



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



**Estudio del *splicing* aberrante en *BRCA1* mediante
el uso de minigenes híbridos.**

Study of aberrant splicing in BRCA1 using hybrid minigenes.

Autor/a:

D^a. Aurora Gil Arrabal

Tutor/es:

D. Eladio Andrés Velasco Sampedro y D^a. Elena Bueno Martínez

TÍTULO: Estudio del *splicing* aberrante de genes de susceptibilidad al cáncer de mama.

AUTOR/A: Aurora Gil Arrabal.

TUTOR/ES: Eladio Andrés Velasco Sampedro y Elena Bueno Martínez.

ÁREA/DEPARTAMENTO: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología.

TRIBUNAL

PRESIDENTE: D^a Mercedes Durán Domínguez (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

SECRETARIO: D^a. Sara Gil Bernabé (Dpto. de Anatomía Patológica, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud)

VOCAL: D^a. Elena Bueno Martínez (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

SUPLENTE 1: D^a. Mar Infante Sanz (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

SUPLENTE 2: D^a. Laura Senovilla González (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología)

FECHA: 25/06/2025

CALIFICACIÓN:

RESUMEN

Introducción: El reconocimiento de los microexones (<51 nt) durante el *splicing* precisa la participación de varios factores, incluyendo los elementos reguladores del *splicing* (SREs), cuya alteración puede provocar transcritos anómalos, asociados a enfermedades genéticas. Este estudio busca identificar los SREs del microexón 19 del gen de susceptibilidad a cáncer de mama/ovario *BRCA1*, y evaluar el impacto de variantes en el *splicing*.

Métodos: Para el mapeo de SREs, se diseñaron dos microdeleciones exónicas solapantes. Estas, junto con las variantes de los sitios de *splicing* del microexón 19, c.5153-1G>C y c.5193+1G>T, y la variante fundadora de CyL, c.5153-1G>A, se introdujeron mediante mutagénesis dirigida en el minigen mgBRCA1_14-20wt y se ensayaron en células MCF-7.

Resultados: Los ensayos de μ del identificaron 2 regiones ricas en SREs. Las variantes c.5153-G>C y c.5193+1G>T provocaron mayoritariamente el *skipping* del microexón [Δ (E19)], mientras que c.5153-1G>A, ocasionó principalmente la pérdida del primer nucleótido del exón [Δ (E19p1)] al usar un sitio aceptor *de novo* 1 nt *downstream*, replicando resultados previos en muestras de pacientes. Ambos transcritos truncan la proteína *BRCA1*, de modo que las 3 variantes pueden ser clasificadas como patogénicas.

Discusión: El mapeo funcional es una estrategia útil para localizar SREs y variantes potencialmente espliceogénicas. Las variantes de los sitios de *splicing* generan transcritos aberrantes que inactivan *BRCA1* e incrementan el riesgo de cáncer de mama, ovario y otros tipos de tumores. Los ensayos con minigenes aportan información valiosa para el asesoramiento genético, al facilitar la clasificación de variantes y el diseño de estrategias preventivas y terapéuticas.

PALABRAS CLAVE

Splicing, gen *BRCA1*, cáncer de mama hereditario, minigen, ensayos funcionales.

ABSTRACT

Introduction: *The recognition of microexons (<51 nt) during splicing requires the involvement of several factors, including splicing regulatory elements (SREs), whose alteration can lead to aberrant transcripts associated with genetic diseases. This study aims to identify the SREs of microexon 19 of the breast/ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, and to evaluate the impact of variants on splicing.*

Methods: *To map SREs, two overlapping exonic microdeletions were designed. These, along with splice site variants of microexon 19—c.5153-1G>C and c.5193+1G>T—as well as the CyL founder variant c.5153-1G>A, were introduced via site-directed mutagenesis into the mgBRCA1_14-20wt minigene and tested in MCF-7 cells.*

Results: *μdel-based assays identified two SRE-rich regions. Variants c.5153-1G>C and c.5193+1G>T predominantly resulted in skipping of the microexon [$\Delta(E19)$], while c.5153-1G>A primarily led to the loss of the first nucleotide of the exon [$\Delta(E19p1)$] by activating a de novo acceptor site 1 nt downstream, replicating previous findings in patient samples. Both transcript types truncate the BRCA1 protein, indicating that all three variants can be classified as pathogenic.*

Discussion: *Functional mapping is a useful strategy for locating SREs and identifying potentially spliceogenic variants. Splice site variants generate aberrant transcripts that inactivate BRCA1 and increase the risk of breast, ovarian, and other cancers. Minigene assays provide valuable information for genetic counseling by facilitating variant classification and informing preventive and therapeutic strategies.*

KEYWORDS

Splicing, BRCA1 gene, hereditary breast cancer, minigene, functional assays.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque sin vosotros nada de esto habría sido posible. Gracias por darme la oportunidad de estudiar aquello que quería, por apoyarme desde el minuto cero y por estar ahí acompañando a vuestra pequeña en cada uno de mis pasos. Gracias por enseñarme a seguir hacia delante, incluso cuando las cosas no salen como espero, pero, sobre todo, por ayudarme a crecer como persona.

A mis tíos, por confiar en mí y hacerme saber que, con esfuerzo y constancia, podía llegar donde quisiese. Ojalá estéis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de ser vuestra sobrina.

A mi abuela Gertru, por recibirme siempre con esa sonrisa tan tuya cada vez que voy a verte y quererme como a la que más. Siempre voy a ser tu pitusa y tu nieta preferida. Ojalá fueras eterna abuela.

A mi abuelo Ángel, porque sé que allá donde estés, te alegras por mí. Estoy segura de que habrías presumido con tus amigos de hasta dónde he llegado, como siempre hacías con mis notas. Siempre te llevaré conmigo abuelo.

A Valladolid, por brindarme la oportunidad de conocer a las personas que me llevo conmigo para siempre, por formar parte de esta etapa tan bonita que he vivido y porque se han convertido en una parte esencial de mí. Que suerte la mía de haberme cruzado con ellas en el camino.

A mis amigos, de Quemada y de Aranda, por confiar en mí y estar a mi lado sin importar la distancia. Gracias por mostrarme lo que significa una verdadera amistad y por todos los momentos compartidos.

Y por último, gracias a mis tutores, así como a Inés, Lara y Alicia, por acogerme durante estos meses en vuestro grupo de laboratorio. Gracias por guiarme, por enseñarme y por ayudarme a avanzar un poquito más en mi carrera investigadora.

GRACIAS.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
<i>SPLICING</i>	1
1) DEFINICIÓN	1
2) REACCIÓN DE <i>SPLICING</i>	1
3) REGULACIÓN DEL <i>SPLICING</i>	2
MICROEXONES	2
ELEMENTOS REGULADORES DEL <i>SPLICING</i> (SREs)	2
4) <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO	3
5) CORRELACIÓN <i>SPLICING</i> -ENFERMEDAD	3
<i>SPLICING</i> -CÁNCER	4
CÁNCER DE MAMA	4
1) GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA	4
2) GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO	4
3) <i>BRCA1</i>	5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
BIOINFORMÁTICA	6
1) BASES DE DATOS	6
ClinVar	6
Ensembl	6
2) PROGRAMAS	7
MaxEntScan	7
HEXplorer	7
SpliceVault	7
Mutalyzer	7
ENSAYOS FUNCIONALES DE <i>SPLICING</i>	8
1) CONSTRUCCIÓN DEL MINIGEN	8
2) MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	8
TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	9
TRANSECCIÓN CELULAR	9
EXTRACCIÓN ARN, RT-PCR	9

AMPLIFICACIÓN	9
3) ANÁLISIS DE RESULTADOS	10
SECUENCIACIÓN	10
CARACTERIZACIÓN DE TRANSCRITOS.....	10
4. RESULTADOS	11
ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	11
ANÁLISIS FUNCIONAL DEL <i>SPLICING</i>	12
1) MINIGEN mgBRCA1_14-20	12
2) VARIANTES EN LOS SITIOS DE <i>SPLICING</i>	12
3) MAPEO DE LOS SREs.....	15
4) INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LAS VARIANTES	16
5. DISCUSIÓN	17
<i>SPLICING</i> COMO MECANISMO PATOGENICO	17
PREDICCIONES <i>IN SILICO</i>	17
ENSAYOS FUNCIONALES MEDIANTE MINIGENES HÍBRIDOS	18
FORTALEZAS Y LIMITACIONES	18
PROYECCIONES FUTURAS.....	19
6. CONCLUSIONES	20
BIBLIOGRAFÍA	21
APÉNDICES.....	25
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	25
TABLAS SUPLEMENTARIAS	30
OTROS	31
CÓDIGO	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados del análisis funcional de <i>splicing</i> de las variantes seleccionadas.	14
Tabla 2. Efecto de los transcritos generados a nivel de ARN y proteína.	16
Tabla Suplementaria 1. Número de registros de las variantes en ClinVar.	30
Tabla Suplementaria 2. <i>Primers</i> para introducir las variantes genéticas de interés.	30
Tabla Suplementaria 3. <i>Primers</i> usados para la obtención de secuencias.	30
Tabla Suplementaria 4. <i>Primers</i> empleados para la amplificación de cDNA.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del minigen mgBRCA1_14-20wt.....	8
Figura 2. Workflow del ensayo funcional mediante minigenes reporteros de <i>splicing</i>	10
Figura 3. Perfil de HEXplorer del microexón 19 de <i>BRCA1</i>	11
Figura 4. Secuenciación de los transcritos mayoritariamente generados por las variantes c.5193+1G>T, c.5153-1G>C y c.515-1G>A	13
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los transcritos generados por las variantes genéticas de interés.	15
Figura Suplementaria 1. Reacción de <i>splicing</i>	25
Figura Suplementaria 2. Procesamiento de los intrones.....	26
Figura Suplementaria 3. Eventos resultantes del proceso de <i>splicing</i> alternativo.....	26
Figura Suplementaria 4. Vía de reparación por recombinación homóloga.	27
Figura Suplementaria 5. Inserto del mgBRCA1_14-20.	28
Figura Suplementaria 6. Validación funcional del minigen.....	29
Figura Suplementaria 7. Análisis de fragmentos fluorescentes.....	30

ABREVIATURAS

5' ss: sitio 5' de *splicing*

3' ss: sitio 3' de *splicing*

ACMG-AMP (del inglés *American College of Medical Genetics and Genomics - Association for Molecular Pathology*): Colegio Americano de Genética Médica y Genómica-Asociación de Patología Molecular

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ASOs (del inglés *antisense oligonucleotides*): oligonucleótidos antisentido

BRCT (del inglés *BRCA1 C-terminal*): dominio de *BRCA1*

cDNA: ADN complementario

CM: cáncer de mama

CMH: cáncer de mama hereditario

CyL: Castilla y León

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

ESE (del inglés *exonic splicing enhancer*): potenciador exónico del *splicing*

ESS (del inglés *exonic splicing silencer*): represor exónico del *splicing*

FL (del inglés *full length*): transcrito canónico

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HGVS (del inglés *Human Genome Variation Society*): Sociedad de Variación del Genoma Humano

hnRNPs (del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*): ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas

IA: inteligencia artificial

ISE (del inglés *intronic splicing enhancer*): potenciador intrónico del *splicing*

ISS (del inglés *intronic splicing silencer*): represor intrónico del *splicing*

LB: Luria Bertani

MCS (del inglés *multicloning site*): sitio de clonación múltiple

MES: MaxEntScan

μdel: microdelección

NMD (del inglés *nonsense-mediated decay*): degradación mediada por codones sin sentido

nt: nucleótido

pb: pares de bases

PCR (del inglés *polymerase chain reaction*): reacción en cadena de la polimerasa

pre-ARNm: ARNm precursor

PTC (del inglés *premature termination codon*): codón de terminación prematuro

RBM (del inglés *RNA binding motif*): motivo de unión al ARN

RE: receptor de estrógenos

RFU (del inglés *relative fluorescence units*): unidades relativas de fluorescencia

RH: receptor hormonal

RING (del inglés *really interesting new gene*): dominio de *BRCA1*

RNA Pol II (del inglés *RNA polymerase II*): ARN polimerasa II

RNA-seq (del inglés *RNA sequencing*): secuenciación de ARN

RP: receptor de progesterona

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR (del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*): reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

SNP (del inglés *single nucleotide polymorphisms*): polimorfismos de un solo nucleótido

snRNAs (del inglés *small nuclear RNAs*): ARNs nucleares pequeños

snRNPs (del inglés *small nuclear ribonucleoproteins*): ribonucleoproteínas nucleares pequeñas

SR: serina y arginina

SREs (del inglés *splicing regulatory elements*): elementos reguladores del *splicing*

Tm (del inglés *melting temperature*): temperatura de fusión

TNBC (del inglés *triple negative breast cancer*): cáncer de mama triple negativo

VUS (del inglés *variants of uncertain significance*): variantes de significado incierto

wt (del inglés *wild type*): tipo silvestre, no mutado

1. INTRODUCCIÓN

SPLICING

1) DEFINICIÓN

En 1977, Philip A. Sharp y Richard J. Roberts, identificaron moléculas de ARN que contenían secuencias provenientes de regiones no contiguas en el genoma viral (1,2). Así, dedujeron la existencia de secuencias de ADN que están ausentes en los transcritos finales de ARN mensajero (ARNm), y por tanto, no son traducidas a proteínas (3). En 1993, ambos investigadores recibieron el premio Nobel de Medicina (4), sentando las bases para la posterior definición del *splicing* del ARN. En la transcripción, la ARN polimerasa II (RNA pol II) sintetiza una molécula de ARNm precursor (pre-ARNm) que debe someterse a una serie de modificaciones postranscripcionales, como son la poliadenilación del extremo 3' y la adición de la caperuza del extremo 5'. Además, las regiones no codificantes del transcrito (intrones), que representan hasta el 90% de la unidad de transcripción (5), deben ser eliminadas, mientras que los exones, que sí codifican información, son unidos consecutivamente mediante el proceso bioquímico de *splicing*. Esto garantiza el mantenimiento de un marco de lectura correcto para originar un ARNm maduro, capaz de migrar al citoplasma celular y ser traducido en una proteína funcional. El *splicing* es esencial en la expresión génica eucariota, ya que más del 95% de los genes humanos requieren el procesamiento de su pre-ARNm (6), por ello debe estar muy regulado.

2) REACCIÓN DE *SPLICING*

El *splicing* es catalizado por el espliceosoma, una maquinaria enzimática que identifica los sitios de *splicing* y regula este proceso. Distinguimos entre dos complejos macromoleculares altamente dinámicos, el espliceosoma mayor y el menor, ambos formados por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) y más de 150 proteínas asociadas (7). El espliceosoma mayor, que contiene los ARNs nucleares pequeños (snRNAs) U1, U2, U4, U5 y U6, procesa aproximadamente el 95,5% de los intrones (8). La función del espliceosoma depende del reconocimiento de secuencias consenso que determinan los límites exón-intrón: el sitio donador o sitio 5' de *splicing* (5' ss), el sitio aceptor o sitio 3' de *splicing* (3' ss), el punto de ramificación y el tracto de polipirimidinas, que junto con los elementos reguladores del *splicing* (SREs), constituyen el código del *splicing*. El ensamblaje del espliceosoma (Figura Suplementaria 1) sobre el pre-ARNm, comienza con el emparejamiento de bases de los snRNAs y las secuencias de los sitios de *splicing*. El 5' ss es reconocido por U1, mientras que el 3' ss es identificado por las proteínas U2AF1, U2AF2 y SF1, que reconocen el dinucleótido AG, el tracto de polipirimidinas y el punto de ramificación, respectivamente. El siguiente paso consiste en la unión de la snRNP U2 alrededor del punto de ramificación. La proteína SF3B1 (componente del complejo U2), tras su unión al pre-ARNm, facilita un cambio conformacional que aproxima la adenosina del sitio de

ramificación al 5'ss (9). En este contexto, el punto de ramificación, generalmente situado a menos de 50 nucleótidos *upstream* del 3'ss, reacciona con el 5'ss para proceder al procesamiento de los intrones (Figura Suplementaria 2), completando así la primera etapa del *splicing* (7). En el espliceosoma menor, las snRNPs U11 y U12 presentan funciones equivalentes a U1 y U2 en el reconocimiento de los sitios de corte 5' y 3', respectivamente; y ZRSR2 participa en el reconocimiento del 3'ss de forma análoga a U2AF1(10). Así, el espliceosoma es reclutado hacia los sitios de *splicing* gracias a la asociación dinámica de los factores de *splicing* con la RNA pol II y elementos del ARN (7), y se activa tras la incorporación del complejo tri-snRNP U4-U5-U6 (10). Esta dinámica red de interacciones culmina con el ensamblaje del espliceosoma y la activación de su núcleo catalítico, generando un ARNm maduro (7).

3) REGULACIÓN DEL *SPLICING*

MICROEXONES

La eficiencia del *splicing* está influida por el tamaño variable de intrones y exones. De media, los exones miden ~120 nt (11) y los intrones ~5,4kb (12), lo que dificulta el procesamiento de los intrones largos (>24 kb) y los microexones (<51 nt), que requieren de una compleja red de regulación (13). Aunque solo un 1,6% de los genes humanos contiene microexones (14), estos tienen importantes efectos regulatorios en funciones neurológicas y en trastornos del espectro autista. La mayoría de los microexones (80-90%) conserva el marco de lectura (15). Según el modelo de definición de exones, el espliceosoma se estabiliza gracias a las interacciones entre los sitios de *splicing*, siendo óptimas las longitudes de exones entre 50 y 250 nt (16). Sin embargo, en los microexones, este acoplamiento se ve dificultado por restricciones alostéricas, lo que requiere señales adicionales para su inclusión. Así, los microexones dependen de sitios de *splicing* 3' y 5' más fuertes y de intrones flanqueantes más cortos, enriquecidos en motivos *enhancer* (11).

ELEMENTOS REGULADORES DEL *SPLICING* (SREs)

El *splicing* está estrechamente regulado por una red de elementos en *cis* (SREs), a los cuales se unen en *trans*, factores reguladores del *splicing*, con el objetivo de modular la expresión del ARNm (17). Los SREs, son motivos de secuencia de ARN que incluyen: los potenciadores exónicos (ESEs) e intrónicos (ISEs) del *splicing*, que promueven el proceso de *splicing* al unirse proteínas de la familia SR (ricas en Ser y Arg); así como los represores exónicos (ESSs) e intrónicos (ISSs) del *splicing*, que inhiben el proceso de *splicing* normalmente a través de la unión de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) (5). Estas interacciones influyen en la eficiencia del reconocimiento de los sitios de *splicing* por parte de las snRNPs U1 y U2 al reclutar los factores de *splicing* o al interferir con etapas específicas del ensamblaje del espliceosoma (16). Dentro de los factores reguladores del *splicing*, se incluyen miembros de diversas familias de proteínas (SR y hnRNPs) que presentan motivos de unión al ARN (RBM) (9) (Figura Suplementaria 1), las cuales tienen funciones tanto activadoras como represoras, dependiendo del

contexto celular y su localización (18,19). Además, las proteínas SR, participan en los procesos de transcripción y traducción (19), mientras que las hnRNPs intervienen en numerosos procesos, como el mantenimiento de la estabilidad del ARN, el transporte núcleo-citoplasma, el alargamiento de los telómeros y la regulación génica, entre otros (20).

4) *SPLICING* ALTERNATIVO

El 90-95% de los genes humanos codificantes expresan múltiples isoformas de ARNm a través del *splicing* alternativo de un mismo gen (7), lo que aumenta la versatilidad del transcriptoma y la diversidad del proteoma humano, regulando la expresión génica. Aproximadamente 1/3 de los eventos resultantes del *splicing* alternativo (Figura Suplementaria 3) introducen un codón de terminación prematuro (PTC), provocando la degradación del ARNm mediante la vía *nonsense-mediated decay* (NMD) (21), controlando los niveles de ARNm en la célula. El *splicing* alternativo utiliza las mismas secuencias consenso y SREs que el *splicing* constitutivo, aunque también se han identificado, mediante el análisis de *microarrays*, elementos en *cis* que se asocian en exclusiva con el *splicing* alternativo (5). En comparación con los exones constitutivos, los exones alternativos suelen tener menor longitud y el 5'ss es más débil, sin embargo los SREs están más conservados, reflejando su importancia en la inclusión de exones alternativos (19).

5) CORRELACIÓN *SPLICING*-ENFERMEDAD

Se estima que el 60% de las mutaciones que causan enfermedades afectan el *splicing*, incluyendo un 25% de las mutaciones sinónimas. La patogenicidad de estas variantes viene dada por la modificación de las secuencias consenso de motivos de reconocimiento o reguladores, la creación de sitios de *splicing* crípticos, y, consecuentemente, por la producción de transcritos aberrantes que, afectan a la función proteica (5). Las mutaciones en los elementos en *cis* afectan al *splicing* del gen en cuestión, mientras que las mutaciones en factores en *trans* tienen un efecto pleiotrópico, influyendo sobre la expresión de múltiples genes (16). Asimismo, mutaciones en componentes del espliceosoma y desequilibrios entre los factores reguladores del *splicing* (proteínas SR y hnRNPs) pueden contribuir al desarrollo de enfermedades (5). La eficiencia del *splicing*, modulada por variantes genéticas como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), contribuye a la variabilidad fenotípica, la susceptibilidad y la gravedad de enfermedades (5).

El reconocimiento del *splicing* aberrante como mecanismo patogénico abre un abanico de nuevas estrategias terapéuticas. El uso de ARNs de interferencia y anticuerpos, eliminan transcritos y proteínas anómalos (5). Los oligonucleótidos antisentido (ASOs), como “Nusinersen” (usado en el tratamiento de la atrofia muscular espinal) modulan el *splicing* ya que contienen un motivo de unión de hnRNP (16); y pequeñas moléculas son capaces de modificar la actividad de los factores de *splicing*, bloqueando su reclutamiento sobre las secuencias mutantes (7). Sin embargo, estas terapias suelen estar dirigidas a genes específicos, es decir, limitadas a enfermedades concretas.

SPLICING-CÁNCER

Las alteraciones en el *splicing* contribuyen al inicio y progresión del cáncer, al afectar a oncogenes y genes supresores de tumores, relacionados con la proliferación, la migración celular y la resistencia a los tratamientos. Estas alteraciones se deben principalmente a cambios en los factores que actúan en *trans*, pues hasta un 84% de las proteínas de unión al ARN y >70% de los factores de *splicing* están desregulados en el cáncer (22). Así, se han observado mutaciones en SF3B1, con una prevalencia del 5% en cáncer de mama (9); sobreexpresión de la proteína SR SF2/ASF en 20-50% de los cánceres (23); y alteraciones en las proteínas hnRNPs, favoreciendo la transición epitelio-mesénquima (20). Los patrones de *splicing* de las células tumorales, sirven como biomarcadores diagnósticos y pronósticos, generando neoantígenos útiles para el desarrollo de inmunoterapias (9). Además, las células tumorales dependen de una maquinaria de *splicing* menos eficiente para generar isoformas beneficiosas para su proliferación (como las antiapoptóticas (24)). Esto las hace especialmente vulnerables a las perturbaciones en el *splicing*, ofreciendo oportunidades terapéuticas selectivas para las células cancerígenas.

CÁNCER DE MAMA

1) GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CM), es una enfermedad multifactorial, que representa un tercio de los tumores malignos en mujeres con una tasa de mortalidad del 15%. El proceso de carcinogénesis comienza con el aumento del número y el estado proliferativo de las células epiteliales, que acumulan mutaciones y progresan a un carcinoma. La presentación clínica varía desde una masa indolora hasta signos como cambios en la piel o secreción del pezón (25). En cuanto a la clasificación del CM (26): desde un punto de vista histológico, distinguimos entre el carcinoma invasivo y el carcinoma lobulillar; considerando la evaluación inmunohistoquímica, receptor hormonal (RH) [receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP)] positivo/ factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) negativo, HER2 positivo y cáncer de mama triple negativo (TNBC); y basados en la expresión génica se distinguen, los subtipos luminal A, luminal B, enriquecido en HER2- y *Basal-like* (TNBC) (25).

2) GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

Según su etiología, el CM puede ser esporádico (70-80%), familiar (15-20%) o hereditario (5-10%) (27). El primer caso de cáncer de mama hereditario (CMH) fue reportado por P. Broca en 1866, y en 1971, Knudson estableció las bases genéticas con el modelo de los “dos golpes”, que explica la necesidad de una mutación germinal y otra somática para el desarrollo del tumor (28). Hay varios genes de predisposición al CMH como *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D* y *TP53* (29), los cuales codifican proteínas supresoras de tumores

encargadas de mantener la estabilidad genómica, principalmente a través de la vía de reparación por recombinación homóloga ([Figura Suplementaria 4](#)). Las mutaciones patogénicas de *splicing* son especialmente abundantes en este grupo de genes ([30](#)), no obstante, el riesgo relativo de desarrollar CM varía según el gen y las variantes específicas ([28](#)). Por ello, el estudio de estas variantes es esencial para comprender su significado clínico y así clasificarlas según la guía ACMG-AMP, como patogénicas, probablemente patogénicas, variantes de significado incierto (VUS), probablemente benignas o benignas ([31](#)).

3) *BRCA1*

El gen supresor de tumores *BRCA1* (MIM 113705), ubicado en la hebra antisentido del cromosoma 17 (17q), fue identificado en 1994 y es uno de los principales genes de susceptibilidad al CM, con un riesgo relativo de 7,62 ([32](#)). Las mutaciones en *BRCA1*, en particular aquellas que afectan a los dominios RING y BRCT1 ([33](#)), presentan un riesgo del 57-65% de desarrollar CM en mujeres antes de los 70 años, y del 48% de cáncer de ovario, mientras que en hombres el riesgo de CM es del 1,2% ([28](#)), existiendo en ambos casos una asociación más fuerte con el TNBC ([33](#)). La frecuencia de las variantes en *BRCA1* difiere entre las poblaciones. En CyL destaca la mutación fundadora c.5153-1G>A, que altera el *splicing* del microexón 19 de *BRCA1* y representa el 18,4% de las familias con este gen mutado ([34](#)). El estudio funcional de estas variantes, especialmente sobre el *splicing*, es fundamental para determinar su patogenicidad en el CMH([16](#)), mejorando el asesoramiento genético y el manejo clínico de los pacientes portadores de estas mutaciones ([28](#)).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El aumento de variantes genéticas identificadas, la mayoría de ellas con relevancia clínica desconocida, en genes como *BRCA1*, complica el manejo del cáncer de mama hereditario. Existe una evidencia creciente que indica que muchas de estas variantes interrumpen el proceso de *splicing*, generando transcritos anómalos que alteran la proteína expresada, aumentando el riesgo de desarrollar la enfermedad. Estudiar la maquinaria de *splicing*, gracias al desarrollo de ensayos funcionales mediante el uso de minigenes híbridos, permite distinguir las mutaciones patogénicas de los polimorfismos benignos. Esto resulta clave para mejorar el diagnóstico precoz y ofrecer estrategias personalizadas en el asesoramiento genético del cáncer de mama hereditario.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es caracterizar las variantes de *splicing* del microexón 19 del gen *BRCA1*, y analizar su impacto en el cáncer de mama hereditario, a través de minigenes reporteros de *splicing*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Introducción de las variantes de *BRCA1* susceptibles de alterar el proceso de *splicing* en el minigen mgBRCA1_14-20 wt estabilizado.
- Mapeo funcional de los SREs necesarios para la inclusión del microexón 19 de *BRCA1* en el ARNm.
- Evaluación del impacto en el *splicing* de una mutación fundadora de la población de CyL y otras 2 variantes de los sitios de *splicing* del microexón 19.
- Clasificación clínica de las variantes espliceogénicas con el propósito de ofrecer un asesoramiento adecuado en las consultas de consejo genético.
- Evaluación del impacto global del *splicing* en la susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama y ovario.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

BIOINFORMÁTICA

1) BASES DE DATOS

ClinVar

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) es una base de datos pública que recopila las variantes genéticas humanas que han sido reportadas junto con su asociación con enfermedades y respuestas a diferentes medicamentos. Además, permite consultar las interpretaciones funcionales sobre el impacto de cada variante, gracias a las contribuciones de múltiples grupos de investigación. La nomenclatura utilizada para describir las variantes genéticas se ajusta a la guía HGVS (<https://hgvs-nomenclature.org/stable/>), usando como referencia la secuencia NM_007294.4, correspondiente al transcrito ENST00000357654.9 de *BRCA1*.

Considerando los datos disponibles en ClinVar, se realizó una selección de variantes, candidatas a alterar el proceso de *splicing*, para su posterior estudio funcional. Se priorizaron aquellas con un mayor número de registros ([Tabla Suplementaria 1](#)) y, siempre que fuera posible, que no hubieran sido evaluadas previamente mediante estudios funcionales. Así, se seleccionaron: dos variantes control localizadas en los sitios de *splicing*, una en el aceptor (c.5153-1G>C) y otra en el donador (c.5193+1G>T); además de la variante c.5153-1G>A, fundadora de CyL.

Ensembl

La base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) ha sido utilizada para consultar las secuencias consenso del gen *BRCA1*, las cuales son imprescindibles tanto para el análisis de los resultados, mediante la comparación entre la secuencia obtenida tras la introducción de la variante de interés y la secuencia *wild type* (wt), como para la obtención de las secuencias necesarias en el diseño de los *primers* empleados a lo largo del procedimiento experimental. Además, Ensembl muestra anotaciones a nivel de los genes, incluyendo el tamaño de exones e

intrones, regiones UTR, presencia de secuencias repetitivas... lo que permite considerar el contexto genómico presente en torno al exón de interés.

2) PROGRAMAS

El estudio *in silico* de las variantes de interés se ha realizado con el uso de diversos programas bioinformáticos, con el objetivo de predecir el impacto que podrían tener dichas alteraciones sobre el proceso de *splicing*.

MaxEntScan

El programa MaxEntScan (MES; http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) permite conocer la fortaleza del sitio de *splicing*, tanto a nivel de la secuencia wt como de la secuencia mutada, pudiendo observar si la variante estudiada fortalece, debilita o conserva el sitio de *splicing* canónico. El cálculo del MES *score* para cada variante se obtiene a través de un *script* ([código](#)) desarrollado en el programa RStudio ([35](#)).

HEXplorer

HEXplorer (<https://rna.hhu.de/HEXplorer/>) es una herramienta que aporta una estimación de cuáles son las regiones ricas en elementos reguladores del *splicing* (SREs). Así, analizando las diferencias entre las secuencias de referencia y las mutantes, podrá predecir el impacto de una mutación exónica en el reconocimiento del exón. No obstante, la existencia de estas regiones ([Figura 3](#)) debe ser corroborada a nivel funcional, es por ello que se procede al diseño de dos microdeleciones solapantes de 21 nt (c.5154_5174del) y 19 nt (c.5172_5190del), a nivel del microexón 19 de *BRCA1*, de manera que al realizar su estudio a través de los minigenes reporteros de *splicing*, se podrá comprobar la presencia de estos SREs a nivel de las regiones delecionadas.

SpliceVault

SpliceVault (<https://kidsneuro.shinyapps.io/splicevault/>) predice el efecto de las variantes genéticas sobre el proceso de *splicing*, a partir del análisis de 300000 muestras de RNA-seq. Esta herramienta no solo permite identificar posibles alteraciones en el *splicing*, como el *skipping* de exones o el uso de sitios crípticos, sino que también proporciona el porcentaje de ocurrencia de dichos eventos a nivel fisiológico.

Es importante tener en cuenta que, en el caso de *BRCA1*, la nomenclatura utilizada por SpliceVault omite el exón 4 no codificante, por lo que el exón que estamos estudiando será designado como el número 18.

Mutalyzer

El programa Mutalyzer (<https://v3.mutalyzer.nl/>) permite conocer los cambios producidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína a partir de los cambios presentes a nivel del ARN, como resultado de la introducción de una variante. Además, indica la posición exacta en la que va a aparecer un PTC, en aquellos casos donde se genere un transcrito aberrante que origina un cambio en el marco de lectura. Todo ello conforme a la nomenclatura establecida por la HGVS.

ENSAYOS FUNCIONALES DE *SPLICING*

Con el fin de estudiar el impacto de las variantes seleccionadas sobre el proceso de *splicing*, se ha realizado un ensayo funcional mediante el uso de minigenes reporteros de *splicing* (Figura 2). Los minigenes son un constructo molecular que replica a pequeña escala el gen humano de interés, sin necesidad de disponer de muestras biológicas procedentes de pacientes. No obstante, pese a ser un estudio experimental, este presenta una aplicación traslacional, ya que todos estos resultados tienen un impacto directo en las consultas de asesoramiento genético.

1) CONSTRUCCIÓN DEL MINIGEN

En este estudio se ha empleado el minigen mgBRCA1_14-20 (Figura 1), previamente diseñado a partir de la inserción del ADN de interés (los exones 14 a 20 de *BRCA1*, Figura Suplementaria 5) en el vector pSAD mediante un proceso de clonación con enzimas de restricción. Además, con el objetivo de conservar el contexto genómico, fueron clonadas las regiones flanqueantes a estos exones (el intrón completo si es menor de 1000 nt, o 200 nt a cada lado si es mayor, evitando la introducción de nuevos sitios de *splicing*, o el fortalecimiento de sitios crípticos o regiones *enhancers*).

Una vez el minigen generaba un transcrito con un tamaño y una estructura esperados (Figura Suplementaria 6), se procedió a realizar una retransformación para aumentar la cantidad de minigen wt disponible. Para ello, se añadieron de 1 a 2 ng de minigen a las bacterias competentes (XL-10 Gold).

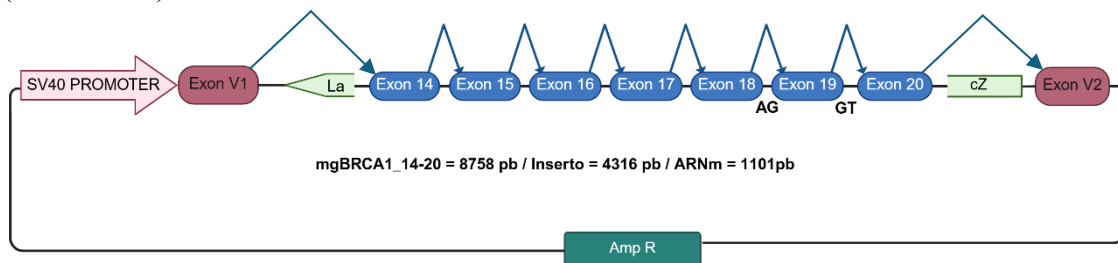


Figura 1. Estructura del minigen mgBRCA1_14-20wt.

El minigen mgBRCA1_14-20 tiene un tamaño de 8758 pb con un inserto de 4316 pb que incluye los exones 14 a 20 del gen *BRCA1*. Esto ha sido introducido en el sitio de clonación múltiple (MCS) dentro del gen LacZ, a nivel del vector pSAD, el cual contiene su propio promotor y los exones constitutivos V1 y V2. La presencia del gen de resistencia a la Ampicilina permite la selección de aquellas bacterias transformadas con el minigen. Las flechas indican las reacciones de *splicing* esperadas en células eucariotas. Figura de elaboración propia (36).

2) MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Para proceder al desarrollo de los ensayos funcionales de *splicing*, sobre los plásmidos del minigen wt se introducen las variantes de interés a través del proceso de mutagénesis dirigida, generando así minigenes mutantes. Para la inserción de cada variante es necesario el diseño de unos *primers* específicos (Tabla Suplementaria 2), para lo que se emplea el programa “Oligo7” (37). El proceso de mutagénesis dirigida se realizó con el kit “Quikchange Lightning Site-directed mutagenesis (Agilent, Santa Clara, CA, USA)”, añadiendo 50 ng del minigen wt.

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

A continuación, gracias al proceso de transformación bacteriana, el minigen mutante es introducido en bacterias competentes. Se emplea: β -mercaptoetanol, para aumentar la permeabilidad de la membrana bacteriana y facilitar la entrada del ADN del minigen; y *DpnI*, para eliminar el ADN metilado presente en la copia parental, seleccionando de esta manera únicamente aquellos vectores que han sufrido la reacción de mutagénesis. Posteriormente, se procede a la selección de las colonias recombinantes, que son incubadas durante 24 horas en el agitador a 200 rpm con el medio de cultivo líquido LB. El siguiente paso consiste en la extracción del ADN de las muestras de cultivo líquido empleando el kit “EasyPure Plasmid Miniprep (Transgen Biotech, Beijing, China)”.

TRANSFECCIÓN CELULAR

Se procede a comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas, a través de la secuenciación con *primers* específicos ([Tabla Suplementaria 3](#)) de 100ng/kb del ADN extraído. Una vez verificada la introducción de la variante de interés, 1000 ng de los minigenes son transfectados a las células MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano), usando lipofectamina LTX y *Plus Reagent* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) que mejoran la eficiencia de la transfección.

EXTRACCIÓN ARN, RT-PCR

Tras un periodo de incubación de 48 horas, se añaden 1,5 μ L de cicloheximida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por pocillo para inhibir la degradación de transcritos por el mecanismo de *nonsense-mediated decay*, y se procede a la extracción del ARN utilizando el kit “Genematrix Universal RNA Purification (EURx, Gdansk, Polonia)”. Seguidamente, el ARN es sometido a un proceso de RT-PCR empleando el kit “RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Life Technologies)”. Los *primers* empleados para la retrotranscripción del ARN son específicos de los exones constitutivos del vector (V1 y V2), SD6-PSPL3_RT-FW y RT-PSPL3-Rv, respectivamente, los cuales permiten amplificar exclusivamente el ARN derivado del minigen.

AMPLIFICACIÓN

A partir del cDNA obtenido del proceso de RT-PCR, se procede a su amplificación mediante PCR empleando 1 μ L de cDNA por cada 25 μ L de volumen final, 10x PCR Rxn *Buffer* (-MgCl₂), MgCl₂, dNTPs, el enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies) y los *primers* específicos ([Tabla Suplementaria 4](#)). Si la amplificación está destinada al análisis por fragmentos, se utiliza un *primer* marcado fluorescentemente y se reduce el número de ciclos a 26, para contrarrestar la amplificación preferencial de fragmentos pequeños. En cambio, para estudios de secuencias, se realizan 35 ciclos. A nivel del termociclador, se ajusta el tiempo de extensión en función del tamaño del producto amplificado (1 min/kb $\rightarrow$ para 1101 pb será necesario 1 min 6 seg) y la temperatura de anillamiento, calculada en función de la temperatura de desnaturalización (*T_m*) de los *primers*, utilizando como referencia la *T_m* más baja - 2 °C. En todos los casos el tamaño de los fragmentos amplificados fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa

al 1%, utilizando como referencia el marcador de tamaño 1kb Plus DNA *Ladder* (Invitrogen).

3) ANÁLISIS DE RESULTADOS

SECUENCIACIÓN

El producto de la RT-PCR se purifica usando el kit “NZYGelPure Kit (NZY Tech, Lisboa, Portugal)” y se prepara para el análisis mediante secuenciación Sanger, añadiendo 5 ng por cada 100 pb en un volumen final de 10 µL, al que se añaden 2,5 µL del *primer* correspondiente (RT_Pspl3_Fw / RTpSAD_A-RV). Para proceder al análisis de las secuencias, se emplea la herramienta “SnapGene Viewer” (38), que permite analizar las secuencias de los transcritos producidos por las diferentes variantes de estudio a nivel del gen *BRCA1*.

CARACTERIZACIÓN DE TRANSCRITOS

De forma paralela, el cDNA es analizado por electroforesis capilar de fragmentos fluorescentes (3 réplicas/variante), lo que permite la identificación de los transcritos, generados tras el proceso de *splicing* del pre-ARNm. Estos resultados son evaluados con el “Software Peak Scanner V1.0 (Life Technologies)” (39), que discrimina los fragmentos (picos) obtenidos, incluso aquellos que difieren en un único nt. Así se realiza una estimación precisa del porcentaje de cada tipo de transcrito.

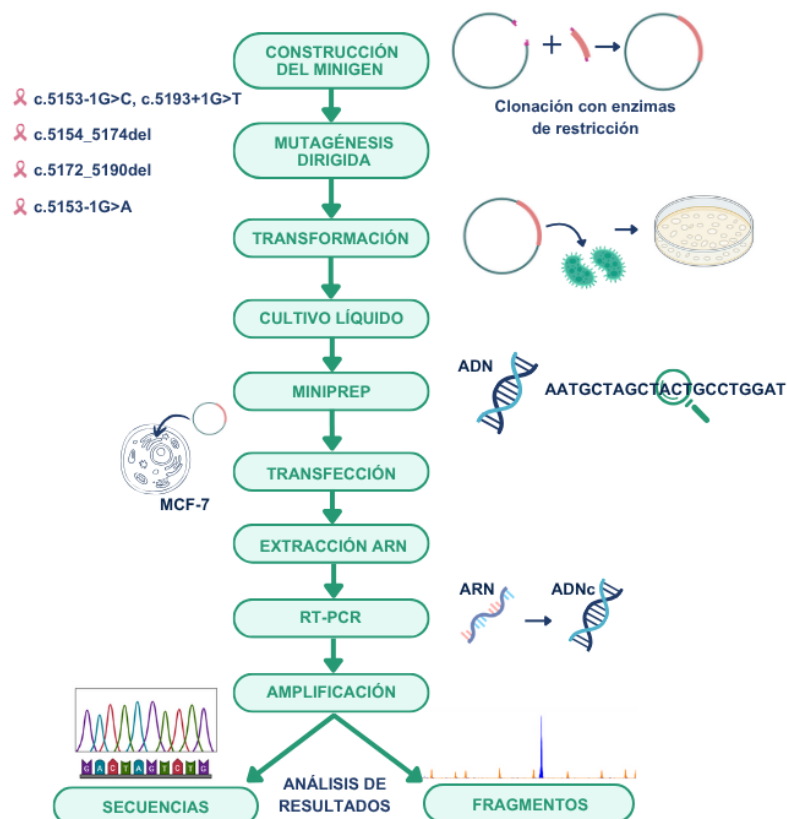


Figura 2. Workflow del ensayo funcional mediante minigenes reporteros de *splicing*.

Resumen gráfico del procedimiento realizado en el laboratorio para lograr la obtención de los resultados, tanto de secuencias como de fragmentos, de las variantes genéticas de estudio a nivel del microexón 19 de *BRCA1*. *Figura de elaboración propia.*

4. RESULTADOS

ANÁLISIS *IN SILICO*

A partir de las variantes seleccionadas, según su número de registros y los estudios funcionales previos, consultados en ClinVar, se procedió a su análisis *in silico* para evaluar si eran candidatas de alterar el proceso de *splicing*. Según los criterios de la guía ACMG-AMP (31) las tres variantes puntuales analizadas (c.5153-1G>C, c.5153-1G>A y c.5193+1G>T) han sido clasificadas como patogénicas en la base de datos de ClinVar. En particular, las variantes que alteran el sitio aceptor de *splicing*, presentan tres estrellas en esta base de datos, lo que indica que su interpretación ha sido revisada y validada por expertos. La variante que afecta al sitio donador cuenta con dos estrellas, lo que refleja una evidencia suficiente para sustentar su clasificación, aunque con un nivel de consenso ligeramente menor. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio experimental aportan evidencia funcional adicional que puede integrarse con datos de otros experimentos para fortalecer la evaluación general de la patogenicidad de estas variantes. Esto será clave para mejorar la interpretación clínica de las variantes de *BRCA1* ensayadas, con el objetivo de que los pacientes puedan beneficiarse a nivel de la práctica médica.

En relación con los resultados del MES score, obtenidos al ejecutar el [código](#) en R para cada una de las variantes analizadas, la [Tabla 1](#) muestra que aquellas mutaciones que afectan a los sitios de *splicing* canónicos tienden a debilitarlos significativamente. Se estima que la variante c.5153-1G>C reduce la fortaleza del sitio aceptor AG en un 91,89%, mientras que la c.5153-1G>A lo hace en un 99,70%. Por otro lado, la variante c.5193+1G>T produce un debilitamiento del 76,8% del sitio donador GT. En el caso de las microdeleciones, c.5154_5174del, parece fortalecer el sitio 3' de *splicing* en un 9,33%, mientras que la μ del c.5172_5190del en un principio no muestra un impacto relevante sobre la fortaleza de los sitios canónicos. Por otra parte, HEXplorer indica la presencia de elementos reguladores del *splicing* a nivel del microexón 19 ([Figura 3](#)), destacando la gran cantidad de ESEs en esta región, presuntamente necesarios para la inclusión de este exón en el ARNm final.

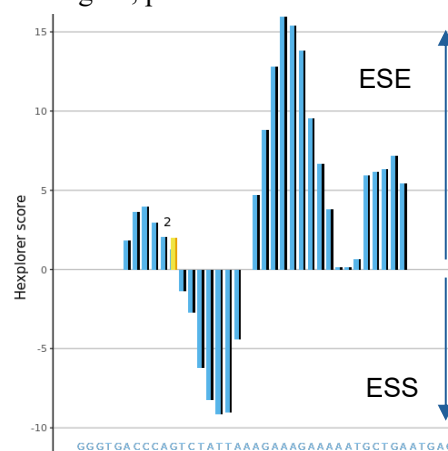


Figura 3. Perfil de HEXplorer del microexón 19 de *BRCA1*.

Los picos indican posibles regiones ricas en ESEs (*exonic splicing enhancers*), mientras que los picos invertidos son regiones probablemente ricas en ESS (*exonic splicing silencers*). En amarillo aparece indicado el sitio donde es posible que se presente un donador críptico (40).

A nivel del microexón 19 de *BRCA1*, SpliceVault ha reportado ciertas modificaciones en el proceso de *splicing* observadas previamente a nivel fisiológico. Se ha descrito el *skipping* de este exón en 68 muestras, el uso de sitios aceptores crípticos localizados 50 nt *upstream*, en 12 muestras, y 11 nt *downstream* en 11 muestras. Además, en 6 muestras, se ha identificado el uso de un sitio donador críptico situado 5 nt *downstream* del sitio canónico. En conjunto, todas estas herramientas bioinformáticas, han aportado una estimación del impacto que tienen las variantes genéticas de estudio sobre el proceso de *splicing*.

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL *SPLICING*

1) MINIGEN mgBRCA1_14-20

El minigen mgBRCA1_14-20, empleado para el desarrollo de los ensayos funcionales de *splicing* ([Figura 1](#)), permite mantener el contexto genómico en torno al microexón 19, la región donde se localizan las variantes genéticas analizadas. El uso de minigenes híbridos permite analizar el efecto de las variantes sobre el *splicing*, especialmente cuando no se dispone de ARN de pacientes. Antes de realizar al ensayo funcional de las variantes, se verificó la estabilidad y reproducibilidad del minigen, analizando su secuencia y los transcritos generados ([Figura Suplementaria 6](#)). El análisis de fragmentos reveló el patrón de *splicing* generado por el minigen wt, cuyos resultados se muestran en la [Tabla 1](#), indicando la expresión mayoritaria del transcrito *full length* (92,1%) y dos isoformas minoritarias que producen transcritos aberrantes, alterando el marco de lectura: el *skipping* del exón 14 ($\Delta(E14)$), y el uso de un sitio donador críptico localizado 11 nt *upstream* del sitio canónico 5' ($\Delta(15q11)$), eliminando los últimos 11 nt del exón 15.

2) VARIANTES EN LOS SITIOS DE *SPLICING*

Los ensayos funcionales de las variantes de *splicing* fueron realizados a través de minigenes mutantes, generados mediante mutagénesis dirigida a partir del minigen wt. La amplificación del cDNA en gel de agarosa para cada variante, en comparación con la wt ([Figura 5](#)), permite identificar los transcritos principales que han sido generados por cada mutación. Esto nos permite observar su impacto en el *splicing*, ya que las bandas correspondientes a las variantes presentan un tamaño ligeramente inferior al wt, lo cual es compatible con el *skipping* del exón 19. Sin embargo, la banda de la variante c.5153-1G>A muestra un tamaño muy similar al transcrito del wt, lo que sugiere un efecto distinto sobre el proceso de *splicing*. Gracias a la secuenciación de las bandas del gel de agarosa y al análisis por electroforesis capilar de fragmentos fluorescentes ([Figura Suplementaria 7](#)), se han podido confirmar los eventos de *splicing* alternativo producidos como consecuencia de las variantes. El reconocimiento del sitio aceptor del microexón 19 se ha visto afectado por las variantes c.5153-1G>C y c.5153-1G>A, que han producido la pérdida total del transcrito *full length*. En ambos casos la fortaleza del sitio 3' de *splicing* canónico se ha visto debilitada, como se ha explicado previamente en base a los valores del MES score. Los resultados

(Tabla 1) muestran que el cambio de guanina, en posición c.5153-1, por citosina, resulta principalmente en la pérdida del microexón 19 [$\Delta(E19)$], generando un 95,5% de este transcrito, el cual origina un PTC dos codones después de la alteración (p.(Trp1718SerfsTer2) ver en Tabla 2) resultando en el truncamiento de la proteína *BRCA1*. Por otro lado, la variante **c.5153-1G>A**, descrita como fundadora de la población de CyL (34), produce el *splicing* aberrante del microexón 19 al omitir el sitio aceptor del intrón 18 y generar un nuevo sitio AG localizado 1 nt *downstream*. Esto produce la delección del primer nt del exón 19 y por tanto un cambio en el marco de lectura, codificando un PTC en el siguiente codón (p.(Val1719Ter) Tabla 2). Este transcrito [$\Delta(E19p1)$] representa un 92,5%, mientras que en menores proporciones se observan otras isoformas aberrantes: $\Delta(E14,17)$, $\Delta(E14)$ y $\Delta(E15q11)$. En la figura 4 se muestra la confirmación por secuenciación de los dos transcritos principales generados por estas variantes. En el caso de la variante **c.5193+1G>T**, los resultados (Tabla 1) muestran que ha alterado el reconocimiento del sitio donador. El sitio de *splicing* canónico se había debilitado en un 76,8%, un porcentaje algo menor que en el caso de las variantes anteriores, por lo que se llega a presentar el transcrito *full length* aunque en cantidades ínfimas (2,4%). El transcrito mayoritario de nuevo ha sido el $\Delta(E19)$, representando un 89,2%, que al igual que el transcrito $\Delta(E19p1)$, contiene un PTC que inducirá su degradación por la vía NMD. Por tanto, ambas isoformas se asocian a una pérdida de función de *BRCA1*.

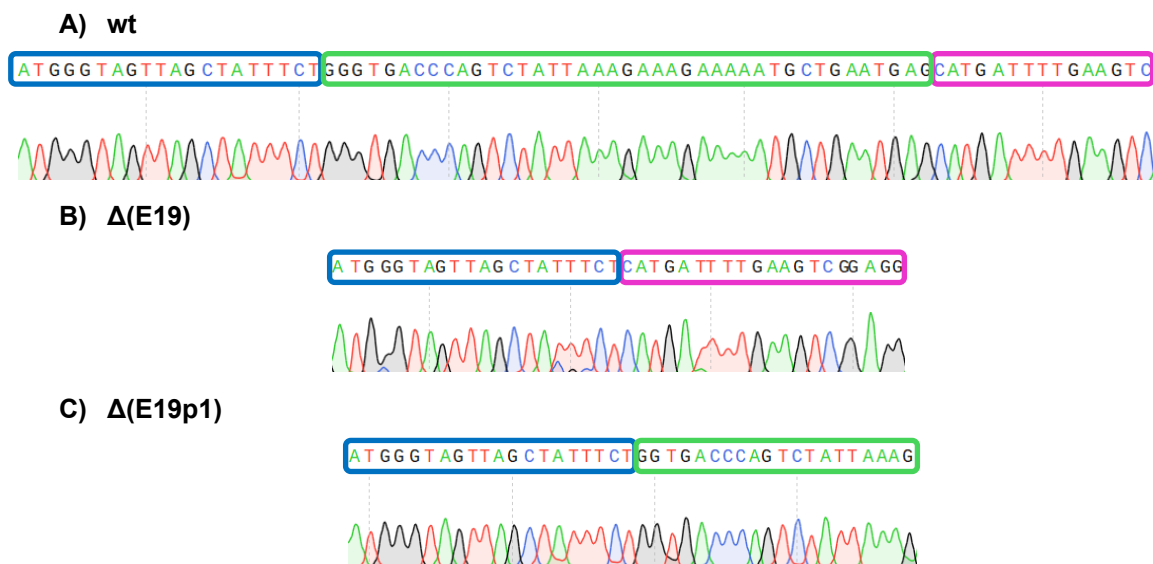


Figura 4. Secuenciación de los transcritos mayoritariamente generados por las variantes c.5193+1G>T, c.5153-1G>C y c.515-1G>A

Se muestran aquellos resultados de *splicing* evidenciados en el análisis de fragmentos que han podido ser confirmados mediante secuenciación Sanger. **A.** Representa la secuencia wt del minigen mgBRCA1_14-20 acotada a la zona de estudio. El final del exón 18 se muestra recuadrado en azul, el microexón 19 en verde y el comienzo del exón 20 en rosa. **B.** *Skipping* del microexón 19 de *BRCA1*. Se observa la unión directa del exón 18 con el exón 20. **C.** Uso de un sitio aceptor críptico ubicado 1 nucleótido *downstream* del sitio 3' de *splicing* canónico, produciendo la eliminación del primer nucleótido del exón 19. *Figura de elaboración propia.*

Tabla 1. Resultados del análisis funcional de *splicing* de las variantes seleccionadas.

VARIANTE	MES	TRANSCRITOS ¹		
		FL	PTC	No caracterizado
mgBRCA1_14–20		92,1 ± 0,3%	Δ(E14) (6 ± 0,3%) Δ(E15q11) (2 ± 0,1%)	
c.5153-1G>C	-91,89%		Δ(E19) (95,5 ± 0,9%) Δ(E14,19) (2 ± 0,2%)	*1051pb (Δ(E19)+Δ(E15q11)) (2,5 ± 0,9%)
c.5193+1G>T	-76,8%	2,4 ± 0,2%	Δ(E19) (89,2 ± 1,3%) Δ(E14,19) (6,5 ± 0,9%)	*1051pb (Δ(E19)+Δ(E15q11)) (1,8 ± 0,3%)
c.5154_5174del	+9,33% (3'ss)	45,3 ± 2%	Δ(E19) (50,4 ± 2,2%) Δ(E14,19) (2,8 ± 0,8%)	1107pb (1,5 ± 2,6%)
c.5172_5190del	0%	16,9 ± 0,7%	Δ(E19) (76,9 ± 2,5%) Δ(E14,19) (1,9 ± 0,2%)	481pb (1,8 ± 0,5%) 865pb (1,1 ± 1,9%) 889pb (1,4 ± 1,2%)
c.5153-1G>A	-99,70%		Δ(E14,17) (1,3 ± 0,2%) Δ(E14) (5,1 ± 0,8%) Δ(E15q11) (1,1 ± 0,2%) Δ(E19p1) (92,5 ± 0,9%)	

¹Aparece representado el porcentaje de transcritos que se han generado tras el procesamiento del pre-ARNm, indicando si se corresponden con el transcrito *full length* (1101 pb, 1082 pb o 1080 pb en función de la delección correspondiente de 19 o 21 pb), o si generan un codón prematuro de terminación, así como aquellos que no se han logrado caracterizar. Los transcritos aparecen anotados de la siguiente manera: Δ (*skipping*), E (exón), p (desplazamiento del sitio aceptor) y q (desplazamiento del sitio donador) + número de nt eliminados. Asimismo, se indica el valor del cambio producido en el MES *score*, como resultado de la introducción de la variante. Los porcentajes, presentados entre paréntesis, corresponden al promedio de los valores obtenidos en las tres réplicas del estudio de cada variante. Además, se incluye la desviación estándar, que hace referencia a la dispersión de los datos con respecto a la media.

*El transcrito de 1051 pb se encuentra en proporciones tan pequeñas que no podemos confirmar lo que está ocurriendo a nivel de secuencias, no obstante se propone la combinación de eventos Δ(E19)+Δ(E15q11), ya que el tamaño del transcrito coincide con los supuestos pb eliminados.

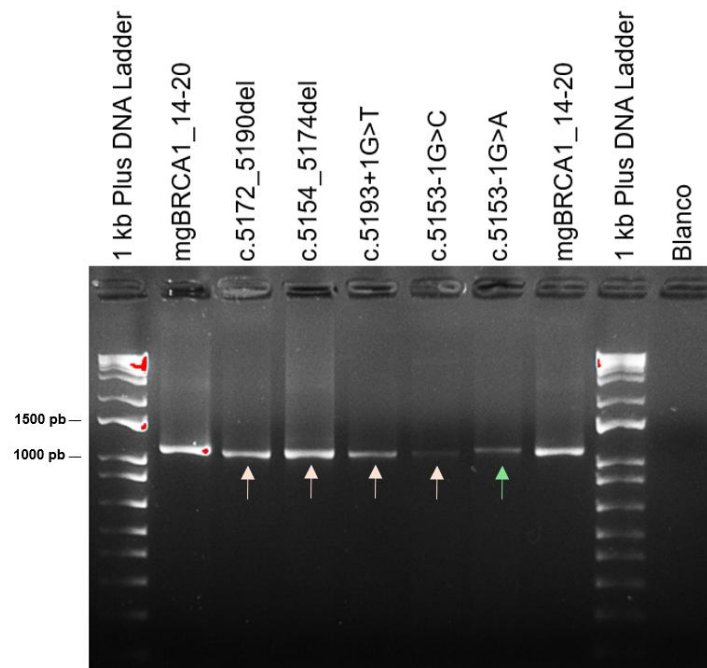


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los transcritos generados por las variantes genéticas de interés.

Se muestra el gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de cDNA, producido por el minigen mgBRCA1_14-20 wt y los minigenes mutantes. Como resultado de la introducción de las variantes, el proceso de *splicing* se ha visto alterado, dando lugar a transcritos de un tamaño diferente al wt (1101 pb). Las flechas indican los patrones anómalos de *splicing*: en el caso de las flechas blancas, el transcrito que aparece representado se corresponde con el *skipping* del microexón 19 [Δ (E19)], que presenta un tamaño de 1060 pb; la flecha verde hace referencia a un transcrito de 1100 pb, que se corresponde con la presencia de un sitio aceptor críptico, ubicado 1 nt *downstream* y que genera la delección de 1 nt [Δ (E19p1)]. *Figura de elaboración propia.*

3) MAPEO DE LOS SREs

Los microexones, como el exón 19 de *BRCA1* (41 nt), requieren de regiones reguladoras del *splicing*, para garantizar su correcta inclusión a nivel del ARNm (11). Para encontrar las zonas que contienen SREs, que parecen estar presentes a nivel de este exón según las predicciones de HEXplorer (Figura 3), se diseñaron dos microdeleciones exónicas solapantes preservando los nucleótidos conservados de los sitios de *splicing* (primer y 3 últimos nt). Ambas alteraron el proceso de *splicing* (Tabla 1), especialmente la μ del c.5172_5190del, que pese a no modificar la fortaleza de los sitios canónicos y expresar un 16,9% de FL, originaba el *skipping* del exón 19 en un 76,9% de los transcritos. Esto evidencia la presencia de ESEs en esta región, ya que al ser eliminados el reconocimiento del exón se ha visto afectado. La μ del c.5154_5174del, presenta un impacto moderado en el *splicing*, ya que un 50,4% de los transcritos se corresponden con Δ (E19), hecho que apunta a la presencia de ESEs. No obstante, esta microdelección expresa un 45,3% de transcrito FL. Esto sugiere la existencia de ESSs, tal y como predice HEXplorer, que equilibran la presencia de ESEs y que son eliminados por la microdelección. Asimismo, las predicciones del

MES indicaban un fortalecimiento del 3'ss del 9,33%, ya que la μ del elimina a partir del segundo nt del exón, que aunque es una posición poco conservada del 3'ss, podría afectar levemente a su fortaleza. En ambas microdeleciones se originan otra serie de transcritos aberrantes en cantidades menores, como el *skipping* de los exones 14 y 19 [Δ (E14,19)] y otros transcritos que no han podido ser caracterizados. Por tanto, este mapeo funcional mediante microdeleciones ha revelado la existencia de secuencias esenciales para el reconocimiento del microexón 19 de *BRCA1*, las cuales pueden constituir zonas calientes donde presumiblemente se concentran variantes espliceogénicas.

Tabla 2. Efecto de los transcritos generados a nivel de ARN y proteína (HGVS).

TRANSCRITOS	Efecto sobre el ARN	Efecto sobre la proteína
* Δ (E14)	r.4358_4484del	p.(Ala1453GlyfsTer10)
* Δ (E15q11)	r.4665_4675del	p.(Gln1556GlyfsTer14)
* Δ (E19)	r.5153_5193del	p.(Trp1718SerfsTer2)
Δ (E14,17)	r.[4358_4484del;4987_5074del]	p.(Ala1453GlyfsTer10)
Δ (E14,19)	r.[4358_4484del;5153_5193del]	p.(Ala1453GlyfsTer10)
Δ (E19p1)	r.5153del	p.(Val1719Ter)
Δ (E15q11)+ Δ (19)	r.[4665_4675del; 5153_5193del]	p.(Gln1556GlyfsTer14)

En esta tabla se presentan los transcritos que se han obtenido tras el proceso de *splicing* en las células, observando su impacto a nivel del ARN y de la proteína.

*Transcritos que han sido descritos fisiológicamente.

4) INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LAS VARIANTES

Todas las variantes analizadas, así como las dos microdeleciones diseñadas, han alterado el proceso de *splicing* (Figura 5). En particular, aquellas ubicadas en los sitios de *splicing* han dejado cantidades insignificantes del transcrito *full length* e incluso las variantes del sitio 3' no han mostrado ningún resto de dicho transcrito (Tabla 1).

El análisis de fragmentos (Figura Suplementaria 7) ha permitido la identificación de 12 transcritos diferentes, generados tanto por el minigen wt como por los minigenes mutantes que contienen las variantes evaluadas. De estos transcritos, 6 han dado lugar a un codón prematuro de terminación (PTC), 1 ha mantenido el marco de lectura, que se corresponde con el transcrito *full length*, y 5 no han podido ser caracterizados, aquellos que representan las isoformas menos abundantes. La presencia de un PTC genera el truncamiento de la proteína (Tabla 2) o la eliminación de algunos de sus dominios, lo que compromete la actividad normal de *BRCA1*. *BRCA1* participa en la vía de reparación por recombinación homóloga (Figura Suplementaria 4) e interacciona con múltiples proteínas contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad genómica (28). Por tanto, alteraciones en *BRCA1* implican un proceso de reparación deficiente de las roturas de doble hebra del ADN, lo que promueve la inestabilidad genómica y favorece la carcinogénesis. En este contexto, las variantes c.5153-1G>C, c.5153-1G>A y c.5193+1G>T deben ser clasificadas como patogénicas, dado que generan transcritos asociados a una pérdida de función de *BRCA1* y están implicadas en la susceptibilidad al cáncer de mama hereditario.

5. DISCUSIÓN

***SPLICING* COMO MECANISMO PATOGENICO**

El *splicing* es el principal mecanismo patogénico que produce alteraciones a nivel de *BRCA1*, representando un 58,5% de las familias con cáncer de mama y ovario hereditario y *BRCA1* alterado (41). Por ello, el estudio de las variantes que alteran este proceso resulta esencial.

Las secuencias flanqueantes a los sitios de *splicing* influyen de manera decisiva en la activación de sitios crípticos, especialmente tras la disrupción de los sitios canónicos (42). Sin embargo, la interrupción de algún ESEs puede no afectar significativamente al *splicing*, en el caso de que el exón en cuestión presente sitios de *splicing* lo suficientemente fuertes como para ser reconocidos de forma eficiente sin depender tanto de los elementos reguladores (SREs) (43). Como se ha observado en este estudio, las variantes analizadas que afectan el *splicing* son deletéreas, ya que inactivan la función de *BRCA1* a través de la eliminación de sus dominios esenciales o al producir el truncamiento de la proteína. No obstante, también puede darse el caso de variantes que presenten efectos más débiles sobre este proceso de *splicing*, de forma que las alteraciones a nivel de la función proteica no sean tan claras y su implicación en la susceptibilidad al cáncer de mama sea incierta, generando variantes de significado incierto (VUS) (41).

PREDICCIONES *IN SILICO*

Las herramientas bioinformáticas que se han empleado, muestran una gran sensibilidad y precisión, ya que los datos que han estimado se asemejan bastante a los resultados obtenidos a nivel de la poyata.

Las predicciones realizadas por el MES *score* se han verificado con los ensayos funcionales mediante el uso de minigenes reporteros de *splicing*, ya que la alteración de los sitios canónicos se asocia con la producción de transcritos aberrantes y una mayor o menor proporción del transcrito *full length* generado por las variantes (Tabla 1). El análisis de fragmentos fluorescentes ha confirmado la clasificación de las variantes en los sitios de *splicing* como patogénicas, tal y como se había reportado en ClinVar. La presencia de regiones reguladores del *splicing*, a nivel del microexón 19, que predecía HEXplorer (Figura 3), se han validado gracias al ensayo con dos microdeleciones solapantes.

Sumado a esto, algunos de los transcritos que han sido generados por los minigenes wt y mutantes, han sido descritos fisiológicamente a nivel de SpliceVault, como son: el *skipping* del exón 14, descrito en 10366 muestras; el uso de un sitio donador críptico 15 nt *upstream* en 121 muestras; y el Δ (E19) a nivel de 68 muestras. Además, los transcritos Δ (E14) y Δ (E15q11) también han sido descritos previamente a nivel fisiológico, a través de un estudio que caracterizó su expresión mediante RNA-seq (44).

ENSAYOS FUNCIONALES MEDIANTE MINIGENES HÍBRIDOS

El reconocimiento de los exones depende de una gran cantidad de parámetros, por ello, cualquier cambio en el ADN deberá ser analizado, en profundidad, para comprobar su impacto sobre el proceso de *splicing*, y así determinar su potencial patogénico.

Un avance importante sería incluir, dentro del análisis rutinario de mutaciones causantes de enfermedades, ensayos que permitan conocer los efectos que tienen las variantes genéticas a nivel del *splicing*. El enfoque ideal sería el análisis mediante RT-PCR del ARNm de los pacientes, específicamente de la región que incluye el exón o intrón afectado y las secuencias flanqueantes. Sin embargo, la principal limitación será la obtención de muestras de ARN a partir de los tejidos relevantes para la enfermedad (45). Otro factor a tener en cuenta es la alta heterogeneidad genética, es decir, que mutaciones en distintos genes pueden originar la misma patología. Esto implica que las variantes individuales sean raras y sea muy difícil obtener datos consistentes sobre su importancia patogénica en base a cohortes de pacientes y estudios de cosegregación familiar (28). Por tanto, existe una necesidad creciente de nuevos métodos que permitan determinar la patogenicidad de las variantes, en función de su impacto en el *splicing*.

Una solución posible podría ser estudiar los efectos de las alteraciones de este proceso en modelos murinos, sin embargo, la conservación de los eventos de *splicing* alternativo entre ratones y humanos es escasa (9). Así, el ensayo funcional con minigenes se plantea como una herramienta valiosa para analizar aquellas variantes susceptibles de alterar el proceso de *splicing*.

FORTALEZAS Y LIMITACIONES

Los minigenes se consideran un método fiable y preciso para el análisis de los patrones de *splicing* resultantes de cualquier variante de ADN, así como para mapear los elementos reguladores clave. Además, son una aproximación directa que no presenta la necesidad de obtener ARN de pacientes. Los análisis funcionales han demostrado que los elementos reguladores del *splicing* son muy complejos, dependiendo en gran medida del contexto genómico (45). Asimismo, este entorno regulatorio es fundamental para determinar los efectos de las variantes y cómo estas contribuyen a la complejidad del transcriptoma (16). Los minigenes, son contruidos con el objetivo de mantener el contexto genómico en torno a la zona de estudio. Por ello, el estudio del proceso de *splicing* mediante esta herramienta, permite conocer de forma específica cómo las variantes en el código de *splicing*, van a influir en el desarrollo de patologías, como el cáncer de mama hereditario.

Así, se demuestra que los ensayos funcionales mediante minigenes reporteros de *splicing* son un método sensible y específico (46) y que además presentan una gran reproducibilidad, como hemos comprobado en el estudio de la variante fundadora de CyL, c.5153-1G>A. Esta variante ha sido descrita en 10 pacientes con cáncer de mama, 2 con cáncer de mama bilateral, 2 con cáncer de ovario y 1 con cáncer colorrectal según el estudio (41). Asimismo, se ha reportado como una

mutación que causa el *splicing* aberrante del exón 19, generando un PTC, de forma que el transcrito será degradado por la vía NMD, originando una proteína truncada en la posición 1719 que interrumpe el dominio BRCT de *BRCA1* (41,47). El ensayo con minigenes ha presentado los mismos resultados que en estos artículos, que a su vez se corresponden con los datos del análisis por RT-PCR del ARNm de los linfocitos de pacientes (34). Esto evidencia la consistencia de los resultados obtenidos por minigenes y la validez de estos.

No obstante, los minigenes no dejan de ser un constructo artificial diseñado para replicar el gen humano de interés, y dado que todos los experimentos se llevan a cabo bajo condiciones controladas, es fundamental tener en cuenta ambos factores a la hora de extrapolar los resultados a la práctica clínica.

Pese a ello, el estudio de las variantes genéticas gracias a los minigenes reporteros de *splicing* aporta una información muy valiosa para las consultas de consejo genético, facilitando la prevención de enfermedades y el desarrollo de terapias personalizadas, al poder interpretar cada variante como benigna, probablemente benigna, VUS, probablemente patogénica o patogénica. Esto refleja cómo los resultados de mi investigación pueden ser aplicables a la práctica clínica, al orientar las estrategias de prevención a los individuos asintomáticos portadores de las variantes patogénicas estudiadas. Así, se aumentará la proporción de familiar con cáncer de mama hereditario que podrán beneficiarse del asesoramiento genético y un manejo clínico personalizado, constituyendo un claro ejemplo de investigación traslacional.

PROYECCIONES FUTURAS

En base a los resultados obtenidos, y con el objetivo de seguir demostrando la aplicabilidad de los minigenes como herramientas para la interpretación clínica de variantes, una posible futura línea de investigación sería el estudio del efecto de la mutación c.5153-1G>T. ClinVar la reporta como patogénica, pero existe una falta de evidencia científica para esta anotación. Sin embargo, al igual que dos de las variantes analizadas en este trabajo, parece alterar el sitio aceptor de *splicing*, por lo que su impacto podría ser verificado a través de un ensayo con minigenes.

Asimismo, podría plantearse el análisis funcional de la variante c.5080G>T, localizada en el exón 18 de *BRCA1*. Esta mutación produce el *skipping* de este exón, al interrumpir una región *enhancer* donde se une la proteína SR (SF2/ASF) y originar una secuencia donde se unen los factores represores hnRNP A1/A2 y DAZAP1 (48). Estos eventos sería interesante validarlos mediante el uso de minigenes híbridos, ya que una misma variante está eliminando un ESE y creando un ESS. Considerando el hecho de que ciertas variantes puntuales afectan a los elementos reguladores del *splicing*, como ocurre con la mutación previamente mencionada, sería interesante identificar las variantes espliceogénicas presentes en las regiones del microexon 19 de *BRCA1* mapeadas en este trabajo. El estudio se centraría en aquellas zonas que a través del mapeo funcional diseñado con las dos microdeleciones, hemos visto que contienen SREs. Los ensayos funcionales de variantes

permitirían identificar si un determinado cambio de nucleótido da lugar a un polimorfismo benigno o a una mutación causante de enfermedad.

A mayores, con el objetivo de garantizar la reproducibilidad de los minigenes, sería relevante ensayar la variante c.5123C>A, una mutación missense que inactiva el gen *BRCA1* mediante un doble mecanismo: la alteración de dominio BRCT y la disminución de la eficiencia del *splicing* a nivel del exón 18, por la unión de una serie de elementos represores (41). Los efectos de esta variante, muy prevalente en CyL, se han observado en pacientes, por ello, compararlos con los hallazgos que revelen los ensayos con minigenes, confirmará la fiabilidad de estos experimentos.

6. CONCLUSIONES

- Las variantes analizadas tienen un impacto severo en el *splicing* del microexón 19 de *BRCA1*, al alterar los sitios canónicos 3' y 5'. El *splicing* aberrante compromete el correcto funcionamiento del gen y constituye un mecanismo etiopatogénico de gran relevancia en el cáncer de mama hereditario. Su clasificación como patogénicas aporta una información esencial que será integrada en las consultas de asesoramiento genético.
- El mapeo funcional mediante microdeleciones ha revelado que el reconocimiento del microexón 19 de *BRCA1* depende de regiones ricas en ESEs.
- Los minigenes reporteros de *splicing* son herramientas útiles para investigar el impacto de las variantes espliceogénicas y los mecanismos regulatorios de este proceso. Además, presentan una gran reproducibilidad, al replicar los efectos observados en pacientes, como demuestran los resultados de la variante fundadora de CyL (c.5153-1G>A).

CONCLUSIONS

- *The analyzed variants have a severe impact on the splicing of BRCA1 microexon 19 by disrupting the canonical 3' and 5' splice sites. Aberrant splicing impairs the proper function of the gene and represents a key etiopathogenic mechanism in hereditary breast cancer. Their classification as pathogenic provides essential information that will be incorporated into genetic counselling.*
- *Functional mapping through microdeletions has revealed that the recognition of BRCA1 microexon 19 depends on regions enriched in exonic splicing enhancers.*
- *Splicing reporter minigenes are useful tools for investigating the impact of spliceogenic variants and the regulatory mechanisms underlying this process. In addition, they exhibit high reproducibility by replicating the splicing effects observed in patients, as is demonstrated by the results obtained for the founder variant from CyL (c.5153-1G>A).*

BIBLIOGRAFÍA

1. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. agosto de 1977;74(8):3171-5.
2. Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*. 1 de septiembre de 1977;12(1):1-8.
3. RNA Splicing | Learn Science at Scitable [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/ma-splicing-introns-exons-and-spliceosome-12375>
4. Richard John Roberts. En: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2025 [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Richard_John_Roberts&oldid=166014886
5. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. octubre de 2007;8(10):749-61.
6. Gallego-Paez LM, Bordone MC, Leote AC, Saraiva-Agostinho N, Ascensão-Ferreira M, Barbosa-Morais NL. Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige. *Hum Genet*. 2017;136(9):1015-42.
7. RNA mis-splicing in disease | Nature Reviews Genetics [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg.2015.3>
8. Turunen JJ, Niemelä EH, Verma B, Frilander MJ. The significant other: splicing by the minor spliceosome. *WIREs RNA*. 2013;4(1):61-76.
9. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer — implications for care | Nature Reviews Clinical Oncology [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41571-020-0350-x>
10. Shen H, Zheng X, Luecke S, Green MR. The U2AF35-related protein Urp contacts the 3' splice site to promote U12-type intron splicing and the second step of U2-type intron splicing. *Genes Dev*. 1 de noviembre de 2010;24(21):2389-94.
11. Ustianenko D, Weyn-Vanhentenryck SM, Zhang C. Microexons: discovery, regulation, and function. *WIREs RNA*. 2017;8(4):e1418.
12. Sakharkar MK, Chow VTK, Kanguane P. Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol*. 2004;4(4):387-93.
13. Non-Canonical Splicing and Its Implications in Brain Physiology and Cancer [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2811>
14. Computational Discovery of Internal Micro-Exons [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://genome.cshlp.org/content/13/6a/1216.long>
15. Li YI, Sanchez-Pulido L, Haerty W, Ponting CP. RBFOX and PTBP1 proteins regulate the alternative splicing of micro-exons in human brain transcripts. *Genome Res*. 1 de enero de 2015;25(1):1-13.
16. Regulation of pre-mRNA splicing: roles in physiology and disease, and therapeutic prospects | Nature Reviews Genetics [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41576-022-00556-8>

17. Genome-wide detection of human variants that disrupt intronic branchpoints | PNAS [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2211194119?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
18. SRP30c Is a Repressor of 3' Splice Site Utilization: Molecular and Cellular Biology: Vol 22, No 12 [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/10.1128/MCB.22.12.4001-4010.2002?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed
19. Howard JM, Sanford JR. The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. WIREs RNA. 2015;6(1):93-110.
20. Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. Hum Genet. 1 de agosto de 2016;135(8):851-67.
21. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes | Nature Reviews Molecular Cell Biology [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrm4063>
22. Large-scale analysis of genome and transcriptome alterations in multiple tumors unveils novel cancer-relevant splicing networks [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://genome.cshlp.org/content/26/6/732.long>
23. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. Nat Struct Mol Biol. marzo de 2007;14(3):185-93.
24. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. Cell Death Dis. 21 de febrero de 2019;10(3):1-12.
25. Breast cancer: pathogenesis and treatments | Signal Transduction and Targeted Therapy [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-024-02108-4>
26. Cáncer de mama [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
27. Cáncer de Mama: Prevención y Causas | Asociación Española Contra el Cáncer [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-mama/prevencion/factores-riesgo-cancer-mama>
28. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways | Nature Reviews Cancer [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.72>
29. Foulkes WD. The ten genes for breast (and ovarian) cancer susceptibility. Nat Rev Clin Oncol. mayo de 2021;18(5):259-60.
30. Hereditary cancer genes are highly susceptible to splicing mutations | PLOS Genetics [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1007231>
31. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular

- Pathology. Genet Med. mayo de 2015;17(5):405-24.
32. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer | New England Journal of Medicine [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2005936>
 33. null null. Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. New England Journal of Medicine. 3 de febrero de 2021;384(5):428-39.
 34. BRCA1 5272-1G>A and BRCA2 5374delTATG are founder mutations of high relevance for genetic counselling in breast/ovarian cancer families of Spanish origin - Infante - 2010 - Clinical Genetics - Wiley Online Library [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0004.2009.01272.x>
 35. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.r-project.org/>
 36. Scientific Image and Illustration Software | BioRender [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.biorender.com/>
 37. Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software. Methods Mol Biol. 2007;402:35-60.
 38. LLC GB. SnapGene Viewer | Free software for plasmid mapping, primer design, and restriction site analysis [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>
 39. Peak Scanner Software 2.0 Download - PeakScanner.exe [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://peak-scanner-software.software.informer.com/2.0/>
 40. HEXplorer [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://rna.hhu.de/HEXplorer/>
 41. A High Proportion of DNA Variants of BRCA1 and BRCA2 Is Associated with Aberrant Splicing in Breast/Ovarian Cancer Patients | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/16/6/1957/76144/A-High-Proportion-of-DNA-Variants-of-BRCA1-and>
 42. Buratti E, Baralle M, Baralle FE. Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. Nucleic Acids Res. 2006;34(12):3494-510.
 43. Hertel KJ. Combinatorial Control of Exon Recognition *. Journal of Biological Chemistry. 18 de enero de 2008;283(3):1211-5.
 44. Targeted RNA-seq successfully identifies normal and pathogenic splicing events in breast/ovarian cancer susceptibility and Lynch syndrome genes - Brandão - 2019 - International Journal of Cancer - Wiley Online Library [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.32114>
 45. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery | Nature Reviews Genetics [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg2164>
 46. Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene | Journal of Medical Genetics [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en:

<https://jmg.bmj.com/content/45/7/438.long>

47. Beristain E, Martínez-Bouzas C, Guerra I, Viguera N, Moreno J, Ibañez E, et al. Differences in the frequency and distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer cases from the Basque country with respect to the Spanish population: implications for genetic counselling. *Breast Cancer Res Treat.* 1 de diciembre de 2007;106(2):255-62.
48. Binding of DAZAP1 and hnRNPA1/A2 to an Exonic Splicing Silencer in a Natural BRCA1 Exon 18 Mutant: *Molecular and Cellular Biology*: Vol 28, No 11 [Internet]. [citado 7 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/10.1128/MCB.02253-07?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed

APÉNDICES

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

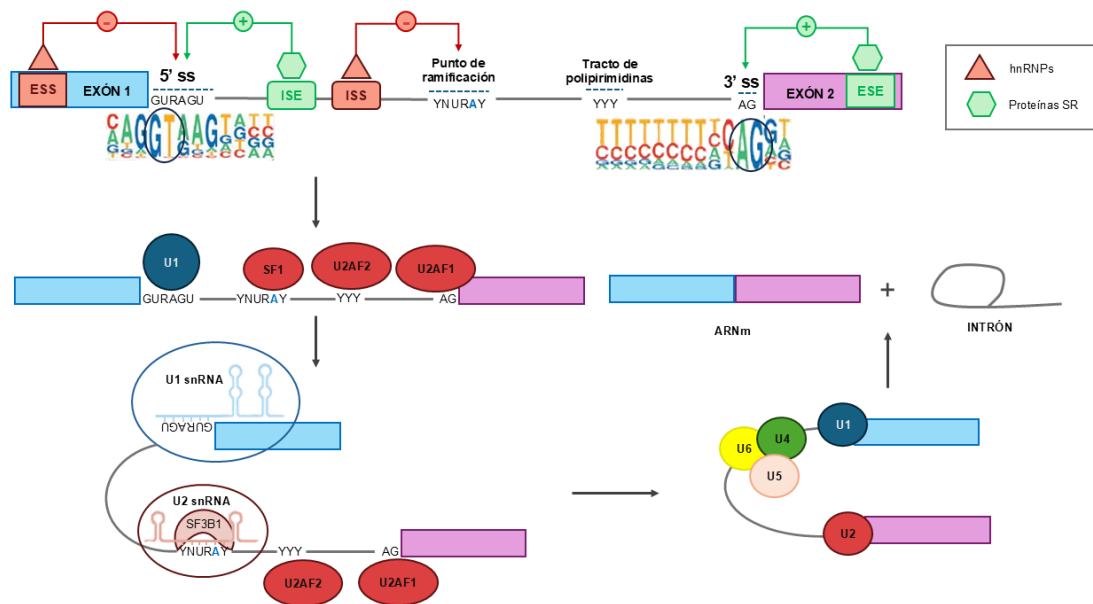


Figura Suplementaria 1. Reacción de *splicing*.

Se muestra el proceso de ensamblaje del espliceosoma, destacando la importancia de las interacciones entre las secuencias del pre-ARNm y los componentes de las snRNPs U1 y U2. La altura de los nucleótidos mostrados en la secuencia refleja su frecuencia relativa en cada posición. Asimismo, se ilustra la asociación de los elementos reguladores del *splicing* (ESE, ISE, ESS e ISS) con los factores reguladores como las proteínas SR y las hnRNPs. Y: pirimidina, R: purina, N: cualquier base. *Figura de elaboración propia.*

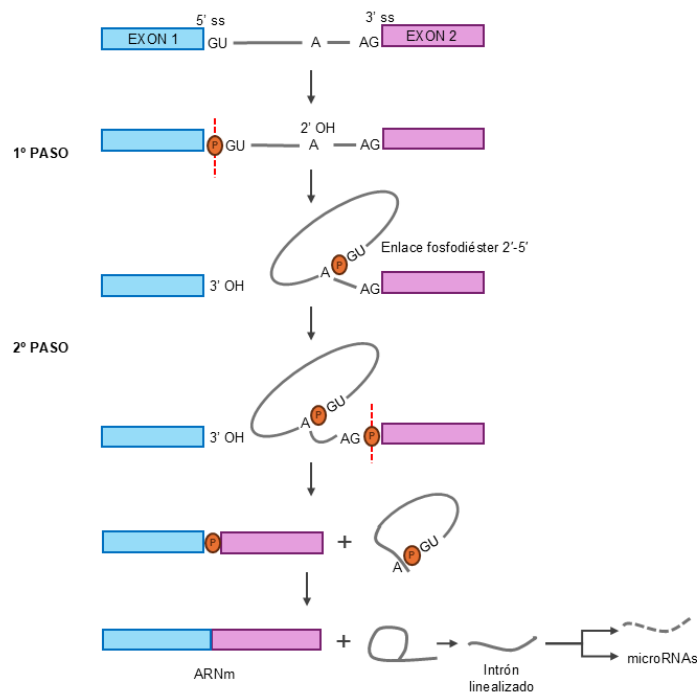


Figura Suplementaria 2. Procesamiento de los intrones.

Las secuencias no codificantes son eliminadas del pre-ARNm mediante un proceso de *splicing* que consta de dos pasos consecutivos. Primero, se produce la escisión del enlace fosfodiéster entre el exón 1 y el intrón adyacente, y seguidamente se forma un enlace fosfodiéster 2'-5' entre la adenina del punto de ramificación y la guanina del extremo 5'. En el segundo se escinde el enlace fosfodiéster entre el extremo 3' del intrón y el exón siguiente (exón 2). Así, se produce la unión consecutiva de ambos exones, obteniendo el ARNm maduro. El intrón es liberado en forma de lazo, pudiendo ser posteriormente degradado o contener ARNs no codificantes como microRNAs. *Figura de elaboración propia.*

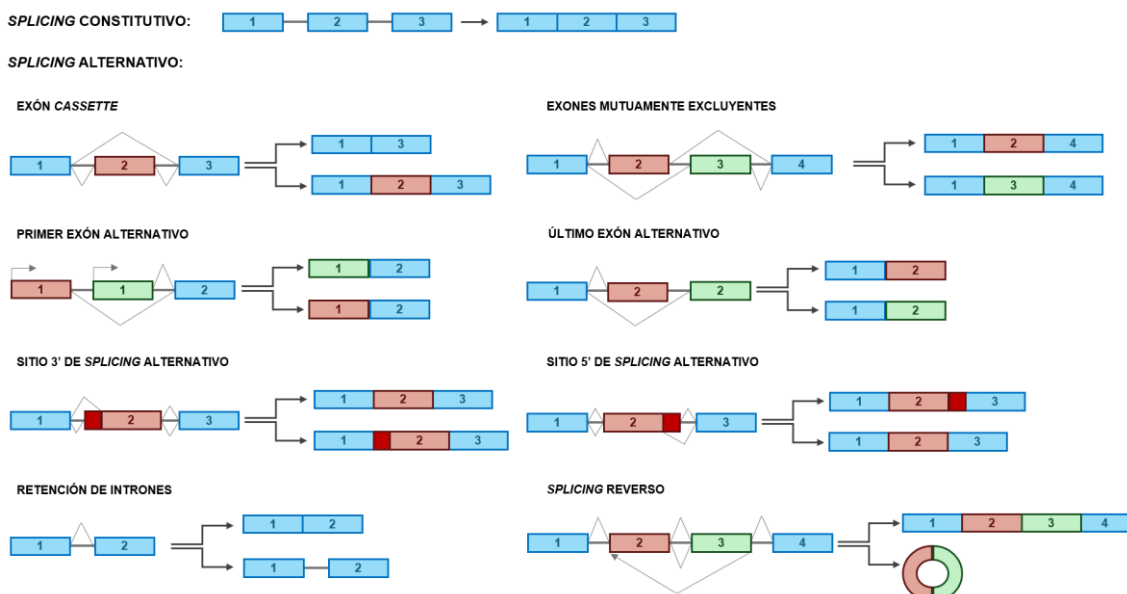


Figura Suplementaria 3. Eventos resultantes del proceso de *splicing* alternativo.

Los exones constitutivos aparecen en azul, mientras que los exones alternativos se representan en tonos granates y verdes. Los eventos del proceso de *splicing* alternativo incluyen: exones *cassette* o mutuamente excluyentes (que pueden ser incluidos u omitidos); uso de promotores o sitios de poliadenilación alternativos, generando exones iniciales o finales alternativos, respectivamente; uso de sitios de *splicing* alternativos en las posiciones 5' y 3', generando la inserción o delección de nucleótidos; retención de intrones y reacciones de *splicing* reverso, que dan lugar a moléculas de ARN circular. *Figura de elaboración propia.*

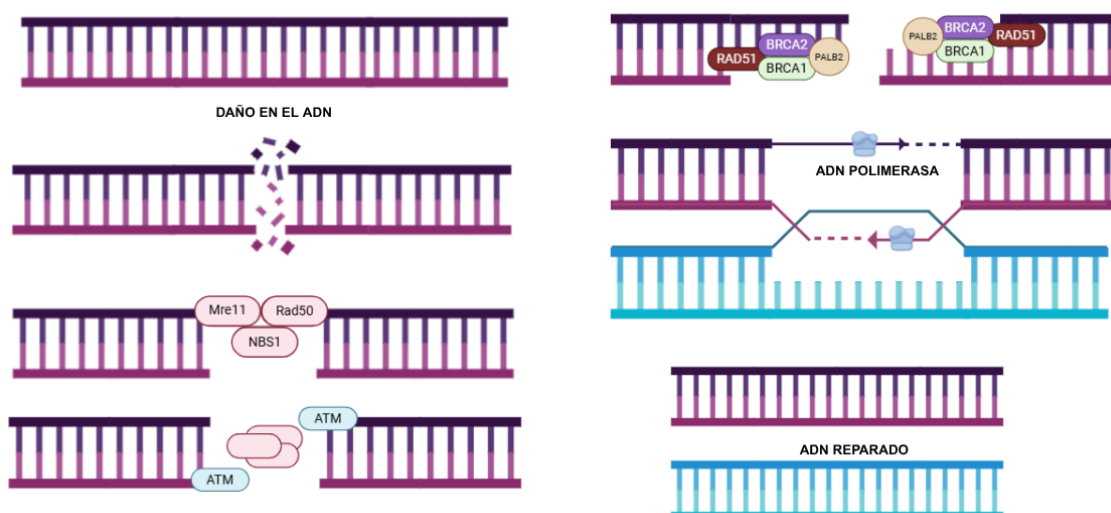


Figura Suplementaria 4. Vía de reparación por recombinación homóloga.

Las roturas de doble hebra del ADN son reparadas a través de esta vía, la cual emplea la cromátida hermana intacta como molde, asegurando un proceso de reparación muy preciso. El proceso comienza con la detección del DSB por el complejo MRN (Mre11, Rad50 y NBS1), que recluta a *ATM* para iniciar la resección del ADN. Así, se activa *BRCAl*, que junto con *PALB2*, detiene el ciclo celular en la fase G2 y estabiliza los cromosomas durante la reparación. A continuación, *BRCAl* y *RAD51* son reclutados promoviendo la interacción entre las cadenas de ADN dañadas. Finalmente, la ADN polimerasa completa la reparación al sintetizar una nueva hebra de ADN usando como molde la cromátida hermana. *Figura de elaboración propia* (36).

tattgtctgaggggatttgggcataatttattttgctgcagagataaaaaatttgttatatatatttttta
tcattcagggccaaggaatatagattttttttttcagccttgtctcagctgggtgtctttatttactctg
tcttaaagtgttccttttattatcattattattttttaatcattgaattccatttgggtgctagcatctgt
ctgttgcatgtgtgtgtttataaaaattctgctgatataacttgtttaaaaaccaatttgtgtatcatag
attgatgcttttgaaaaaatcagtattctaacctgaattatcactatcagaacaaagcagtaaagtaga
tttgttttctcattccattttaaagCAGTATTAACCTTCACAGAAAAGTAGTGAATACCCCTATAAGCCAGAA
TCCAGAAGGCCCTTCTGCTGACAAGTTTGAGGTGTCTGCAGATAGTTCTACCAGTAAAAATAAAGAACCA
GGAGTGGAAAAGgtaagaaacatcaatgtaaagatgctgtgggtatctgacatctttatttatattgaactc
tgattgttaatttttttaccatactttctccagttttttgcatacaggcattttatacacttttattgct
ctaggatacttcttttgtttaatcctatataggttttttgaacctataacataagctacaacatgagaaa
tcccatgttatatgtcaaccctgacatattggcaggcaacatgaatccagacttctaggctgtcatgagg
actctttttttcccaatcattttctgaatctctctgaacataaacttctcattttatcttttacttcccaaaa
agtatgatttgtcctttcacaaattgggtggcgatgggtttttctccttccatttatctttctagGTCATCCCC
TTCTAAATGCCCCATCATTAGATGATAGGTGGTACATGCACAGTTGCTCTGGGAGTCTTCAGAAATAGAAAC
TACCCATCTCAAGAGGAGCTCATTAAGGTTGTTGATGTGGAGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGGCCAC
ACGATTTGACGGAAACATCTTACTTGCCAAGGCAAGATCTAGgtaaatatttcatctgctgtattggaaca
aacacttttgattttactctgaatcctacataaagatatcttggttaaccaacttttagatgtactagtct
atcatggacacttttgttatacttaattaagcccactttagaaaaatagctcaagtgttaatacaagggtt
acttgaaaattattgaaactgttaatccatctatatattttaattaatgggttaactaatgattttgaggat
gagggagtccttggaattcatactatttctatgactaaacctttgcatatatcttttatctccctaggata
tatttctaaaaactagcattgttgactgaaagtgtaaatacgtgttaagggtgtttgctacataatgccata
tttcttttttaggaaactaagctactttggatttccaccaacactgtattcatgtacccattttttctctt
aacctaactttattggtcttttttaattcttaacagagaccagaactttgtaattcaacattcatcgttgt
gtaaattaaacttctccattcctttcagAGGGAACCCCTTACCTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCT
GATGACCCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCCAGAGTCAGCTCGTGTTGGCAACATACCATCTT
CAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCCAATTGAAAGTTGCAGAATCTGCCAGAGTCCAGCTGCTGCTCATA
TACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTCA
ACAGAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGTCTGGCCTGACCCAGAAAGAAATTTgtgagtgat
ccatatgtatctccctaagtactaagacttaacaacattctggaaagagttttatgtaggtattgtcaat
taataacctagaggaagaaatctagaaaacaatcacagttctgtgtaatttaatttcgattactaatttc
tgaaaatttagatctagataaagctatagtgtggattattttatgtatatttacttgagaaaataattat

Ex14

Ex15

Ex16

taaatattagtggaagctatactttgggtatgatataggactttcgctcgagcttcaggtgtcttaga
 attttttaaatgtaccctttctgagaaaaacagagacttaagctaggataactgggtattctatttttt
 tttttttttttttttttttacccagcctgggtgacagagcaagactctgtctaaaaaaaaaaaaaaaa
 attcactttaaatagttccaggacacgtgtagaacgtgcaggattgctacataggtaaacatatgccatg
 gtggaataactagtattctgagctgtgtgctagaggtaactcatgataatggaatatttgatttaatttc
 ag**ATGCTCGTGTACAAGTTTGCCAGAAAAACACCACATCACTTTAACTAATCTAATTACTGAAGAGACTAC** **Ex17**
TCATGTTGTTATGAAAAACAGgtat**BstI**2171taccagaacacctttacagaataccttgcatctgctgcataaaaccac
 atgaggcgaggcacgggtggcgcatgcctgtaatcgcagcactttgggaggccgaggcgggcagatcacga
 gattaggagatcgagaccatcctggccagcatggtgaaaccccgctctactaaaaataaaaaaattag
 ctgggtgtggccctagacttccaaatatccatacctgctggttataaattagtgggtgttttcagcctctga
 ttctgtcaccaggggttttagaatcataaatccagattgatcttgggagtgtaaaaactgaggctcttt
 agcttcttaggacagcatttctgattttgttttcaacttctaatacctttgagtgtttttcattctgcag
ATGCTGAGTTTGTGTGTGAACGGACACTGAAATATTTTCTAGGAATTGCGGGAGGAAAATGGGTAGTTAG **Ex18**
CTATTTCTgtaagtataatactattttctccctcctcccttaaacacctcagaattgcatttttacacct
 aacatttaaacacctaaggtttttgctgatgctgagctctgagttaccaaaggctcttaattgtaatacta
 aactacttttatctttaatatcactttgttcagataagctggtgatgctgggaaaatgggtctcttttat
 aactaataggacctaatactgctcctagcaatgtagcatatgagctagggattttatataatagtcggcag
 gaatccatgtgcagcaggcaaaacttataatgtttaaattaaacatcaactctgtctccagaaggaaactg
 ctgctacaagccttattaaagggtgtggcttttagagggaaggacctctcctctgtcattcttctctgtgc
 tcttttgtgaatcgtgacctctctatctccgtgaaaagagcacgttcttctgctgtatgtaacctgtct
 tttctatgatctcttttag**GGGTGACCCAGTCTATTAAAGAAAGAAAAATGCTGAATGAG**gtaagtacttg **Ex19**
 atgttacaactaaccagagatattcattcagtcataatagttaaaaatgtatttgcttccctccatcaat
 gcaccactttccttaacaatgcacaaattttccatgataatgaggatcatcaagaattatgcaggcatcg
 atctgctggcaattctgaatgccttaaatgaatgccttaaatatgacgtgtctgctccacttccattga
 aggaagcttctctttctcttatectgatgggtgtgtttggtttctttcag**CATGATTTTGAAGTCAGAG** **Ex20**
GAGATGTGGTCAATGGAAGAAACCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAGAATCCCAGGACAGAAAGgtaaa
 gctccctccctcaagttgacaaaaatctcaccaccactctgtattccactccctttgcagagatggg
 ccgcttcattttgtgaagacttattacatacatcacagtgtctagatactttcacacaggttcttttttca
 ctcttccatcccaaccacataaataagattgtctctactttatgaatgataaaactaagagatttagag
 aggctgtgtaatttgattcccgctctcggttcagatcttagctgataagtgaagagctgggacttta
 gcagatgagaatctaaagactttgctcttttcaacttcaactggggta

Figura Suplementaria 5. Inserto del mgBRCA1_14-20.

Estructura de la secuencia de 4316 pb del inserto de ADN introducida en el minigen mgBRCA1_ex_14-20: int13 (374 pb) – ex14 (127 pb) – int14 (400 pb) – ex15 (191 pb) – int15 (547 pb) – ex16 (311 pb) – int16 (572 pb) – ex17 (88 pb) – int17 (400 pb) – ex18 (78 pb) – int18 (500 pb) – ex19 (41 pb) – int19 (272 pb) – ex20 (84 pb) – int20 (331 pb). Aparecen representados los sitios de corte de las enzimas de restricción. *Figura de elaboración propia.*

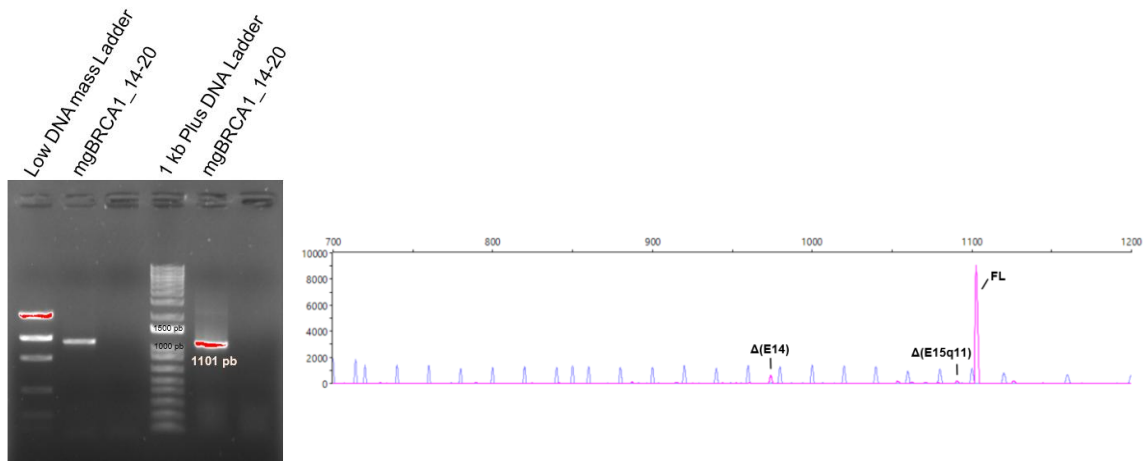


Figura Suplementaria 6. Validación funcional del minigen.

Electroforesis en gel de agarosa del mgBRCA1_14-20 wt amplificado, con un tamaño esperado de 1101 pb (izquierda). Electroferograma del análisis de fragmentos fluorescentes (derecha), donde los picos rosas se corresponden con los transcritos generados por el minigen y los picos azules indican el patrón de tamaño LIZ1200. A nivel del eje x se representa el tamaño en pb y en el eje y se muestran las unidades relativas de fluorescencia (RFU). *Figura de elaboración propia.*

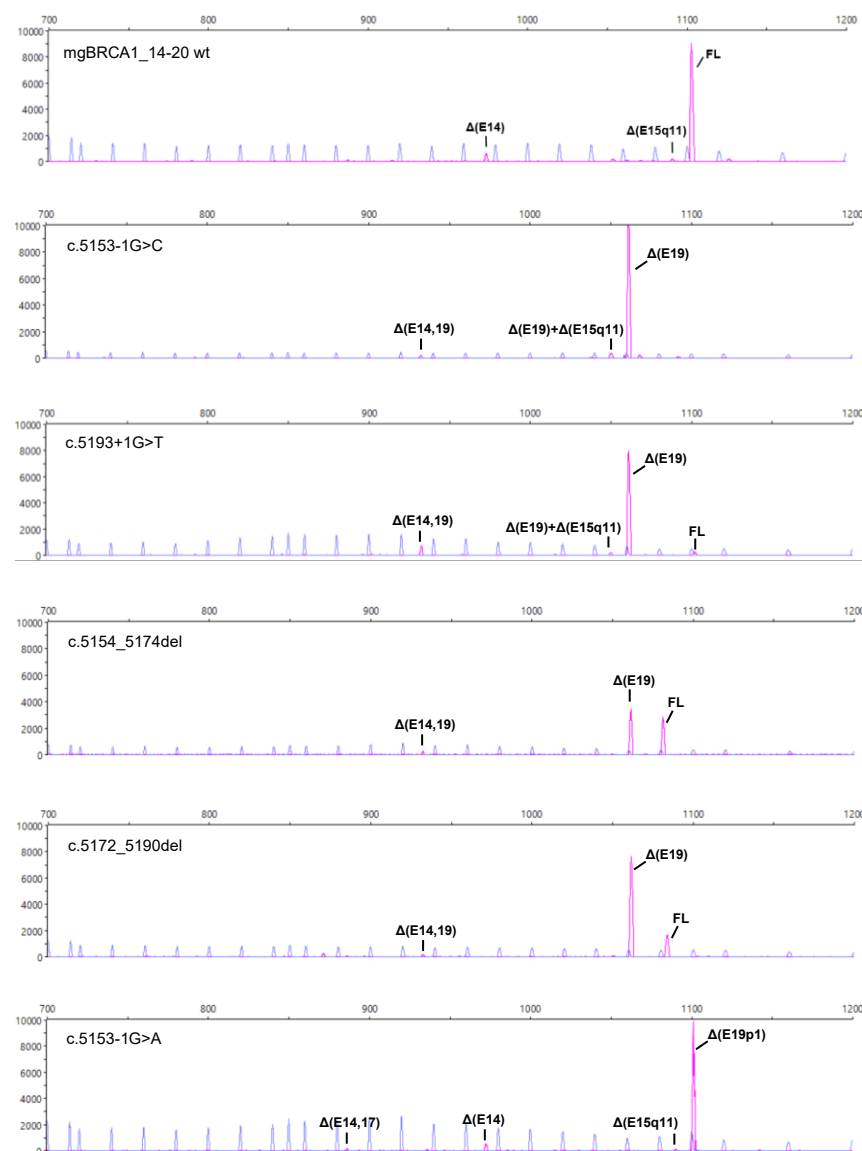


Figura Suplementaria 7. Análisis de fragmentos fluorescentes.

Se muestran los electroferogramas del análisis de fragmentos fluorescentes, donde los picos rosas se corresponden con los transcritos generados por el minigen y los picos azules indican el patrón de tamaño LIZ1200. A nivel del eje x se representa el tamaño en pb y en el eje y se muestran las unidades relativas de fluorescencia (RFU). *Figura de elaboración propia.*

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla Suplementaria 1. Número de registros de las variantes en ClinVar.

VARIANTE	NÚMERO DE REGISTROS
c.5193+1G>T ¹	10
c.5193+1G>A	7
c.5193+1G>C	6
c.5153-1G>C ¹	15
c.5153-1G>A	12
c.5153-1G>T	3

¹Considerando aquellas variantes con un mayor número de registros la base de datos de ClinVar, se procede a la selección de las variantes c.5193+1G>T y c.5153-1G>C como mutaciones control a nivel de los sitios de *splicing*.

Tabla Suplementaria 2. *Primers* para introducir las variantes genéticas de interés.

MUTAGÉNESIS DIRIGIDA ¹	
c.5153-1G>C	Fw TCTTTTCTATGATCTCTTTACGGGTGACCCAGTCTATTAAA
	Rv TTTAATAGACTGGGTCACCCCTAAAGAGATCATAGAAAAGA
c.5193+1G>T	Fw AAAGAAAAATGCTGAATGAGTTAAGTACTTGATGTTACAAA
	Rv TTTGTAACATCAAGTACTTAACTCATTTCAGCATTTTCTTT
c.5154_5174del	Fw CTGTCTTTTCTATGATCTCTTTAGGAAGAAAAATGCTGAATGAGGTAAGT
	Rv ACTTACCTCATTTCAGCATTTTCTTCCTAAAGAGATCATAGAAAAGACAG
c.5172_5190del	Fw CTTTAGGGGTGACCCAGTCTATTAAGAGGTAAGTACTTGATGTTACAAAC
	Rv GTTTGTAACATCAAGTACTTACCTCTTAATAGACTGGGTCACCCCTAAAG
c.5153-1G>A	Fw TCTTTTCTATGATCTCTTTAAGGGTGACCCAGTCTATTAAA
	Rv TTTAATAGACTGGGTCACCCCTAAAGAGATCATAGAAAAGA

¹Los *primers* (Sigma-Aldrich) han sido diseñados de forma específica para la introducción de cada una de las variantes. En el caso de variantes puntuales, se mantienen 20 nt a ambos lados; mientras que para microdeleciones exónicas, se amplía a 25 nt, conservando siempre el primer nt y los 3 últimos nt del exón. Asimismo, se verificó que la temperatura de desnaturalización (Tm) no fuese excesivamente alta y que la temperatura de formación de horquillas fuera inferior a 55 °C.

Tabla Suplementaria 3. *Primers* usados para la obtención de secuencias.

OBTENCIÓN DE SECUENCIAS ¹	
DE MINIPREP	RTBR1_ex18-FW → TTTCTAGGAATTGCGGGAG
	RTBR1_ex19-RV* → TTTCTTTAATAGACTGGGTCACC
	T7* → TAATACGACTCACTATAGGG
	PSADSeq_Rv* → GGATAACAATTTACACAGG
	RTBR1_ex16-FW* → GGGTATAATGCAATGGAAGA

¹Se muestran los *primers* empleados para comprobar las secuencias de ADN de las bacterias que han sido transformadas con el minigen, con el objetivo de asegurar que la variante de interés ha sido introducida. Los *primers* han sido seleccionados teniendo en cuenta que cada uno de ellos puede extender la secuenciación hasta 1 kb con respecto a la región complementaria de ADN a la que se une. El asterisco señala aquellos *primers* empleados para la obtención de la secuencia completa del minigen wt mgBRCA1_14-20.

Tabla Suplementaria 4. *Primers* empleados para la amplificación de cDNA.

AMPLIFICACIÓN cDNA	
SECUENCIAS	RT_Psp13_Fw → TCACCTGGACAACCTCAAAG
	RTpSAD_A-RV → GGAGTGAATTGGTCGAATG
FRAGMENTOS	RT_Psp13_Fw → TCACCTGGACAACCTCAAAG
	RTpSAD_A-RV FAM → GGAGTGAATTGGTCGAATG

OTROS

Declaración uso de la Inteligencia Artificial (IA). En la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado, se ha hecho uso de los sistemas de IA Generativa “Gemini 2.5” y “ChatGPT 4.0”. Estas herramientas me han permitido estructurar los contenidos de mi investigación, y me han ayudado a comprender la información más relevante de algunos de los artículos científicos consultados.

CÓDIGO

A continuación se muestra detalladamente el código empleado para el cálculo del *MES score*.

title: "MES SCORE"

author: "Aurora"

date: "2025-05-30"

##RESUMEN DEL SCRIPT

El siguiente código calcula el cambio generado en el *MaxEntScan (MES) score* al introducir las variantes de estudio correspondientes al microexón 19 de *BRCA1*. El valor resultante permite evaluar si los sitios canónicos de *splicing* han sido fortalecidos, debilitados o no se han visto alterados como consecuencia de la variante introducida.

##PRIMER PASO: INTRODUCCIÓN DE SECUENCIAS

En primer lugar, se carga el paquete "spliceSites", el cual permite identificar posibles sitios de *splicing*, basándose en alineamientos de secuencias a partir del análisis de datos de RNA-seq. La siguiente línea del comando, permite cargar al entorno de trabajo las funciones necesarias para calcular los valores del *MES score*. Esto habilita el uso de funciones como "score5" y "score3", que permiten evaluar la fortaleza de los sitios canónicos de *splicing* 5'y 3', respectivamente.

A continuación, es necesario definir la secuencia genómica del *wild type* (.wt) y aquella que ha incorporado la variante genética de interés, es decir, la secuencia mutada (.mut). Así, teniendo en cuenta el sitio de *splicing* que se desee analizar, los nucleótidos (nt) a incorporar serán: para el sitio de *splicing* 5', 3 nt del exón y 6 nt del intrón adyacente, conformando una secuencia de 9 nt en total; mientras que para el sitio 3' de *splicing*, será necesario añadir 20 nt del intrón y 3 nt del exón, sumando así 23 nt.

```
```{r}
```

```
library(spliceSites)
```

```
mes=load.maxEnt()
```

```
.wt="GAGgtaagt"
```

```
.mut="GAGttaaagt"
```

```
```
```

##CÁLCULO MES SCORE

Se procede a calcular el *MES score* tanto para la secuencia wt como para la secuencia mutada, utilizando las funciones "score5" o "score3", previamente cargadas desde el entorno configurado. Además, para que el análisis sea adecuado, aparece indicada en el código la posición del sitio de *splicing* con respecto a la secuencia proporcionada.

Finalmente, se calcula la diferencia entre los valores obtenidos para ambas secuencias, lo cual permite interpretar si la variante introducida ha provocado un fortalecimiento (aumento del *MES score*), un debilitamiento (disminución del *MES score*), o ningún cambio significativo en la fortaleza del sitio de *splicing* canónico.

```
```{r}
```

```
if(nchar(.wt)==9){
```

```
 .MES_score_wt=score5(mes, .wt,3)
```

```
 .MES_score_mut=score5(mes, .mut,3)
```

```
}else{
```

```
 .MES_score_wt=score3(mes, .wt,20)
```

```
 .MES_score_mut=score3(mes, .mut,20)
```

```
}
```

```
MES_score_change=((.MES_score_mut-.MES_score_wt)/.MES_score_wt)*100
```

```
```
```