2910164 (G>C), rs12975333 (A>C), and rs2043556 (T>C), were genotyped using commercially-available TaqMan Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) (assay ID C__2142612_30, C__15946974_10, C__31444793_10, and C__11737438_10, respectively). A custom TaqMan assay was designed to genotype the SNP rs4541843 (context sequence 5'-ACAGCCAGCGAGGGAAGGGC[C/T]GGCCAATGCTGGACCTGCTGTT-3'). The reaction was performed in a 10 μ L final volume containing 5 ng of genomic DNA, 1X TaqMan Genotyping Master Mix, and 20X TaqMan SNP Genotyping Assay. The PCR was carried out in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The thermal cycles were initiated for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles, each at 92 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Each genotyping run contained control DNA confirmed by sequencing. The alleles were assigned using StepOne software, v2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As a quality control, we repeated the genotyping on ~10% of the samples, and all genotype scoring was performed and checked separately by two reviewers unaware of case-control status.

2.4. Statistical Analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium assumption was assessed in the control sample using a goodness-of-fit chi-square test (HW Chisq function included in the 'HardyWeinberg' package v1.4.1 for R, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL: <https://www.r-project.org/>). The Fisher's exact test was used to test the association between the genotypes/alleles and the case/control status. The odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated to estimate the strength of the associations (odds ratio and Fisher's exact test functions were performed using GraphPad Prism v 6.0 for Windows 10, GraphPad Software, La Jolla California, USA, URL: www.graphpad.com) A two-tailed *p*-value <0.05 was used as the criterion of significance. The Cochran–Armitage trend test was performed to test the additive genetic effect model (CATT function included in the 'Rassoc' package v 1.03 for R, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL: <https://www.r-project.org/>). A chi-square test for the trend was performed to examine the additive combined effects of the risk alleles ('ptrend' was performed in Stata/MP v 13.0 for Windows 10, Unix-StataCorp, College Station, TX, USA; using 'ptrend' package).

3. Results

3.1. Association Study between rs2910164, rs4541843, rs3746444, rs12975333, and rs2043556 with Familial Breast Cancer and Early-Onset Non-Familial Breast Cancer in Non-Carriers of BRCA1/2 Mutations

We analyzed the complete coding sequence and boundaries of pre-miR-16, pre-miR-182, pre-miR-192, and pre-miR-146a in 99 probands who had a strong family history of BC, but were negative for *BRCA1* and *BRCA2* point mutations, with the aim of identifying new miRNA sequence variations in a Chilean population. No variants were detected in the pre-miR-16 and pre-miR-192 sequences. We identified two variants, rs2910164 (pre-miR-146a) and rs4541843 (pri-miR-182). These two variants and three SNPs from the literature, rs3746444 (pre-miR-499), rs12975333 (pre-miR-125a), and rs2043556 (miR-605), were then analyzed in 440 *BRCA1/2*-negative cases and 1048 controls. For the case-control analysis, the whole BC sample was subdivided into two subgroups, individuals from families with two or more members with BC and/or OC ($n = 269$) (subgroup A), and individuals with non-familial early-onset BC (≤ 50 years) ($n = 171$) (subgroup B). Subgroup A excludes the subgroup B cases. The genotype distributions and allele frequencies of pre-miR-146a rs2910164:G>C, pri-miR-182 rs4541843:C>T, pre-miR-499 rs3746444:A>G, pre-miR-125a rs12975333:G>T, and miR-605 rs2043556:T>C are shown in Table 2 for the whole patient group and subgroups vs. the controls. The observed genotype frequencies for three of the five polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium in the controls ($p = 0.86$ for rs2910164:G>C, $p = 0.83$ for rs3746444:A>G, and $p = 0.90$ for rs12975333), while the p -values for the SNPs rs4541843:C>T and rs2043556:T>C were 0.03 and $<10^{-4}$, respectively.

In the single-locus analysis, the genotypes and alleles distributions for rs3746444:A>G, did not differ significantly between cases and controls, in either the whole-group or subgroup analysis ($p > 0.05$). The genotype frequencies of rs2910164:G>C in the 99 *BRCA1/2*-negative probands from high-risk families were 52.7% G/G, 39.4% G/C and 7.9% C/C. For the case-control analysis of rs2910164:G>C, the genotypes and alleles distributions did not differ significantly between cases and controls, in either the whole-group or subgroup analysis ($p > 0.05$). For rs12975333:G>T, the frequency of the wild-type allele (G) was 0.996 in controls and 0.995 in cases, and the frequency of allele T was 0.004 in controls and 0.005 in cases. Therefore, the T allele was extremely rare and practically monomorphic in this Chilean population.

The rs2043556:T>C is located in pre-miR-605. The minor allele frequency (MAF) (allele C) was significantly lower in the whole sample (0.32) and in the subgroup A (0.31) vs. controls (0.37) (OR = 0.8 [95% CI 0.6–0.9] $p = 0.01$ and OR = 0.7 [95% CI 0.6–0.9] $p = 0.01$, respectively). This result indicates that the C allele is associated with a protective effect against BC risk. We also observed a protective effect for the C-allele carriers (T/C + C/C) in the whole sample (OR = 0.6 [95% CI 0.4–0.7], $p < 10^{-4}$), in subgroup A (OR = 0.6 [95% CI 0.4–0.8] $p < 10^{-4}$), and in single cases diagnosed at ≤ 50 years of age (subgroup B) (OR = 0.6 [95% CI 0.5–0.9] $p = 0.02$). We also assessed for a protective effect of rs2043556 in according to number of BC cases in the family (Table 3). No protective effect was found for rs2043556 in the families with two BC/OC cases. However, the BC risk was significantly decreased in the C-allele carriers with three or more family members with BC/OC (T/C + C/C) (OR = 0.5 [95% CI 0.4–0.9] $p = 0.006$). This result indicates that the C-allele was associated with a protective effect in the families with a strong history of BC.

The rs4541843:C>T corresponds to a SNP detected by sequencing in pri-miR-182. This SNP is located at the position 138 downstream of 5' pre-miR-182. The genotype frequencies in the 99 *BRCA1/2*-negative probands from high-risk families were 34.6% C/C, 42.7% C/T, and 22.7% T/T. In the case-control analysis, no significant differences were observed for genotype or allele distribution, for whole group or subgroup B vs. controls ($p > 0.05$). However, in the familial BC cases (subgroup A), the MAF (allele T) was higher in cases than controls (0.46 and 0.41, respectively, $p = 0.01$). Furthermore, in subgroup A, the homozygous T/T- and T-allele carriers (C/T + T/T) had a significantly increased BC risk (OR = 1.5 [95% CI 1.0–2.2] $p = 0.03$ and OR = 1.2 [95% CI 1.0–1.5] $p = 0.01$, respectively) (Table 2), indicating that the T allele is associated with an increased BC risk. When we analyzed the effect of the T allele by the number of BC cases per family, no association between the rs4541843 and BC risk was found. No associations were observed between this SNP and the early-onset BC (diagnosis ≤ 50 years of age). It is important to note that is the first association study on this SNP and the risk of a human disease.

Table 2. Genotype and allelic frequencies of rs3746444, rs2910164, rs12975333, rs2043556, and rs4541843 in *BRCA1/2*-negative breast cancer cases and controls.

Genotype or Allele	All BC Cases (n = 440)				Families with ≥2 BC and/or OC Cases (n = 269)			Families with a Single Case, Diagnosis at ≤50 Years of Age (n = 171)		
	Controls (n = 1048) (%)	BC Cases (%)	p-Value ^a	OR [95% CI]	BC Cases (%)	p-Value ^a	OR [95% CI]	BC Cases (%)	p-Value ^a	OR [95% CI]
rs3746444 (Pre-miR-499)										
A/A	772 (73.7)	319 (72.5)	-	1.0 (Ref)	198 (73.6)	-	1.0 (Ref)	121 (70.8)	-	1.0 (Ref)
A/G	254 (24.2)	111 (25.2)	0.6	1.0 [0.8–1.3]	64 (23.8)	0.9	0.9 [0.7–1.3]	47 (27.5)	0.3	1.1 [0.8–1.7]
G/G	22 (2.1)	10 (2.3)	0.8	1.1 [0.5–2.3]	7 (2.6)	0.6	1.2 [0.5–2.9]	3 (1.7)	1.0	0.8 [0.2–2.9]
A/G + G/G	276 (26.3)	121 (27.5)	0.6	1.0 [0.8–1.3]	71 (26.4)	1.0	1.0 [0.7–1.3]	50 (29.2)	0.4	1.1 [0.8–1.6]
Allele A	1798 (85.8)	749 (85.1)	-	1.0 (Ref)	460 (85.5)	-	1.0 (Ref)	289 (84.5)	-	1.0 (Ref)
Allele G	298 (14.2)	131 (14.9)	0.6	1.0 [0.8–1.3]	78 (14.5)	0.9	1.0 [0.7–1.3]	53 (15.5)	0.5	1.1 [0.8–1.5]
rs2910164 (Pre-miR-146a)										
G/G	561 (53.5)	236 (53.6)	-	1.0 (Ref)	149 (55.4)	-	1.0 (Ref)	87 (50.9)	-	1.0 (Ref)
G/C	410 (39.1)	165 (37.5)	0.7	0.9 [0.7–1.1]	101 (37.5)	0.6	0.9 [0.6–1.2]	64 (37.4)	1.0	1.0 [0.7–1.4]
C/C	77 (7.4)	39 (8.9)	0.3	1.2 [0.7–1.8]	19 (7.1)	0.8	0.9 [0.5–1.5]	20 (11.7)	0.06	1.6 [0.9–2.8]
G/C + C/C	487 (46.5)	204 (46.4)	1.0	0.9 [0.7–1.2]	120 (44.6)	0.6	0.9 [0.7–1.2]	84 (49.1)	0.5	1.1 [0.8–1.5]
Allele G	1532 (73.1)	637 (72.4)	-	1.0 (Ref)	399 (74.2)	-	1.0 (Ref)	238 (69.6)	-	1.0 (Ref)
Allele C	564 (26.9)	243 (27.6)	0.7	1.0 [0.8–1.2]	139 (25.8)	0.6	0.9 [0.7–1.1]	104 (30.4)	0.2	1.1 [0.9–1.5]
rs12975333 (Pre-miR-125a)										
G/G	1040 (99.2)	436 (99.1)	-	1.0 (ref)	267 (99.3)	-	1.0 (ref)	169 (98.8)	-	1.0 (ref)
G/T	8 (0.8)	4 (0.9)	0.7	1.1 [0.3–3.9]	2 (0.7)	0.2	1.9 [0.5–6.5]	2 (1.2)	0.6	1.5 [0.3–7.3]
T/T	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-
G/T + T/T	8 (0.8)	4 (0.9)	0.7	1.1 [0.3–3.9]	2 (0.7)	0.2	1.9 [0.5–6.5]	2 (1.2)	0.6	1.5 [0.3–7.3]
Allele G	2088 (99.6)	876 (99.5)	-	1.0 (ref)	536 (99.6)	-	1.0 (ref)	340 (99.4)	-	1.0 (ref)
Allele T	8 (0.4)	4 (0.5)	0.7	1.1 [0.3–3.9]	2 (0.4)	0.2	1.9 [0.5–6.5]	2 (0.6)	0.6	1.5 [0.3–7.3]
rs2043556 (miR-605)										
T/T	376 (35.9)	208 (47.3)	-	1.0 (ref)	128 (47.6)	-	1.0 (ref)	80 (46.8)	-	1.0 (ref)
T/C	571 (54.5)	182 (41.3)	<10 ⁻⁴	0.5 [0.4–0.7]	115 (42.7)	0.0003	0.5 [0.4–0.7]	67 (39.2)	0.0009	0.5 [0.3–0.7]
C/C	101 (9.6)	50 (11.4)	0.6	0.8 [0.6–1.3]	26 (9.7)	0.2	0.7 [0.5–1.2]	24 (14.0)	0.6	1.1 [0.6–1.8]
T/C + C/C	672 (64.1)	232 (52.7)	<10 ⁻⁴	0.6 [0.4–0.7]	141 (52.4)	0.0006	0.6 [0.4–0.8]	91 (53.2)	0.02	0.6 [0.5–0.9]
Allele T	1323 (63.1)	598 (68.0)	-	1.0 (ref)	371 (69.0)	-	1.0 (ref)	227 (66.4)	-	1.0 (ref)
Allele C	773 (36.9)	282 (32.0)	0.01	0.8 [0.6–0.9]	167 (31.0)	0.01	0.7 [0.6–0.9]	115 (33.6)	0.4	0.9 [0.7–1.1]
rs4541843 (Pri-miR-182)										
C/C	386 (36.8)	150 (34.1)	-	1.0 (Ref)	81 (30.1)	-	1.0 (ref)	69 (40.4)	-	1.0 Ref
C/T	473 (45.1)	205 (46.6)	0.4	1.1 [0.8–1.4]	127 (47.2)	0.1	1.2 [0.9–1.7]	78 (45.6)	0.6	0.9 [0.6–1.3]
T/T	189 (18.1)	85 (19.3)	0.4	1.5 [0.8–1.5]	61 (22.7)	0.03	1.5 [1.0–2.2]	24 (14.0)	0.1	0.7 [0.4–1.1]
C/T + T/T	662 (63.2)	290 (65.9)	0.3	1.1 [0.8–1.4]	188 (69.9)	0.04	1.3 [1.0–1.8]	102 (59.6)	0.3	0.8 [0.6–1.1]
Allele C	1245 (59.4)	505 (57.4)	-	1.0 (Ref)	289 (53.7)	-	1.0 (ref)	216 (63.2)	-	1.0 (Ref)
Allele T	851 (40.6)	375 (42.6)	0.3	1.0 [0.9–1.2]	249 (46.3)	0.01	1.2 [1.0–1.5]	126 (36.8)	0.2	0.8 [0.6–1.0]

BC—breast cancer; OC—ovarian cancer; OR—odds ratio; CI—confidence interval; Ref—Reference. ^a Fisher's exact test. $p < 0.05$ statistically significant.

Table 3. Genotype and allelic frequencies of rs2043556 and rs4541843 according the number of BC cases in the families in *BRCA1/2*-negative breast cancer cases and controls.

Genotype or Allele	Controls (<i>n</i> = 1048) (%)	Families with 2 BC and/or OC Cases (<i>n</i> = 148)			Families with ≥ 3 BC and/or OC Cases (<i>n</i> = 121)		
		BC Cases (%)	<i>p</i> -Value ^a	OR [95% CI]	BC Cases (%)	<i>p</i> -Value ^a	OR [95% CI]
rs2043556 (miR-605)							
T/T	376 (35.9)	67 (45.3)	-	1.0 (Ref)	61 (50.4)	-	1.0 (Ref)
T/C	571 (54.5)	68 (45.9)	0.08	0.7 [0.5–1.0]	47 (38.9)	0.003	0.5 [0.4–0.8]
C/C	101 (9.6)	13 (8.8)	0.3	0.7 [0.4–1.4]	13 (10.7)	0.5	0.7 [0.4–1.5]
T/C + C/C	672 (64.1)	81 (54.7)	0.06	0.7 [0.5–1.0]	60 (49.6)	0.006	0.5 [0.4–0.9]
Allele T	1323 (63.1)	202 (68.2)	-	1.0 (Ref)	169 (69.8)	-	1.0 (Ref)
Allele C	773 (36.9)	94 (31.8)	0.1	0.8 [0.6–1.0]	73 (30.2)	0.06	0.7 [0.5–1.0]
rs4541843 (Pri-miR-182)							
C/C	386 (36.8)	45 (30.4)	-	1.0 (Ref)	36 (29.8)	-	1.0 (Ref)
C/T	473 (45.1)	70 (47.3)	0.2	1.2 [0.8–1.8]	57 (47.1)	0.2	1.2 [0.8–1.9]
T/T	189 (18.1)	33 (22.3)	0.1	1.4 [0.8–2.4]	28 (23.1)	0.09	1.5 [0.9–2.6]
C/T + T/T	662 (63.2)	103 (69.6)	0.1	1.3 [0.9–1.9]	85 (70.2)	0.1	1.3 [0.9–2.0]
Allele C	1245 (59.4)	160 (54.1)	-	1.0 (Ref)	129 (53.3)	-	1.0 (Ref)
Allele T	851 (40.6)	136 (45.9)	0.09	1.2 [0.9–1.5]	113 (46.7)	0.07	1.2 [0.9–1.6]

BC—breast cancer; OC—ovarian cancer; OR—odds ratio; CI—confidence interval; Ref—Reference. ^a Fisher's exact test. *p* < 0.05 Statistically significant.

3.2. Combined Effect between *TOX3* rs3803662-T and *pri-miR-182* rs4541843-T Alleles with Breast Cancer Risk

In a previous publication, our group showed that *TOX3* rs3803662:C>T was significantly associated with an increased BC risk in familial BC [12]. As *TOX3* rs3803662-T and *pri-miR-182* rs4541843-T were associated with an increased BC risk, we considered these two variants to be risk alleles. Moreover, *TOX3* mRNA is a target of miR-182 [64]. Therefore, we evaluated the combined effect of these variants. For the analysis, the subjects were divided into five groups based on number of risk alleles (subjects with 0 [group 1], one [group 2], two [group 3], three [group 4], or four [group 5] risk alleles). As shown in Table 4, the distribution of the combined genotypes in the whole patient group and in subgroup A significantly differed from the controls ($p = 0.005$ and 0.0001 , respectively), and the BC risk increased in a dose-dependent manner in the whole sample, and in subgroup A, with the number of risk alleles (p -trend = 0.0005 and $<10^{-4}$, respectively). No additive effect was observed for early-onset BC (diagnosis ≤ 50 years of age). We also analyzed this additive effect within cases with a family history of BC, according to the number of BC cases per family (Table 5). An additive effect was observed in the families with two BC/OC cases and the families with the strongest history of BC (p -trend = 0.0001 and 0.001 , respectively). These results indicate an additive effect of *TOX3* rs3803662-T and *pri-miR-182* rs4541843-T on BC risk.

Table 4. Combined effects of rs3803662 (*TOX3*) and rs4541843 (pri-miR-182) on the risk of breast cancer.

Number of Risk Alleles ^(a)	Controls (<i>n</i> = 1048) (%)	All BC Cases (<i>n</i> = 440)			Families with ≥2 BC and/or OC cases (<i>n</i> = 269)			Families with a Single Case, Diagnosis at ≤50 Years of Age (<i>n</i> = 171)		
		BC Cases (%)	OR [95% CI]	<i>p</i> -Value ^(b)	BC Cases (%)	OR [95% CI]	<i>p</i> -Value ^(b)	BC Cases (%)	OR [95% CI]	<i>p</i> -Value ^(b)
0 risk alleles	153 (14.6)	49 (11.1)	1.0 (Ref)	-	22 (8.2)	1.0 (Ref)	-	27 (15.8)	1.0 (Ref)	-
1 risk allele	381 (36.4)	128 (29.1)	1.0 [0.7–1.5]	0.8	73 (27.1)	1.3 [0.7–2.2]	0.3	55 (32.2)	0.8 [0.4–1.3]	0.4
2 risk alleles	336 (32.1)	168 (38.2)	1.5 [1.0–2.2]	0.01	105 (39)	2.1 [1.3–3.5]	0.001	63 (36.9)	1.0 [0.6–1.7]	0.9
3 risk alleles	153 (14.6)	79 (18)	1.6 [1.0–2.4]	0.02	57 (21.2)	2.5 [1.5–4.4]	0.0006	22 (12.9)	0.8 [0.4–1.4]	0.5
4 risk alleles	25 (2.4)	16 (36)	1.9 [0.9–3.8]	0.08	12 (4.5)	3.2 [1.4–7.2]	0.006	4 (2.3)	0.8 [0.2–2.6]	1.0
<i>p</i> -trend ^(c)				0.0005			<10 ⁻⁴			0.9755
Global <i>p</i> ^(d)				0.005			0.0001			0.6970

^(a) 0 risk allele: C/C + C/C; 1 risk allele: C/C + C/T, C/T + C/C; 2 risk alleles: C/C + T/T, T/T + C/C, C/T + C/T; 3 risk alleles: C/T + T/T, T/T + C/T; 4 risk alleles: T/T + T/T.
^(b) Fisher’s exact test. ^(c) Chi-test for trend. ^(d) Chi-squared test for independence. BC—breast cancer; OC—ovarian cancer; OR—odds ratios; CI—confidence interval; Ref—Reference. *p* ≤ 0.05 statistically significant.

Table 5. Combined effects of rs38033662 (*TOX3*) and rs4541843 (pri-miR-182) on the risk of breast cancer according the number of BC cases in the families.

Number of Risk Alleles ^(a)	Controls (<i>n</i> = 1048) (%)	Families with Two BC and/or OC Cases (<i>n</i> = 148)			Families with ≥3 BC and/or OC Cases (<i>n</i> = 121)		
		BC Cases (%)	OR [95% CI]	<i>p</i> -Value ^(b)	BC Cases (%)	OR [95% CI]	<i>p</i> -Value ^(b)
0 risk alleles	153 (14.6)	10 (6.8)	1.0 (Ref)	-	12 (8.1)	1.0 (Ref)	-
1 risk allele	381 (36.4)	29 (19.6)	1.1 [0.5–2.4]	0.8	44 (29.7)	1.4 [0.7–2.8]	0.2
2 risk alleles	336 (32.1)	47 (31.8)	2.1 [1.0–4.3]	0.03	58 (39.2)	2.2 [1.1–4.2]	0.01
3 risk alleles	153 (14.6)	30 (20.3)	3.0 [1.4–6.3]	0.003	27 (18.2)	2.2 [1.0–4.6]	0.02
4 risk alleles	25 (2.4)	5 (3.4)	2.9 [0.9–9.3]	0.06	7 (4.7)	3.4 [1.2–9.5]	0.02
<i>p</i> -trend ^(c)				0.0001			0.001
Global <i>p</i> ^(d)				0.001			0.02

^(a) 0 risk allele: C/C + C/C; 1 risk allele: C/C + C/T, C/T + C/C; 2 risk alleles: C/C + T/T, T/T + C/C, C/T + C/T; 3 risk alleles: C/T + T/T, T/T + C/T; 4 risk alleles: T/T + T/T.
^(b) Fisher’s exact test. ^(c) Chi-test for trend. ^(d) Chi-squared test for independence. BC—breast cancer; OC—ovarian cancer; OR—odds ratios, CI—confidence interval; Ref—Reference. *p* ≤ 0.05 Statistically significant.

4. Discussion

Currently, there is consensus that the *BRCA1* and *BRCA2* mutations are responsible for an average of only 16% of the risk for familial breast and ovarian cancers [3,5]. Consequently, there is an intensive search for additional targets.

The miRNAs are a class of endogenous, non-coding, single-stranded RNAs involved in many molecular pathways and biological processes, including the development, apoptosis, differentiation, proliferation, and immune response [65]. Many miRNAs have been implicated in various human diseases, and it has been shown that miRNAs are aberrantly expressed or mutated in many cancers. SNPs are the most common form of variation present in the human genome. The SNPs in the miRNA regions can alter the genetic expression, processing, and maturation, as well as the target binding affinity and specificity [23,66]. Therefore, many epidemiological studies have examined the associations between the miRNA SNPs and BC susceptibility [22]. It is important to note that genetic variability is ethnicity-specific. To date, most miRNA SNP studies have been performed in cases from European, Asian, Arab, or Jewish populations, mainly in sporadic BC. In contrast, the publications regarding the role of the miRNA variations in BC susceptibility among Latin-American populations are very scarce. In the present study, we evaluated the impact of the miRNA SNPs on familial and early-onset BC in Chilean families negative for *BRCA1/2* point mutations. To this end, we performed a case-control study to examine the association between the BC risk and rs2910164 in pre-miR-146a, rs4541843 in pri-miR-182, rs3746444 in pre-miR-499, rs12975333 in pre-miR-125a, and rs2043556 in pre-miR-605.

Our data do not support an association between rs2910164:G>C or rs3746444:A>G and BC risk. The SNP rs2910164:G>C resides within miR-146a, a microRNA that binds to the 3' untranslated region of the *BRCA1* transcript [43] and negatively regulates expression of this gene [27]. There have been a number of studies on rs2910164 in populations of various ethnicities, but the results are controversial [24,25,27,43,67–69]. Shen et al. (2008) [43] reported in US population that *BRCA1/2*-negative BC/OC cases with G/C-C/C genotypes were significantly younger at diagnosis than those with the G/G genotype; nevertheless, the ethnicity of the US population used in this study was not specified. This association was not confirmed in a study by Catucci et al. (2010) [24], who reported no association between rs2910164 with BC risk or the age of onset in *BRCA1/2*-negative BC patients from Germany and Italy. On the other hand, Pastrello et al. (2010) [25] reported that the SNP miR-146a rs2910164 had a potential impact on the age of onset in an Italian population of *BRCA1/2*-negative familial BC/OC patients. In a North Indian population, Bansal et al. (2014) [68] demonstrated that the miR-146a G/G (rs2910164) polymorphism was associated with reduced genetic susceptibility to BC. However, a multivariate analysis showed that this SNP was associated with an increased BC risk in postmenopausal females. In a Chinese population, the rs2910164 G/G and C/G-G/G genotypes were associated with an increased BC risk in the postmenopausal BC cases with no familial history of BC [69]. In an Iranian population, the rs2910164 polymorphism was not significantly associated with the occurrence of BC. Several meta-analyses that included the rs2910164:G>C polymorphism were published between 2011 and 2017. Of these, two meta-analyses reported that rs2910164 contributed to BC susceptibility in a Caucasian population [29,70]. The other five meta-analyses showed that rs2910164 was not associated with BC susceptibility in Caucasians or Asians [23,37,44,71,72]. The majority of authors suggest that the oncogenic mechanisms are markedly influenced by specific genetic backgrounds across populations. The contemporary Chilean population stems from the admixture of Amerindian people with the Spanish settlers in the sixteenth and seventeenth centuries. Later (nineteenth-century) migrations of Germans, Italians, Arabs, and Croatians had only a minor impact on the general population (accounting for no more than 4% of the total population), with effects restricted to the specific locations of the country where these immigrants settled [73]. The relationships among ethnicity, Amerindian admixture, genetic markers, and socioeconomic strata in Chile have been studied extensively [74,75]. The SNP rs3746444, located at the 3p mature miRNA-499, was also found to have no association with BC risk in our study. This polymorphism involves an A>G nucleotide substitution, leading to altered processing and the

expression of the mature transcript [76]. The analyses of rs3746444 polymorphisms in BC patients have shown mixed results. Several studies have reported that rs3746444 was associated with an increased BC risk in Iranian [34,67,77] and Chinese populations [69,78]. In contrast, other studies found no association between rs3746444 and BC risk in Caucasian (German and Italian) [24] or North Indian populations [68]. In addition, all five meta-analyses published to date have found that rs3746444 is associated with an increased BC risk in Asians, but not Caucasians [23,44,72,76,79]. Given the European and Native American ancestry estimates for Chileans as 52% and 44% on average, respectively, these results could explain the lack of association of rs3746444 with BC risk in this group [80].

The variant rs12975333:G>T is located in the seed region of the mature miRNA-125a. The T allele reportedly blocks the processing of pri-miRNA to the pre-miRNA precursor. This variation is extremely rare, having been detected in only one of 1200 individuals from diverse ethnic backgrounds in a study by the Centre d'Etude du Polymorphisme Humain [38]. Li et al. (2009) [38] showed that rs12975333-T was strongly associated with BC risk in a Belgian population from Antwerp. These authors found that while 8.3% of the BC cases were T-allele carriers, this risk allele was not present in any of the 192 controls from the general population in the Antwerp area or the 587 Caucasian controls collected in the United States [38]. This SNP was also monomorphic for the G allele in a sample of 340 healthy individuals from Catalonia (in northeast Spain) [81]. Peterlongo et al. (2011) [39] showed that rs12975333 was monomorphic in 4114 controls from Germany, Italy, Australia, and Spain (Madrid). Moreover, the authors suggested that very few BC cases, if any, were attributable to rs12975333 in the populations studied. Our results also indicate that rs12975333 is extremely rare, if not absent, in the BC cases and controls from a Chilean population. Therefore, we were unable to estimate the association between rs12975333 and BC risk.

Several studies have investigated the association between miR-605 rs2043556:T>C and cancer risk [82]. Specifically, the miR-605 C allele was associated with an increased risk of bladder cancer in a Caucasian population [60], and in gastrointestinal cancer, the C allele was significantly less common in the controls vs. cancer patients in an Asian population [31]. However, rs2043556-C significantly decreased the oral squamous cell carcinoma risk in a Chinese population [82]. Only one article and one meta-analysis have evaluated the association between rs2043556 and BC risk. In a Chinese population, no significant association with BC risk was observed [31], while the meta-analysis by Chen et al. (2014) [23], reported that the miR-605 rs2043556 C/C genotype may increase the BC susceptibility in an Asian population. Because all of the participants in this meta-analysis were Asian, additional case-control studies, especially in non-Asian populations, are necessary to validate the finding. Our results showed that the rs2043556 C allele was associated with a protective effect in the *BRCA1/2*-negative Chilean women with a strong family history of BC or non-familial, early-onset BC. These results are contradictory to the results obtained in Asians. Therefore, given that the Chilean population is ~52% Caucasian and ~44% Native American, studies in other population are needed. One important issue to consider is that the genotype distribution of rs2043556 is in a Hardy–Weinberg disequilibrium, which could distort the results. The possibility that different selective factors may directly or indirectly alter the association between rs2043556 and BC risk cannot be discarded.

miR-182 is one of three miRNAs in the miR-183/182/96 cluster, located in a 5-Kb region of human chromosome 7q32.2 [83]. Several studies have confirmed that the members of the miR-182 cluster are abnormally expressed in some cancers and other human diseases [84]. This cluster, and specifically miR-182, is highly expressed in many BC subtypes. This molecule functions as an onco-miRNA, promoting the proliferation and migration of BC cells [85]. With respect to miR-182, Moskwa et al. (2011) [41] reported that the Argonaute/miR-182 complex associates selectively with the *BRCA1* transcript and that miR-182 downregulates the *BRCA1* expression. Therefore, miR-182 overexpression reduces the *BRCA1* protein levels and impairs the homologous recombination-mediated repair. In addition, consistent with a *BRCA1*-deficiency phenotype, miR-182-overexpressing breast tumor cells are hypersensitive to the inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase I (PARP1) [41]. Krishnan et al. (2013) [86] showed that miR-182 is overexpressed in

several molecular subtypes of BC. This author then experimentally validated that miR-182 mediates the disruption of homologous recombination (HR), as a consequence of its ability to target multiple components of that pathway [86]. Other targets of miR-182 include the transcription factor *TOX3* mRNA; Nibrin *NBN* mRNA, which is a gene member of the MRE11/RAD50 double-strand break repair complex; and LIM and SH3 domain protein 1 (*LASP1*) mRNA. Therefore, miR-182 may participate in the regulation of DNA double-strand break repair and estrogen receptor-mediated gene expression, by regulating the *NBN* and *TOX3* expression. Moreover, miR-182 may also influence the nodal positivity and tumor size of breast carcinomas by regulating *LASP1* expression [64]. The SNP rs4541843:C>T is located in pre-miR-182. This SNP is described in the Ensembl genome browser 90 database; nevertheless, there are no studies in the literature assessing the association of rs4541843:C>T with any human disease. Here, we performed a case-control study on rs4541843:C>T, showing that the T allele is associated with an increased BC risk. In addition, homozygous T/T- and T-allele carriers (C/T + T/T) had a significantly increased BC risk among *BRCA1/2*-negative familial BC cases. Given the known roles of miR-182, it could be hypothesized that rs4541843-T induces miR-182 overexpression, reducing the *BRCA1* protein levels by altering the pathways involved in maintaining the genomic stability. Thus, the association of rs4541843-T with an increased BC risk in the *BRCA1/2*-negative BC patients could be a consequence of reduced *BRCA1* protein levels. Studies in other populations are needed to confirm this assertion, as this is the first association study on rs4541843:C>T and BC risk.

In a previous publication, our group described an association between the *TOX3* rs3803662:C>T and risk of familial BC. In this study, we showed that rs4541843-T, located in the boundaries of pre-miR-182 (pri-miR-182 region), is also associated with an increased BC risk. Considering that the transcription factor *TOX3* mRNA is a target of miR-182 [64], we evaluated the combined effects of the *TOX3* rs3803662-T and pri-miR-182 rs4541843-T, and constructed a genetic score based on the number of risk alleles. A dose-response association was observed for familial BC. The presence of four risk alleles was associated with a 3.2-fold increased risk of familial BC compared with the zero risk alleles. miRNA-182 is an onco-miRNA in BC [85,87] that regulates the expression of *BRCA1*, *NBN*, *LASP1*, and *TOX3*, and other genes [64]. miR-182 is upregulated in BC, increasing the proliferation, migration, and tumorigenesis of BC cells [87,88]. *TOX3* also encodes a protein that plays a pivotal role in calcium-dependent transcription, as a transcription factor [89]. This gene is located on chromosome 16q12. The loss of heterozygosity (LOH) and the translocations involving the 16q region are commonly observed in BC [90]. Moreover, *TOX3* is expressed in mammary ER+ epithelial cells, and regulates the expression of estrogen receptor-mediated genes [91]. Associations between several *TOX3* or nearly *TOX3* SNPs and BC susceptibility have been established in European, Asian, African American, and South American populations [12,92–96]. Among these, rs3803662:C>T is the most strongly correlated with disease. Each copy of rs3803662-T is associated with a 20% increase in BC risk [93]. Riaz et al. (2012) [97], suggested that *TOX3* might act as a tumor suppressor gene and that the risk allele rs3803662-T is significantly associated with a reduced *TOX3* expression. Furthermore, *TOX3* mRNA is a target of miR-182, and miR-182 overexpression reduces the *TOX3* endogenous transcript level [64]. Consequently, the presence of the risk alleles from both of the SNPs could produce a more marked decrease in the *TOX3* expression. This effect increases with the number of risk alleles, producing a dose-dependent increase in the BC risk. Functional studies are needed to elucidate the biological consequences of rs4541843:C>T in breast and other cancers. The potential utility of miR-182 in BC therapy should also be considered. Although our study provides evidence for an association of rs2043556 and rs4541843 with BC risk, certain limitations must be considered. Firstly, the genotype distribution of rs2043556 did not conform to the Hardy–Weinberg expectations, which may distort the results. Secondly, the sample size of the whole group in the present study is sufficient to yield 80% power; nevertheless, the sample size limits the subgroup analyses. Therefore, these results should be replicated using subgroups with larger sample sizes.

Author Contributions: S.M. and T.D.M. conceived and designed the experiments; T.D.M., S.M. and F.A.G. carried out the genotyping assays; S.M., V.C., and P.G.-H. performed the statistical analysis; T.D.M. and L.J. analyzed the Sanger sequencing data; J.M.R., F.G., and E.W. selected familial breast cancer cases from the various oncology services; L.J. contributed reagents/materials/analysis tools; S.M. and L.J. wrote the paper. All of the authors reviewed the manuscript.

Funding: Grant Sponsor: Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), Grant Number 1150117.

Acknowledgments: The authors thank the many families who participated in the research studies described in this article. We acknowledge the CONAC Breast Cancer Group: María Teresa Barrios, Angelica Soto, Rossana Recabarren, Leticia García, Karen Olmos, and Paola Carrasco. We would like to thank Lorena Seccia, Felipe Benavides, and Sofia Burattini for their contribution the experimental work.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to publish the results.

Ethical Approval and Informed Consent: This research (code ID # FONDECYT 1150117) was performed in accordance with the Helsinki Declaration and was approved by the ethics committee of the University of Chile/School of Medicine (Ethics Committee of Research in Humans). Informed consent for this research was conducted under the approval of the ethics committee of the University of Chile/School of Medicine. Both informed and written consent were obtained for all of the participants in the study.

References

1. Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M.J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* **2009**, *59*, 225–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. De Salud, M. *Guía Clínica AUGE Cáncer de Mama; Manejo Integral del Cáncer y otros Tumores*, Ed.; Ministerio de Salud—Gobierno de Chile: Santiago, Chile, 2015.
3. Stratton, M.R.; Rahman, N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 17–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Couch, F.J.; Hart, S.N.; Sharma, P.; Toland, A.E.; Wang, X.; Miron, P.; Olson, J.E.; Godwin, A.K.; Pankratz, V.S.; Olszold, C.; et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 304–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 1301–1308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chandler, M.R.; Bilgili, E.P.; Merner, N.D. A review of whole-exome sequencing efforts toward hereditary breast cancer susceptibility gene discovery. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 835–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Leyton, Y.; Gonzalez-Hormazabal, P.; Blanco, R.; Bravo, T.; Fernandez-Ramires, R.; Morales, S.; Landeros, N.; Reyes, J.M.; Peralta, O.; Tapia, J.C.; et al. Association of *PALB2* sequence variants with the risk of familial and early-onset breast cancer in a South-American population. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gonzalez-Hormazabal, P.; Reyes, J.M.; Blanco, R.; Bravo, T.; Carrera, I.; Peralta, O.; Gomez, F.; Waugh, E.; Margarit, S.; Ibañez, G.; et al. The *BARD1* Cys557Ser variant and risk of familial breast cancer in a South-American population. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 8091–8098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Gonzalez-Hormazabal, P.; Bravo, T.; Blanco, R.; Valenzuela, C.Y.; Gomez, F.; Wauhg, E.; Peralta, O.; Ortuzar, W.; Reyes, J.M.; Jara, L. Association of common *ATM* variants with familial breast cancer in a South American population. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gonzalez-Hormazabal, P.; Castro, V.G.; Blanco, R.; Gomez, F.; Peralta, O.; Waugh, E.; Bravo, T.; Reyes, J.M.; Jara, L. Absence of *CHEK2* 1100delC mutation in familial breast cancer cases from a South American population. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *110*, 543–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Jara, L.; Gonzalez-Hormazabal, P.; Cerceno, K.; Di Capua, G.A.; Reyes, J.M.; Blanco, R.; Bravo, T.; Peralta, O.; Gomez, F.; Waugh, E.; et al. Genetic variants in *FGFR2* and *MAP3K1* are associated with the risk of familial and early-onset breast cancer in a South-American population. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *137*, 559–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Elematore, I.; Gonzalez-Hormazabal, P.; Reyes, J.M.; Blanco, R.; Bravo, T.; Peralta, O.; Gomez, F.; Waugh, E.; Margarit, S.; Ibanez, G.; et al. Association of genetic variants at *TOX3*, 2q35 and 8q24 with the risk of familial and early-onset breast cancer in a South-American population. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, *41*, 3715–3722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mehrgou, A.; Akouchekian, M. The importance of *BRCA1* and *BRCA2* genes mutations in breast cancer development. *Med. J. Islam. Repub. Iran* **2016**, *30*, 369. [[PubMed](#)]
14. Rothe, F.; Ignatiadis, M.; Chaboteaux, C.; Haibe-Kains, B.; Kheddoumi, N.; Majjaj, S.; Badran, B.; Fayyad-Kazan, H.; Desmedt, C.; Harris, A.L.; et al. Global microRNA expression profiling identifies miR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Song, F.J.; Chen, K.X. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: Big effects on cancer. *Chin. J. Cancer* **2011**, *30*, 381–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **1993**, *75*, 843–854. [[CrossRef](#)]
17. He, L.; Hannon, G.J. microRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **2005**, *120*, 15–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Erson, A.E.; Petty, E.M. microRNAs in development and disease. *Clin. Genet.* **2008**, *74*, 296–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lu, J.; Getz, G.; Miska, E.A.; Alvarez-Saavedra, E.; Lamb, J.; Peck, D.; Sweet-Cordero, A.; Ebert, B.L.; Mak, R.H.; Ferrando, A.A.; et al. microRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **2005**, *435*, 834–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Esquela-Kerscher, A.; Slack, F.J. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 259–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. O'Day, E.; Lal, A. microRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, 201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chen, Q.H.; Wang, Q.B.; Zhang, B. Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: A HuGE meta-analysis. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 529–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Catucci, I.; Yang, R.; Verderio, P.; Pizzamiglio, S.; Heesen, L.; Hemminki, K.; Sutter, C.; Wappenschmidt, B.; Dick, M.; Arnold, N.; et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, E1052–E1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pastrello, C.; Polesel, J.; Della Puppa, L.; Viel, A.; Maestro, R. Association between hsa-miR-146a genotype and tumor age-of-onset in *BRCA1/BRCA2*-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 2124–2126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yang, R.; Schlehe, B.; Hemminki, K.; Sutter, C.; Bugert, P.; Wappenschmidt, B.; Volkmann, J.; Varon, R.; Weber, B.H.; et al. A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *121*, 693–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Garcia, A.I.; Cox, D.G.; Barjhoux, L.; Verny-Pierre, C.; Barnes, D.; Antoniou, A.C.; Stoppa-Lyonnet, D.; Sinilnikova, O.M.; Mazoyer, S. The rs2910164:G>C SNP in the *MIR146A* gene is not associated with breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 1004–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Catucci, I.; Verderio, P.; Pizzamiglio, S.; Bernard, L.; Dall'olio, V.; Sardella, D.; Ravagnani, F.; Galastri, L.; Barile, M.; Peissel, B.; et al. The SNP rs895819 in miR-27a is not associated with familial breast cancer risk in Italians. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *133*, 805–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lian, H.; Wang, L.; Zhang, J. Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Has-miR-146a Rs2910164 polymorphism in Europeans. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hu, Z.; Liang, J.; Wang, Z.; Tian, T.; Zhou, X.; Chen, J.; Miao, R.; Wang, Y.; Wang, X.; Shen, H. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum. Mutat.* **2009**, *30*, 79–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zhang, M.; Jin, M.; Yu, Y.; Zhang, S.; Wu, Y.; Liu, H.; Chen, B.; Li, Q.; Ma, X.; Chen, K. Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population. *Eur. J. Cancer Care* **2012**, *21*, 274–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Alshatwi, A.A.; Shafi, G.; Hasan, T.N.; Syed, N.A.; Al-Hazzani, A.A.; Alsaif, M.A.; Alsaif, A.A. Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kontorovich, T.; Levy, A.; Korostishevsky, M.; Nir, U.; Friedman, E. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 589–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kabirizadeh, S.; Azadeh, M.; Mirhosseini, M.; Ghaedi, K.; Tanha, H.M. The SNP rs3746444 within miR-499a is associated with breast cancer risk in Iranian population. *J. Cell. Immunother.* **2016**, *2*, 95–97. [[CrossRef](#)]
35. Linhares, J.J.; Azevedo, M., Jr.; Siufi, A.A.; de Carvalho, C.V.; Wolgien Mdel, C.; Noronha, E.C.; Bonetti, T.C.; da Silva, I.D. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in microRNAs (hsa-miR-196a2 rs11614913 C/T) from Brazilian women with breast cancer. *BMC Med. Genet.* **2012**, *13*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Morales, S.; Gulppi, F.; Gonzalez-Hormazabal, P.; Fernandez-Ramires, R.; Bravo, T.; Reyes, J.M.; Gomez, F.; Waugh, E.; Jara, L. Association of single nucleotide polymorphisms in pre-miR-27a, pre-miR-196a2, pre-miR-423, miR-608 and pre-miR-618 with breast cancer susceptibility in a South American population. *BMC Genet.* **2016**, *17*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Wang, P.Y.; Gao, Z.H.; Jiang, Z.H.; Li, X.X.; Jiang, B.F.; Xie, S.Y. The associations of single nucleotide polymorphisms in miR-146a, miR-196a and miR-499 with breast cancer susceptibility. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Li, W.; Duan, R.; Kooy, F.; Sherman, S.L.; Zhou, W.; Jin, P. Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. *J. Med. Genet.* **2009**, *46*, 358–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Peterlongo, P.; Caleca, L.; Cattaneo, E.; Ravagnani, F.; Bianchi, T.; Galastri, L.; Bernard, L.; Ficarazzi, F.; Dall'olio, V.; Marme, F.; et al. The rs12975333 variant in the miR-125a and breast cancer risk in Germany, Italy, Australia and Spain. *J. Med. Genet.* **2011**, *48*, 703–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Quann, K.; Jing, Y.; Rigoutsos, I. Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Moskwa, P.; Buffa, F.M.; Pan, Y.; Panchakshari, R.; Gottipati, P.; Muschel, R.J.; Beech, J.; Kulshrestha, R.; Abdelmohsen, K.; Weinstock, D.M.; et al. miR-182-mediated downregulation of *BRCA1* impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 210–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Georges, S.A.; Biery, M.C.; Kim, S.Y.; Schelter, J.M.; Guo, J.; Chang, A.N.; Jackson, A.L.; Carleton, M.O.; Linsley, P.S.; Cleary, M.A.; et al. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 10105–10112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Shen, J.; Ambrosone, C.B.; DiCioccio, R.A.; Odunsi, K.; Lele, S.B.; Zhao, H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1963–1966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mu, K.; Wu, Z.Z.; Yu, J.P.; Guo, W.; Wu, N.; Wei, L.J.; Zhang, H.; Zhao, J.; Liu, J.T. Meta-analysis of the association between three microRNA polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Oncotarget* **2017**, *8*, 68809–68824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Akkiz, H.; Bayram, S.; Bekar, A.; Akgollu, E.; Uskudar, O.; Sandikci, M. No association of pre-microRNA-146a rs2910164 polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish population: A case-control study. *Gene* **2011**, *486*, 104–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ma, X.P.; Zhang, T.; Peng, B.; Yu, L.; Jiang, D.K. Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Landgraf, P.; Rusu, M.; Sheridan, R.; Sewer, A.; Iovino, N.; Aravin, A.; Pfeffer, S.; Rice, A.; Kamphorst, A.O.; Landthaler, M.; et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **2007**, *129*, 1401–1414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Qi, P.; Dou, T.H.; Geng, L.; Zhou, F.G.; Gu, X.; Wang, H.; Gao, C.F. Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hum. Immunol.* **2010**, *71*, 621–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Li, X.; Wang, J.; Jia, Z.; Cui, Q.; Zhang, C.; Wang, W.; Chen, P.; Ma, K.; Zhou, C. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. Tian, T.; Shu, Y.; Chen, J.; Hu, Z.; Xu, L.; Jin, G.; Liang, J.; Liu, P.; Zhou, X.; Miao, R.; et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2009**, *18*, 1183–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Srivastava, K.; Srivastava, A.; Mittal, B. Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of gallbladder cancer in North Indian population. *J. Hum. Genet.* **2010**, *55*, 495–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Liu, Z.; Li, G.; Wei, S.; Niu, J.; El-Naggar, A.K.; Sturgis, E.M.; Wei, Q. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **2010**, *116*, 4753–4760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhou, J.; Lv, R.; Song, X.; Li, D.; Hu, X.; Ying, B.; Wei, Y.; Wang, L. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population. *DNA Cell Biol.* **2012**, *31*, 524–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Min, K.T.; Kim, J.W.; Jeon, Y.J.; Jang, M.J.; Chong, S.Y.; Oh, D.; Kim, N.K. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. *Mol. Carcinog.* **2012**, *51* (Suppl. 1), E65–E73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Schulman, B.R.; Esquela-Kerscher, A.; Slack, F.J. Reciprocal expression of *lin-41* and the microRNAs *let-7* and *mir-125* during mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* **2005**, *234*, 1046–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wu, L.; Belasco, J.G. Micro-RNA regulation of the mammalian *lin-28* gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 9198–9208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Scott, G.K.; Goga, A.; Bhaumik, D.; Berger, C.E.; Sullivan, C.S.; Benz, C.C. Coordinate suppression of *ERBB2* and *ERBB3* by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1479–1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Iorio, M.V.; Ferracin, M.; Liu, C.G.; Veronese, A.; Spizzo, R.; Sabbioni, S.; Magri, E.; Pedriali, M.; Fabbri, M.; Campiglio, M.; et al. microRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7065–7070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Duan, R.; Pak, C.; Jin, P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 1124–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hu, Y.; Yu, C.Y.; Wang, J.L.; Guan, J.; Chen, H.Y.; Fang, J.Y. microRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Gonzalez-Hormazabal, P.; Gutierrez-Enriquez, S.; Gaete, D.; Reyes, J.M.; Peralta, O.; Waugh, E.; Gomez, F.; Margarit, S.; Bravo, T.; Blanco, R.; et al. Spectrum of *BRCA1/2* point mutations and genomic rearrangements in high-risk breast/ovarian cancer Chilean families. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *126*, 705–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Chomczynski, P.; Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 581–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Moazzeni, H.; Najafi, A.; Khani, M. Identification of direct target genes of miR-7, miR-9, miR-96, and miR-182 in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol. Cell. Probes* **2017**, *34*, 45–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ruan, K.; Fang, X.; Ouyang, G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* **2009**, *285*, 116–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ryan, B.M.; Robles, A.I.; Harris, C.C. Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 389–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Afsharzadeh, S.M.; Mohaddes Ardebili, S.M.; Seyedi, S.M.; Karimian Fathi, N.; Mojarrad, M. Association between rs11614913, rs3746444, rs2910164 and occurrence of breast cancer in Iranian population. *Meta Gene* **2017**, *11*, 20–25. [[CrossRef](#)]
68. Bansal, C.; Sharma, K.L.; Misra, S.; Srivastava, A.N.; Mittal, B.; Singh, U.S. Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of breast cancer in the North Indian population. *Ecancermedicalscience* **2014**, *8*, 473. [[PubMed](#)]
69. He, B.; Pan, Y.; Xu, Y.; Deng, Q.; Sun, H.; Gao, T.; Wang, S. Associations of polymorphisms in microRNAs with female breast cancer risk in Chinese population. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 4575–4582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

70. Srivastava, K.; Srivastava, A. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Gao, L.B.; Bai, P.; Pan, X.M.; Jia, J.; Li, L.J.; Liang, W.B.; Tang, M.; Zhang, L.S.; Wei, Y.G.; Zhang, L. The association between two polymorphisms in pre-miRNAs and breast cancer risk: A meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *125*, 571–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Zhang, H.; Zhang, Y.; Yan, W.; Wang, W.; Zhao, X.; Ma, X.; Gao, X.; Zhang, S. Association between three functional microRNA polymorphisms (miR-499 rs3746444, miR-196a rs11614913 and miR-146a rs2910164) and breast cancer risk: A meta-analysis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 393–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Cruz-Coke, R. Ethnic origin and evolution of the Chilean population. *Rev. Med. Chile* **1976**, *104*, 365–368. [[PubMed](#)]
74. Valenzuela, C.Y.; Acuna, M.P.; Harb, Z. Sociogenetic gradient in the Chilean population. *Rev. Med. Chile* **1987**, *115*, 295–299. [[PubMed](#)]
75. Valenzuela, C.Y.; Harb, Z. Socioeconomic assortative mating in Santiago, Chile: A demonstration using stochastic matrices of mother-child relationships applied to ABO blood groups. *Soc. Biol.* **1977**, *24*, 225–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Fan, C.; Chen, C.; Wu, D. The association between common genetic variant of microRNA-499 and cancer susceptibility: A meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 3389–3394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Omrani, M.; Hashemi, M.; Eskandari-Nasab, E.; Hasani, S.S.; Mashhadi, M.A.; Arbabi, F.; Taheri, M. hsa-miR-499 rs3746444 gene polymorphism is associated with susceptibility to breast cancer in an Iranian population. *Biomark. Med.* **2014**, *8*, 259–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Dai, Z.M.; Kang, H.F.; Zhang, W.G.; Li, H.B.; Zhang, S.Q.; Ma, X.B.; Lin, S.; Wang, M.; Feng, Y.J.; Liu, K.; et al. The associations of single nucleotide polymorphisms in miR196a2, miR-499, and miR-608 with breast cancer susceptibility: A STROBE-compliant observational study. *Medicine* **2016**, *95*, e2826. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Chen, P.; Zhang, J.; Zhou, F. miR-499 rs3746444 polymorphism is associated with cancer development among Asians and related to breast cancer susceptibility. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 10433–10438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Fuentes, M.; Pulgar, I.; Gallo, C.; Bortolini, M.C.; Canizales-Quinteros, S.; Bedoya, G.; Gonzalez-Jose, R.; Ruiz-Linares, A.; Rothhammer, F. Gene geography of Chile: Regional distribution of American, European and African genetic contributions. *Rev. Med. Chile* **2014**, *142*, 281–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Muinos-Gimeno, M.; Montfort, M.; Bayes, M.; Estivill, X.; Espinosa-Parrilla, Y. Design and evaluation of a panel of single-nucleotide polymorphisms in microRNA genomic regions for association studies in human disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **2010**, *18*, 218–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Miao, L.; Wang, L.; Zhu, L.; Du, J.; Zhu, X.; Niu, Y.; Wang, R.; Hu, Z.; Chen, N.; Shen, H.; et al. Association of microRNA polymorphisms with the risk of head and neck squamous cell carcinoma in a Chinese population: A case-control study. *Chin. J. Cancer* **2016**, *35*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Song, C.; Zhang, L.; Wang, J.; Huang, Z.; Li, X.; Wu, M.; Li, S.; Tang, H.; Xie, X. High expression of microRNA-183/182/96 cluster as a prognostic biomarker for breast cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Dambal, S.; Shah, M.; Mihelich, B.; Nonn, L. The microRNA-183 cluster: The family that plays together stays together. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 7173–7188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Li, P.; Sheng, C.; Huang, L.; Zhang, H.; Cheng, Z.; Zhu, Q. miR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration. *Breast Cancer Res.* **2014**, *16*, 473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Krishnan, K.; Steptoe, A.L.; Martin, H.C.; Wani, S.; Nones, K.; Waddell, N.; Mariasegaram, M.; Simpson, P.T.; Lakhani, S.R.; Gabrielli, B.; et al. microRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA* **2013**, *19*, 230–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Guttilla, I.K.; White, B.A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23204–23216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Zhang, J.; Kong, X.; Li, J.; Luo, Q.; Li, X.; Shen, L.; Chen, L.; Fang, L. miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. *Oncol. Rep.* **2014**, *31*, 1357–1363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Yuan, S.H.; Qiu, Z.; Ghosh, A. TOX3 regulates calcium-dependent transcription in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2909–2914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

90. Maia, A.T.; Spiteri, I.; Lee, A.J.; O'Reilly, M.; Jones, L.; Caldas, C.; Ponder, B.A. Extent of differential allelic expression of candidate breast cancer genes is similar in blood and breast. *Breast Cancer Res.* **2009**, *11*, R88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Seksenyan, A.; Kadavallore, A.; Walts, A.E.; de la Torre, B.; Berel, D.; Strom, S.P.; Aliahmad, P.; Funari, V.A.; Kaye, J. TOX3 is expressed in mammary ER⁺ epithelial cells and regulates ER target genes in luminal breast cancer. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Easton, D.F.; Pooley, K.A.; Dunning, A.M.; Pharoah, P.D.; Thompson, D.; Ballinger, D.G.; Struewing, J.P.; Morrison, J.; Field, H.; Luben, R.; et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **2007**, *447*, 1087–1093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Ruiz-Narvaez, E.A.; Rosenberg, L.; Cozier, Y.C.; Cupples, L.A.; Adams-Campbell, L.L.; Palmer, J.R. Polymorphisms in the TOX3/LOC643714 locus and risk of breast cancer in African-American women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2010**, *19*, 1320–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Slattery, M.L.; Baumgartner, K.B.; Giuliano, A.R.; Byers, T.; Herrick, J.S.; Wolff, R.K. Replication of five GWAS-identified loci and breast cancer risk among Hispanic and non-Hispanic white women living in the Southwestern United States. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *129*, 531–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Stacey, S.N.; Manolescu, A.; Sulem, P.; Rafnar, T.; Gudmundsson, J.; Gudjonsson, S.A.; Masson, G.; Jakobsdottir, M.; Thorlacius, S.; Helgason, A.; et al. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 865–869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Udler, M.S.; Ahmed, S.; Healey, C.S.; Meyer, K.; Struewing, J.; Maranian, M.; Kwon, E.M.; Zhang, J.; Tyrer, J.; Karlins, E.; et al. Fine scale mapping of the breast cancer 16q12 locus. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 2507–2515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Riaz, M.; Berns, E.M.; Sieuwerts, A.M.; Ruigrok-Ritstier, K.; de Weerd, V.; Groenewoud, A.; Uitterlinden, A.G.; Look, M.P.; Klijn, J.G.; Sleijfer, S.; et al. Correlation of breast cancer susceptibility loci with patient characteristics, metastasis-free survival, and mRNA expression of the nearest genes. *Breast Cancer Res. Treat.* **2012**, *133*, 843–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Genetic Variation in MicroRNA-423 Promotes Proliferation, Migration, Invasion, and Chemoresistance in Breast Cancer Cells

Sebastian Morales-Pison ^{1,†} , Lilian Jara ^{1,†} , Valentina Carrasco ², Cristian Gutiérrez-Vera ³ , José Miguel Reyes ⁴, Patricio Gonzalez-Hormazabal ¹, Leandro J. Carreño ³, Julio C. Tapia ^{5,*} , and Héctor R. Contreras ^{6,*}

- ¹ Laboratorio de Genética Humana, Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencia Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 8380453, Chile; seba.morales.p@gmail.com (S.M.-P.); ljara@med.uchile.cl (L.J.); patriciogonzalez@uchile.cl (P.G.-H.)
 - ² Laboratorio de Biología Estructural y Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago 8380453, Chile; valentina.carrasco@gmail.com
 - ³ Millennium Institute on Immunology and Immunotherapy, Programa de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 8380453, Chile; cristian.gutierrez.vera@ug.uchile.cl (C.G.-V.); leandrocarreno@uchile.cl (L.J.C.)
 - ⁴ Clínica Las Condes, Santiago 7591047, Chile; jmreyes@clc.cl
 - ⁵ Laboratorio de Transformación Celular, Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 8380453, Chile
 - ⁶ Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Oncología Básico Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 8380453, Chile
- * Correspondence: jtapia@med.uchile.cl (J.C.T.); hcontrer@uchile.cl (H.R.C.) Tel.: +56-2-9788647 (J.C.T.)
† Both Sebastian Morales-Pison and Lilian Jara are considered first authors.



Citation: Morales-Pison, S.; Carrasco, V.; Gutiérrez-Vera, C.; Reyes, J.M.; Gonzalez-Hormazabal, P.; Carreño, L.J.; Tapia, J.C.; Contreras, H.R.; Jara, L. Genetic Variation in MicroRNA-423 Promotes Proliferation, Migration, Invasion, and Chemoresistance in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 380. <https://doi.org/10.3390/ijms23010380>

Academic Editor: Michael Welsh

Received: 29 October 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 29 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: MicroRNA-423 (miR-423) is highly expressed in breast cancer (BC). Previously, our group showed that the SNP rs6505162:C>A located in the pre-miR-423 was significantly associated with increased familial BC risk in patients with a strong family history of BC. Therefore, in this study, we evaluated the functional role of rs6505162 in mammary tumorigenesis in vitro to corroborate the association of this SNP with BC risk. We found that rs6505162:C>A upregulated expression of both mature miR-423 sequences (3p and 5p). Moreover, pre-miR-423-A enhanced proliferation, and promoted cisplatin resistance in BC cell lines. We also showed that pre-miR-423-A expression decreased cisplatin-induced apoptosis, and increased BC cell migration and invasion. We propose that the rs6505162-A allele promotes miR-423 overexpression, and that the rs6505162-A allele induces BC cell proliferation, viability, chemoresistance, migration, and invasion, and decreases cell apoptosis as a consequence. We suggest that rs6505162:C>A is a functional SNP site with potential utility as a marker for early diagnosis, prognosis, and treatment efficacy monitoring in BRCA1/2-negative BC patients, as well as a possible therapeutic target.

Keywords: breast cancer; microRNA function; microRNA-423; functional study



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most frequent cancer affecting women worldwide. In Chile, BC has the highest mortality rate among cancers in women (16.6/100,000 women) [1]. Though genetic factors play an important role in etiology, the most well-known susceptibility genes, BRCA1 and BRCA2, only account for about 16% of familial cases [2]. Currently, there is consensus that other susceptibility alleles, called moderate- or low-penetrance genes, could also be responsible for a significant percentage of BC susceptibility [2].

In recent years, evidence has emerged to support a role of microRNAs (miRNAs) in BC development and progression [3,4]. These molecules can regulate gene expression by degrading or blocking translation of their specific target mRNAs, mainly by binding to

their 3'-untranslated region (UTR) [5,6]. Approximately 30% of all of human genes are regulated by miRNAs [7,8]. Growing evidence indicates that miRNA variations and mutations are correlated with various human cancers, including BC [9–11]. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common variations in the human genome. SNPs in miRNAs can alter expression, lead to maturation of aberrant miRNA, and affect target binding affinity and specificity [11,12]. Several studies have shown that miRNA-423 (miR-423) plays an important role in tumorigenesis [13–15]. In hepatocellular carcinoma, miR-423 promotes cell growth, and regulates G(1)/S transition by targeting p21 Cip1/waf1 [13]. Moreover, in gastric cancers [15–18], glioblastomas [19–22], laryngeal carcinomas [14], lung cancers [23–25], and endometrial cancers [26,27], miR-423 is implicated in cell proliferation, migration, and invasion. miR-423 also seems to influence proliferation and apoptosis in colorectal [28–31] and prostate cancers [32].

Zhao et al. [33] suggested that the SNP rs6505162:C>A in pre-miR-423 affects mature miRNA expression, and that miR-423 plays a potentially oncogenic role in breast tumorigenesis. Our group previously evaluated the association between rs6505162:C>A and BC susceptibility in a Chilean population using a case-control study. We concluded that the rs6505162-A allele was significantly associated with increased familial BC risk in patients with a strong family history (OR = 1.7 [95% CI 1.0–2.0] $p = 0.05$) [34]. Given these promising findings, the goal of the present study was to perform a functional characterization of the rs6505162:C>A polymorphism, evaluating its role in several breast tumorigenesis processes in vitro.

2. Results

2.1. miR-423 Expression Was Upregulated by Rs6505162:C>A

In a previous article, our findings supported the contention that allele A (the minor allele, or MA) of rs6505162:C>A in pre-miR-423 increased familial BC risk. Consequently, we were interested in exploring the effect of pre-miR-423 rs6505162:C>A on mature miR-423 expression. Pre-miR-423 produces two mature sequences: miR-423-3p and miR-423-5p. We constructed pre-miR-423-C (wild-type) and pre-miR-423-A (MA) expression vectors, which were transfected into MCF-10A, MCF-7, and MDA-MB-231 cells to produce stable populations. Expression was evaluated by RT-qPCR. Figure 1A shows that miR-423-3p and miR-423-5p expression levels were very low, and were similar in MCF-10A cells regardless of transfection with pre-miR-423-C or pre-miR-423-A. On the other hand, miR-423-3p and miR-423-5p levels were significantly increased in both MCF-7 and MDA-MB-231 BC cells transfected with pre-miR-423-A versus pre-miR-423-C (Figure 1B,C). These results suggest that the expression levels of both mature miR-423 sequences (3p and 5p) are upregulated in BC cells by the presence of the rs6505162-A allele in pre-miR-423.

2.2. Pre-miR-423-A Enhanced Breast Cancer Cell Proliferation

MCF-7 and MDA-MB-231 transfected with pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector were studied to assess the effect of pre-miR-423 rs6505162:C>A. Proliferation was evaluated in both stable cell lines with CFSE-based proliferation assays at 24 and 48 h. Figure 2A shows that transfection with pre-miR-423-C had no effect on the proliferation index in MCF-7 cells compared to transfection with empty vector, after either 24 or 48 h. However, proliferation indices were significantly higher ($p < 0.01$) in cells transfected with pre-miR-423-A as compared to pre-miR-423-C or empty vector at both 24 and 48 h (Figure 2A). Figure 2B shows the results for MDA-MB-231 cells. No significant differences in the proliferation index were observed among cells transfected with pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector at 24 h. However, cells transfected with pre-miR-423-A had significantly higher proliferation indices than those transfected with pre-miR-423-C or empty vector at 48 h ($p < 0.001$) (Figure 2B). Furthermore, we evaluated the proliferation index in the normal breast cell line MCF-10A, where we observed no significant differences when cells were transfected with pre-miR-423-C, pre-miR-423-A, or empty vector, at either

24 or 48 h (Figure 2C). The results obtained indicate that pre-miR-423-A significantly enhanced proliferation of both luminal A and triple-negative representative BC cells.

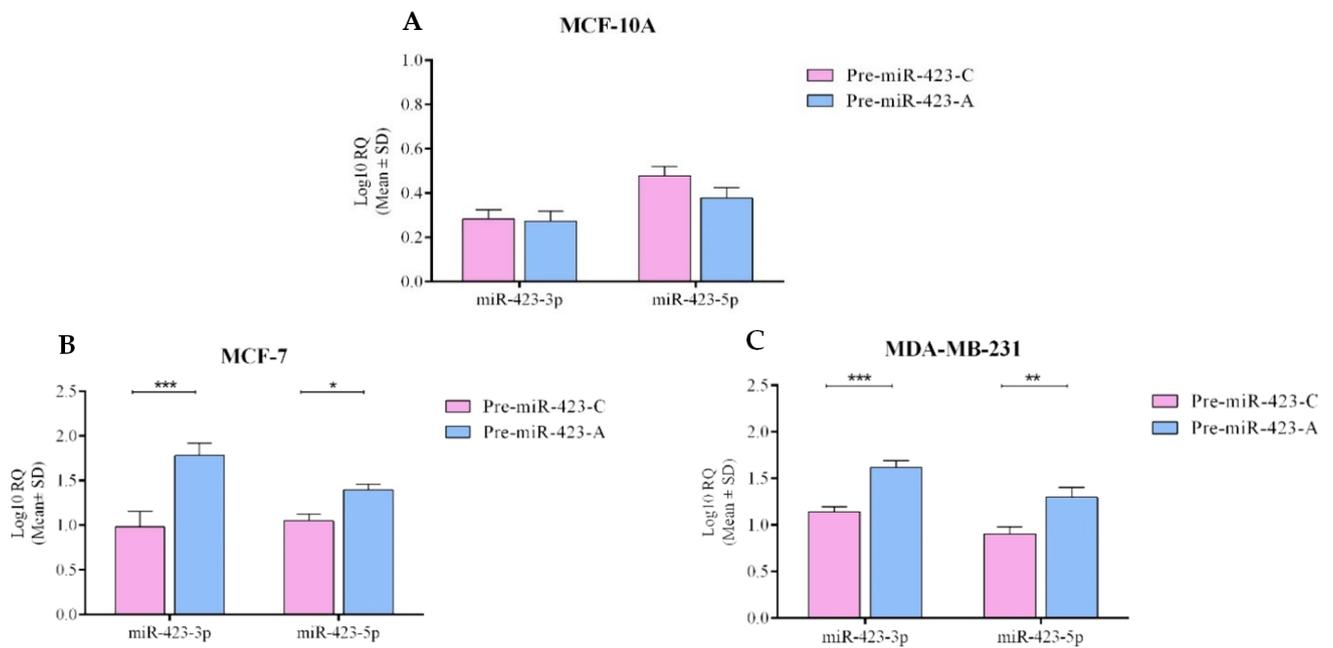


Figure 1. Mature miR-423 expression was differentially regulated by the SNP rs6505162:C>A in normal and cancerous breast cells. Levels of mature miR-423-3p and miR-423-5p were measured in stable populations of normal breast MCF-10A (A), MCF-7 (B), and MDA-MB-231 (C) BC cell lines, which were transfected with expression vectors containing pre-miR-423-A or pre-miR-423-C. Fold changes were normalized to the empty vector. Data represent means (\pm SD) of three independent experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

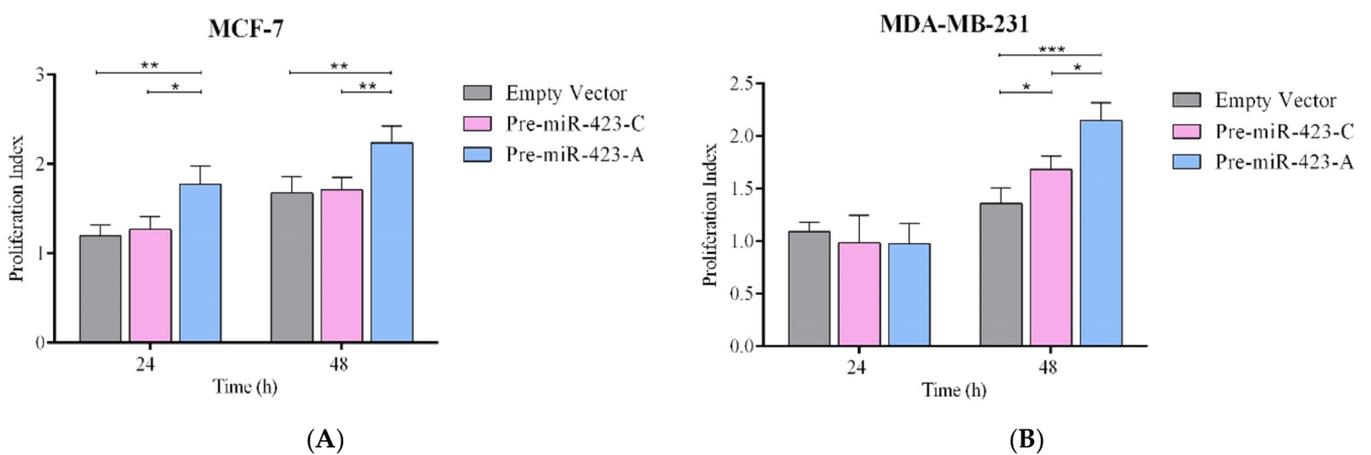


Figure 2. Cont.

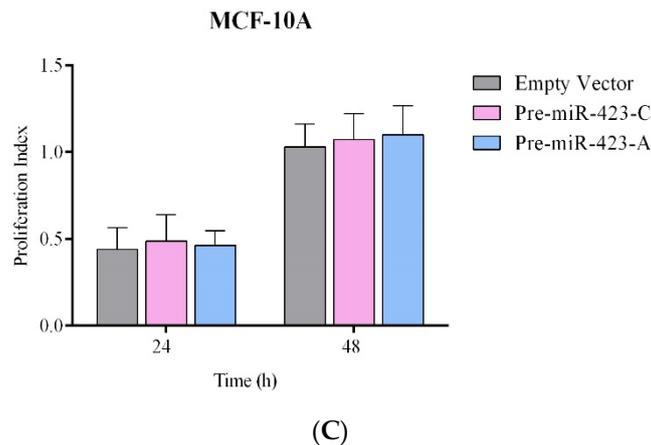


Figure 2. Cell proliferation was increased by the SNPs rs6505162:C>A in luminal A and triple-negative BC cells. Proliferation index was measured by CFSE-based flow cytometry in stable populations of MCF-7 luminal A (A), MDA-MB-231 triple-negative (B), and MCF-10A (C) cells transfected with expression vectors containing pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector at 24 and 48 h. Data represent means (\pm SD) of three independent experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

2.3. Pre-miR-423-A Expression Promoted Cisplatin Resistance in Breast Cancer Cells

It is very well known that some miRNAs can regulate resistance to antineoplastic drugs [35]. To study the effects of the SNP rs6505162:C>A on cisplatin sensitivity, stable MCF-7 and MDA-MB-231 BC cells were cultured with various concentrations of cisplatin (0, 40, and 80 μ M) for 48 h. An MTS assay was used to evaluate cisplatin sensitivity. Survival in the presence of cisplatin was significantly higher for MCF-7 cells transfected with pre-miR-423-A than for those transfected with pre-miRNA-423-C or empty vector (Figure 3A). Similar results were observed for stable MDA-MB-231 cells (Figure 3B). In the triple-negative BC cell line, a slight, but significant, cisplatin resistance was observed in cells transfected with pre-miR-423-C versus empty vector. In summary, the results support the assertion that the SNP rs6505162-A is a risk allele, as the presence of allele A in pre-miR-423 was associated with a significant elevation in cell survival and cisplatin resistance as compared to allele C or empty vector for two concentrations of cisplatin.

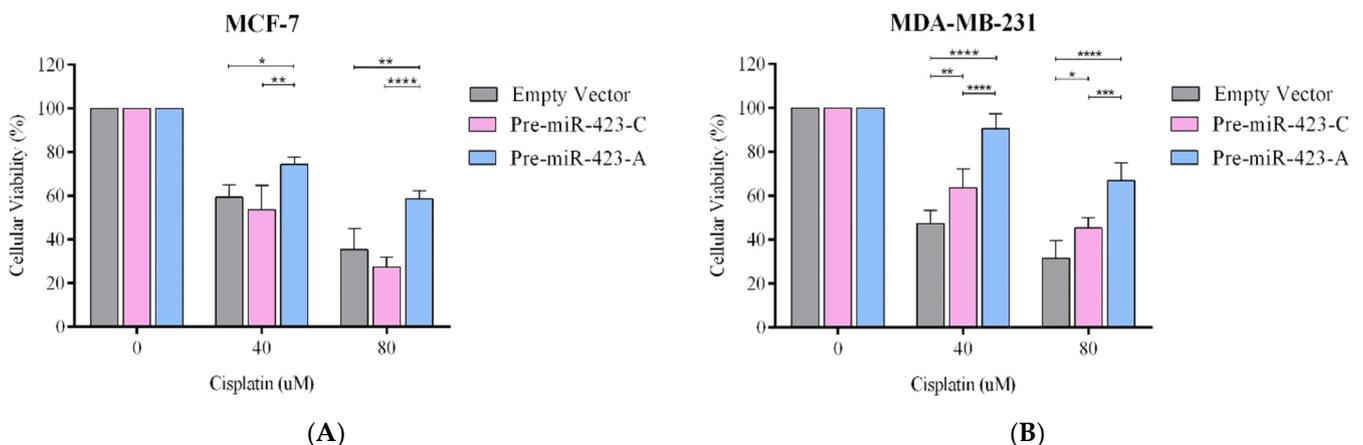


Figure 3. Resistance to cisplatin was differentially modulated by the SNP rs6505162:C>A in luminal A and triple-negative BC cell lines. Resistance to cisplatin was measured by MTS assay in stable populations of MCF-7 luminal A (A) and MDA-MB-231 triple-negative (B) BC cells transfected with vectors containing pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector. Data represent means (\pm SD) of three independent experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

2.4. Pre-miR-423-A Expression Decreased Cisplatin-Induced Apoptosis of Breast Cancer Cells

To examine the role of the SNP rs6505162:C>A in cisplatin-induced apoptosis, MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-423-C, pre-miR-423-A, or empty vector were treated with 100 μ M cisplatin. Apoptosis was estimated by measuring caspase 3/7 activity. Figure 4A,B shows significantly lower levels of cisplatin-induced apoptosis at 48 h in MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-423-A compared to those transfected with pre-miR-423-C ($p < 0.0001$) or empty vector ($p < 0.0001$). These results demonstrate that miR-423 upregulation, attributable to the presence of the rs6505162-A allele in pre-miR-423, inhibited cisplatin-induced apoptosis by decreasing caspase 3/7 activity. The results are consistent with our previously-published findings implicating rs6505162-A as a risk allele.

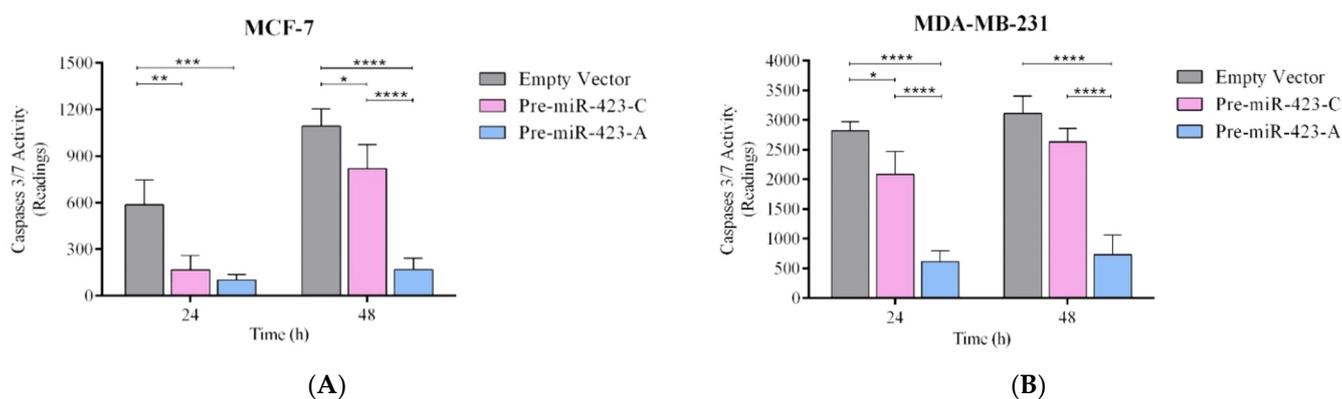


Figure 4. Pre-miR-423-A expression protected against apoptosis in luminal A and triple-negative BC cell lines. Apoptosis was assessed by measuring caspase 3/7 activity in stable populations of MCF-7 luminal A (A) and MDA-MB-231 triple-negative (B) BC cells transfected with vectors containing pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector. Data represent means (\pm SD) of three independent experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

2.5. Pre-miR-423-A Expression Increased Migration and Invasion in Breast Cancer Cells

To evaluate the effect of rs6505162:C>A on migration and invasion in BC cells, migration and invasion assays were performed using MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-423-C, pre-miR-423-A, or empty vector. The cells were plated in Transwell chambers with or without Matrigel. Cell migration was significantly greater in MCF-7 cells transfected with pre-miR-423-A versus pre-miR-423-C ($p < 0.01$) or empty vector ($p < 0.01$) (Figure 5A). Similar results were observed for stable MDA-MB-231 cells (Figure 5B). Our results also demonstrated increased cell invasion in both MCF-7 (Figure 6A) and MDA-MB-231 (Figure 6B) cells transfected with pre-miR-423-A. No significant differences in migration or invasion were observed between MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-423-C versus empty vector (Figure 5A,B and Figure 6A,B). Therefore, it was demonstrated that miR-423 upregulation in the presence of the pre-miR-423 rs6505162-A allele enhanced migration and invasion of luminal A and triple-negative BC cells.

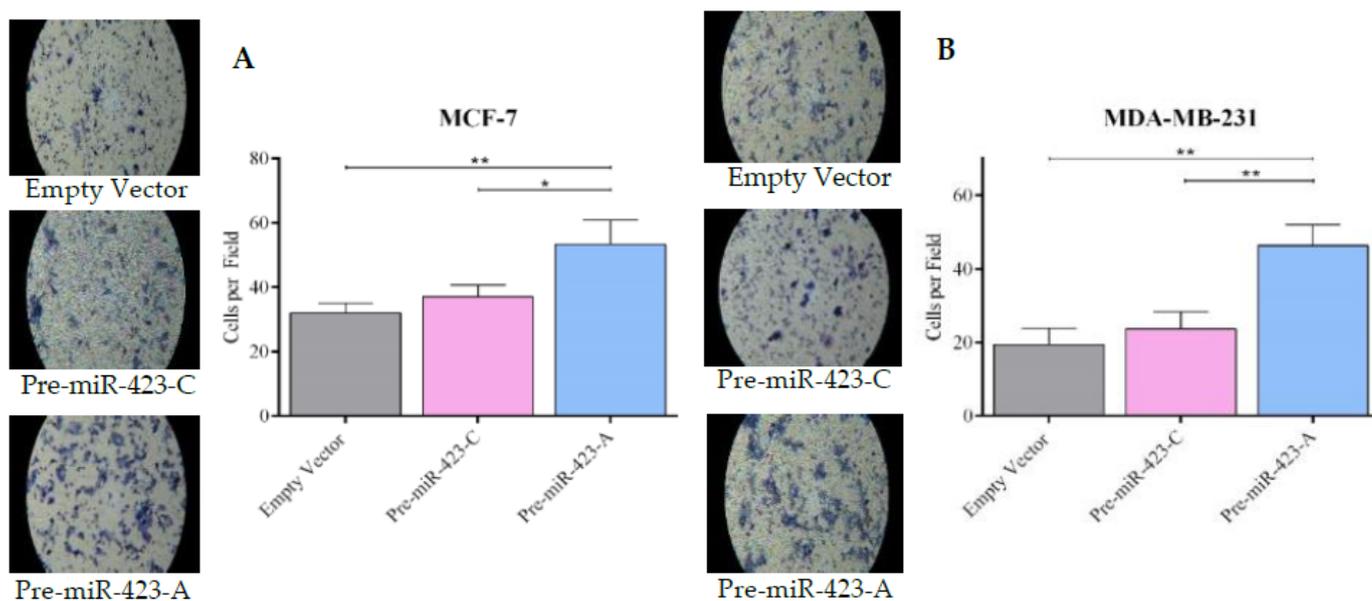


Figure 5. SNP rs6505162:C>A expression increased cell migration in luminal A and triple-negative BC cell lines. Cell migration was measured in stable populations of MCF-7 luminal A (A) and MDA-MB-231 triple-negative (B) BC cells transfected with expression vectors containing pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector. The number of migrated cells was quantified by counting the cells in the pictures taken. Data represent means (\pm SD) of three independent experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

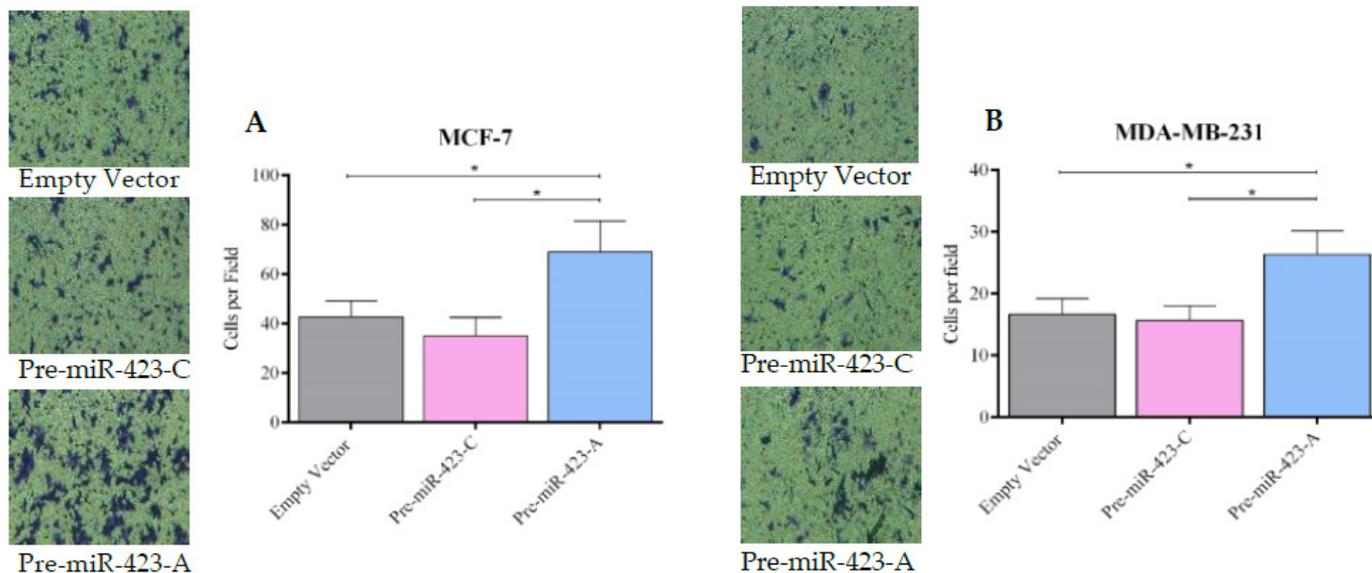


Figure 6. SNP rs6505162:C>A expression increased cell invasion in luminal A and triple-negative BC cell lines. Cell invasion was measured in stable populations of MCF-7 luminal A (A) and MDA-MB-231 triple-negative (B) BC cells transfected with expression vectors containing pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector. The number of invasive cells was quantified by counting the cells in the pictures taken. Data represent means (\pm SD) of three independent experiments (* $p < 0.05$).

3. Discussion

It is well established that miRNAs participate in the initial and developmental stages of numerous types of cancers [36,37]. Notably, miRNAs are frequently located in cancer-associated genome regions [38], and seem to regulate almost all cancer-associated genes [39]. Mutations or SNPs located in pri- or pre-miRNAs may affect the transcription of miRNA

primary transcripts, processing of miRNA precursors to mature miRNAs, and miRNA-mRNA interactions [40].

Numerous studies have indicated that miR-423 shows distinct expression patterns and functions in cellular processes, such as cell proliferation, apoptosis, tumor metastasis, and chemoresistance [41]. miR-423 is highly expressed in multiple cancer types, including hepatocellular carcinomas, head and neck cancers, gastric cancers, colorectal cancers, glioblastomas, lung cancers, ovarian cancers, laryngeal carcinomas, endometrial cancers, prostate carcinomas, and breast cancers [15,41–45]. A pre-miRNA usually produces two mature sequences: miRNA-5p and miRNA-3p. It is thought that one pre-miRNA is typically processed into one mature miRNA, which incorporates into the RISC complex, whereas the other arm of the pre-miRNA degrades rapidly. However, pre-miR-423 can simultaneously produce two mature sequences, possibly as a consequence of structural characteristics that allow both strands to join the RISC complex [13]. It has been reported that both of the mature miR-423 sequences, miR-423-3p and miR-423-5p, are involved in tumorigenesis [33]. In laryngeal carcinoma, miR-423-3p increases cell proliferation, invasion, and migration via modulation of AdipoR2 [14]. In gastric cancer cells, miR-423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 [15], and in hepatocellular carcinoma, miR-423-3p overexpression promotes cell growth and regulates G1/S transition by targeting *p21Cip/WaF1*, a tumor suppressor gene [13]. Overexpression of miR-423-5p induces upregulation of *p-ERK1/2* and *p-AKT*, and enhances glioma cell proliferation, as well as angiogenesis and metastasis, by targeting inhibitor of growth 4 (ING-4) [19]. miR-423-3p acts as an oncogene, and promotes cell proliferation, migration, and invasion in lung cancer [24], and in endometrial cancer, miR-423 promotes proliferation, migration, invasion, and chemoresistance [26]. In prostate cancer, miR-423-5p enhances proliferation and decreases apoptosis [32,41]. miR-423-5p has a protective effect in colorectal cancer, downregulating cell proliferation, and upregulating apoptosis [28,41], and in ovarian cancer, miR-423-5p decreases cell proliferation and invasion [41,46]. In breast cancer, Zhao et al. [33] showed that both forms of mature miR-423 were expressed in nine breast cancer cell lines. In addition, Xia et al. [47] reported that miR-423 acts as an oncogene to promote tumor cell proliferation and migration, inhibiting ZFP36 expression via the Wnt/ β -catenin signaling pathway of BC cells. Furthermore, Dai et al. (2020) [48] demonstrated that miR-423 upregulation enhances BC cell invasion through the NF- κ B signaling pathway.

It has been established that SNPs play a crucial role in the development of human tumors [49,50]. A meta-analysis of miR-423 polymorphisms and cancer prognoses suggests that rs6505162 is a prognostic marker in all common human cancers [41]. SNP rs6505162:C>A, mapping to chromosome 17 at 17q11.2, is located in the pre-miRNA region of miR-423, 12bp from the 3' end of mature miR-423 [33]. In a previous study, our group showed that the rs6505162 allele A (rs6505162-A) is significantly associated with familial BC risk in patients with a strong family history [34]. Therefore, in this study, we performed an in vitro evaluation of the role of the SNP rs6505162:C>A in several breast tumorigenesis processes. Our results showed expression of both miR-423-3p and miR-423-5p in the MCF-7 and MDA-MB-231 BC cell lines, consistent with results from Zhao et al. [33]. We also observed expression of both mature miRNAs (5p and 3p) in the normal breast cell line, but at very low levels. Moreover, we found significantly increased levels of mature miR-423-3p and miR-423-5p in cancer cell lines transfected with pre-miR-423-A as compared to those transfected with pre-miR-423-C (the wild-type allele) in both MCF-7 and triple-negative BC cell lines, but not in the normal epithelial breast cancer line. Our results indicate that the rs6505162-A allele affects expression of both mature sequences, miR-423-3p and -5p, in cancer cell lines. Our findings are consistent with those of Zhao et al. [33]. We also evaluated the effect of rs6505162:C>A on cell proliferation using flow cytometry, as this technique is the most sensitive method available for assessing the proliferation index. Our results showed that the presence of rs6505162-A increased the proliferation rate of the BC cell line MCF7 and triple-negative BC cell line MDA-MB-231. It is likely that upregulation

of miR-423 expression levels as a consequence of the presence of the rs6505162-A allele enhances BC cell proliferation. Our results are the first to report a functional characterization of rs6505162:C>A.

Cisplatin is a well-known and effective anticancer drug that has been used to treat numerous types of malignant tumors [51]. However, many tumor cells show intrinsic or acquired resistance to chemotherapeutic drugs [52,53]. miRNAs have been demonstrated to serve essential roles in chemotherapy sensitivity [54]. Yang et al. [55] reported that miR-214 promotes cell survival, and induces cisplatin resistance by targeting PTEN in ovarian cancer. Kong et al. [56] demonstrated that miR-155 overexpression promotes BT-474 breast cells resistant to paclitaxel, VP16, and doxorubicin, whereas miR-155 downregulation sensitizes HS578T cells to these drugs. Yu et al. [57] reported that miR-17/20 overexpression increases doxorubicin-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by targeting AKT1. The present study demonstrated that miR-423 overexpression as a consequence of the presence of the rs6505162-A allele in pre-miR-423 increased survival of BC cells following cisplatin treatment. These results suggest that miR-423 induces drug resistance in BC cells, consistent with the report from Xia et al. [47].

Inhibition of apoptosis can promote tumor progression, whereas induction of apoptosis can inhibit tumor progression [58]. Li et al. [26] showed that miR-423 inhibits cisplatin-induced apoptosis by modulating caspase 3/7 and Bcl-2 expression levels in endometrial cancer cells. In glioma cells, miR-423-3p inhibition leads to an induction of apoptosis [20]. Our study results demonstrated that in BC cells, miR-423 upregulation as a consequence of the rs6505162-A allele inhibited cisplatin-induced apoptosis by decreasing caspase 3/7 activity, as has been observed in other cancers.

Metastasis is the leading cause of cancer mortality. Cell invasion and migration represent the initial steps of metastasis [59]. miR-423 is a common marker of cross-cancer metastasis in metastatic samples [41]. miR-423 overexpression in endometrial cancer promotes metastasis of cancer cells [26,27]. miR-423-5p participates in gastric cancer cell invasion [17]. miR-423-3p affects tumor cell metastasis in laryngeal and lung cancers [14,24,25]. In addition, miR-423-5p promotes glioma cell invasion [19]. Thus, the literature suggests that abnormal expression of miR-423 can influence cancer cell metastasis in human tumors. On the other hand, only Mir et al. [60] have evaluated the correlation between the SNP rs6505162:C>A and the metastatic process in BC patients. The authors showed that rs6505162 allele A had a strong and significant association ($p < 0.009$) with metastasis in Saudi Arabian BC patients, indicating that this allele is associated with disease progression and distant metastasis status. Our results show that the rs6505162 A allele in pre-miR-423 increased migration and invasion in BC cells as a consequence of miR-423 overexpression. Moreover, we carried out an in-silico analysis using the miR-Walk database (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/> (accessed on 20 December 2021)), finding that TNIP2 is a possible target of miR-423. Huber et al. [61] showed that the IKK-2/IkappaBalpha/NF-kappaB pathway is required for induction and maintenance of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is a crucial step in the initiation of metastatic process. The authors found that inhibiting NF-kappaB signaling prevented EMT in Ras-transformed epithelial cells, whereas activation of this pathway promoted the transition to a mesenchymal phenotype. Furthermore, inhibition of NF-kappaB activity in mesenchymal cells caused a reversal of EMT, suggesting that NF-kappaB is essential for both the induction and maintenance of EMT. In accordance with this previous report, Dai et al. [48] observed that upregulation of miR-423 led to activation of the NF-kappaB signaling pathway by repressing TNIP2 expression, suggesting that miR-423 is a crucial factor that enhances breast cancer cell invasion. Therefore, miR-423 overexpression as a consequence of the presence of the rs6505162 allele A could trigger an initiation of the metastatic process by activating the NF-kappaB signaling pathway. This finding highlights this miRNA as a promising prognostic and therapeutic marker for metastatic BC.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines

Normal human breast epithelial cell lines (MCF-10A) and BC cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The BC cell lines were selected because of their low miR423-5p and miR423-3p expression levels [33,62]. MCF-10A is a not tumorigenic cell line, is ER (–), and is the most commonly-used normal breast cell model. MCF-7 is ER (+), PR (+), and HER2 (–), and, therefore, can be classified as luminal A. MDA-MB-231 is a triple-negative cell line. Both BC cell lines are negative for BRCA1 and BRCA2 mutations. MCF-10A cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 5% horse serum (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). MCF-7 and MDA-MB-231 were seeded in high-glucose DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After reaching 70–80% confluence, cells were harvested for use in further experiments.

4.2. miR-423 Expression Vector Construction and Cell Transfection

We designed one pair of primers (forward: 5'-CCGAAGTTTGAGGGAGAAACT-3' and reverse: 5'-TTCCTGGCTTCCTTAGAGGG-3') to amplify pre-miR-423 rs6505162-C and pre-miR-423 rs6505162-A sequences from genomic DNA extracted from CC and AA homozygous patients for rs6505162. PCR products were cut from agarose gel, purified, and inserted into pcDNA3.3 TOPO-TA (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Correct insertion of pre-miR-423-A and pre-miR-423-C into the expression vector was further confirmed by SANGER sequencing. Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to transfect the recombinant vectors into MCF-10A, MCF-7, and MDA-MB-231 cells. After selection using G418 (800 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), three groups of stable cell populations transfected with pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector were obtained. miR-423 expression was detected via reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

4.3. Analysis of miR-423-5p and miR-423-3p Expression by RT-qPCR

Total small RNA was extracted from the transfected BC cells using the mirVana kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to manufacturer protocol. RNA concentration was determined using the NanoDrop system. Small RNA was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) using the TaqMan microRNA Reverse-Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). miR-423-5p and miR-423-3p expression levels were determined using specific TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). qPCR was performed as follows: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 60 s. All reactions were performed in triplicate. U6 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used as an endogenous control to calculate miR-423 expression in BC cells. miRNA expression levels were measured based on threshold cycle (Ct), and relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [63].

4.4. Cell Proliferation Assay

To assess the effect of pre-miR-423 rs6505162:C>A on BC cell proliferation, CFSE assay (BioLegend Way, San Diego, CA, USA) was performed according to manufacturer protocol. The MCF-7 and MDA-MB-231 transfected cells were resuspended and collected at a density of 1×10^6 cells/well. Cells were then labelled with 5 µM CFSE dye (CFSE Cell Division Tracker Kit) for 30 min. Staining was halted by adding 5 volumes of ice-cold culture media. BC cells were subsequently cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24 and 48 h. Fluorescence was measured in a BD FACSVerser™ flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The proliferation index, analyzed using FlowJo V.10.1

software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), was calculated based on the sum of cells in all generations divided by the calculated number of original parent cells. All experiments were performed in triplicate.

4.5. Cell Viability Assay

To determine the effects of pre-miR-423-C and pre-miR-423-A on BC cell viability, an MTS[®] assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was performed according to manufacturer protocol. Stable BC clones of MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^4 cells. After 24 h incubation, various concentrations of cisplatin (0, 40, and 80 μ M) were added. BC cells were subsequently cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 48 h. MTS was added to each well, and incubated for 4 h. Absorbance was measured at 490 nm on a multiplate reader (BioTek Instrument, Inc., Winooski, VT, USA). All experiments were performed three times in triplicate.

4.6. Apoptosis Analysis

To examine the effects of pre-miR-423-A and pre-miR-423-C on cisplatin-induced apoptosis of BC cells, caspase 3/7 activity was assessed according to manufacturer protocol (Caspase-Glo 3/7 assay systems; Promega Corporation, Madison, WI, USA). Stable BC clones of MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-423-A, pre-miR-423-C, or empty vector were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells. The cells were cultured in DMEM overnight at 37 °C in a humidified incubator. Subsequently, the culture medium was replaced with a medium containing 0 or 100 μ g/mL cisplatin. Cells were cultured for a further 48 h. Caspase-Glo reagent (Promega Corporation) was added to each well, and incubated for 3 h at room temperature with gentle agitation. Caspase 3/7 activity was measured on a BioTek Synergy HTX Multi-Mode reader (BioTek Instrument, Inc., Winooski, VT, USA). All experiments were performed three times in triplicate.

4.7. Migration and Invasion Assay

Transwell migration and invasion assays were performed to determine the impact of pre-miR-423 rs6505162:C>A on cell migration and invasion in BC cells. For the invasion assay, the upper chambers of Transwell plates were coated with 100 μ L Matrigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-423-C and pre-miR-423-A were suspended in culture medium without FBS, and plated in the upper chamber at a density of 1×10^5 /mL. Culture medium containing 10% FBS was added to the lower chamber. The cells were incubated for 12 to 16 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Remaining cells in the upper chamber were removed with a cotton swab, and cells in the lower chamber were stained at room temperature for 60 min with 0.1% crystal violet plus 2% methanol. The invaded cells were counted under light microscopy in ten randomly-selected fields (magnification, $\times 40$). BC cells transfected with empty vector were used as controls. All experiments were performed in triplicate.

4.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data are presented as mean \pm SD, and represented graphically with box plots. One- or two-way ANOVA was used to analyze for significant differences among groups. *p*-values < 0.05 were considered to indicate a statistically significant difference.

5. Conclusions

We carried out the first functional characterization of the rs6505162 polymorphism. We propose that the rs6505162-A allele promotes miR-423 overexpression. Moreover, the rs6505162-A allele induces BC cell proliferation, viability, chemoresistance, migration, and invasion, as well as decreasing cell apoptosis, as a consequence of this miR-423 overexpression. The current results confirm our previous findings indicating that the rs6505162-A

allele is a risk allele for BC. Taken together, the present results indicate that the rs6505162-A allele upregulates miR-423, and, consequently, plays an oncogenic role in BC tumorigenesis and likely other cancers. This SNP is a potential marker in BRCA1/2-negative BC. The variant may also be a useful biomarker for early diagnosis, prognosis, and treatment efficacy monitoring, as well as a possible therapeutic target.

Author Contributions: Conceptualization: S.M.-P., H.R.C., J.C.T., L.J.C. and L.J.; methodology: S.M.-P., V.C., C.G.-V., H.R.C., J.C.T., L.J.C. and L.J.; validation: S.M.-P. and V.C.; formal analysis: S.M.-P., V.C., C.G.-V. and P.G.-H.; investigation: S.M.-P., V.C., J.M.R. and L.J.; resources: L.J., J.C.T., H.R.C. and L.J.C.; data curation: S.M.-P. and C.G.-V.; writing—original draft preparation: S.M.-P., H.R.C., J.C.T., L.J.C. and L.J.; writing—review and editing: S.M.-P., H.R.C., J.C.T. and L.J.; visualization: S.M.-P.; supervision: L.J., H.R.C., J.C.T. and L.J.C.; project administration: L.J.; funding acquisition: L.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), grant numbers 1200049, 1160336 and 1160889; International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) grant CRP-CHL17-06-EC; COPEC-UC grant 2017.J.924; and URedes URC grant 007/17.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are shown within the manuscript.

Acknowledgments: We would like to thank Lorena Seccia and Graciela Caroca for their contributions to the maintenance of biological materials and experimental work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest, and the funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Government of Chile. *Plan Nacional de Cáncer 2018–2028*; Department of Comprehensive Management of Cancer and Other Tumors, Undersecretary of Public Health, Ministry of Health: Santiago, Chile, 2019.
2. Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 1301–1308. [[CrossRef](#)]
3. Rothe, F.; Ignatiadis, M.; Chaboteaux, C.; Haibe-Kains, B.; Kheddoumi, N.; Majaj, S.; Badran, B.; Fayyad-Kazan, H.; Desmedt, C.; Harris, A.; et al. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Song, F.J.; Chen, K.X. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: Big effects on cancer. *Chin. J. Cancer* **2011**, *30*, 381–391. [[CrossRef](#)]
5. Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **1993**, *75*, 843–854. [[CrossRef](#)]
6. He, L.; Hannon, G.J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 522–531. [[CrossRef](#)]
7. Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **2005**, *120*, 15–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Erson, A.; Petty, E.M. MicroRNAs in development and disease. *Clin. Genet.* **2008**, *74*, 296–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Getz, G.; Miska, E.A.; Alvarez-Saavedra, E.; Lamb, J.; Peck, D.; Sweet-Cordero, A.; Ebert, B.L.; Mak, R.H.; Ferrando, A.A.; Downing, J.R. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **2005**, *435*, 834–838.
10. Esquela-Kerscher, A.; Slack, F.J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 259–269. [[CrossRef](#)]
11. O’Day, E.; Lal, A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, 201. [[CrossRef](#)]
12. Ryan, B.; Robles, A.; Harris, C.C. Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 389–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lin, J.; Huang, S.; Wu, S.; Ding, J.; Zhao, Y.; Liang, L.; Tian, Q.; Zha, R.; Zhan, R.; He, X. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G₁/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1641–1647. [[CrossRef](#)]
14. Guan, G.; Zhang, D.; Zheng, Y.; Wen, L.; Yu, D.; Lu, Y.; Zhao, Y. microRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 5683–5691. [[PubMed](#)]
15. Liu, J.; Wang, X.; Yang, X.; Liu, Y.; Shi, Y.; Ren, J.; Guleng, B. miRNA423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* **2014**, *347*, 98–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Yang, H.; Fu, H.; Wang, B.; Zhang, X.; Mao, J.; Li, X.; Wang, M.; Sun, Z.; Qian, H.; Xu, W. Exosomal miR-423-5p targets SUFU to promote cancer growth and metastasis and serves as a novel marker for gastric cancer. *Mol. Carcinog.* **2018**, *57*, 1223–1236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kong, P.; Zhu, X.; Geng, Q.; Xia, L.; Sun, X.; Chen, Y.; Li, W.; Zhou, Z.; Zhan, Y.; Xu, D. The microRNA-423-3p-Bim Axis Promotes Cancer Progression and Activates Oncogenic Autophagy in Gastric Cancer. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1027–1037. [[CrossRef](#)]
18. Dong, L.; Deng, J.; Sun, Z.M.; Pan, A.P.; Xiang, X.J.; Zhang, L.; Yu, F.; Chen, J.; Sun, Z.; Feng, M.; et al. Interference with the beta-catenin gene in gastric cancer induces changes to the miRNA expression profile. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 6973–6983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Li, S.; Zeng, A.; Hu, Q.; Yan, W.; Liu, Y.; You, Y. miR-423-5p contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastomas. *Neuro-Oncology* **2017**, *19*, 55–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Xu, J.; He, J.; Huang, H.; Peng, R.; Xi, J. MicroRNA-423-3p promotes glioma growth by targeting PANX2. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 179–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Wan, Y.; Fei, X.; Wang, Z.; Jiang, D.; Chen, H.; Wang, M.; Zhou, S. miR-423-5p knockdown enhances the sensitivity of glioma stem cells to apigenin through the mitochondrial pathway. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317695526. [[CrossRef](#)]
22. Zhao, P.; Sun, S.; Zhai, Y.; Tian, Q.; Zhou, T.; Li, J. miR-423-5p inhibits the proliferation and metastasis of glioblastoma cells by targeting phospholipase C beta 1. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2019**, *12*, 2941–2950.
23. Sun, R.; Gong, J.; Li, J.; Ruan, Z.; Yang, X.; Zheng, Y.; Qing, L.; He, X.; Jiang, J.; Peng, Y.; et al. A genetic variant rs13293512 in the promoter of let-7 is associated with an increased risk of breast cancer in Chinese women. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20182079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, R.; Li, G.; Zhuang, G.; Sun, S.; Song, Z. Overexpression of microRNA-423-3p indicates poor prognosis and promotes cell proliferation, migration, and invasion of lung cancer. *Diagn. Pathol.* **2019**, *14*, 53. [[CrossRef](#)]
25. Chen, X.; Fan, Z.; McGee, W.; Chen, M.; Kong, R.; Wen, P.; Xiao, T.; Chen, X.; Liu, J.; Zhu, L.; et al. TDP-43 regulates cancer-associated microRNAs. *Protein Cell* **2018**, *9*, 848–866. [[CrossRef](#)]
26. Li, J.; Sun, H.; Liu, T.; Kong, J. MicroRNA-423 promotes proliferation, migration and invasion and induces chemoresistance of endometrial cancer cells. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 4213–4224. [[CrossRef](#)]
27. Yanokura, M.; Banno, K.; Iida, M.; Irie, H.; Umene, K.; Masuda, K.; Kobayashi, Y.; Tominaga, E.; Aoki, D. MicroRNAs in endometrial cancer: Recent advances and potential clinical applications. *EXCLI J.* **2015**, *14*, 190–198. [[PubMed](#)]
28. Jia, W.; Yu, T.; An, Q.; Cao, X.; Pan, H. MicroRNA-423-5p inhibits colon cancer growth by promoting caspase-dependent apoptosis. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 1225–1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nishikawa, R.; Goto, Y.; Kojima, S.; Enokida, H.; Chiyomaru, T.; Kinoshita, T.; Sakamoto, S.; Fuse, M.; Nakagawa, M.; Naya, Y.; et al. Tumor-suppressive microRNA-29s inhibit cancer cell migration and invasion via targeting LAMC1 in prostate cancer. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 401–410. [[CrossRef](#)]
30. Ke, J.; Tian, J.; Li, J.; Gong, Y.; Yang, Y.; Zhu, Y.; Zhang, Y.; Zhong, R.; Chang, J.; Gong, J. Identification of a functional polymorphism affecting microRNA binding in the susceptibility locus 1q25.3 for colorectal cancer. *Mol. Carcinog* **2017**, *56*, 2014–2021. [[CrossRef](#)]
31. Li, H.T.; Li, H.T.; Zhang, H.; Chen, Y.; Liu, X.F.; Qian, J. MiR-423-3p enhances cell growth through inhibition of p21Cip1/Waf1 in colorectal cancer. *Cell Physiol. Biochem.* **2015**, *37*, 1044–1054. [[CrossRef](#)]
32. Lin, H.; Lin, T.; Lin, J.; Yang, M.; Shen, Z.; Liu, H.; Zou, Z.; Zheng, Z. Inhibition of miR-423-5p suppressed prostate cancer through targeting GRIM-19. *Gene* **2019**, *688*, 93–97. [[CrossRef](#)]
33. Zhao, H.; Gao, A.; Zhang, Z.; Tian, R.; Luo, A.; Li, M.; Zhao, D.; Fu, L.; Fu, L.; Dong, J.-T.; et al. Genetic analysis and preliminary function study of miR-423 in breast cancer. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 4763–4771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Morales, S.; Gulppi, F.; Gonzalez-Hormazabal, P.; Fernandez-Ramires, R.; Bravo, T.; Reyes, J.M.; Gomez, F.; Waugh, E.; Jara, L. Association of single nucleotide polymorphisms in Pre-miR-27a, Pre-miR-196a2, Pre-miR-423, miR-608 and Pre-miR-618 with breast cancer susceptibility in a South American population. *BMC Genet.* **2016**, *17*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Si, W.; Shen, J.; Zheng, H.; Fan, W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin. Epigenet.* **2019**, *11*, 25. [[CrossRef](#)]
36. Chen, P.-S.; Su, J.-L.; Hung, M.-C. Dysregulation of microRNAs in cancer. *J. Biomed. Sci* **2012**, *19*, 90. [[CrossRef](#)]
37. Salzman, D.W.; Weidhaas, J.B. SNPing cancer in the bud: MicroRNA and microRNA-target site polymorphisms as diagnostic and prognostic biomarkers in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *137*, 55–63. [[CrossRef](#)]
38. Calin, G.A.; Croce, C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nicoloso, M.S.; Sun, H.; Spizzo, R.; Kim, H.; Wickramasinghe, P.; Shimizu, M.; Wojcik, S.E.; Ferdin, J.; Kunej, T.; Xiao, L.; et al. Single-nucleotide polymorphisms inside microRNA target sites influence tumor susceptibility. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2789–2798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Yang, W.; Chendrimada, T.P.; Wang, Q.; Higuchi, M.; Seeburg, P.H.; Shiekhattar, R.; Nishikura, K. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 13–21. [[CrossRef](#)]
41. Ke, R.; Lv, L.; Zhang, S.; Zhang, F.; Jiang, Y. Functional mechanism and clinical implications of MicroRNA-423 in human cancers. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 9036–9051. [[CrossRef](#)]
42. Hui, A.B.; Lenarduzzi, M.; Krushel, T.; Waldron, L.; Pintilie, M.; Shi, W.; Perez-Ordóñez, B.; Jurisica, I.; O’Sullivan, B.; Waldron, J.; et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1129–1139. [[CrossRef](#)]

43. Ma, Y.; Wang, R.; Zhang, J.; Li, W.; Gao, C.; Liu, J.; Wang, J. Identification of miR-423 and miR-499 polymorphisms on affecting the risk of hepatocellular carcinoma in a large-scale population. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **2014**, *18*, 516–524. [[CrossRef](#)]
44. McDermott, A.M.; Miller, N.; Wall, D.; Martyn, L.M.; Ball, G.; Sweeney, K.J.; Kerin, M. Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87032. [[CrossRef](#)]
45. Xing, J.; Wan, S.; Zhou, F.; Qu, F.; Li, B.; Myers, R.E.; Fu, X.; Palazzo, J.P.; He, X.; Chen, Z.; et al. Genetic polymorphisms in pre-microRNA genes as prognostic markers of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2012**, *21*, 217–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tang, X.; Zeng, X.; Huang, Y.; Chen, S.; Lin, F.; Yang, G.; Yang, N. miR-423-5p serves as a diagnostic indicator and inhibits the proliferation and invasion of ovarian cancer. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *15*, 4723–4730. [[CrossRef](#)]
47. Xia, W.; Liu, Y.; Du, Y.; Cheng, T.; Hu, X.; Li, X. MicroRNA-423 Drug Resistance and Proliferation of Breast Cancer Cells by Targeting ZFP36. *OncoTargets Ther.* **2020**, *13*, 769–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Dai, T.; Zhao, X.; Li, Y.; Yu, L.; Li, Y.; Zhou, X.; Gong, Q. miR-423 Promotes Breast Cancer Invasion by Activating NF- κ B Signaling. *OncoTargets Ther.* **2020**, *13*, 5467–5478. [[CrossRef](#)]
49. Tan, H. The association between gene SNPs and cancer predisposition: Correlation or causality? *EBioMedicine* **2017**, *16*, 8–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Tan, H.; Bao, J.; Zhou, X. Genome-wide mutational spectra analysis reveals significant cancer-specific heterogeneity. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12566. [[CrossRef](#)]
51. Dasari, S.; Tchounwou, P.B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhou, J.; Giannakakou, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 65–71. [[CrossRef](#)]
53. Ohtsukasa, S.; Okabe, S.; Yamashita, H.; Iwai, T.; Sugihara, K. Increased expression of CEA and MHC class I in colorectal cancer cell lines exposed to chemotherapy drugs. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2003**, *129*, 719–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Meng, F.; Henson, R.; Lang, M.; Wehbe, H.; Maheshwari, S.; Mendell, J.T.; Jiang, J.; Schmittgen, T.D.; Patel, T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* **2006**, *130*, 2113–2129. [[CrossRef](#)]
55. Yang, H.; Kong, W.; He, L.; Zhao, J.-J.; O'Donnell, J.D.; Wang, J.; Wenham, R.M.; Coppola, D.; Kruk, P.A.; Nicosia, S.V.; et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 425–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kong, W.; He, L.; Coppola, M.; Guo, J.; Esposito, N.N.; Coppola, D.; Cheng, J.Q. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 22855. [[CrossRef](#)]
57. Yu, Z.; Xu, Z.; DiSante, G.; Wright, J.; Wang, M.; Li, Y.; Zhao, Q.; Ren, T.; Ju, X.; Gutman, E.; et al. miR-17/20 sensitization of breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis requires Akt1. *Oncotarget* **2014**, *5*, 1083–1090. [[CrossRef](#)]
58. Zhi, Y.; Zhou, H.; Mubalake, A.; Chen, Y.; Zhang, B.; Zhang, K.; Chu, X.; Wang, R. Regulation and functions of MicroRNA-149 in human cancers. *Cell Prolif.* **2018**, *51*, e12465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Van Zijl, F.; Krupitza, G.; Mikulits, W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* **2011**, *728*, 23–34. [[CrossRef](#)]
60. Mir, R.; Al Balawi, I.A.; Duhier, F.A. Duhier, Involvement of microRNA-423 Gene Variability in Breast Cancer Progression in Saudi Arabia. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, *19*, 2581–2589.
61. Huber, M.A.; Azoitei, N.; Baumann, B.; Grünert, S.; Sommer, A.; Pehamberger, H.; Kraut, N.; Beug, H.; Wirth, T. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Investig.* **2004**, *114*, 569–581. [[CrossRef](#)]
62. Farazi, T.A.; Horlings, H.M.; Then Hoeve, J.J.; Mihailovic, A.; Halfwerk, H.; Morozov, P.; Brown, M.; Hafner, M.; Reyat, F.; Van Kouwenhove, M.; et al. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 4443–4453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]