



**TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN MEDICINA
CURSO ACADÉMICO 2022/2023**

**CORRELACIONES CLÍNICO-MOLECULARES
DE TUMORES POR ALTERACIÓN DE DICER1.**

Autora:

- Daniela Santos Medina

Tutores:

- Prof. Pablo Martín Vasallo
- Dra. Natalia Pérez Rodríguez

Facultad de Ciencias de la Salud. Sección de Medicina. Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética y Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC).

1. ÍNDICE

2. RESUMEN.....	3
3. ABSTRACT.....	3
4. PALABRAS CLAVE.....	4
5. INTRODUCCIÓN.....	4
5.1 Síndrome Dicer y el cáncer	4
5.2 Tumores asociados Dicer1	5
5.2.1 Blastoma Pleuropulmonar (PPB).....	5
5.2.2 Bocio Multinodular (BMN) y Cáncer de Tiroides.....	5
5.2.3 Tumor de células de Sertoli-Leydig (SLCT).....	5
5.2.4 Nefroma quístico.....	6
5.2.5 Meduloepitelioma del cuerpo ciliar (CBME).....	6
5.2.6 Hamartoma condromesenquimatoso nasal (NCMH).....	6
5.3 Síntesis y función del miRNA.....	7
5.3.1 Estructura de Dicer.....	7
5.3.2 Regulación Drosha/Dicer.....	9
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	9
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
8. RESULTADOS.....	10
9. DISCUSIÓN.....	11
10. CONCLUSIONES.....	13
11. ¿QUÉ HE APRENDIDO REALIZANDO ESTE TFG?.....	13
12. BIBLIOGRAFÍA.....	14
13. LEYENDA DE FIGURAS.....	17
14. FIGURAS.....	18

2. RESUMEN

DICER1 codifica una endoribonucleasa RNasaIII que tiene un papel fundamental en la biogénesis de los miRNA, un tipo de RNA monocatenario que regula la expresión de proteínas y es responsable del silenciamiento génico postranscripcional. En el síndrome *DICER1*, una serie de mutaciones en este gen en células de la línea germinal heredada de forma autosómica conduce a una mayor predisposición a ciertos tipos de tumores embrionarios benignos y malignos.

Este TFG estudia los casos clínicos de dos pacientes, hermanas, tratadas en el Servicio de Oncología Médica del HUNSC por bocio multinodular no tóxico. Estudio observacional, transversal y descriptivo. Ambas presentan una nueva variante, probablemente patogénica, c.4314T>A (p. Tyr1438Ter) codificadora de una proteína truncada y responsable del síndrome *DICER1*. Esta mutación no consta en la base de datos de Clinvar del NCBI.

La ausencia de una de las copias de *DICER1* junto con una segunda mutación somática tipo “nonsense” en el dominio RNasa IIIb de *DICER1* dan lugar a una pérdida de función. Esto conduce a un corte defectuoso del miRNA maduro 5p, regulador de la traducción de varios supresores tumorales y, además, se produce un desequilibrio global en la producción de miRNA, dando lugar a una mayor capacidad para generar tumores e inducir el desarrollo de metástasis.

3. ABSTRACT

DICER1 gene encodes an RNase endoribonucleaseIII with a fundamental role in the biogenesis of miRNA, a type of single-stranded RNA that regulates protein expression and is responsible for post-transcriptional gene silencing. In *DICER1* syndrome, a series of mutations in this gene in autosomal inherited germline cells leads to an increased predisposition to certain types of benign and malignant embryonal tumors.

This study reports the clinical cases of two sister patients, treated at the HUNSC Medical Oncology Service for non-toxic multinodular goiter. This is an observational, cross-sectional and descriptive study. Both present a new variant, probably pathogenic, c.4314T>A (p. Tyr1438Ter) encoding a truncated protein and responsible for *DICER1* syndrome. This mutation is not listed, so far, in the NCBI Clinvar database.

The absence of one of the copies of *DICER1* together with a second nonsense somatic mutation in the RNase IIIb domain of *DICER1* leads to a loss of function. This leads to a defective cut of the mature miRNA 5p, a regulator of the translation of several tumor suppressors, and, in addition, a global imbalance in the production of miRNA is produced, giving rise to a greater capacity to generate tumors and induce the development of metastases.

4. PALABRAS CLAVE

- Síndrome *DICER1*, miRNA, bocio multinodular no tóxico, tumores pediátricos.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 SÍNDROME *DICER1* Y EL CÁNCER

El síndrome *DICER1* es un trastorno de predisposición tumoral familiar autosómico, dominante poco frecuente, que se produce por mutaciones de la línea germinal en el gen *DICER1* (2). Estudios recientes han demostrado que se hereda de manera haploinsuficiente, por lo que es necesaria una segunda mutación somática en el otro alelo de *DICER1* para causar un fenotipo maligno (1). En la clínica, el tumor que más predomina es el blastoma pleuropulmonar (PPB), sin embargo, se asocian una larga serie de neoplasias extrapulmonares tanto malignas como benignas, aparentemente no relacionadas tales como el tumor de células de Sertoli-Leydig, rhabdomyosarcoma embrionario de cuello uterino, bocio multinodular, carcinoma de tiroides diferenciado y pobremente diferenciado, nefroma quístico, hamartoma condromesenquimatoso nasal, meduloepitelioma del cuerpo ciliar, etc (Figura 1)(2).

Cuando *DICER1* funciona correctamente tiene un papel potencial como supresor tumoral, pero cuando se produce la pérdida o la expresión aberrante de la proteína se desencadena una cascada de sucesos que nos llevan a la pérdida del mantenimiento de la fisiología y al cáncer (3).

5.2 ALGUNOS TUMORES ASOCIADOS A *DICER1*

5.2.1 Blastoma pleuropulmonar (BPP)

El BPP es un tumor embrionario raro, que se origina en la cavidad pleural o en los pulmones y se manifiesta en la primera infancia, normalmente en bebés y en niños menores de siete años. Se describen cuatro tipos principales basados en la patología macroscópica: el tipo I, consiste en crecimientos quísticos con potencial maligno que pueden sufrir una transformación hacia sarcomas de alto grado. El tipo Ir, (en regresión o sin progresión), similar al tipo I, pero carece de componente maligno. El tipo II, tiene un componente mixto entre tumores quísticos y cancerosos y, el tipo III, es un sarcoma agresivo puramente sólido. Los BPP tipo II y III son más agresivos, y pueden dar lugar a recurrencias locales y/o metástasis a distancia (2,4,5).

5.2.2 Bocio multinodular (BMN) y cáncer de tiroides

Tanto los bocios multinodulares como los crecimientos cancerosos de la glándula tiroides están relacionados con variantes patogénicas de la línea germinal de *DICER1*. Se ha demostrado que el 32% y 13% de mujeres y hombres, respectivamente, con mutaciones en *DICER1* han sido sometidos a una tiroidectomía a los 20 años de edad por crecimientos tiroideos anormales. Sin embargo, este síndrome suele asociarse a cáncer de tiroides diferenciado encapsulado, por lo que en general, no se manifiesta con invasión linfovascular, extensión extratiroidea o metástasis en ganglios linfáticos regionales (4,5).

5.2.3 Tumor de células de Sertoli-Leydig (SLCT)

El SLCT se considera un tumor raro de entre todas las neoplasias de ovario. La edad de presentación varía desde la infancia temprana hasta la edad adulta tardía, aunque suelen diagnosticarse dentro de los años reproductivos. Los signos y síntomas típicos incluyen distensión o masa abdominal, dolor, amenorrea e irregularidades en el ciclo menstrual, así como, signos de virilización como hirsutismo, cambios en la voz o acné, debido a que se produce un aumento de la producción de testosterona. Se estadian de manera intraoperatoria según el sistema de estadificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Los tumores en estadios Ia bien diferenciados se comportan de manera benigna, mientras que tumores pobremente diferenciados o en etapas superiores tienen peor pronóstico (5,6). Estudios recientes han mostrado que un 57% de las pacientes con SLCT presentan mutaciones de la línea germinal de *DICER1* y

que en un 60% de estos tumores diagnosticados las mutaciones ocurren en el dominio RNasa IIIb de *DICER1*, sin que ello afecte la función RNasa IIIa (4). La pérdida de la actividad catalítica del dominio RNasa IIIb conduce a una reducción global de la producción de miRNA que se traduce en una desregulación de los genes que controlan la proliferación celular (*ARID3A*, *CDC25A* y *PLAGL1*) y la diferenciación celular (*FST*, *CYP19A1*, *FGF9* y *FGFR2*) (7).

5.2.4 Nefroma quístico (CN)

El CN es el segundo tumor que se observa con más frecuencia en niños con mutaciones *DICER1* (6). Se trata de una neoplasia benigna que se presenta como una masa quística unilateral circunscrita y se diagnostica dentro de los tres primeros años de vida. Los síntomas más frecuentes incluyen hematuria, dolor en el costado y un aumento anormal de la masa abdominal. Un pequeño porcentaje suele desarrollar *a posteriori* sarcomas renales de alto grado, por lo que se realiza nefrectomía radical como tratamiento para su prevención (4–6).

5.2.5 Meduloepitelioma del cuerpo ciliar (CBME)

El CBME es una neoplasia intraocular neuroepitelial primitiva rara proveniente del epitelio ciliar no pigmentado. Habitualmente se manifiesta en niños de siete años de edad con síntomas de disminución de la agudeza visual, leucocoria o estrabismo. Aunque se consideran neoplasias malignas por su histología, las metástasis a distancia y la mortalidad son poco frecuentes (5,6).

5.2.6 Hamartoma condromesenquimatoso nasal (NCMH)

El NCMH es una neoplasia benigna que se manifiesta como una masa nasal polipoide en lactantes, niños y adultos jóvenes. Los síntomas dependen de la ubicación y el tamaño y pueden variar desde drenaje nasal persistente hasta obstrucción nasal. En bebés, además, se puede observar dificultad para la respiración o la alimentación. El tratamiento curativo consiste en la extirpación quirúrgica, aunque pueden aparecer recidivas locales (5,6).

5.3 SÍNTESIS Y FUNCIÓN DEL miRNA

5.3.1 Estructura Dicer

Dicer es una endonucleasa que pertenece a la tercera subfamilia de enzimas ribonucleasa tipo III (RNasa III) (8). Estas enzimas hidrolizan los enlaces fosfodiéster de regiones bicatenarias del RNA y destacan por su papel fundamental en la biosíntesis de RNAs reguladores (9). En humanos, Dicer está codificado por el gen *DICER1* que se encuentra en el cromosoma 14 en la región subtelomérica 14q32.13, contiene 29 exones y codifica una proteína de 1922 aminoácidos, de aproximadamente 200 kDa, representando el miembro más grande y complejo de la familia RNasa III (10,11). Los estudios estructurales sobre hDicer han revelado que su arquitectura consta de una helicasa N-terminal, un dominio DUF-283, un dominio helicoidal del conector Platform-PAZ, dos dominios de RNasa III (RNasa IIIa y RNasa IIIb) y un dominio de unión a RNA de doble cadena C-terminal (dsRBD) (10). Además, mediante microscopía crioelectrónica se ha mostrado que la estructura tridimensional de Dicer humano se asemeja a la letra L y dentro de ésta podemos distinguir cabeza, núcleo y base. La cabeza la comprenden los dominios Platform y PAZ, el núcleo los dominios RNasa IIIa y RNasa IIIb y la base está formada por el dominio helicasa (Figura 2 y 3) (9,12).

Dominio helicasa

La helicasa de hDicer está formada por subdominios que se organizan estructuralmente en tres lóbulos denominados HEL1, HEL2i y HEL2. En estos subdominios encontramos a las familias de helicasas tipo DExD/H, cuya función es desenrollar los dúplex de RNA o DNA rompiendo los puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas, y las helicasas tipo RIG-I que se translocan a lo largo de estos ácidos nucleicos. A parte de estas funciones, el dominio helicasa es capaz de diferenciar los pre-miRNA de los pre-siRNA dependiendo de los extremos de dsRNA y gracias a la interacción con el bucle apical de los sustratos de pre-miRNA y, además, sirve como guía para unir proteínas de unión a dúplex de RNA (9,10).

Dominio DUF283

El dominio hDicer DUF283 se asemeja estructuralmente a los dsRBP pero se une a ácidos nucleicos monocatenarios y facilita la hibridación entre cadenas complementarias de RNA o DNA, realizando una función similar a la de las chaperonas. Además, también

tiene un papel importante en la unión de proteínas asociadas a Dicer. DUF283 se une a la adenosina desaminasa que actúa sobre RNA1 (ADAR1), y promueve tanto la escisión de pri-miRNA como la transferencia de miRNA a las proteínas AGO (9,10).

Dominio PAZ

El dominio PAZ (Piwi/Ago/Zwille) se considera el núcleo funcional de las enzimas canónicas de Dicer junto con el dominio RNasaIII. La distancia entre el dominio PAZ y los dominios RNasa III es la que define la longitud de los miRNA o siRNA. Si nos encontráramos ante un hDicer sin dominio PAZ éste no sería capaz de procesar sustratos pre-miRNA ni generar productos canónicos, sin embargo, si pueden escindir sustratos RNA y DNA monocatenarios, lo que ha demostrado que, en tales casos, otros dominios hDicer pueden participar en la unión del sustrato dando lugar a productos no canónicos (9,10).

Dominios de RNasa

El dominio RNasa está formado por RNasa IIIa y RNasa IIIb y juntos forman el núcleo catalítico de las enzimas canónicas de tipo Dicer. Su función es procesar los dsRNA generando fragmentos de RNA más cortos de 21-23 nucleótidos. Además, el dominio RNasa IIIa escinde el brazo 3' del pre-miRNA (miRNA 3p) y, por otro lado, el dominio RNasa IIIb escinde el brazo que contiene el fosfato 5' (miRNA 5p); cómo en todo este tipo de reacciones, aquí se requieren iones de magnesio en la interfaz entre los dominios IIIa y IIIb y el miRNA (2,9).

Dominio dsRBD

DsRBD es el dominio de unión a dsRNA, está formado por 70 aminoácidos y tiene una conformación $\alpha\beta\beta\alpha$. Se ha visto que las proteínas que contienen este dominio están involucradas en muchos aspectos de la vida celular como el metabolismo, procesamiento, transporte y silenciamiento de RNA, así como en la respuesta antiviral. Además, el dsRBD de hDicer es esencial para la unión del sustrato de RNA en ausencia del dominio PAZ. Por tanto, la función de este dominio es importante ya que se encarga de acoplar el dsRNA al sitio dimérico activo formado por los dominios RNasaIII y posteriormente coger el producto resultante y liberarlo para preparar la enzima para otra ronda de escisión (9).

5.3.2 Regulación Drosha/Dicer

Los microRNA influyen en casi todos los procesos biológicos del organismo. Para convertirse en fragmentos maduros capaces de modificar la expresión génica, precisan de pasos de procesamiento específicos (13). La biosíntesis comienza con la transcripción de pri-miRNA (miRNA primarios). A continuación, el complejo nuclear de procesador formado por la RNasa III Drosha y su proteína asociada DGCR8, elimina las regiones flanqueantes de pri-miRNA para formar pre-miRNA (miRNA precursor). Además, este complejo Drosha/DGCR8 genera un saliente característico 3' como punto de corte de referencia para la siguiente enzima del proceso. Estos fragmentos más cortos de miRNA precursor son reconocidos y exportados al citoplasma por la exportina-5, donde serán escindidos por el complejo Dicer. Este complejo tiene 2 tipos de proteínas de unión: TARBP2 y PACT. Dicer reconoce el extremo 3' gracias a su dominio PAZ, que es el que va a determinar la distancia exacta donde producir la rotura y, seguidamente, sus dominios RNasa III escinden el bucle terminal del pre-miRNA dando lugar a un dúplex de miRNA maduro. Por último, el dúplex se carga en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para seleccionar y desenrollar la hebra que quedará como cadena guía de miRNA maduro que posteriormente reconocerá y se complementará con secuencias en mRNAs específicos impidiendo su traducción (Figura 4 y 5) (13,14).

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Objetivo principal

Estudiar las bases moleculares y alteraciones funcionales que presenta la proteína dicer1 con la mutación en el gen de *DICER1* c.4314T>A (p. Tyr1438Ter) y que llevan al síndrome *DICER1* a nuestras pacientes con bocio multinodular no tóxico.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto de este TFG fue aprobado por el Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) referencia CHUNSC_2023_14. La información para este estudio observacional, transversal y descriptivo se obtuvo a través del Sistema de Gestión

Administrativa y Clínica de Atención Sanitaria (Dragoe) de las historias clínicas de pacientes del Servicio de Oncología Médica del HUNSC.

El estudio se llevó a cabo en 2 pacientes mujeres diagnosticadas de Síndrome *DICER1*, en la Unidad de Genética del HUNSC y con seguimiento clínico en la consulta de Oncología Médica.

Para su diagnóstico, se realizó la extracción de DNA a partir de sangre periférica. Se amplificó mediante PCR del exón 23 y zonas intrónicas flanqueantes del gen *DICER1*. A continuación, se secuenciaron y se compararon las cadenas obtenidas con la cadena de referencia y se detectó la mutación. Ante este hallazgo, se compara la secuencia encontrada con la de la proteína Dicer en la base de datos “Universal Protein Resource (UniProt)” (15). Búsqueda de mutaciones en bancos de datos gnomAD (18), ClinVar (17) y HGMD (19) y bibliográfica para conocer la estructura de la proteína y sus dominios funcionales y establecimiento de ambas diferencias en la variante patológica encontrada.

8. RESULTADOS

8.1 Estudio de segregación familiar de cáncer hereditario (gen *DICER1*)

Las muestras de sangre de las dos pacientes, hermanas en seguimiento por el servicio de Oncología Médica fueron procesadas por la Unidad de Genética, ambos del HUNSC. Las pacientes de 41 y 46 años tienen antecedentes personales de tiroidectomía por bocio multinodular no tóxico y nefrectomía a la edad de 4 años con el diagnóstico de poliquistosis. En cuanto a los antecedentes familiares, se encuentra la madre de las pacientes con bocio multinodular no tóxico, y la hija de una de ellas intervenida de tiroidectomía por bocio multinodular, diagnosticada de tumor de Willms a los 6 meses y en seguimiento en la actualidad por lesión nasal sospechosa de hamartoma condromesenquimal.

Por estos hallazgos, se les realiza un estudio genético a ambas hermanas y se les detecta la misma mutación c.4314T>A (p. Tyr1438Ter) en heterocigosis en el gen *DICER1*. Como mostramos en la Figura 6, esta variante consiste en la sustitución de un nucleótido de timina (T) por otro de adenina (A) en la posición nucleotídica 4314, lo que origina la sustitución del aminoácido tirosina (Y) en la posición 1438 de la proteína por un codón de parada prematuro (TGA), mutación “nonsense” (Figura 7).

Las variantes patogénicas de tipo truncante, como la detectada en estas pacientes, son el mecanismo habitual de patogenicidad de este gen. Esta variante no está recogida en la base de datos de población sana gnomAD (18) y tampoco ha sido reportada en las bases de datos clínicas ClinVar (17), HGMD (19) ni en la bibliografía científica consultada. Por tanto, basándonos en los datos disponibles, hemos clasificado esta variante como probablemente patogénica. Esta variante asociada al gen *DICER1* se relaciona con un síndrome de predisposición a los diversos tipos de tumores que mostramos en la Introducción (Figura 1) y, principalmente, blastoma pleuropulmonar y bocio multinodular tipo 1. Sigue un patrón de herencia autosómico dominante, por lo que el riesgo de transmisión a la descendencia es del 50% independientemente en este caso el exón 23 y las zonas que flanquean el gen *DICER1* del sexo de la misma.

8.2 Mutación c.4314T>A (p. Tyr1438Ter) en *DICER1*.

Como puede verse en la Figura 7, el codón de parada (stop) prematuro da lugar a la pérdida del dominio de unión a dsRNA (dsRBD) y produce una proteína defectuosa en uno de los dos centros catalíticos de RNasa III (RNasa IIIb).

9. DISCUSIÓN

En este TFG se describen varios de los tipos de tumores que se relacionan con una mutación de línea germinal en *DICER1*, en el caso de nuestras pacientes, se manifiestan: bocio multinodular (BMN), hamartoma condromesenquimatoso nasal (NCMH) y nefroma quístico. Sin embargo, en el síndrome de *DICER1* también se incluyen: blastoma pleuropulmonar (BPP), cáncer de tiroides, tumor de células de Sertoli-Leydig (SLCT) y meduloepitelioma del cuerpo ciliar (CBME).

Discusión del método empleado.

El método de diagnóstico de esta patología es el estándar para “cáncer hereditario”, de forma breve, se extrae el DNA de las células blancas de sangre periférica, se amplifica por PCR, en este caso el exón 23 y las zonas que flanquean el gen *DICER1* (OMIM*606241), se secuenciaron por método de Sanger y se comparan con la secuencia de referencia.

Discusión de la pérdida de función de la proteína *dicer1* truncada por la mutación 4314T>A.

DICER1 tiene un papel fundamental en la biogénesis de los miRNA, un tipo de RNA monocatenario que regula la expresión de proteínas, y es responsable del silenciamiento génico postranscripcional. Los genes de miRNA se transcriben a partir de DNA genómico y, después del procesamiento inicial de RNA en el núcleo, es transportado al citoplasma en forma de horquilla. El dominio RNasa III de *DICER1* reconoce esta estructura y escinde los extremos 3' y 5' generando fragmentos de RNA más cortos de 21-23 nucleótidos, dando lugar a miRNA maduros. A continuación, el miRNA se va a unir a su RNA mensajero correspondiente produciendo un bloqueo en la traducción o una destrucción dirigida (6), de ahí su importancia en la supresión de neoplasias o en el desarrollo de órganos.

La ausencia completa de la proteína *DICER1* produce una muerte prematura en la embriogénesis. Por el contrario, los individuos que tienen una sola copia de *DICER1* tienen un mayor riesgo de desarrollar estas neoplasias, pero son fenotípicamente normales (6). Estas mutaciones de la línea germinal se heredan de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta, por lo que los tumores asociados en el síndrome de *DICER1* suelen adquirir una segunda mutación somática tipo “nonsense”, que da lugar a una pérdida de función. Estas variaciones, normalmente se encuentran en cinco codones “hotspot” en el dominio RNasa IIIb de *DICER1* (E1705, D1709, G1809, D1810, E1813) y dan como resultado un sesgo hacia la producción de cadenas 3p con pérdida de cadenas 5p de miRNA (2). En estos miRNA 5p se encuentran muchos genes supresores de tumores, incluidas las familias let-7, miR34/449 y miR200 (6,11). La variación de un sólo nucleótido en el extremo 5' de un microRNA puede cambiar el mRNA diana debido a que esta región constituye la secuencia de identificación mínima que determina los mRNAs objetivo (13).

Como consecuencia, en estas variantes patológicas, y de forma general, se produce un desequilibrio global en la producción de miRNA, que, posiblemente, sea más evidente en aquellos que regulan la expresión génica en células madre ya comprometidas durante el desarrollo y células madre tumorales ya fuera de las regulaciones fisiológicas del ciclo celular, presentando una función deficiente en *DICER1* y, por tanto, mayor capacidad para generar tumores o cooperar en el desarrollo de metástasis.

En nuestro caso concreto, la pérdida del dominio de unión a dsRNA (dsRBD) y la proteína defectuosa en uno de los dos centros catalíticos de RNasa III (RNasa IIIb) conlleva un problema en la fijación de la horquilla del Pre-miRNA y una mala eliminación del bucle

de esa horquilla y, consecuentemente, no formación de un dsRNA que pueda ser separado por la actividad helicasa de la misma enzima (Figura 2). Pensamos que este fallo en la función del Dicer mutado es, parcialmente, compensada por el alelo sano y, quizás, por la función residual del mutado, aunque haría falta investigación futura para determinar esta función residual.

Discusión sobre revisión de diagnósticos. Conjetura.

Podemos pensar que la causa de la nefrectomía durante la infancia de una de las paciente estudiada (1988) y con diagnóstico anatómico patológico de poliquistosis pudiera ser la primera manifestación del síndrome de DICER1, también, hemos de tener en cuenta que, aunque se habían visto sus efectos en plantas, los iRNA se comienzan a describir en 1998.

10. CONCLUSIONES

1. En el diagnóstico genético de dos pacientes hermanas afectas de bocio multinodular no tóxico hemos encontrado una mutación c.4314T>A (p. Tyr1438Ter) en *DICER1*, no descrita hasta ahora en ninguno de los bancos de datos consultados (gnomAD, ClinVar y HGMD).
2. Dicha mutación codifica una forma truncada de la proteína *dicer1* que carece del dominio de unión a dsRNA y defectuosa en uno de los dos centros catalíticos de RNasaIII.
3. Podemos deducir que los defectos funcionales en la fabricación de iRNA resultan en alteraciones del ciclo celular que conducen a los tumores hereditarios descritos en esta familia, aunque hacen falta estudios posteriores para comprobar molecularmente esta deducción.

11. ¿QUÉ HE APRENDIDO REALIZANDO ESTE TFG?

He aprendido a realizar tareas que forman parte del desarrollo formativo de un médico, cómo la búsqueda de información científica y bibliografía actualizada en buscadores de base científica (PubMed, Medline, Elsevier). También, a manejar procedimientos de documentación clínica como el programa DRAGO-AE; comprender las bases de un

trabajo científico, su investigación, métodos y análisis estadístico para su posterior interpretación y comparación con otros estudios; así como, a organizar, redactar y exponer trabajos de investigación médica.

Aprender a utilizar bases de datos, como Clinvar, con variantes genéticas patogénicas y probablemente patogénicas, e identificarlas con su fenotipo.

He entendido como variaciones en la línea germinal, pueden conducir a proliferación carcinogénica. Todo lo anterior es necesario en el ejercicio de la profesión médica moderna que requiere actualización e investigación constante para su avance.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Theotoki EI, Pantazopoulou VI, Georgiou S, Kakoulidis P, Filippa V, Stravopodis DJ, et al. Dicing the disease with dicer: The implications of dicer ribonuclease in human pathologies [Internet]. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020 [cited 2022 Oct 10]. p. 1–24. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7223/htm>
2. González IA, Stewart DR, Schultz KAP, Field AP, Hill DA, Dehner LP. DICER1 tumor predisposition syndrome: an evolving story initiated with the pleuropulmonary blastoma. Vol. 35, Modern Pathology. Springer Nature; 2022. p. 4–22. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41379-021-00905-8>
3. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis [Internet]. Vol. 15, Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group; 2014 [cited 2022 Oct 23]. p. 509–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm3838>
4. Robertson JC, Jorcyk CL, Oxford JT. DICER1 syndrome: DICER1 mutations in rare cancers [Internet]. Vol. 10, Cancers. MDPI AG; 2018 [cited 2022 Oct 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5977116/>
5. Kris Ann P Schultz, Douglas R Stewart, Junne Kamihara MP, Andrew J Bauer, Melissa A Merideth MM, Pamela Stratton M, et al. DICER1 Tumor Predisposition. [cited 2022 Oct 10]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK196157/>

6. Schultz KA, Yang J, Doros L, Williams GM, Harris A, Stewart DR, et al. DICER1-pleuropulmonary blastoma familial tumor predisposition syndrome: A unique constellation of neoplastic conditions [Internet]. Vol. 19, Pathology Case Reviews. Lippincott Williams and Wilkins; 2014 [cited 2022 Oct 10]. p. 90–100. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4209484/>
7. Solarski M, Rotondo F, Foulkes WD, Priest JR, Syro L v., Butz H, et al. DICER1 gene mutations in endocrine tumors [Internet]. Vol. 25, Endocrine-Related Cancer. BioScientifica Ltd.; 2018 [cited 2022 Oct 10]. p. R197–208. Available from: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/25/3/ERC-17-0509.xml>
8. Pellegrino L, Jacob J, Roca-Alonso L, Krell J, Castellano L, Frampton AE. Altered expression of the miRNA processing endoribonuclease Dicer has prognostic significance in human cancers. Vol. 13, Expert Review of Anticancer Therapy. Expert Reviews Ltd.; 2013. p. 21–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23259424/>
9. Ciechanowska K, Pokornowska M, Kurzyńska-Kokorniak A. Genetic insight into the domain structure and functions of dicer-type ribonucleases [Internet]. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2021 [cited 2022 Oct 26]. p. 1–18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7827160/>
10. Vergani-Junior CA, Tonon-da-Silva G, Inan MD, Mori MA. DICER: structure, function, and regulation [Internet]. Vol. 13, Biophysical Reviews. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021 [cited 2022 Oct 23]. p. 1081–90. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-021-00902-w>
11. Thunders M, Delahunt B. Gene of the month: DICER1: ruler and controller. J Clin Pathol [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Nov 14];74(2):66–72. Available from: <https://jcp.bmj.com/content/74/2/69>
12. Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. Nat Struct Mol Biol [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Oct 26];19(4):436–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3319852/>

13. Ruiz-Arroyo VM, Nam Y. Dynamic Protein-RNA recognition in primary MicroRNA processing [Internet]. Vol. 76, Current Opinion in Structural Biology. Elsevier Ltd; 2022 [cited 2023 Jan 2]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X2200121X?via%3Dihub>
14. Chen PS, Lin SC, Tsai SJ. Complexity in regulating microRNA biogenesis in cancer [Internet]. Vol. 245, Experimental Biology and Medicine. SAGE Publications Inc.; 2020 [cited 2022 Oct 5]. p. 395–401. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7082889/>
15. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Ahmad S, Alpi E, et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. Nucleic Acids Res [Internet]. 2023 Jan 6;51(D1): D523–31. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/51/D1/D523/6835362>
16. Lehninger Principles of Biochemistry, Eighth Edition 2021 W.H. Freeman and Company.
17. Melissa J. Landrum, Jennifer M. Lee, George R. Riley, Wonhee Jang, Wendy S. Rubinstein, Deanna M. Church, Donna R. Maglott, ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype, *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue D1, 1 January 2014, Pages D980–D985, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1113>.
18. Laricchia, K. M., Lake, N. J., Watts, N. A., Shand, M., Haessly, A., Gauthier, L. D., Benjamin, D., Banks, E., Soto, J., Garimella, K., Emery, J., Genome Aggregation Database (gnomAD) Consortium, Rehm, H. L., MacArthur, D. G., Tiao, G., Lek, M., Mootha, V. K., Calvo, S. E. Mitochondrial DNA variation across 56,434 individuals in gnomAD. *Genome Res.* 32, 569–582 (2022). <https://doi.org/10.1101/gr.276013.121>.
19. Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S., Abeyasinghe, S., Krawczak, M., & Cooper, D. N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human mutation*, 21(6), 577–581. <https://doi.org/10.1002/humu.10212>.

13. LEYENDA DE FIGURAS

Figura 1: Algunos de los tumores que se asocian al síndrome *DICER1* según las alteraciones de la línea germinal (1).

Figura 2: Esquema que muestra la organización de los dominios que conforman la ribonucleasa hDicer. Dominio Helicasa N-terminal y sus subdominios (HEL1, HEL2i y HEL2), un dominio DUF-283, un dominio helicoidal del conector Platform-PAZ, dos dominios de RNasa III (RNasa IIIa y RNasa IIIb) y un dominio de unión a RNA de doble cadena C-terminal (dsRBD) (9).

Figura 3: Esquema de la estructura terciaria de Dicer humano formado por cabeza, núcleo y base. La cabeza formada por los dominios Platform y PAZ, el núcleo por los dominios RNasa IIIa y RNasa IIIb y la base por el dominio helicasa. Las flechas indican los puntos de escisión de pre-miRNA por las enzimas catalíticas RNasa III (9).

Figura 4: Vía canónica de biogénesis de miRNA. La polimerasa II transcribe un gen de miRNA. Después, el microprocesador Drosha-DGCR8 escinde el pri-miRNA generando pre-miRNA que será exportado desde el núcleo por la Exportina-5-RanGTP. A continuación, el complejo Dicer-TRBP escinde las horquillas de pre-miRNA para formar miRNA maduro. La hebra funcional de miRNA se une a las proteínas Argonaute (AGO) en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para posteriormente complementarse con el RNAm y dirigir la represión postranscripcional (1).

Figura 5: Esquema del silenciamiento génico por RNA de interferencia. (a) Los RNA temporales pequeños (stRNA, una clase de miRNA) se generan mediante la escisión mediada por Dicer de precursores más largos que se pliegan para crear dúplex de stRNA. A continuación, los stRNA se unen a los mRNA, lo que conduce a la degradación del mRNA o a la inhibición de la traducción. (b) Los RNA de doble cadena (dúplex de RNA) son procesados por Dicer en pequeños RNA de interferencia (siRNA) que interactúan con el mRNA objetivo para, nuevamente su degradación o bien, la inhibición de la traducción (16).

Figura 6: Secuencia del mRNA y de la proteína Dicer humana obtenida a través de la base de datos de “UniProt”. Se señala la mutación que presentan nuestras pacientes en color rojo (c.4314T>A p. Tyr1438Ter). Esta variante consiste en la sustitución de un

nucleótido de timina (T) por otro de adenina (A) en la posición nucleotídica 4314, lo que origina la sustitución del aminoácido tirosina (Y) en la posición 1438 de la proteína por un codón de parada (stop) prematuro (TGA) (15).

Figura 7: Esquemas de la estructura hDicer. (A) Se señala con una flecha de color rojo el lugar donde se produce la mutación dentro de la secuencia de *DICER1* conservando la función del dominio RNasa IIIa. (B) La mutación resulta ser una variante patogénica por la aparición de un codón de parada prematuro (stop), dando lugar a una proteína truncada y a la pérdida de los dominios RNasa IIIb y dsRBD (9).

14. FIGURAS

Figura 1:

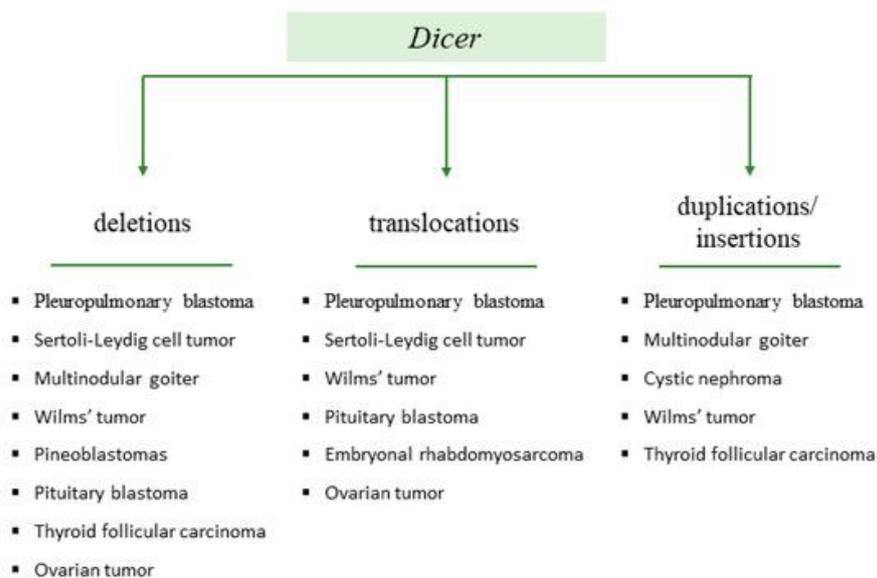


Figura 2:

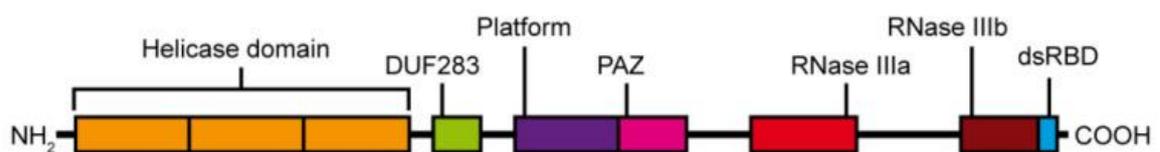


Figura 3:

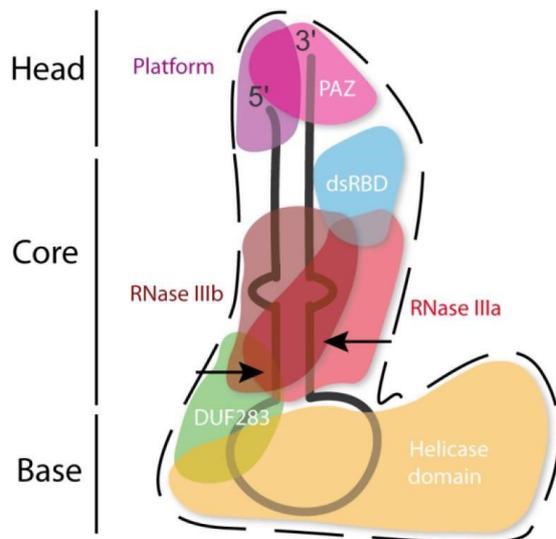


Figura 4:

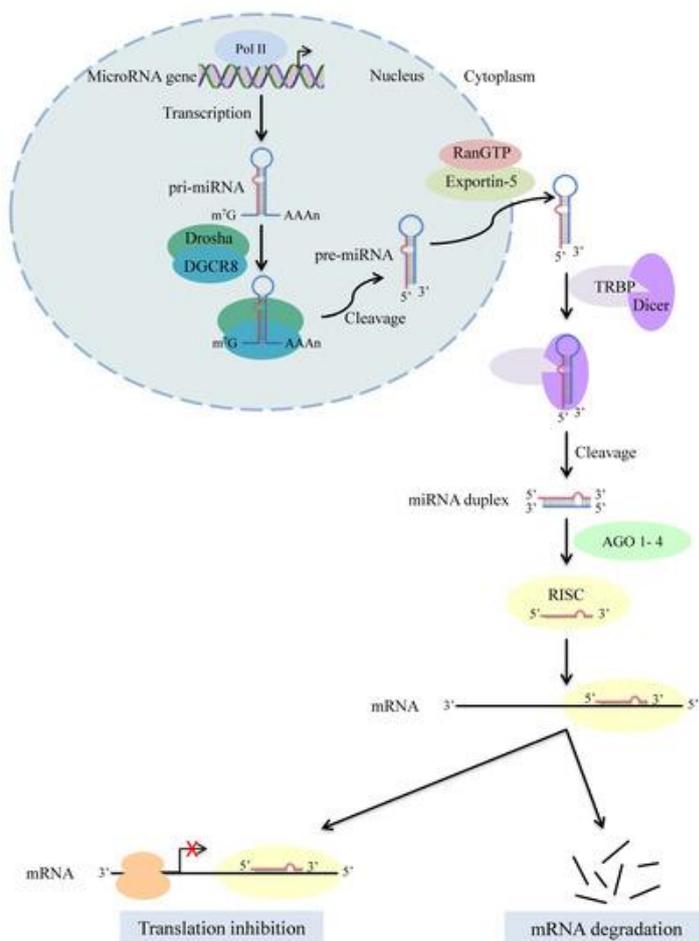


Figura 5:

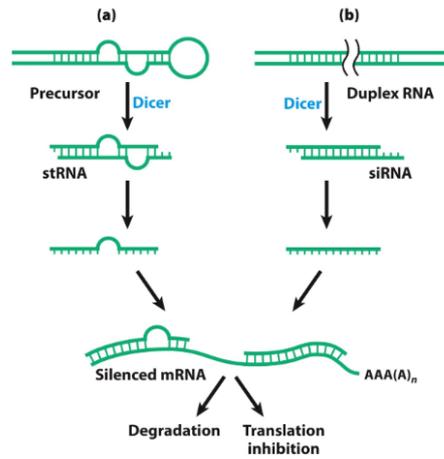


Figura 6:

HUMAN DICER1

mRNA: NM_177438 (transcript variant 1) 10384
CDS 346-6114
Proteina: NP_803187.1 (1922aa)
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9UPY3/entry>

1 ATGAAAAGCCCTGCTTTGCAACCCCTCAGCATGGCAGGCCTGCAG...
M K S P A L Q P L S M A G L Q

4006 ...CCTGATGCGCATGAGGGCCGCCTTTCATATATGAGAAGCAAAAAG
P D A H E G R L S Y M R S K K

4051 GTCAGCAACTGTAATCTGTATCGCCTTGGAAGAAAGAGGGACTA
V S N C N L Y R L G K K K G L

4096 CCCAGCCGCATGGTGGTCAATATTTGATCCCCCTGTGAATTGG
P S R M V V S I F D P P V N W

4141 CTTCTCCTGGTTATGTAGTAAATCAAGACAAAAGCAACACAGAT
L P P G Y V V N Q D K S N T D

4186 AAATGGGAAAAAGATGAAATGACAAAAGACTGCATGCTGGCGAAT
K W E K D E M T K D C M L A N

4231 GGCAAACTGGATGAGGATTACGAGGAGGAGGATGAGGAGGAGGAG
G K L D E D Y E E E D E E E E
NM_17743 nt(4314)

4276 AGCCTGATGTGGAGGGCTCCGAAGGAAGAGGCTGACTA TGAAGAT
S L M W R A P K E E A D Y E D
NP_803187 aa1438

4321 GATTTCTGGAGTATGATCAGGAACATATCAGATTTATAGATAAT...
D F L E Y D Q E H I R F I D N

Figura 7:

