

## ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN NON-CODING RNA EN SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO

### *Non-Coding RNA Polymorphisms Research in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome*

Marina ROSÓN<sup>[1]</sup>; Rogelio GONZÁLEZ<sup>[2]</sup>

<sup>[2]</sup>Unidad de Medicina Molecular-IBSAL. Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca-CSIC. 37007 Salamanca, España

Facultad de Farmacia-Universidad de Salamanca

Correo-e: <sup>[1]</sup>[marinarosonf@gmail.com](mailto:marinarosonf@gmail.com); [gonzalez@usal.es](mailto:gonzalez@usal.es)

**RESUMEN:** Desde hace un tiempo se viene estudiando la relación entre polimorfismos de non-coding RNA y la posible predisposición a padecer diferentes tipos de cáncer. En este trabajo se ha estudiado la correlación entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en 5 genes (*miR-146A*, *miR-196A2*, *miR-499A* y dos SNPs de *HOTAIR*) y la predisposición a desarrollar cáncer de mama y ovario. El tamaño de la muestra estudiada fue de 99 pacientes y 133 controles. El método utilizado para el análisis del genotipo de las muestras fue la discriminación alélica por sondas Taqman (genotipado) y, posteriormente, se sometió a análisis estadístico, con el que se pudo observar que ninguno de los genotipos estudiados mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles. Con los resultados obtenidos ( $p > 0,05$  en todos los casos) se pudo concluir que la presencia de SNPs en los genes estudiados no está relacionada con la predisposición a desarrollar cáncer de mama y ovario en la población estudiada.

*Palabras clave:* cáncer; polimorfismo; ncRNA; mama; ovario.

**ABSTRACT:** The relation between the non-coding RNA polymorphisms and the possible predisposition to suffer different kinds of cancer has been studied for quite some time. This research studies the correlation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 5 genes (*miR-146A*, *miR-196A2*, *miR-499A* and two *HOTAIR* SNPs) and the predisposition to develop breast and ovary cancer. The size of the studied sample was 99 patients and 133 controls. The method used for the analysis of the samples genotype was the Taqman allelic discrimination assay and afterwards, a statistical analysis was done, which indicated that any of the studied genotypes showed significant statistical difference between the patients and the controls. With the results obtained ( $p > 0,05$  in every case) we could conclude that the presence of SNPs in the studied genes is unrelated with the predisposition to develop breast and ovary cancer in the studied population.

*Keywords:* cancer; polymorphysm; ncRNA; breast; ovary.

## 1. INTRODUCCIÓN

El RNA no codificante es una molécula de RNA que no se traduce en una proteína. La función principal de los ncRNA es la regulación de la expresión genética, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (<https://www.whatisepigenetics.com/non-coding-rna/>). Se pueden dividir en dos grupos:

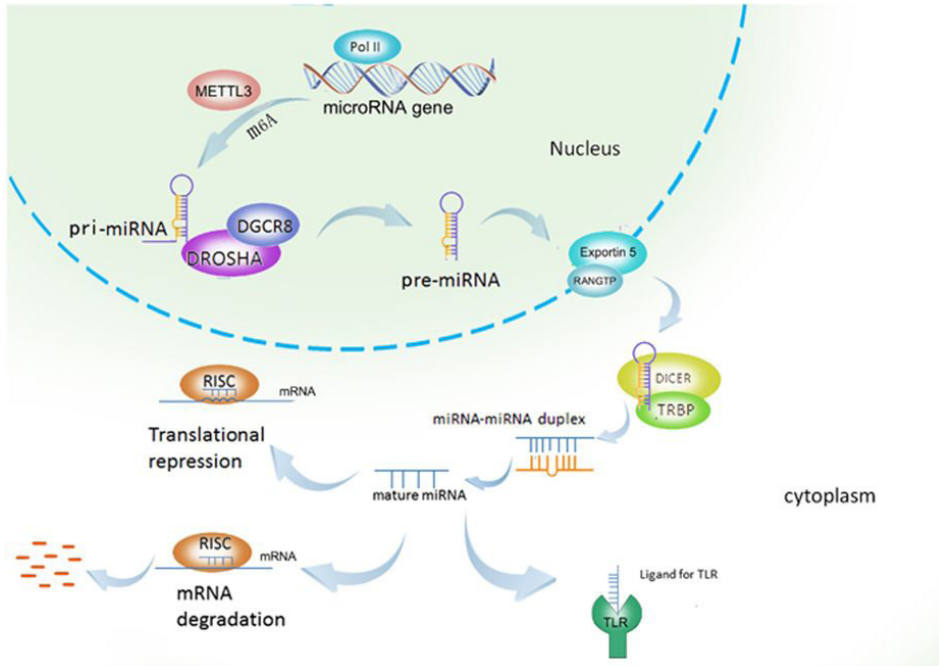
### **Short ncRNA** (ARN no codificante de cadena corta)

Tienen menos de 30 nucleótidos de longitud. Dentro de este grupo existen 3 subgrupos: los micro RNA (miRNA), los short interfering RNA (siRNA) y los piwi-interaction RNA (piRNA). Nos centramos en los miRNA, ya que son los que utilizamos en el estudio. Los miRNA se suelen unir a un RNAm diana que tenga una secuencia complementaria y favorecen la degradación de sus RNAm complementarios, inhibiendo la traducción de los mismos (Figura 1). Estos miRNAs pueden actuar como oncogenes o como supresores tumorales en el desarrollo de cáncer (<https://www.whatisepigenetics.com/non-coding-rna/>).

Los miRNAs estudiados fueron miR-146a, el cual está implicado en la regulación negativa de BRCA1 y su expresión está elevada en algunos tipos de cáncer de mama (<https://www.whatisepigenetics.com/non-coding-rna/>); miR-196a2, y miR-499.

### **Long ncRNA** (RNA no codificante de cadena larga)

FIGURA 1. Biogénesis de miRNA y su posterior degradación de mRNA y regulación de la expresión génica (Peng *et al.*, 2016)



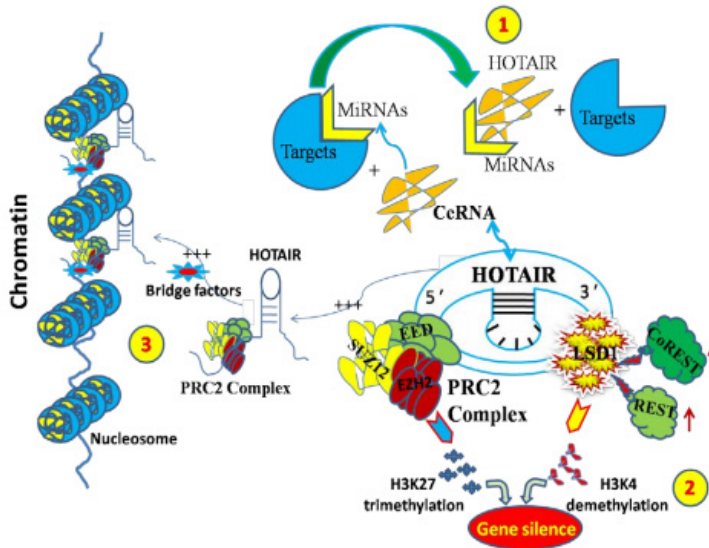
Tienen más de 200 nucleótidos de longitud. La mayoría de los ncRNA son lncRNA. Los lncRNA actúan en la remodelación de la cromatina, en la regulación transcripcional y postranscripcional, y son precursores de los siRNAs (<https://www.whatisepigenetics.com/non-coding-rna/>).

El lncRNA estudiado fue *HOTAIR*, el cual puede actuar como un oncogén, y está relacionado con la progresión de la metástasis en cáncer de mama y otros tipos de cáncer (Dai *et al.*, 2016) (Figura 21).

Ambos grupos parecen tener un papel importante en la modificación de histonas, la formación de heterocromatina, la metilación del DNA y la silenciamiento de genes<sup>1</sup>.

En este estudio se investigó la posible relación entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de estos ncRNA y el riesgo de desarrollar síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, que se trata de un trastorno que supone el aumento del riesgo de padecer estas enfermedades, así como otros tipos de cáncer, y se debe a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* (Lux *et al.*, 2006). Las personas afectadas por este síndrome tienen una mayor predisposición a desarrollar

FIGURA 2. Funciones y mecanismos de HOTAIR mediante la silenciación de genes, la modificación de la cromatina y la asociación con miRNAs en cáncer (Tang *et al.*, 2018)



especialmente cáncer de mama (tanto hombres como mujeres), generalmente a edades tempranas (antes de los 50) (<https://rarediseases.org/rare-diseases/hereditary-breast-ovarian-cancer-syndrome/>).

*BRCA1* y *BRCA2* son supresores tumorales, por lo que si se produce una mutación en alguno de ellos o en ambos, evitando que reparen el DNA dañado, el riesgo de que células malignas se multipliquen es mucho mayor y, por tanto, es mayor el riesgo de desarrollar cáncer.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la importancia de los ncRNA en la regulación de la expresión génica, la existencia de polimorfismos en estos genes podría tener un papel importante en su función, por lo que la finalidad de este estudio es determinar la posible relación entre la existencia de SNPs en los ncRNA estudiados y una mayor predisposición a desarrollar cáncer de mama y ovario en la población estudiada.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. *Población de estudio*

Se analizaron 99 casos de mujeres que padecían cáncer de mama y/u ovario y 133 controles de mujeres sanas. Estas muestras fueron obtenidas de la Unidad de Consejo Genético en Cáncer del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de la Universidad de Salamanca.

#### 3.2. *Extracción de ADN de sangre periférica*

Para obtener la muestra de ADN se aislaron las células mononucleadas mediante centrifugación, se digirieron durante 16 horas con un tampón FORTICE, EDTA, SDS y proteinasa K. Pasado este tiempo se extrajo por el método fenol-cloroformo, donde se recuperó la fase acuosa que contiene el DNA, tras lo cual se precipitó con etanol y se dejó secar para luego resuspenderlo en ddH<sub>2</sub>O, obteniendo así la muestra con la que posteriormente se trabajó.

#### 3.3. *Discriminación alélica por sondas Taqman (genotipado)*

Esta técnica consiste en una PCR en la cual la amplificación y la detección se producen al mismo tiempo en el vial.

Se utilizaron sondas específicas, las cuales son oligonucleótidos marcados por un fluorocromo donador en el extremo 5', el cual emite fluorescencia cuando es excitado, y un aceptor en el extremo 3', que absorbe la energía que libera el donador. Para ello es necesario que el donador y el aceptor estén próximos en el espacio y el espectro de emisión de la primera se solape con la segunda. Mientras la sonda esté intacta, la fluorescencia emitida por el donador va a ser absorbida por el aceptor. Cuando se produce la amplificación del ADN diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y se produce la liberación del fluorocromo donador debido a la acción de la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa. Como consecuencia la fluorescencia emitida va a ser captada por el termociclador.

La fluorescencia emitida es directamente proporcional al aumento de hibridación en cada ciclo y, por tanto, al incremento de DNA en la PCR. Este método permite identificar polimorfismos y mutaciones puntuales.

Los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM, siendo cada punto de la gráfica obtenida en la PCR la representación del genotipo de cada una de las muestras de DNA que se amplificaron, pudiendo ser homocigotos para FAM (FAM/FAM), heterocigotos (VIC/FAM) u homocigotos para VIC (VIC/VIC). FAM será el equivalente a uno de los alelos de los estudiados y VIC al otro.

SNPs estudiados:

- miR-146A: rs2910164 G>C, cromosoma 5
- miR-196A2: rs11614913 C>T, cromosoma 12
- miR-499A: rs2746444 A>G, cromosoma 20
- HOTAIR:
  - rs1899663 C>A, cromosoma 12
  - rs12826785 C>T, cromosoma 12

### 3.4. Análisis estadístico con SPSS

Se utilizó el programa estadístico SPSS para concluir si los resultados obtenidos eran estadísticamente significativos, mediante la prueba de Chi-cuadrado, obteniendo así el p valor, que indica si los resultados obtenidos son estadísticamente significativos o no, siendo significativos cuando este es menor de 0,05.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas se muestra la comparación de los genotipos de pacientes y controles, realizando luego diferentes divisiones dentro del grupo pacientes.

TABLA 1. Análisis de casos y controles, separando a las pacientes en función de su edad, de si presentaban mutaciones o no en *BRCA* y si eran o no triple negativo (no hay mutación en el receptor de progesterona, en el de estrógenos ni en ER2)

SNP	Genotipo	Controles	Pacientes	p valor
<i>miR-146A</i> rs2910164	GG	68 (58,6 %)	57 (57,6 %)	0,659
	CG	35 (30,2 %)	34 (34,3 %)	
	CC	13 (11,12 %)	8 (9,8 %)	
<i>miR-196A2</i> rs11614913	CC	35 (30,2 %)	38 (38,4 %)	0,447
	CT	64 (55,2 %)	48 (48,5 %)	
	TT	17 (14,7 %)	13 (13,1 %)	
<i>miR-499A</i> rs3746444	AA	85 (63,9 %)	68 (68,7 %)	0,607
	GA	44 (33,1 %)	27 (27,3 %)	
	GG	4 (3 %)	4 (4 %)	
<i>HOTAIR</i> rs1899663	CC	63 (50,8 %)	48 (48,5 %)	0,705
	CA	48 (38,7 %)	43 (43,4 %)	
	AA	13 (10,5 %)	8 (8,1 %)	
<i>HOTAIR</i> rs12826786	CC	50 (40,7 %)	43 (43,4 %)	0,501
	CT	54 (43,9 %)	46 (46,5 %)	
	TT	19 (15,4 %)	10 (10,1 %)	

MARINA ROSÓN; ROGELIO GONZÁLEZ  
 ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN NON-CODING RNA EN SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA  
 Y OVARIO HEREDITARIO

SNP	Genotipo	Pacientes según edad		Controles	p valor
		<40	>40		
<i>miR-146A</i> rs2910164	GG	26 (65 %)	28 (51,9 %)	68 (58,6 %)	0,435
	CG	13 (32,5 %)	20 (37 %)	35 (30,2 %)	
	CC	1 (2,5 %)	6 (11,1 %)	13 (11,2 %)	
<i>miR-196A2</i> rs11614913	CC	14 (35 %)	22 (40,7 %)	35 (30,2 %)	0,705
	CT	21 (52,5 %)	24 (44,4 %)	64 (55,2 %)	
	TT	5 (12,5 %)	8 (14,8 %)	17 (14,7 %)	
<i>miR-499A</i> rs3746444	AA	27 (67,5 %)	37 (68,5 %)	85 (63,9 %)	0,800
	GA	12 (30 %)	14 (25,9 %)	44 (33,1 %)	
	GG	1 (2,5 %)	3 (5,6 %)	4 (3 %)	
<i>HOTAIR</i> rs1899663	CC	21 (52,5 %)	24 (44,4 %)	63 (50,8 %)	0,766
	CA	17 (42,5 %)	24 (44,4 %)	48 (38,7 %)	
	AA	2 (5 %)	6 (11,1 %)	13 (10,5 %)	
<i>HOTAIR</i> rs12826786	CC	20 (50 %)	21 (38,9 %)	50 (40,7 %)	0,683
	CT	16 (40 %)	27 (50 %)	54 (43,9 %)	
	TT	4 (10 %)	6 (11,1 %)	19 (15,4 %)	

SNP	Genotipo	Pacientes BRCA		Controles	p valor
		BRCA mutado	BRCA no mutado		
<i>miR-146A</i> rs2910164	GG	33 (63,5 %)	24 (51,1 %)	68 (58,6 %)	0,435
	CG	16 (30,8 %)	18 (38,3 %)	35 (30,2 %)	
	CC	3 (5,8 %)	5 (10,6 %)	13 (11,2 %)	
<i>miR-196A2</i> rs11614913	CC	19 (36,5 %)	19 (40,4 %)	35 (30,2 %)	0,714
	CT	25 (48,1 %)	23 (48,9 %)	64 (55,2 %)	
	TT	8 (15,4 %)	5 (10,6 %)	17 (14,7 %)	
<i>miR-499A</i> rs3746444	AA	36 (69,2 %)	32 (68,1 %)	85 (63,9 %)	0,907
	GA	14 (26,9 %)	13 (27,7 %)	44 (33,1 %)	
	GG	2 (3,8 %)	2 (4,3 %)	4 (3 %)	
<i>HOTAIR</i> rs1899663	CC	27 (51,9 %)	21 (44,7 %)	63 (50,8 %)	0,874
	CA	21 (40,4 %)	22 (46,8 %)	48 (38,7 %)	
	AA	4 (7,7 %)	4 (8,5 %)	13 (10,5 %)	
<i>HOTAIR</i> rs12826786	CC	24 (46,2 %)	19 (40,4 %)	50 (40,7 %)	0,788
	CT	23 (44,2 %)	23 (48,9 %)	54 (43,9 %)	
	TT	5 (9,6 %)	5 (10,6 %)	19 (15,4 %)	

SNP	Genotipo	Pacientes TN		Controles	p valor
		no TN	TN		
<i>miR-146A</i> rs2910164	GG	24 (61,5 %)	14 (77,8 %)	65 (58,6 %)	0,619
	CG	12 (30,8 %)	3 (16,7 %)	34 (30,6 %)	
	CC	3 (7,7 %)	1 (5,6 %)	12 (10,8 %)	
<i>miR-196A2</i> rs11614913	CC	12 (30,8 %)	10 (28,8 %)	32 (32,1 %)	0,217
	CT	20 (51,3 %)	7 (56,8 %)	63 (53,6 %)	
	TT	7 (17,9 %)	1 (14,4 %)	16 (14,3 %)	
<i>miR-499A</i> rs3746444	AA	26 (66,7 %)	14 (77,8 %)	82 (64,1 %)	0,707
	GA	11 (28,2 %)	4 (22,2 %)	42 (32,8 %)	
	GG	2 (5,1 %)	0 (0 %)	4 (3,1 %)	
HOTAIR rs1899663	CC	18 (46,2 %)	10 (55,6 %)	61 (51,3 %)	0,683
	CA	18 (46,2 %)	8 (44,4 %)	47 (39,5 %)	
	AA	3 (7,7 %)	0 (0 %)	11 (9,2 %)	
HOTAIR rs12826786	CC	16 (41 %)	9 (50 %)	48 (40,7 %)	0,806
	CT	19 (48,7 %)	8 (44,4 %)	53 (44,9 %)	
	TT	4 (10,3 %)	1 (5,6 %)	17 (14,4 %)	

Como se puede observar en las tablas, ninguno de los resultados obtenidos resultó ser diferente significativamente entre las pacientes y los controles (siendo  $p > 0,05$  en todos los resultados) ya que el genotipo es prácticamente igual en ambos grupos, independientemente de la edad, si presentaban *BRCA* mutado o si eran triple negativo. Por tanto, con los resultados obtenidos no podemos demostrar que la presencia de estos SPNs en los cinco genes esté implicada en el desarrollo de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. En otras poblaciones, más concretamente la alemana y la italiana, tampoco se ha podido demostrar la relación entre la presencia de polimorfismos en *miR-146A*, *miR-196A2* y *miR-499A* y el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Catucci *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha estudiado el rol del SNP *rs12826786* en el posible desarrollo de cáncer de mama y se han obtenido resultados que sostienen esta relación. Sin embargo, la falta de concordancia entre ambos estudios puede deberse a la diferencia étnica, ya que el estudio mencionado se realizó sobre población turca y el presente estudio se realizó sobre mujeres de nacionalidad española. El número de casos estudiados fue similar (Bayram *et al.*, 2016). Un estudio sobre el SNP *rs1899663* realizado en población iraní tampoco mostró resultados significativos que relacionaran la presencia de este polimorfismo con el riesgo de cáncer de mama (Khorshidi *et al.*, 2017). Otro estudio relaciona la presencia del SNP *rs2910164* con la aparición de cáncer de mama y ovario a edades tempranas (menores de 50) al combinar los genotipos GC+CC, obteniendo resultados significativos que relacionan la presencia del alelo C con estos dos tipos de cáncer (Shen *et al.*, 2008). La diferencia



con el presente estudio podría deberse al tipo de población (la anterior es inglesa), además de que no se realizó tal combinación debido a la gran semejanza de genotipos entre controles y pacientes, ya que predominaba en ambos grupos el alelo no polimórfico.

## 7. CONCLUSIONES

este estudio pone de manifiesto que los SNPs estudiados no alteran la susceptibilidad a desarrollar síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario en la población de estudio.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Bayram S, Sümbül AT, Dadaş E. A functional HOTAIR rs12826786 C>T polymorphism is associated with breast cancer susceptibility and poor clinicopathological characteristics in a Turkish population: a hospital-based case-control study. *Tumour Biol.* 2016; 37(4):5577-84.
- Catucci I, Yang R, Verderio P, Pizzamiglio S, Heesen L, Hemminki K et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum Mutat.* 2010; 31(1): e1052-7.
- Dai ZM, Kang HF, Zhang WG, Li HB, Zhang SQ, Ma XB et al. The Associations of Single Nucleotide Polymorphisms in miR196a2, miR-499, and miR-608 With Breast Cancer Susceptibility: A STROBE-Compliant Observational Study. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(7): e2826.
- Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome - NORD (National Organization for Rare Disorders) [Internet]. NORD (National Organization for Rare Disorders). 2018 [citado 24 jun 2019]. Disponible en: <https://rarediseases.org/rare-diseases/hereditary-breast-ovarian-cancer-syndrome/>
- Jie Shen, Christine B. Ambrosone, Richard A. DiCioccio, Kunle Odunsi, Shashikant B. Lele, Hua Zhao, A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis.* 2008; 29(10): 1963–1966
- Khorshidi H R, Taheri M, Noroozi R, Soudyab M, Sayad A, et al. Investigation of the Association of HOTAIR Single Nucleotide Polymorphisms and Risk of Breast Cancer in an Iranian Population. *Int J Cancer Manag.* 2017; 10(5):e7498.
- Lux MP, Fasching PA, Beckmann MW. Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med (Berl).* 2006; 84(1):16-28.
- Non-Coding RNA | What is Epigenetics? [Internet]. What is Epigenetics? 2019 [citado 26 may 2019]. Disponible en: <https://www.whatisepigenetics.com/non-coding-rna/>
- Peng Y., Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016; 1:15004.
- Tang Q, Hann SS. HOTAIR: An Oncogenic Long Non-Coding RNA in Human Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 47(3):893-913.

