



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Ciencias

Ciudad Universitaria

*“Regulación de la expresión de Merlín
por los microRNAs 7 y 146a.”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

YAXEM LÓPEZ SEVILLA

TUTOR:

DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA



Octubre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA EN EL LABORATORIO DE NEUROINMUNOBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (IBT, UNAM), CON FINANCIAMIENTO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE APOYO AL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA), DE LA UNAM, PROYECTO IN-227510.

Director de Tesis

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Jurado de examen

Dra. Annie Pardo Cemo

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

Dra. Leonor Pérez Martínez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Gustavo Pedraza por abrirme las puertas del laboratorio a su cargo y brindarme la ayuda y asesoramiento necesarios para desarrollar este trabajo y cumplir con este objetivo de vida.

Agradezco a la Dra. Leonor Pérez por brindarme consejos, estar al pendiente de mi estancia en el laboratorio y por revisar mi tesis.

Agradezco a los integrantes y personal del laboratorio de Neuroinmunobiología del IBT.

Agradezco a todo los investigadores que forman parte de mi jurado de examen por revisar mi tesis y dedicarme su tiempo para que construyera un trabajo de calidad. Gracias a la Dra. Annie Pardo, Dra. Claudia Segal y Dr. Alfonso Vilchis.

Agradezco a la Unidad de Enseñanza de Biología por abrir el camino y darme el asesoramiento necesario para poder continuar con los trámites y desarrollo de esta meta académica. Gracias al Dr. Luis Felipe Jiménez, a Yukiko Maria A Sakurai y a la maestra Rosa Maria Guevara.

DEDICATORIA

¡Al fin lo logramos Guerreros! Las barreras y obstáculos sorteados fueron fuertes, pero al final exactos y movidos para fines y propósitos justos, todo lo vivido valió la pena, la enseñanza clara, y el saber que contaba con su amor, guía y energía era lo que me mantenía en pie, dejar de sentirme sola y sin rumbo por un camino incierto al ser guiada por dos grandes luceros es la sensación más plena y regocijante que hay. ¡Sí! Papá y mamá, José López Martínez y Concepción Sevilla Vázquez, ustedes son mi luz, gracias por todo lo dado, todo su esfuerzo, su tiempo, amor, materia y espacio, por su ser, gracias porque el recorrido ha sido bello. Al tenerlos cerca, a mi lado, la perspectiva de la vida es una explosión sensorial de colores, sabores, olores, texturas, temperaturas, energías, gracias a ustedes la manera en cómo veo la ciencia y cómo cuestiono mi entorno es ética y humana, es encontrar y generar conocimiento para ayudar al otro, para saber quién soy entendiendo a los otros, para entender la vida, amar la vida, para hacer biología y ser bióloga.

Este es el fin de un ciclo pero el comienzo de otro, haremos camino al andar entre dar y dar por el caminar, aprendiendo también a recibir, así lo he entendido, pues he recibido a dos seres hermosos, intensos, que se complementan en sus opuestos, en un discurso dialéctico, gracias al cual soy y me da orgullo ser y seguiré siendo en el actuar, ayudando siempre, mejorando siempre.

También agradezco a María Rosa Gonzalez Madero, por los consejos, por escucharme, por la ayuda material, por ser amiga, por la compañía y cuidar a mi papá. Por ser coach de vida, por ser maestra de vida, Gracias Mayosa.

Gracias a mis dos hermanitos adoptivos, ¡no inventen! fueron demasiada felicidad en mi vida, demasiadas risas, pláticas, música, baile, irreverencias, resistencias, amor, me dio gusto encontrarlos, los amo, Jonathan Alejandro Correa, Alejo, gracias por los clamatos, por las caminatas de horas, por encontrar lugares, tiempos y cosas que los otros no percataban, por hacerlas únicas, por las explicaciones, por ser sabio, gracias Rosa María Alcocer, La Roux, La Luna Roux, por los bailes en los pasillos de la fac, por caerte en bici conmigo, por las comilonas y las transgresiones a lo impuesto, por ser rebelde. Gracias a los dos por estar en todo tipo de situaciones, por escucharme, por llorar conmigo, por reír conmigo, por vivir conmigo.

Gracias a la Dra. Karla Meza por ser una maestra del laboratorio, por enseñarme y tenerme paciencia al explicarme los experimentos, por cantar, bailar, por las madrugadas de confesiones, por las labo-party's, gracias monigotina por tu nobleza, por doña huanzontle. Gracias a las pequeñuelas Lisi y Ana, por apoyarme, escucharme, por poner música y alegría.

Gracias a Vicky, a Clarita y Carmelita por toda su ayuda dentro del laboratorio, por brindarme su amistad.

Gracias a toda la familia Sevilla por estar al pendiente de mi, por el apoyo material, por quererme y cuidarme, por aceptarme como soy; gracias a los pilares de esto a mis abuelitos, por ser sabios, por observar la vida, por ser campesinos, por enseñarme a ser productiva, trabajar con gusto,

amar las plantas y la tierra, a entender los ciclos y por su capacidad de entender al mundo y abrirse a vivir nuevas experiencias a pesar de su edad, a la abuelita Chenchá por sus servilletas, calabaza en piloncillo, pepitas, pan, arte de reciclados, y al abuelito José por sus caminatas y subida a los árboles, por sus sillas; gracias a la familia Pérez Sevilla tía Georgina, tío Ángel, a la peque de Mariana, y a mi prima, que es mi amiguis del alma, consejera y cómplice de travesuras, la Chiquis triquis, Cynthia. Gracias a la familia Beltrán Sevilla por su apoyo, por su amor, gracias a mi tía Gema, mi tío Cuco y los primis Azucena, David, Blanca y Paco. Gracias a la familia Rangel Sevilla por abrir su corazón y permitir conocerlos, gracias a mi tía Helena, a Shagui y Helenita. Gracias a la familia Vazquez Dirzo por apoyarme en los talleres, por ayudarme a brindar espacios de cultura a la gente, a los niños, por cocinar y reír, a tía Diega, gracias por su dedicación, y a mi tío rockero Mario por sus obras musicales, por Campesino, por ser un niño, por brindar e ir de fiesta conmigo, por no detenerse y seguir explorando nuevos caminos y países, y Colombianas, por ser internacionalista, por ser activista, a mi tío Beto gracias por bailar, por leer, por cuestionar, y gracias a sus familias y todos sus seres queridos. Gracias a la familia Sevilla Rodríguez por ayudarnos en el cuidado de la salud, gracias tío Santiago, tía Genoveva y Mayra. Gracias a mis tíos fuera de México, a mi tío Cube y a mi tío Pepe y sus familias, por los apoyos materiales brindados.

Gracias a la familia López, a mi tío Hugo y familia tía Sara, Emiliano y Daniel, a mi tío Paco, mi tío Juan, Chayo, Paco, Tania y Amelie, gracias a la loquita irreverente en los cielos que me hacía reír, Tía Lupe, a Juanelo, por cocinar, por las enchiladas, por bailar, por retar, y en especial a mi angelito, mi tío Jesús López por enseñarme a ver lo oculto, a sentir sin límites, a expresarme, por enseñarme el arte, la cocina, la pintura, la sensualidad, por transgredir los tiempos, por cuestionar y ser crítico, por el performance y no inhibirse, por la poesía, por los museos, por los desenfrenos, por el bacalao y los tamales.

Gracias al 132 Ambiental por ser compañeros de lucha, me da gusto haberme topado con seres tan aguerridos, luchones, abiertos, críticos, contestatarios, subversivos, amantes de la vida, por llenar mi vida, por generar equipo, comunidad, por hacer para los demás y transformar este caos de opresión y desigualdad, gracias Andrea, Hugo Shanti, Ximena, Memo, Iris, Rosa, Chandra, Tole, Caro, Ivan, Fercho, Alex, Negro, Berenice, Luis y Tania.

Gracias a Doña José y Don Toño por ser mis psicólogos del IBT, por escucharme, alimentarme y dar consejos en aquellas tardes en que sentía ya no poder más, fueron algo muy determinante para que yo continuara, son seres nobles, luchones, sensibles y lindos, siempre los tendré presentes.

Gracias a Motis-gato, Chimichurri, por darme masajitos y abrazarme en las madrugadas de desvelo, gracias a Citla, Ovis y Bola por recibirme con su entusiasmo en las noches, brincarme, lamerme y cuidar de mi con sus ladridos, gracias a la Chuburna por ser sabia y estar al pendiente.

Y finalmente gracias a la vida, que me ha dado tanto, a la Madre Tierra y a las energías del Universo.

**No te rindas, aún estás a tiempo
De alcanzar y comenzar de nuevo,
Acepta tus sombras,
Enterrar tus miedos,
Liberar el lastre,
Retomar el vuelo.
No te rindas que la vida es eso,
Continuar el viaje,
Perseguir tus sueños,
Destruir el tiempo,
Correr los escombros,
Y destapar el cielo.
No te rindas, por favor no cedas,
Aunque el frío queme,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se esconda,
Y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma
Aún hay vida en tus sueños.
Porque la vida es tuya y tuyo también
el deseo
Porque lo has querido y porque te
quiero. Porque cada día es un comienzo
nuevo,
Porque esta es la hora y el mejor
momento.
Porque no estás solo, porque yo te
quiero.**

Mario Benedetti

Como hacerte saber ..Que nadie establece
normas, salvo la vida.
Que la vida sin ciertas normas pierde la
forma.
Que la forma no se pierde con abrirnos.
Que abrirnos no es amar
indiscriminadamente.
Que no esta prohibido amar, que también se
puede odiar.
Que el odio y el amor son afectos.
Que la agresión porque sí duele mucho.
Que las heridas se cierran, que las puertas
no deben cerrarse.
Que la mayor puerta es el afecto.
Que buscar un equilibrio no implica ser tibio.
Que encontrarse es muy hermoso.
Que el sexo forma parte de lo hermoso de la
vida,

Que la vida forma parte del sexo.
Que nunca está de más agradecer.
Que autodeterminación, no es hacer las
cosas solo.
Que nadie quiere estar solo.
Que para no estar solo hay que dar,
Que para dar debemos recibir antes.
Que para que nos den también hay que
saber pedir
Que saber pedir no es regalarse.
Que regalarse en definitiva es no quererse.
Que para que nos quieran, debemos
demostrar qué somos.
Que para que alguien sea, hay que ayudarlo.
Que ayudar es poder alentar y apoyar.
Que adular no es apoyar,
Que adular es tan pernicioso como dar vuelta
la cara.
Que las cosas cara a cara son más honestas,
Que nadie es más honesto porque no roba.
Que quien roba, no es ladrón por placer.
Que cuando no hay placer en las cosas, no
se está viviendo
Que para sentir la vida, no hay que olvidarse
que existe la muerte.
Que se puede estar muerto en vida.
Que se siente con el cuerpo y con la mente.
Que con los oídos se escucha,
Que cuesta ser sensibles, y no herirse
Que herirse no es desangrarse
Que para no ser heridos, levantamos muros
Que quien siembra muros, no cosecha nada
Que casi todos somos albañiles de muros
Que sería mejor construir puentes
Que sobre ellos se va a la otra orilla, y que
también se vuelve.
Que volver, no implica retroceder.
Que al retroceder, también se puede
avanzar.
Que no por mucho avanzar, se amanece más
cerca del sol
¡Cómo hacerte saber que nadie establece
normas, salvo la vida!

Mario Benedetti

CONTENIDO

ABREVIATURAS	11
RESUMEN	14
1) INTRODUCCIÓN	15
1.1) CÁNCER	15
1.1.1) <i>Causas del cáncer: carcinógenos</i>	16
1.1.2) Carcinogénesis	17
1.1.3) Características del cáncer	17
1.1.4) Cáncer e inflamación	21
1.1.5) Genes responsables del cáncer	23
1.1.5.a) <i>Proto-oncogenes</i>	23
1.1.5.b) <i>Genes supresores de tumores</i>	25
1.2) NF2 O MERLÍN: GEN SUPRESOR DE TUMORES	27
1.2.1) Neurofibromatosis tipo 2	29
1.2.2) <i>Papel supresor de tumores de Merlín</i>	30
1.2.3) La inactivación de Merlín induce carcinogénesis	37
1.3) MiRNAs	38
1.3.1) Biogénesis y maduración de los miRNAs	39
1.3.2) miRNAs como reguladores del cáncer	40
1.4) MiRNA-7	41
1.4.1) Relación del miR-7 con el cáncer	41
1.5) MiRNA-146A	42
1.5.1) Relación del miR-146a con el sistema inmune y la respuesta inflamatoria	42
1.5.2) Relación del miR-146a con el cáncer	44
2) JUSTIFICACIÓN	45
3) HIPÓTESIS	46
4) OBJETIVOS	47
4.1) OBJETIVO GENERAL	47
4.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5) MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1) ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO: BASES DE DATOS Y PROGRAMAS	48
5.2) EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE SANGRE	48
5.3) PCR	49
5.4) RESTRICCIONES ENZIMÁTICAS	50
5.4.1) <i>Digestión de 3'UTR de Merlín</i>	50
5.4.2) <i>Digestión de miR-146a</i>	51
5.4.3) <i>Digestión del plásmido psiCheck2</i>	51
5.4.4) <i>Digestión del plásmido pcDNA3.1</i>	52
5.5) LIGACIÓN	52
5.6) TRANSFORMACIÓN EN BACTERIAS DH5-A	52

5.7) MINIPREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO	53
5.8) SECUENCIACIÓN	54
5.9) MAXIPREPARACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO	55
5.10) CULTIVO DE CÉLULAS HEK-293	56
5.11) TRANSFECCIÓN DE CONSTRUCCIONES.....	56
5.12) EXTRACTOS TOTALES	57
5.13) ENSAYO DE LUCIFERASA	58
5.14) WESTERN BLOT	58
5.15) ANTICUERPOS	59
5.16) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	59
6) RESULTADOS.....	60
6.1) ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO: MIRNAS QUE TIENEN COMO BLANCO LA 3'UTR DE MERLÍN.....	60
6.1.1) Predicción bioinformática: hsa-miR-7 forma un dúplex significativo con la 3'UTR de Merlín.....	63
6.1.2) Predicción bioinformática: hsa-miR-146a forma un dúplex significativo con la 3'UTR de Merlín.....	65
6.2) ENSAYO DE LUCIFERASA: USO DEL PLÁSMIDO PSICHECK2 PARA DETERMINAR LA INTERACCIÓN MIRNA:MRNA	67
6.2.1) Obtención de la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín.....	69
6.3) "MIR-7 PODRÍA ESTAR INTERACTUANDO E INACTIVANDO A MERLÍN"	72
6.3.1) Obtención de la construcción pcDNA3.1/miR-7.....	72
6.3.2) La región 3'UTR de Merlín es blanco del miR-7.....	75
6.3.3) miR-7 reduce de manera significativa los niveles de luciferasa	76
6.3.4) miR-7 regula los niveles de Merlín en células HEK-293.....	79
6.4) "MIR-146A PODRÍA ESTAR INTERACTUANDO E INACTIVANDO A MERLÍN"	80
6.4.1) Obtención de la construcción pcDNA3.1/miR-146a	80
6.4.2) La región 3'UTR de Merlín es blanco del miR-146a.....	84
6.4.3) miR-146a reduce de manera significativa los niveles de luciferasa	86
6.4.4) miR-146a regula negativamente los niveles proteicos de Merlín en células HEK-29387	
7) DISCUSIÓN	89
8) CONCLUSIONES	93
9) PERSPECTIVAS.....	93
SUPLEMENTARIAS	95
REFERENCIAS.....	103

ABREVIATURAS

- **3'UTR:** Región 3' sin traducir de un gen, del inglés *3' untranslated region*.
- **°C:** Grados centígrados.
- **AKT:** Proteína cinasa B o PKB.
- **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.
- **Amp^r:** Casete de resistencia a ampicilina.
- **AP1:** Proteína activadora 1, del inglés *activator protein 1*.
- **ATP:** Adenosin trifosfato.
- **BCL-2:** Células B de linfoma 2, del inglés *B-cell lymphoma 2*.
- **BRCA:** Proteína asociada a cáncer de mama, del inglés *breast cancer susceptibility protein*.
- **BrEt:** Bromuro de etidio.
- **BSA:** Seroalbumina bovina.
- **CCL-:** Quimiocinas, del inglés *chemokine C-C motif ligand*.
- **CD:** Con digestión.
- **CD-:** Proteínas con dominio de diferenciación, del inglés *cluster of differentiation*.
- **CO₂:** Dióxido de carbono.
- **COOH:** Grupo carboxilo.
- **CRL4:** Ubiquitín ligasa *E3 cullin-4-Ring*.
- **DCAF1:** Factor asociado a CRL4.
- **DICER1:** Endoribonucleasa específica de RNA de doble cadena, del inglés *double-strand RNA-specific endoribonuclease*.
- **DMEM:** Medio para cultivo celular Dulbecco modificado de medio Eagle
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- **E. coli:** Bacterias Escherichia coli.
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- **EGF:** Factor de crecimiento epidermal, del inglés *epidermal growth factor*.
- **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento EGF.
- **ERK:** Cinasas reguladas por señales extracelulares, del inglés *extracellular signal regulated kinases*.
- **ETOH:** Etanol
- **FAK:** Cinasa de adhesión focal, del inglés *focal adhesion kinase*.
- **FERM:** dominio globular N (amino)- terminal de proteínas que consta de la banda 4.1 (F), ezrin, radaxina, moesina.
- **Fig.:** Figura
- **GTPasa:** Guanosina trifosfatasa.
- **HDAC:** Deacetilasas de histonas, del inglés *histone deacetylase*.
- **HEK-293:** Células de riñon embrionario humano-293.
- **hLuc:** Proteína luciferasa de luciérnaga.
- **hRLuc:** Proteína luciferasa de *Renilla sp.*
- **HRS:** Sustrato de tirosina cinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos, del inglés *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*.
- **HSV-TK:** Promotor timidina cinasa del virus simple del herpes.
- **IL-:** Interleucinas.
- **IRAK1:** Cinasa 1 asociada al receptor de IL-1.

- **JNK**: Cinasas C-Jun-N-terminal, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*.
- **Kb**: Kilobases
- **KDa**: Kilodaltones
- **KLF4**: Proteína parecida a kruppel factor 4, del inglés *kruppel-like factor 4*.
- **LB**: Medio de cultivo rico.
- **MDM2**: Proteína doble minuta murina, del inglés *murine double minute 2*.
- **Merlín**: Del inglés *moesin, exrin, radaxin, like protein*.
- **miRNAs**: MicroRNAs.
- **mL**: Mili litros.
- **mM**: MiliMolar.
- **µL**: Micro litros.
- **µg**: Micro gramos.
- **µM**: MicroMolar.
- **MMPs**: Metaloproteinasas, del inglés *matrix metalloproteinase*.
- **MP**: Marcador de peso molecular
- **MYPT-1-PPT1δ**: Proteína fosfatasa subunidad 1 blanco de la miosin fosfatasa, del inglés *myosin phosphatase target subunit*.
- **NaCl**: Cloruro de sodio.
- **Nf2**: Gen de la proteína Merlín.
- **NF2**: Neurofibromatosis tipo 2 (enfermedad)
- **NF-κB**: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés *factor nuclear kappa-B*.
- **ng**: Nano gramos.
- **PAK**: Proteín-cinasa activada por p21, del inglés *p21 activated kinase*.
- **pb**: Pares de bases.
- **PBS**: Solución buffer de fosfatos.
- **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa.
- **PDGF**: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *platelet-derived growth factor*.
- **PDGFR**: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *platelet-derived growth factor receptors*.
- **pH**: Potencial de hidrógeno.
- **PIP3**: Fosfatidilinositol trifosfato, del inglés *phosphatidylinositol triphosphate*.
- **PKA**: proteín cinasa A dependiente de AMPc, del inglés *protein kinase A*.
- **Pmol**: Picomolar
- **PTEN**: Proteína homóloga de fosfatasa y tensina, del inglés *phosphatase and tensin homolog*.
- **Rb**: Retinoblastoma.
- **RISC**: Complejo de silenciamiento inducido por RNA, del inglés *RNA-induced silencing complex*.
- **RNA**: Ácido ribonucleico.
- **mRNA**: RNA mensajero.
- **R.p.m.**: Revoluciones por minuto.
- **RTK**: Receptores tirosin-cinasa, del inglés *receptor tyrosine kinase*.
- **SD**: Sin digestión.
- **SDS**: Dodecilsulfato sódico.
- **Ser**: Serina.
- **SFB**: Suero fetal bovino.

- **SRC:** Tirosin-cinasa derivada de sarcoma, del inglés *sarcome tyrosine kinase*.
- **STAT-:** Proteínas transmisoras de señales y activadora de la transcripción, del inglés *signal transducer and activator of transcription*.
- **SV-40:** Promotor *simian virus-40*.
- **TAZ:** Coactivador transcripcional con motivo de unión PDZ, del inglés *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*.
- **TBE:** Buffer tris-borato-EDTA.
- **TBS-T:** Tris-HCL, NaCl, Tween.
- **TE:** Solución con Tris-EDTA.
- **TEG:** Solución con glucosa, tris y EDTA.
- **TGF-β:** Factor de crecimiento transformante beta, del inglés *transforming growth factor beta*.
- **Thr:** Treonina.
- **TLR:** Receptores tipo toll, del inglés *Toll like receptors*.
- **TNF-α:** Factor necrótico tumoral alfa, del inglés *tumor necrosis factor alpha*.
- **TRBP:** Proteína de unión a RNA es respuesta a la trans-activación, del inglés *Trans-activation response RNA-binding protein*.
- **Tregs:** Células T reguladoras.
- **U:** Unidades.
- **UV:** Luz ultravioleta.
- **V.V:** Vector vacío.
- **VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *vascular endotelial growth factor*.
- **YAP:** Proteína asociada a Yes, del inglés *Yes-associated protein*.
- **Web:** Indica que la referencia fue obtenida de una página web.

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad en la cual las células normales adquieren la capacidad de proliferar descontroladamente y formar tumores a través de un mecanismo llamado transformación, dado por mutaciones o alteraciones en la expresión de genes y proteínas reguladoras de la proliferación, el crecimiento y la muerte celular, clasificados en proto-oncogenes y genes supresores de tumores. También, se ha reportado que los microRNAs (miRNAs) juegan un papel central en el desarrollo del cáncer, estos son RNAs pequeños de 19 a 24 nucleótidos, capaces de inhibir la traducción o inducir la degradación del RNA mensajero (mRNA) de genes relacionados con el cáncer, mediante su unión a sitios complementarios ubicados principalmente en la región sin traducir 3' (3'UTR) de estos mRNA. Dentro de los genes supresores de tumores, el gen de la neurofibromatosis tipo 2 (*Nf2*), cuya proteína es Merlín (por sus siglas en inglés moesin, ezrin, radixin, like protein), es de gran interés, ya que regula procesos como la inhibición de la proliferación por contacto célula-célula, control del ciclo celular y sobrevivencia, inhibición de la respuesta inflamatoria, control de la movilidad y morfología celular. Además, la inactivación de Merlín, dada ya sea por mutaciones, por fosforilación o por degradación, se ha asociado al desarrollo de diferentes tipos tumorales dentro del sistema nervioso central, así como de mama, hígado, pulmón, tiroides, colón, próstata y fibrosarcomas.

Sin embargo, a pesar de su importante papel como supresor de tumores, hasta el momento no existen reportes sobre la regulación de Merlín por miRNAs. Mediante un análisis bioinformático, aquí se identificaron doce miRNAs con la capacidad de formar dúplex termodinámicamente estables con la región 3'UTR de Merlín. De acuerdo con esto, se mostró que cuando la región 3' UTR de Merlín se clonó abajo del DNA complementario (cDNA) del gen de luciferasa, tanto el miR-7 como el miR-146a regulan la expresión de luciferasa. De igual modo, la expresión de miR7 o de miR-146a en células HEK-293 promueve la disminución en los niveles proteicos de Merlín. En conjunto, nuestros resultados muestran que además de los mecanismos hasta ahora descritos para inactivar las funciones anti-tumorales de Merlín, éste también puede ser regulado negativamente por miRNAs, y sugieren que las funciones oncogénicas de los miRNAs 7 y 146a involucran la inactivación de Merlín y que estos miRNAs pueden contribuir a la generación de tumores en diferentes órganos del cuerpo.

1) INTRODUCCIÓN

1.1) Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, los índices de mortandad generados por esta enfermedad aumentarán un 45%, entre el 2007 y el 2030, pasando de 7.9 millones de defunciones a 11.5 millones anuales (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2008-1^{Web}; Revisado por Visvader, 2011). En México, en 2007 el cáncer fue la tercera causa de muerte en las mujeres y la cuarta causa en hombres (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2007-2^{Web}). En tanto que en 2008, 71,074 de las defunciones registradas tuvieron como causa principal algún tipo de cáncer (INEGI, 2010-3^{Web}).

El cáncer se presenta cuando las células “normales” adquieren la capacidad de proliferar descontroladamente (neoplasia), convirtiéndose en células tumorales o cancerígenas a través de un proceso conocido como transformación. Las neoplasias producen grandes masas de células, llamadas tumores, formados por subpoblaciones de células normales y tumorales (revisado por: Ruddon, 2007; Pardee y Stein, 2009; Sun y Yang, 2010; Visvader, 2011).

El proceso de transformación es causado por múltiples factores de riesgo ya sean físicos, químicos y/o biológicos, así como por las interacciones genes–ambiente, dando como resultado mutaciones o múltiples cambios en la expresión génica, que llevan a la pérdida del balance entre la proliferación y la muerte celular. Tal desbalance favorece ya sea la formación de tumores primarios o benignos, es decir, el crecimiento poblacional de células tumorales dentro de los mismos lugares en donde se generó la transformación; o bien la adquisición de un mayor número de mutaciones que favorecen la capacidad de generar vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis, que ayuda al desarrollo de un ambiente estromal oxigenado y a la disponibilidad de nutrientes favorables para la progresión de las células tumorales, las cuales en ocasiones llegan a adquirir la capacidad de romper la matriz extracelular que las contiene e invadir órganos distantes de donde se inició la transformación, proceso conocido como metástasis, promoviendo el desarrollo de tumores malignos o secundarios, los cuales son difíciles de erradicar y por ello considerados mortales (revisado por: Ruddon, 2007; Pardee y Stein, 2009; Sun y Yang, 2010).

1.1.1) Causas del cáncer: carcinógenos

Los carcinógenos son aquellas sustancias o materias que pueden proveer un factor de riesgo para desarrollar el cáncer (American Cancer Society (ACS)-4^{Web}). De manera general los carcinógenos se dividen en dos grandes grupos:

- Los ambientales: Incluyen a los físicos (radiaciones ionizantes y radiaciones ultravioleta), los biológicos (como los mediados por virus y bacterias) y los químicos (solventes, gases de combustión, pesticidas, herbicidas, asbestos, metales pesados). Dentro de los factores ambientales también se incluyen los relacionados con el estilo de vida, como fumar o una dieta desbalanceada, los que no son controlados por el hombre, como los niveles de radiación solar y ciertas infecciones, y finalmente los que vienen de procesos naturales inevitables, como la generación de radicales libres, hormonas endógenas y rayos cósmicos (revisado por: Pelengaris y Khan, 2006)
- Los genéticos: Incluyen a las mutaciones a nivel germinal, o heredadas de los padres y generalmente monogénicas. y las mutaciones a nivel somático, que van desde alteraciones a nivel puntual hasta cromosomal, provocados por inestabilidad génica, afectando múltiples genes relacionados con la proliferación celular y apoptosis (revisado por: Pelengaris y Khan, 2006).

Un individuo con un fondo génico específico puede ser particularmente vulnerable a determinado cáncer y por tanto más susceptible a determinadas influencias ambientales (revisado por: Pelengaris y Khan, 2006).

Actualmente se toma en cuenta como tercer grupo de carcinógenos a aquellos que no producen modificaciones directas en el DNA, sino más bien generan que las células puedan dividirse más rápido, incrementando la tasa de error en la replicación de DNA, y los inductores del proceso epigenético, es decir las modificaciones en la metilación del DNA y/o en las histonas relacionadas con la compactación del DNA, inducido por factores ambientales (revisado por: Pelengaris y Khan, 2006; Sharma *et al.*, 2009; Carlo y Croce, 2011; ACS-4^{WEB}).

1.1.2) Carcinogénesis

Todo el proceso que involucra el desarrollo del cáncer es conocido como carcinogénesis y se divide en tres principales estados: iniciación, promoción y progresión (revisado por: Pitot, 1993; Hanahan y Weinberg, 2000; Martínez *et al.*, 2003; Pardee y Stein, 2009).

- **Iniciación:** Resulta de mutaciones, alteraciones genéticas o epigenéticas irreversibles en genes específicos, que confieren ventajas en el crecimiento celular, siendo susceptibles a la promoción del desarrollo neoplásico indefinido, lo cual les permite desarrollar y/o crecer más rápido, sin pasar por los puntos de control celular que normalmente las mantienen en homeostasis (revisado por Martínez *et al.*, 2003).
- **Promoción:** Las mutaciones provocador por el agente iniciador no resultan en formación tumoral pero son esenciales para un mayor desarrollo neoplásico el cual se dará en respuesta a aplicaciones repetidas de un agente promotor, induciendo la selección clonal de células transformadas que superan en número a las normales (revisado por Martínez *et al.*, 2003).
- **Progresión:** Es el proceso donde la acumulación de mutaciones adicionales hace que las células tumorales adquieran un fenotipo maligno por su capacidad metastásica, invadiendo sitios distantes de donde ocurrió la iniciación (revisado por Martínez *et al.*, 2003).

1.1.3) Características del cáncer

A través de los años, muchas investigaciones han establecido las siguientes características propias de cualquier cáncer la inestabilidad genómica y mutaciones, la autosuficiencia en señales de crecimiento, la insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, la evasión de la muerte celular programada o apoptosis, el ilimitado potencial replicativo, la angiogénesis sostenida, la invasión de los tejidos o metástasis, la reprogramación de la energía metabólica y la destrucción de la defensa inmune **(Fig.1)**. Los diferentes tipos de cáncer pueden adquirir estas características por igual, sin embargo la manera para hacerlo varía significativamente, tanto mecanística como cronológicamente (revisado por: Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011).

Las características del cáncer se enlistan a continuación:

- Inestabilidad genómica y mutaciones: En el cáncer hay un incremento en la tasa mutacional de genes que controlan la proliferación celular o apoptosis. Tales mutaciones se deben a la alteración directa en el DNA, a los defectos en la maquinaria encargada de detectar y reparar defectos en el DNA, a la alteración en los sistemas de vigilancia que normalmente cuidan la integridad genómica y a la incapacidad para inactivar o interceptar moléculas mutagénicas antes de que provoquen daño en el DNA. Mientras que la inestabilidad genómica, es decir amplificaciones y deleciones de segmentos cromosómicos enteros, se ha relacionado con la pérdida de DNA telomérico que genera una inestabilidad cariotípica ventajosa para la progresión tumoral, contribuyendo al incremento de la tasa mutacional y a la acumulación de genotipos cancerosos favorables. De tal modo que aberraciones genómicas específicas y patrones genómicos se han asociado a determinados tipos de cáncer (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011).
- Autosuficiencia en señales de crecimiento: Las células cancerígenas evitan las rutas de control de la progresión, el crecimiento, número y tamaño celular, alterando las vías de señalización que regulan estos procesos, ya sea porque ellas mismas, o células estromales adyacentes, sobre-expresan ligandos o factores de crecimiento inductores de la progresión, o porque inducen un aumento en el número de receptores transmembranales que favorecen la progresión tumoral por una respuesta pronunciada, o bien porque alteran la estructura de los receptores para facilitar una activación independiente de ligando, al igual que promueven la activación constitutiva de componentes de rutas de señalización río abajo de estos receptores (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011).
- Insensibilidad en señales de anti-crecimiento: Las células cancerígenas pueden evadir las señales anti-proliferativas presentes en tejidos normales, encargadas de mantener la homeostasis de los mismos, ya sea por abolición de la inhibición por contacto célula-célula, o por la resistencia a inhibidores de crecimiento tanto solubles, como inmovilizados en la matriz extracelular, evitando así la salida del ciclo proliferativo activo y la entrada a un estado de quiescencia, librando su regreso al ciclo celular (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011)

- Evasión de la muerte celular programada o apoptosis: Para limitar la apoptosis, las células cancerígenas alteran las vías relacionadas con la inducción de este proceso, como la pérdida de función de proteínas sensoras del daño al DNA, el incremento en la expresión de reguladores anti-apoptóticos o señales de supervivencia, la desregulación de factores pro-apoptóticos y la interrupción de la ruta de muerte extrínseca inducida por ligando (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011).
- Potencial replicativo ilimitado: A diferencia de las células normales, que presentan primero senescencia, un estado no proliferativo pero viable, y finalmente a una fase de crisis, donde las células senescentes mueren, las células cancerígenas proliferan por evasión de las fases de senescencia y crisis, adquiriendo un estado de inmortalización, siendo capaces de mantener su DNA telomérico en longitudes suficientes como para evitar que los extremos cromosómicos se acorten a un tamaño crítico que lleve a una pérdida de material genético vital, evitando así la activación de rutas de muerte (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011).
- Capacidad angiogénica: Para que los tumores mantengan un crecimiento sostenido requieren la adquisición de una neovasculatura asociada a ellos, que les permita tener oxígeno, nutrientes y desechar la basura metabólica y el dióxido de carbono. La formación de esta nueva vasculatura ocurre a partir de la activación de la vasculatura existente, que normalmente es quiescente, lo cual se debe a que las células cancerígenas producen factores angiogénicos, tales como ligandos de receptores de células endoteliales vasculares, o sobre-expresan tales receptores (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011).
- Capacidad metastásica: Los tumores son capaces de colonizar órganos distantes a su origen por adquisición de alteraciones en su forma, en el tipo de agregación que presentan con otras células y en las agregaciones con la matriz extracelular. Tales alteraciones son inducidas ya sea por la desregulación en la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular, o por la sobre-expresión de moléculas promotoras de tales adhesiones, como moléculas involucradas en procesos de migración, embriogénesis e inflamación (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011)

- Reprogramación de la energía metabólica: Las células cancerígenas son capaces de mantener altas tasas de crecimiento y división, al ajustar su metabolismo, reprogramando el procesamiento de glucosa. En presencia de oxígeno limitan la formación del piruvato y por tanto su entrada a la mitocondria, promoviendo solo la glucólisis, contrario a lo que ocurre normalmente en condiciones aeróbicas, donde la fosforilación oxidativa dada en la mitocondria es la principal fuente de energía. La glucólisis aeróbica presente en los tumores, en principio tiene una producción de ATP (adenosin tri fosfato) hasta 18 veces menor al de la mitocondria, para compensar esta pérdida de energía, las células cancerígenas sobre-expresan los transportadores de glucosa, además de modificar enzimas de la ruta glucolítica, generando un consumo más eficiente de la glucosa (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011).
- Evasión de la respuesta inmune: Durante la formación tumoral el sistema inmune resiste o erradica la progresión neoplásica, eliminando a las células cancerígenas nacientes. Sin embargo, los tumores sólidos se establecen gracias a su capacidad para evadir o desarticular los componentes que participan en tal respuesta. Por ejemplo, son capaces de inhibir la infiltración de linfocitos citotóxicos y células NK (natural killer), por la producción de factores inmunosupresivos, que incluyen a las células T reguladoras (T Regs) y a las células supresoras derivadas de mieloides, (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs). Además, algunos carcinógenos biológicos, como virus y bacterias, son resistentes a la detección y destrucción por parte del sistema inmune, siendo capaces de inducir la iniciación tumoral (revisado por Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 1. Características comunes presentes en las células transformadas o tumorigénicas en los diferentes tipos de cáncer. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

1.1.4) Cáncer e inflamación

En las últimas décadas, se han acumulado evidencias suficientes para afirmar que el proceso inflamatorio es una característica adicional determinante para favorecer la progresión neoplásica. Existe una estrecha relación entre las rutas moleculares de la inflamación y el cáncer. En el microambiente tumoral, la inflamación latente contribuye a la proliferación y supervivencia de las células malignas, induce inestabilidad génica, angiogénesis, metástasis, oposición a la respuesta inmune adaptativa y reducida respuesta a hormonas o agentes quimioterapéuticos **(Fig.2)** (revisado por: Colotta *et al.*, 2009; Hanahan y Weinberg, 2011).

Los orquestadores clave en el proceso de inflamación-cáncer incluyen leucocitos infiltrados, macrófagos asociados a tumor (MAT), neutrófilos, los linfocitos B y T que junto con las células cancerígenas proveen, al medio tumoral, moléculas favorecedoras de la progresión tumoral, como algunos anticuerpos efectores, factores de crecimiento señaladores de la proliferación sostenida, como el factor de crecimiento epidermal (epidermal growth factor, EGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (vascular endothelial growth factor, VEGF), factores de supervivencia limitadores la muerte celular, citocinas pro-inflamatorias, como interleucinas (IL-), IL-1 β , IL-6 y el factor necrótico tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha, TNF- α), quimiocinas 2 y 8 (chemokine (C-C motif) ligand 2 y 8, CCL2 y CCL8), factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) y enzimas pro-invasivas degradadoras de la matriz, como metaloproteinasa 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) y heparinasa. Además, las células inflamatorias liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y quimiocinas, que por sí mismas son mutagénicas o reprimen directa o indirectamente las rutas de reparación del DNA y los puntos de control del ciclo celular, contribuyendo a la acumulación de alteraciones genéticas aleatorias y acelerando su evolución a estados malignos mayores **(Fig.2)** (revisado por: Colotta F. *et al.*, 2009; Grivemikov *et al.*, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

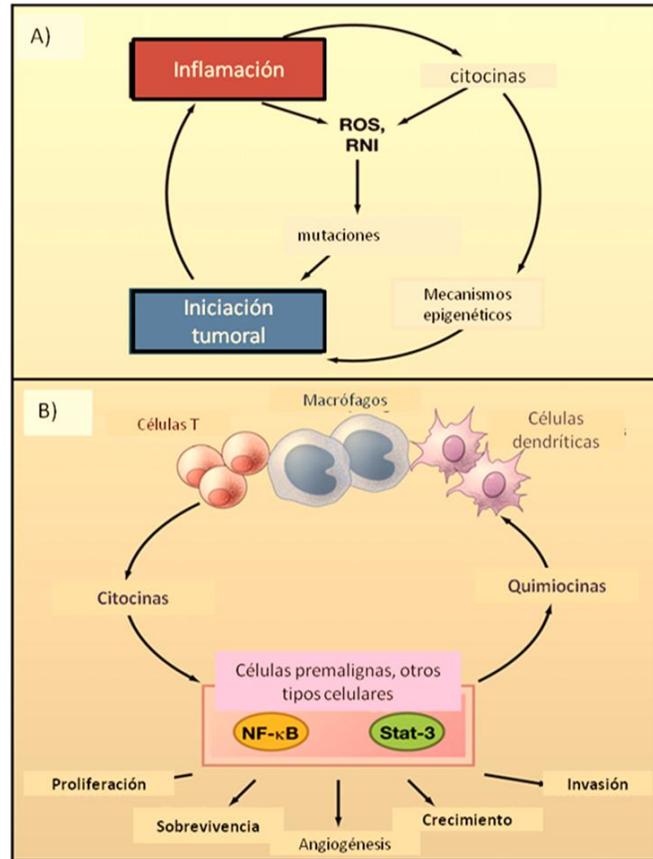


Figura 2. Relación entre cáncer e inflamación. A) La inflamación produce citocinas y ROS e intermediarios de nitrógeno (RNI), inductores de mutaciones o cambios epigenéticos que promueven la iniciación tumoral. El tumor a la vez promueve la inflamación, sobre-estimando su propio crecimiento. **B)** Las diferentes células del sistema inmune, como macrófagos, células T y dendríticas, producen citocinas activadoras de factores de transcripción en las células pre-malignas que inducen procesos favorecedores de la tumorigénesis, como proliferación, supervivencia, angiogénesis, crecimiento e invasión. Simultáneamente, las células cancerígenas producen quimiocinas que atraen a las células inmunológicas a la zona del desarrollo tumoral, exacerbando la respuesta inflamatoria y la carcinogénesis. Modificado de Grivemikov *et al.*, 2010.

1.1.5) Genes responsables del cáncer

Las alteraciones en el DNA o mutaciones responsables de favorecer la transformación celular, se dividen en dos principales grupos de genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. En las últimas décadas se han reconocido cientos de oncogenes potenciales y genes supresores de tumores, los cuales tienen en común el participar en las rutas de señalización que controlan la proliferación, diferenciación, migración y ciclo celular, apoptosis, integridad genómica y morfogénesis (revisado por: Hanahan y Weinberg, 2000; Kopnin, 2000; Vogelstein y Kinzler, 2004; Carlo y Croce, 2011).

1.1.5.a) *Proto-oncogenes*

Los proto-oncogenes, son genes normales cuya conversión a oncogenes ocurre por mutaciones o alteraciones epigenéticas, que hacen que el gen esté constitutivamente activo, o activo bajo condiciones en las que el gen silvestre no lo es, obteniendo una ganancia de función que favorece la proliferación celular reduciendo la sensibilidad a la muerte celular programada, todo lo cual ayuda al proceso de transformación celular (revisado por: Kopnin, 2000; Martínez *et al.*, 2003; Vogelstein y Kinzler, 2004; Carlo y Croce, 2011).

Las proteínas oncogénicas se clasifican principalmente en:

- Factores de crecimiento: Su expresión constitutiva favorece el crecimiento celular descontrolado. Algunos de ellos son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF), inductor de la proliferación celular y estimulador de fibroblastos; la familia de factores de crecimiento wingless (WNT), los cuales inhiben la fosforilación de la β -catenina, lo que bloquea su degradación permitiéndole translocarse al núcleo y activar la proliferación e invasión (revisado por Carlo y Croce, 2011); el factor EGF que promueve la división celular; y el factor VEGF, estimulador de la angiogénesis (revisado por Carlo y Croce, 2011).
- Receptores de factores de crecimiento: Son los miembros de la familia de receptores tirosina-cinasa, por ejemplo, los receptores del factor de crecimiento EGF (EGFR), y que en muchos tumores presentan activación constitutiva en ausencia de la unión del ligando, por modificación del dominio de unión al ligando; o

el receptor de VEGF (VEGFR) que estimula la angiogénesis (revisado por Carlo y Croce, 2011).

- Transductores de señales: Son las proteínas citoplasmáticas efectoras y reguladoras de la señalización intracelular, ubicadas río abajo de los receptores de factores de crecimiento. Entre éstas se encuentran las proteín-cinasas no receptoras y las proteínas de unión a guanósín trifosfato, como son las G pequeñas de la familia de Ras. Las proteínas no receptoras son de dos tipos: las tirosina-cinasas, como la tirosina cinasa de leucemia murina Abelson (Abelson murine leukemia protein tyrosine kinase, Abl), tirosina cinasa específica de linfocitos (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, LCK) y la tirosina cinasa derivada de sarcoma (sarcome tyrosine kinase, SRC); y las serina-treonina cinasas como la AKT o proteína cinasa B (PKB), el oncogén homólogo de la leucemia viral bovina (RAF1), el oncogén homólogo del sarcoma viral murino moloney (MOS) y el oncogén relacionado con el sitio de integración proviral 1 (proviral integration site 1 oncogene, PIM1) (revisado por Carlo M. y Croce M.D., 2011).
- Reguladores de la apoptosis: Como la familia de proteínas llamadas células B de linfoma 2 (B-Cell lymphoma 2, BCL-2) y extra larga (B-cell lymphoma extra large, BCLXL) que inhiben la apoptosis, cuya sobre regulación favorece la sobrevivencia celular (revisado por Carlo y Croce, 2011).
- Factores de transcripción: Son proteínas cuya ganancia de función favorece la expresión, estabilidad proteica y sobrevivencia celular de genes promotores de la transformación. Entre estos se encuentran el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (factor nuclear kappa-B, NF-kB) que controla genes relacionados con la inflamación, proteínas de adhesión celular, regulación del ciclo celular y genes anti-apoptóticos; también está la proteína activadora 1 (activator protein 1, AP1) compuesta de varios miembros, como Jun y Fos (participantes en diferenciación, proliferación y apoptosis) y la familia de oncogenes de eritoblastosis viral (ETS), como la escualeno epoxidasa 1 (ERG1) o la proteína relacionada con ETS 1 (ets variant, ETV1), las cuales controlan la hematopoyesis, angiogénesis, organogénesis, desarrollo de tejidos, diferenciación, y proliferación celular) (revisado por Carlo y Croce, 2011).

- Modeladores de la cromatina: Son los encargados de controlar el grado de compactación y de la remodelación de la cromatina. Como ejemplo de lo anterior son aquellos que silencian genes supresores de tumores por la unión de complejos represores transcripcionales a sus promotores hipermetilados, tales como las DNA metiltransferasas (DNMT), las proteínas de unión a DNA metilado (methyl-CpG-binding domain proteins, MBD), las metil transferasas de histonas y las desacetilasas de histonas (histone deacetylase, HDAC). También, de las proteínas coactivadoras de la transcripción de oncogenes como son las histona acetil transferasas (HAT), las metil-transferasas y complejos remodeladores de la cromatina, como el complejo remodelador del nucleosoma de levaduras (Switch/Sucrose Non Fermentable, SWI/SNF) (revisado por Delgado, 2008).

1.1.5.b) Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores, o anti-oncogenes, son genes cuya inactivación incrementa la probabilidad de formación de tumores, mientras que su activación inhibe el crecimiento celular y promueve la muerte celular. Algunos supresores de tumores son conocidos como guardianes del genoma, regulando los procesos involucrados en la reparación del DNA, limitando la proliferación celular de manera indirecta, al promover la estabilidad génica. Su eliminación resulta en un incremento en la tasa de mutación, acelerando la progresión tumoral (Martínez J.D. *et al.*, 2003). La inactivación o pérdida de función de los productos de los genes supresores de tumores puede deberse a mutaciones sin sentido en residuos esenciales para su actividad, produciendo proteínas truncas, o deleciones o inserciones de varios tamaños, y/o al silenciamiento epigenético. Se requieren en general mutaciones en ambas copias del gen son generalmente requeridas para favorecer el desarrollo tumoral (revisado por Vogelstein y Kinzler, 2004; Sun y Yang, 2010).

Los productos proteicos de los genes supresores de tumores se clasifican de acuerdo a la actividad que cumplen de manera normal, los cuales principalmente son:

- Supresores de la división celular: Su alteración promueve la proliferación, por su incapacidad de suprimir la división celular, dentro de este grupo se encuentran la proteínas de retinoblastoma (Rb), p53, poliposis coli adenomatosa (adenomatous polyposis coli, APC), p15, p16, p18, p19, p21, p27 y *Nf2*. Rb inhibe la transcripción de genes específicos requeridos para la mitosis a través de la unión de factores de transcripción tales como E2Fs, los cuales son un tipo de regulador de la proliferación celular; p53, induce el arresto del ciclo celular en las fases G1/S y G2/M en respuesta al daño generado al DNA por agentes como la radiación ultravioleta (UV). APC degrada a β -catenina, evitando que entre al núcleo y estimule la proliferación celular. p15, p16, p18, p21 y p27 inhiben las cinasas dependientes de ciclina (cyclin-dependent kinase, CDKs), activando con ello a Rb, siendo éste capaz de suprimir la división celular; *Nf2*, bloquea la proliferación y la transformación inducida por oncogenes como factores de crecimiento, al inducir la inhibición por contacto célula-célula; además, *Nf2* regula negativamente los niveles de ciclina D1, arrojando el ciclo celular (revisado por: McClatchey y Giovanni, 2005; Sun y Yang, 2010).
- Inductores de la apoptosis: Ejemplos de este grupo son p53, el receptor del factor de necrosis tumoral miembro 6 (Fas), la proteína puente integradora 1 (bridging integrator 1, Bin1) y la proteína fosfatasa y homóloga de la tensina (phosphatase and tensin homolog, PTEN). P53 media la apoptosis a través de dos principales rutas, la ruta extrínseca, activando la cascada de caspasas, y por la ruta intrínseca promoviendo la formación de apoptosomas, vía la familia de BCL-2. Fas actúa como receptor de ligandos que inducen la apoptosis. Bin1 media la apoptosis por c-Myc. La fosfatasa de lípidos PTEN inactiva al fosfatidilinositol trifosfato (phosphatidylinositol triphosphate, PIP3) e indirectamente previene la activación de AKT que promueve sobrevivencia y proliferación celular (revisado por Sun y Yang, 2010)
- Reparadores del daño del DNA: Ejemplo de estos son p53, la proteína homóloga de muts 2 (mutS homolog 2, MSH2), la homóloga de mutL (Mutl homolog 1, MLH1), la proteína mutada de ataxia telangiectasia (ataxia telangiectasia mutated, ATM) y la proteína asociada a cáncer de mama (breast cancer susceptibility protein, BRCA). p53, MSH2 y MLH1 pueden inducir la reparación por escisión de nucleótidos, remover el daño y mediar la síntesis desde la otra cadena. ATM es un sensor general del daño y fosforila a p53 y BRCA, para activar el proceso de reparación. BRCA y p53 trabajan

juntos en la reparación por escisión de nucleótidos por aductos formados en el DNA (revisado por Sun y Yang, 2010).

- **Inhibidores de la metástasis:** Su mutación permite a las células migrar e invadir sitios distantes. Aquí se encuentran la metastina, el supresor de la metástasis de cáncer de mama (breast cancer metastasis suppressor, BRMS1), los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs), el cofactor requerido para la activación de SP1 (cofactor required for SP1, CRSP) y la proteína con grupo de diferenciación-82 (Cluster of differentiation, CD82). La unión de la metastina al receptor acoplado a proteína G parecida a galanina (Galanin like G protein coupled receptor, GPR54) incrementa la expresión y actividad de la cinasa de adhesión focal (Focal adhesion kinase, FAK) e inhibe la metástasis de células cancerígenas. BRMS1 regula la transcripción de genes a través de su interacción con la desacetilasa de histonas HDAC. TIMPs, inhibe MMPs, o enzimas degradadoras de la matriz extracelular. CRSP sobre regula la expresión de metastina. CD82 es una glicoproteína de superficie celular activada por p53 que inhibe la migración celular (revisado por Sun y Yang, 2010).

1.2) NF2 o Merlín: gen supresor de tumores

El gen *Nf2*, identificado por primera vez en 1993, codifica para una proteína conocida como Merlín o Schwannomina. El gen que codifica para *Nf2* está localizado en el cromosoma humano 22q12 y su secuencia génica se extiende 100 Kb, puede presentar splicing alternativo formando diferentes isoformas, siendo las más comunes las isoformas 1 y 2. Sólo la isoforma 1 es capaz de someterse al plegamiento protéico necesario para contar con la actividad supresora de tumores y es codificada por los exones del 1-15 y el 17, formando una proteína de 595 residuos aminoácidos, mientras que la isoforma 2 es codificada por los exones 1-15 y 16, dando una proteína con 590 residuos. Ambas isoformas dan productos con un peso molecular estimado de 65 KDa (**Fig.3-A**) (revisado por: McClatchey y Giovannini, 2005; Scoles, 2007; Asthagiri *et al.*, 2009).

Merlín pertenece a la superfamilia de proteínas ERM, que incluye a la exrina, radaxina, y moesina, de allí su nombre. Esta familia de proteínas está involucrada en la interacción de proteínas de membrana con el citoesqueleto. Merlín está compuesto de un dominio N-

terminal tri-lobulado donde está el dominio FERM, seguido por una larga estructura α -hélice, y un dominio carboxilo terminal cargado (**Fig.3-B**) (revisado por: McClatchey y Giovannini, 2005; Scoles, 2007).

La activación canónica de Merlín ocurre por desfosforilación, la cual es mediada por las proteínas fosfatasa subunidad 1 blanco de la miosin fosfatasa (myosin phosphatase target subunit 1, MYPT-1-PPT1 δ), ésta desfosforila la serina-518 ubicada en el tallo C-terminal, permitiendo al dominio FERM unirse con el extremo C-terminal; tal interacción intramolecular permite que Merlín adopte una conformación cerrada o activa. Por su parte la fosforilación en el residuo de la Ser-518, por la proteína cinasa activada por p21 (p21 activated kinase, PAK) y por la proteína cinasa A dependiente de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) (protein kinase A, dependiente de AMP cíclico, PKA), evita el plegamiento intramolecular entre el dominio FERM y el tallo C-terminal, manteniendo a la proteína en una conformación abierta y por lo tanto inactiva. La regulación río arriba de las actividades de las proteínas cinasas, PAK y PKA, y de la MYPT-1-PPT1 δ determina el estado de fosforilación de Merlín (**Fig.3-B**) (revisado por: Scoles, 2007; Asthagiri *et al.*, 2009; Stamenkovic y Yu, 2010).

Por otro lado, Merlín puede ser inactivada de manera alterna por la proteína cinasa AKT, que se une directamente a Merlín y la fosforila en la treonina 230 (Thr-230) y en la serina 318 (Ser-318), lo cual evita la interacción de su extremo amino con el carboxilo y por consiguiente que adopte una conformación cerrada, afectando la asociación de Merlín con otras proteínas incluyendo ERM, CD44 y la proteína doble minuta murina (murine double minute 2, MDM2). Además, AKT promueve la degradación de Merlín al inducir su ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Tang *et al.*, 2007).

Merlín participa en varias rutas responsables del control de la proliferación celular, por lo cual su alteración o pérdida de función contribuye a la iniciación y progresión de distintos tipos de tumores, indicando que Merlín tiene una amplia función como gen supresor de tumores (revisado por Okada *et al.*, 2007). Las mutaciones en Merlín se han asociado principalmente a un fenotipo canceroso, llamado neurofibromatosis tipo 2, el cual se caracteriza por el desarrollo de tumores en el sistema nervioso central (revisado por Asthagiri *et al.*, 2009).

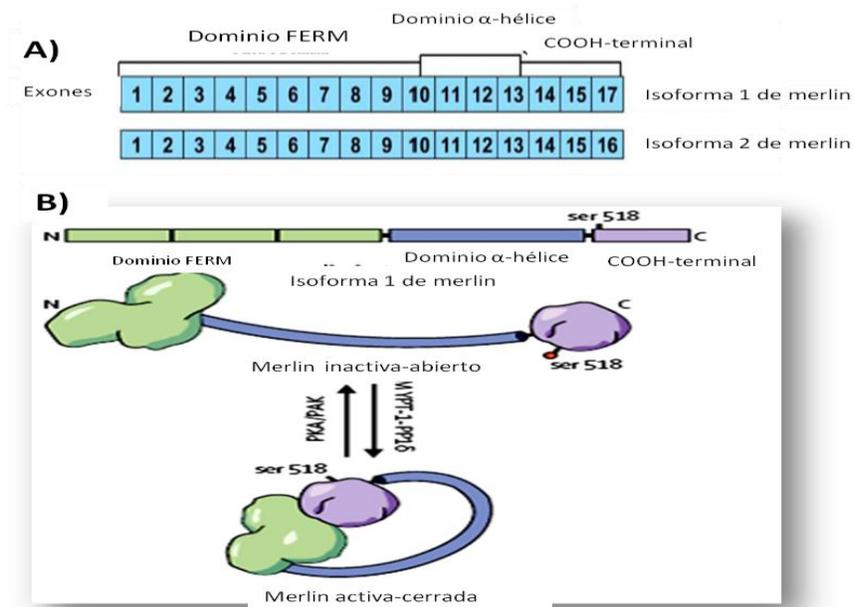


Figura 3. Proteína Merlín, características e isoformas. **A)** En los humanos, Merlín presenta la isoforma 1, constituida por los exones 1-15 y 17, y la isoforma 2, constituida por los exones 1-16. **B)** La isoforma 1 de Merlín, que es la más frecuente, consta de 3 dominios: un dominio FERM, una α -hélice y un carboxilo (COOH). Merlín es activada cuando es desfosforilada por MYPT-1 o -1 δ , lo que permite que interactúen el dominio FERM con el COOH, adquiriendo una conformación cerrada, mientras que cuando es fosforilada en la Ser-518, por PKA y PAK, se impide la interacción entre sus dominios, permaneciendo abierta o inactiva. Modificado de Scoles D.R, 2007 y Asthagiri R. *et al.*, 2009.

1.2.1) Neurofibromatosis tipo 2

La neurofibromatosis tipo 2, también conocida como neurofibromatosis central o neurofibromatosis acústica bilateral, es una enfermedad dominante autosómica provocada por la inactivación o pérdida de función de Merlín. La neurofibromatosis tipo 2 predispone a los individuos al desarrollo de múltiples tumores en el sistema nervioso central y periférico, principalmente en células de Schwann, meningeales, endodurales y aracnoidales (revisado por: Scoles, 2007; Asthagiri *et al.*, 2009).

Los síntomas presentes, además de los tumores, son pérdida de la audición por el schwannoma vestibular, tinnitus, mareos, desequilibrio, anormalidades visuales como cataratas, hamartomas y opacidad del cristalino, tumores y manchas en la piel, mononeuropatías como parálisis facial o caída del pie (revisado por Asthagiri *et al.*, 2009). La malignidad de la neurofibromatosis tipo 2 depende del desarrollo multi-tumoral, generalmente se presenta con tumores de crecimiento lento que no responden bien a la quimioterapia y tienen que ser extirpados por cirugía y radiación (revisado por McClatchey y Giovannini, 2005).

La neurofibromatosis tipo 2 se ha asociado principalmente a mutaciones de Merlín que llevan a la sustitución de aminoácidos en el dominio FERM y en el tallo C-terminal de Merlín, evitando que estos dominios interactúen y por tanto la molécula no adquiera la conformación activa. Sin embargo, no todas las mutaciones del dominio FERM interrumpen tal interacción, sino que evitan la unión de Merlín con otras proteínas de superficie celular o con efectores blanco, alterando su función (revisado por: Scoles, 2007; Asthagiri *et al.*, 2009; Jacoby *et al.*, 1996).

Las mutaciones que alteran a Merlín pueden ser tanto heredadas germinalmente por los padres como esporádicas o somáticas, por exposición a ciertos carcinógenos, desarrollando la neurofibromatosis tipo 2 o tumores en pacientes que no tienen una historia familiar clínica previa (revisado por: McClatchey y Giovannini, 2005).

1.2.2) Papel supresor de tumores de Merlín

- Inhibidor de la proliferación celular por contacto célula-célula

Merlín, al estar presente en los sitios ricos en actina y las uniones adherentes célula-célula, sirve como un conector entre la matriz extracelular-membrana plasmática-citoesqueleto-citoplasma, por lo que su participación es importante para regular la proliferación celular en respuesta a señales extracelulares (revisado por Okada *et al.*, 2007).

La forma desfosforilada o activa de Merlín, es la encargada de inhibir el crecimiento celular por contacto célula-célula en ausencia de factores de crecimiento o por exposición a ácido hialurónico. Merlín, al estar localizada justo debajo de la membrana plasmática, en

las uniones célula-célula y en sitios ricos en actina, sirve para que las señales extracelulares, que indican el paro de la proliferación celular, lleguen de manera directa e induzcan su activación. La inhibición por contacto célula-célula es esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular, su pérdida es una característica típica de la transformación celular y conduce al incremento de células tumorales, proliferación, movilidad e invasión (revisado por: Okada *et al.*, 2007; Stamenkovic y Yu, 2010).

Para inhibir el crecimiento celular, Merlín es activada por varios mecanismos, uno de ellos se inicia cuando en respuesta al contacto célula-célula se forma el complejo E-caderina- β -catenina, el cual evita que se active la proteína Rac que a su vez activa rutas relacionadas con la progresión celular. Al no estar presente Rac no puede reclutar cinasas, como PKA, que inactivan a Merlín. Otros mecanismos ocurren cuando debido a la alta confluencia celular hay interacción entre caderinas, lo que induce el reclutamiento de la fosfatasa MYPT1, que activa a Merlín y el arresto de crecimiento. Otro mecanismo más, es inducido por el ácido hialurónico, componente de la matriz extracelular, el cual interactúa con el receptor CD44, que a la vez recluta a MYPT1 e induce la activación de Merlín. De manera contraria, cuando las células necesitan aumentar su número, secretan factores de crecimiento o agentes mitogénicos, que señalizan por integrinas y receptores tirosina-cinasa (receptor tyrosine kinase, RTKs), los cuales activan diferentes cinasas como PAK o PKA, que inactivan a Merlín, haciéndolo incapaz de inhibir el progreso del ciclo celular **(Fig. 4)** (revisado por: Okada *et al.*, 2007; Stamenkovic y Yu, 2010).

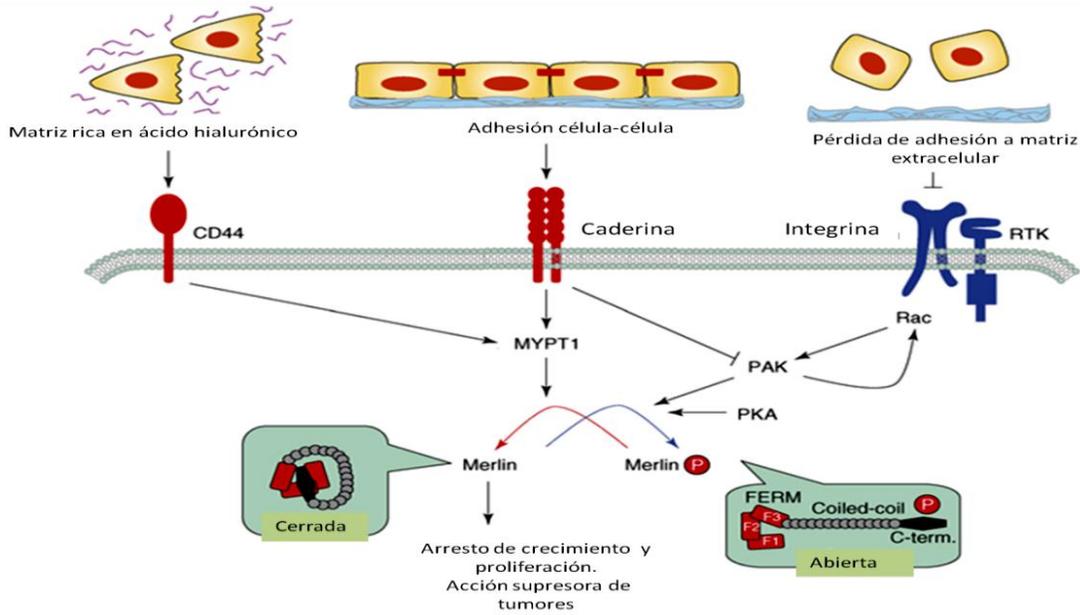


Figura 4. Inhibición de la proliferación celular por contacto célula-célula, mediada por Merlín. Existen diversos mecanismos por los cuales Merlín es activada para impedir el crecimiento y proliferación. Uno de ellos es cuando el ácido hialurónico activa a su receptor CD44, el cual induce que la fosfatasa MYPT1 desfosforile a Merlín permitiendo que ésta se cierre, se active y pueda bloquear el arresto del crecimiento. Otra manera ocurre cuando en confluencia celular el contacto célula-célula promueve la interacción entre caderinas, lo cual activa a MYPT1 y está a la vez desfosforila y activa a Merlín, además de impedir que sea inactivada por PAK. Cuando se pierde la confluencia celular y por lo tanto hay pérdida de contacto con la matriz extracelular, las integrinas activan a receptores tirosin-cinasa o RTKs, los cuales activan a Rac y éste a la vez activa a la cinasa PAK, la cual fosforila a Merlín impidiendo que se cierre quedando inactiva, favoreciendo la proliferación celular. Modificado de Okada *et al.*, 2007.

También se ha reportado que Merlín puede inhibir el crecimiento al bloquear el EGFR, el cual, como ya se mencionó, al ser un receptor del factor de crecimiento epidermal induce la proliferación celular. En ausencia de Merlín las células confluentes son incapaces de silenciar la señalización mitogénica dada por EGFR, provocando que haya proliferación desmedida. Cuando hay contacto célula-célula, Merlín se asocia con EGFR vía el cofactor regulador de intercambio de Na⁺/H⁺ (Na⁺/H⁺ exchange regulatory cofactor, NHE-RF), proteína que forma complejos macromoleculares involucrados en el tráfico y regulación transmembranal de receptores, además de asociarse a moléculas involucradas con el

crecimiento, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth factor receptors, PDGFR) y PTEN, previendo la internalización de EGFR inducida por ligando, así como la asociación de EGFR con efectores canónicos, inhibiendo la señalización río abajo, y evitando que pueda promover el crecimiento descontrolado (Curto *et al.*, 2007).

Un estudio indica que la forma activa de Merlín está localizada abundantemente en balsas lipídicas junto con Rac. Cuando hay confluencia celular, al ocurrir la interacción de la matriz extracelular con las islas lipídicas, Merlín ayuda a la retención de Rac dentro de la caveola, impidiendo que active rutas de las proteína-cinasas activadas por mitógeno (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK), relacionadas con la proliferación (revisado por Okada *et al.*, 2007).

- Inductor de la endocitosis de receptores inductores de la proliferación celular

Estudios realizados en la mosca de la fruta y en células de mamífero, mostraron que Merlín regula la distribución, agregación y disponibilidad de diferentes receptores de superficie celular, al inducir su endocitosis por interacción con proteínas que participan en este proceso, como el sustrato de tirosina cinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, Hrs). Entre los receptores que son controlados están Notch, Patched, Fat, E-caderina, EGFR, PDGFR y otros RTKs, todos los cuales inducen el crecimiento y proliferación. Con la reclusión de los receptores en endosomas y lisosomas para su degradación, Merlín contaría con otro modo de actuar para restringir el crecimiento celular. La pérdida de Merlín inhibe el tráfico endocítico de tales receptores, llevando a la acumulación de éstos en la superficie celular y la correspondiente activación río abajo de vías como Ras-Cinasas reguladas por señales extracelulares (extracellular signal regulated kinases, ERK), de las cinasas C-Jun-N-terminal (c-Jun N-terminal kinase, JNK), Rac, Pak y FAK, que promueven el incremento de la proliferación celular (revisado por: Okada *et al.*, 2007; Stamenkovicy Yu, 2010).

- Controlador de la movilidad y morfología celular

Merlín juega un papel esencial en la regulación de movilidad y morfología celular, puesto que regula la organización del citoesqueleto y la adhesión celular al interactuar con las

proteínas ERM, proteínas conformadoras y abundantes en aéreas dinámicas del citoesqueleto, como son vellosidades y estructuras celulares cruciales para la movilidad celular. Diferentes estudios han mostrado que la expresión de Merlín controla la adhesión célula-célula y célula-matriz, la extensión celular y movilidad. La pérdida de Merlín lleva a adquirir cambios en la adhesión celular y organización del citoesqueleto de actina, además desestabiliza las uniones célula-célula, llevando a una pérdida de inhibición por contacto y un incremento en la actividad de Rac, alteraciones de la membrana, formación de lamelopodios e incremento de la movilidad celular y tasas de migración (revisado por Okada *et al.*, 2007; Stamenkovic y Yu, 2010).

- La vía de Hippo-YAP: reguladora de la proliferación celular y la sobrevivencia

Merlín se encuentra participando río arriba de la vía Hippo-YAP, la cual juega un papel importante en el control del tamaño de los órganos y la tumorigénesis, pues regula la proliferación celular y la sobrevivencia. En general una alta confluencia celular inicia la activación en cascada de las cinasas de esta vía, lo que finalmente lleva a la fosforilación e inactivación del factor de transcripción compuesto por la proteína asociada a Yes (Yes-associated protein, YAP) y el coactivador transcripcional con motivo de unión PDZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ), provocando una baja en la expresión de genes involucrados en la proliferación celular. Cuando hay contacto célula-célula se activa a Merlín que se une a FRDM6, y a la vez interactúa con la cinasa Mst $\frac{1}{2}$ e induce que ésta fosforile a Lats $\frac{1}{2}$, y a su molécula coactivadora Mob1. Lats $\frac{1}{2}$ fosforila al factor de transcripción YAP e impide que pueda trasladarse al núcleo, pues tales fosforilaciones son reconocidas ya sea por el complejo proteico 14-3-3, que retiene a YAP en el citoplasma, o por un complejo de ubiquitinación, que la lleva a su degradación. Contrario a lo anterior, cuando se pierde el contacto célula-célula o cuando Merlín es inactivada por otro tipo de mecanismo, no se induce la activación de la cinasas río debajo de la ruta, YAP no se fosforila y se trasloca al núcleo, para unirse con TAZ y unirse al potenciador transcripcional TEAD, promoviendo la transcripción de genes de proteínas como el factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor beta, TGF- β), proteína morfogenética ósea (Bone morphogenetic protein, BMP), Gli2, el factor de crecimiento de tejido conectivo (Connective tissue growth factor, CTGF), citocinas, como el factor neurotrópico derivado del cerebro (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) y el factor de crecimiento de fibroblastos o FGF, todas las cuales inducen la proliferación y el

crecimiento independiente de anclaje (**Fig. 5**) (revisado por Okada *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2011).

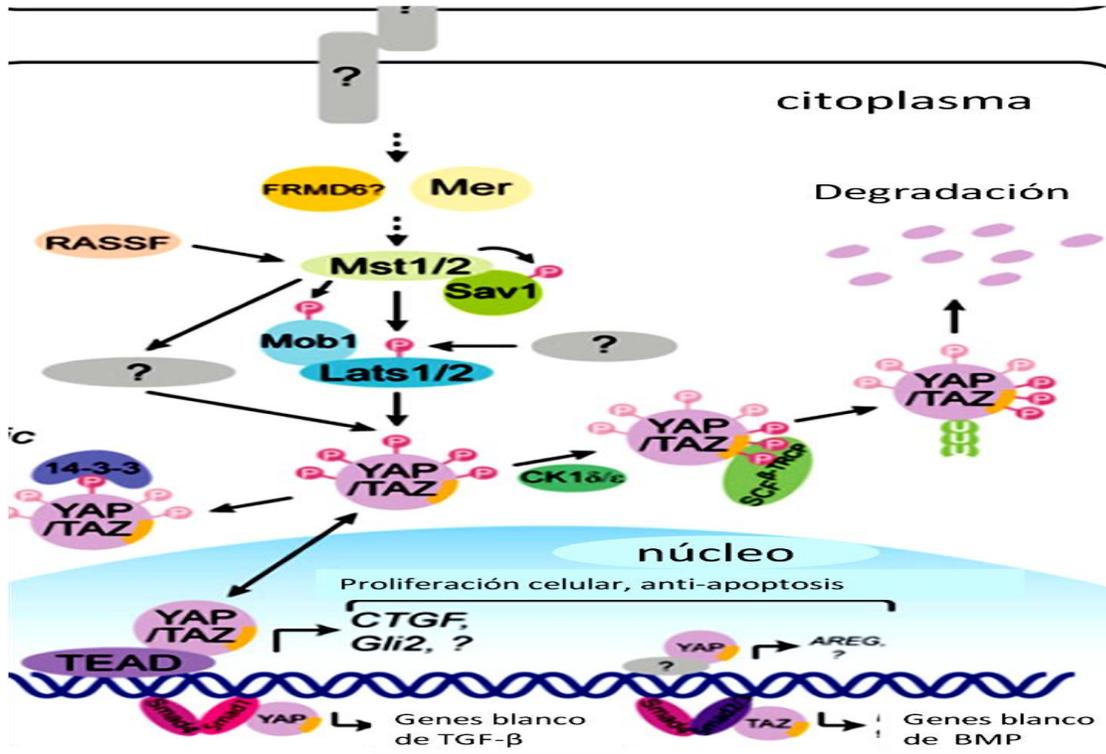


Figura 5. Vía Hippo/YAP. Merlín participa en la vía Hippo/YAP. Al ser activado por el contacto célula-célula, Merlín interactúa con FRMD6, ambas proteínas activan a la cinasa Mst1/2, la cual fosforila otra cinasa la Lats 1/2 y a su coactivador Mob1. Lats 1/2 multifosforila al factor de transcripción YAP, promoviendo su retención en el citoplasma por 14-3-3, o promoviendo su degradación por proteosoma. YAP al no poder traslocarse al núcleo no interactúa con TEAD y no puede inducir la transcripción de genes que promueven la proliferación e inhiben la apoptosis. Es decir la activación de la vía de Hippo por medio de Merlín ejerce una respuesta supresora de tumores. Por el contrario cuando Merlín es inactivado, no ocurre la cascada de fosforilación que bloquea a YAP, pudiendo entrar al núcleo y promover la proliferación e inhibir la apoptosis, favoreciendo la transformación celular y la tumorigénesis. Modificado de Zhao *et al.*, 2011.

- Inhibición de componentes de la respuesta Inflamatoria

Como ya se mencionó anteriormente, la activación de Merlín inactiva a Rac y por ende a todas las rutas de señalización inducidas por esta guanosina trifosfatasa (GTPasa), entre

las que están la activación de JNK y AP1. AP1 es un factor que induce la transcripción de componentes de la respuesta inflamatoria, como citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-8, IL-12 y TNF- α , además de controlar la proliferación, movilidad y migración celular (Shaw *et al.*, 2001), por lo que, Merlín al inactivar Rac y con ella a AP1 podría estar inactivando la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, Merlín inhibe la unión de CD44 con el ácido hialurónico, inhibiendo la acción de CD44 e impidiendo que promueva rutas involucradas en la proliferación, migración y producción de citocinas pro-inflamatorias (Bai *et al.*, 2007). También se ha visto que Merlín inhibe la activación de NF-kB, por medio de p65 (Rel A). En fibroblastos Merlín reprime la actividad endógena de NF-kB, al impedir la degradación de I κ B α (un inhibidor de NF-kB) inducida por TNF- α . Al inhibir a NF-kB, Merlín, también inhibe procesos como el crecimiento celular, la transformación mediada por Ha-ras, y la respuesta pro-inflamatoria, incluyendo la producción de citocinas pro-inflamatorias (Kim *et al.*, 2002).

Un estudio mostró que Merlín al interactuar con HRS, bloquea la vía activada por RTKs y por la proteína adaptadora transductora de señales (signal-transducing adaptor molecule, STAM), lo que inhibe a la proteína transmisora de señales y activadora de la transcripción-3 (signal transducer and activator of transcription-3, Stat-3) (Scoles *et al.*, 2002), de tal modo que Merlín podría estar evitando la transcripción de genes de citocinas inflamatorias, pues Stat-3 es un factor de transcripción que se ha visto involucrado en el proceso inflamatorio.

- Inhibición de la degradación por proteosoma

Cuando Merlín está activa, bajo confluencia por contacto célula-célula, es capaz de translocarse al núcleo, donde se une y suprime a la ubiquitin ligasa E3 CRL4 (cullin4A-ring E3 ubiquitin ligase, CRL4) y a su factor asociado (DDB1- and CUL4-associated factors, DCAF1), evitando que CRL4/DCAF1 mande a degradación por proteosoma a diferentes clases de genes involucrados en el control de la proliferación celular, arresto del crecimiento y supresión de la tumorigénesis. La depleción de esta ubiquitin-ligasa por sobre-expresión de Merlín inhibe la proliferación en las células de schwannoma y suprime el potencial oncogénico de células deficientes de Merlín (Li *et al.*, 2011).

- Control del ciclo celular

Otro estudio mostró que Merlín incrementa la estabilidad de p53 al inhibir su degradación mediada por MDM2, lo cual acompaña el incremento de la actividad de transcripción dependiente de p53, es decir de genes que inducen apoptosis y arresto del ciclo celular (Kim *et al.*, 2004). Además, Merlín al inhibir a Stat-3, también inhibe la transcripción de la ciclina D1, lo cual arresta el ciclo celular (Scoles *et al.*, 2002; Scoles, 2007). Merlín ejerce un efecto antiproliferativo, al menos en parte, por represión de la vía de expresión de ciclina D1 inducida por PAK, ya que esta cinasa es bloqueada por Merlín, lo cual evita la entrada a la fase S (Xiao G.H. *et al.*, 2005).

- Otras proteínas con las que interactúa

Se han identificado una plétora de proteínas que interactúan con Merlín, tanto transmembranales como intracelulares, entre las que se encuentran la proteína relacionada con el gen deletéreo del cáncer colorectal (deleted in colorectal carcinoma, DCC), CD43, FAT, NHE-RF, caspr/paranodina, paxilina, capaina, sintenina, a la isoforma L de la proteína potenciadora de pip (phosphoinositide 3-kinase enhancer, PIKE-L), y la proteína de unión a RNA es respuesta a la trans-activación (trans-activation response RNA-binding protein, TRBP); estas proteínas unidas a Merlín parecen estar jugando un papel importante en rutas de señalización mediadas por RTKs, moléculas de adhesión, receptores de la matriz extracelular y pequeñas GTPasas. Es posible que estas proteínas no sean efectores blanco de Merlín, sino que su función sea reclutar a Merlín dentro de varias localizaciones subcelulares (revisado por: Okada *et al.*, 2007; Stamenkovic y Yu, 2010).

1.2.3) La inactivación de Merlín induce carcinogénesis

La inactivación sostenida de Merlín, ocasionada ya sea por mutaciones somáticas o germinales, por represión epigenética, por activación constitutiva de cinasas PKA o PAK, por inducción de su degradación por proteosoma por AKT, o por alteraciones en cualquier ruta de señalización encargada de su activación o fosforilación, conduce a la proliferación celular descontrolada, a la promoción de fenotipos tumorales y progresión del cáncer, puesto que se ve inhibida la actividad de Merlín dentro de los diferentes procesos en los que participa como supresor de tumores. Como ya se mencionó arriba la baja en la

expresión del gen *Nf2* o en la actividad de Merlín se ha asociado al desarrollo de diferentes tipos de cáncer entre los que se encuentran cánceres del sistema nervioso central como schwannomas, meningiomas, ependimomas, astrocitomas, osteosarcomas, carcinomas en el sistema nervioso periférico, gliomas, fibrosarcomas, carcinomas hepatocelulares, carcinomas de tiroides, de colon, de próstata, de mama, carcinomas perineurales o pulmonares (revisado por: McClatchey y Giovannini, 2005; Scoles, 2007; Asthagir *et al*, 2009; Stamenkovic y Yu, 2010).

Varios estudios han mostrado que ratones *NF2+/-* están predispuestos al desarrollo de una variedad de tipos de tumores, sugiriendo un amplio papel de la pérdida de Merlín en la tumorigénesis. Notablemente la función de supresor de crecimiento de Merlín es conservada en otras especies (revisado por Jacoby, *et al.*, 1996). Además, la deficiencia de Merlín coopera con la pérdida de p53 en inducir tumores en el sistema nervioso periférico, y con la pérdida de p16 para causar mesoteliomas en diferentes modelos de ratones, indicando que la inactivación de Merlín coopera con otras lesiones oncogénicas para promover la tumorigénesis en un amplio rango de tejidos (revisado por Okada *et al.*, 2007).

1.3) miRNAs

Los microRNAs o miRNAs, son RNAs pequeños, monocatenarios, no codificantes, con un tamaño aproximado entre 19 a 24 nucleótidos, cuya función es la regulación de la expresión génica de diferentes mRNA. Los miRNAs reprimen la expresión génica por reconocimiento de los sitios blancos complementarios, localizados mayormente en la región no traducida 3' UTR, de los mRNA. Sin embargo, algunos miRNAs animales pueden tener como blanco la región 5' UTR y regiones codificantes de los mRNA. La complementariedad induce la formación de un dúplex miRNA:mRNA, tal interacción impide la traducción o promueve la degradación de los mRNA (revisado por: Carlo y Croce, 2011; Melo y Esteller, 2011). Debido a la capacidad de los miRNAs para regular de manera específica y fina la expresión génica, su papel es de gran importancia en diversos procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la respuesta al estrés, el metabolismo, el cáncer, la inflamación y la muerte celular programada, entre otros (revisado por Meza-Sosa *et al.*, 2012).

1.3.1) Biogénesis y maduración de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs comienza cuando la RNA polimerasa dos (Pol-II) sintetiza un transcrito grande conocido como miRNA primario (pri-miRNA), que forma una estructura tallo-asa. El pri-miRNA es reconocido por un complejo proteico llamado microprocesador, constituido por una RNAasa llamada Drosha y la proteína DGR8. DGR8 reconoce la estructura tipo asa, de aproximadamente 70 nucleótidos, del pri-miRNA, mientras que Drosha se une al RNA de doble cadena o estructura tipo tallo, donde corta sólo algunas bases de los extremos del pri-miRNA. A esta nueva estructura se le conoce como miRNA precursor (pre-miRNA), el cual es exportado del núcleo al citoplasma por la Exportina 5, con ayuda de la GTPasa Ran. El pre-miRNA transportado al citoplasma es subsecuentemente convertido a un miRNA maduro dúplex por otra enzima RNA III, endoribonucleasa específica de RNA de doble cadena (double-stranded RNA-specific endoribonuclease, DICER1). El procesamiento del pre-miRNA por DICER1 genera un dúplex corto que contiene dos cadenas, un miRNA final o maduro y un miRNA estrella. En células humanas, TRBP es una proteína que se asocia con DICER1, siendo un sensor de RNA de doble cadena, y permitiendo que éste se cargue dentro del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RNA-induced silencing complex, RISC). Seguido al procesamiento por DICER1/TRBP, resulta un dúplex de 22 nucleótidos que es cargado dentro de una proteína conocida como Argonauta (Ago), que también forma parte del complejo efector conocido como RISC. La cadena del dúplex que permanece dentro de Argonauta es el miRNA maduro (cadena guía o miRNA) mientras que la cadena estrella (cadena pasajera o miRNA*) es degradada en la mayoría de las ocasiones. Los nucleótidos 2-8 de la secuencia del miRNA maduro forman la llamada región semilla, que es complementaria al sitio blanco del mRNA blanco y por tanto confiere la especificidad de la interacción y del silenciamiento. Una vez unida el miRNA maduro al mRNA blanco éste impide su traducción o promueve su degradación (**Fig. 6**) (revisado por Melo y Esteller, 2011).

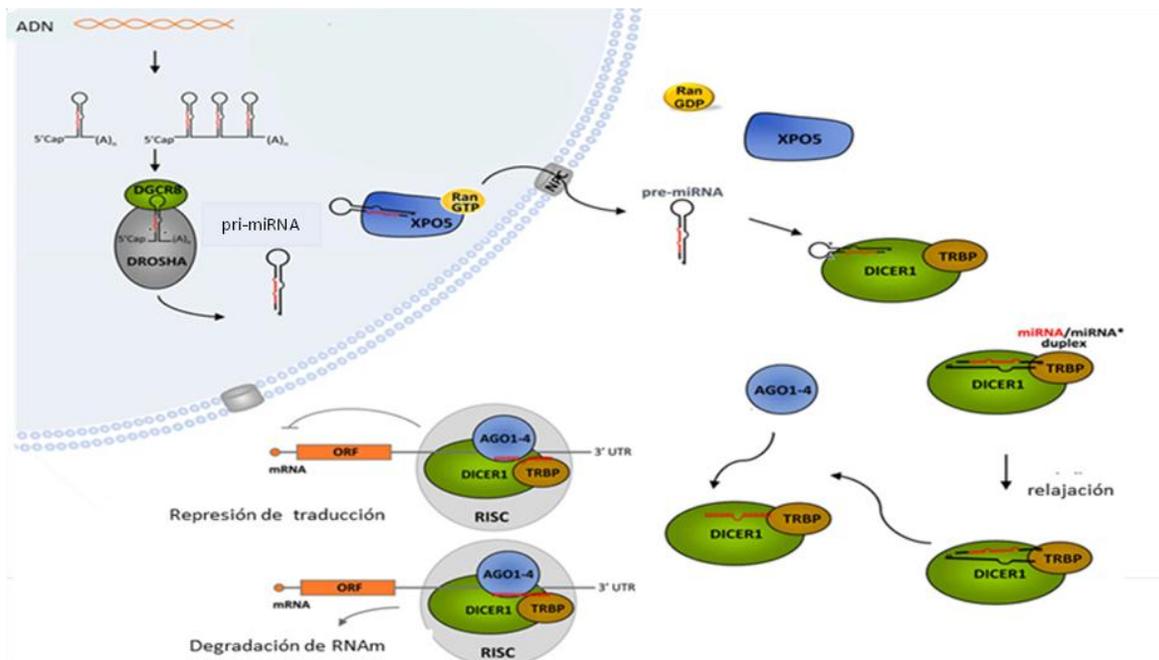


Figura 6. Biogénesis y maduración de los miRNAs. Los genes de miRNAs son generados como transcritos largos, denominados miRNAs primarios (pri-miRNAs) que después son procesados para generar miRNAs precursores (pre-miRNAs). Los pre-miRNAs son exportados desde el núcleo al citoplasma, donde son procesados para generar un dúplex que consiste del miRNA maduro y su cadena complementaria llamada miRNA estrella (miRNA*). El miRNA maduro es capaz de reclutar al complejo RISC y este complejo guía el silenciamiento de sus mRNA blanco, ya sea por degradación o por inhibición traduccional. Modificado de Melo y Esteller, 2011.

1.3.2) miRNAs como reguladores del cáncer

Recientemente, distintos estudios han reportado que la desregulación de los miRNAs, ya sea por mecanismos genéticos o epigenéticos, es clave para el desarrollo de varios tipos de cáncer, al estar involucrados en la regulación traduccional de cientos de genes relacionados con la diferenciación, proliferación y apoptosis. Distintos miRNAs están directamente involucrados en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón, mama, sistema nervioso central y periférico, cerebro, hígado, colon y leucemias. Los miRNAs oncogénicos son aquellos que al sobre-expresarse inactivan mRNA de supresores de tumores, y/o al bajar su expresión aumenta la de los oncogenes, mientras que los miRNAs supresores de tumores son aquellos que al sobre-expresarse inactivan mRNA de

oncogenes, y/o al bajar su expresión aumenta los supresores de tumores (revisado por Ruan *et al.*, 2009).

Se han descrito perfiles particulares de expresión de miRNAs asociados con la aparición de determinados tipos de cáncer, por lo que su detección ha servido como referencia para la clasificación de tumores, la diagnosis, el estado y progresión, así como prognosis y respuesta al tratamiento de diferentes cánceres. Por mapeo génico se ha visto que 50 % de los genes de miRNAs están localizados en regiones cromosómicas, que están bajo rearrreglos, deleciones y amplificaciones en las células cancerígenas. Además de las alteraciones genéticas y epigenéticas en los genes de miRNAs, su desregulación también puede ser alterada por cambios en las proteínas encargadas de su biogénesis y maduración, como por ejemplo, por mutaciones dentro del TRBP2 o DICER1, dando una baja global de miRNAs maduros (revisado por: Ruan *et al.*, 2009; Carlo y Croce, 2011; Melo y Esteller, 2011).

1.4) miRNA-7

El gen que codifica para el Hsa-miR-7 (Hsa, se refiere a *Homo sapiens*), reside en la banda citogenética humana 9q21 y participa en procesos relacionados con la diferenciación de foto-receptores, diferenciación de progenitores neurales del sistema nervioso central, regulación de la proliferación celular e inflamación (Lu *et al.*, 2011; Atlas Genetic Oncology-5^{Web}).

1.4.1) Relación del miR-7 con el cáncer

La sobre-expresión del miR-7 favorece la adquisición y desarrollo del linfoma de células B, el cáncer pulmonar, el de mama y el urotelial. Tal sobre-expresión es estimulada por el receptor EGFR por la vía Ras/ERK/c-Myc, la cual a la vez induce la proliferación celular y el crecimiento celular independiente de anclaje. EGFR induce miR-7, a través de la supresión de la expresión del represor transcripcional de ETS (Ets Domain Transcriptional Repressor, ERF), un regulador negativo de la actividad de la MAPK/ERK (Chou *et al.*, 2010).

Sin embargo, también se ha reportado que la progresión tumoral en glioblastomas, meduloblastomas, cáncer pulmonar, de mama y gástrico, se debe a una disminución de miR-7. En estos cánceres la baja en miR-7 aumenta la señalización de proliferación, pues impide la inactivación de los mRNA blanco de EGFR y AKT (Kefas *et al.*, 2008). En cáncer de mamá, la baja de miR-7 impide la inactivación de su mRNA blanco PAK, aumentando los niveles de esta cinasa promotora de invasión (revisado por Chou *et al.*, 2010; Godlewski *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011).

En conjunto, estos datos indican que hay un delicado balance del circuito regulatorio existente entre EGFR y miR-7. Las diferentes alteraciones de este balance, dadas en varios tipos de cáncer, pueden finalmente determinar el papel de miR-7 como oncogén o como supresor de tumores (Chou *et al.*, 2010).

1.5) miRNA-146a

1.5.1) Relación del miR-146a con el sistema inmune y la respuesta inflamatoria.

En los humanos el hsa-miR-146a está localizado en la banda cromosómica 5q34, y es expresado en varios tipos celulares, pero mayormente en células TReg, promoviendo que estas células sean capaces de mantener la homeostasis inmune, limitando la respuesta inflamatoria. En este sentido, la deficiencia de miR-146a resulta en un incremento del número de TRegs con función descontrolada, ocasionando una ruptura en la tolerancia inmunológica, una masiva activación linfocítica e infiltración tisular (revisado por: Williams *et al.*, 2008; Rusca y Monticelli, 2011).

Una alta expresión de miR-146a se ha observado en las células T cooperadoras (T helper cells-, TH-) tipo 1, pero no en las tipo 2 (TH2), sugiriendo que miR-146a es importante en el mantenimiento de la diferenciación del linaje de las células T. Además, miR-146a está involucrado en la producción de células mieloides incluyendo neutrófilos, monocitos y plaquetas. Por ejemplo, miR-146a participa en la diferenciación y maduración de los megacariocitos o plaquetas, proceso que intensifica la expresión de la proteína con dedos de zinc asociada a la leucemia promielocítica (promyelocytic leukaemia zinc finger, PLZF), la cual a su vez inhibe a miR-146a. Esta desregulación de miR-146a provoca un

incremento en la expresión del receptor de quimiocinas tipo 4 (chemokine receptor type 4, CXCR4), necesario para que lleve la megacariopoyesis (revisado por: Williams *et al.*, 2008; Rusca y Monticelli, 2011).

En linfocitos T cooperadores, la estimulación con componentes bacterianos o fúngicos como lipolisacáridos (LPS), o con citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 y TNF- α , inducen la transcripción de miR-146a, lo cual depende de la activación de NF- κ B. TNF- α e IL-1 β inducen la expresión de miR-146a en fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide. En células epiteliales de tejido alveolar de pulmón, un incremento de miR-146a, dado por la sobre-estimulación con IL-1 β , regula negativamente la liberación de quimiocinas inflamatorias como IL-8 y CCL5. Se ha visto que miR-146a atenúa o controla la hiper-respuesta inflamatoria al inhibir la transcripción de componentes río abajo de los receptores tipo toll (toll like receptors, TLR), como son la cinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK1) y el factor 6 asociado al receptor de TNF (receptor-associated factor 6, TRAF6), contribuyendo al umbral de tolerancia a endotoxinas y a la regulación de la producción de TNF- α . Significativamente, esta asa de retroalimentación negativa sólo se ha visto cuando los niveles de IL-1 β son muy elevados, reafirmando que miR-146a podría ser un importante controlador de rutas involucradas en la inflamación severa (Taganov *et al.*, 2006) (revisado por: Williams *et al.*, 2008; Rusca y Monticelli, 2011).

En células de Langerhans humanas, miR-146a está constitutivamente expresado en altos niveles, en comparación con las células dendríticas intersticiales. La alta expresión de miR-146a es inducida por el factor de transcripción PU.1, en respuesta a TGF- β , un señalizador clave que induce la diferenciación epidermal de las células de Langerhans pero no la diferenciación de las dendríticas. La alta expresión de miR-146a representa un nuevo mecanismo para evitar que las células de Langerhans sean sensibles a una exacerbada señalización de TLR, a través de disminuir los niveles de NF- κ B, por inactivación de IRAK1 y TRAF6. Por ejemplo, en células epiteliales, la baja de IRAK1, dada por miRNA-146a, induce una tolerancia inmune innata y protege del daño epitelial inducido por bacterias (Taganov *et al.*, 2006) (revisado por: Williams *et al.*, 2008; Rusca y Monticelli, 2011).

En células neurales de cultivo primario estresadas por péptidos β -amiloides-42 y/o IL-1 β , y en cerebros de personas con Alzheimer, miRNA-146a presenta una sobre-expresión inducida por NF-kB. A la vez, miR-146a inhibe al factor de complemento H (complement factor H, CFH), un represor de la respuesta inflamatoria en el cerebro, exacerbando la respuesta inflamatoria (Lukiw *et al.*, 2008), la cual podría estar favoreciendo la formación de las placas β -amiloides-42 y el desarrollo de Alzheimer y del propio cáncer.

1.5.2) Relación del miR-146a con el cáncer

Varios estudios han reportado que la sobre-expresión de miR-146a en distintos tipos de cáncer, como son el de tiroides papilar, páncreas, mama, cervical y glioblastoma, en comparación con el tejido normal, incrementó la proliferación de éstos. El desarrollo de linfomas y algunos carcinomas ocasionados por la infección crónica con el virus Epstein Barr (VEB), parecen estar relacionados con la sobre-expresión de miR-146a, pues la proteína latente de la membrana 1 (latent membrane protein 1, LMP1) de este virus, la cual mimetiza los receptores para TNF, induce la expresión de miR-146a, suprimiendo así la respuesta inmune y por tanto favoreciendo la sobrevivencia de las células cancerosas (revisado por: Williams *et al.*, 2008; Rusca y Monticelli, 2011).

Sin embargo, también se ha reportado una baja en la expresión de miR-146a en células de cáncer pancreático, gástrico, de mama, gliomas, carcinoma de próstata y carcinoma de médula, en comparación con las normales, en donde bajo un contexto celular normal miR-146a reduciría los niveles de la Rho-cinasa 1 (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1) y EGFR, proteínas claves inductoras de la proliferación celular, invasión y metástasis. En células pancreáticas la re-expresión de miR-146a inhibió la capacidad invasiva de las células pancreáticas, al bajar los niveles EGFR e IRAK1 (revisado por: Williams *et al.*, 2008; Rusca y Monticelli, 2011). En el caso del desarrollo de gliomas, la baja de miR-146a estaría aumentando los niveles de Notch1, implicado en la diferenciación celular de la astrogliá del sistema nervioso central, proceso que de manera indirecta podría estar favoreciendo la progresión tumoral (Mei *et al.*, 2011)

Todos estos datos sugieren que miR-146a, dependiendo del tipo y contexto celular, puede jugar un papel de promotor oncogénico o de supresor de tumores.

2) JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó, Merlín juega un papel importante como supresor de tumores al controlar procesos como la proliferación, crecimiento, apoptosis, inflamación y movilidad en diferentes tipos celulares, de tal modo que su inactivación, ya sea por mutaciones, modificaciones postraduccionales y degradación, promueve la adquisición de diferentes fenotipos tumorales.

Debido a lo anterior y siendo que actualmente los miRNAs son considerados reguladores clave para el desarrollo del cáncer, el definir si existen miRNAs que tengan como blanco a Merlín permitiría entender el desarrollo de tumores aún en ausencia de mutaciones y otros mecanismos de inactivación en el gen de Merlín.

3) HIPÓTESIS

Dado que Merlín es un importante supresor de tumores, que no todos los tumores resultan de mutaciones en este gen y que los miRNAs pueden promover el desarrollo tumoral alterando la expresión de supresores de tumores, entonces proponemos la existencia miRNAs que regulen la expresión de Merlín y así promover la transformación celular.

4) OBJETIVOS

4.1) Objetivo general

- Demostrar que Merlín es blanco de miRNAs.

4.2) Objetivos específicos

- Identificar bioinformáticamente miRNAs que podrían tener como blanco a Merlín.
- Demostrar si algunos de los miRNAs identificados interactúan con la 3'UTR de Merlín.
- Demostrar que los miRNAs regulan los niveles de expresión de Merlín.

5) MATERIALES Y MÉTODOS

5.1) Análisis bioinformático: bases de datos y programas

Los programas utilizados para predecir si la 3'UTR de Merlín era blanco de miRNAs específicos, fueron los siguientes:

- miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do>)
- PITA (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html)
- Target Scan Human (<http://www.targetscan.org>)

Algunos programas requirieron tanto la secuencia de la región 3'UTR del mRNA humano de Merlín, obtenida de la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>), como la secuencias de los miRNAs maduros candidatos, obtenidas de la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org>).

Por otro lado, el programa usado para predecir el tamaño de los fragmentos de DNA después de haber sido digerido con enzimas de restricción específicas (restricciones *in silico*) fue NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>); mientras que los programas usados para revisar las construcciones secuenciadas fueron BLAST/NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

5.2) Extracción de DNA genómico de sangre

La extracción de DNA genómico se hizo a partir de sangre humana periférica obtenida del banco de sangre del Hospital Regional del IMSS de Cuernavaca, Morelos. La sangre se mezcló con solución buffer de fosfatos 1x (PBS-1x) en una relación 1:1. Por cada 10 mL de sangre-PBS, se agregaron 3 mL de Ficol, centrifugando por 30 minutos a 13,000 r.p.m. Se tomó la fase anillada y se le agregaron 50 mL de PBS-1x, centrifugando por 5 minutos a 13,000 r.p.m. La pastilla de células se resuspendió con 5 mL de PBS-1x. Se cuantificó el número de células con azul de tripan 1:1 usando una cámara de New Bawer. Las células se lavaron una vez más con PBS, centrifugándolas por 5 minutos a 13,000 r.p.m. Posteriormente, la pastilla de células se resuspendió suavemente en 1 mL de PBS-1x y se

centrifugó por treinta segundos a 15,000 r.p.m. A partir de la nueva pastilla de células (que contenía 22.5×10^6 células) se purificó el DNA genómico, con ayuda del Kit MidiPrep (Stratagene) siguiendo las instrucciones del proveedor. El DNA se cuantificó en espectrofotómetro y guardó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, para su posterior uso.

5.3) PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), para amplificar tanto la 3'UTR de Merlín como el pre-miR-146a, se realizó mezclando los siguientes reactivos a las correspondientes concentraciones finales: buffer de reacción a 1x, cloruro de magnesio (MgCl_2) a 1.5 mM, mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) a 1.5mM, oligonucleótido sentido y oligonucleótido antisentido a 1pmol por cada μL de reacción, DNA genómico a 4 ng por μL de reacción, DNA-polimerasa Amplificasa de *Termus aquaticus* (Taq) (Bio TecMol, EA500) a 0.025 U por μL de reacción, la reacción se ajusta al volumen final deseado con agua esteril, libre de DNAasas. La reacción de PCR constó de una etapa de desnaturalización a $95\text{ }^\circ\text{C}$ por tres minutos, una etapa de alineamiento a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por un minuto y a $72\text{ }^\circ\text{C}$ por un minuto treinta segundos, esta etapa constó de 30 ciclos, y finalmente la etapa de extensión fue a $72\text{ }^\circ\text{C}$ por diez minutos hasta descender a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por un minuto. Los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados para amplificar tanto la 3' de Merlín como el pre-miR-146a, fueron diseñados *in silico* y se muestran en la **Tabla 1**.

3' UTR de Merlín	Sentido	5' AATTCTCGAGACCTGCCACTTCTCCTGC 3'	TM	L
	(XhoI):		71.72°C	28b
Antisentido		5' AAGCGGCCGCGCTGACTGCAGTACGACC 3'	79.13°C	29b
(NotI):				
pre-miR-146a	Sentido	5' AATTGGATCCAGCTGCATTGGATTTACC 3'	69.4°C	29b
	(BamHI):			
Antisentido		5' TAATCTCGAGGCCTGAGACTCTGCCTTCT 3'	71.55°C	29b
(XhoI):				

Las bases en rojo indican los sitios de restricción para las correspondientes enzimas, escritas también en rojo en paréntesis. Las letras azules indican las bases añadidas para un anclaje correcto de las enzimas de restricción. L: Longitud, TM: Temperatura de fusión.

El DNA obtenido de la reacción de PCR, con la 3'UTR de Merlín, se corrió a 100 volts en un gel de agarosa de bajo punto de fusión Ultrapure (Invitrogen) al 1 %, con buffer Tris-borato-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (TBE) al 1x y 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (BrEt). Se cortó la banda del gel que contenía el amplificado de la 3'UTR y se purificó el DNA con ayuda del kit de QIAquick (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del proveedor. El DNA purificado fue cuantificado y guardado a -20 °C, para su posterior uso.

Por otro lado, de la reacción de PCR con el pre-miR-146a amplificado se tomaron 5 µl y se corrieron en un gel de agarosa al 1 %, con TBE al 1x y 0.5 µg/mL de BrEt, para confirmar la presencia del producto esperado, y el resto de la reacción fue purificada por precipitación con etanol, cuantificada y guardada a -20 °C, para su posterior uso.

5.4) Restricciones enzimáticas

5.4.1) Digestión de 3'UTR de Merlín

- **Digestión para ligación**

El DNA purificado con la 3'UTR de Merlín fue digerido con las enzimas *XhoI* y *NotI*, para poder ser insertado dentro del vector psiCheck2 (Promega), para ello se preparó una mezcla con los siguientes reactivos, a las correspondientes concentraciones finales: Seroalbumina bovina (BSA) a 1 µg/µL, Buffer 3 (NE Bio Labs) a 1x, 1µg de DNA de 3'UTR de Merlín, 10 U de *NotI* (NE Bio Labs), 10 U de *XhoI* (NE Bio Labs). La reacción de digestión se realizó por dos horas a 37°C. Se inactivaron las enzimas poniéndolas veinte minutos a 62 °C en baño maría, y finalmente el DNA se purificó por precipitación en etanol, cuantificó y guardó a -20 °C para su posterior uso.

- **Digestión diagnóstica**

La digestión diagnóstica, para confirmar si el DNA purificado correspondía a la 3'UTR de Merlín, se realizó tomando 500 ng del DNA, a los cuales se le agregaron 10 U de la enzima *PvuII* (Fermentas), Buffer G a 1x (Fermentas) y se digirió por dos horas a 37 °C.

La digestión se separó en un gel de agarosa al 1 % con TBE y 0.5 µg/mL de BrEt a 100 volts.

5.4.2) Digestión de miR-146a

- **Digestión para ligación**

El DNA purificado con el pre-miR-146a fue digerido con las enzimas *BamHI* y *XhoI* para poder ser insertado en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Para ello se preparó una mezcla con los siguientes reactivos a las siguientes concentraciones finales: BSA a 1µg/µL, Buffer 3 (NE Bio Labs) a 1x, 1 µg del pre-miRNA146a, 10 U de *BamHI* (NE Bio Labs) y 10 U de *XhoI* (NE Bio Labs). La reacción se realizó por dos horas a 37 °C. Se inactivaron las enzimas incubándola reacción de digestión por veinte minutos a 62 °C en baño maría. El DNA se purificó por precipitación con etanol, se cuantificó y se guardó a -20 °C para su posterior uso.

- **Digestión diagnóstica**

La digestión diagnóstica, para confirmar si el DNA purificado correspondía al pre-miR-146a, se realizó usando 500 ng del DNA purificado que fueron digeridos con 10 U de la enzima *PvuII* (Fermentas), usando Buffer G a 1x (Fermentas). La reacción se realizó por dos horas a 37°C y los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa al 1% con TBE y 0.5 µg/mL de BrEt, a 100 volts.

5.4.3) Digestión del plásmido psiCheck2

El vector psiCheck2 (Promega) fue digerido con las mismas enzimas que el inserto 3'UTR de Merlín, es decir *XhoI* y *NotI*. La digestión fue hecha en dos fases, primero fue con *NotI*, por ser la de actividad más sensible, y los reactivos usados quedaron a las siguientes concentraciones finales: BSA a 1µg/µL, Buffer 3 (NE Bio Labs) a 1x, 10 U de *NotI* (NE Bio Labs) por cada µg del vector psiCheck2. Se realizó la digestión por dos horas a 37 °C y para inactivar a la enzima, la mezcla se incubó a 62 °C por veinte minutos. Para la segunda digestión, al tubo con la primera digestión se le agregaron 10 U de *XhoI* (NE Bio Labs), dejándola por dos horas a 37 °C. Posteriormente se agregaron 10 U de fosfatasa alcalina (Fermentas), por cada µg de vector y se dejó actuando por una hora a 37 °C. El

DNA se purificó por precipitación con etanol, cuantificó y dejó a -20 °C para su posterior uso. Para confirmar que se tenía el psiCheck2 linearizado, se separaron 500 ng de lo purificado en un gel de agarosa al 1 %, con TBE y 0.5 µg/mL de BrEt, a 100 volts.

5.4.4.) Digestión del plásmido pcDNA3.1

El vector pcDNA3.1 (Invitrogen) fue digerido con las mismas enzimas que el inserto pre-miR-146a, es decir *Bam*HI y *Xho*I. Los reactivos usados para la reacción de digestión quedaron a las siguientes concentraciones finales: BSA a 1µg/µL, Buffer 3 (NE Bio Labs) a 1x, 1 µg del vector pcDNA3.1 por 10 U de *Bam*HI (NE Bio Labs) y 10 U *Xho*I (NE Bio Labs), llevando al volumen final deseado con agua estéril. Se dejó por dos horas a 37 °C. Pasado el tiempo se puso veinte minutos a 62 °C, para inactivar ambas enzimas. Se purificó por precipitación con etanol, cuantificó y dejó a -20 °C para su posterior uso. Para confirmar que el pcDNA3.1 estaba linearizado se corrieron 500 ng de lo purificado en un gel de agarosa al 1%, con TBE al 1 y 0.5 µg/mL de BrEt, a 100 volts.

5.5) Ligación

Para insertar o ligar la 3'UTR de Merlín en el vector psiCheck2, y el pre-miR-146a, en el vector pcDNA3.1, se mezclaron en una reacción de ligación los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas: 5 U de ligasa T4 (Fermentas), buffer de la enzima T4 (Fermentas) a 1x, de 10 a 50 ng del correspondiente vector previamente linearizado y purificado, el correspondiente producto de ligación digerido (ya sea la 3'UTR de Merlín o el miR-146a), a una concentración dada a partir de la siguiente fórmula :

$$ng \text{ del Inserto} = \frac{(ng \text{ del vector}) \times (\text{tamaño del inserto})}{Kb \text{ del tamaño del vector}} \times 3, \text{ ajustando el volumen final deseado}$$

con agua estéril libre de DNAasas. Las reacciones de ligación se incubaron dos horas a 22 °C y doce horas a 4 °C.

5.6) Transformación en bacterias DH5-α

Bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α (Promega), fueron transformadas con las construcciones, psiCheck2/3'UTR-Merlín y pcDNA3.1/pre-miR146a; para esto, de las reacciones de ligación se tomó un volumen tal que contuviera 15 ng de DNA (tomando en

cuenta tanto del DNA plasmídico como el inserto), y se mezcló por inversión con 50 μ L de bacterias competentes por tratamiento con cloruro de calcio (CaCl_2) previamente descongeladas en hielo. La mezcla de bacterias con la ligación se incubó treinta minutos en hielo, y luego 38 segundos a 48°C, y se regresó al hielo por dos minutos. Posteriormente se agregaron 300 μ L de medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) y se incubó a 37 °C por 50 minutos en agitación. Pasado el tiempo, se plaquearon 50 μ L y 100 μ L del cultivo bacteriano en cajas Petri con medio LB sólido con ampicilina a 100 μ g/mL. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C, por 18 horas. Las colonias que fueran más grandes y aisladas se tomaron con una punta estéril y se depositaron en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina a 100 μ g/mL, y se incubaron por 18 horas a 37 °C en agitación. Pasado el tiempo el crecimiento bacteriano fue guardado a 4 °C para la posterior purificación del plásmido.

Por otro lado, la construcción pcDNA3.1/pre-miR-7 fue purificada a partir de un pastilla en glicerol de *E. coli* DH5- α , guardada a -70 °C. Tal construcción fue previamente aislada, secuenciada y purificada en laboratorio, y cuenta con la inserción de la secuencia precursora del miR-7b de ratón, amplificada a partir de sangre de ratones C57 obtenidos del Bioterio del IBT, UNAM. Se puso un raspado de la colonia en 6 mL de medio LB líquido con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL y se incubó a 37 °C en agitación por 18 horas. El cultivo se guardó a 4 °C para la posterior purificación del plásmido.

5.7) Minipreparación de DNA plasmídico

Las construcciones, psiCheck2/3'UTR-Merlín, pcDNA3.1/pre-miR-7 y pcDNA3.1/pre-miR-146a, contenidas en los diferentes crecimientos de las colonias guardadas a 4 °C, fueron purificadas mediante la técnica de extracción de DNA por método de lisis alcalino. Para ello se tomaron 3 mL de crecimiento bacteriano y se centrifugaron un minuto a 15,000 r.p.m. La pastilla bacteriana se resuspendió suavemente en 100 μ L de TEG (glucosa 50 nM, Tris pH 8.0 25 nM, EDTA 10mM) y se dejó por cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló suavemente con 200 μ L de la solución 0.2 N de hidróxido de sodio (NaOH) y dodecilsulfato sódico (SDS) al 1 % (preparada al momento), dejando cinco minutos en hielo. Se agregaron 150 μ L de acetato de potasio (KAc) 5 M frío a pH4.8 y sin mezclar se dejó cinco minutos en hielo, para después centrifugarlo por un minuto a 15,000 r.p.m. Luego, se tomó sólo el sobrenadante evitando llevar el DNA genómico y

restos celulares y se centrifugó por un minuto a 15,000 r.p.m. Este paso de centrifugar y pasar el sobrenadante se repitió las veces que fueron necesarias para eliminar todo el DNA genómico y restos celulares. Posteriormente al sobrenadante se le agregaron 800µL de etanol (ETOH) al 100%, y se mezcló por inversión 5 veces, dejándolo un minuto a temperatura ambiente, después se centrifugó por un minuto a 15,000 r.p.m. y se desechó el sobrenadante, quedando sólo la pastilla a la que se le agregaron 800 µl de ETOH al 70%, dejándola por dos minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por un minuto a 15,000 r.p.m, se desechó el sobrenadante, evitando desprender la pastilla, la cual se dejó a temperatura ambiente, hasta que adquiriera un color translucido, luego se resuspendió con vortex en 50µL de tris-EDTA (TE), hasta disolverla.

Para comprobar que se tenía la construcción deseada, se digirieron 4 µL del DNA purificado con 10 U de la enzima *PvuII* (Fermentas), junto con el Buffer G (Fermentas) a 1x (el cual contenía 2 ng/µL de RNAasa). La digestión se incubó durante media hora a 37 °C. Los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa al 10 % con TBE 1x y con 0.5 µg/mL de BrEt, a 100 volts.

De las colonias portadoras de las construcciones que dieron el patrón de digestión esperado, se escogieron las que emitieron mayor señal en el gel, y se tomó 1 mL del LB que contenía los respectivos crecimientos bacterianos (previamente guardados a 4°C), y se agregaron a 6 mL de medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina, que se dejaron agitando a 37°C por 18 horas. Se tomaron 3 mL para purificar las construcciones, con ayuda del Kit MiniPrep Gene Jet Plasmid (Fermentas), siguiendo las instrucciones del proveedor. El DNA purificado se cuantificó y fue usado para la secuenciación.

5.8) Secuenciación

Las construcciones purificadas con MiniPrep (Fermentas) se mandaron a secuenciar. Para ello se preparó una dilución, que se envió a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM (IBT), con 500ng del DNA purificado en 15 µL de agua estéril y el correspondiente oligonucleótido a una concentración de 10 pmol/µL. Las diluciones se hicieron por duplicado, una con el oligonucleótido sentido, y otra con el oligonucleótido antisentido. Al par que contenía la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín, se le agregaron el oligonucleótido sentido 5'AGG ACG CTC CAG ATG AAA TG 3' y el

antisentido 5'CAA ACC CTA ACC ACC GCT TA 3', los cuales sirven para amplificar cualquier secuencia insertada dentro del sitio de clonación múltiple del psiCheck2; mientras que al par de diluciones que contenía la construcción pcDNA3.1/miR-146a se le agregó el oligonucleótido sentido 5'AAT TGG ATC CCA GCT GCA TTG GAT TTA CC 3', y el antisentido 5'TAA TCT CGA GGC CTG AGA CTCTGCCTTCT 3'; al par de diluciones que contenía la construcción pcDNA3.1/pre-miR-7 se le agregó el oligonucleótido T7 primer 5'TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3', el cual amplifica la región promotora T7, propia del plásmido pcDNA3.1, y ubicada río arriba del inserto pre-miR-7. Las secuenciaciones se analizaron con los programas BLAST-NCBI y Chromas (**Sección 5.1**), y se seleccionaron las colonias con las secuencias que no presentaran mutaciones en relación con las secuencias sacadas de las bases de datos.

5.9) Maxipreparación del DNA plasmídico

Las construcciones, psiCheck2/3'UTR-Merlín, pcDNA3.1/pre-miR-7 y pcDNA3.1/pre-miR-146a, cuya secuencia fue correcta, fueron seleccionadas y purificadas en grandes cantidades partiendo de 6 mL de medio líquido LB, que contenía los crecimientos bacterianos de DH5- α , junto con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Tales crecimientos bacterianos se cultivaron por dieciocho horas a 37 °C, en agitación. Posteriormente, los 6 mL de los cultivos bacterianos se inocularon en 500 mL medio LB Líquido con 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, y se dejó en agitación por 18 horas a 37 °C. Pasado el tiempo, los 500 mL fueron utilizados para purificar el DNA con ayuda del Kit Maxiprep Genopure Plasmid (Roche), siguiendo las indicaciones del proveedor. El DNA purificado se cuantificó y fue digerido con *PvuII* para comprobar que correspondía a la construcción de interés, finalmente se guardó a -20 °C para su posterior uso.

De los 500 mL de medio LB iniciales utilizados para el maxiprep, se tomaron 1.5 mL de cada cultivo y se centrifugaron por un minuto a 15,000 r.p.m. Se desechó el sobrenadante, y la pastilla se resuspendió en 500 μL de LB líquido con ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$, más 500 μL de glicerol y se guardó a -70 °C.

5.10) Cultivo de células HEK-293

Las células utilizadas para los experimentos de transfección y los ensayos de luciferasa, fueron las células HEK-293 de American Type Cell Culture (ATCC), las cuales son células humanas embrionarias de riñón, con altos índices de transfección previamente reportados. Las células HEK-293 fueron mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco de Invitrogen) suplementado con: 5 % de Suero Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomina y 2mM de glutamina en un ambiente de 5 % de dióxido de carbono (CO₂) a 37 °C y 90 % de humedad. Para su transfección, las células, a un 90 % de confluencia, se desprendieron con Tripsina a 1x (Gibco Invitrogen) y se colectaron en 1/10 del volumen inicial de DMEMsup-5%SFB. Las células se centrifugaron por 5 minutos a 1,200 r.p.m. y la pastilla se resuspendió suavemente en 3 mL de DMEMsup-5%SFB. El número de células se determinó usando una cámara New Bawer, en presencia de azul de tripano 1:1. Se sembraron 120,000 células por caja, en cajas de 35 mm con 3 mL de medio DMEMsup-5%SFB, las células se cultivaron a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 90 % de humedad, hasta alcanzar el 90 % de confluencia.

5.11) Transfección de construcciones

A las células HEK-293 a 90 % de confluencia, se les retiró el medio y se enjuagaron con 1 mL de DMEM sin suplementar, y se agregaron 1.5 mL de DMEM sin suplementar. Posteriormente a cada caja se le agregó 100 µl de una mezcla que contenía: 50µl de DMEM junto con el DNA de las construcciones, previamente purificadas, a diferentes concentraciones y combinaciones mostradas, a grandes rasgos en la **Tabla 2**, más 50 µl de DMEM sin suplementar que contenía 3 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se cultivaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 90 % de humedad. Pasadas 24 horas se retiró el medio y fue sustituido por 1.5 mL de DMEMsup-5%SFB. Las células se cultivaron de nuevo bajo las mismas condiciones y se cosecharon pasando las 48 horas post-transfección.

Los grupos de transfección variaron en concentración y combinación de construcciones en los diferentes ensayos de luciferasa, y se muestran a detalle en las **Tablas suplementarias S1-S5**.

Tabla 2. Grupos de transfección de los ensayos de luciferasa. Cantidades usadas de cada construcción en la transfección de células HEK-293 para los ensayos de luciferasa

NO TRANSFECTADAS	-	-	
TRANSFECTADAS (GRUPOS)	psiCheck2 (0.1 µg) +	-	
		pcDNA3.1	(0.1,0.2 y 0,4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a	
		pcDNA3.1/miR-7	
		pcDNA3.1/miR-145	
	pcDNA3.1/miR-881		
	psiCheck2/3'UTR de Merlín (0.1 µg) +	-	
		pcDNA3.1	(0.1,0.2 y 0,4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a	
		pcDNA3.1/miR-7	
	pcDNA3.1/miR-145		
	psiCheck2/3'UTR de KLF4 (0.1 µg) +	-	
		pcDNA3.1	(0.1,0.2 y 0,4 µg)
		pcDNA3.1/miR-7	
		pcDNA3.1/miR-145	
pcDNA3.1/miR-881			

5.12) Extractos totales

Una vez que pasaron 48 horas post-transfección, se desechó el medio y las cajas se enjuagaron con 1 mL de PBS1x.

Cada una de las cajas, con las células con los diferentes grupos de transfección, que fueron usadas para los ensayos de luciferasa se lisaron con 100 µL de Buffer de Lisis Pasivo 1x del Kit Luciferase Dual System Assay (Promega). Los lisados se congelaron en hielo seco y se descongelaron en baño maría a 65 °C. Este ciclo de congelación-descongelación se repitió dos veces. Posteriormente se centrifugaron a 4 °C, por diez minutos a 14,000 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante, para guardarlo a -70 °C hasta su uso.

Las cajas con las células que fueron usadas para el ensayo del Western blot se lisaron con 100 µL de buffer de lisis (Tris 20 mM pH 7.4, cloruro de sodio (NaCl) 137 mM, β-glicerolfosfato 25 mM pH7.4, PPINa 2 mM, EDTA 2 mM pH7.4, Triton x 100 1%, glicerol 10%), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Antipaína 5 µg/mL, Aprotinina 5 µg/mL, ditioneitol (DTT) 0.5 mM, Leupeptina 5 µg/mL, Pepstatina 5 µg/mL, PMSF 1 mM, Ortovanadato de Sodio (Na₃VO₄)1 µM). Después de ser incubados por 15 minutos en hielo, los lisados se centrifugaron a 4 °C, por diez minutos a 14,000 r.p.m. El sobrenadante se recuperó y se guardó a -70 °C, para su posterior uso.

5.13) Ensayo de luciferasa

Los ensayos de luciferasa se llevaron a cabo utilizando el Kit Luciferase Dual System Assay (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor, partiendo de 5 µl de los extractos celulares totales.

5.14) Western blot

La cuantificación de proteínas de los extractos totales de las células HEK-293 transfectadas, se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron 40 µg de proteínas y se llevaron a un volumen de 30 µl con agua estéril, 5 µl de Buffer de carga para proteínas 1x (Tris HCl pH 6.8 a 0.5 M, glicerol al 10 %, SDS al 10 %, azul de bromofenol al 0.05 %, β-mercaptoetanol al 0.005 %). Las proteínas se desnaturalizaron hirviendo las muestras por cinco minutos y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10 %, a una corriente de 35 mA en buffer de corrida 1x (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y SDS al 0.1 %), durante una hora.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (LG) en buffer de transferencia (200 mM de glicina, 25 mM Tris, 0.1% de SDS y metanol al 20 %) utilizando un voltaje constante de 100 mV, durante 90 minutos.

La membrana fue teñida con rojo de ponceau, para evaluar la calidad de la transferencia de proteínas y se destiñó con agua destilada. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con leche al 5 % en TBS-T (Tris/HCl 20 Mm pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05 %).

Posteriormente, se les añadió el anticuerpo primario correspondiente en 5 % de leche en TBS-T, y se incubaron con agitación a 4 °C durante toda la noche. El anticuerpo anti-NF2 fue utilizado a una dilución 1:1000 y el anticuerpo anti-ERK2 a una dilución 1:4000.

Las membranas se lavaron tres veces por lapsos de cinco minutos con TBS-T para después agregar el anticuerpo secundario en leche al 5 % en TBST-T. El anticuerpo secundario anti-conejo Inmunoglobulina G (IgG) fue diluido 1:6000 para la membrana que contenía el anticuerpo anti-Merlín y 1:10,000 para la membrana que tenía el anticuerpo anti-ERK2. Las membranas se incubaron por una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Pasado el tiempo las membranas se lavaron tres veces por lapsos de cinco minutos con TBS-T y posteriormente se reveló con una mezcla de Luminol y Reacción Oxidante del kit de quimioluminiscencia Western Ligthing Plus ECL (Perkin Elmer), siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.15) Anticuerpos

Los anticuerpos se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, INC. Los anticuerpos primarios fueron anti-NF2 (Merlín) (sc-332), anti-ERK2 (sc-154), y el anticuerpo secundario fue anti-conejo IgG (sc-5308).

5.16) Análisis estadísticos

La comparación de las medias de los datos obtenidos en los ensayos de luciferasa, se hizo por medio de la prueba estadística T-student. Los datos se presentan como un promedio \pm desviación estándar. Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov fueron aplicadas para los dato. Múltiples comparaciones pareadas y la prueba T-student fue usada para determinar el valor de p, cuyo valor de significación se definió como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Los procedimientos matemáticos para analizar las diferentes lecturas de luciferasa se muestran a detalle en la sección suplementaria **S-6**.

6) RESULTADOS

6.1) Análisis bioinformático: miRNAs que tienen como blanco la 3'UTR de Merlín

Ya que hasta la fecha de este trabajo de tesis no hay reporte alguno sobre la regulación de la expresión de Merlín mediada por algún miRNA, lo primero que se hizo fue un análisis bioinformático para determinar aquellos miRNAs que podrían tener como blanco a la 3'UTR de Merlín, el cual se basó en la comparación de los valores obtenidos por los programas Target Scan Human, PiTa y miRanda (**Fig. 7**). Estos tres programas están diseñados con base en algoritmos capaces de predecir la probabilidad de interacción de un miRNA con el o los sitios blanco dentro de la 3'UTR del mRNA de un gen, tomando en cuenta distintos criterios, como son la ubicación del sitio blanco dentro de la 3'UTR, complementariedad de la región semilla del miRNA con el sitio blanco, cantidad y ubicación de bases adenina-uracilo (A-U) adyacentes al sitio blanco, abundancia del sitio blanco y estabilidad termodinámica en la formación del dúplex miRNA:mRNA. Además, cada programa aporta valores o datos específicos, que hacen más robusto el análisis (revisado por Hammell, 2010).

El programa PiTa determina la probabilidad de interacción de un miRNA con un mRNA con el valor $\Delta\Delta G$, que es la resta de ΔG open (energía necesaria para que el sitio blanco esté accesible) del ΔG dúplex (energía necesaria para la formación del dúplex). Entre menor es el valor $\Delta\Delta G$, hay menor energía libre y mayor probabilidad de interacción, de tal modo que si determinado dúplex arroja una $\Delta\Delta G$ menor a -7 establece un valor significativo para considerar que se podría estar dando tal interacción. Lo anterior se basa en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, donde se probó que la inactivación dada por ciertos miRNAs sobre algunos genes, presentaron valores de $\Delta\Delta G$ menores a -7 (revisado por: PITA-6^{Web}, Kertesz, M., *et al.*, 2007; Hammell, M. 2010).

El programa Target Scan Human considera significativa la formación de determinado dúplex miRNA:mRNA si el valor context + score presenta un porcentaje entre 80 % a 100 %. Además, dentro de los parámetros que toma en cuenta para obtener estos valores se encuentra la conservación del sitio blanco al alinear la 3'UTR de Merlín con sus ortólogas. Si el sitio blanco está conservado en varias especies, es un indicador positivo para

considerar que tal interacción miRNA:mRNA podría estar teniendo una significancia funcional y por ello se ha preservado a lo largo de la evolución. También toma en cuenta la complementariedad de la región semilla con el sitio blanco, si las 8 o 7 bases de la región semilla son complementarias al sitio blanco es un buen indicador para sugerir que tal interacción se podría estar dando (revisado por: Target Scan Human-7^{Web}; Lewis B. P., *et al.*, 2003; Hammell, 2010).

El programa miRanda se basa en el valor miRsvr score, el cual entre más negativo se presente es un indicador favorable para considerar significativa la formación de determinado dúplex. De manera directa el programa sólo muestra los miRNAs que presentan valores negativos, y por lo tanto señala a aquellos miRNAs que tienen una alta probabilidad de estar interactuando con determinado mRNA (revisado por: miRanda-8^{Web}; John B., *et al.*, 2004; Hammell M. 2010).

Las secuencias de cada miRNA, usadas para el análisis bioinformático, fueron obtenidas de la base de datos miRBase y la secuencia de la 3'UTR de Merlín de la base de datos Ensembl (**Fig. 7**). Las direcciones electrónicas de todos los programas y las bases de datos usadas se muestran a detalle en la sección de materiales y métodos.

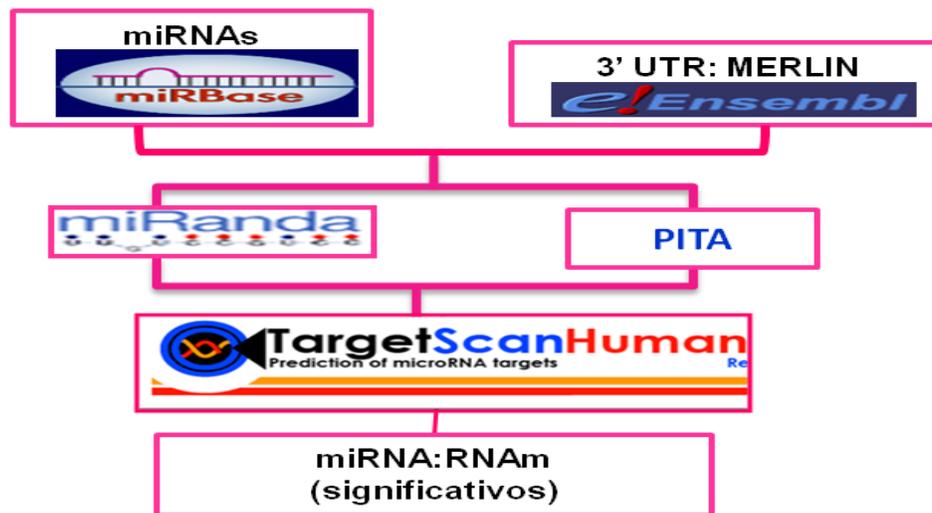


Figura 7. Método bioinformático para encontrar miRNAs candidatos. Esquema de flujo que muestra el desarrollo del análisis bioinformático para determinar aquellos miRNAs con alta probabilidad de que tengan como blanco la 3'UTR de Merlín y que podrían estar formando dúplex significativos con éste. También se muestran las bases de datos usadas para obtener las secuencias de los miRNAs y la

El resultado final obtenido a través del análisis bioinformático comparativo con los tres diferentes programas nos arrojó una lista de 12 miRNAs que se consideraron significativos para interactuar con Merlín al formar un dúplex con algún sitio blanco de su región 3'UTR (**Tabla 3**). Dentro de esta lista se consideran más significativos a los miRNAs: hsa-miR-25, hsa-miR-32, hsa-miR-146a, hsa-miR-7, hsa-miR-330 y hsa-miR-326, que están sombreados en rojo en la **Tabla 3**, ya que presentaron valores positivos para la formación del dúplex con los tres diferentes programas. En cambio, el resto de los miRNAs de la lista, presentes en blanco (**Tabla 3**), sólo contaron con valores significativos en dos programas, pero fueron tomados en cuenta ya que se han comprobado, de manera experimental, interacciones de miRNAs con su mRNA blanco a pesar de no haber sido predichos o reconocidos por algoritmos de algunos de los programas hasta ahora diseñados, como es el caso del miR-1 de ratón, el cual ya se ha demostrado experimentalmente que tiene como blanco a la proteína parecida a Kruppel factor 4 (Kruppel-like factor 4, KLF4), a pesar de solamente ser positivo para su interacción con este mRNA en dos programas (Xie C. *et al.*, 2011).

Tabla 3. MiRNAs que resultaron significativos para la formación de un dúplex con la 3'UTR de Merlín.

N°	miRNA	Sitio blanco dentro de la 3'UTR de Merlín	Pita	Miranda	Target Scan Human		
			$\Delta\Delta G$	miRsvr score	Context score percentile %	Complementariedad región semilla/ sitio blanco	Conservación
1	hsa-miR-25	184-190	-6.76	-0.1779	79	7mer/8	Alta
2	hsa-miR-32	184-190	-7.05	-0.1763	81	7mer/8	Alta
3	hsa-miR-92a	184-190	-4.43	-0.1779	81	7mer/8	Alta
4	hsa-miR-92b	184-190	-4.43	-0.1779	81	7mer/8	Alta
5	hsa-miR-363	185-191	-2.34	-0.1779	78	7mer/8	Alta
6	hsa-miR-367	185-191	-4.53	-0.1779	77	7mer/8	Alta
7	hsa-miR-146a	234-240	-8.12	-0.1309	88	7mer/8	Alta
8	hsa-miR-146b	234-240	-2.92	-0.1309	86	7mer/8	Alta
9	hsa-miR-7	271-277	-9.10	-0.3048	91	7mer/8	Baja
		802-808	-9.63	X	42	7mer/8	Baja
10	hsa-miR-193b	304-310	-6.03	X	94	8mer	Baja
11	hsa-miR-330	3521-3527	-10.74	-0.1684	95	8mer	Baja
12	hsa-miR-326	3523-3529	-9.54	-0.1717	95	8mer	Baja

Debido al enfoque de investigación de nuestro laboratorio, los miRNAs que nos llamaron más la atención fueron el miR-7 y el miR-146a (**Tabla 3**), ya que como se mencionó en la introducción, la activación de miR-146a se ha visto relacionada con el proceso inflamatorio, y la de miR-7 con el proceso de proliferación celular y diferenciación, además de que la sobreexpresión de ambos miRNAs se ha asociado al desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Por tanto, el presente trabajo se planteó como objetivo determinar si hsa-miR-7 y hsa-miR-146a podrían estar regulando a Merlín.

6.1.1) Predicción bioinformática: hsa-miR-7 forma un dúplex significativo con la 3'UTR de Merlín

Dentro de la lista de miRNAs, obtenida como resultado del análisis bioinformático, el hsa-miR-7 resultó ser un candidato positivo para estar formando un dúplex con la 3'UTR de Merlín. En la introducción se mencionó que la sobreexpresión de hsa-miR-7 se ha asociado a diferentes tipos de cáncer, además de ser un miRNA cuya transcripción y actividad se ha asociado a procesos favorecedores del proceso cancerígeno, como la inflamación, diferenciación y proliferación celular (Chou *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011; Atlas Genetic Oncology-5^{Web}). Lo anterior, llevó a suponer que las funciones transformantes del miR-7 podrían involucrar la inactivación del supresor de tumores Merlín. Por tanto, se planteó averiguar si el miR-7 es capaz de reducir los niveles de Merlín.

El análisis bioinformático mostró que la 3'UTR de Merlín presenta dos posibles sitios blanco para miR-7, el primero se ubica en las bases 271-277 y el segundo en las bases 802- 808. Ambos sitios son complementarios con 7 de las 8 bases de la región semilla del miR-7 (**Fig. 8-A**). Los resultados del programa miRanda indican que el primer sitio blanco muy probablemente sea un sitio genuino, ya que obtuvo un miRsvr score de -0.3048, pero no el segundo sitio blanco, el cual a pesar de ser mostrado por el programa Target Scan Human tampoco fue considerado significativo. Sin embargo, el programa PiTa dio una $\Delta\Delta G$ de -9.10 para el primer sitio y de -9.63 para el segundo, ambos valores caen dentro del rango que se considera positivo para afirmar que miR-7 podría estar interactuando con la 3'UTR de Merlín (**Fig. 8-B**). Además, el programa Target Scan Human mostró un *context score percentile* de 91 % para el primer sitio blanco, dato efectivo para considerar significativo que este sitio esté formando un dúplex con el mRNA, en cambio el segundo sitio presentó un *context score percentile* de 42 %, valor que no

considera significativo la interacción de este sitio blanco en el miR-7. El programa Target Scan Human también mostró que el primer sitio se encuentra conservado sólo en humano, chimpancé y macaco, y el segundo sitio está conservado en humano, chimpancé y perro (**Fig. 8-C**). Estos datos sugieren que al estar presentes sólo en tres especies podría tratarse de apariciones recientes y por tanto su significancia funcional podría ser importante sólo para las especies en las que se presentaron.

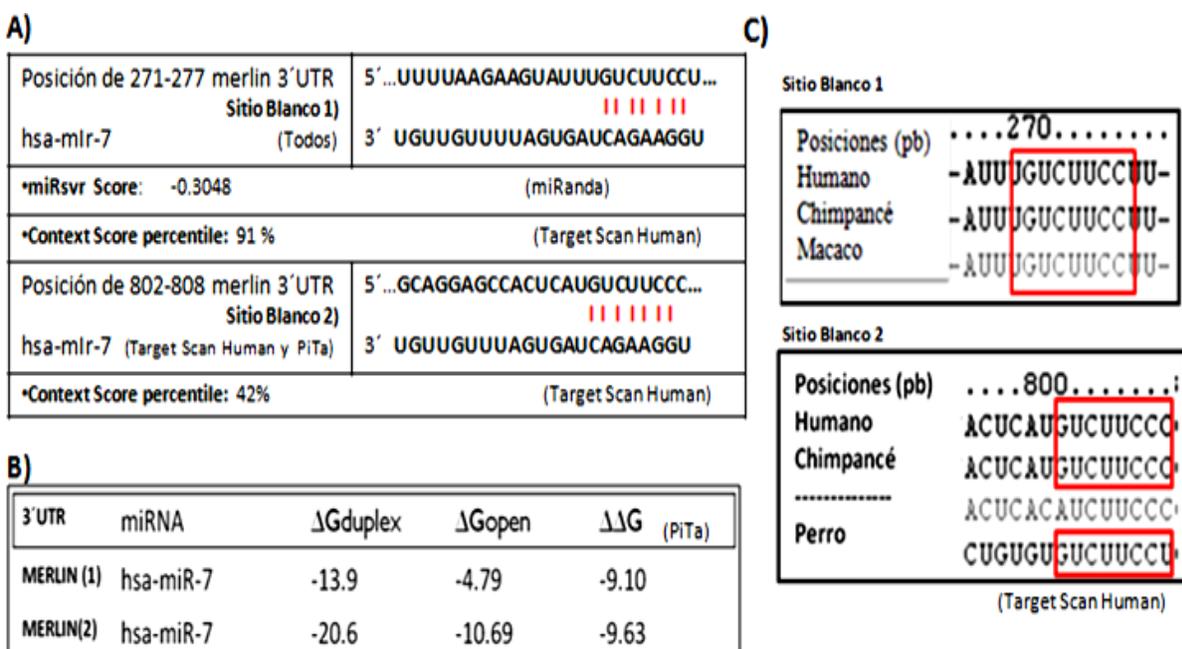


Figura 8. Predicción bioinformática: hsa-miR-7 forma un dúplex significativo con la 3'UTR de Merlín. A) Dúplex formados entre el miR-7 y sus dos posibles sitios blanco dentro de 3'UTR de Merlín. Las líneas rojas presentan el perfecto alineamiento entre 7, de las 8 bases, de la región semilla del miR-7 con sus 2 sitios blanco. Muestra el valor de mRsvr de -0.3048 para el primer sitio, y un *context score percentile* de 91 % y 42 % para el primer y segundo sitio. **B)** Valores termodinámicos, Δ dúplex, Δ open y $\Delta\Delta G$, dados en ambas interacciones de miR-7 con la 3' UTR de Merlín. La $\Delta\Delta G$ para el primer sitio es de -9.10 y para el segundo es de -9.63, indicando una alta probabilidad en la formación de ambos dúplex. **C)** Alineamientos de la secuencia de la 3'UTR de Merlín de diferentes especies; los cuadros rojos muestran la conservación del sitio blanco para miR-7. El primer sitio sólo se conservó en humano, chimpancé y macaco, y el segundo entre el humano, chimpancé y perro, lo que indica que ambos sitios están principalmente conservados en homínidos, por lo que son de reciente aparición en la escala evolutiva. Los paréntesis encierran los programas que generaron los correspondientes valores.

La comparación de los valores obtenidos por los tres diferentes programas sugiere que el miR-7 muy probablemente forme un dúplex con el primer sitio blanco de la 3'UTR de Merlín, y con menor posibilidad, el miR-7 podría estar interactuando con el segundo sitio de la 3'UTR de Merlín.

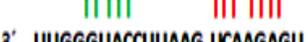
6.1.2) Predicción bioinformática: hsa-miR-146a forma un dúplex significativo con la 3'UTR de Merlín

Dentro de los miRNAs que resultaron candidatos para tener como blanco 3'UTR de Merlín, obtenidos por el análisis bioinformático, se encontraba el hsa-miR146a. Los valores bioinformáticos obtenidos para este miRNA sugieren que podría estar regulando traduccionalmente a Merlín ya que, como se mencionó en la introducción, la sobreexpresión del miR146a se ha asociado con diferentes tipos de cáncer, y cuya transcripción y actividad, también, se ha relacionado con la respuesta inflamatoria, proceso favorecedor del desarrollo cancerígeno (revisado por: Lukiw *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008; Arónica *et al.*, 2010; Rusca y Monticelli, 2011). Con base en lo anterior, se asumió que el miR-146a podría favorecer el desarrollo tumoral a través de la inactivación de la actividad supresora de tumores de Merlín. Por tanto, se planteó como objetivo el tratar de averiguar si Merlín es blanco del miR-146a.

El análisis bioinformático mostró que el miR-146a tiene un sitio blanco en la 3'UTR de Merlín, ubicado en las bases 210-216, formando complementariedad con 7 de las 8 bases, de la región semilla del miR-146a (**Fig. 9-A**). El programa miRanda dio un miRsvr score de -0.1309 (**Fig. 9-A**), mientras que el programa PiTa dio una $\Delta\Delta G$ de -8.12 (**Fig. 9-B**), ambos datos indican que, termodinámicamente hablando, la probabilidad de formación del dúplex entre la región 3'UTR de Merlín y el miR-146a es muy alta. Por otro lado, el programa Target Scan Human mostró un *context score percentile* de 88 % (**Fig. 9-A**). Además, el sitio blanco reconocido por el miR-146a está altamente conservado, presentándose en las 3'UTR de Merlín de especies como humano, chimpancé, macaco, ratón, rata, cobayo, musaraña, caballo, vaca, armadillo y elefante. La conservación de este sitio a lo largo de la evolución sugiere que la inactivación de Merlín por miR-146a podría estar teniendo una significancia funcional importante a nivel celular (**Fig. 9-C**).

Todos los valores obtenidos por los tres diferentes programas fueron indicadores positivos de que miR-146a podría estar interactuando con Merlín y posiblemente inactivándolo.

A)

Posición 210-216 de la 3'UTR de Merlin	5'...CUCUCAUGGCGUUCUAGUUCUCU... 
hsa-miR-146a (Todos)	3' UUGGGUACCUAAG-UCAAGAGU
•miRsvr Score: -0.1309	(miRanda)
•Context Score percentile: 88%	(Target Scan Human)

B)

3'UTR	miRNA	ΔG_{duplex}	ΔG_{open}	$\Delta \Delta G$ (PiTa)
MERLN	hsa-miR-146a	-21.8	-13.68	-8.12

C)

Posiciones (pb)	...	210	...	220
Humano	UUC	JAGUUCU-CUG	GACCUG	
Chimpancé	UUC	JAGUUCU-CUG	GACCUG	
Macaco	UUC	JAGUUCU-CUG	GACCUG	
-----	UUC	UACUUCUCCUG	AUCUG	
Ratón	UUC	JAGUUCU-CG	-----	
Rata	UUC	JAGUUCU-CG	-----	
Cobayo	UUU	JAGUUCU-CG	-----	
-----	AUC	CGGUUCU-CGG	CAUU	
Musaraña	UUC	JAGUUCU-CG	-----	
-----	UUC	UAGUUC	-----	
-----	UUC	JAGUUC	-----	
Caballo	UUC	JAGUUCU-CUG	GACCUG	
Vaca	UUC	JAGUUCU-CUG	GACCUG	
Armadillo	UUC	JAGUUCU-CG	-----	
Elefante	UUC	JAGUUCU-CG	-----	

(Target Scan Human)

Figura 9. Predicción bioinformática: hsa-miR-146a forma un dúplex significativo con la 3'UTR de Merlín.

A) Muestra la formación del dúplex entre el miRNA-146a y el sitio blanco de la 3'UTR de Merlín. Las líneas rojas presentan el perfecto alineamiento entre 7, de las 8 bases, de la región semilla del miR-146a con el sitio blanco de la 3'UTR. Las líneas verdes indican complementariedad de bases adyacentes al sitio blanco de Merlín con otras bases del miR-146a. Se presentan los valores de miRsvr score de -0.1309 y de *context score percentile* de 88 %, ambos son significativos para considerar la formación del dúplex. **B)** Valores termodinámicos, ΔG_{duplex} , ΔG_{open} y $\Delta \Delta G$, dados en la interacción de miR-146a con la 3' UTR de Merlín. El valor de $\Delta \Delta G$ es de -8.12, valor significativo para afirmar la formación del dúplex. **C)** Alineamiento de las secuencias de la 3'UTR de Merlín de diferentes especies; los cuadros rojos encierra las secuencias de las especies donde se ha conservado el sitio blanco de miR-146a, entre las que se encuentran el humano, chimpancé, macaco, ratón, rata, cobayo, musaraña, caballo, vaca, armadillo y elefante. Su conservación a lo largo de la evolución sugiere que podría tener una significancia funcional a nivel celular.

6.2) Ensayo de luciferasa: Uso del plásmido psiCheck2 para determinar la interacción miRNA:mRNA

Para confirmar que el miR-7 o el miR-146a interactúan con Merlín, se usó el vector psiCheck2 (**Fig. 10-A**), el cual porta un gen reportero que codifica para la proteína luciferasa de *Renilla sp.* (hRLuc), además de contar con un segundo gen reportero codificante para la luciferasa de Luciérnaga (hLuc), ambos genes reporteros emiten luz cuando son traducidos de manera normal, esta emisión de fotones en el caso del gen hLuc se debe a que es oxidado en una reacción que requiere ATP, Mg² y O₂, produciendo un intermediario luciferil-AMP, dando como resultado un flash de luz que se desintegra rápidamente después de que el sustrato y la enzima se mezclan; el gen hRLuc cataliza la reacción luminiscente utilizando O₂ y coelenterazina. Los reactivos utilizados en ambas reacciones bioluminiscentes se añaden cuando se incuban los extractos de las células transfectadas con los componentes del *Kit Luciferase Dual System Assay* (Promega).

Para determinar si un mRNA es blanco de un miRNA específico, se clona la secuencia 3'UTR del mRNA de interés río abajo del gen de luciferasa hRLuc e inmediatamente río arriba de la secuencia de poliadenilación (necesaria para que el gen hRLuc finalice su transcripción). Así, cuando se cotransfecta el vector psiCheck2 con la 3'UTR de Merlín junto con un vector, como pcDNA3.1 (**Fig.10-C**), que porte un miRNA que interactúe e inactive a la 3'UTR, evitará la traducción del gen reportero, disminuyendo los niveles de luz emitida. De este modo, el grado de inactivación del mRNA de Merlín por parte del miRNA va estar relacionado directamente con la baja de emisión de luz del gen reportero hRLuc (**Fig. 10-B**). En cambio, cuando se cotransfecta el vector pcDNA3.1 que contenga un miRNA que no tenga un sitio blanco dentro de la 3'UTR de Merlín, y por lo tanto no inactive su traducción, no se verá alterada la traducción del gen reportero hRLuc, generando una emisión de luz comparable al obtenido de células donde no se cotransfectó ningún mRNA o sólo el vector vacío (**Fig. 10-B**).

PsiCheck2 cuenta con un casete de resistencia a ampicilina, permitiendo la específica selección de las colonias que lo contienen en los ensayos de transformación, además el segundo gen hLuc, por estar ubicado cientos de bases adelante del sitio de clonación múltiple y contar con un promotor distinto al del hRLuc, el promotor del gen de la timidina-cinasa del virus simple del herpes (herpes simplex virus thymidine kinase promoter, HSV-

TK), tiene la capacidad de emitir luz independientemente de la correcta transcripción del hRLuc y del inserto 3'UTR, de tal modo que hRLuc da una señal de fondo que permite normalizar la señal del gen reportero hRLuc y corregir la variabilidad de la transfección (Fig. 10-A). Cabe aclarar que la intensidad de señal o luz emitida por ambos genes reporteros es determinada de manera precisa por un luminómetro, el cual la convierte en valores numéricos que son sometidos a análisis estadísticos que permiten conocer si realmente hay variaciones significativas entre la de la señal de luciferasa emitida por grupos transfectados con el vector vacío pcDNA3.1 y la señal dada por los grupos con los vectores que portan los diferentes miRNAs, candidatos para inactivar a Merlín.

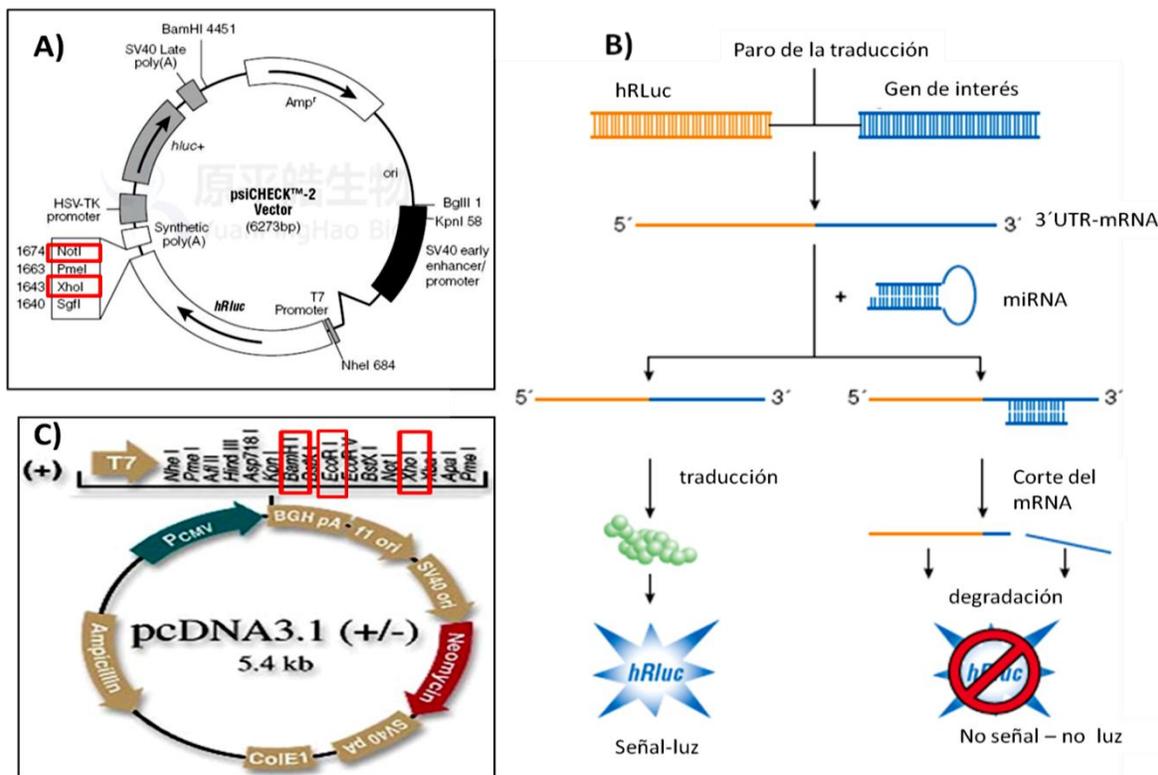


Figura 10. Vector psiCheck-2, su uso en el ensayo de luciferasa, y el vector pcDNA3.1. A) El vector psiCheck-2 contiene el gen reportero hRLuc, necesario para el ensayo de luciferasa, y el sitio de clonación múltiple donde se insertará la 3'UTR de Merlín para saber si está siendo inactivada por miR-146a y miR-7. B) Principio básico del que parte el ensayo de luciferasa, que se usará para determinar si los miRNAs inactivan a determinado mRNA. Modificado del manual de uso del vector psiCheck-2. C) Vector pcDNA3.1, dentro del cual es insertado el miRNA, del cual se quiere saber su actividad de silenciamiento. los cuadros rojos de a) y c) encierran los sitios de restricción que son cortados, por sus correspondientes enzimas, para poder introducir los respectivos insertos (modificado del manual psiCheck, PROMEGA).

6.2.1) Obtención de la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín

Partiendo del principio básico del ensayo de luciferasa, antes explicado, se clonó la región 3'UTR de Merlín humano dentro del vector psiCheck2, por medio de PCR en la que se usaron los oligonucleótidos de la **Tabla 1**, se amplificaron las primeras 858 pb, de las 3,780 pb con las que cuenta la 3'UTR del gen de Merlín. Esta decisión se tomó en parte porque el tamaño de la 3'UTR era demasiado grande como para ser insertada dentro de psiCheck2, y porque justo dentro de estas 858 pb se ubican tanto el sitio blanco de unión del miR-146a, como los dos sitios blanco del miR-7 (**Fig. 11**).

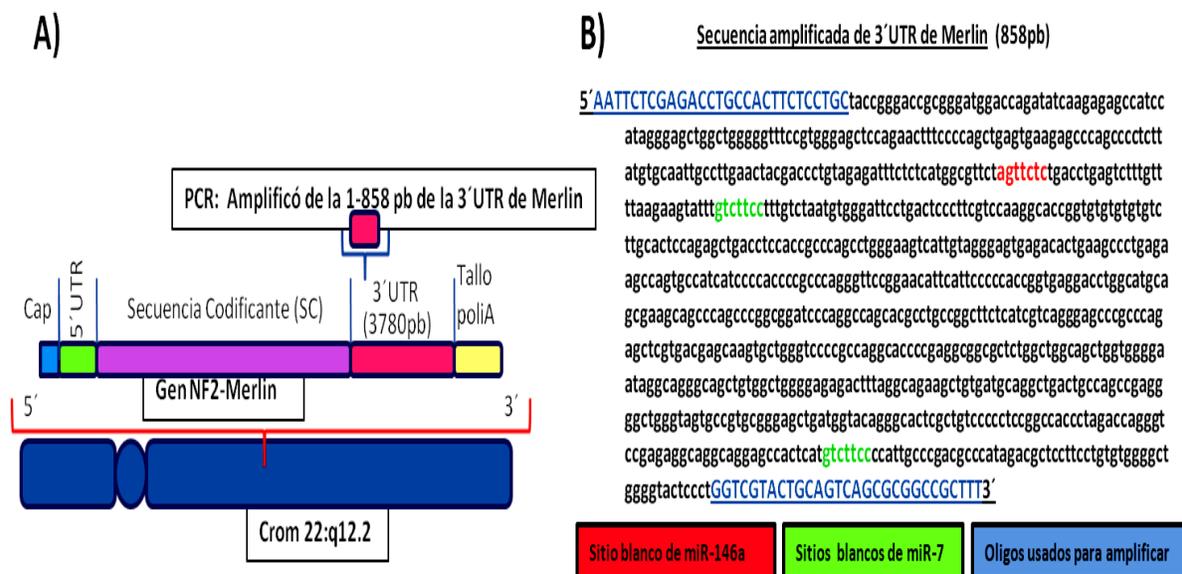


Figura 11. 3'UTR de Merlín y sus sitios blanco. **A)** Ubicación del gen humano de NF2 de Merlín dentro del región q12.2 del cromosoma 22, además de la ubicación de la región 3'UTR dentro del gen de Merlín y la relación que muestran las primeras 858 pb de la 3'UTR amplificadas por PCR con la región entera de 3,780 pb. **B)** Muestra la ubicación del sitio blanco de miR-146a (en rojo) y de los 2 sitios blanco de miR-7 (en verde), además de los oligonucleótidos utilizados para amplificar (en azul) las primeras 858 pb de la 3'UTR de Merlín.

El oligonucleótido sentido contaba con un sitio de restricción para la enzima *XhoI* y el oligonucleótido antisentido un sitio de restricción para la enzima *NotI*, por lo que la 3'UTR amplificada con ellos contó con los mismos sitios de restricción (**Tabla 1**). Los sitios de restricción agregados fueron escogidos por dos razones: la primera fue el propósito de

que la secuencia de la 3'UTR de Merlín amplificada, al ser digerida por las enzimas correspondientes, pudiera ser insertada dentro de la región de clonación múltiple de psiCheck2, el cual cuenta justo con los sitios de restricción para *XhoI* y *NotI* (**Fig. 10-A**); y la otra razón, fue basada en el análisis con el programa NEBcutter, con el cual se detectó que ambos sitios de restricción no están presentes dentro de la 3'UTR de Merlín, descartando que al ser digerido con tales enzimas también se digiriera una región interna de la 3'UTR, generando un producto trunco. A ambos oligonucleótidos, se les agregaron bases extras para que funcionaran como plataformas de anclaje para las enzimas de restricción.

Una parte del producto de la PCR de la 3'UTR de Merlín, se corrió en un gel de agarosa, para confirmar que el producto amplificado era el deseado, y cuya observación bajo UV podemos ver en la **Fig. 12**, en donde se ve una banda con un peso molecular ubicado entre 750 y 1000 pb, es decir dentro del peso esperado para el producto de la 3'UTR de Merlín amplificada, que era de 858 pb.

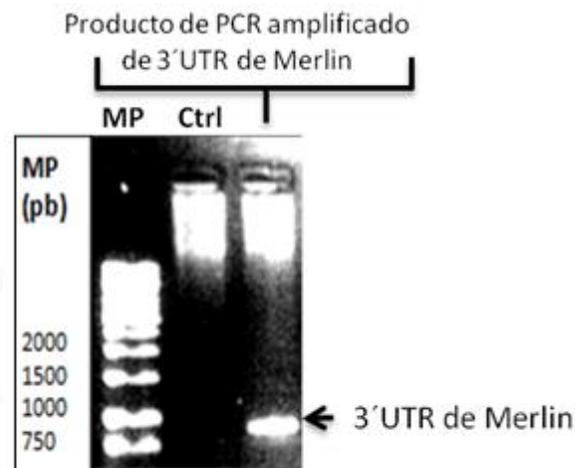


Figura 12. Amplificación de la 3'UTR de Merlín humano. Los productos de la reacción de PCR tanto control (Ctrl) como de Merlín se separaron en un gel de agarosa al 1 %, se observó con luz UV después de teñirse con BrEt. MP: marcador de peso molecular. La flecha denota la 3' UTR de Merlín.

La 3'UTR de Merlín fue digerida con las enzimas *XhoI* y *NotI*, purificada e insertada por ligación dentro del vector psiCheck2, que previamente fue digerido con las mismas enzimas y purificado. La ligación psiCheck2/3'UTR-Merlín fue transfectada en las bacterias DH5 α , cuyas colonias fueron seleccionadas con el antibiótico ampicilina, para el cual contaba con el casete de resistencia el vector psiCheck2, y de las que se purificó su DNA. Para corroborar que realmente se había ligado la 3'UTR de Merlín al vector, es decir si realmente se contaba con la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín, el DNA purificado fue digerido con la enzima *PvuII*, los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa, en el que se puede observar que las colonias seleccionadas digeridas (1D, 2D, y 3D) mostraron un patrón de bandas esperado para la construcción de psiCheck2/3'UTR-Merlín (3747 pb, 1677 pb, 834 pb, 464 pb y 338 pb), y diferente al que se observa cuando se digiere el vector vacío del psiCheck2 (3667 pb y 2188 pb) (**Fig. 13**). Esto confirmó que se contaba con la construcción de interés.

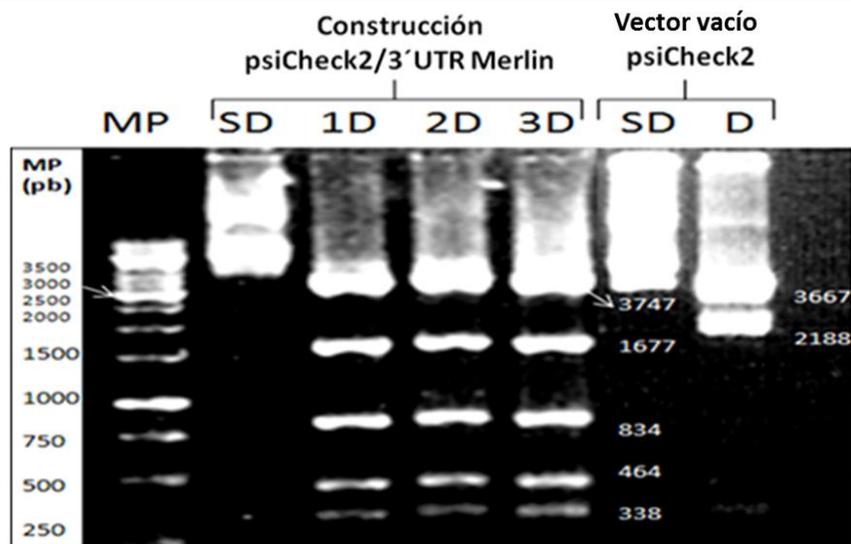


Figura 13. Verificación de la construcción psiCheck2/3'UTRMerlín. Las clonas (1D, 2D y 3D), candidatas por contar con el inserto 3'UTR dentro del psiCheck2, se corrieron junto con las clonas con el plásmido psiCheck2 vacío, ambos grupos de clonas se dejaron sin digerir (SD) o se digirieron con enzima *PvuII* (CD). Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1 % y se observaron con luz UV después de que el gel se tiñó con BrEt. MP: marcador de peso molecular. Las cifras indican los pesos moleculares del patrón de bandeado esperado.

Las colonias seleccionadas portadoras de la construcción de psiCheck2/3'UTR-Merlín, se secuenciaron para determinar si no había mutaciones internas que afectaran los sitios blanco o la secuencia, y se escogieron aquellas que no presentaran cambios de bases. Tales colonias se propagaron en grandes cantidades, purificando su DNA por Maxiprep, para obtener y aislar la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín, que se muestra representada en la **Fig.14**.

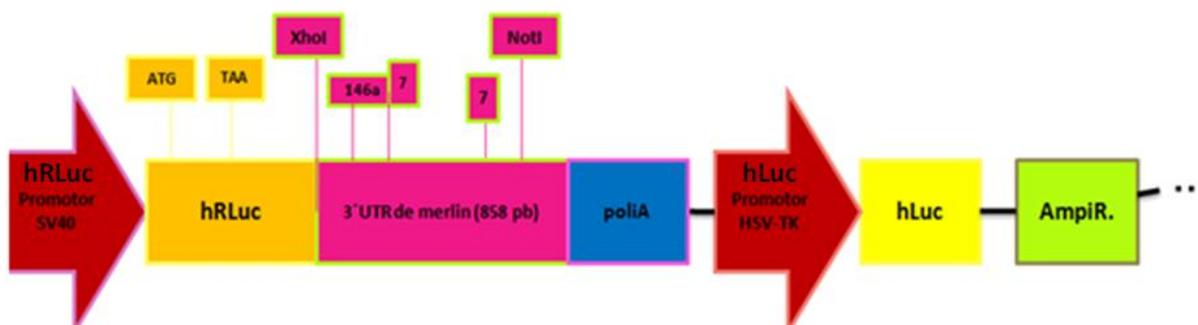


Figura 14. Representación de la construcción psiCheck2/3'UTR de Merlín. Tal construcción está constituida por la 3'UTR de Merlín (los sitios blancos para miR-146a y miR-7); se muestra la relación espacial que guarda con los diferentes componentes propios del vector psiCheck2, que forman parte de esta construcción, como son el gen reportero hRLuc y su promotor *simian virus-40* (SV40). En rosa se representa la 3'UTR de Merlín que fue insertada y la relación que guardan los sitios blanco de miR-7 y miR-146a. Muestra también el segundo gen reportero hLuc, manejado bajo otro promotor, el HSV-TK; y el casete de resistencia a ampicilina (AmpR).

6.3) “miR-7 podría estar interactuando e inactivando a Merlín”

6.3.1) Obtención de la construcción pcDNA3.1/miR-7

Para confirmar que el miR-7 interactúa con la 3'UTR de Merlín se utilizó tanto la construcción pcDNA3.1/miR-7 (**Fig.15**), previamente diseñada y purificada en el laboratorio, así como la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín que contiene las primeras 858 pb de la 3'UTR de Merlín que incluye los dos sitios blanco del miR-7, clonada río abajo del gen de luciferasa (**Figs.11-B y 14**).

La construcción pcDNA3.1/miR-7 cuenta con la inserción de la secuencia precursora del miR-7b de ratón, más 100 pb tanto río arriba como río abajo de está, dentro de la región *polylinker* del vector pcDNA3.1. (Figs.15 y 16-A).

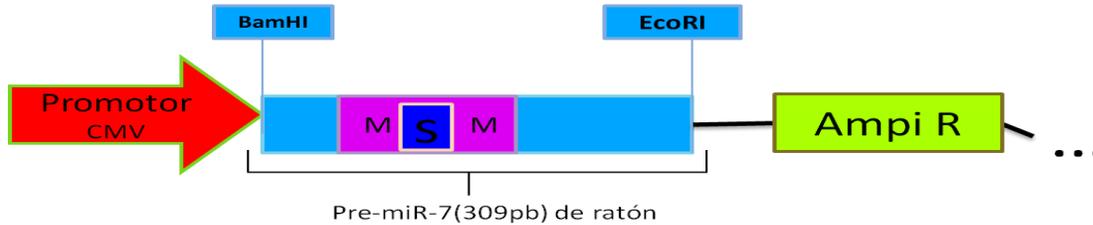


Figura 15. Representación de la construcción pcDNA3.1/miR-7. Tal construcción está constituida por la secuencia precursora de miR-7b de ratón; se muestra la relación espacial que guarda con los diferentes componentes propios del vector pcDNA3.1 y que forman parte de esta construcción. El rectángulo azul claro representa la secuencia del pre-miR-7b murino, el cuadro rosa dentro de él delimita la secuencia del miRNA maduro (M), y el cuadro azul oscuro representa la región semilla (S). AmpiR indica el casete de resistencia a ampicilina.

A pesar de que la construcción pcDNA3.1/miR-7 está hecha con la secuencia precursora del miR-7b de ratón, fue útil para mimetizar la acción del miR-7 humano, ya que la región semilla del miR-7b de ratón es idéntica al miR-7 humano, por lo que ambos miRNAs son complementarios de la misma manera a los dos sitios blanco dentro de la 3'UTR de Merlín humano (Fig. 16-B).

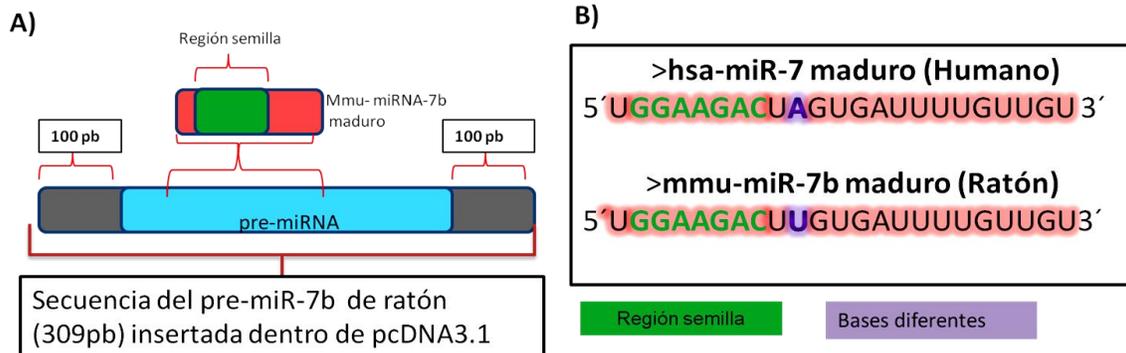


Figura 16. Pre-miR-7b de ratón y su relación con el miR-7 humano. A) Esquematiza las partes del inserto del miR-7b de ratón que se introdujeron en el vector pcDNA3.1, para formar la construcción pcDNA3.1/miR-7 utilizada en los posteriores ensayos de luciferasa. B) Muestra la gran similitud entre el miR-7 maduro de humano, y el miR-7b de ratón, las cuales presentan idénticas regiones semillas y sólo 1 base de diferencia entre sus miRNAs maduros.

Además, la secuencia del miR-7b maduro de ratón sólo varía en una base de la secuencia del miR-7 maduro humano (**Fig. 16-B**), por lo que, se esperaba que el miR-7 maduro de ratón estaría participando de manera idéntica a la del humano en la degradación o represión del mRNA de Merlín humano, pues el cambio en una sola base no estaría afectando su capacidad de reconocer la 3'UTR de éste.

Las bacterias DH5 α transformadas con pcDNA3.1/miR-7 se dejaron crecer para purificar el plásmido. Para confirmar que realmente se contaba con la construcción, 1 μ g de DNA purificado y 1 μ g del vector vacío (pcDNA) se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa. La digestión del plásmido pcDNA3.1/miR-7 mostró una banda de aproximadamente 309 pb, la cual corresponde al peso molecular esperado, esta banda estuvo ausente en la digestión del vector vacío (**Fig.17**). Estos resultados confirman que se cuenta con la construcción adecuada.

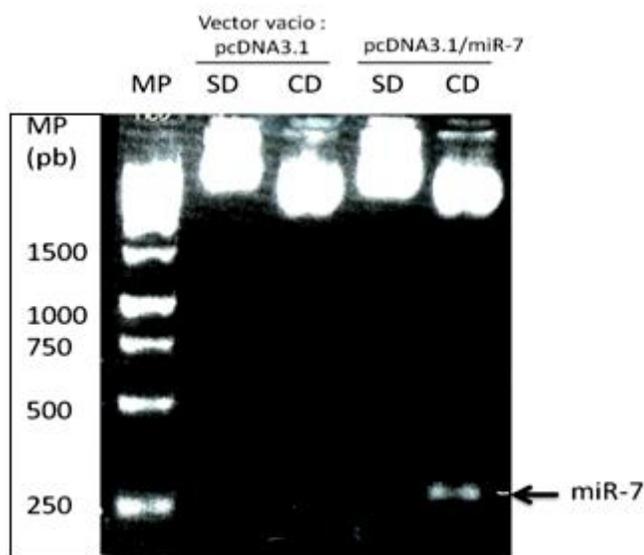


Figura 17. Verificación de la construcción pcDNA3.1/miR-7. Las clonas candidatas por contar con el inserto miR-7 dentro del pcDNA3.1, se corrieron junto con las clonas con el plásmido pcDNA3.1 vacío, ambos grupos de clonas se dejaron sin digerir (SD) o se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI (CD). Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1 % y se observaron con luz UV, después de que el gel se tiñó con BrEt. MP: marcador de peso molecular. La flecha denota el inserto miR-7.

6.3.2) La región 3'UTR de Merlín es blanco del miR-7

Las construcciones psiCheck2/3'UTR-Merlín y pcDNA3.1/miR-7 y sus correspondientes vectores vacíos, fueron transfectadas en las células HEK-293 bajo diferentes combinaciones y concentraciones, y los extractos celulares fueron usados para evaluar la actividad de luciferasa en cinco diferentes ensayos. Los grupos de transfección de cada ensayo de luciferasa se presentan a detalle en las **Tablas S-1 a S-5**.

Los dos primeros ensayos fueron diseñados para determinar la concentración óptima a la que el miR-7 disminuyera los niveles de la actividad de la luciferasa. Las concentraciones con las que se cotransfectó la construcción pcDNA3.1/miR-7 fueron de 0.1 µg, 0.2 µg y 0.4 µg, ya que a estas concentraciones el miR-7 afecta la expresión de sus genes blanco ya descritos, según previos experimentos en el laboratorio.

Las lecturas obtenidas del primer y segundo ensayo de luciferasa fueron sometidas a procedimientos matemáticos (**S-6**), en los que se restó el promedio de las lecturas de luciferasa de las células no transfectadas a las lecturas de las células que si fueron transfectadas, y en cada ensayo se sacaron los promedios de los siguientes grupos de transfección: Promedio 1 (psicheck2 vacío cotransfectado con pcDNA3.1/miRNA-7), Promedio 2 (psiCheck2/ 3'UTR-Merlín cotransfectado con pcDNA3.1/miRNA-7), Promedio 3 (psiCheck2 vacío cotransfectado con pcDNA3.1 vacío) y Promedio 4 (psiCheck2/3'UTR-Merlín cotransfectado con pcDNA3.1 vacío). Se dividió el Promedio 2 entre el Promedio 1, y se tomaron en cuenta los productos dados por esta división para cada ensayo de luciferasa y se sacó un promedio de todos ellos, nombrado Promedio-miRNA7. Por otro lado, se dividió el Promedio 4 entre el Promedio 3, y se tomaron en cuenta los productos dados por esta división para cada ensayo de luciferasa y se sacó un promedio de todos ellos, nombrado Promedio-pcDNA3.1. El Promedio-miRNA7 se normalizó a 1, tomando en cuenta como 1 al Promedio-pcDNA3.1.

Las lecturas normalizadas fueron graficadas para comparar los valores de los grupos cotransfectados con el miR-7 y los de los grupos cotransfectados con el vector vacío. La expresión del miR-7 independientemente de la concentración de plásmido usada, fue capaz de disminuir en un 60 % la actividad de luciferasa, en comparación con el vector vacío, tomado como 100 % (**Fig. 18**). Los datos crudos de estos ensayos se muestran en

las **Gráficas S-7 y S-8**, que en conjunto indican que las construcciones generadas no presentaban comportamientos anómalos, es decir que por sí solas no generaban caídas marcadas en los niveles de luciferasa, de tal modo que los datos obtenidos con dichas construcciones son confiables.

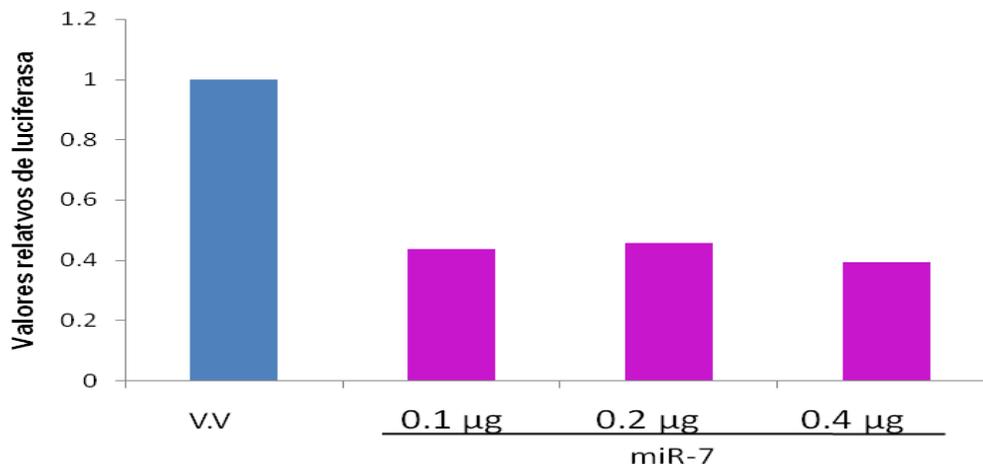


Figura 18. La 3'UTR de Merlín es blanco de miR-7. La células HEK-293 se cotransfectaron con 0.1 µg de la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín y con 0.4 µg del vector vacío pcDNA3.1 (V.V) (barra azul) o con las concentraciones indicadas del vector de expresión de miR-7 (barras rosas), y 48 horas después se realizaron los ensayos de luciferasa, como se describe en materiales y métodos. Estos datos provienen del 1er y 2do ensayo de luciferasa.

6.3.3) miR-7 reduce de manera significativa los niveles de luciferasa

Además del primer y segundo ensayo de luciferasa se realizaron otros tres experimentos independientes, y cuyos grupos de transfección y concentración de las construcciones empleadas se muestran a detalle en las **Tablas S-1 a S-5**.

A pesar de que el miR-7 reduce la actividad de luciferasa desde 0.1 µg, en los siguientes ensayos la construcción pcDNA3.1/miR-7 sólo fue usada la concentración de 0.4 µg para poder comparar su actividad con aquella del miR-146a (la cual sólo baja los niveles de luciferasa a 0.4 µg) (**Fig. 26**). De igual manera, las construcciones de los miRNAs usados como controles fueron transfectados a la misma concentración de 0.4µg.

Las lecturas obtenidas en los cinco ensayos de luciferasa fueron sometidas a un análisis estadístico que se muestra a detalle la parte suplementaria **S-6**, y los datos se resumen

en la **Fig. 19**, en la que se observa que el miR-7 disminuyó de manera significativa la actividad de luciferasa, hasta un 60 % con una $p \leq 0.001$ cuando se compara con la obtenida cuando se transfecta el vector vacío, y hasta un 43 % con una $p \leq 0.001$, en comparación a la observada en las células que expresan el miR-145, usado como control negativo, ya que este miRNA no tiene sitios blanco dentro de la 3'UTR de Merlín y por lo tanto no induce bajas significativas de los niveles de luciferasa, comportándose de manera similar al vector vacío de pcDNA3.1. La disminución de la actividad de luciferasa (60 % y 43 %) resultante de la expresión del miR-7, está dentro del rango de la reducción de la actividad en respuesta a otros microRNAs (Xiong *et al.*, 2011) y dentro del rango de inactivación resultante de la interacción de un miRNA con su mRNA, según trabajos e investigaciones publicadas donde se reportan bajas de los niveles relativos de luciferasa de entre 20 % y 60 % (Sun *et al.*,2010; Mei *et al.*,2011).

En conjunto, estos resultados indican que la región 3'UTR del gene de Merlín es blanco del miR-7, y por tanto que el miR-7 puede modular los niveles de expresión de Merlín.

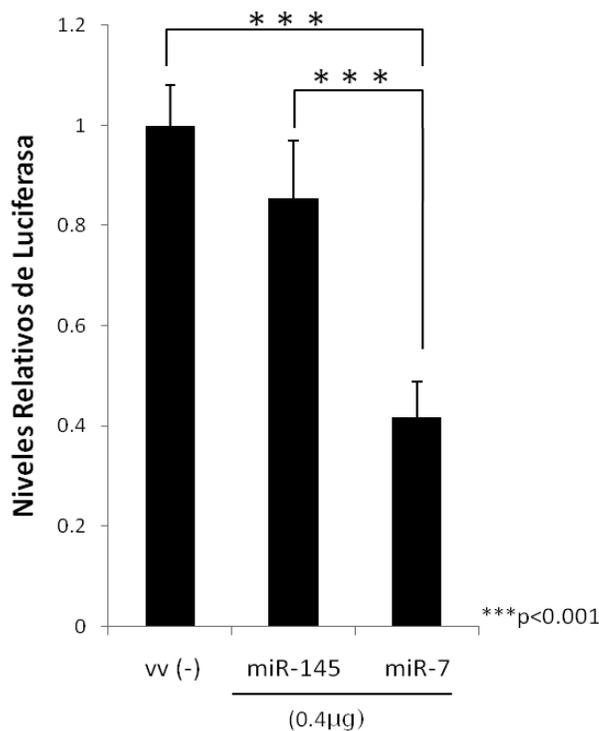


Figura 19. miR-7 reduce de manera significativa los niveles de luciferasa. Las células HEK-293 se cotransfectaron con 0.1 µg de la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín y con 0.4 µg del vector vacío pcDNA3.1 (VV), o 0.4 µg del vector de expresión de miR-7, o 0.4 µg del vector de expresión miR-145, y 48 horas después se realizaron los ensayos de luciferasa, como se describe en materiales y métodos. Los resultados se obtuvieron del análisis estadístico de 5 experimentos independientes con una n mínima de 3.

Como control interno se usaron varias construcciones previamente diseñadas y purificadas en el laboratorio, las cuales fueron psiCheck2/3'UTR-KLF4, pcDNA3.1/miR-145, pcDNA3.1/miR-7y pcDNA3.1/miR-881. La primera de ellas porta 1,000pb de la 3'UTR del gen KLF4. La segunda y tercera construcción portan el miR-145 y miR-7 de ratón, respectivamente; tales miRNAs, en ensayos de luciferasa, han generado bajas significativas de los niveles de luciferasa al ser cotransfectadas con la construcción con la 3'UTR de KLF4, ya que tienen sitios blanco en esta secuencia, contrario a lo que se ha visto al cotransfectar la cuarta construcción con el miR-881 de ratón, la cual no tiene sitios blancos dentro de la 3'UTR de KLF4 y por ello no causa bajas significativas en los niveles de luciferasa, comportándose de manera parecida al vector vacío pcDNA3.1. Con base en lo anterior la cotransfección del miR-7 junto con KLF4, serviría también de control positivo; de este modo, que lo que se esperaba con estos controles es que si la técnica del ensayo de luciferasa se estaba realizando de manera correcta, se comportaran de la misma manera que lo observado en otros ensayos e investigaciones del laboratorio, independientemente de las lecturas arrojadas por las construcciones generadas en este trabajo. Todos los controles internos se incluyeron sólo en dos ensayos de luciferasa.

Los resultados obtenidos para los controles internos se presentan en la gráfica 3, en la que se puede ver que tanto el miRNA-145 y como el miR-7, que tienen sitios blanco dentro la 3'UTR de KLF4, bajaron los niveles de luciferasa hasta 60 % en relación con el control del vector vacío pcDNA3.1 y hasta un 50 % en comparación con el miR-881 usado como control negativo (**Figura 20**), esto muestra la especificidad de los distintos mRNAs probados.

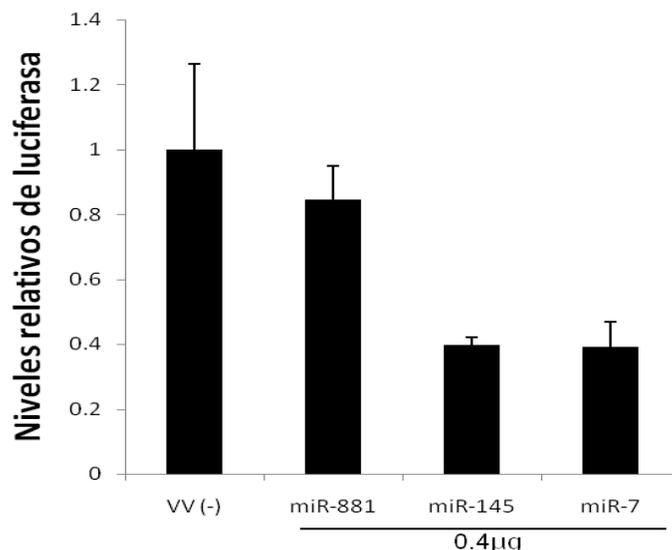


Figura 20. miR-7 y miR-145 bajan los niveles de luciferasa, al cotransfectarse con KLF4. Las células HEK-293 se cotransfectaron con 0.1 µg de la construcción psiCheck2/3'UTRKLF4, junto con ya sea 0.4 µg del vector vacío pcDNA3.1 (VV), con 0.4 µg del vector de expresión de miR-7, con 0.4 µg del vector de expresión miR-145, o con 0.4 µg del vector de expresión de miR-881, y 48 horas después se realizaron los ensayos de luciferasa, como se describe en materiales y métodos. Esta gráfica muestra los resultados obtenidos en 2 diferentes ensayos.

6.3.4) miR-7 regula los niveles de Merlín en células HEK-293

Los resultados obtenidos con los diferentes ensayos de luciferasa indican que el miR-7 tiene como blanco la 3'UTR de Merlín. Para confirmar que la expresión del miR-7 disminuye los niveles proteicos de Merlín, éste se evaluó por medio de inmunoblots con extractos de células HEK-293 no transfectadas, transfectadas con 0.4 µg del vector de expresión vacío o con 0.4 µg de la construcción pcDNA3.1/miR-7, usando anticuerpos específicos para Merlín. Las células HEK-293 transfectadas con el miR-7, presentaron una marcada disminución en los niveles de Merlín al compararlos con los niveles detectados en las células no transfectadas o transfectadas con el vector vacío (**Fig. 21**). Las diferencias en los niveles de Merlín no se deben a diferencias en el cargado de la muestra o un efecto pleiotrópico del miR-7, ya que los niveles de ERK2, una proteína constitutiva, fueron similares.

En resumen, estos resultados muestran que el miR-7 disminuye los niveles de proteína endógena de Merlín en las células HEK-293, lo que apoya la idea de que el miR-7 puede interactuar con el mRNA de Merlín y así disminuir la expresión de la proteína

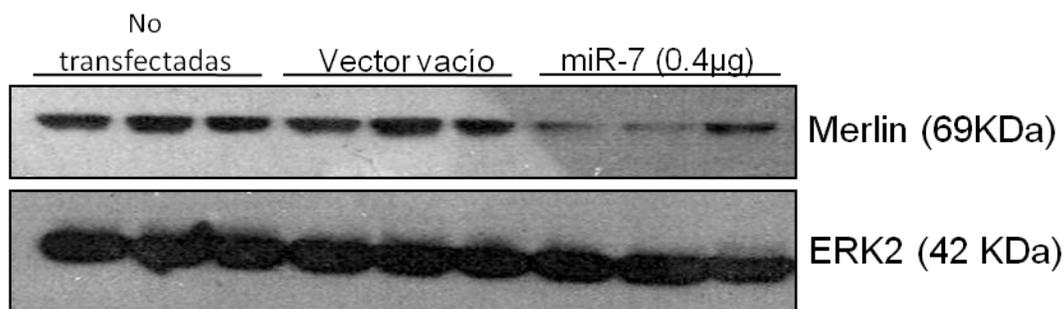


Figura 21. miR-7 regula los niveles de Merlín en células HEK-293. Los extractos proteicos de células HEK-293 no transfectadas, transfectadas con 0.4 μg del vector vacío pcDNA 3.1 y transfectadas con 0.4 μg del vector de expresión del miR-7, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10 %, y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa, realizando un inmunoblot con anti-NF2 y anti-ERK2. Se indica el peso de las proteínas de Merlín y ERK2.

6.4) “miR-146a podría estar interactuando e inactivando a Merlín”

6.4.1) Obtención de la construcción pcDNA3.1/miR-146a

Para confirmar que el miR-146a realmente interactúa con la 3'UTR de Merlín, se necesitaba obtener una construcción que portara el precursor del miR-146a dentro del vector pcDNA3.1, y poderlo usar en los ensayos de luciferasa. Para generar tal construcción, lo primero que se hizo fue amplificar el miR-146a por medio de reacciones de PCR usando los oligonucleótidos de la **Tabla 1**, los cuales fueron diseñados para amplificar 100 pb río arriba y 100 pb río abajo de la secuencia del precursor de miR-146a o pre-miR-146a, obtenida de la base de datos miRBase, y que internamente contiene la secuencia del miRNA maduro y por lo tanto la región semilla que reconoce el sitio blanco de la 3'UTR de Merlín. El tamaño del miR-146a por amplificar se decidió porque, como ya se mencionó en la introducción, para la formación del miRNA maduro es necesario contar con su precursor y por tanto de su estructura tipo horquilla, cuya secuencia es brindada por miRBase, pero a pesar de eso aún no sabe con certeza la secuencia específica para

que se produzca tal estructura, es por ello que para asegurar su formación se añaden 100 pb extras, tanto arriba como abajo, del pre-miR-146a (**Fig. 22**).

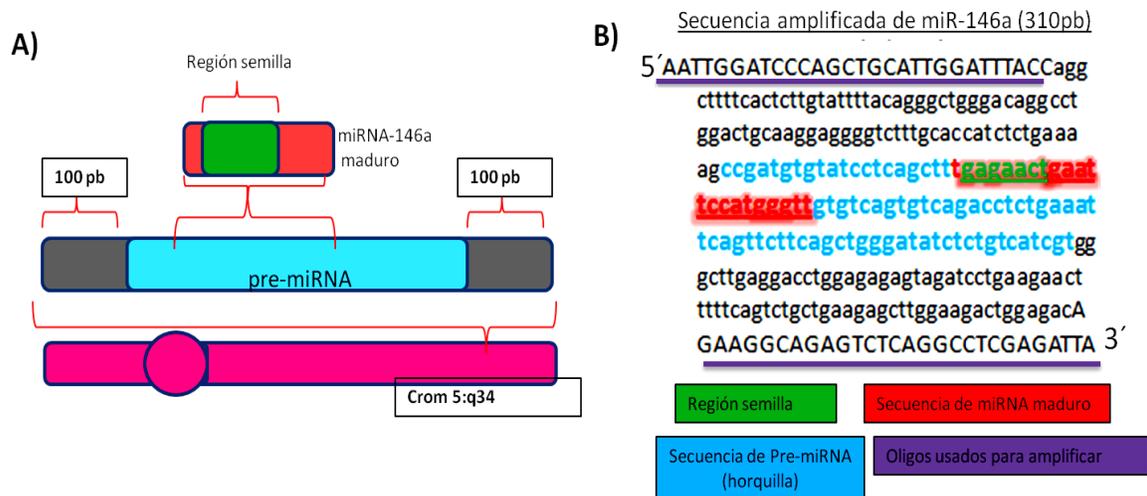


Figura 22. miRNA-146a y secuencia. A) Ubicación del miR-146a dentro de la región q34 del cromosoma humano 5. A y B)Ubicación del pre-miRNA, miRNA maduro y la región semilla, dentro de las 310 pb que fueron amplificadas, además de las pb extras, tanto arriba como abajo, que fueron tomadas en cuenta para el diseño de los oligonucleótidos.

Además, al oligonucleótido sentido se le añadió un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI y al oligonucleótido antisentido un sitio de restricción para la enzima *Xho*I, para que el miR-146a amplificado por estos oligonucleótidos contara con los mismos sitios de restricción (**Tabla 1**). Los sitios de restricción agregados fueron escogidos ya que al digerir el producto amplificado de miR-146a por estas enzimas, pudo ser insertado dentro de la región múltiple de clonación del pcDNA3.1, la cual cuenta justo con los sitios de restricción para *Bam*HI y *Xho*I (**Fig. 10-C**); también previamente con el programa NEBcutter se analizó la secuencia del miRNA-146a y se determinó que estas enzimas no cortaban en partes internas de la secuencia, evitando con ello que se presentara un producto trunco al ser digerido. A ambos oligonucleótidos, se les agregaron bases extras para que funcionaran como plataformas para que las enzimas de restricción funcionen de manera eficiente (**Tabla 1**).

Una parte del producto de la PCR del pre-miR-146a, se corrió en un gel de agarosa, para confirmar que el producto amplificado era el deseado, y cuya observación en UV se muestra en la **Fig. 23**, en donde se aprecia una banda con un peso molecular ubicado entre los 500 y 250 pb, es decir dentro del peso esperado para el producto del miR-146a amplificado, que era de 310 pb (**Fig.20**).

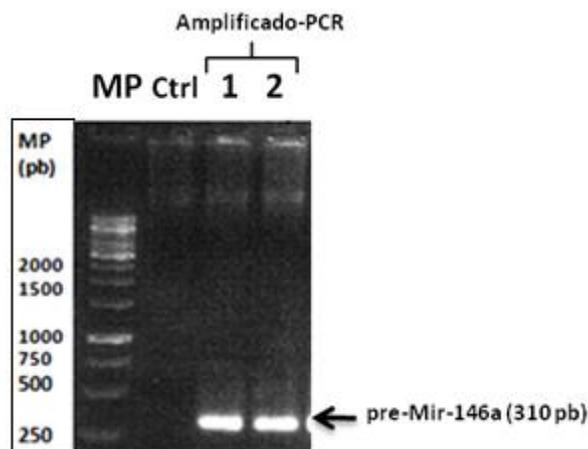


Figura 23. Amplificación de miR-146a humano. Los productos de la reacción de PCR tanto de miR-146a como del control (Ctrl) se separaron en un gel de agarosa al 1 % y se observó con luz UV después de teñirse con BrEt. Mp, indica el marcador de peso molecular. La flecha denota el pre-miR-146a.

El pre-miR-146a amplificado, fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, purificado e insertado por ligación dentro del vector pcDNA3.1, que previamente fue digerido con las mismas enzimas, y purificado. La ligación pcDNA3.1/miR-146a fue transfectada en las bacterias DH5 α , cuyas colonias fueron seleccionadas con el antibiótico ampicilina para el cual contaba con el casete de resistencia el vector pcDNA3.1, y de las cuales se purificó su DNA. Para corroborar que realmente se había ligado el pre-miR-146a al vector, es decir si realmente se contaba con la construcción pcDNA3.1/3miR-146a, el DNA purificado fue digerido con la enzima *Pvu*II, los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa en el que se puede observar que algunas colonias seleccionadas portadoras de la construcción (1D y 2D) muestran un patrón de bandas esperado para la construcción de pcDNA3.1/miR-146a (2923 pb, 1096 pb, 1069 pb, 409 pb, 495 pb 173pb) y diferente al patrón observado cuando se digiere el vector vacío del pcDNA3.1 (1989 pb, 1274 pb, 1096 pb y 1069 pb), lo que confirmó que se contaba con la construcción de interés (**Fig. 24**).

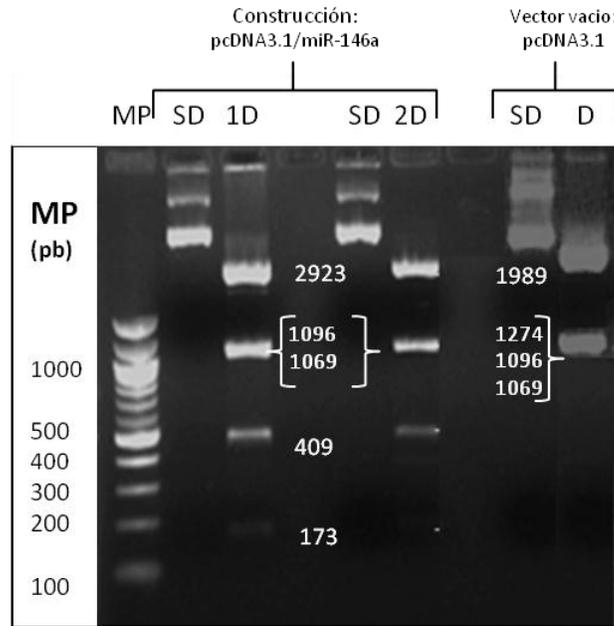


Figura 24. Verificación de la construcción pcDNA3.1/miR-146a. Las clonas (1, 2, D), candidatas por contar con el inserto miR-146a dentro del pcDNA3.1, se corrieron junto con las clonas con el plásmido pcDNA3.1 vacío, ambos grupos de clonas se dejaron sin digerir (SD) o se digirieron con enzima *PvuII* (D). Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1 % y se observaron con luz UV después de que el gel se tiñó con BrEt. MP: marcador de peso molecular. Las cifras indican los pesos moleculares del patrón de bandeado esperado.

Las colonias seleccionadas portadoras de la construcción pcDNA3.1/miR-146a, se secuenciaron para determinar si no había mutaciones internas que afectarían los sitios blanco o la secuencia, y se escogieron aquellas que no presentarían cambios en las bases. Tales colonias se propagaron en grandes cantidades, purificando su DNA por Maxiprep, para obtener y aislar la construcción pcDNA3.1/miR-146a, que se muestra representada en la **Fig. 25**.

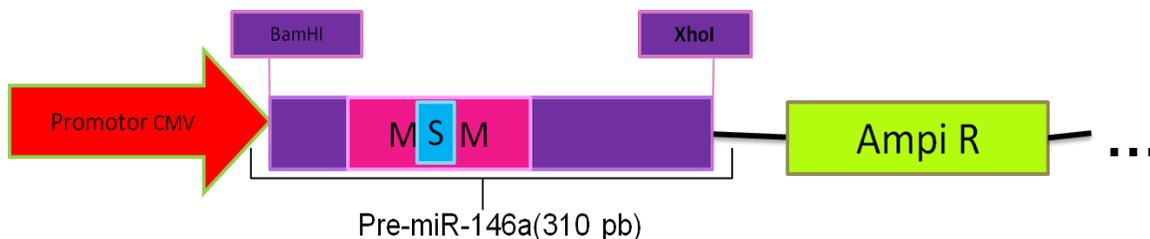


Figura 25. Representación de la construcción pcDNA3.1/miR-146a. Tal construcción está constituida por la secuencia precursora de miR-146a; se muestra la relación espacial que guarda con los diferentes componentes propios del vector pcDNA3.1 y que forman parte de esta construcción. El rectángulo morado representa la secuencia del pre-miR-146a humano amplificada, el rectángulo rosa dentro de él delimita la secuencia del miRNA maduro (M), y el cuadro azul claro dentro la región semilla (S). AmpR indica el casete de resistencia a ampicilina.

6.4.2) La región 3'UTR de Merlín es blanco del miR-146a

Las construcciones psiCheck2/3'UTR-Merlín y pcDNA3.1/miR-146a, previamente generadas, y sus correspondientes vectores vacíos, fueron transfectadas en las células HEK-293 bajo diferentes combinaciones y concentraciones, y los extractos celulares fueron usados en ensayos de luciferasa. Los grupos de transfección de cada ensayo de luciferasa se presentan a detalle en las **Tablas S-1 a S-5**.

Los dos primeros ensayos fueron diseñados para determinar la concentración a la que el miR-146a podría disminuir los niveles de luciferasa. Las concentraciones a las que se decidió cotransfectar la construcción pcDNA3.1/miR-146a fueron de 0.1µg, 0.2µg y 0.4µg, ya que a estas concentraciones el miR-7 tuvo efecto sobre la 3'UTR de Merlín.

Las lecturas obtenidas del primer y segundo ensayo de luciferasa fueron sometidas a procedimientos matemáticos (**S-6**), en los que se restó el promedio de las lecturas de luciferasa de las células no transfectadas a las lecturas de las células que si fueron transfectadas, y en cada ensayo se sacaron los promedios de los siguientes grupos de transfección: Promedio 1 (psicheck2 vacío cotransfectado con pcDNA3.1/miRNA-146a), Promedio 2 (psiCheck2/ 3'UTR-Merlín cotransfectado con pcDNA3.1/miRNA-146a), Promedio 3 (psiCheck2 vacío cotransfectado con pcDNA3.1 vacío) y Promedio 4 (psiCheck2/3'UTR-Merlín cotransfectado con pcDNA3.1 vacío). Se dividió el Promedio 2

entre el Promedio 1, y se tomaron en cuenta los productos dados por esta división para cada ensayo de luciferasa y se sacó un promedio de todos ellos, nombrado Promedio-miRNA146a. Por otro lado, se dividió el Promedio 4 entre el Promedio 3, y se tomaron en cuenta los productos dados por esta división para cada ensayo de luciferasa y se sacó un promedio de todos ellos, nombrado Promedio-pcDNA3.1. El Promedio-miRNA146a se normalizó a 1, tomando en cuenta como 1 al Promedio-pcDNA3.1.

Las lecturas normalizadas fueron graficadas para comparar los valores de los grupos cotransfectados con el miR-146a y los de los grupos cotransfectados con el vector vacío. A partir de lo anterior se generó la **Fig. 26**, la cual reveló que el miR-146a sólo al transfectar a una concentración de 0.4 μg fue capaz de generar una marcada disminución, de 50 %, en los niveles relativos de luciferasa, en comparación con el vector vacío, muy diferente a lo visto a la concentraciones de 0.1 μg y 0.2 μg , que no mostraron ningún efecto sobre los niveles de actividad de luciferasa. Además, estos resultados fueron el primer indicio para considerar que el miR-146a, al bajar los niveles de luciferasa, podría estar teniendo como blanco a la 3'UTR de Merlín. Los datos crudos de estos ensayos se muestran en las **Gráficas S-9** y **S-10**, que en conjunto indican que las construcciones generadas no presentaban comportamientos anómalos, es decir que por sí solas no generaban caídas marcadas en los niveles de luciferasa, de tal modo que los datos obtenidos con dichas construcciones son confiables.

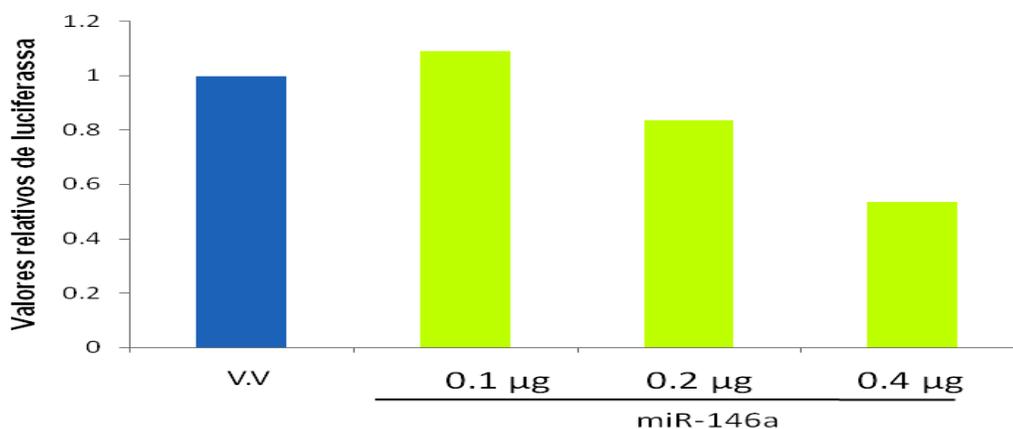


Figura 26. La 3'UTR de Merlín es blanco del miR-146a. Las células HEK-293 se cotransfectaron con 0.1 μg de la construcción psiCheck2/3'UTRMerlín y con 0.4 μg del vector vacío pcDNA3.1 (v.v) (barra azul) o con las concentraciones indicadas del vector de expresión de miR-146a (barras verdes), y 48 horas después se realizaron los ensayos de luciferasa, como se describe en materiales y métodos. Estos valores corresponden al 1ro y 2do ensayo de luciferasa.

6.4.3) miR-146a reduce de manera significativa los niveles de luciferasa

Además del primer y segundo ensayo de luciferasa, se realizaron otros tres experimentos independientes, y cuyos grupos de transfección y concentración de las construcciones empleadas se muestran a detalle en las **Tablas S-1 a S-5**.

A partir de los resultados de los dos primeros ensayos en los que el miR-146a indujo una baja marcada en la actividad de luciferasa sólo cuando se usaron 0.4 µg del vector de expresión del miR-146a, en los siguientes se usó esta concentración de plásmido.

Las lecturas obtenidas en los cinco ensayos de luciferasa fueron sometidas a un análisis estadístico que se muestra a detalle la parte suplementaria **S-6**, y los datos se resumen en la **Fig. 27**, en la que se observa que el miR-146a disminuyó de manera significativa la actividad de luciferasa, hasta un 40 % con una $p \leq 0.01$, cuando se compara con la obtenida cuando se transfecta el vector vacío, y hasta un 23 % con una $p \leq 0.05$, en comparación a la observada en las células que expresan el miR-145, usado como control negativo. La disminución de la actividad de luciferasa (40 % y 23 %) observada después de expresar el miR-146a, cae dentro del rango de inactivación resultante de la interacción de un miRNA con su mRNA (Sun *et al.*, 2010; Mei *et al.*, 2011).

En conjunto, estos resultados indican que la región 3'UTR del gen de Merlín es blanco del miR-146a, y por tanto que el miR-146a puede modular los niveles de expresión de Merlín

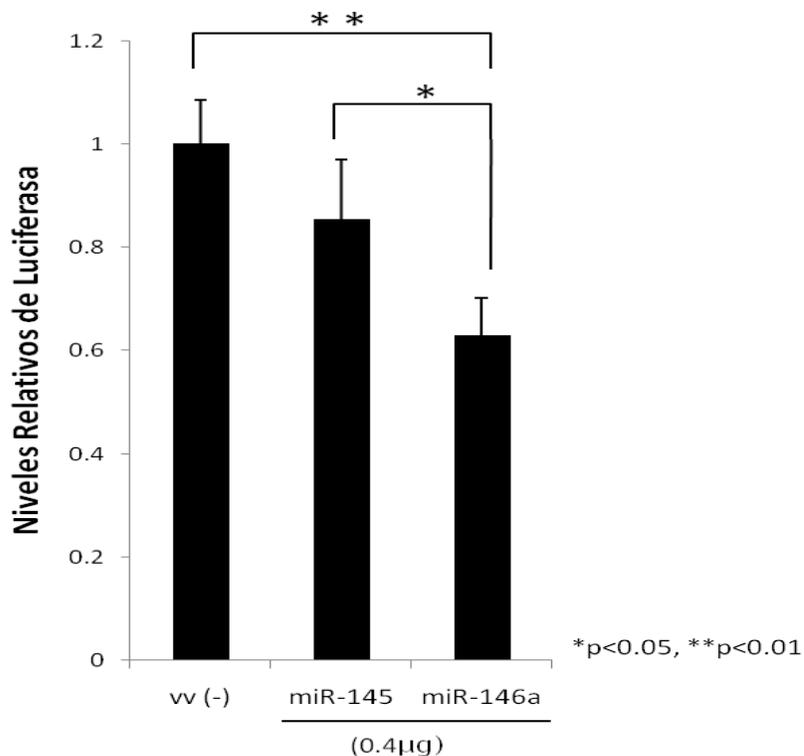


Figura 27. miR-146a reduce de manera significativa los niveles de luciferasa. Las células HEK-293 se cotransfectaron con 0.1 µg de la construcción psiCheck2/3'UTRMerlín y con 0.4 µg del vector vacío pcDNA3.1 (V.V), o con 0.4 µg del vector de expresión de miR-146, o con 0.4 µg del vector de expresión miR-145, como control negativo, y 48 horas después se realizaron los ensayos de luciferasa. Los resultados se obtuvieron del análisis estadístico de 5 experimentos independientes con una n mínima de 3.

6.4.4) miR-146a regula negativamente los niveles proteicos de Merlín en células HEK-293

Los resultados obtenidos con los diferentes ensayos de luciferasa indican que el miR-146a tiene como blanco la 3'UTR de Merlín. Para confirmar que la expresión del miR-146a disminuye los niveles proteicos de Merlín, se evaluó por medio de inmunoblots en extractos de células HEK-293 no transfectadas, transfectadas con 0.4 µg del vector de expresión vacío o transfectadas con 0.4 µg de la construcción pcDNA3.1/miR-146a usando anticuerpos específicos para Merlín. La expresión del miR-146 en las células

HEK-293 disminuyó los niveles de Merlín al compararlos con los niveles observados en las células no transfectadas o transfectadas con el vector vacío (**Fig. 28**). La disminución de proteína endógena de Merlín que resulta de la expresión del miR-146a no se debió a bajas en los niveles totales de proteínas celulares, puesto que los niveles de ERK2 no cambiaron independientemente de la expresión del miR-146a.

En resumen, estos resultados muestran que el miR-146a disminuye los niveles de proteína endógena de Merlín en las células HEK-293, lo que apoya la idea de que el miR-146a puede interactuar con el mRNA de Merlín y así disminuir la expresión de esta proteína.

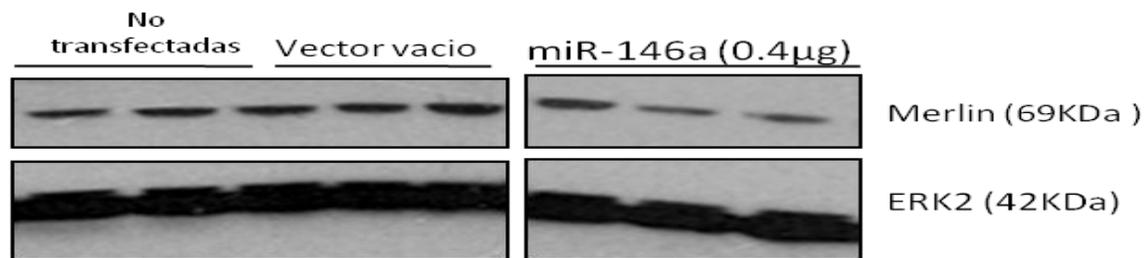


Figura 28. miR-146a regula negativamente los niveles proteicos de Merlín en células HEK-293. Los extractos protéicos de células HEK-293 no transfectadas, transfectadas con 0.4 µg del vector vacío pcDNA 3.1 y transfectadas con 0.4 µg del vector de expresión del miR-146a, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10 % y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa, realizando un inmunoblot con anti-NF2 y anti-ERK2. Se indica el peso molecular de Merlín y ERK2.

7) DISCUSIÓN

El proceso de transformación celular que resulta en cáncer involucra una serie de cambios en funciones celulares básicas, los cuales se adquieren gracias a mutaciones que favorecen la función de los productos de genes (oncogenes) que regulan positivamente la proliferación y/o supervivencia celular, o mutaciones que inhiben la función de los productos de genes que controlan negativamente estos procesos (supresores de tumores) (revisado por: Martínez *et al.*, 2003; Vogelstein y Kinzler, 2004). Entre los genes supresores de tumores, el producto del gen *Nf2*, Merlín, juega un papel importante en el control de la proliferación celular. Merlín previene la proliferación descontrolada al activar el mecanismo conocido como inhibición de la proliferación por contacto, lo que asegura un número definido de células en cada órgano adulto (revisado por: Okada *et al.*, 2007; Scoles, 2007). De acuerdo con esto, mutaciones deletéreas en *Nf2* favorecen la aparición de tumores, principalmente del sistema nervioso central (revisado por McClatchey y Giovannini, 2005; Asthagiri *et al.*, 2009). Interesantemente, también se ha observado que en tumores no asociados a mutaciones en *Nf2*, Merlín se encuentra inactivado por procesos postransduccionales que resultan de la actividad sostenida de distintas vías de señalización que favorecen la proliferación celular, por ejemplo, la fosforilación de Merlín por la cinasa AKT resulta en su degradación (Tang *et al.*, 2007), en tanto que su fosforilación por las cinasas PKA o PAK lo inactiva (revisado por McClatchey y Giovannini, 2005; Okada *et al.*, 2007; Asthagiri *et al.*, 2009); de este modo la inactivación de Merlín es un paso crucial en el proceso de transformación celular.

Aquí se muestra que además de los mecanismos hasta ahora descritos, Merlín también puede ser regulado negativamente por miRNAs. El análisis bioinformático de la región 3'UTR de *Nf2* arrojó doce miRNAs candidatos, de la base de datos de miRNAs hasta ahora conocidos, que podrían interactuar con la 3'UTR del mRNA de Merlín y estar regulando los niveles proteicos de Merlín. Dado que nuestro análisis informático se enfocó a la región 3'UTR de Merlín, es posible que existan otros miRNAs que podrían interactuar con otras regiones del mRNA de Merlín y regular también su expresión, como se ha descrito para otros genes (revisado por Melo y Esteller, 2011).

De los doce candidatos, pusimos particular atención en los miR-7 y el miR-146a, puesto que se ha reportado su participación en procesos promotores de la carcinogénesis como la inflamación, proliferación, diferenciación y crecimiento celular, además de tener una asociación directa su sobreexpresión con diferentes tipos de cáncer (revisado por Williams *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011; Rusca y Monticelli, 2011).

Nuestros datos utilizando la actividad de luciferasa como reportero, muestran que la 3' UTR de Merlín es blanco tanto del miR-7 como del miR-146a. Se observó que el miR-7 redujo la actividad de luciferasa entre un 60% y 43%, en comparación con el vector vacío y el control negativo miR-145, respectivamente, siendo más eficiente en reducir los niveles de luciferasa que el miR-146a, ya que este último sólo redujo la actividad de luciferasa un 40% y 23%, respecto al vector vacío y el control negativo miR-145, respectivamente. Esto se puede atribuir a que el miR-7 cuenta con dos sitios blanco dentro de la región 3'UTR de Merlín, mientras que el miR-146a sólo cuenta con uno. El contar con un sitio más de reconocimiento podría estar incrementando las posibilidades de que el miR-7 interactúe con Merlín y por lo tanto su represión, para saber esto habría que realizar más experimentos.

Del mismo modo, en las células HEK-293 la disminución de proteína endógena de Merlín ocasionada por la expresión de miR-7 o miR-146a, indica que estos miRNAs regulan a Merlín a un nivel traduccional. De acuerdo con los datos dados por los inmunoblots, la expresión del miR-7 resultó en una mayor reducción en los niveles de proteína endógena Merlín que la observada cuando se expresa el miR146a; esto confirma que la 3'UTR de Merlín es más susceptible de regulación por el miR-7 que por miR146a, y que tener dos sitios de interacción podría estar confiriendo una mayor grado de regulación que tener un sólo sitio. Sin embargo, para poder afirmar lo anterior es necesario mostrar que ambos miRNAs se expresan en niveles similares.

Por otra parte, el hecho de que los sitios de reconocimiento del miR-7 en la 3'UTR de Merlín humano sólo se encuentren conservados en homínidos, sugiere que la regulación de Merlín por este miRNA es un evento reciente en la evolución. En cambio, la regulación de Merlín por el miR-146a parece ser un evento temprano en la evolución, ya que el sitio se encuentra conservado en mamíferos pequeños como la rata y el ratón. En invertebrados este sitio no se encuentra en la 3'UTR de Merlín.

Con base en nuestros resultados, proponemos que dentro de un contexto celular donde la expresión de miR-7 y miR-146a se encuentren elevadas como resultado de la proliferación y crecimiento celular o de una respuesta inflamatoria, estos miRNAs podrían inducir la degradación o la inhibición traduccional de Merlín y favorecer el proceso de transformación celular.

Lo anteriormente establecido se basa en la existencia de reportes que apoyan, por un lado, que la respuesta inflamatoria, por medio de las citocinas IL-1 β y TNF- α , promueve la activación del factor NF- κ B, el cual a la vez induce la transcripción del miR-146a (revisado por: Williams *et al.*, 2008; Rusca y Monticelli, 2011); y por otro lado, la misma inflamación y la proliferación celular estimulan la liberación de factores de crecimiento que al unirse a receptores como EGFR, por medio de la ruta RAS/ERK/c-Myc, inducen la transcripción de miR-7 (**Fig. 29**) (Chou *et al.*, 2010). La transcripción del miR-7 y del miR-146a, inducida por la proliferación celular y la inflamación, llevaría a la inactivación de la capacidad supresora de tumores de Merlín, activando con ello factores de transcripción como YAP/TEAD (Zhao *et al.*, 2011), AP1 (Shaw *et al.*, 2001), Stat-3 (Scoles *et al.*, 2002), CRL4/DCAF1 (Li *et al.*, 2011), NF- κ B (Kim *et al.*, 2002), entre otros (Okada *et al.*, 2007), que estimularían la transcripción de oncogenes, llevando a la ruptura del equilibrio homeostático, promoviendo la exacerbación de rutas favorecedoras de la transformación celular cancerígena, como son la misma inflamación, la proliferación, la inhibición apoptótica y el crecimiento celular, y posiblemente llevando a la adquisición de diferentes tipos tumorales, reportados por la inactivación de Merlín (revisado por McClatchey y Giovannini, 2005; Scoles, 2007; Okada, 2007; Asthagiriet *al.*, 2009; Stamenkovic y Yu, 2010) (**Fig. 29**). Sin embargo, esto aún tiene que ser demostrado experimentalmente. Por otro lado, también es necesario determinar si realmente se está dando la interacción endógena de Merlín con miR-7y miR-146a, su comportamiento en otros tipos celulares y si la inactivación causada por estos miRNAs es ocasionada por represión traduccional o degradación del mRNA.

Finalmente, aunque este estudio se enfocó a los miRNAs 7 y 146a, recientemente también se ha implicado al resto de los 12 miRNAs candidatos, revelados por el análisis bioinformático, como actores importantes en el cáncer, como es el caso del miR- 25, pues se ha encontrado que este miRNA, a través de regular negativamente a p21, Bim y PTEN, puede promover proliferación y supervivencia celular en etapas tempranas del proceso de

transformación y en etapas avanzadas puede promover migración celular y metástasis al inhibir a caderina1 (Zhang *et al.*, 2012). Del mismo modo miR-32 se ha asociado al desarrollo de cáncer de próstata (Volinia *et al.*, 2006) y de pulmón (Yanaihara *et al.*, 2006), al igual que la sobreexpresión de miR-363 y miR-367 se ha asociado a cáncer gástrico (Cho *et al.*, 2010), de mama (Zhang, 2011; Beltran, 2012) y de pulmón (Navarro *et al.*, 2011). También el miR-92a y 92b se han implicado en metástasis; esto es importante ya que Merlín también regula negativamente la migración celular en la transformación celular (Nass *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). Interesantemente, los miR-193b, miR-326 y miR-330 se han implicado en carcinomas de cuello y cabeza, melanoma (Lenarduzzi *et al.*, 2012), gliomas (Qu, 2012), cáncer de mama (Liang, 2010) y cáncer de próstata pero hasta ahora las evidencias experimentales sugieren que estos mRNAs son supresores de tumores (Kefas, 2009; Lee *et al.*, 2009; Chen, 2012). Sin embargo, dependiendo del contexto celular es posible que también puedan funcionar como onco-miRNAs afectando las funciones de Merlín, siempre y cuando efectivamente Merlín sea blanco de estos miRNAs.

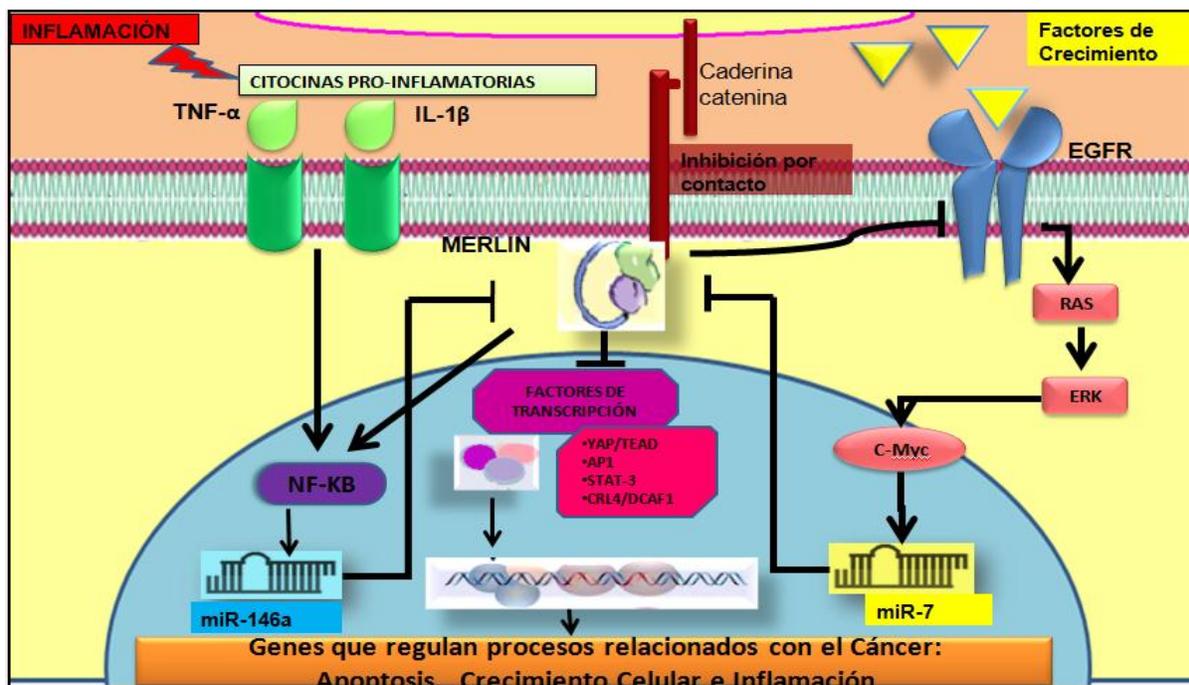


Figura 29. Papel de Merlín, miR-7 y miR-146a dentro de un escenario celular. Marco celular posible por el cual se estaría suscitando el mecanismo de inactivación de la actividad supresora de tumores de Merlín, dado por la regulación traduccional de miR-7 y el miR-146, la cual estaría favoreciendo y exacerbando rutas promotoras de la transformación cancerígena, como antiapoptóticas, inflamatorias, de crecimiento y proliferación celular.

8) CONCLUSIONES

- El análisis bioinformático, generado a partir de tres diferentes programas, reveló que existen 12 miRNAs que pueden formar un dúplex significativo (miRNA:mRNA) con la 3'UTR de Merlín.
- Los 12 miRNAs candidatos son: miR-25, miR-32, miR-92a y- 92b, miR-363, miR-367, miR-146a, miR-146b, miR-7, miR-193, miR-330 y miR- 326.
- Tanto el miR-7 como el miR-146 interactúan funcionalmente con la 3'UTR de Merlín cuando éste se encuentra río abajo del cDNA que codifica para la luciferasa, ya que ambos reducen la actividad de luciferasa.
- Ambos miRNAs regulan negativamente los niveles proteicos de Merlín en células HEK-293.
- El miR-7 es más eficiente regulando a Merlín que el miR-146a, probablemente esto es debido a que la 3'UTR de Merlín contiene dos secuencias de reconocimiento e interacción para el miR-7.

9) PERSPECTIVAS

- ✓ Demostrar que los demás miRNAs, que resultaron ser candidatos para estar formando dúplex significativos con Merlín, por análisis bioinformático, interactúan con la 3'UTR de Merlín.
- ✓ Mutar los sitios blancos de miR-7 y miR-146a en la 3'UTR de Merlín, para ver si se inhibe su interacción. En este sentido, evaluar qué ocurre al mutar sólo un sitio blanco para miR-7, y definir si un sitio es más importante que el otro en la inactivación de Merlín.

- ✓ Determinar por RT- PCR a tiempo real (RT-qPCR) si la inactivación de Merlín, es dada por el miR-7 y el miR-146a de manera endógena, y ver a qué nivel se está dando la inactivación de Merlín por estos miRNAs, si es por degradación o por inhibición traduccional. Además, analizar en líneas celulares procedentes de diferentes tipos de cáncer, los niveles de transcripción de miR-7 y miR-146a, y la relación que presentan con Merlín.
- ✓ Determinar las variaciones en los niveles de Merlín endógeno al transfectar el miR-7 y el miR-146a, a diferentes concentraciones y en diferentes líneas celulares inmortalizadas o relacionadas con el cáncer. Además, ver cómo se comporta Merlín si se cotransfectan ambos miRNAs.
- ✓ Analizar si el tratamiento con factores de crecimiento ligados del receptor EGFR, como TGF- β , induce la inactivación de Merlín debido al aumento en la expresión del miR-7, y hacer una cinética de concentraciones y tiempo de tratamiento, para ver el comportamiento de Merlín y miR-7.
- ✓ Analizar si el tratamiento con citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 β y TNF- α , induce la inactivación de Merlín debido al aumento en la expresión del miR-146a, y hacer una cinética de concentraciones y tiempo de tratamiento, para ver el comportamiento de Merlín y miR-146a.
- ✓ Averiguar si la inactivación de Merlín por miR-7 (inducida por TGF- β) y por miR-146a (inducida por IL-1 β y TNF- α) favorece el proceso de transformación celular o cáncer, por medio de ensayos de cicatrización, cultivo de colonias en agar blando y cuantificación celular.

SUPLEMENTARIAS

Tabla S-1. Grupos de transfección del primer ensayo de luciferasa.		
No Transfectadas	-	-
TRANSFECTADAS	psiCheck2 (0.1 µg) +	-
		pcDNA3.1 (0.1 µg,0,2 µg,0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a (0.1 µg,0,2 µg,0.4 µg)
	psiCheck2/3'UTR de Merlín (0.1 µg) +	pcDNA3.1/miR-7 (0.1 µg,0,2 µg,0.4 µg)
		-
		pcDNA3.1 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)
Todos los grupos, transfectadas y no transfectadas, contaron con su duplicado		

Tabla S-2. Grupos de transfección del segundo ensayo de luciferasa.		
No Transfectadas	-	-
TRANSFECTADAS	psiCheck2 (0.1 µg)	-
		pcDNA3.1 (0.1 µg,0,2 µg,0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a (0.1 µg,0,2 µg,0.4 µg)
	psiCheck2/3'UTR de Merlín (0.1 µg)	pcDNA3.1/miR-7 (0.1µg,0,2µg,0.4µg)
		-
		pcDNA3.1 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a (0.1 µg,0,2 µg,0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-7 (0.1 µg,0,2 µg,0.4 µg)
Todos los grupos, transfectadas y no transfectadas, contaron con su duplicado.		

Tabla S-3. Grupos de transfección del tercer ensayo de luciferasa .			
No Transfectadas	-	-	
TRANSFECTADAS	psiCheck2 (0.1 µg) +	-	
		pcDNA3.1 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-146a (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)	
	psiCheck2/3'UTR de Merlín (0.1 µg) +	-	
		pcDNA3.1 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-146a (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)	
	Todos los grupos, transfectadas y no transfectadas, contaron con su triplicado		

Tabla S-4. Grupos de transfección del cuarto ensayo de luciferasa.		
No Transfectadas	-	-
TRANSFECTADAS	psiCheck2 (0.1 µg) +	-
		pcDNA3.1 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-881 (0.4 µg)
	psiCheck2/3'UTR de Merlín (0.1 µg) +	-
		pcDNA3.1 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-146a (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)
	psiCheck2/3'UTR de KLF4 (0.1 µg) +	-
		pcDNA3.1 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)
		pcDNA3.1/miR-881 (0.4 µg)

Todos los grupos, transfectadas y no transfectadas, contaron con su triplicado

Tabla S-5. Grupo de transfección del 5to ensayo de luciferasa.

No Transfectadas	x	X	
TRANSFECTADAS	psiCheck2 (0.1 µg) +	X	
		pcDNA3.1 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-146a(0.4µg)	
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-881 (0.4 µg)	
	psiCheck2/3'UTR de Merlín (0.1 µg) +	X	
		pcDNA3.1 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-146a (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-7 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)	
	psiCheck2/3'UTR de KLF4 (0.1 µg) +	X	
		pcDNA3.1 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-145 (0.4 µg)	
		pcDNA3.1/miR-881 (0.4 µg)	
	Todos los grupos, transfectadas y no transfectadas, contaron con su triplicado		

S-6) Análisis matemático y estadístico

A todas las lecturas obtenidas en los diferentes grupos de transfección se les restó el promedio de los valores de las lecturas obtenidas para el grupo que no fue transfectado. Cada grupo de transfección contaba con dos tipos de lecturas, una dada por el gen de luciferasa de *Renilla sp.* (hRLuc) y otra dada por el gen de luciferasa de luciérnaga (hLuc). Las lecturas obtenidas por cada grupo de transfección, fueron normalizadas dividiendo la lectura dada por hRLuc sobre hLuc.

(Hasta este punto se sometieron las lecturas utilizadas para las **Gráficas**

S-7 a S-10.)

Posteriormente, para cada ensayo de luciferasa se sacaron los promedios de los siguientes grupos de transfección:

	Grupos de transfección:
PROMEDIO 1	psicheck2 vacío cotransfectado con pcDNA3.1/miRNA-x
PROMEDIO 2	psiCheck2/ 3'UTR-z cotransfectado con pcDNA3.1/miRNA-x
PROMEDIO 3	psiCheck2 vacío cotransfectado con pcDNA3.1vacío
PROMEDIO 4	psiCheck2/3'UTR-z cotransfectado con pcDNA3.1vacío

Los grupos de transfección antes mencionados debían compartir entre ellos el mismo miRNA a la misma concentración (X), y la misma 3'UTR (Z).

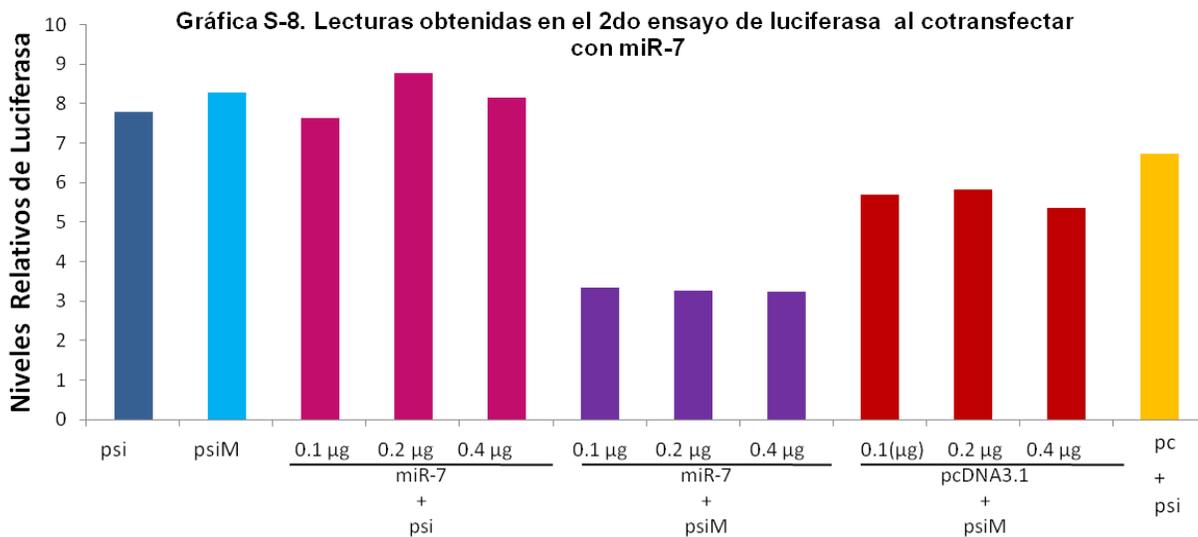
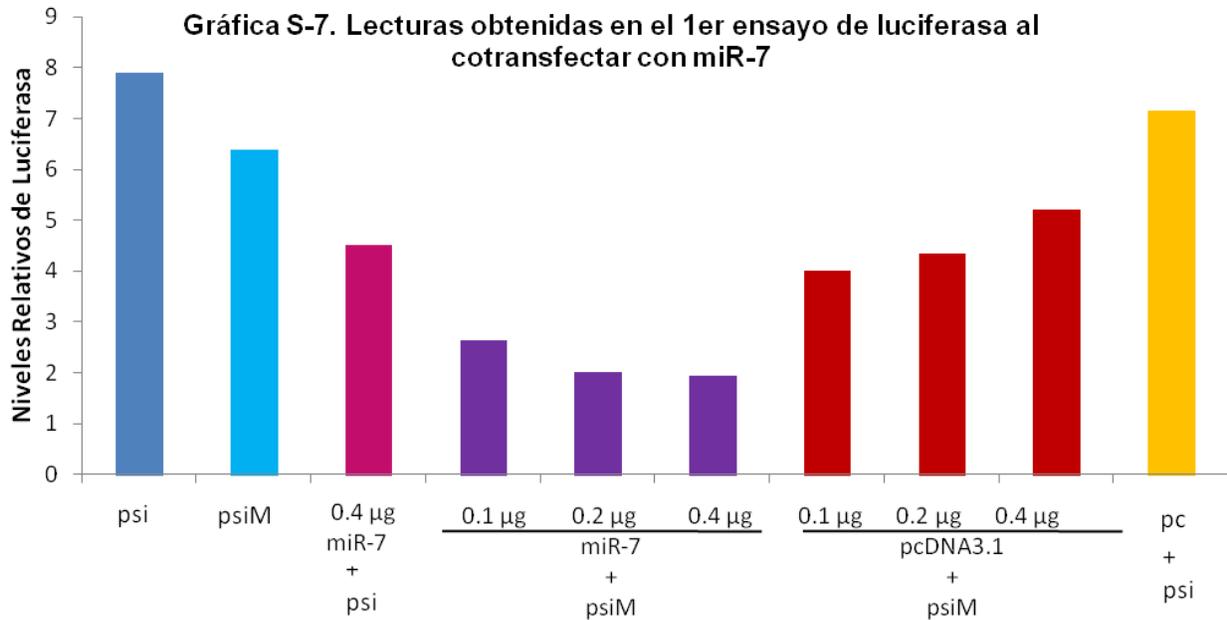
Para cada miRNA, se dividió el PROMEDIO 2 entre el PROMEDIO 1. Se tomaron en cuenta los productos dados por esta división para cada ensayo de luciferasa y se sacó un promedio, de todos ellos, nombrado PROMEDIO-miRNax.

Por otro lado, se dividió el PROMEDIO 4 entre el PROMEDIO 3. Se tomaron en cuenta los productos dados por esta división para cada ensayo de luciferasa y se sacó un promedio, de todos ellos, nombrado PROMEDIO-pcDNA3.1

El PROMEDIO-miRNax se normalizó a 1, tomando en cuenta como 1 al PROMEDIO-pcDNA3.1. Las lecturas normalizadas se graficaron (hasta este punto se sometieron las lecturas utilizadas para generar las gráficas de las **Figuras 18 y 26**) y se obtuvo su desviación estándar (hasta aquí se llegó con la gráfica de la **Figura 20**).

Para determinar si las diferencias observadas en la gráfica entre los PROMEDIO-miRNax y los PROMEDIO-pcDNA3.1 eran significativas, estadísticamente hablando, se hizo una prueba Kolmogorof-Smirnoff para ver si los promedios se comportaban de manera normal, y una prueba T-student para ver la diferencias de medias (hasta este punto se sometieron las lecturas utilizadas para generar las gráficas de las **Figuras 19 y 27**).

S-7 y S-8) Lecturas del 1er y 2do Ensayo de luciferasa al cotransfectar con miR-7

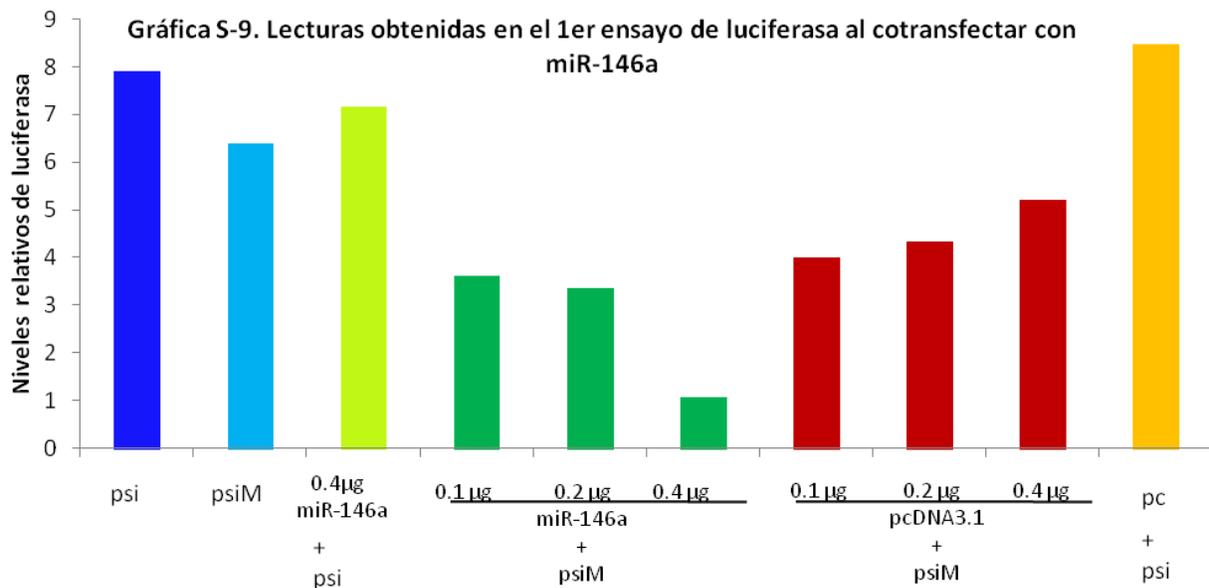


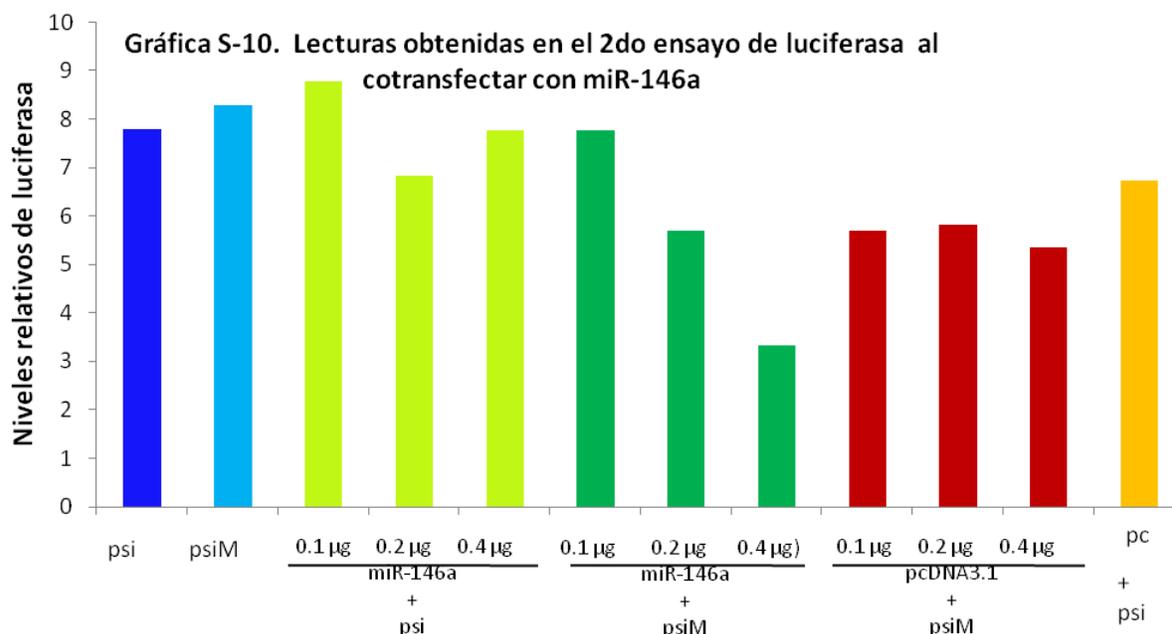
Las **Gráficas S-7** y **S-8** muestran las lecturas obtenidas en los diferentes grupos de transfección en el primer y segundo ensayo de luciferasa, respectivamente. Ambas gráficas muestran cómo el grupo en el que se transfectó la construcción pcDNA3.1/miR-7 más la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín o psiM (barras moradas) presentan una disminución pronunciada en los niveles de luciferasa en relación con el grupo en el que se transfectó el pcDNA3.1vacío más la construcción con la 3'UTR de Merlín (barras rojas), y

también en comparación con el grupo con el miR-7 y el vector vacío psiCheck2 (barras rosas). La anterior disminución de luciferasa se ve de manera marcada en las 3 concentraciones del miR-7, 0.1 μg , 0.2 μg y 0.4 μg (barras moradas). La **Gráfica S-8** varía de la **S-7**, ya que cuenta con el grupo de transfección del miR-7 más el psiCheck2 vacío a las concentraciones de 0.1 μg , 0.2 μg además de la de 0.4 μg , que presentaba la gráfica **S-7** (barras rosas). La adición de este grupo de barras rosas nos permitió descartar la posibilidad de que la construcción miR-7 por sí sola generara la baja de los niveles de luciferasa en ausencia de la 3'UTR, presentando, a las tres diferentes concentraciones, niveles de luciferasa muy parecidos a los dados por el vector vacío de psiCheck2 (barra azul fuerte).

Las **Gráficas S-7 y S-8**, también nos permitieron confirmar que la construcción pcDNA3.1/miR-7, se comportaba según lo esperado, es decir que no inducía una baja en los niveles de luciferasa por sí misma, en ausencia de la 3'UTR, esto se puede ver al comparar las barras rosas o el grupo que tiene el miR-7 más el vector vacío psiCheck2, con la del vector vacío psiCheck2 sólo (barra azul fuerte), o con el grupo que contiene ambos vectores vacíos (barra naranja).

S-9 y S-10) Lecturas del 1er y 2do Ensayo de luciferasa al cotransfectar con miR-146a





Las **Gráficas S-9 y S-10** muestran las lecturas obtenidas en los diferentes grupos de transfección en el primer y segundo ensayo de luciferasa, respectivamente. Ambas gráficas muestran cómo el grupo en el que se transfectó la construcción pcDNA3.1/miR-146a más la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín (barras verde oscuro) presentan una baja en los niveles de luciferasa en relación con el grupo en el que se transfectó el pcDNA3.1 vacío más la construcción con la 3'UTR de Merlín (barras rojas), pero sólo a la concentración de 0.2 y 0.4 µg. La disminución de los niveles de luciferasa es más marcada cuando se transfecta el miR-146a a 0.4 µg, en relación con las otras dos concentraciones. La **Gráfica S-10** varía de la **S-9**, ya que cuenta con el grupo de transfección del miR-146a más el psiCheck2 vacío a las concentraciones de 0.1 µg, 0.2 µg además a la de 0.4 µg, que presentaba la **S-10** (barras verde claro). La adición de este grupo de barras verde claro nos permitió descartar la posibilidad de que la construcción miR-146a estuviera metiendo ruido por sí sola, generando la baja de niveles de luciferasa en ausencia de la 3'UTR, presentando, a las tres diferentes concentraciones, niveles de luciferasa muy parecidos a los dados por el vector vacío psiCheck2 sólo (barra azul fuerte) o con el grupo que contiene ambos vectores vacíos (barra naranja). Los barras que se comparten entre las **Gráficas S-7, S-8, S-9 y S-10**, es decir la barra azul claro, azul oscuro, las barras rojas y naranja, presentan los mismos valores de luciferasa en el primer y segundo ensayo de luciferasa, tanto al co-transfectar el miR-7 y el miR-146a,

porque la transfección de estos miRNAs se hizo en paralelo y se utilizaron los mismos grupos de transfección control.

Es por lo anterior, que en las cuatro gráficas se puede ver que hay una reducción de la actividad de luciferasa muy marcada cuando se transfecta el vector vacío de pcDNA3.1 más la construcción con la 3'UTR de Merlín o psiM (barras rojas), en comparación a cuando la construcción psiM se encuentra sola (barra azul claro), ya que lo que se esperaría de manera normal es que ambos grupos de barras presentaran niveles de luciferasa muy parecidos, pero la baja al agregar el vector pcDNA3.1, a sus diferentes concentraciones, creemos que se debe a una competencia entre promotores de los vectores, ya que tanto el gen de luciferasa de *Renilla sp.* del vector psiCheck2 como el vector pcDNA3.1, cuentan con el mismo promotor, el SV40, de tal modo que la baja en los niveles de luciferasa se puede deber a competencia entre factores promotores de la transcripción. A pesar de lo inferido anteriormente, supusimos que el vector pcDNA3.1 por sí sólo no estaría afectando los experimentos donde se comprobó la acción del miR-7 y del miR-146a, ya que se puede ver que los grupos transfectado con las construcciones con estos miRNAs más la 3'UTR de Merlín, sí generan una baja marcada de niveles de luciferasa (barras verde oscuro y moradas) en relación a cuando sólo está presente el vector vacío (barras rojas).

Por otro lado, ambas gráficas también mostraron una baja marcada en la actividad de luciferasa en el grupo de transfección con vector vacío pcDNA3.1 más la construcción psiCheck2/3'UTR-Merlín (barras rojas), en comparación con el grupo con el vector vacío pcDNA3.1 más el vector vacío psiCheck2 (barra naranja), siendo que se esperaría que ambos grupos se comportaran de manera parecida, ya que no hay miRNA que esté afectando a la 3'UTR de Merlín, pero esta baja de luciferasa en el grupo que cuenta con la construcción con la 3'UTR de Merlín la atribuimos a que probablemente factores endógenos propios de las células HEK-293, incluyendo algunos miRNAs, estarían reconociendo a la 3'UTR y reprimiendo la traducción de Merlín, bajando con ello los niveles de luciferasa; este mismo fenómeno de inactivación de Merlín por factores endógenos, puede explicar el por qué en la **Gráfica S-7**, se ve una baja de la actividad de luciferasa en el vector vacío de psiCheck2 (barra azul fuerte) al compararlo con el mismo vector pero con la 3'UTR de Merlín (barra azul claro).

REFERENCIAS

- 1) Arónica, E., Fluiter, K., Iyer, A., Zurolo, E., Vreijiling, J., van Vliet, E. A., Baayen, J.C. and Gorter, J. A. (2010) Expression pattern of miR-146a, an inflammation- associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 31, 1100-1107.
- 2) Asthagiri, R.A., Parry D.M., Butman A. J., Kim, J. H., Tsilou, E. T., Zhuang, Z. and Lonser R. R. (2009) Neurofibromatosis type 2. *Lancet Sem.* 373, 1974-1986.
- 3) Bai, Y., Liu, Y.J., Wang, H., Xu, Y., Stamenkovic, I. and Yu, Q. (2007) Inhibition of the hyaluronan- CD44 interaction by Merlin contributes to the tumor-suppressor activity of Merlin. *Oncogen* 25, 836-850.
- 4) Beltran, A.S., Russo, A., Lara, H., Fan, C., Lizardi, P.M. (2011) Suppression of breast tumor growth and metastasis by an engineered transcription factor. *PLoS ONE* 6.
- 5) Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- 6) Carlo, M. and Croce, M.D. (2011) Oncogenes and cancer. *N Engl J Med Rev.* 358, 502-511.
- 7) Cho, J.Y., Lim, J.Y., Kim, S.B., Park, Y. and Lee, J.S. (2010) MicroRNA-196b and microRNA-363 were identified as gastric cancer specific microRNAs in human gastric cancer tissue using microarray. *Conference of Eu Soc Med Oncol.*
- 8) Chou, Y.T., Lin, H.H., Lien, Y.C., Wang, Y.H., Hong, C.F., Kao, Y.R., Linc, S.C., Chang, S.J., Chen, S.J., Chen, H.C., Yeh, S.D. and Wu, C.W. (2010) EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a RAS/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res* 70, 8822-8831.
- 9) Chen, J. (2012) MicroRNA-193b functions as a tumor suppressor in malignant melanoma. Thesis of Queen's University, 15:27:01.707.
- 10) Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. and Montavani, A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcin Rev* 30, 1073-1081.
- 11) Curto, M., Cole, B.K., Lallemand, D., Liu, C.H. and McClatchey A.L. (2007) Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by NF2/Merlin. *J Cell Biol* 177, 893-903.
- 12) Delgado, M.D. (2008) Modificadores de la cromatina, regulación génica y cáncer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.* España, 130-160.
- 13) Godlewski, J., Newton, H.B., Chiocca, E.A. and Lawler, S.E. (2010) MicroRNAs and Glioblastoma; the stem cells connection cell death and proliferation. *Cell Death Differ Rev.* 17, 221- 228.

- 14) Grivennikov, S., Greten, F.R. and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation and cancer. *Cell Rev.* 140, 883-899.
- 15) Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell Rev.* 100, 57-70.
- 16) Hanahan, D. and Weinberg, R. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell Rev.* 144, 646-674.
- 17) Hammell, M. (2010) Computational methods to identify miRNA targets. *Semin Cell Dev Biol Rev.* 21, 738-744.
- 18) Jacoby, L.B., MacCollin, M., Barone, R., Ramesh, V. and Gusella, J.F. (1996) Frequency and distribution of NF2 mutations in schwannomas. *Genes Chromosom Cancer* 17, 45-55.
- 19) John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschli, T., Sander, C. (2004) Human MicroRNA targets. *Plos biology* 11, 1863-1879.
- 20) Kefas, B., Godlewski J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M., Lee, J., Fines, H., Chiocca, A., Lawler, S. and Purow, B. (2008) microRNA-7 inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt pathway and is Down-regulated in Glioblastoma. *Cancer Res* 68, 3566-3562.
- 21) Kefas, B., Comeau, L., Floyd, D., Seleverstov, O., Godlewski, J., Schmittgen, T., Li, Y., Chiocca, E.A., Lee J., Fine, H., Abounader, R., Lawler, S. and Purow, B. (2009) The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J Neurosci* 48, 15161-15168.
- 22) Kertesz, M., Lovino, N., Unnerstall, U. Gaul, U. y Segal E. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39, 1278-1284.
- 23) Kim J.Y., Kim, H., Jeun, S.S., Rha, S.J., Kim, Y.H., Ko, Y.J., Won, J., Lee, K.H., Rha, H.K. and Wang, Y.P. (2002) Inhibition of NF-kappaB activation by Merlin. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1295-1302.
- 24) Kim, J.Y., Kwak, N.J., Lee, J.Y., Choi, B.H., Lim, Y., Ko, Y.J., Kim, Y.H., Huh, P.W., Lee, K.H., Rha, H.K. and Wang, Y.P. (2004) Merlin neutralizes the inhibitory effect of Mdm2 on p53. *J Biol Chem* 279, 7812-7818.
- 25) Kong, D., Piao, Y.S., Yamashita, S., Oshima, H., Oquma, K., Fushida, S., Fujimura, T., Minamoto, T., Seno, H., Yamada, Y., Satou, K. Ushjima, T., Ishikawa, T.O. and Oshima, M. (2012) Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene* 31, 3949-3960.
- 26) Kopnin, B.P. (2000) Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc.) Rev.* 65, 2-27.
- 27) Lee, K.H., Chen, Y.L., Yeh, S.D., Hsiao, M., Lin, J.T., Goan, Y.G. and Lu, P.J. (2009) MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of AKT phosphorylation. *Oncogene* 28, 3360-3370.

- 28) Lenarduzzi, M., Hui, A., Alajez, N., Williams, J. and Liu, F.F. (2012) MicroRNA 193b enhances head and neck cancer progression through downregulation of neurofibromatosis 1. 8th conference on head and neck cancer. Oral presentation.
- 29) Lewis, B. P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Burge C.B. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- 30) Li, W., You, L., Cooper, J., Schiavon, G., Pepe-Caprio, A., Zhou, L., Ishii, R., Giovanninni, M., Hanemann, C.O., Long, S.B., Erdjument-Bromage, H., Zhou, P., Tempst, P., Giacotti, F.G. (2010) Merlin/NF2 suppresses tumorigenesis by inhibiting the E3 ubiquitin ligase CRL4 (DCAF1) in the nucleus. *Cell* 140, 447 -490.
- 31) Liang, Z., Wu, H., Xia, J. L., Zhang, Y., Huang, K., Wagar, N., Yoon, Y., Cho, H.T., Scala, S. and Shim, H. (2010) Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochem Pharmacol* 79, 817-824.
- 32) Lu, Z.J., Liu, S.Y., Yao, Y.Q., Zhou, Y.J., Zhang, S., Dai, L., Tian, H.W., Zhou, Y., Deng, H.X., Yang, J.L. and Lou, F. (2011) The effect of miR-7 on behavior and global protein expression in gliomal cell lines. *Electrophoresis* 32, 3612-3620.
- 33) Lukiw, W.J., Zhao, Y. y Cui, J.G. (2008) An NF-KappaB sensitive microRNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem* 283, 31315-31322.
- 34) Martínez, J.D., Taylor, M., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A. and Gerner, E.W. (2003). Molecular biology of cancer. Chapter one. Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery. John Wiley & Sons, 6ta ed.15, 1-50.
- 35) McClatchey, A. and Giovannini, M. (2005) Membrane organization and tumorigenesis- the NF2 tumor supresor, Merlin. *Genes Dev Rev.* 29, 2265-2277.
- 36) Mei, J., Bachoo, R. y Zhang, C.L. (2011) MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1. *Mol Cell Biol* 31, 3584-3592.
- 37) Melo, S.A. and Esteller, M. (2011) Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS let Rev.* 585, 2087-2099.
- 38) Meza-Sosa K.F., Valle-García, D. Pedraza-Alva, G. and Pérez-Martínez, L.(2012) Role of microRNAs in central nervous system development and pathology. *J Neurosci Res Rev.* 90, 1-12.
- 39) Montavani, A., Allavena, P., Sica A. and Balkwill, F. (2009) Cancer- related inflammation. *Nature Rev.* 454, 436-444.
- 40) Nass, D., Rosenwald, S., Meiri, E., Gilad, S., Tabibian, H., Schlosberg, A., Kuker, H. y Rosenfeld N. (2009) Mir-92b and miR-9/9 are specifically expressed in Brain Primary Tumors and can be used to differentiate primary from mestatatic brain tumors. *Brain Pathol* 19, 375-383.

- 41) Navarro, A., Campayo, M., Vinolas, V., Ciria, T., Diaz, R.M., Marrades, R.M., Molins, L., Ramírez, J. and Monzo, M. (2011) SOX2-related microRNAs, miR-145 ad miR-367, as prognostic markers of time to recurrence (TTR) in surgically resected non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p). *J Clin Oncol*, 29.
- 42) Okada, T., You, L. and Giancotti, F.G. (2007) Shedding light on Merlin´s wizardry. *Trends Cell Biol* 17, 222-229.
- 43) Pardee, A.B., Stein, G.S. and Bronstein, E.A. (2008) what goes wrong in cancer, in the biology and treatment of cancer: Understanding cancer. John Wiley & Sons.USA. 23-24.
- 44) Pelengaris, S. and Khan, M. (2009) The molecular biology of cancer. John Wiley & Sons. UK. Ed 2, 3- 4, 63-65.
- 45) Pitot, H.C. (1993) the molecular biology of carcinonegesis. *Cancer Rev.* 72, 962-970.
- 46) Qu, S., Yao, Y., Shang, C., Xue Y., Ma J. (2012) MicroRNA-330 is an oncogenic factor in glioblastoma cells by regulating SH3GL2 gene. *PLoS ONE* 9, e46010, 1-8.
- 47) Ruan, K., Fang, X. and Ouyang, G. (2009) MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett Rev.* 285,116-126.
- 48) Ruddon, R.W. (2007) Cancer biology. Oxford University Press. USA. Ed4, 4.
- 49) Rusca, N. and Monticelli, S. (2011) MiR-146a in inmunity and disease. *Mol Biol Inter Rev.* 2011, 1-7.
- 50) Scoles, D.R., Nguyen, V.D., Qin, Y., Sun, C-X., Morrison, H., Gutmann, D.H. and Pulst, S-M. (2002) Neurofibromatosis 2(NF2) tumor suppressor schwannomin and its interacting protein HRS regulate STAT signaling. *Hum Mol Genet* 11, 3179-3189.
- 51) Scoles, D.R. (2007) The Merlin interacting proteins reveal multiple targets for NF2 therapy. *Biochim Biophys Acta Rev.* 1785, 32-54.
- 52) Sharma, S., Kelly, T.K. and Jones, A.P. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcin Rev.* 31, 27-36.
- 53) Shaw, R.J., Paez, J.G., Curto, M., Yaktine, A., Pruitt, W.M., Saotome, I., O´Bryan, J.P., Gupta, V. Rather, N., Der, C.J., Jacks, T. and MacClatchey AI. (2001) The NF2 tumor suppressor, Merlin functions in RAC-dependent signaling. *Dev Cell* 1, 63-72.
- 54) Stamenkovic, I. and Yu, Q. (2010) Merlin, a “magic” linker between the extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation and survival. *Curr Protein Pept Sci Rev.* 11, 471-484.
- 55) Sun, S.G., Zheng, B., Han, M., Fang X.M., Li, H.X., Miao, S.B., Su, M., Han, Y., Shi, H.J. and Wen, J.K.(2010) MiR-146a and Kruppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. *EMBO Rep* 12, 56-62.
- 56) Sun, W. and Yang, J. (2010) Functional mechanisms for the human tumor supressors. *J Cancer Rev.* 1, 136-140.

- 57) Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J. and Baltimore, D. (2006) NF-kappaB- dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci*, 103, 12481–12486.
- 58) Tang, X., Jang, S-W., Wang, X., Liu, Z., Bahr, B.M., Sun, S-Y., Brat, D., Gutmann, D.H. and Ye, K. (2007) AKT phosphorylation regulates the tumour-suppressor Merlin through ubiquitination and degradation. *Nat Cell Bio* 9, 1199-1207.
- 59) Visvader, J.E. (2011) Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
- 60) Vogelstein, B. and Kinzler K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med Rev*. 10, 789-799.
- 61) Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Roldo, C., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchiones, A., Negrini, M., Harris, C.C. and Croce, C.M. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA Rev*. 103, 2257-2261.
- 62) Williams, E., Perry, M.M., Moschos, S.A., Lerner-Svensson, H.M. and Lindsay, M.A. (2008) Role de miRNA-146a in the regulation of innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans Rev*. 36, 1211-1215.
- 63) Xiao, G.H., Gallagher, R., Shetler, J., Skele, K., Altomare, D.A., Pestell, R.G., Jhanwar, S. and Testa, J.R. (2005) The NF2 tumor suppressor gene product, Merlin, inhibits cell proliferation and cell cycle progression by repressing cyclin D1 expression. *Mol Cell Biol* 25, 2384-2394.
- 64) Xie, C., Huang, H., Sun, K., Guo, Y., Hamblin, M., Ritchie, R.P., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, J. and Che, Y.E. (2011) MicroRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing Kruppel-like Factor 4. *Stem Cells Dev* 20, 205-2010.
- 65) Xiong, S., Zheng, Y., Jiang, P., Liu, R., Liu, X. and Chu, Yu. (2011) MicroRNA-7 inhibits the growth of human non small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2. *Int J Biol Sci* 7, 805-814.
- 66) Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G.A., Liu, G.C. y Harris C.C. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189-198.
- 67) Zhang, L., Liu, Y., Song, F., Zheng, H., Hu, L., Liu, P., Hao, X., Zhang, W. and Chen, K. (2011) Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 13653-13658.
- 68) Zhang, H., Zuo, Z., Lu, X., Wang, H. and Zhu Z. (2012) Mir-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 27, 594-598.
- 69) Zhao, B., Li, L., Lei, Q. and Guan, K.L. (2011) The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes and Dec Rev*. 24, 882-874.

70) Zhou, T., Zhang, G., Liu, Z., Xia, S. and Tian H. (2012) Overexpression of miR-92a correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 7, 19-24.

Referencias Web u obtenidas de internet:

- **OMS, 2008-1^{Web}**: <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html>
- **INEGI, 2007-2^{Web}**: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/>
- **INEGI,2010-3^{Web}**: <http://www.ceprec.org/CancerMx2010.pdf>
- **ACS-4^{Web}**: <http://www.cancer.org/Cancer/CancerCauses/OtherCarcinogens/GeneralInformation/aboutCarcinogens/known-and-probable-human-carcinogens>
- **Atlas Genetic Oncology-5^{Web}**: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MIRN711D44356ch9q21.html>
- **PITA-6^{Web}**: <http://www.ceprec.org/CancerMx2010.pdf>
- **Target Scan Human-7^{Web}**: <http://www.targetscan.org/>
- **miRanda-8^{Web}**: <http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do>