



Variantes genéticas en miRNAs y su asociación con el cáncer de mama

RESUMEN

Antecedentes: en México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. A nivel molecular, los RNAs no codificantes y, en particular, los microRNAs, han tomado un papel importante en el origen y crecimiento de esta neoplasia. En población anglosajona se han reportado diversas variantes genéticas en los genes que codifican los microRNAs y en sus blancos, que se asocian con esta enfermedad. En la población mexicana se desconoce la existencia de estas u otras variantes; por eso su identificación en nuestra población es decisiva para comprender mejor la patogénesis del cáncer y contribuir a establecer una mejor estrategia diagnóstica.

Objetivo: buscar y analizar variantes genéticas de tipo SNPs en cinco genes que codifican microRNAs y en tres sitios blancos de estos relacionados con predisposición al cáncer de mama, de mujeres mexicanas con o sin esta neoplasia.

Material y métodos: estudio retrospectivo y longitudinal en el que se aisló ADN de tumores mamarios, tejido adyacente al tumor y sangre periférica de mujeres mexicanas con o sin cáncer. A partir del ADN se amplificaron y secuenciaron cinco genes de microRNAs y tres sitios blanco de estos en los que se han reportado variantes genéticas asociadas con el cáncer de mama en población anglosajona.

Resultados: en las muestras estudiadas se identificaron siete polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Dos son variantes no descritas que se encontraron sólo en mujeres con cáncer.

Conclusión: las nuevas variantes identificadas pueden ser factores de predisposición genética para cáncer de mama en nuestra población. Para conocer cuál es la participación de estas variantes en el desarrollo, establecimiento y progresión del cáncer de mama se necesita experimentar más.

Palabras clave: cáncer de mama, microRNA, SNP, predisposición genética.

Susana Méndez-Gómez¹
Ruth Ruiz Esparza-Garrido¹
Miguel Velázquez-Flores¹
Maria Dolores-Vergara²
Fabio Salamanca-Gómez³
Diego Julio Arenas-Aranda¹

¹ Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF.

² Hospital de la Mujer, Secretaría de Salud, México DF.

³ Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF.

Genetic variants in miRNAs and its association with breast cancer

ABSTRACT

Background: In Mexico, breast cancer represents the first cause of cancer death in females. At the molecular level, non-coding RNAs and especially microRNAs have played an important role in the origin and development of this neoplasm.

Recibido: 4 de noviembre, 2013

Aceptado: 9 de mayo, 2014

Correspondencia:

Dr. Diego J. Arenas Aranda
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana
Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, segundo piso
Centro Médico Nacional Siglo XXI.
Av. Cuauhtémoc 330
06720 México DF.
Tel: 01 (55) 56276945
arenasdi@gmail.com

In the Anglo-Saxon population, diverse genetic variants in microRNA genes and in their targets are associated with the development of this disease. In the Mexican population it is not known if these or other variants exist. Identification of these or new variants in our population is fundamental in order to have a better understanding of cancer development and to help establish a better diagnostic strategy.

Methods: DNA was isolated from mammary tumors, adjacent tissue and peripheral blood of Mexican females with or without cancer. From DNA, five microRNA genes and three of their targets were amplified and sequenced. Genetic variants associated with breast cancer in an Anglo-Saxon population have been previously identified in these sequences.

Results: In the samples studied we identified seven single nucleotide polymorphisms (SNPs). Two had not been previously described and were identified only in women with cancer.

Conclusion: The new variants may be genetic predisposition factors for the development of breast cancer in our population. Further experiments are needed to determine the involvement of these variants in the development, establishment and progression of breast cancer.

Key words: Breast cancer, microRNA, SNP, genetic predisposition.

ANTECEDENTES

El cáncer es una enfermedad genética que se caracteriza por su alta proliferación celular, pérdida de diferenciación en las células afectadas (anaplasia), invasión al tejido adyacente y a distancia a otros órganos o tejidos (metástasis), que genera nuevos focos tumorales que ocasionan la muerte del paciente.¹

La incidencia de las enfermedades oncológicas se ha incrementado en todo el mundo de manera muy importante y el cáncer de mama no es la excepción. Se reporta un millón de casos nuevos por año y, en México, a partir del 2006 es la principal causa de muerte en mujeres con cáncer.^{2,3}

En esta neoplasia el tumor más frecuente es el adenocarcinoma, que aparece en las células de los conductos mamarios. Con base en el tamaño del tumor, el número de ganglios afectados y

la metástasis, los tumores se clasifican en cuatro estadios (clasificación TNM);³ el estadio 4 es el de peor pronóstico. Desde el punto de vista molecular el cáncer de mama es heterogéneo, lo que complica su tratamiento; sin embargo, gracias a estudios recientes de genómica funcional han podido identificarse cuatro fenotipos moleculares, lo que permite dirigir la estrategia terapéutica y disminuir la alta mortalidad de este padecimiento.⁴

La identificación de gran número de secuencias de RNAs no codificantes (ncRNAs) en células humanas está transformando la visión de la regulación genética en el estado normal y patológico. Los microRNAs (miRNAs), un tipo de estas secuencias, se asocian con los extremos 3' de sus mRNAs blancos que en la mayoría de los casos ocasionan su inhibición traduccional. Los cambios en sus niveles de expresión se asocian con diversas neoplasias, incluida la mamaria.⁵⁻⁷



Hace poco se propuso que la coexistencia de SNPs en genes de microRNAs en la maquinaria de su procesamiento y en sitios blancos podría implicar un riesgo de cáncer, afectar la eficacia del tratamiento y el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.⁸

La identificación de marcadores de susceptibilidad, como lo SNPs, permitirá evaluar el riesgo de cáncer. La caracterización de las interacciones entre los factores de susceptibilidad genética que predisponen al cáncer en un individuo y los factores ambientales a los que está sometido (estilo de vida, nutrición, higiene, exposición a mutágenos, etc.) favorecerá la prevención de la enfermedad y disminución de la mortalidad asociada con el padecimiento.

En este trabajo se buscaron y analizaron variantes genéticas de tipo SNPs en cinco genes que codifican microRNAs y en tres sitios blanco de microRNAs relacionados con predisposición al cáncer de mama de mujeres mexicanas con o sin esta neoplasia.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo y longitudinal. Se obtuvo sangre periférica de 30 mujeres mayores de 50 años sin cáncer mamario (grupo control) y sangre periférica o tumor mamario, o ambos, de 30 mujeres en estadios 2 o 3, vírgenes al tratamiento y sin antecedentes familiares de cáncer. Uno de los criterios de inclusión fue que sus padres y abuelos hubieran nacido en México y que las muestras se obtuvieran de pacientes atendidas en el Hospital de la Mujer (Secretaría de Salud); todas las participantes autorizaron el uso de sus muestras mediante una carta de consentimiento informado.

A partir de la pastilla de linfocitos, aislada de sangre periférica y de la lisis celular de los tejidos tumorales, obtenida mediante tratamiento con proteinasa K, se obtuvo el ADN genómico

mediante el método de sales.⁹ La calidad y concentración del ADN obtenido se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa⁹ y por espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Se amplificaron mediante PCR 5 microRNAs diferentes (para el microRNA-196 se amplificaron 2 regiones, la del pre-microRNA-196a-2 y la del microRNA maduro 196a) y 3 blancos de éstos. El criterio para seleccionar estos microRNAs y sus blancos fueron las variantes genéticas asociadas con cáncer de mama en población anglosajona. Las secuencias de microRNAs y sus blancos se obtuvieron de las bases de datos miRBase¹⁰ y Ensembl;¹¹ en el Cuadro 1 se describen, junto con los 9 pares de oligonuclótidos necesarios para su amplificación y diseñados con el programa Primer3.¹²

Se estableció un solo programa de amplificación y solo se modificó en las temperaturas de alineamiento (tm) de cada amplicón. Las condiciones fueron: desnaturalización inicial a 95°C, 10 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C, 1 minuto, alineamiento entre 58-68°C y extensión a 72°C, 10 minutos. Los productos de amplificación de cada muestra se separaron por electroforesis en geles de agarosa⁹ y se purificaron con columnas (Wizard SV Gel and PCR clean-up system, Promega Corporation, USA). Los productos purificados se ampliaron en ambos sentidos con el sistema Big Dye (Applied Biosystems, USA) y volvieron a purificarse con columnas Centri-Sep (Applied Biosystems, USA) y secuenciaron en el sistema de secuenciación automática AB3130; se utilizó el paquete Sequencing Analysis v5.3 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias reportadas en al menos dos bases de datos públicas (Ensembl¹¹ y NCBI¹³). Las regiones en donde se identificaron las variantes genéticas se secuenciaron de nuevo en ambos sentidos. El efecto de las variantes encontradas en la estructura del microRNA o en sus blancos se evaluó mediante el programa mFold.¹⁴

Cuadro 1. Secuencia de los oligonucleótidos, región que amplifican y tamaño del producto amplificado.

Secuencia	Ubicación/Tamaño del producto amplificado (pb)
1 (F) 5' ATCACATTGCCAGGGATTTC 3' (R) 5' ACCCCTGTTCCCTGCTGAACT 3'	Bucle (loop) del pre-microRNA-27a / 331 pb.
2 (F) 5' AATGTCTCTGTGCCTATCTCCATCT 3' (R) 5' AACCTCACCTGTGACCCTG 3'	MicroRNA-125a maduro / 132 pb.
3 (F) 5' CCGATGTGTATCCTCAGCTTTG 3' (R) 5' GCCTGAGACTCTGCCTTCTG 3'	Tallo (stem) del pre-microRNA-146a / 192 pb.
4 (F) 5' ACCCAGCAACCCAAAGTCTA 3' (R) 5' ATCTGGAGGAGAAGGGAAGG 3'	Tallo (stem) del pre-microRNA-196a-2 / 110 pb.
5 (F) 5' CCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATA 3' (R) 5' GGAAAACCGACTGATGTAACCTCCG 3'	MicroRNA-196a maduro / 149 pb.
6 (F) 5' GATGTTAACTCCTCTCCACGTGATC 3' (R) 5' CAAAGTCTTCACCTCATTCCCTGCCA 3'	MicroRNA-M499 maduro / 146 pb.
7 (F) 5' GTGGGCAGAGCAAAAGACAT 3' (R) 5' CGGTTTCTCCGTCCTACAAA 3'	Sitio 3'UTR del gen <i>BMPR1B</i> / 168 pb.
8 (F) 5' CCACAGTAGACAAAATAGCACTAATCCA 3' (R) 5' TCCTTTTCAGGCATAATCTTTGCTACA 3'	Sitio 3'UTR del gen <i>ESR1</i> / 93 pb.
9 (F) 5' GGCCTCACGACGGTGCTAC 3' (R) 5' GTTCCCCAGGAGGATGCTTAC 3'	Sitio 3'UTR del gen <i>SET8</i> / 308 pb.

F= Oligonucleótido sentido, R= Oligonucleótido reverso, UTR= región que no se traduce del extremo 3', pb= pares de bases.

RESULTADOS

En las mujeres con cáncer y en el grupo control se amplificaron las 6 secuencias de microRNAs y 3 blancos. En la Figura 1 se muestra un gel de agarosa con los productos amplificados de una paciente y una mujer sin cáncer.

Una vez que todos los amplicones se purificaron, secuenciaron y analizaron se identificaron siete variantes de tipo SNP (Cuadro 2). Tres de ellas en el pre-microRNA-27a (A>G rs895819, T265A, T301A) (Figura 2). Las dos últimas no se encontraron en el grupo control y no están descritas en las bases públicas Ensembl,¹¹ NCBI,¹³ SNPdb.¹⁵

La primera nueva variante se encontró en una paciente y la segunda en tres. Estas cuatro pacientes también tenían en común la variante A>G rs895819 del pre-microRNA-27a. El resto de los SNPs identificados se encontraron en diferentes frecuencias en las pacientes y el grupo

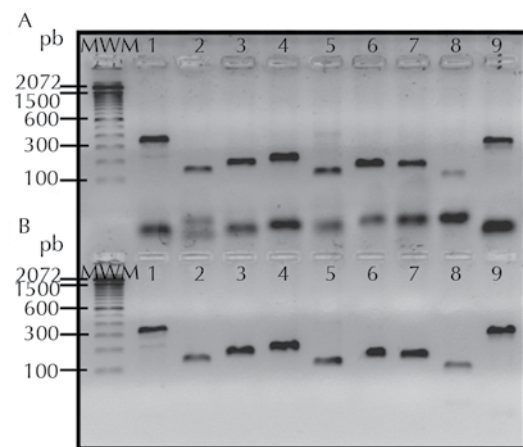


Figura 1. Amplicones de las nueve regiones estudiadas. Gel de agarosa al 1% con los amplicones de las nueve regiones estudiadas de una paciente (A) y una mujer sin cáncer de mama (B). En los carriles izquierdos de A y B se muestra el marcador de peso molecular.

control, y ya estaban descritas en población anglosajona. Es interesante comentar que los

Cuadro 2. Variantes genéticas y tipo de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) identificadas.

MicroRNA / UTR	ID	Fuente	Notas
microRNA-27a	rs895819	a, b	*
microRNA-27a	No descrito	b, c	**
microRNA-27a	No descrito	b, c	**
microRNA-146a	rs2910164	a, b	*
microRNA-196a-2	rs2833807	a, b	*
3' UTR gen <i>SET8</i>	rs16917496	a, b	*
3' UTR gen <i>SET8</i>	rs28642812	a, b	*

a= dbSNP,¹⁵ b= Ensembl,¹¹ c= NCBI.¹³ *= Variantes ya reportadas, **= Nuevas variantes.

SNPs del pre-microRNA146a y del pre-microRNA196a-2 se encontraron en altos porcentajes de homocigosis en nuestras pacientes, 71 y 100%, respectivamente.

El análisis con el programa mFold¹⁴ de las nuevas variantes genéticas encontradas en el pre-microRNA-27a permitió predecir su estructura secundaria. En la Figura 3 se describen las estructuras secundarias del pre-microRNA-27a. Como puede observarse, la variación rs895819 cambia la estructura de la molécula en el bucle (loop), lo que podría afectar la biogénesis del microRNA. Es interesante notar que las dos nuevas variantes encontradas no afectan la estructura secundaria de la molécula.

DISCUSIÓN

Las variantes genéticas, como los SNPs, tienen influencia en el procesamiento de los microRNAs y afectan la unión a su blanco. En diversos trabajos se demostró que estas variantes en la región correspondiente al pre-microRNA como a la del microRNA maduro, afectan su biogénesis, por lo que su papel en la susceptibilidad al cáncer es muy importante.¹⁶⁻¹⁸ En este trabajo identificamos siete polimorfismos de tipo SNP, cinco ya reportados y dos no descritos. Estos últimos se encontraron en el pre-microRNA-27a, sólo

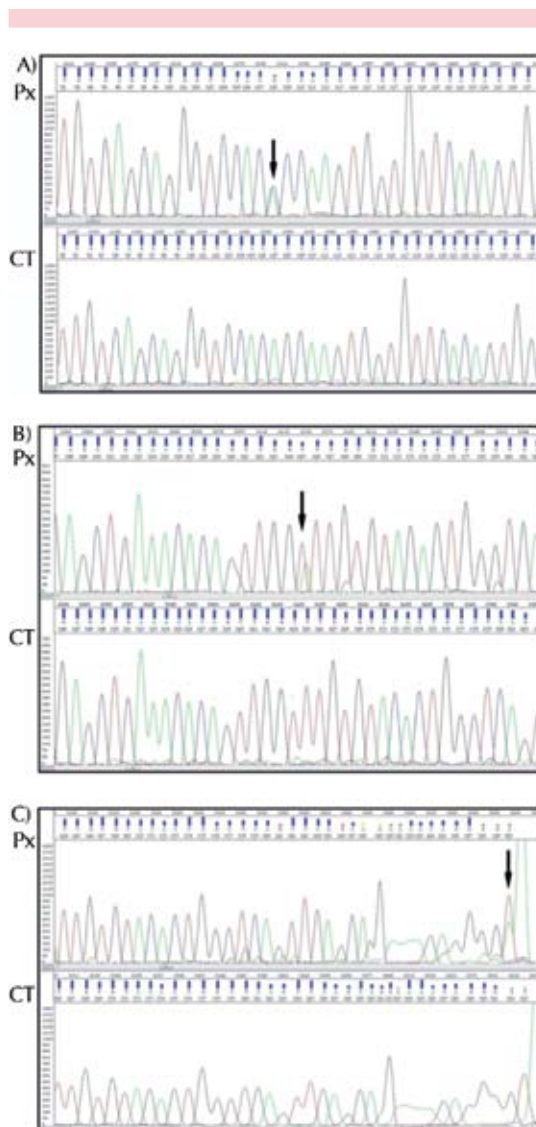


Figura 2. Electroferogramas del pre-microRNA 27a. Electroferogramas de las secuencias para el SNP A>G rs895819 (A), SNP T265A (B) y SNP T301A (C). Las flechas en cada electroferograma indican el SNP identificado.

en mujeres con cáncer de mama y que también compartían el SNP ya reportado, rs895819 que afecta la biogénesis del microRNA.¹⁶ El efecto de las dos nuevas variantes en la estructura secundaria del microRNA-27a, definido mediante el programa mFold,¹⁴ permitió concluir que ambas

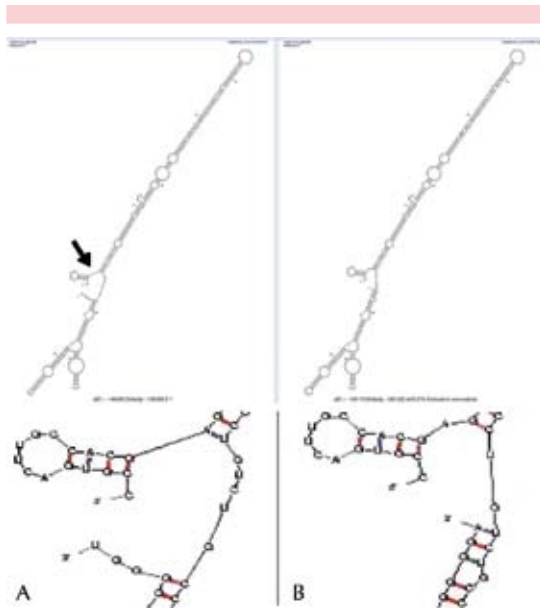


Figura 3. Estructura secundaria del pre-microRNA 27a. Estructuras secundarias del pre-microRNA 27a con las variantes A>G rs895819, A265T y T301A. En A se describe la estructura con las variantes y en B sin éstas. La flecha indica la alteración en el bucle (loop). En las partes inferiores de A y B se muestra un acercamiento del bucle.

variantes no afectan su estructura; sin embargo, no pueden descartarse otros tipos de cambio. Se ha reportado que las variaciones en la secuencia de un pre-microRNA pueden traducirse en alteraciones estructurales subsecuentes, incluso alteraciones funcionales.¹⁹ Por lo anterior es necesario realizar diversos estudios, como la cuantificación de los niveles del microRNA maduro en mujeres mexicanas, identificación de sus blancos y ensayos funcionales con genes reporteros para averiguar el efecto de estas nuevas variantes en este microRNA.

Por lo que se refiere a las otras variantes encontradas en los pre-microRNAs 196a-2 y 146a y de acuerdo con Shen y sus colaboradores¹⁹ éstas afectan el tallo (*stem*) de sus microRNAs respectivos, lo que ocasiona desde el punto de vista funcional una elevada expresión del mi-

croRNA maduro. En población anglosajona esta sobreexpresión se ha asociado con la aparición temprana de la neoplasia mamaria, quizá por afectar a los genes *BRAC1* y *BRCA2*, dos de sus posibles blancos. De los dos SNPs identificados en el UTR del gen *SET8* sólo el rs16917496 afecta la traducción del mRNA de *SET8* y se asocia con la aparición temprana del cáncer mamario en población china.²⁰

CONCLUSIÓN

Al igual que en población anglosajona, en nuestro grupo de estudio identificamos variantes genéticas previamente asociadas con la susceptibilidad al cáncer de mama. El papel de estas variantes en nuestra población necesita estudiarse en una muestra más numerosa, representativa de los diferentes grupos de mexicanos. Por lo que hace a las dos nuevas variantes identificadas se requieren más estudios para conocer cuál es su participación en el inicio, establecimiento y evolución del cáncer de mama.

Agradecimientos

Esta investigación se efectuó con el apoyo económico de la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, proyecto prioritario en salud con número de registro FIS/IMSS/PROT/PRI0/12/20. Este trabajo forma parte de la Red de cáncer de mama del IMSS. DJAA es becario de la Fundación IMSS y agradece el apoyo otorgado.

REFERENCIAS

1. Vogelstein B, Kinzler KW. The Genetic basis of human cancer. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002;821.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin M. Globocan 2008 v2.0: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Globocan (breast, Word) (consultado 2013 Sep 11). Disponible en <http://globocan.iarc.fr>
3. Cardenas S, Erazo A, Maafs E, Poitevin A. Cuarta revisión del Consenso Nacional sobre el diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Colima, México, 2011. (consultado 2013



- Sep 12). Disponible en <http://consensocancermamario.com>
4. Dawood S, Hu R, Homes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Connolly J, et al. Defining breast cancer prognosis base on molecular phenotypes: results from a large cohorte study. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126(1):185-192.
 5. Mattick JS. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* 2004;5:316-323.
 6. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(4):259-269.
 7. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol* 2010;4(3):230-241.
 8. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010;10(6):389-402.
 9. Sambrook F, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: CHL Press; 2001. p. 2344.
 10. Faculty of life Sciences. University of Manchester. miRBase: the microRNA database. United Kingdom. 2013. *Nucl Acids Res*. 2013;41(D1):D48-D55. (consultado 2013 Sep 12). Disponible en <http://www.mirbase.org>
 11. Ensembl 2013. United Kingdom. Regents of the EMBL-EBI and Wellcome Trust Sanger Institute 2013. (consultado 2013 Sep 13). Disponible en <http://www.ensembl.org>.
 12. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Rimm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15):e115.
 13. National Center for Biotechnology Information (NCBI). United States 2013. (consultado 2013 Sep 13). Disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov.
 14. mFold 3.5. New York: Regents of the RNA Institute, Collage of Arts and Sciences, State University of New York at Albany 2013. (consultado 2013 Sep 13). Disponible en <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>.
 15. Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) (dbSNP-NCBI). United States 2013. (consultado 2013 Sep 13). Disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/snp.
 16. Tchatchou S, Jung A, Hemminhi K, Sutter C, Wappenschmidt B, Bugert P, et al. A variante affecting a puntative miRNA target site in estrogeno receptor (ESR) 1 is associated with breast cancer risk in premenopausal women. *Carcinogenesis* 2009;30(1):59-64.
 17. Yang R, Schlehe B, Hemminhi K, Sutter C, Bugert P, Wappenschmidt B, et al. A genetic variante in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121(3):693-702.
 18. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzuela R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med* 2012;16(1):8-21.
 19. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A funcional polymorphism in the *miR-146a* gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008;29(10):1963-1966.
 20. Song F, Zheng H, Liu B, Wei S, Dai H, Zhang L, et al. An miR-502-Binding Site Single-Nucleotide Polymorphism in the 3'-Untranslated Region of the *SET8* Gene Is Associated with Early Age of Breast Cancer Onset. *Clin Cancer Res* 2009;15(19):6292-6300.