

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EFFECTO DE LA VARIANTE GENÉTICA RS4541843:C>T EN
LOS NIVELES DEL MICRORNA-182 Y EN LA INHIBICIÓN DE
LA TRADUCCIÓN DEL RNA MENSAJERO DE BRCA1***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica, área de Especialización en Bioquímica Clínica
y Memoria para optar al Título de Bioquímica

CAROLINA ELISA GAVILÁN ROSALES

**Director de Tesis: Dra. Lilian Jara Sosa
Co-director de Tesis: Sebastián Morales Pison (MSc)**

Santiago-CHILE

2021

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister y Memoria de Título presentada por el candidato

CAROLINA ELISA GAVILÁN ROSALES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Lilian Jara Sosa _____

Co-director de Tesis:

Sebastián Morales Pison (MSc) _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund _____

Dr. Vinicius Maracaja _____

Dr. Mauricio Moraga _____

FINANCIAMIENTO

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. PROYECTO FONDECYT N°1200049

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Efecto de la variante rs4541843-T en la expresión del microRNA-182 y en la disminución del RNA mensajero de BRCA1. Gavilán Rosales C., S. Morales, J.C. Tapia, L. Jara. Poster. Congreso Latinoamericano de Genética ALAG2021. Modalidad Virtual. Del 5 al 8 de octubre de 2021, Chile.

*“Fue el tiempo que pasaste con tu rosa lo que la hizo
tan importante”*

El Principito

Para mi primo Pato,
porque tu recuerdo siempre está presente en el sonido del mar y en la luz de
las estrellas que iluminan mi camino.

AGRADECIMIENTOS

Si hoy estoy escribiendo esto es porque es el fin de una etapa y el comienzo de una nueva aventura y quiero agradecer a quienes han estado durante todo este largo, difícil, pero al final gratificante viaje llamado universidad.

Agradecer a mi familia, especialmente a mi mamá porque sin ella nada de esto sería posible. A mi abuela y hermana, porque junto con mi mamá son las mujeres más importantes de mi vida y mis ejemplos a seguir, gracias por siempre estar a mi lado, por retarme cuando fue necesario, por los abrazos, por todo. A mis tías, primo y sobrinos (mis bestias), porque son mi motor y agradezco siempre contar con cada uno de ustedes.

A los seres de 4 patas que me acompañan día a día Violeta, Bonita, Duke y Flor, porque mi vida no sería lo mismo sin ellos. Y a mi Copito, quien fue mi compañera por casi 18 años, quizás hoy no esta conmigo, pero fue quien me acompañó durante mucho tiempo en esas largas noches de estudio.

A mis amigos, a quienes el destino puso en mi camino y pasaron a ser parte importante de mi vida. A Maxi, Faridde, Nayi, Gonza y Vale, amigos desde el colegio, gracias por todos estos años de amistad, por su apoyo, por esos momentos riéndonos y molestándonos, por siempre estar. A quienes conocí durante la carrera, Luz (cangrejo de caparazón brillante) eres una persona maravillosa y no tengo palabras para describir lo importante que eres para mi, muchas gracias por tu apoyo incondicional. Nicole (Perry) gracias por

escucharme, ayudarme, por entenderme y compartir la locura y maldad. A Ricky, Matías Verde, Carli, Andrea Chinchí y Yani, sobran emociones y faltan palabras para expresarles mi gratitud, porque estos años de pregrado y postgrado no hubieran sido lo mismo sin ustedes. Gracias por su ayuda, apoyo, risas, juntas y todas las locuras que aún quedan por venir. Gracias infinitas a todos por ser los mejores amigos.

Agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Lilian Jara, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Me gustaría agradecer también al pequeño grupo que lo integra; Lorena Seccia (Lore) gracias por tu ayuda y apoyo durante todo el desarrollo de mi tesis. Gonzalo Castro, por las conversaciones mientras trabajábamos. Sebastián Morales, muchas gracias por tu apoyo y ayuda en todo este proceso.

Por último, y aunque suene raro, agradecerme a mi misma, porque pucha que costo, pero se logró. Por nunca rendirme, por superar y enfrentar cada una de las dificultades que se presentaron en el camino. Se vienen muchas más aventuras y sé que tendré la fuerza para enfrentar los nuevos desafíos.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	x
ABREVIATURAS	xii
I. RESUMEN	xvi
II. INTRODUCCIÓN	22
II.1. CÁNCER DE MAMA	22
II.2. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA.....	24
II.3. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER DE MAMA	26
II.4. BRCA1 Y BRCA2	30
II.5. MICRORNAS	31
II.5.a. MICRORNAS Y CÁNCER DE MAMA	36
II.5.b. MIRNA-182 Y CÁNCER DE MAMA	38
II.5.c. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP) EN MIRNA-182 Y SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE MAMA.....	41
III.1. HIPÓTESIS.....	43
III.2. OBJETIVO GENERAL	43
III.3. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	43

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	45
V. RESULTADOS	57
Objetivo 1: Evaluar <i>in vitro</i> el efecto del rs4541843: C>T sobre los niveles del miRNA-182 maduro en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y en la línea de epitelio de mama normal MCF-10A.	57
a) Amplificación por PCR de los pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T a partir de pacientes homocigotos C/C y T/T.	57
b) Secuenciación por Sanger de los vectores de expresión pcDNA3.3 TOPO TA conteniendo los pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T.	58
c) Efecto del SNP rs4541843:C>T sobre los niveles de expresión de miRNA-182 maduro.	60
Objetivo 2: Evaluar el efecto del alelo rs4541843: C>T sobre la unión del microRNA-182 a la región 3'UTR del RNA mensajero de <i>BRCA1</i>	64
VI. DISCUSIÓN	68
VI.1. Expresión del miRNA-182 maduro	68
VI.1.a. Líneas celulares utilizadas en el estudio de expresión del miRNA-182 en presencia del SNP rs4541843:C>T	69
VI.1.b. Aumento de miRNA-182-3p en presencia del SNP rs4541843:C>T	70
VI. 2. Incremento en la unión del miRNA-182 a la región 3'UTR de <i>BRCA1</i> . 73	

VII. CONCLUSIONES.....	78
VIII. PROYECCIONES	80
ANEXO 1	81
ANEXO 2	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Gráfico de riesgo relativo <i>versus</i> frecuencia alélica de los genes de susceptibilidad al cáncer de mama.....	29
Figura 2. Porcentaje de riesgo de cáncer de mama familiar explicado por los genes de susceptibilidad actualmente identificados.....	30
Figura 3. Vía canónica de biogénesis de los microRNA.....	35
Figura 4. Estructura del clúster miR-183/96/182 y ubicación del SNP rs4541843.	40
Figura 5. Estrategia experimental Objetivo específico 1.	45
Figura 6. Estrategia experimental Objetivo específico 2.	46
Figura 7. Esquema del vector de expresión recombinante de luciferasa.	52
Figura 8. Amplificación de los fragmentos para el pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T.	58
Figura 9. Cromatograma de los vectores de expresión recombinantes pri-miR-182-C y pri-miR-182-T.	60
Figura 10. Niveles del miRNA-182 maduro en las líneas celulares (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231.	63

Figura 11. Efecto del rs4541843:C>T en la unión a la región 3'UTR-mRNA- <i>BRCA1</i>	67
Figura 12. Frecuencias alélicas del SNP rs4541843:C>T en diferentes poblaciones.....	69
Figura 13. Modelo de la regulación de la expresión de <i>BRCA1</i>	79
Tabla 1. Valores de Ct para ejemplo de cálculo de las veces de cambio.	87

ABREVIATURAS

Ago: Proteína Argonauta.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

BRCA1: Gen de susceptibilidad a cáncer de mama 1.

BRCA2: Gen de susceptibilidad a cáncer de mama 2.

CCR: (*Colorectal cancer*): Cáncer colorrectal.

cDNA: ADN complementario.

CM: Cáncer de mama.

CMTN: Cáncer de mama triple negativo.

CO₂: Dióxido de carbono.

DGCR8 (*DGCR8 Microprocessor Complex Subunit*): subunidad del complejo microprocesador DGCR8.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): Medio de cultivo celular.

DNA (*Deoxyribonucleic acid*): Ácido desoxirribonucleico.

E. coli: *Escherichia coli*.

ER (*Estrogen receptor*): Receptor de estrógeno.

FBS (*Fetal bovine serum*): Suero fetal de bovino.

FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*): Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos.

GTP (*Guanosine triphosphate*): Guanosín trifosfato.

GWAS (*Genome-wide association studies*): Estudios de asociación de genoma completo.

HeLa: Línea celular derivada de una paciente con carcinoma epitelioide de cuello uterino humano.

HER2 (*Human Epidermal growth factor receptor type 2*): Receptor de crecimiento epidermal humano tipo 2.

HR (*Homologous recombination*): Recombinación homóloga.

IGF (*Insulin-like growth factor*): Factor de crecimiento similar a insulina.

Kb: Kilobases.

LB (*Lysogeny broth*): Caldo de Lisogenia.

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica.

M: Mutada.

MAF (*Minor allele frequency*): Alelo de menor frecuencia.

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama esporádico.

MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama triple negativo.

Minsal: Ministerio de Salud.

miRNA: microRNAs.

mRNA: ARN mensajero.

NAT (*Normal tissue adjacent to the tumor*): Tejidos adyacentes normales.

ng: Nanogramos.

NHP (*Normal human hypopharyngeal cells*): Células hipofaríngeas humanas normales.

nt: Nucleótidos.

OR (*Odds Ratio*): Razón de probabilidades.

pb: Pares de bases.

PBS (*Phosphate Buffered Saline*): Amortiguador fosfato salino.

PCR (*Polymerase chain reaction*): Reacción en cadena de polimerasa.

PLB (*Passive lysis buffer*): Amortiguador de lisis pasivo.

Pol II: ARN polimerasa II.

PR (*Progesterone receptor*): Receptor de progesterona.

pre-miRNA: precursor de miRNA.

pri-miRNA: transcrito primario.

RISC (*RNA-induced silencing complex*): Complejo de silenciamiento inducido por ARN.

RNA (*Ribonucleic acid*): Ácido ribonucleico.

RNasas: Ribonucleasa.

rpm: Revoluciones por minuto.

RR: Riesgo relativo.

RT-qPCR (*Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*): PCR cuantitativa.

SNP (*Single-nucleotide polymorphisms*): Polimorfismos de nucleótido único.

TRH: Terapia de reemplazo de hormonas.

UTR (*Untranslated Region*): Región no traducida.

VV: Vector vacío.

WT (*Wild type*): Secuencia normal.

µg: Microgramos.

µL: Microlitros.

I. RESUMEN

El cáncer de mama (CM) corresponde a la neoplasia maligna más prevalente en mujeres en el mundo. En Chile, el CM es uno de los 5 cánceres más frecuentes, con una incidencia de 46,3 por cada 100.000 mujeres y mortalidad de 16,6 por cada 100.000 mujeres. Los factores de riesgo asociados al desarrollo del CM corresponden a género, edad, factores nutricionales y modo de vida, factores reproductivos, factores hormonales y factores genéticos. El factor de riesgo más importante es la predisposición o susceptibilidad genética, la cual es responsable del 5-15% de todos los casos de CM. En los años 1994 y 1995 se descubrieron los genes *BRCA1* y *BRCA2*, los que han sido considerados genes de susceptibilidad de alta penetrancia. Las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* son responsables del 16-20% del riesgo de CM familiar. Se ha propuesto que otros genes, denominados de moderada y baja penetrancia podrían ser responsables del 80% restante de los casos con CM familiar *BRCA1/2*-negativos. Las mutaciones en el gen *BRCA1*, son responsables aproximadamente del 54% del riesgo de desarrollar CM. Varios estudios han demostrado que la expresión de *BRCA1* está regulada por miRNAs. Se ha predicho que entre 20-100 miRNAs se unen a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1*. El miRNA-182 es uno de los miRNAs que tienen como blanco a la región 3'UTR del mRNA del gen *BRCA1*. La literatura ha sugerido que el miRNA-182 es un miRNA oncogénico involucrado en la progresión de tumores malignos, promoviendo la proliferación y migración de las

células cancerígenas. El grupo de Moskwa (2011) demostró que el miRNA-182 tiene como blanco a la región 3'UTR del mRNA del gen *BRCA1* y que mayores niveles del miRNA disminuyen la expresión de *BRCA1*.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) son el tipo más común de variación en el genoma humano. Los SNPs en genes de miRNAs pueden afectar: el procesamiento, la maduración del miRNA o la interacción del miRNA con el mRNA blanco. Se han realizado estudios de asociación entre polimorfismos de miRNAs y riesgo de CM. Estudios recientes identificaron el SNP rs4541843:C>T, el cual se encuentra en la región del precursor pri-miRNA-182. Morales et al. (2018) establecieron que la variante rs4541843:C>T en el pri-miR-182 se asocia con riesgo de CM familiar en población chilena. En base a los antecedentes expuestos, en esta tesis, se propuso evaluar el efecto del rs4541843:C>T sobre los niveles del miRNA-182 maduro y sobre la unión del miRNA-182 al mRNA de *BRCA1*. Para ello, se evaluó los niveles del miRNA-182 maduro en presencia del rs4541843 alelo T y C por medio de RT-qPCR. Para determinar el efecto del SNP rs4541843:C>T en la unión del miRNA-182 a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1*, se realizó un ensayo de luciferasa. Los resultados mostraron una mayor presencia de la hebra 3p del miRNA-182 maduro en las líneas celulares de CM transfectadas con el pri-miRNA-182-C en comparación con aquellas transfectadas con el alelo T. Además, estos niveles mayores se detectan en presencia del alelo C del rs4541843, lo que indicaría que el alelo C de este SNP es el alelo de riesgo. Con respecto al efecto del SNP rs4541843:C>T en la unión

a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1*, los resultados obtenidos indicaron que hay un aumento significativo en la unión del miRNA-182 a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* cuando las células son transfectadas con el alelo C en comparación con aquellas transfectadas con el vector vacío. Lo anterior permite concluir que el alelo C del rs4541843:C>T en el pri-miRNA-182, es el alelo de riesgo. Estos resultados son importantes para los pacientes *BRCA1/2*-negativos, ya que si son portadores de la variante C en el pri-miRNA-182 podrían tener niveles muy bajos de la proteína BRCA1 y ser equivalentes a pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1*. Por lo tanto, la variación genética en el pri-miRNA-182 podría explicar en parte la presencia de CM en pacientes cuya etiología genética aún no ha sido establecida.

I. ABSTRACT

Effect of the rs4541843:C>T genetic variant on microRNA-182 levels and translation inhibition of BRCA1 messenger RNA.

Breast cancer (BC) is the most prevalent malignancy in women worldwide. In Chile, BC is one of the five most frequent cancers, with an incidence rate of 46.3 per 100,000 women and a mortality rate of 16.6 per 100,000 women. The risk factors associated with the development of BC are gender, age, nutritional and lifestyle factors, as well as reproductive, hormonal, and genetic factors. However, the most important risk factor is genetic predisposition or susceptibility, which is responsible for 5-15% of all BC cases. In 1994 and 1995, the *BRCA1* and *BRCA2* genes were discovered, which have been considered high penetrance susceptibility genes. *BRCA1* and *BRCA2* mutations are responsible for 16-20% of the familial risk for BC. It has been proposed that other susceptibility genes of moderate and low penetrance might be responsible for the remaining 80% of cases with *BRCA1/2*-negative familial BC. Mutations in the *BRCA1* gene are responsible for approximately 54% of the risk of developing BC. Several studies have shown that *BRCA1* expression is regulated by miRNAs. Between 20-100 miRNAs have been predicted to bind to the 3'UTR of *BRCA1* mRNA. One of the miRNAs that target the 3'UTR of the *BRCA1* mRNA is miRNA-182. The literature has suggested that miRNA-182 is an oncogenic miRNA involved in the

progression of malignant tumors, promoting the proliferation and migration of cancer cells. The group of Moskwa et al. (2011) demonstrated that miRNA-182 targets the 3'UTR of the *BRCA1* mRNA and that high miRNA levels decrease *BRCA1* expression.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common type of variation in the human genome. SNPs in miRNA genes can affect: the processing and maturation of the miRNA, or the interaction of the miRNA with the target mRNA. Association studies have been carried out between miRNA polymorphisms and BC risk. Recent studies identified the SNP rs4541843: C> T, which is located in the region of pri-miRNA-182. Morales et al. (2018) established that the variant rs4541843: C> T in the pri-miR-182 is associated with the risk of familial BC in the Chilean population. In this thesis, we proposed to evaluate the effect of rs4541843: C> T on mature miRNA-182 levels and the binding of miRNA-182 to *BRCA1* mRNA. For this, mature miRNA-182 levels of both rs4541843 T and C alleles were evaluated by RT-qPCR. To determine the effect of the SNP rs4541843: C> T on the binding of miRNA-182 to the 3'UTR of *BRCA1* mRNA, a luciferase assay was performed. The results showed that in the BC cell lines higher levels of the 3p strand of the mature miRNA-182 transfected with the pri-miRNA-182-C were observed, compared to those transfected with the T allele. Furthermore, this occurs in the presence of the C allele of rs4541843, which suggests that the C allele of this SNP is the risk allele. Results also indicated a significant increase in the binding of miRNA-182 to the 3'UTR region of the mRNA

of BRCA1 when cells are transfected with the C allele of the SNP rs4541843, compared to those transfected with the empty vector. This allows us to conclude that the C allele of rs4541843: C> T of the pri-miRNA-182 is the risk allele. These results are important for BRCA1/2-negative patients, since they might present very low levels of BRCA1 protein and be equivalent to patients with germline *BRCA1* mutations if they are carriers of C variant in pri-miRNA-182. Therefore, genetic variations within the pri-miRNA-182 could explain part of the presence of BC in patients whose genetic etiology has not yet been established.

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad en la que se ven alterados factores genéticos y epigenéticos que desencadenan una desregulación de las funciones celulares claves, tales como crecimiento y división celular (Ginsburg et al., 2021). Actualmente, es un problema de salud pública a nivel mundial, encontrándose entre las primeras causas de muerte. En hombres, los cánceres más frecuentes corresponden a próstata, pulmón y bronquios, colon, recto y vejiga urinaria. En el caso de las mujeres, los cánceres más prevalentes son cáncer de mama, pulmón y bronquios, colon y recto, útero y tiroides (Hassanpour & Dehghani, 2017). En Chile, el cáncer corresponde a la segunda causa de muerte y se proyecta que para el año 2023 se convierta en la primera causa de muerte a nivel nacional, afectando principalmente a mujeres (Minsal, 2018).

II.1. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia maligna más frecuente en mujeres, la cual ha mostrado un incremento en su incidencia y mortalidad en los últimos años. A nivel mundial, aproximadamente 1 de cada 8 mujeres y 1 de cada 1000 hombres desarrollarán CM a lo largo de su vida (Donepudi et al., 2014). En Chile, el CM es el cáncer más prevalente en mujeres con una tasa de incidencia y

mortalidad de 46,3 y 16,6 por cada 100.000 mujeres respectivamente (Minsal, 2018; Sung et al., 2021).

Corresponde a una enfermedad heterogénea, que consta de diferentes subtipos a nivel molecular, histopatológico y clínico. De acuerdo al estatus de los receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), el CM se clasifica en: luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo. Los subtipos de CM luminal se caracterizan por expresar los ER, PR y HER2. El subtipo luminal A es el más común y representa entre un 50% a 60% de todos los CM. Los tumores luminales B comprenden aproximadamente el 40% de los casos y al comparar con el anterior tienen un fenotipo más agresivo y peor pronóstico. Los tumores HER2 positivo, son negativos para ER y PR, pero positivos para HER2 y corresponden al 15-20% de los casos de CM. La positividad de HER2 confiere un comportamiento biológico y clínico más agresivo, siendo este tipo de tumores altamente proliferativos. El subtipo triple negativo (CMTN) y da cuenta de aproximadamente un 10-15% de todos los CM. Se caracteriza por una expresión baja o nula de los ER, PR y HER2. De acuerdo con sus características moleculares, este subtipo tiene un comportamiento mucho más agresivo con un pronóstico desfavorable en comparación con los otros subtipos de cáncer de mama (Dai et al., 2017; Liu et al., 2014; Yersal & Barutca, 2014).

II.2. FACTORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA

Existen diferentes factores de riesgo que se han asociado al desarrollo del CM. De acuerdo al riesgo relativo (RR), que corresponde a una medida de efecto, que cuantifica cuantas veces más tiende a desarrollarse el evento en el grupo de los individuos expuesto al factor de riesgo, en relación con el grupo de individuos no expuestos, podemos mencionar los siguientes factores de riesgo:

a) Género: En mujeres, el riesgo a desarrollar CM se encuentra incrementado en comparación con los hombres, siendo 100 veces mayor la probabilidad de que ocurra en mujeres que en hombres (Feng et al., 2018).

b) Edad: Diversos estudios han demostrado que la incidencia de CM aumenta con la edad. De acuerdo a lo anterior, el RR de CM en mujeres mayores de 65 años es de 5,8 veces respecto a aquellas menores de 65 años (Singletary, 2003).

c) Factores nutricionales y estilo de vida: Entre estos factores, podemos mencionar el sobrepeso y obesidad, el cual toma mayor relevancia en mujeres postmenopáusicas, debido a que si bien los ovarios dejan de producir estrógenos, el tejido adiposo es una fuente extragonadal de estrógenos. En consecuencia, las mujeres con sobrepeso u obesas tienen niveles elevados de esta hormona, lo cual aumenta el riesgo de desarrollar CM (Feng et al., 2018; Minsal, 2018). Además, diferentes estudios sugieren que la obesidad y la inactividad física son determinantes importantes de la hiperinsulinemia y la

resistencia a la insulina, lo que conlleva a niveles altos de insulina que pueden contribuir 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 metástasis del CM (Coughlin, 2019). Otro factor corresponde al consumo de alcohol, donde el consumo de dos a tres vasos de alcohol diarios aumentan en un 20% el riesgo de CM (Seitz et al., 2012; Feng et al., 2018).

d) Factores reproductivos: Se relacionan con el número de ciclos menstruales ovulatorios que experimenta una mujer a lo largo de su vida (Singleton, 2003). El inicio de la menstruación antes de los 12 años, o una menopausia tardía después de los 55 años, aumentan el riesgo de CM debido a la exposición prolongada a hormonas reproductivas (estrógeno y progesterona), las que se relacionan con un aumento de la proliferación celular (Feng et al., 2018; Coughlin, 2019). 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 (Stuckey & Rojas, 2016).

e) Factores hormonales: Como se mencionó anteriormente, las hormonas reproductivas influyen en el riesgo de desarrollar CM debido a su efecto sobre la proliferación celular. La Terapia de Reemplazo de Hormonas (TRH) es utilizada para aliviar los síntomas de la menopausia y prevenir la osteoporosis, sin embargo, aumenta el riesgo de desarrollar CM en un 24% (Stuckey & Rojas,

2016), el cual se eleva aún más si la TRH combina el uso tanto de estrógeno como de progesterona respecto a utilizar solo estrógeno (Coughlin, 2019).

f) Factores genéticos: La predisposición o susceptibilidad genética corresponde a uno de los factores que otorga un mayor RR al desarrollo de CM. Podemos evidenciar la susceptibilidad genética en alrededor del 20% de las pacientes con CM que poseen antecedentes familiares para este cáncer (Singletary, 2003). 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 la paciente al momento del diagnóstico de la enfermedad, llegando a ser dos veces mayor respecto de la población general (Singletary, 2003; Coughlin, 2019). El factor de riesgo más importante corresponde a la predisposición o susceptibilidad genética, la cual se ha estimado que es responsable del 5-15% de todos los CM (Feng et al., 2018).

II.3. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER DE MAMA

A través del estudio de genes candidatos, la genotipificación, el mapeo de polimorfismos de nucleótido único (SNP) y actualmente los estudios a nivel de genoma completo o *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) en grandes cohortes, ha sido posible identificar variantes en genes que se han asociado con riesgo de desarrollar CM. Estos genes se han clasificado en genes de alta, moderada y baja penetrancia (Figura 1).

a) Variantes en genes de alta penetrancia: Las variantes en genes de alta penetrancia corresponden principalmente a cambios en la secuencia de nucleótidos que generan proteínas truncadas. Este tipo de variantes son consideradas mutaciones que presentan muy baja frecuencia en la población ($\leq 0,1\%$). Sin embargo, otorgan un alto RR de alrededor de 10 a 20 veces (Stratton & Rahman, 2008). Las variantes en genes de alta penetrancia, en el grupo de pacientes con CM familiar, dan cuenta de aproximadamente 20-25% del riesgo de CM (Mavaddat et al., 2010). Dentro de este tipo de variantes destacamos mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales codifican para proteínas esenciales para la reparación del daño al DNA. El solo hecho de presentar mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* confiere aproximadamente un 16% de riesgo de desarrollar CM en individuos pertenecientes a familias de alto riesgo para CM (Zavala et al., 2019).

b) Variantes en genes de moderada penetrancia: La frecuencia de la población portadora de las variantes en genes de moderada penetrancia corresponde a $\leq 0,6\%$, con un RR de 2 a 4 veces. Debido a lo anterior, se estima que las variantes en genes de moderada penetrancia representarían cerca del 3% del RR de CM familiar (Mavaddat et al., 2010). En su mayoría, las variantes en genes de moderada penetrancia resultan también en la generación de proteínas truncadas, lo que aumenta el riesgo de desarrollar CM (Stratton & Rahman, 2008). Dentro de este grupo podemos mencionar variantes genéticas en genes como *CHEK2*, que corresponde a una quinasa que regula la reparación de

roturas de doble hebra del DNA mediante la fosforilación de p53 y BRCA1 (Mavaddat et al., 2010). Mujeres portadoras de variantes en estos genes poseen un riesgo de 6-10% de desarrollar CM a los 60 años, en comparación con el 3% de riesgo de la población general (Stratton & Rahman, 2008).

c) Variantes en genes de baja penetrancia: Las variantes genéticas en genes de baja penetrancia son las más frecuentes en la población (5% al 50%) (Stratton & Rahman, 2008). Pese a lo anterior, este tipo de variantes otorgan un RR bajo, entre 1,25-1,65 veces. En este grupo se encuentran los polimorfismos de nucleótido único (SNPs), por ejemplo, SNPs en el gen *FGFR2* (Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos) que generan una función alterada del producto de este gen, promoviendo la formación de tumores a través de la interacción con factores de transcripción oncogénicos (Lei & Deng, 2017). Las variantes en genes de baja penetrancia que han sido identificadas explicarían aproximadamente el 18% de los casos de CM familiar (Wendt & Margolin, 2019).

La Figura 1 muestra cómo influyen las variantes ya identificadas en el riesgo de desarrollar CM. El gráfico indica que las variantes en genes de alta y moderada penetrancia otorgan un alto RR al CM en comparación a las variantes en genes de baja penetrancia. Sin embargo, la frecuencia de las variantes en genes de baja penetrancia es mucho más alta y, por lo tanto, podrían ser responsable de un alto porcentaje de los casos de CM familiar. De acuerdo a lo anterior,

diferentes estudios se han enfocado en la identificación de nuevas variantes en genes de baja penetrancia asociadas a riesgo de desarrollar CM.

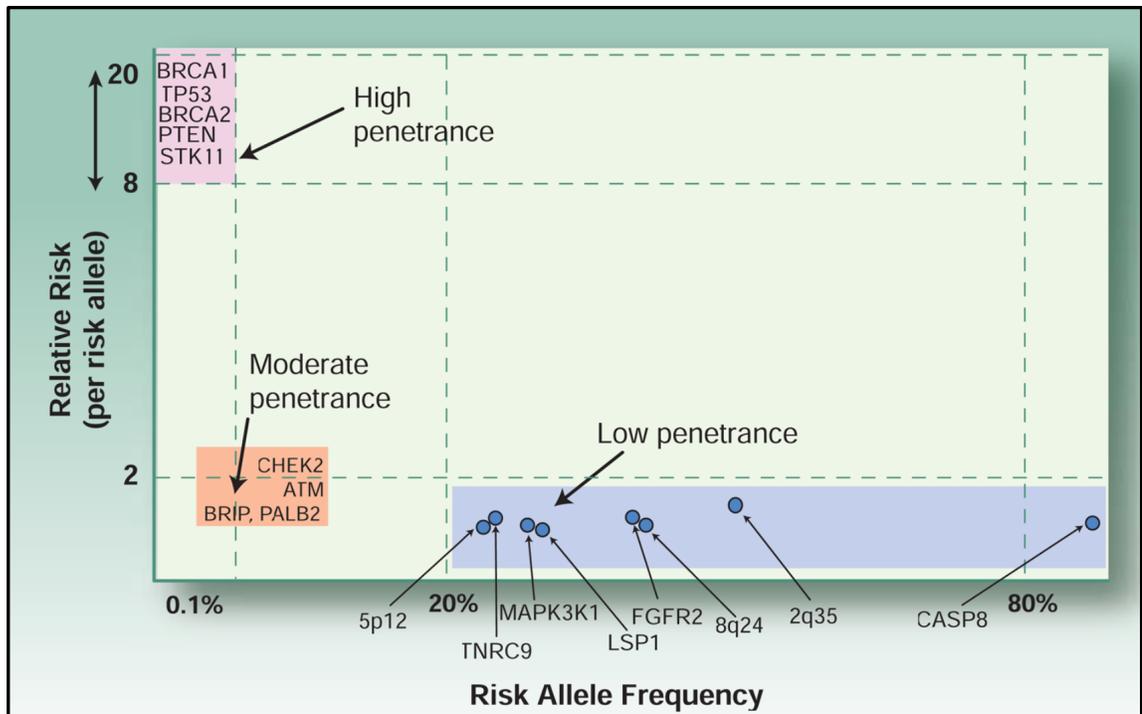


Figura 1. Gráfico de riesgo relativo versus frecuencia alélica de los genes de susceptibilidad al cáncer de mama.

Se representan los porcentajes de riesgo relativo *versus* frecuencia para las variantes de alta, moderada y baja penetrancia de los genes ya identificados que se asocian con riesgo de desarrollar cáncer de mama (García-Closas & Chanock, 2008).

Así, la susceptibilidad genética explicaría entre el 5-15% del total de los casos de CM. Las variables genéticas ya identificadas en los genes de alta, moderada y baja penetrancia podrían explicar cerca del 40%-50% de los casos de CM familiar. Sin embargo, existe entre un 50-60% de casos cuya etiología genética aún no ha sido identificada (Figura 2).

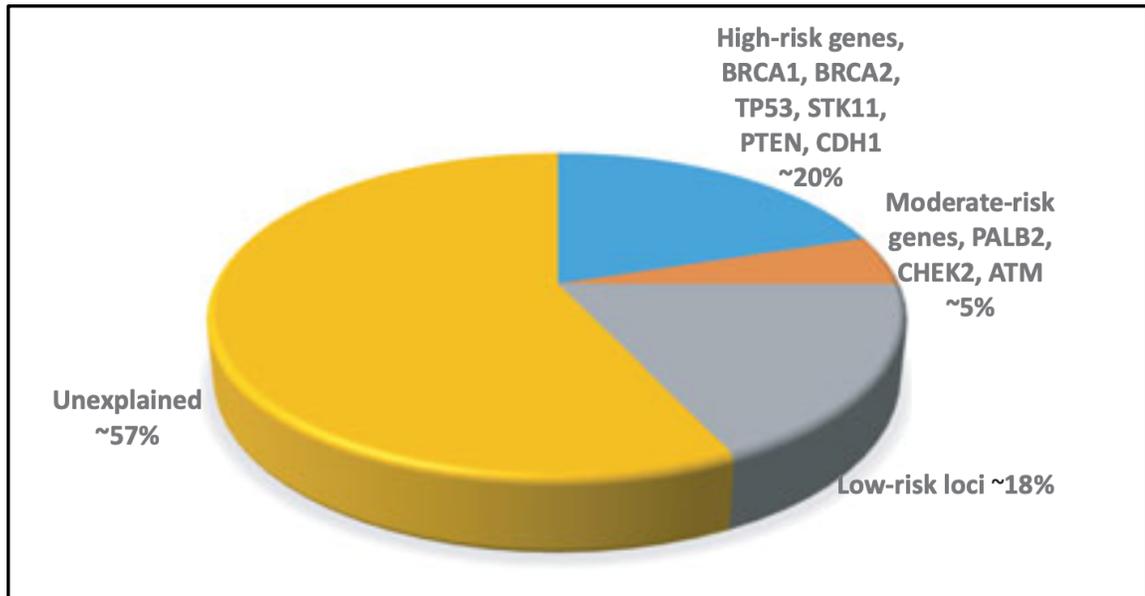


Figura 2. Porcentaje de riesgo de cáncer de mama familiar explicado por los genes de susceptibilidad actualmente identificados.

El gráfico muestra el porcentaje de riesgo de CM otorgado por las variantes en los genes de alta, moderada y baja penetrancia (Wendt & Margolin, 2019).

II.4. BRCA1 Y BRCA2

Los genes de susceptibilidad a CM 1 y 2 (*BRCA1* y *BRCA2*) fueron descubiertos en los años 1994 y 1995, respectivamente (Narod & Foulkes, 2004). 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 (HR) (Petrovic et al., 2017). Se ha reportado que mutaciones en los

genes *BRCA1* y *BRCA2* pueden desencadenar una pérdida de función y aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de mama, ovario, próstata y otros cánceres (Narod & Foulkes, 2004).

Una parte significativa del porcentaje de casos de CM familiar se atribuye a mutaciones en *BRCA1/2* (aproximadamente el 16%) las cuales confieren una alta susceptibilidad al CM familiar y/o de ovario (Jara et al., 2006). Sin embargo, hay un gran porcentaje de casos de CM familiar cuya etiología genética es desconocida.

El gen *BRCA1* es uno de los genes de susceptibilidad de alta penetrancia más caracterizados. Las mutaciones en *BRCA1* son responsables de un aumento del riesgo de desarrollar CM en un 54%, en comparación con el riesgo de la población general (Chang & Sharan, 2012). Alternativamente, varios estudios han demostrado que la expresión de *BRCA1* está regulada por microRNAs (miRNAs) (Petrovic et al., 2017). Se ha predicho, a través de herramientas *in silico*, que a la región 3'UTR (región no traducida) del mRNA de *BRCA1* humano se unen entre 20-100 miRNAs. Hasta la fecha se ha corroborado, por estudios funcionales, solo que un grupo de estos miRNAs regulan la expresión de *BRCA1*.

II.5. MICRORNAS

Los miRNAs son RNA endógenos no codificantes de un tamaño aproximado de 22 nucleótidos (nt) que regulan la expresión génica de aproximadamente el 60%

de los genes humanos (Jie et al., 2009; Shu et al., 2017; Xu et al., 2020). Se ha demostrado que la regulación de la expresión depende del grado de complementariedad entre el miRNA y su RNA mensajero (mRNA) blanco, que ocurre a través de dos mecanismos post-transcripcionales, ya sea degradando el mRNA blanco o bloqueando la traducción (Kim, 2005).

Los miRNAs que se unen con una complementariedad perfecta o casi perfecta 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 sitios de unión en la región 3'UTR del mRNA blanco, inhibiendo la expresión del gen a nivel traduccional (Esquela-Kerscher & Slack, 2006). Están involucrados en la regulación de procesos biológicos y fisiológicos esenciales, como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Se ha asociado la desregulación positiva en los niveles de los miRNAs con diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Petrovic et al., 2017).

Los miRNAs se transcriben desde genes individuales o en clúster. Aproximadamente el 25% se encuentran organizados en clúster, que corresponden a un conjunto de dos o más miRNAs que se transcriben a partir de genes ubicados adyacentes entre sí en el cromosoma. Los miRNAs que se encuentran en clúster se transcriben juntos como un transcrito policistrónico, el cual es procesado, dando como resultado miRNAs maduros individuales (Kabekkodu et al., 2018; Treiber et al., 2019).

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 los miRNAs (O'Brien et al., 2018). La vía canónica de la biogénesis es un proceso que se inicia en el núcleo y finaliza en el citoplasma (Figura 3). 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 5p y 3p del miRNA dúplex se separan, y una de estas hebras se asocia a la proteína Argonauta (Ago), formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual va a ejercer la función regulatoria sobre el gen blanco, mientras que la otra hebra es degradada. Diferentes estudios han demostrado que la hebra 5p tiene mayor afinidad con el complejo RISC, correspondiendo a la hebra guía, mientras que la hebra 3p corresponde a la hebra pasajera la cual es degradada (Lin & Gregory, 2015; Peng & Croce, 2016; Treiber et al., 2019).

La biogénesis de miRNAs no canónica se puede agrupar en vías independientes de Drosha/DGCR8 e independientes de Dicer (O'Brien et al., 2018). 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 empalmados, funcionan como pre-miRNA (Treiber et al., 2019).

La biogénesis de los miRNAs es un proceso altamente regulado, por lo que cualquier alteración en alguna de sus etapas puede afectar los niveles de expresión del miRNA maduro. Los SNPs son la forma más común de variación presente en el genoma humano, y corresponden al cambio de una base por otra. La presencia de SNPs en la secuencia génica de los miRNAs puede afectar la transcripción del pri-miRNA, el procesamiento tanto del pri-miRNA como del pre-miRNA, la maduración del miRNA o unión al mRNA blanco, lo que conduce a cambios en la expresión de genes blanco de miRNA. Lo anterior podría contribuir a la susceptibilidad de distintas enfermedades, entre ellas el CM (Malhotra et al., 2019; Morales et al., 2016; Treiber et al., 2019).

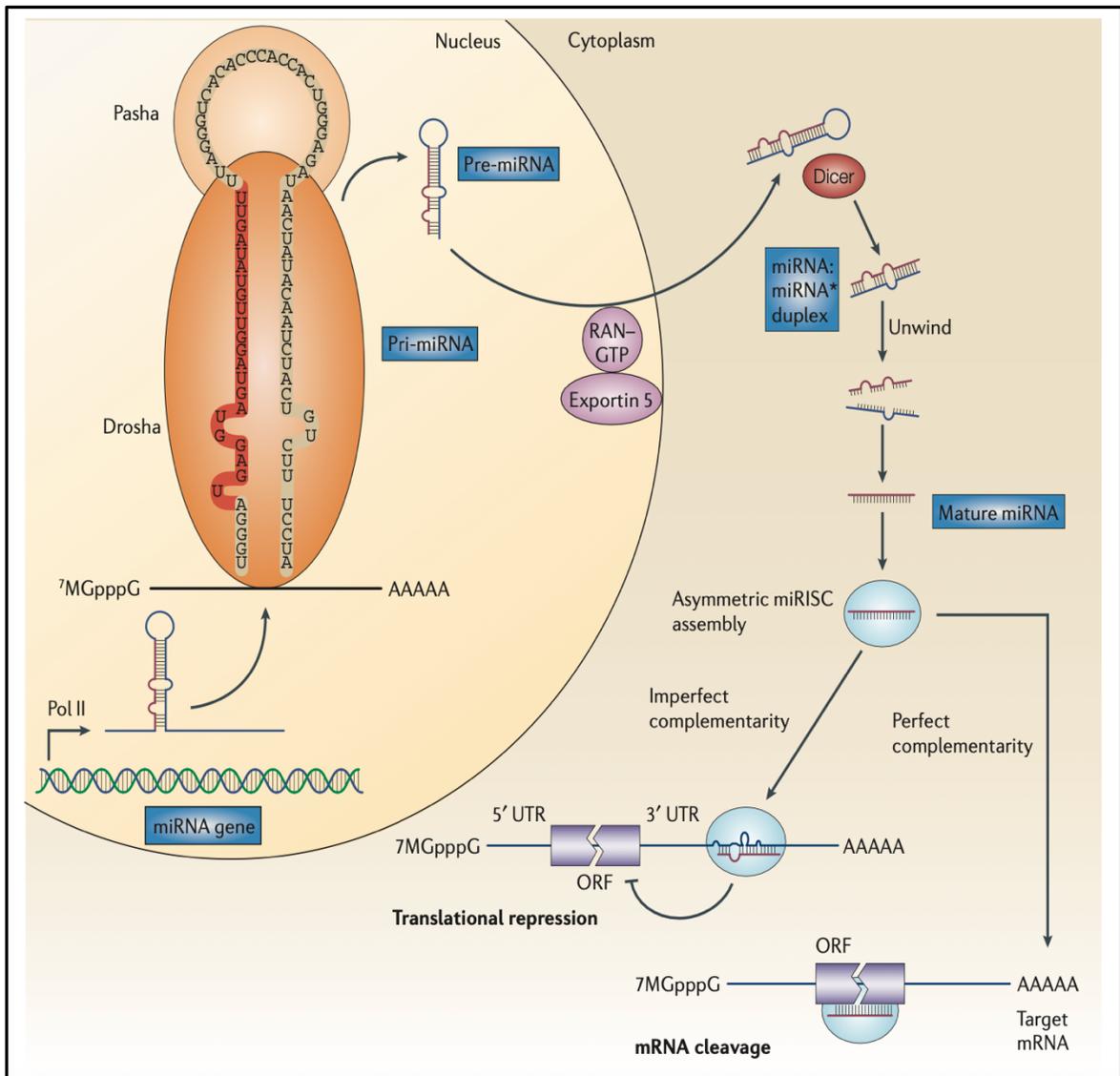


Figura 3. Vía canónica de biogénesis de los microRNA.

La imagen corresponde a un diagrama representativo del procesamiento de miRNAs por la vía canónica de la biogénesis. Se observa que los primeros pasos de la vía se desarrollan en el núcleo, continuando el procesamiento en el citoplasma. El resultado del proceso es un miRNA maduro, el cual va a ejercer su función regulatoria (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

II.5.a. MICRORNAS Y CÁNCER DE MAMA

Diversos estudios han relacionado cambios en los niveles de expresión en los miRNAs con la formación, progresión y metástasis del cáncer (Petrovic et al., 2017). La primera evidencia que relacionó la participación de los miRNAs en la etiopatogénesis del cáncer humano proviene de estudios realizados por el grupo de Croce et al. (2006). En este estudio descubrieron que los miRNAs miRNA-15a y miRNA-16-1 se encuentran en una región frecuentemente delecionada en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). La deleción de esta región resulta en la pérdida o expresión reducida de estos dos miRNAs en aproximadamente el 70% de los pacientes con LLC, lo que implica que estos miRNAs actúan como supresores de tumores (Calin & Croce, 2006; Mathe et al., 2015).

En el caso del CM, los primeros antecedentes que lo relacionan a los miRNAs fueron obtenidos por Iorio et al. (2005), quienes evaluaron los perfiles de expresión de miRNAs en 10 tejidos mamarios normales y en 76 neoplásicos utilizando Northern blot y microarrays. En estos ensayos identificaron 29 miRNAs cuya expresión está desregulada significativamente ($p < 0,05$) y 15 miRNAs que permitían predecir si la muestra correspondía a tejido mamario normal o tumoral con 100% de precisión basado en la expresión diferencial de los miRNAs. Entre los miRNAs expresados diferencialmente, los miRNA-10b, miRNA-125b y miRNA-145 estaban disminuidos y los miRNA-21 y miRNA-155 se encontraban aumentados, lo que sugiere que podrían actuar como genes supresores de

tumores o como oncogenes, respectivamente (Iorio et al., 2005). Estos resultados plantean que la desregulación positiva de la expresión de los miRNAs estaría involucrada en el CM humano.

De acuerdo con los antecedentes presentados, los genes *BRCA1/2* cumplen un papel crucial en la supresión de tumores. Los pacientes portadores de mutaciones en estos genes se asocian con un mayor riesgo de desarrollar CM (Petrovic et al., 2017). Como se mencionó anteriormente, a través de análisis bioinformáticos se identificó a miRNAs que se unen a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* (Chang & Sharan, 2012). Hasta la fecha, solo de algunos de estos miRNAs se ha demostrado, a través de ensayos funcionales, que regulan la expresión de *BRCA1*.

Entre los miRNAs caracterizados, se encuentran el miRNA-146a y miRNA-146-5p, los cuales disminuyen la expresión de *BRCA1* y así contribuyen al desarrollo de CM triple negativo y CM esporádico de tipo basal (Petrovic et al., 2017). Los niveles elevados del miRNA-146a maduro se han asociado a la presencia de SNPs en la secuencia del pre-miRNA-146a, lo que afecta los niveles de expresión de *BRCA1*. Los resultados de estos estudios indicarían que las variantes genéticas en miRNAs podrían influir en la regulación de la expresión de los genes *BRCA1/2* y cumplir un rol importante en el riesgo de desarrollar CM.

Dado que los miRNAs actúan ya sea degradando el mRNA blanco o inhibiendo su traducción, la presencia y posterior unión de miRNAs al mRNA de *BRCA1* tendría como consecuencia la ausencia o disminución en forma importante de la

proteína BRCA1. Este efecto podría ser similar al producido por una mutación patogénica en *BRCA1* (Chang & Sharan, 2012).

II.5.b. MIRNA-182 Y CÁNCER DE MAMA

El miRNA-182 es uno de los miRNAs identificados que se unen a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* (Chang & Sharan, 2012). Este miRNA pertenece al clúster miRNA 183/96/182, el cual es un grupo de miRNAs policistrónicos altamente conservado. Los miembros de este grupo se encuentran dentro de una región de 5 kb en el cromosoma humano 7q32.2 (Li et al., 2014; Wei et al., 2015).

Diferentes estudios han demostrado que el clúster miRNA 183/96/182 se encuentra altamente expresado en diversos tipos de cáncer, entre ellos el CM (Ma et al., 2016; Song et al., 2016). El estudio de Song et al. (2016) mostró que el clúster miRNA 183/96/182 se encuentra altamente expresado en tejidos y líneas celulares de CM comparadas con tejidos normales y líneas celulares normales de mama (Song et al., 2016). Por otra parte, el grupo de Li et al. (2014) reportaron que el clúster miRNA 183/96/182 estaba altamente expresado en muestras de CM en comparación con la expresión en tejidos adyacentes normales (NAT), cumpliendo una función como miRNA oncogénico, ya que la desregulación positiva de la expresión de los genes del clúster aumentó la proliferación y promovió la migración celular (Li et al., 2014).

En el caso del miRNA-182, varios estudios han mostrado que este miRNA participa en el proceso de tumorigénesis. Se ha sugerido que el miRNA-182 es un miRNA oncogénico, involucrado en la progresión de tumores malignos y promoviendo la proliferación y migración de las células cancerígenas (Moazzeni et al., 2017).

Existen antecedentes que señalan que los niveles de la proteína de BRCA1 disminuyen en pacientes negativos para mutaciones en este gen (Moskwa et al., 2011). El estudio realizado por el grupo de Moskwa (2011) identificó miRNAs que tuvieran como blanco a *BRCA1* u otros genes involucrados en la reparación del daño al DNA. De los miRNAs que identificaron, se predijo que el miRNA-182 se unía con una complementariedad parcial a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1*. Utilizando un ensayo de luciferasa, los autores demostraron que el miRNA-182 tiene como blanco a la región 3'UTR del mRNA del gen *BRCA1*. Por otra parte, los autores observaron que los niveles de expresión de BRCA1 se encuentran significativamente disminuidos cuando se encuentran niveles muy altos de miRNA-182.

Como se planteó anteriormente, los SNPs presentes en genes de miRNAs pueden alterar su expresión, llevar a la maduración anormal de los miRNA y afectar la afinidad y especificidad de unión a su mRNA blanco. Por lo tanto, estas variantes pueden contribuir a algunas formas de cáncer familiar. En estudios del laboratorio dirigido por la Dra. Lilian Jara, y como parte de la tesis doctoral del alumno Tomas de Mayo, se propuso identificar variantes en miRNAs que tuvieran

como blanco a los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Entre las variantes identificadas se encuentra el SNP rs4541843:C>T, el cual está ubicado en el pri-miRNA, específicamente en la posición 138 río abajo de la región 5' del pre-miRNA-182 (Figura 4).

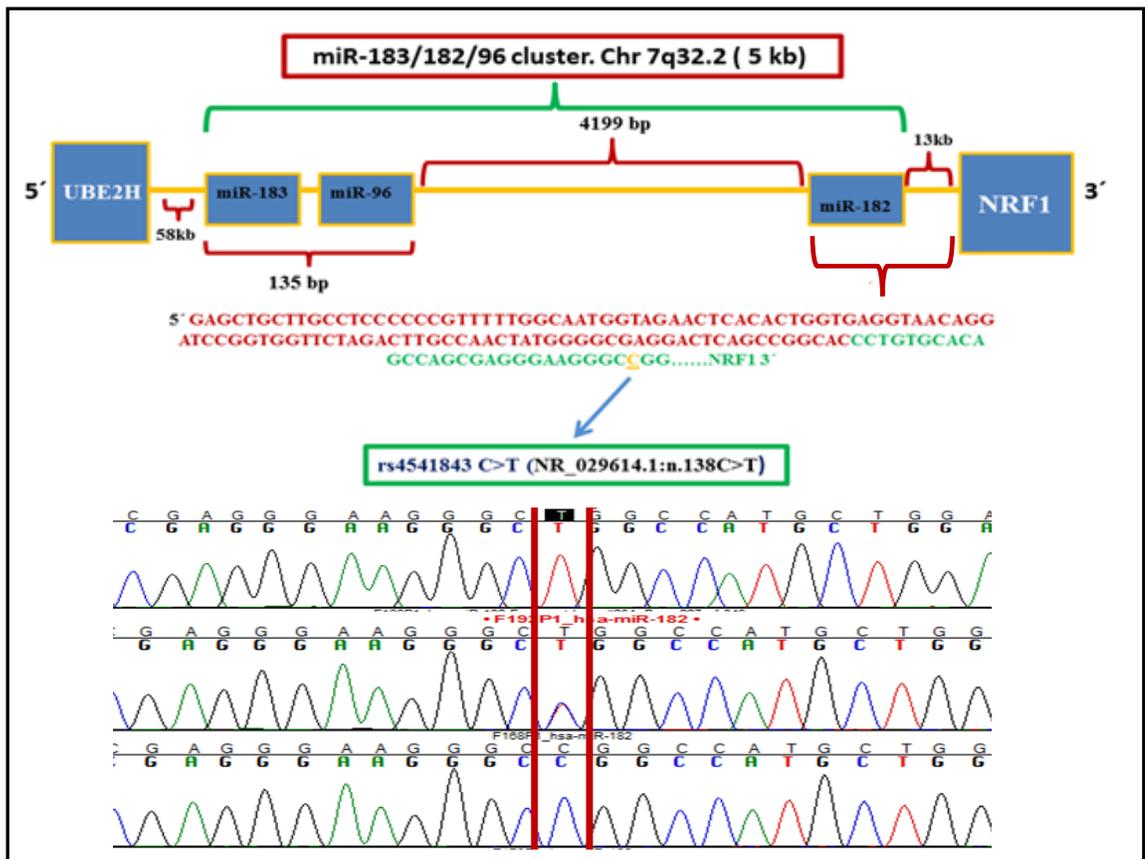


Figura 4. Estructura del clúster miR-183/96/182 y ubicación del SNP rs4541843. La estructura del clúster miRNA 183/96/182 se encuentra en el cromosoma 7, en la región intergénica entre el gen *UBE2H* y *NRF1*. En rojo se observa parte de la secuencia del pre-miRNA-182 y en verde se indica el inicio del pri-miRNA-182, destacando en amarillo el sitio donde se ubica el SNP. La identificación de la variante se realizó por secuenciación de Sanger.

II.5.c. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP) EN MIRNA-182 Y SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE MAMA.

Diferentes estudios han evaluado la asociación entre SNPs en miRNAs y riesgo de desarrollar CM (Chhichholiya et al., 2021). Estudios previos realizados en población chilena por el laboratorio de la Dra. Jara, mostraron que el SNP rs6505162:C>A ubicado en el pre-miRNA-423 aumenta el riesgo de CM familiar en casos con fuerte historia familiar de CM. En la publicación generada, se informó que el genotipo C/A del rs2682818:C>A, presente en el pre-miRNA-618, aumenta el riesgo de CM en casos de CM de diagnóstico temprano; y que el genotipo G/G del rs895819:A>G, el cual se encuentra en el pre-miRNA-27a, reduce el riesgo de CM en casos con moderada historia familiar de CM (Morales et al., 2016).

Con respecto al SNP rs4541843:C>T, ubicado en el pri-miRNA-182, Morales et al. (2018) analizaron la asociación entre el rs4541843 y riesgo de CM familiar en casos *BRCA1/2*-negativos, utilizando un diseño caso-control. Los resultados mostraron que el alelo T se asocia con aumento del riesgo de CM familiar [OR= 1.2 [95% CI 1.0–1.5], $p=0.01$]. Además, los casos con CM familiar *BRCA1/2*-negativos portadores del alelo T (C/T + T/T) tuvieron un riesgo significativamente mayor [OR=1.3 [95% CI 1.0–1.8], $p=0.04$].

Existe gran cantidad de evidencia de que la desregulación positiva del miRNA-182 participa directamente en el desarrollo de CM. Sin embargo, no se conoce si el SNP rs4541843:C>T, presente en el pri-miRNA-182, podría alterar la expresión

de este miRNA y en consecuencia generar un efecto BRCA mutado, incrementando el riesgo a desarrollar CM.

III.1. HIPÓTESIS

La variante genética rs4541843:C>T aumenta los niveles del microRNA-182, incrementando la unión del microRNA al RNA mensajero de *BRCA1*.

III.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la variante genética rs4541843:C>T sobre los niveles del microRNA-182 maduro en líneas celulares de cáncer de mama y su efecto sobre la unión al RNA mensajero de *BRCA1* en células HeLa.

III.3. OBJETIVO ESPECÍFICOS.

1) Evaluar *in vitro* el efecto del rs4541843:C>T sobre los niveles del miRNA-182 maduro en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y en la línea de epitelio de mama normal MCF-10A.

Se ha sugerido que el miRNA-182 es un miRNA oncogénico involucrado en la progresión de tumores malignos, promoviendo la proliferación y migración de las células cancerígenas. Se ha demostrado que los niveles de expresión del miRNA-182 se encuentran incrementados en tumores mamarios. Alternativamente, los SNPs presentes en los miRNAs pueden alterar su expresión, llevar a la maduración anormal de los miRNA y afectar la afinidad y especificidad de unión a su blanco. Para establecer el efecto del SNP

rs4541843:C>T ubicado en la región del pri-miRNA-128 se requiere de estudios funcionales que permitan determinar su implicancia en el desarrollo de CM.

2) Evaluar el efecto del rs4541843:C>T sobre la unión del microRNA-182 a la región 3'UTR del RNA mensajero de *BRCA1*.

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* expresan proteínas que están implicadas en procesos celulares fundamentales, tales como la detección de daño genómico y su reparación. Diferentes estudios han demostrado que entre el 16-20% de las familias con múltiples casos de CM son portadoras de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*. En consecuencia, para aproximadamente un 80% de los pacientes con CM familiar su etiología genética es desconocida. Diferentes publicaciones han demostrado que el miRNA-182 tiene como blanco al mRNA-*BRCA1*. Alternativamente, no existen estudios que demuestren que el rs4541843:C>T en el pri-miRNA-182 podría aumentar la unión de más moléculas de miRNA-182 al RNA mensajero de *BRCA1*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

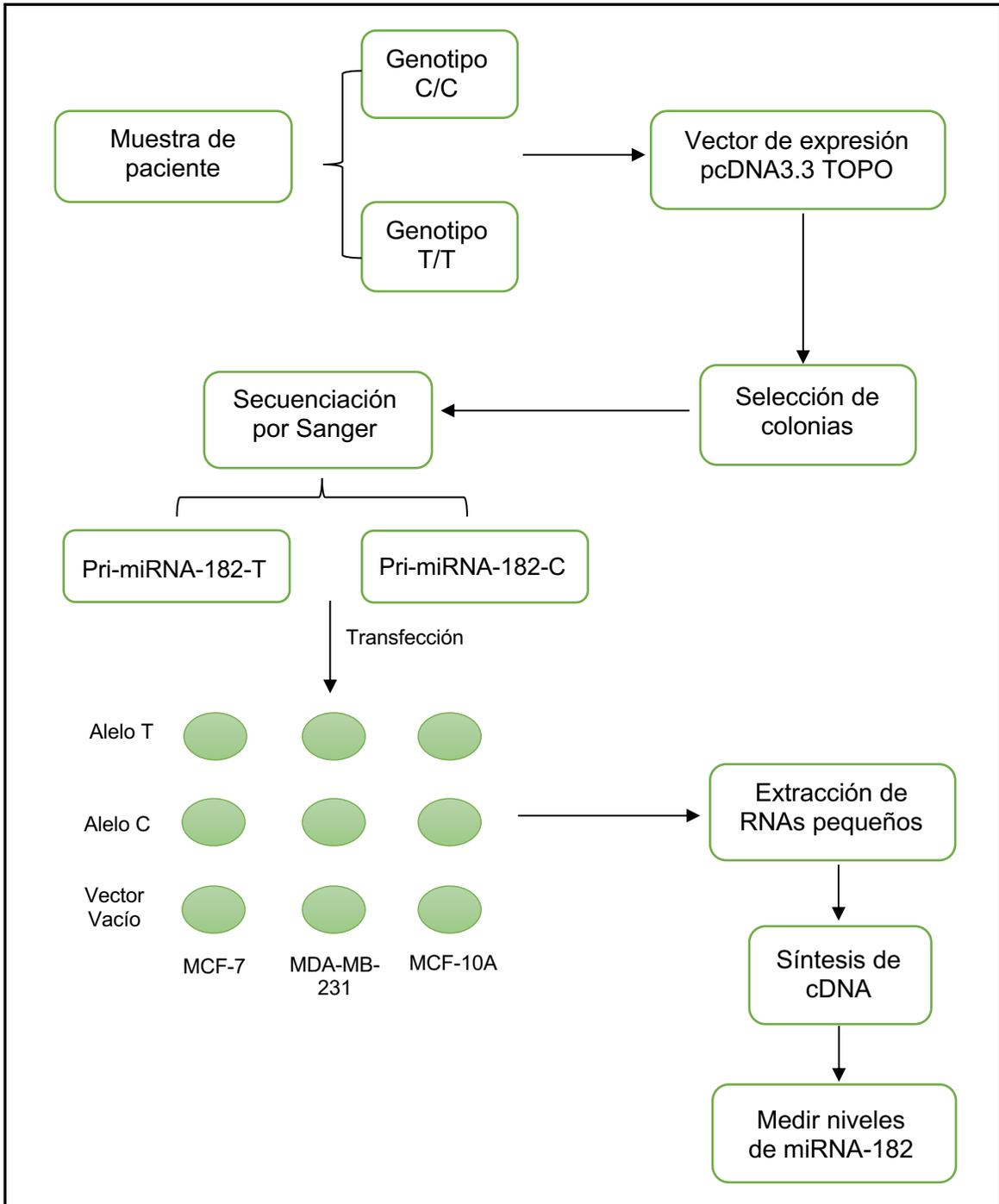


Figura 5. Estrategia experimental Objetivo específico 1.

Esquema representativo del diseño experimental de los ensayos realizados para el objetivo específico 1.

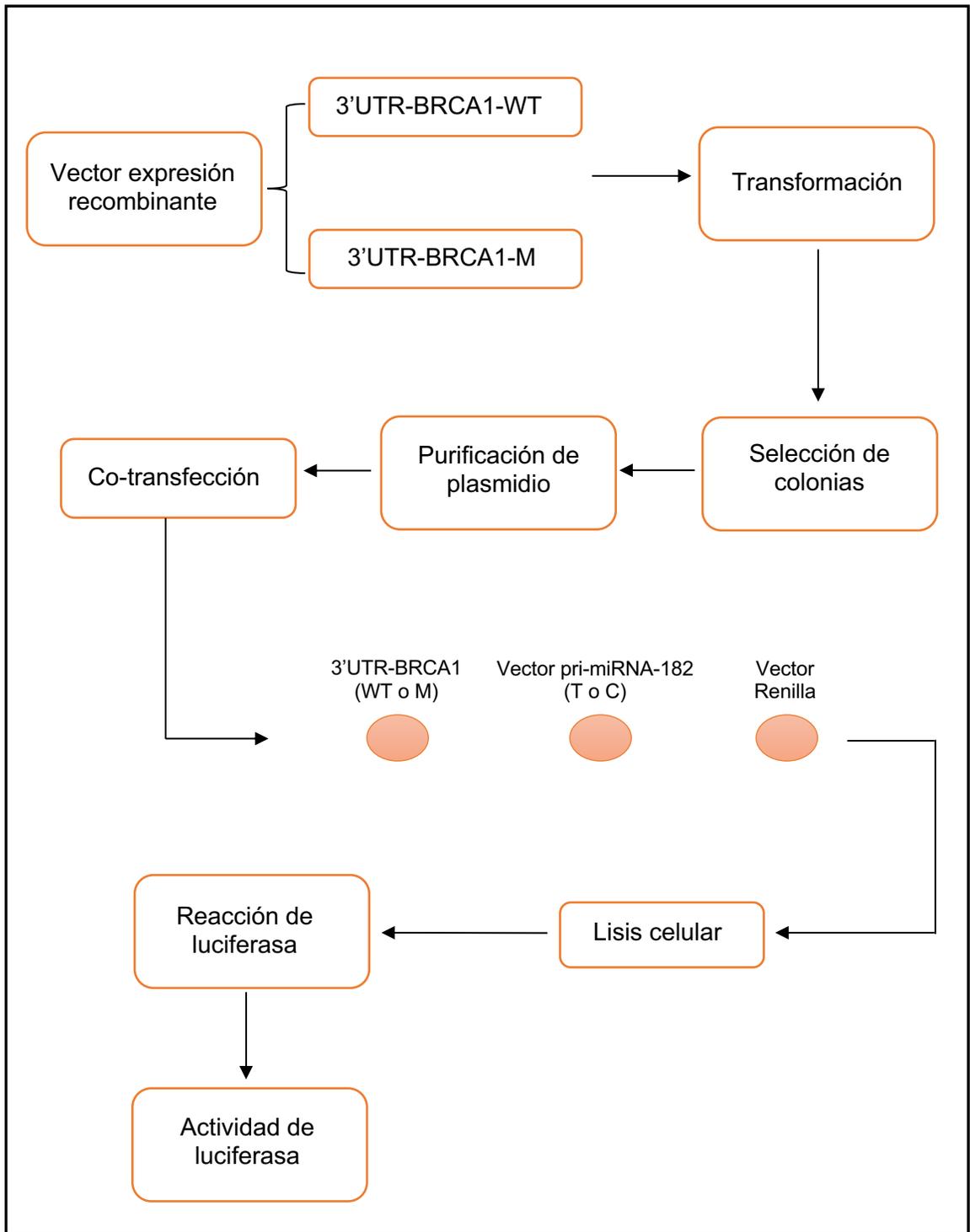


Figura 6. Estrategia experimental Objetivo específico 2.

La figura representa el esquema del diseño experimental de los estudios realizados para el objetivo específico 2.

1) Muestras de pacientes con CM

Las muestras de DNA genómico de pacientes con CM familiar utilizadas en este trabajo de tesis fueron recolectadas en el proyecto FONDECYT anterior de la Dra. Lilian Jara. El DNA genómico utilizado, se extrajo de una muestra de sangre de pacientes con CM y pacientes sanas, posterior aceptación de consentimiento informado (Anexo 1). Para realizar dicho estudio se consideraron los siguientes criterios de selección:

- a) Casos con CM familiar (n = 500): 1) Al menos dos familiares de primer grado con CM y / o cáncer de ovario diagnosticado a cualquier edad; 2) Al menos dos familiares de primer o segundo grado con cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años; 3) Al menos tres familiares de primer o segundo grado con cáncer de mama con al menos uno diagnosticado antes de los 40 años; 4) Al menos un familiar con cáncer de ovario diagnosticado antes de los 50 años y al menos un familiar con cáncer de ovario diagnosticado a cualquier edad; 5) Al menos un familiar varón con cáncer de mama diagnosticado a cualquier edad y al menos una mujer familiar diagnosticada de cáncer de mama a cualquier edad; 6) Al menos un familiar diagnosticado con CM antes de los 30 años y otro pariente de primer o segundo grado diagnosticado con CM a cualquier edad; 7) Al menos un familiar con CM bilateral y otro familiar de primer o segundo grado con CM.
- b) Controles (n = 1000): Individuos sanos sin antecedentes familiares de cáncer de mama.

c) Mujeres sanas con antecedentes familiares de CM y seguimiento mamográfico durante 9 años (n = 350): Este grupo incluye mujeres clínicamente sanas con al menos dos familiares cercanos con CM, comprobadas por certificado médico y / o de defunción.

2) Líneas Celulares

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama esporádico, de morfología epitelial que sobreexpresa los receptores de estrógenos, progesterona y glucocorticoides. Esta línea deriva de una paciente con adenocarcinoma. La línea celular fue comprada en ATCC código HTB-22™.

MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama triple negativo (Receptor de estrógeno, progesterona y HER2 negativo). Esta línea fue aislada de una paciente con carcinoma ductal invasivo. La línea celular fue comprada en ATCC código CRM-HTB-26™.

HeLa: Las células HeLa derivan de una paciente con carcinoma epitelioide de cuello uterino humano. La línea celular fue donada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

3) Cultivo celular

Se cultivaron las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y HeLa en medio *Dulbecco's minimal essential medium* (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (FBS) y una solución de una mezcla de antibióticos al 1% (Anfotericina B, Penicilina-Estreptomicina). Las células se cultivaron a 37°C, en atmósfera húmeda, a una concentración de 5% de CO₂.

4) Construcción de los plásmidos de expresión del pri-miRNA-182

Se realizó la construcción de los plásmidos de expresión del pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T utilizando el plásmido comercial pcDNA3.3 TOPO TA (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, E.E.U.U.). Para ello, se extrajo DNA genómico de pacientes con genotipos homocigotos C/C y T/T del SNP rs4541843. Se diseñaron partidores (directo: 5' CCTGCAGGAAGGACCTTGT 3' y reverso 5' ATGCAGGGAAACACAGAGTG 3') para generar las secuencias pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T. Los productos de PCR (375 pb) conteniendo parte de la secuencia de los pri-miRNAs se purificaron e insertaron en el vector pcDNA3.3 TOPO TA. Los vectores de expresión conteniendo los pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T se enviaron a secuenciar para confirmar su correcta inserción. Posteriormente, se transfectaron los vectores en las células MCF-7 y MDA-MB-231 utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, E.E.U.U.), junto los reactivos

proporcionados por el proveedor, en los siguientes volúmenes para cada línea celular:

47µL Optimen + 3µL Lipofectamina 2000	50µL volumen final
35µL Optimen + 1,5ng p-pri-miRNA-182-C	50µL volumen final
	100µL volumen total
47µL Optimen + 3µL Lipofectamina 2000	50µL volumen final
35µL Optimen + 1,5ng p-pri-miRNA-182-T	50µL volumen final
	100µL volumen total
47µL Optimen + 3µL Lipofectamina 2000	50µL volumen final
35µL Optimen + 1,5ng pcDNA3.3 vacío	50µL volumen final
	100µL volumen total

5) Detección de los niveles de expresión de los miRNA-182-5p y miRNA-182-3p utilizando RT-PCR en tiempo real

A partir de cultivos de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se extrajeron los RNAs pequeños totales, utilizando el sistema comercial mirVana (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.U.U.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para determinar los niveles de los miRNA-182-5p y miRNA-182-3p maduros, se realizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real. La transcripción inversa se realizó utilizando el sistema comercial TaqMan Reverse-Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.U.U.). Las reacciones se realizaron en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.U.U.), aplicando el siguiente protocolo: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y 10 minutos a 4°C. Luego, se determinaron los niveles de los miRNA-182-5p y

miRNA-182-3p utilizando un ensayo TaqMan para microRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.U.U.) en un equipo de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.U.U.). Todas las reacciones se realizaron en triplicado. Las amplificaciones se iniciaron con 10 minutos de incubación a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. El RNA pequeño U6 se utilizó como control endógeno (*gen housekeeping*) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.U.U.). Los datos obtenidos en el análisis por PCR en tiempo real fueron analizados utilizando la fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (método de Ct comparativo) para cada muestra experimental.

6) Diseño de los vectores de expresión recombinantes para la región 3'UTR del gen *BRCA1*

Para la construcción del vector de expresión recombinante, se requirió de la inserción de la región 3'UTR de BRCA1 normal y mutada en el vector comercial pMirTarget (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD). El diseño de la región a insertar en el vector se realizó en el laboratorio. Este diseño se envió a la empresa OriGene y se les solicitó la construcción de un vector que contuviera la región 3'UTR-BRCA1 con la secuencia normal (WT) para el sitio de reconocimiento del miRNA-182 y un segundo vector con la región 3'UTR-BRCA1 mutada (M).

Los plásmidos de expresión recombinantes se diseñaron con las siguientes características: a) que contuviera el gen de resistencia a kanamicina; b) que

contuviera el gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*); y c) adyacente al gen de la luciferasa, la región 3'UTR del gen BRCA1 WT o M, como se observa en la Figura 7.

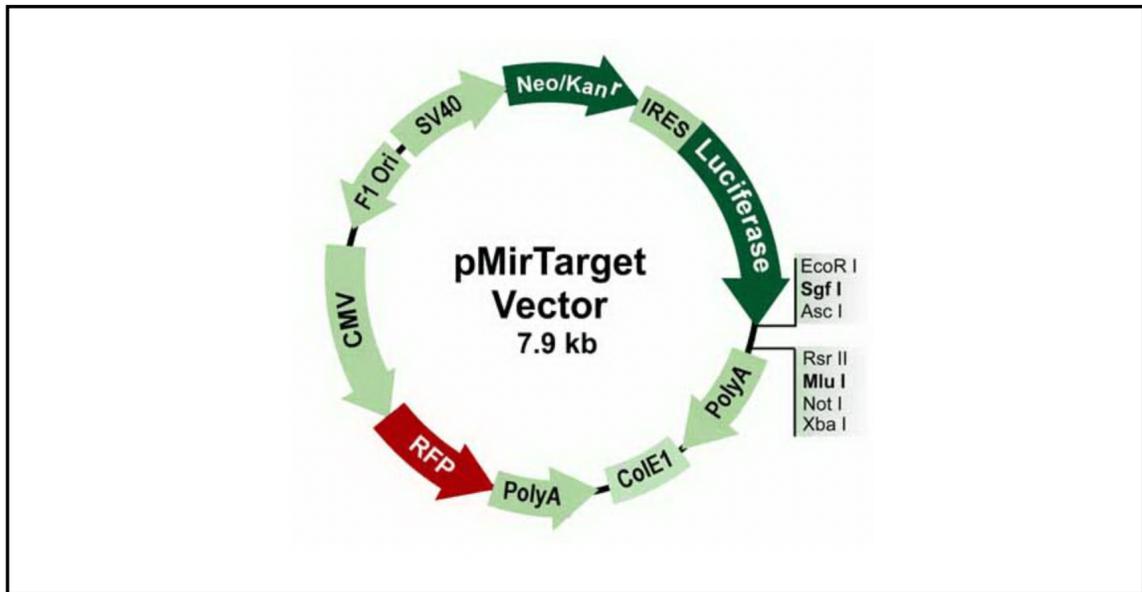


Figura 7. Esquema del vector de expresión recombinante de luciferasa.

La figura representa la estructura del vector recombinante para la región 3'UTR del gen *BRCA1*. Se identifican el gen de resistencia a kanamicina, a continuación, el gen de luciferasa de luciérnaga y adyacente a este, el sitio *polylinker* donde se insertó la región 3'UTR del gen BRCA1 WT o M (*PMirTarget 3'-UTR Assay Vector – PS100062 | OriGene, n.d.*)

Las secuencias para la región 3'UTR-BRCA1 WT y M se obtuvieron de la publicación de Moskwa et al. (2011), y corresponden a:

WT:5'CTAGTAGAAGAGATTTCTAAAAGTCTGAGATATATTTGCTAGATTTCTA
AAGAATGTGTTCTAAAACAGCAGAAGATTTTCAAGAACCGGTTTCCAAGAC
AG-3'

**M:5'CTAGAAGAGACGATACCCGTCTGAGATATATTTGCTAGGCGATACCCG
GGTGTGTTCTAAAGCAGAAGCCGATACCCGGCCGGCGATACCCGACAG-3'**

En negrillas se encuentran destacadas las regiones mutadas, correspondientes a los sitios de unión del miRNA-182 a la región 3'UTR-mRNA-BRCA1. Estos plásmidos se denominaron plásmidos p-3'UTR-BRCA1-WT y p-3'UTR-BRCA1-M.

7) Clonación de los plásmidos p-3'UTR-BRCA1-WT y p-3'UTR-BRCA1-M

Los plásmidos p-3'UTR-BRCA1-WT y p-3'UTR-BRCA1-M se clonaron en bacterias *E. coli* DH5 α competentes utilizando un protocolo de electroporación. Brevemente, se mezcló 95 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α competentes con 5 μ L de los plásmidos previamente dializados. Los 100 μ L de reacción se agregaron a una cubeta de electroporación y se electroporaron a 2,2mV. Luego, se agregó 1mL de medio LB para recuperar las bacterias, incubando a 37°C durante 1 hora en snapcap. Después de 1 hora, las bacterias electroporadas con los plásmidos p-3'UTR-BRCA1-WT y p-3'UTR-BRCA1-M se traspasaron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 13.000 rpm en una microcentrifuga durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se eliminaron 900 μ L del sobrenadante y con los 100 μ L restantes se resuspendió el sedimento, el cual fue sembrado en placas LB tratadas con kanamicina (concentración 75 μ g/ml). Se incubaron las placas a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se seleccionaron las colonias de bacterias resistentes al antibiótico y se realizó la extracción plasmidial utilizando

el sistema comercial NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

8) Co-transfección en células HeLa

Para obtener el porcentaje de actividad de luciferasa, se co-transfectaron las células HeLa con los siguientes plásmidos: vectores de expresión recombinantes p-3'UTR-BRCA1-WT y p-3'UTR-BRCA1-M; vectores de expresión pri-miRNA-182-C, pri-miRNA-182-T, vector vacío y el vector pRL-TK (Luciferasa de Renilla (*Renilla reniformis*)). Para la co-transfección, se sembraron 1×10^6 células HeLa en placas de 96 pocillos. Las células se incubaron durante toda una noche a 37°C y 5% de CO₂. Al término de la incubación se realizó la co-transfección en las siguientes condiciones:

- a) 3'UTR-BRCA1-WT + p-pri-miRNA-182-C + pRL-TK
- b) 3'UTR-BRCA1-WT + p-pri-miRNA-182-T + pRL-TK
- c) 3'UTR-BRCA1-WT + pcDNA3.3 vacío + pRL-TK
- d) 3'UTR-BRCA1-MUT + p-pri-miRNA-182-C + pRL-TK
- e) 3'UTR-BRCA1-MUT + p-pri-miRNA-182-T + pRL-TK
- f) 3'UTR-BRCA1-MUT + pcDNA3.3 vacío + pRL-TK

Cada transfección se preparó en tubos diferentes con las siguientes combinaciones: Optimen, Lipofectamina 2000 y 0,25ng 3'UTR-BRCA1-WT o

3'UTR-BRCA1-MUT; Optimen, Lipofectamina 2000 y 0,25ng p-pri-miRNA-182-C, p-pri-miRNA-182-T o pcDNA3.3 vacío; Optimen, Lipofectamina 2000 y 1µg pRL-TK. Luego, se incubaron las combinaciones de plásmidos con las células HeLa durante 6 horas en medio DMEM sin FBS. Posterior al tiempo de incubación, se cambió el medio de cultivo por DMEM con FBS y se incubaron las células durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂.

9) Ensayo de Luciferasa

Pasadas las 48 horas post-transfección de la línea celular HeLa, se descartó el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con PBS 1X. Luego, a cada uno de los pocillos con las células transfectadas se agregó 20µL de *passive lysis buffer* 1X (PLB 1X) y se dejó incubando la placa en agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para medir la luminiscencia se agregó a cada pocillo 100µL LARII (sustrato de luciferasa de luciérnaga) y se midió la actividad de luciferasa. Posteriormente se agregó 100µL del tampón (o amortiguador) Stop & Glo (inhibidor de luciferasa de luciérnaga y sustrato de luciferasa de Renilla) y se midió la actividad de luciferasa de Renilla. Se realizaron 4 ensayos independientes. Se definió como el 100% de la actividad al valor obtenido para el vector vacío. Para normalizar el valor de actividad de luciferasa se calculó la proporción de actividad de luciferasa de luciérnaga/ actividad de luciferasa de Renilla.

10) Análisis estadístico

La cuantificación de la expresión del miRNA-182 por RT-qPCR se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los análisis estadísticos para medir los niveles de expresión del miRNA-182 se realizaron con test ANOVA de dos colas y para los análisis de múltiple comparación se utilizó el test de Sidak, ambos con una significancia de $p < 0,05$ y un intervalo de confianza de 95%. Para el ensayo de luciferasa se utilizó test ANOVA de una cola y para los análisis de comparación múltiple se utilizó el test de Tukey. Estos análisis se realizaron con el programa *GraphPad Prism*® version 8.3.1.

V. RESULTADOS

Objetivo 1: Evaluar *in vitro* el efecto del rs4541843: C>T sobre los niveles del miRNA-182 maduro en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y en la línea de epitelio de mama normal MCF-10A.

a) Amplificación por PCR de los pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T a partir de pacientes homocigotos C/C y T/T.

Para determinar el efecto del rs4541843: C>T sobre la expresión del miRNA-182 maduro, se procedió a la construcción de los vectores de expresión recombinantes portadores de las secuencias de los pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T. La Figura 8 muestra los fragmentos amplificados por PCR de los pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T, a partir de DNA genómico de pacientes con genotipo homocigoto (C/C y/o T/T) para el rs4541843:C>T.

Se obtuvieron bandas únicas con un tamaño de aproximadamente 375 pb, lo que se corresponde con el tamaño esperado. Las bandas de los carriles 2, 3 y 4 corresponden a bandas de amplificación del pri-miRNA-182 obtenidas a partir de DNA genómico de pacientes con genotipo C/C. Las bandas de los carriles 5, 6 y 7 corresponden a bandas de amplificación del pri-miRNA-182 obtenidas a partir de DNA genómico de pacientes con genotipo T/T. Para la clonación se utilizaron las bandas de mayor intensidad, correspondientes a la banda del carril 2 (paciente F307P1) para el genotipo C/C y la banda del carril 5 (paciente F315P1)

para el genotipo T/T (Figura 8). Se obtuvo como resultado dos muestras con los fragmentos correspondientes al pri-miRNA-182 alelo C y T.

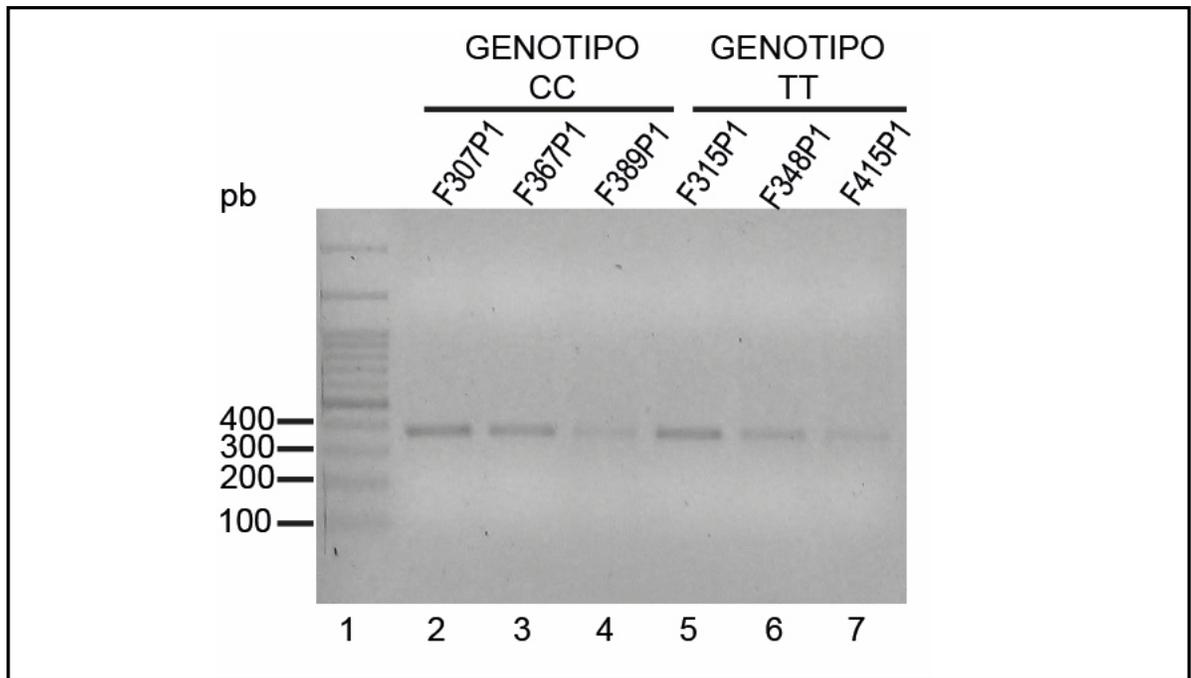


Figura 8. Amplificación de los fragmentos para el pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T.

El carril 1 muestra el estándar de peso molecular (ladder) 100 pb; los carriles 2, 3 y 4 muestran bandas de amplificación del pri-miRNA-182-C; los carriles 5, 6 y 7 muestran bandas de amplificación del pri-miRNA-182-T.

b) Secuenciación por Sanger de los vectores de expresión pcDNA3.3 TOPO TA conteniendo los pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T.

La siguiente etapa consistió en corroborar la correcta inserción de los fragmentos en el vector. Para ello se insertaron los productos de PCR correspondientes a los pri-miRNA-C y pri-miRNA-T en el vector pcDNA3.3 TOPO TA, obteniéndose dos

vectores de expresión recombinantes: p-pri-miRNA-182-C y p-pri-miRNA-182-T. Las bacterias *E. coli* competentes proporcionadas en el sistema comercial de clonación pcDNA3.3 TOPO TA se transformaron con los vectores recombinantes construidos.

Para verificar la correcta inserción de los pri-miRNAs en el vector pcDNA3.3 TOPO TA, los vectores de expresión recombinantes fueron enviados para su secuenciación a la empresa Macrogen (Korea). Para ello se realizó la extracción de plasmidios a partir de las *E. coli* transformadas de cada una de las muestras. La Figura 9 muestra los cromatogramas de la secuenciación de SANGER, los que corresponden a un segmento de la secuencia del pri-miRNA-182 rs4541843: C>T. La Figura 9A muestra un segmento que contiene la variante C del SNP y la Figura 9B, muestra un segmento de la secuencia del pri-miRNA-182 rs4541843: C>T, conteniendo la variante T del SNP. La secuenciación comprobó que los insertos del pri-miRNA-182 se ubicaron adyacentes al promotor del vector de expresión y en dirección 5'P - 3'OH.

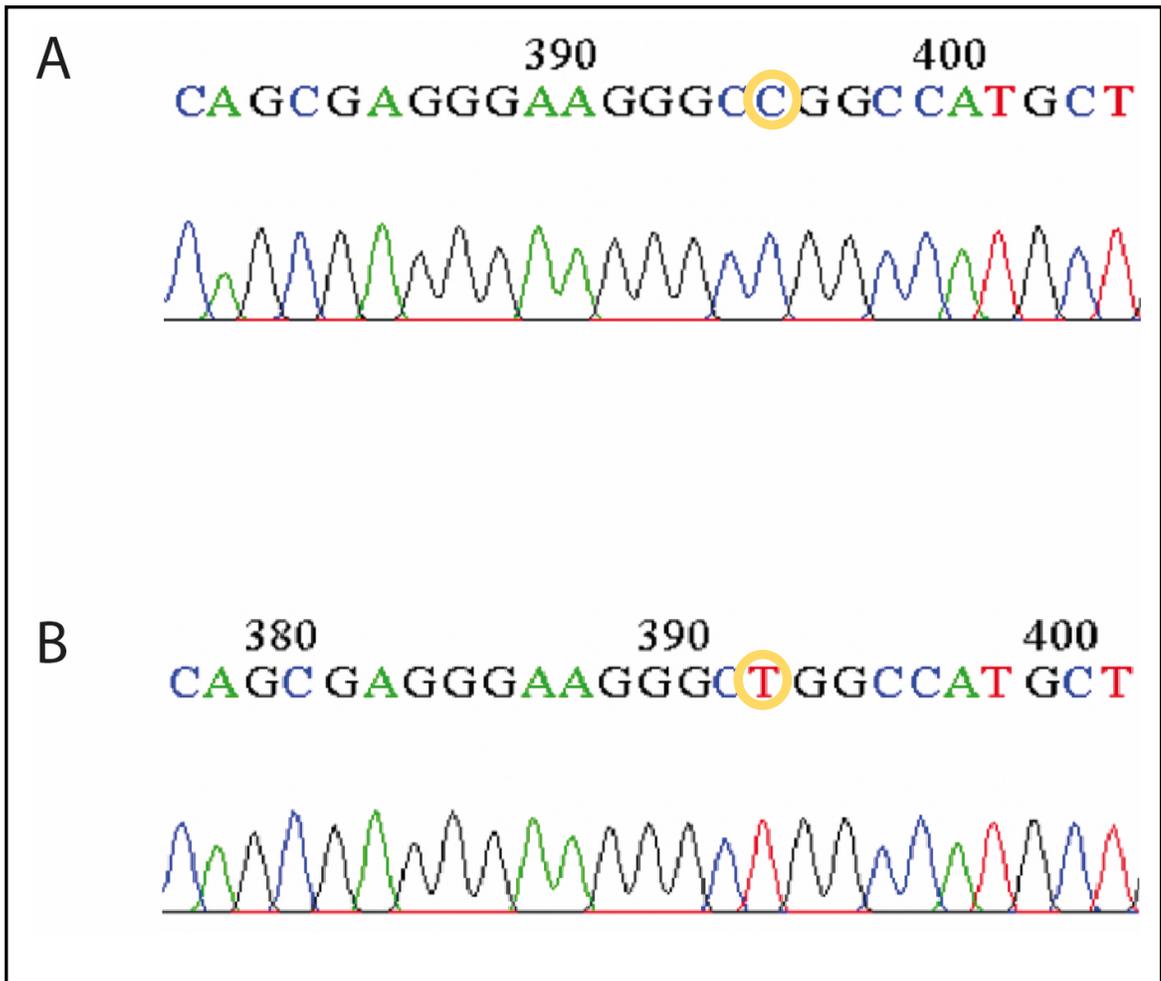


Figura 9. Cromatograma de los vectores de expresión recombinantes pri-miR-182-C y pri-miR-182-T.

Se observa la correcta inserción de los fragmentos correspondientes al pri-miRNA-182-C (A) y pri-miRNA-182-T (B) en el vector pcDNA3.3 TOPO TA.

c) Efecto del SNP rs4541843:C>T sobre los niveles de expresión de miRNA-182 maduro.

El pre-miRNA-182 puede producir dos secuencias maduras: miRNA-182-3p y miRNA-182-5p. En condiciones normales en las células, la secuencia 3p se

degrada siendo la secuencia 5p la funcional. Sin embargo, existen antecedentes de que en algunos tipos de cáncer tanto la hebra 3p como la 5p se encuentran en niveles más altos que en células normales. En consecuencia, se decidió medir los niveles de las hebras 3p y 5p del miRNA-182.

Para evaluar el efecto del SNP rs4541843:C>T sobre los niveles de las hebras 3p y 5p del miRNA-182 maduro se utilizaron dos líneas celulares. La línea celular MCF-7 corresponde al subtipo de CM luminal A, que representa aproximadamente al 40% de todos los CM, siendo el subtipo de mejor pronóstico. Las células MDA-MB-231 corresponden a una línea celular de CM triple negativo que representa aproximadamente el 20% de todos los CM y generalmente se comporta de manera más agresiva y de peor pronóstico que otros tipos de CM. Los vectores de expresión recombinante pri-miRNA-182-C, pri-miRNA-182-T y el vector vacío se transfectaron en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Utilizando el sistema comercial MirVana se extrajo el total de RNAs pequeños, a partir de estos se realizó transcripción reversa obteniéndose los cDNAs. Finalmente, mediante RT-qPCR se evaluaron los niveles de expresión del miRNA-182 maduro en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

La Figura 10A muestra que en la línea celular MCF-7 hay expresión tanto de la hebra 3p como de la hebra 5p. Sin embargo, la cantidad de la hebra 3p es significativamente mayor respecto de los niveles de la hebra 5p, tanto en las células transfectadas con el pri-miRNA-182-C como en las transfectadas con el pri-miRNA-182-T, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$,

$p < 0,01$ respectivamente). Además, hay una mayor cantidad del miRNA-182-3p en las células transfectadas con el pri-miRNA-182-C con respecto de las células transfectadas con el pri-miRNA-182-T, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

En la línea celular triple-negativa nuevamente se observó una expresión de ambos miRNA-182-3p y 5p, siendo significativamente mayor la expresión del miRNA-182-3p respecto del miRNA-182-5p ($p < 0,01$). Los niveles de expresión del miRNA-182-5p fueron muy bajos (Figura 10B). En esta línea celular, nuevamente los resultados mostraron una sobreexpresión del miRNA-182-3p en las células transfectadas con el pri-miRNA-182-C con respecto de las células transfectadas con el pri-miRNA-182-T, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Los resultados sugieren que hay altos niveles del miRNA-182-3p a consecuencia de la presencia del alelo C del SNP rs4541843:C>T en las líneas celulares de CM luminal A y triple negativo. No se observó efecto del alelo T del rs4541843:C>T en los niveles del miRNA-182 maduro. Estos resultados muestran que la hebra 3p del miRNA-182 se encuentra en mayor cantidad en relación a la hebra 5p en ambas líneas celulares de CM, lo que indicaría que es la hebra 3p la responsable del rol oncogénico de este miRNA. Además, niveles mayores ocurren en presencia del alelo C del rs4541843:C>T.

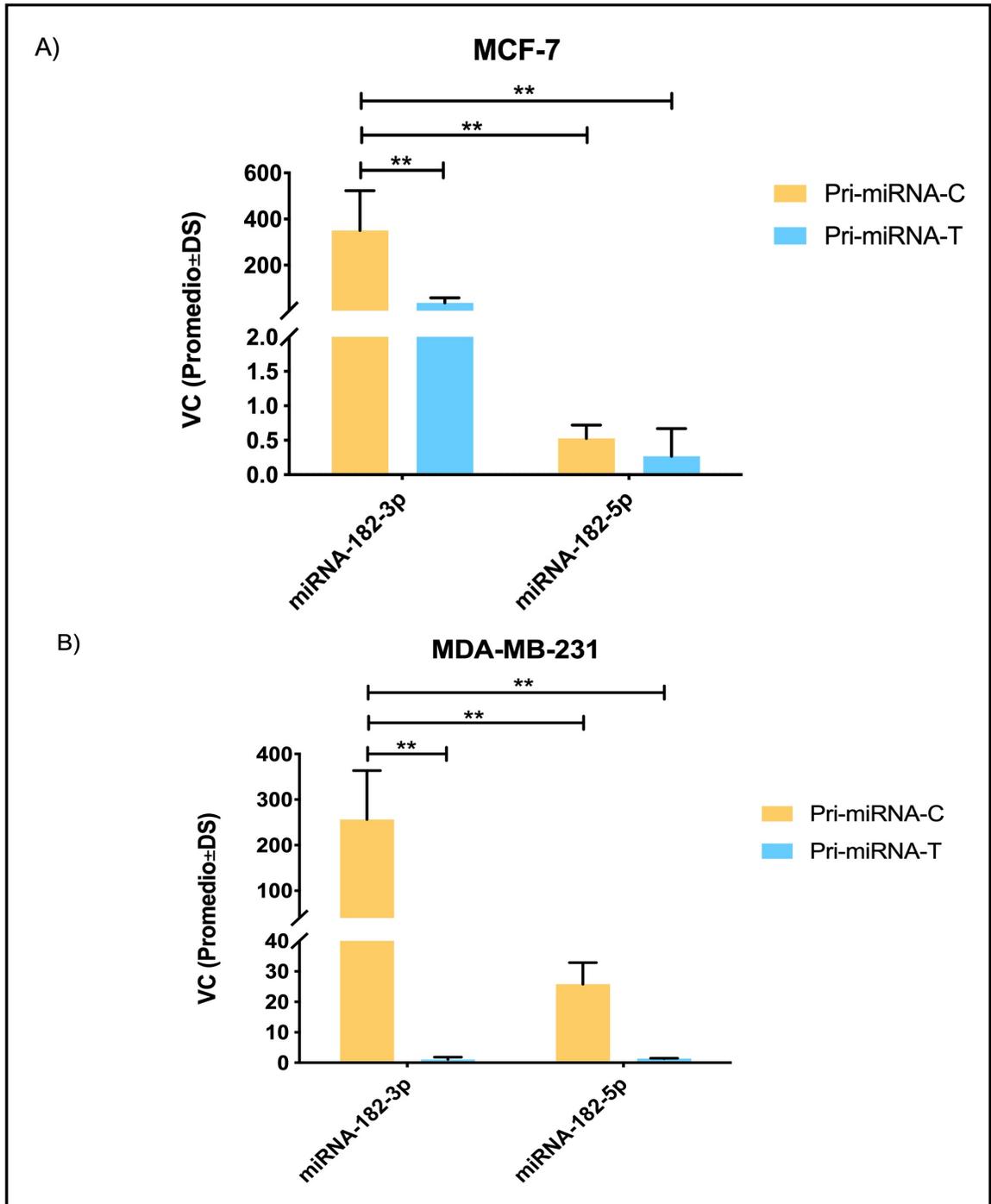


Figura 10. Niveles del miRNA-182 maduro en las líneas celulares (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231.

Se midieron los niveles del miRNA-182 maduro por RT-qPCR en las líneas celulares transfectadas con los vectores de expresión pri-miRNA-182-T y pri-miRNA-182-C. Las veces de cambio se normalizaron con respecto al vector vacío. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes (** $p < 0,01$).

Objetivo 2: Evaluar el efecto del alelo rs4541843: C>T sobre la unión del microRNA-182 a la región 3'UTR del RNA mensajero de *BRCA1*.

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* expresan proteínas que están implicadas en procesos celulares fundamentales, entre estos, la detección del daño genómico y su reparación. Diferentes publicaciones han demostrado que el miRNA-182 tiene como blanco al mRNA-*BRCA1*. Si bien se conoce que el miRNA-182 se une a la región 3'UTR del RNA mensajero de *BRCA1*, no existen estudios que demuestren que la variante miRNA-182 rs4541843: C>T aumenta el riesgo a consecuencia de que podría aumentar la unión del miRNA-182 al RNA mensajero de *BRCA1*.

Con el fin de evaluar el efecto de la variante rs4541843:C>T sobre la unión del miRNA-182 a la región 3'UTR del mRNA-*BRCA1*, se realizó un ensayo de expresión con luciferasa. Para ello se diseñaron y enviaron a construir vectores de expresión recombinantes que contuvieran: a) un gen de resistencia a kanamicina; b) el gen de luciferasa; y c) adyacente al gen de la luciferasa, la región 3'UTR del gen *BRCA1* normal (WT) para el sitio de reconocimiento del miRNA-182 y un segundo vector con la región mutada (M) para el sitio de reconocimiento del miRNA-182. Los vectores de expresión recombinantes, denominados vectores p-3'UTR-*BRCA1*-WT y p-3'UTR-*BRCA1*-M, fueron clonados en bacterias *E. coli* DH5 α . Posteriormente se realizó la extracción plasmidial utilizando el sistema comercial NucleoBond® Xtra Midi.

Se co-transfectaron los vectores de expresión recombinantes p-3'UTR-BRCA1-WT y p-3'UTR-BRCA1-M, junto con los vectores de expresión pri-miRNA-182-C, pri-miRNA-182-T, vector vacío y el vector pRL-TK (Renilla) en la línea celular HeLa. Se midió la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga y de luciferasa de Renilla para cada una de las condiciones. La actividad de luciferasa normalizada correspondió a la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga dividida la luminiscencia de Renilla. La actividad de luciferasa normalizada obtenida para el vector vacío se consideró como 100%.

La Figura 11A muestra que hay un aumento significativo de la unión del miRNA-182 maduro a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* WT en las células transfectadas con el pri-miRNA-182-C con respecto a las células transfectadas con el vector vacío, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,01$). No se observaron diferencias significativas en la unión del miRNA-182 maduro a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* WT en las células transfectadas con el pri-miRNA-182-T respecto de aquellas transfectadas con el vector vacío (Figura 11A). En consecuencia, estos resultados indican que el alelo C del rs4541843:C>T es el alelo de riesgo, considerando que existe mayor unión del miRNA-182 maduro a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* como consecuencia de la presencia del SNP rs4541843-C en el pri-miRNA-182.

Para corroborar la especificidad de la unión entre el miRNA-182 y la región 3'UTR-*BRCA1* en presencia del rs4541843:C>T, se midió el porcentaje de actividad de luciferasa cuando la región 3'UTR-mRNA-*BRCA1* se encuentra

mutada en los sitios de reconocimiento del miRNA-182. Los resultados indican que no hay una disminución significativa en el porcentaje de actividad de luciferasa, en las dos condiciones estudiadas (alelo T y alelo C) (Figura 11B). Estos resultados indican que el miRNA-182 maduro se une específicamente a la región 3'UTR del mRNA *BRCA1*.

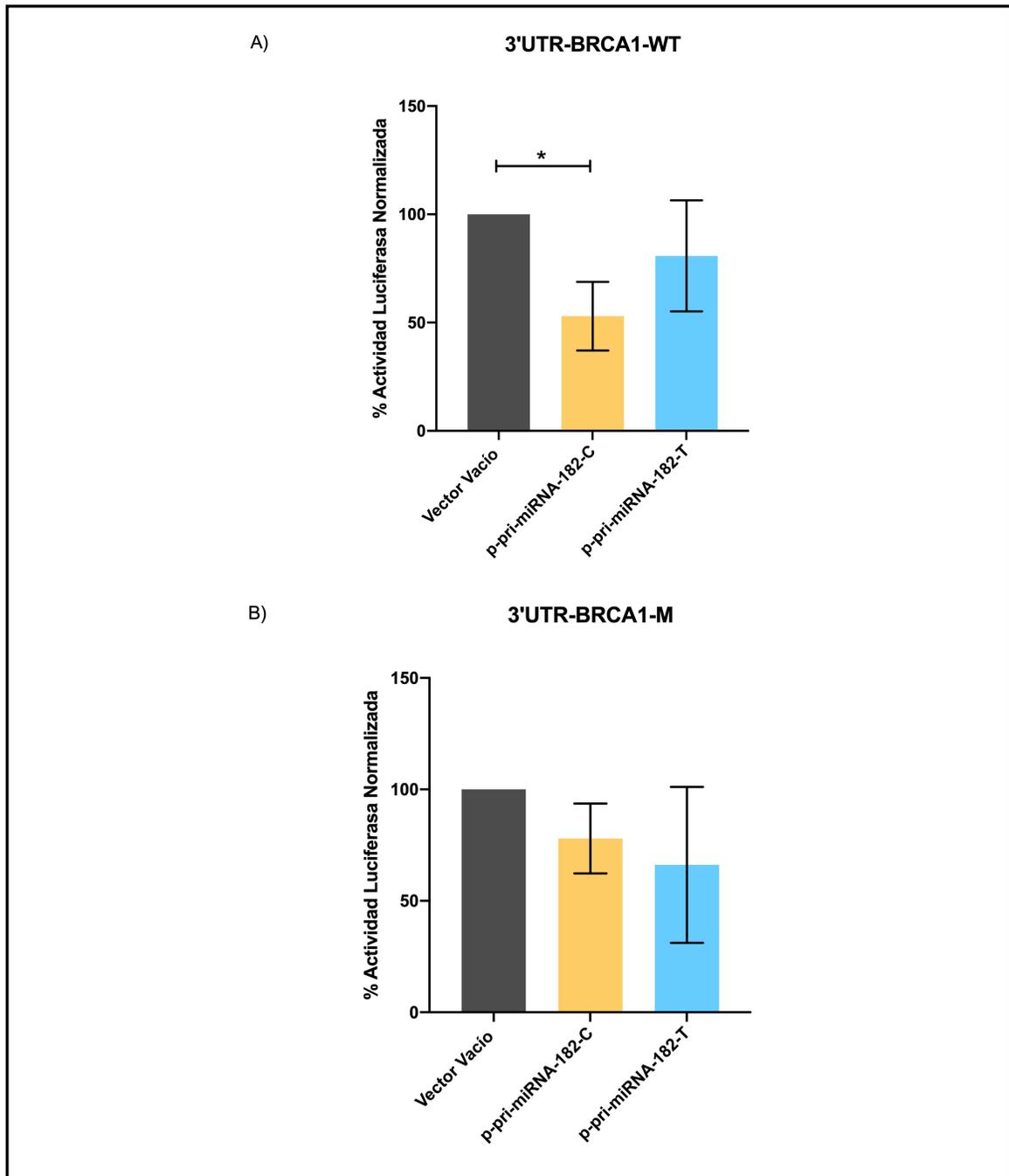


Figura 11. Efecto del rs4541843:C>T en la unión a la región 3'UTR-mRNA-BRCA1. Se calculó el porcentaje de actividad de luciferasa normalizada en presencia del pri-miRNA-182 rs4541843-T y pri-miRNA-182 rs4541843-C para la región 3'UTR-mRNA-BRCA1 WT y M. Los datos corresponden al porcentaje de actividad de luciferasa normalizada obtenida de 4 ensayos independientes (*p<0,05).

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Expresión del miRNA-182 maduro

En la actualidad encontramos un gran número de estudios que relacionan la desregulación positiva de los niveles de los miRNAs con el desarrollo de cáncer, siendo una de las causas de la desregulación la presencia de variación genética en la secuencia de los miRNAs o en sus regiones precursoras. En el presente trabajo de tesis se estudió el efecto de la variante genética rs4541843:C>T sobre la expresión del miRNA-182 maduro y su efecto sobre la unión al mRNA de *BRCA1*.

Si se analiza la frecuencia alélica del SNP rs4541843:C>T en la población a nivel mundial, esta nos señala que el alelo de mayor frecuencia correspondería al alelo C (Figura 12). Sin embargo, hasta el momento existen muy pocas publicaciones en que se asocie la frecuencia alélica del SNP rs4541843:C>T con la predisposición a desarrollar alguna enfermedad. Los resultados del estudio de asociación del SNP rs4541843:C>T, realizado por Morales et al. (2018) en población chilena de mujeres con CM familiar indican que, el alelo que se encuentra en mayor frecuencia, en el grupo de familias con dos o más casos de CM u ovario, corresponde al alelo T en comparación con los controles. Estos resultados sugieren que dicho alelo se asocia con el desarrollo del CM. Por lo anterior, para validar los resultados de los estudios de asociación con el desarrollo de una enfermedad se hacen necesarios estudios funcionales.

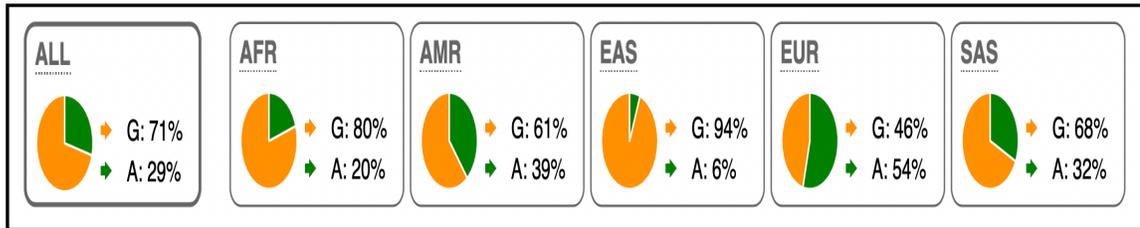


Figura 12. Frecuencias alélicas del SNP rs4541843:C>T en diferentes poblaciones. Gráficos de las frecuencias alélicas en distintas poblaciones: AFR = Población africana; AMR = Población americana; EAS= Población del este de Asia ; EUR = Población europea; SAS: Población del sur de Asia (Rs4541843 (SNP) – Population Genetics – Homo_sapiens – Ensembl Genome Browser 104, n.d.).

VI.1.a. Líneas celulares utilizadas en el estudio de expresión del miRNA-182 en presencia del SNP rs4541843:C>T

Entre las líneas celulares ampliamente utilizadas en estudios de CM se encuentran las células MCF-7, T47D y MDA-MB-231 (Dai et al., 2017). En este trabajo de tesis se utilizaron las células MCF-7 y MDA-MB-231, que representan a dos subtipos de CM. Las MCF-7 corresponden al subtipo luminal A, mientras que las MDA-MB-231 al subtipo CMTN, siendo la primera el subtipo de CM más frecuente en mujeres. En cambio, la línea celular CMTN representa a un tipo celular tumoral más agresivo y para el cual no existen blancos terapéuticos para su tratamiento. Debido a lo anterior, al utilizar estas dos líneas celulares de CM se puede estudiar el comportamiento del miRNA-182 en dos subtipos diferentes de CM.

En esta tesis se evaluó el efecto del SNP sobre la expresión tanto de la hebra 5p (hebra guía) como de la hebra 3p (hebra pasajera) del miRNA-182 maduro. Si

bien la biogénesis de los miRNAs nos indica que la hebra guía ejerce la función regulatoria, mientras que la hebra pasajera es degradada, se decidió evaluar ambas hebras del miRNA debido a que estudios recientes señalan que la hebra 3p también podría estar involucrada en la patogénesis del cáncer (Sugawara et al., 2018; Mitra et al., 2020).

VI.1.b. Aumento de miRNA-182-3p en presencia del SNP rs4541843:C>T

Los resultados obtenidos en los ensayos de expresión del miRNA-182 maduro señalan que en las líneas celulares de CM estudiadas (MCF-7 y MDA-MB-231), se observa la presencia de ambas hebras 5p y 3p en presencia del pri-miRNA-182-T y de la variante pri-miRNA-182-C (Figura 10). Al analizar los niveles en presencia del SNP rs4541843:C>T, los resultados indican que hay un aumento, tanto de la hebra 3p como 5p, en presencia de la variante pri-miRNA-182-C en ambas líneas celulares, por lo que estos resultados sugerirían que la presencia del SNP rs4541843:C>T favorece una mayor expresión o menor degradación del miRNA-182 maduro. Sin embargo, con la metodología utilizada, no es posible discriminar entre estas posibilidades, por lo que se propone realizar un ensayo de co-inmunoprecipitación utilizando las proteínas Ago con la finalidad de observar por medio de Northern blot los niveles de la hebra 3p y 5p en presencia del SNP rs4541843:C>T. Relacionando los niveles del miRNA maduro, con una mayor afinidad a las proteínas Ago y por tanto al ser más afín al complejo se podría asociar de manera indirecta con la degradación de la otra hebra.

En las células MCF-7 los resultados mostraron bajos niveles de la hebra 5p en ambas variantes (células transfectadas con el pri-miRNA-182-C y células transfectadas con el pri-miRNA-182-T). En cambio, se observa una mayor cantidad estadísticamente significativa de la hebra 3p al transfectar la línea celular con el pri-miRNA-182-C. El mismo resultado se observa al analizar la línea celular MDA-MB-231, donde se obtuvo un evidente aumento de los niveles, tanto de la hebra 3p como 5p, al transfectar con el pri-miRNA-182-C, siendo la mayor cantidad de la hebra pasajera estadísticamente significativa en comparación con las células transfectadas con el pri-miRNA-182 portador del alelo T. Estos resultados nos permitirían plantear que la hebra 3p (hebra pasajera) tendría una importancia funcional en el desarrollo del CM.

La hebra pasajera se ha estudiado en otros tipos de cáncer. Un ejemplo es el estudio en la progresión de cáncer colorrectal (CCR) realizado por Hou et al. (2018) quienes investigaron el rol del miRNA-21-3p. El grupo de Hou y cols, observaron niveles elevados del miRNA-21-3p en la línea celular de CCR humana HCT116 en comparación con otras líneas celulares de CCR. Los mismos autores determinaron que el miRNA-21-3p cumple un rol importante en la proliferación, apoptosis e invasión de las células del CCR, dado que al utilizar inhibidores de miRNA-21-3p (anti-miR-21-3p) disminuyó la proliferación e invasión, mientras que la apoptosis aumentó notablemente (Hou et al., 2018).

En este mismo contexto, el grupo de Guan demostró que el miRNA-423-3p desempeña un rol oncogénico en el cáncer de laringe. Los autores mostraron que

los niveles de este miRNA se encuentran aumentados en la línea celular humana de carcinoma de laringe Hep-2 comparado con células hipofaríngeas humanas normales (NHP), y que el miRNA-423-3p tiene como blanco a AdipoR2, el receptor de adiponectina cuya función es inhibir la proliferación y la angiogénesis. Estos resultados indicarían que el miRNA-423-3p cumple un rol oncogénico al inhibir la expresión de AdipoR2, promoviendo la proliferación, invasión y migración de células en el cáncer de laringe (Guan et al., 2014).

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de expresión, junto con los antecedentes presentados anteriormente, se podría sugerir que, en células de CM, la mayor abundancia del miRNA-182 maduro sería consecuencia de la presencia del SNP rs4541843:C>T. Este SNP se ubica en el pri-miRNA, por lo que la presencia del alelo C podría favorecer el procesamiento y de esta forma desencadenar en un aumento del miRNA-182 maduro.

Por otra parte, los resultados indican que la hebra 3p del miRNA-182 está presente en mayor abundancia en comparación a la hebra 5p en ambas líneas celulares de CM. Esto sugiere que la estructura del miRNA-182-3p podría ser más estable debido a algún cambio en la estructura por la presencia del SNP, lo que podría alterar tanto el procesamiento del pri-miRNA como del pre-miRNA y posteriormente del miRNA maduro que desencadenaría que la hebra 3p sea más estable que la hebra 5p. Otra alternativa que se podría plantear es, que la modificación de su estructura podría ser causa de una mayor afinidad de la hebra 3p con las proteínas argonautas, quedando de esta forma la hebra 5p expuesta

a la acción de las RNasas, sugiriendo que la hebra 5p del miRNA-182 se estaría degradando en mayor grado. De acuerdo a lo anterior, se podría plantear que la hebra 3p sería la responsable del rol oncogénico de este miRNA, cumpliendo un papel importante en la regulación de *BRCA1*. El miRNA-182-3p aumenta en presencia del polimorfismo rs4541843-C, en ambas líneas celulares de CM estudiadas. Esta mayor abundancia en presencia del alelo C del rs4541843:C>T, sugeriría que el alelo C correspondería al alelo de riesgo para CM.

De acuerdo a lo anterior, los resultados del ensayo de expresión en presencia del rs4541843:C>T nos permitirían plantear que tanto en el subtipo luminal A como en las células CMTN, la presencia de la variante va a desencadenar en un aumento del miRNA-182 maduro, específicamente de la hebra 3p, sugiriendo de esta forma la importancia funcional de esta hebra pasajera en el desarrollo del CM y proponiendo al alelo C como el alelo de riesgo para el desarrollo de CM.

VI. 2. Incremento en la unión del miRNA-182 a la región 3'UTR de *BRCA1*

Para evaluar el efecto del SNP rs4541843:C>T en la unión a la región 3'UTR de *BRCA1*, se trabajó con la línea celular HeLa por su alta eficiencia de transfección debido a que el modelo experimental contempló la transfección de 3 vectores.

Del análisis del ensayo para la condición con la región 3'UTR de *BRCA1* WT, se obtuvo una disminución estadísticamente significativa, de aproximadamente un 60%, en el porcentaje de la actividad de luciferasa cuando las células fueron transfectadas con el pri-miRNA-182-C en comparación con el vector vacío. En

cambio, en presencia del alelo T, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de actividad de luciferasa al comparar con el vector vacío. Para corroborar la especificidad de unión entre el miRNA-182 SNP rs4541843:C>T a la región 3'UTR de *BRCA1*, las células HeLa se transfectaron con la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* mutada para los sitios de unión del miRNA-182. Los resultados evidencian que no hay cambios significativos en la actividad de luciferasa en ambas variantes (pri-miRNA-182-C y pri-miRNA-182-T).

De esta forma, los resultados obtenidos por el ensayo de luciferasa permitirían proponer que el miRNA-182 variante rs4541843: C>T se uniría específicamente a la región 3'UTR-*BRCA1*. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por el grupo de Moskwa, quienes verificaron que el miRNA-182 tiene como blanco al mRNA del gen *BRCA1* (Moskwa et al., 2011). Los autores demostraron una reducción en el porcentaje de actividad de luciferasa en las células transfectadas con el vector reportero para *BRCA1* WT, indicando que el miRNA-182 se une a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1* WT.

Alternativamente, el estudio realizado en relación a la regulación de miRNAs sobre *BRCA1* por el grupo de Garcia, mostró la participación directa del miRNA-146a y miRNA-146b-5p en la tumorigénesis del CM (Garcia et al., 2011). El grupo de investigación determinó que los miRNA-146a y miRNA-146b-5p se encuentran en mayor cantidad en algunas líneas celulares de CM de tipo basal y en tumores mamarios triples negativos. Por otra parte, evidenciaron que ambos miRNAs tienen como blanco a la región 3'UTR de *BRCA1*, regulando negativamente la

expresión de BRCA1, llevando a una disminución de la recombinación homóloga y un aumento de la proliferación.

En consecuencia, los resultados obtenidos por este ensayo, en conjunto con los antecedentes planteados, permitirían sugerir que el miRNA-182 variante rs4541843: C>T se une específicamente a la región 3'UTR-BRCA1, siendo significativamente mayor la unión del miRNA-182 maduro en presencia del alelo C. Esto nos permitiría plantear que la presencia del alelo C del rs4541843 aumentaría la unión del miRNA a su gen blanco y por tanto resultaría en una mayor regulación de la expresión de BRCA1.

Tal como se mencionó anteriormente, aproximadamente el 16% de los casos de CM familiar se atribuyen a mutaciones en *BRCA1/2*. Sin embargo, en el 80% de los casos de CM *BRCA1/2*-negativo se desconoce la etiología molecular. Por lo tanto, el conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis nos permite sugerir que el SNP rs4541843:C>T aumentaría los niveles del miRNA-182 maduro, específicamente de la hebra 3p, favoreciendo de este modo la unión a la región 3'UTR-mRNA-*BRCA1*. Este aumento en la unión del miRNA-182-3p a la región 3'UTR-mRNA-*BRCA1* podría tener como consecuencia la degradación del mRNA de BRCA1 o la abolición de la traducción del mRNA de BRCA1. Esto es especialmente importante en pacientes *BRCA1/2*-negativos, ya que aquellos pacientes portadores de la variante C en el pri-miRNA-182 podrían tener muy bajos niveles de proteína BRCA1 y ser, en consecuencia, equivalentes a

pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1*. Por lo tanto, la variación genética en el pri-miRNA-182 podría explicar parte del porcentaje de pacientes cuya etiología genética aún no ha sido identificada.

Limitaciones

Se presentaron varias limitantes en el desarrollo de este trabajo de tesis. Una de ellas fue no poder realizar los ensayos en la línea de epitelio de mama normal MFC-10A, debido a problemas técnicos en el manejo de la línea celular, lo que impidió contar con una suficiente cantidad de células para realizar los ensayos.

Otra de las limitantes, fue la estrategia experimental planteada para los ensayos de luciferasa. Este ensayo contempló la transfección de tres plasmidios (vectores de expresión recombinantes p-3'UTR-*BRCA1* (WT o M), vectores de expresión (pri-miRNA-182-C, pri-miRNA-182-T o vector vacío) y el vector pRL-TK (Renilla). La transfección de las células con 3 plasmidios podría provocar estrés por toxicidad de plasmidios, lo que podría afectar los resultados obtenidos. Por este motivo, para futuros ensayos se propone la utilización de un vector que contenga tanto el pri-miRNA (C o T) junto con el vector pRL-TK (Renilla) o en su defecto el vector vacío junto con el vector pRL-TK (Renilla), con el fin de evitar la muerte celular por toxicidad producto de transfección de 3 plasmidios en forma simultánea.

En relación a la limitación anterior, el vector de expresión pcDNA3.3 TOPO TA no cuenta con un gen reportero para facilitar la evaluación de la eficiencia de

transfección. Por lo tanto, utilizar un vector con un gen reportero permitiera evaluar de manera más directa la eficiencia en la transfección.

VII. CONCLUSIONES

Considerando los antecedentes presentados, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos permiten concluir que:

- a) En las líneas celulares de CM luminal A (MCF-7) y triple negativo (MDA-MB-231) se evidencia mayores niveles de la hebra 3p del miRNA-182 maduro debido a la presencia del alelo C del rs4541843 en el pri-miRNA-182.
- b) Existe mayor unión del miRNA-182 maduro a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1*, sugiriendo que este aumento en la unión se debe a la presencia del alelo C del rs4541843, incrementando de esta forma la regulación sobre la expresión de *BRCA1*.

De acuerdo a las conclusiones presentadas, la presencia del SNP rs4541843:C>T promovería una mayor abundancia del miRNA-182-3p maduro, sugiriendo que el alelo C podría cumplir un rol funcional importante en la tumorigénesis mamaria.

A partir de los resultados se propone el siguiente modelo: pacientes con genotipo C/C tendrían una mayor cantidad del miRNA-182 maduro, producto de la presencia del SNP rs4541843: C>T, incrementando la hebra 3p. Esto resultaría en una mayor disponibilidad del miRNA-182 maduro, aumentando la unión a la región 3'UTR del mRNA de *BRCA1*. Esto redundaría en una disminución de los niveles de la proteína BRCA1, favoreciendo de este modo el desarrollo del CM. Lo anterior es de gran relevancia para pacientes *BRCA1/2*-negativos, ya que se propone que la variación genética en el pri-miRNA-182 podría explicar parte del porcentaje de pacientes cuya etiología genética aún no ha sido identificada.

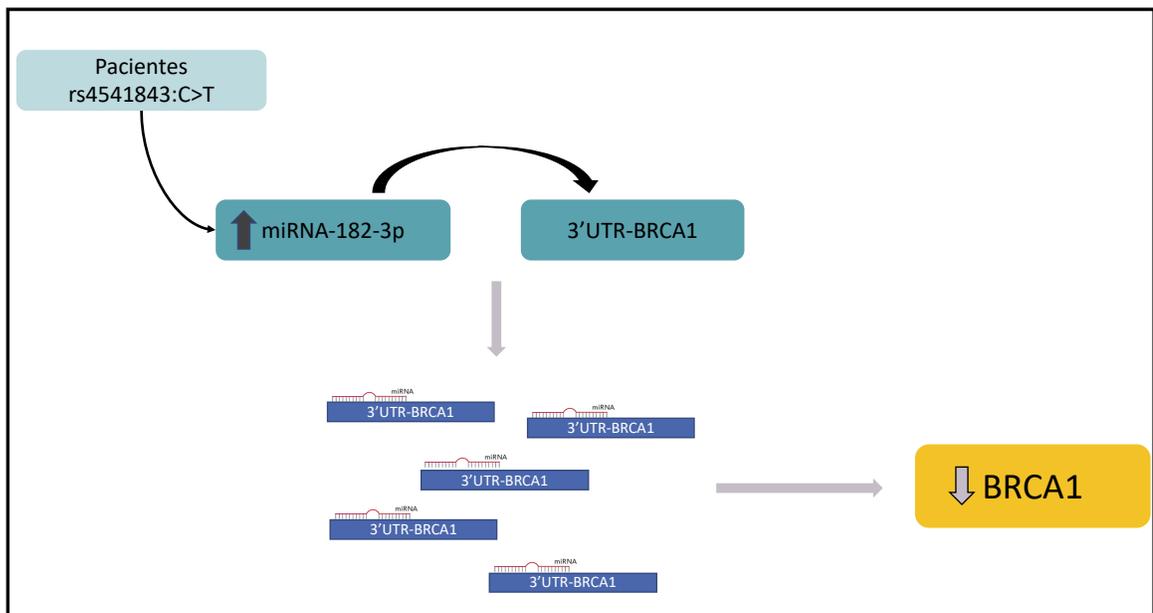


Figura 13. Modelo de la regulación de la expresión de BRCA1

Esquema del modelo propuesto a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. Se observa que en presencia del rs4541843: C>T aumentan los niveles del miRNA-182 maduro, regulando en mayor medida la expresión de BRCA1

VIII. PROYECCIONES

A modo de proyección del presente trabajo, se propone evaluar la expresión del miRNA-182 maduro en la línea de epitelio de mama normal MCF-10A. Adicionalmente, para comprobar el rol regulatorio del miRNA-182 sobre la expresión de BRCA1, se propone medir los niveles del mRNA de BRCA1 por qPCR y los niveles proteicos de BRCA1 por Western blot en presencia del SNP rs4541843: C>T en la línea celular de mama normal y en las distintas líneas de cáncer de mama.

Para complementar los resultados, y con el objetivo de establecer la importancia del SNP rs4541843:C>T en la biogénesis del miRNA-182, resultaría interesante evaluar cómo la presencia del SNP rs4541843:C>T afecta la maduración del miRNA-182. Es de particular interés evaluar las etapas del procesamiento en que participan Drosha y DGCR8, debido a que el procesamiento de pri-miRNA corresponde al paso inicial y crítico de la biogénesis de los miRNA.

Finalmente, considerando el rol oncogénico del miRNA-182, resultará interesante evaluar al miRNA-182-3p como posible diana terapéutica. Para ello se propone la utilización de inhibidores de miRNA-182-3p con la finalidad de evaluar el efecto de la inhibición del miRNA-182-3p en la progresión del CM. Complementario a lo anterior, se propone estudiar a la variante rs4541843:C>T como posible biomarcador para el diagnóstico temprano de pacientes con CM.

ANEXO 1



UNIVERSIDAD DE CHILE

"Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Investigadores

Lilian Jara Sosa	Universidad de Chile	Tel.: 9786458
José Miguel Reyes Vidal	CONAC	Tel.: 7375520
Patricio González Hormazábal	Universidad de Chile	Tel.: 9786166

Declaración de los investigadores

Conducimos una investigación de genes que serían responsables de susceptibilidad a cáncer de mama y cáncer de ovario en algunas familias. Por este motivo, nos hemos contactado con Ud. para solicitar su participación en calidad de paciente con cáncer de mama. Para ayudarlo a decidir si desea participar en este estudio, nos gustaría explicarle los riesgos y beneficios, lo que constituye una decisión informada.

Propósitos y beneficios

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. Hemos visto genes alterados en familias con cáncer, pero todavía no está totalmente claro cómo utilizar la información para prevenir el cáncer. Los resultados de este estudio suministrarán información sobre la genética del cáncer de mama que podría llevar a una mejor comprensión de sus causas y a la posibilidad de un 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. Si se ha determinado que usted ha heredado un gen alterado, se le contactará y se le preguntará si desea conocer el resultado del examen y se responderán todas las preguntas que usted realice. La información obtenida será remitida a su médico tratante para que se considere con fines terapéuticos.

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.

Riesgo, Stress o Incomodidad

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. Alguno de los investigadores conversarán con usted para aclarar sus problemas, si existen.

Otras informaciones

Privacidad: 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. Es necesario plantear que este estudio puede continuar en forma indefinida y por lo tanto, la utilización de los datos también será indefinida.

Financiamiento: La participación en este estudio no tiene ningún costo para Ud.

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.

Utilización de la muestra de sangre: Las muestras obtenidas serán utilizadas sólo para los fines de la investigación propuesta. Las muestras se mantendrán en el laboratorio por tiempo indefinido.

Otras informaciones: Si el examen resultara positivo, se le podrían también realizar a los familiares que lo soliciten. Si algún familiar sano resultare portador de un factor genético de pronóstico, la información le será comunicada y se informará al médico tratante del probando a objeto que éste explique al portador sano las posibles medidas terapéuticas necesarias.

Nombre y Firma del Investigador

Fecha

Declaración del participante: El estudio descrito anteriormente me ha sido explicado, lo he leído y comprendido. Consiento voluntariamente en participar en esta actividad. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Me queda claro que cualquier pregunta que desee hacer a futuro acerca de la investigación me será respondida por los investigadores.

Nombre y Firma del Participante

Fecha

Con copia a: - Participante
- Investigadores



UNIVERSIDAD DE CHILE

"Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA GRUPO CONTROL SANO

Investigadores

Lilian Jara Sosa	Universidad de Chile	Tel.: 9786458
José Miguel Reyes Vidal	CONAC	Tel.: 7375520
Patricio González Hormazábal	Universidad de Chile	Tel.: 9786166

Declaración de los investigadores

Conducimos una investigación de genes que serían responsables de susceptibilidad a cáncer de mama y cáncer de ovario en algunas familias. Por este motivo, nos hemos contactado con Ud. para solicitar su participación en calidad de individuo sano. Se necesita un grupo de mujeres sin cáncer de mama para conocer la distribución de éstos genes en la población chilena. Para ayudarlo a decidir si desea participar en este estudio, nos gustaría explicarle los riesgos y beneficios, lo que constituye una decisión informada.

Propósitos y beneficios

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. Hemos visto genes alterados en familias con cáncer, pero todavía no está totalmente claro cómo utilizar la información para prevenir el cáncer. Los resultados de este estudio suministrarán información sobre la genética del cáncer de mama que podría llevar a una mejor comprensión de sus causas.

Si Ud. decide participar en este examen está en su derecho ser informado de los resultados de las pruebas realizadas. Ud. también puede decidir no conocer los resultados.

¿Desea conocer los resultados? Si No

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.

Riesgo, Stress o Incomodidad

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.

Otras informaciones

Privacidad: 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. Es necesario plantear que este estudio puede continuar en forma indefinida y por lo tanto, la utilización de los datos también será indefinida.

Financiamiento: La participación en este estudio no tiene ningún costo para Ud.

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.

Utilización de la muestra de sangre: Las muestras obtenidas serán utilizadas sólo para los fines de la investigación propuesta. Las muestras se mantendrán en el laboratorio por tiempo indefinido.

Otras informaciones: Si el examen resultara positivo, y Ud. fuese portador de algún factor genético de pronóstico, la información le será comunicada y se informará al médico tratante a objeto que éste le explique las posibles medidas terapéuticas necesarias.

Nombre y Firma del Investigador

Fecha

Declaración del participante: El estudio descrito anteriormente me ha sido explicado, lo he leído y comprendido. Consiento voluntariamente en participar en esta actividad. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Me queda claro que cualquier pregunta que desee hacer a futuro acerca de la investigación me será respondida por los investigadores.

Nombre y Firma del Participante

Fecha

Con copia a: - Participante
- Investigadores

ANEXO 2

A continuación, se presenta un ejemplo de cómo se realizaron los cálculos de las veces de cambio para los ensayos de expresión del miRNA-182. Los valores de Ct que se presentan en la Tabla 1 no corresponden a los obtenidos en los ensayos realizados en esta tesis.

Tabla 1. Valores de Ct para ejemplo de cálculo de las veces de cambio.

	Gen <i>Housekeeping</i> (U6)			Gen de interés 1			Gen de interés 2		
	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Ct 1	Ct 2	Ct 3	Ct 1	Ct 2	Ct 3
Control	17,19	17,16	17,18	30,57	30,55	30,49	34,77	34,35	33,69
Muestra 1	16,96	16,95	16,93	26,11	25,54	25,83	25,11	23,54	23,83
Muestra 2	18,05	17,95	18,00	23,64	23,74	24,1	21,64	20,74	20,9

En primer lugar, se calculó el promedio de los valores de Cts para las réplicas de cada una de las condiciones. A partir de ese resultado se procedió a la determinación del ΔC_t , de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta C_t = C_t (\text{gen de interés}) - C_t (\text{gen } \textit{Housekeeping})$$

Por ejemplo, para el control del gen de interés 1 el valor del ΔC_t correspondería a:

$$\Delta C_t \text{ control} = 30,54 - 17,18$$

$$\Delta C_t \text{ control} = 13,36$$

A continuación, se selecciona la muestra de referencia y a partir de los valores de ΔCt obtenidos anteriormente se calcula el $\Delta\Delta\text{Ct}$ de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{muestra}) - \Delta\text{Ct} (\text{muestra de referencia})$$

Ejemplo para la muestra 1 del gen de interés 1, el valor de $\Delta\Delta\text{Ct}$ correspondería:

$$\Delta\Delta\text{Ct muestra 1} = 8,88 - 13,36$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = -4,48$$

Finalmente, para el cálculo de las veces de cambio se utiliza la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Ejemplo para la muestra 1 del gen de interés 1, el valor de las veces de cambio correspondería a:

$$\text{Veces de cambio} = 2^{-(-4,48)}$$

$$\text{Veces de cambio} = 22,32$$

BIBLIOGRAFÍA

- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857–866. <https://doi.org/10.1038/nrc1997>
- Chang, S., & Sharan, S. K. (2012). BRCA1 and MicroRNAs: Emerging networks and potential therapeutic targets. *Molecules and Cells*, 34(5), 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-0118-y>
- Chhichholiya, Y., Suryan, A. K., Suman, P., Munshi, A., & Singh, S. (2021). SNPs in miRNAs and Target Sequences: Role in Cancer and Diabetes. *Frontiers in Genetics*, 12, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.793523>
- Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., & Li, J. (2017). Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>
- Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J., & Venkateshan, P. (2014). Breast cancer statistics and markers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(3), 506–511. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.137927>
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and

progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

Garcia, A. I., Buisson, M., Bertrand, P., Rimokh, R., Rouleau, E., Lopez, B. S., Lidereau, R., Mikaélian, I., & Mazoyer, S. (2011). Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Molecular Medicine*, 3(5), 279–290. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100136>

Garcia-Closas, M., & Chanock, S. (2008). Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status. *Clinical Cancer Research*, 14(24), 8000–8009. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0975>

Ginsburg, O., Ashton-Prolla, P., Cantor, A., Mariosa, D., & Brennan, P. (2021). The role of genomics in global cancer prevention. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(2), 116–128. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0428-5>

Guan, G., Zhang, D., Zheng, Y., Wen, L., Yu, D., Lu, Y., & Zhao, Y. (2014). microRNA-423-3p promotes tumor progression via modulation of AdipoR2 in laryngeal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(9), 5683–5691. www.ijcep.com/

Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>

- Hou, N., Guo, Z., Zhao, G., Jia, G., Luo, B., Shen, X., & Bai, Y. (2018). Inhibition of microRNA-21-3p suppresses proliferation as well as invasion and induces apoptosis by targeting RNA-binding protein with multiple splicing through Smad4/extra cellular signal-regulated protein kinase signalling pathway in human colorectal cancer HCT116 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45(7), 729–741. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12931>
- lorio, M. v., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65(16), 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>
- Jara, L., Ampuero, S., Santibáñez, E., Seccia, L., Rodríguez, J., Bustamante, M., Martínez, V., Catenaccio, A., Lay-Son, G., Blanco, R., & Reyes, J. M. (2006). BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American population. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 166(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2005.08.019>
- Jie, S., Ambrosone, C. B., & Hua, Z. (2009). Novel genetic variants In microRNA genes and familial breast cancer. *International Journal of Cancer*, 124(5), 1178–1182. <https://doi.org/10.1002/ijc.24008>

- Kabekkodu, S. P., Shukla, V., Varghese, V. K., d'Souza, J., Chakrabarty, S., & Satyamoorthy, K. (2018). Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biological Reviews*, 93(4), 1955–1986. <https://doi.org/10.1111/brv.12428>
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376–385. <https://doi.org/10.1038/nrm1644>
- Lei, H., & Deng, C. X. (2017). Fibroblast growth factor receptor 2 signaling in breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(9), 1163–1171. <https://doi.org/10.7150/ijbs.20792>
- Li, P., Sheng, C., Huang, L., Zhang, H., Huang, L., Cheng, Z., & Zhu, Q. (2014). MiR-183/-96/-182 cluster is up-regulated in most breast cancers and increases cell proliferation and migration. *Breast Cancer Research*, 16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0473-z>
- Liu, Z., Zhang, X. S., & Zhang, S. (2014). Breast tumor subgroups reveal diverse clinical prognostic power. *Scientific Reports*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep04002>
- Ma, Y., Liang, A.-J., Fan, Y.-P., Huang, Y.-R., Zhao, X.-M., Sun, Y., & Chen, X.-F. (2016). Dysregulation and functional roles of miR-183-96-182 cluster in cancer cell proliferation, invasion and metastasis. *Oncotarget*, 7(27), 42805–42825. www.impactjournals.com/oncotarget

- Malhotra, P., Read, G. H., & Weidhaas, J. B. (2019). Breast cancer and miR-SNPs: The importance of miR germ-line genetics. *Non-Coding RNA*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ncrna5010027>
- Mathe, A., Scott, R. J., & Avery-Kiejda, K. A. (2015). MiRNAs and other epigenetic changes as biomarkers in triple negative breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28347–28376. <https://doi.org/10.3390/ijms161226090>
- Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F., & Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular Oncology*, 4(3), 174–191. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.011>
- Minsal. (2018). Plan Nacional de Cáncer 2018 – 2028. *Documento de Consulta Pública*, 27(2018).
- Mitra, R., Adams, C. M., Jiang, W., Greenawalt, E., & Eischen, C. M. (2020). Pan-cancer analysis reveals cooperativity of both strands of microRNA that regulate tumorigenesis and patient survival. *Nature Communications*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14713-2>
- Moazzeni, H., Najafi, A., & Khani, M. (2017). 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. *Molecular and Cellular Probes*, 34, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.05.005>
- Morales, S., Gulppi, F., Gonzalez-Hormazabal, P., Fernandez-Ramires, R., Bravo, T., Reyes, J. M., Gomez, F., Waugh, E., & Jara, L. (2016). 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 Genetics*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0415-0>

Moskwa, P., Buffa, F. M., Pan, Y., Panchakshari, R., Gottipati, P., Muschel, R. J., Beech, J., Kulshrestha, R., Abdelmohsen, K., Weinstock, D. M., Gorospe, M., Harris, A. L., Helleday, T., & Chowdhury, D. (2011). MiR-182-Mediated Downregulation of BRCA1 Impacts DNA Repair and Sensitivity to PARP Inhibitors. *Molecular Cell*, 41(2), 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.005>

Narod, S. A., & Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 665–676. <https://doi.org/10.1038/nrc1431>

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

Petrovic, N., Davidovic, R., Bajic, V., Obradovic, M., & Isenovic, R. E. (2017). MicroRNA in breast cancer: The association with BRCA1/2. *Cancer Biomarkers*, 19(2), 119–128. <https://doi.org/10.3233/CBM-160319>

pMirTarget 3'-UTR Assay Vector – PS100062 | OriGene. (n.d.). Retrieved October 24, 2021, from <https://www.origene.com/catalog/vectors/3-utr-assay-vector/ps100062/pmirtarget-3-utr-assay-vector>

- rs4541843 (SNP) - Population genetics - Homo_sapiens - Ensembl genome browser* 104. (n.d.). Retrieved December 5, 2021, from https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:129769855-129770855;v=rs4541843;vdb=variation;vf=730417732
- Seitz, H. K., Pelucchi, C., Bagnardi, V., & la Vecchia, C. (2012). Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012. *Alcohol and Alcoholism*, 47(3), 204–212. <https://doi.org/10.1093/alcalc/ags011>
- Shu, J., Resende E Silva, B. V., Gao, T., Xu, Z., & Cui, J. (2017). Dynamic and modularized MicroRNA regulation and its implication in human cancers. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13470-5>
- Singletary, S. E. (2003). Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Annals of Surgery*, 237(4), 474–482. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87>
- Song, C., Zhang, L., Wang, J., Huang, Z., Li, X., Wu, M., Li, S., Tang, H., & Xie, X. (2016). High expression of microRNA-183/182/96 cluster as a prognostic biomarker for breast cancer. *Scientific Reports*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep24502>
- Steven S. Coughlin. (2019). *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance* (A. Ahmad, Ed.; Second Edition, Vol. 1152). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6>

- Stratton, M. R., & Rahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature Genetics*, 40(1), 17–22. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.53>
- Stuckey, A., & Rojas, K. (2016). Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 651–672. www.clinicalobgyn.com
- Sugawara, S., Yamada, Y., Arai, T., Okato, A., Idichi, T., Kato, M., Koshizuka, K., Ichikawa, T., & Seki, N. (2018). Dual strands of the miR-223 duplex (miR-223-5p and miR-223-3p) inhibit cancer cell aggressiveness: Targeted genes are involved in bladder cancer pathogenesis. *Journal of Human Genetics*, 63(5), 657–668. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0437-8>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 5–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
- Wei, Q., Lei, R., & Hu, G. (2015). Roles of miR-182 in sensory organ development and cancer. *Thoracic Cancer*, 6(1), 2–9. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12164>

- Wendt, C., & Margolin, S. (2019). Identifying breast cancer susceptibility genes— a review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta Oncologica*, 58(2), 135–146. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1529428>
- Xu, P., Wu, Q., Yu, J., Rao, Y., Kou, Z., Fang, G., Shi, X., Liu, W., & Han, H. (2020). A Systematic Way to Infer the Regulation Relations of miRNAs on Target Genes and Critical miRNAs in Cancers. *Frontiers in Genetics*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00278>
- Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. In *World Journal of Clinical Oncology* (Vol. 5, Issue 3, pp. 412–424). Baishideng Publishing Group Co., Limited. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>
- Zavala, V. A., Serrano-Gomez, S. J., Dutil, J., & Fejerman, L. (2019). Genetic epidemiology of breast cancer in Latin America. *Genes*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/genes10020153>