



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PAPEL DE LOS miRNAs TUMORALES EN EL FENÓMENO PRO-INFLAMATORIO  
DE LA MÉDULA ÓSEA LEUCÉMICA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. JUSSARA RIOS DE LOS RIOS RESÉNDIZ**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO**

**Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas  
Centro Médico Nacional Siglo XXI**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**DR. FÉLIX RECILLAS TARGA**

**Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**Ciudad de México. Marzo, 2017.**



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.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio a cargo de la Dra. Rosana Pelayo Camacho de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas de la UMAE Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en colaboración con el laboratorio del Dr. Muller Fabbri en el Children's Center for Cancer and Blood Diseases del Children's Hospital Los Angeles y el Chemokine Biology Research Laboratory a cargo del Dr. Eduardo García Zepeda del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutela de la Dra. Rosana Pelayo Camacho.

El Comité Tutor que asesoró esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Eduardo García Zepeda	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Rosana Pelayo Camacho	Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, CMN SXXI, IMSS

El proyecto fue apoyado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número de registro R-2014-785-041 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT CB-2010-01-152695).

Los estudios de Maestría de la alumna Jussara Rios de los Rios Reséndiz fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro 560400 y por el Instituto Mexicano del Seguro Social con número de matrícula 99096821. La realización de una estancia en el Children's Hospital Los Angeles fue posible gracias al apoyo otorgado por la Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa, con el número de convenio 271609.

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Pérez Martínez Leonor
Vocal	Dr. Ortiz Navarrete Vianney
Vocal	Dra. Molina Hernández Anayansi
Vocal	Dr. Pedraza Alva Gustavo
Secretario	Dra. Chávez González María Antonieta

# CONTENIDO

<b>I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>II. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>III. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
1. Hematopoyesis .....	5
2. Linfopoyesis .....	7
3. Regulación de la diferenciación linfoide .....	8
4. Microambiente hematopoyético .....	9
5. Leucemia Linfoblástica Aguda.....	12
6. Alteraciones microambientales en neoplasias hematológicas malignas .....	14
7. miRNAs.....	17
7.1 miRNAs en hematopoyesis .....	17
7.2 miRNAs en neoplasias hematológicas malignas .....	19
<b>IV. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>V. HIPÓTESIS .....</b>	<b>23</b>
<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
1. Objetivo general.....	23
2. Objetivos particulares.....	23
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
1. Análisis <i>in silico</i> .....	24
2. Síntesis secuencias miRNAs .....	24
3. Líneas celulares.....	25
4. Obtención de células mononucleares.....	25
5. Inmunoprecipitación del Receptor tipo Toll 8 (TLR8) .....	25
6. Tratamiento celular con miRNAs / exosomas .....	26
7. Inmunofluorescencia para NF-kB .....	27
8. Producción de citocinas .....	27
9. Purificación de exosomas .....	27
10. Identificación de miRNAs por RT-PCR .....	28
11. Ensayo con Reportero de NF-kB.....	28
12. Ensayo de proliferación .....	29
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
1. Análisis <i>in silico</i> de la expresión de miRNAs en LLA .....	30
2. Caracterización de exosomas producidos por líneas celulares de LLA .....	30
3. Exosomas de LLA activan el factor de transcripción NF-kB .....	31
4. Secreción de microRNAs candidatos a ser ligandos agonistas de TLR8 en exosomas de células leucémicas.....	34
5. Los miRNAs secretados por blastos leucémicos en exosomas unen TLR8 e inducen la activación del factor de transcripción NF-kB .....	35
6. Los miRNAs secretados por blastos leucémicos de LLA inducen la producción de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento en células mononucleares.....	39

<b>7. Los factores solubles producidos por las células hematopoyéticas tras la estimulación con miRNAs aumentan la frecuencia de una población primitiva CD34<sup>High</sup> e inducen su proliferación .....</b>	<b>40</b>
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>X. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>50</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>XIII. ANEXO .....</b>	<b>59</b>

## I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGO	Argonauta	FLT3	<i>Fms related tyrosine kinase 3</i> Factor estimulante de colonias de granulocitos, del inglés <i>Granulocyte-Colony stimulating factor</i>
Bcl11a	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 11A</i>	G-CSF	
CCR9	<i>C-C motif chemokine receptor 9</i>	GMP	Progenitor de Granulocitos y Monocitos, del inglés, <i>Granulocyte-monocyte progenitor</i>
Células CAR	Células reticulares abundantes en CXC12, del inglés, <i>CXCL12-abundant reticular cells</i>	HSCs	Células Troncales Hematopoyéticas, del inglés <i>Hematopoietic stem cells</i>
CLP	Progenitor linfoide común, del inglés <i>Common lymphoid progenitor</i>	Id2	<i>Inhibitor of DNA Binding 2</i>
CMP	Progenitor Mieloide Común, del inglés <i>Common myeloid progenitor</i>	IGFBP2	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>
CSC	Célula troncal cancerosa, del inglés, <i>Cancer Stem Cell</i>	IKZF1	<i>Ikaros family zinc finger 1</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor 4</i>	IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño, del inglés, <i>Damage-associated molecular patterns</i>	IL-7	Interleucina 7
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>	IL-10	Interleucina 10
DLL1	<i>Delta-like 1</i>	ILC	Células linfoides innatas, del inglés, <i>Innate Lymphoid Cells</i>
E4BP4	<i>E-4 Binding protein 4</i>	IRF	Factores reguladores de interferón, del inglés, <i>Interferon regulatory factors</i>
EBF1	<i>Early B-cell factor 1</i>	JAK/ST AT	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
EGF	Factor de crecimiento epidermal, del inglés, <i>Epidermal growth factor</i>	LIC	Célula iniciadora de la leucemia, del inglés, <i>Leukemia Initiating Cell</i>
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2, del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>	LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica Células troncales hematopoyéticas de largo plazo, del inglés, <i>Long term –</i>	Pax5	<i>Paired Box 5</i>
LT-HSCs	<i>haematopoietic stem cells</i>	PI	Yoduro de propidio, del inglés <i>Propidium Iodide</i>

MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos, del inglés, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>	PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones, del inglés <i>Pattern recognition receptors</i>
MDP	Progenitor de Macrófagos y Células Dendríticas, del inglés <i>Macrophage-DC progenitor</i>	RAG	<i>Recombination Activating Gene</i>
MEP	Progenitor de Megacariocitos y Eritrocitos, del inglés <i>erythro-megakaryocyte progenitor</i>	RISC	Complejo silenciador inducido por ARN, del inglés <i>RNA Induced Silencing Complex</i>
miRNA	microRNA	RUNX1	<i>Runt related transcription factor 1</i>
MLP	Progenitor Multilinfoide, del inglés <i>Multilymphoid progenitor</i>	SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
MO	Médula ósea	SCU	Sangre de cordón umbilical
MPP	Progenitor Multipotente, del inglés <i>Multipotent progenitor</i>	SDF-1	Factor derivado de células estromales 1, del inglés <i>Stromal Cell Derived Factor 1</i> . También llamado CXCL12
mRNA	RNA mensajero	SON	<i>Spindle-shaped N-cadherin<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> osteoblastic cells</i>
MVBs	Cuerpos multivesiculares, del inglés <i>Multivesicular Bodies</i>	STAT5	<i>Signal transducers and activators of transcription 5</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary-response protein 88</i>	ST-HSCs	Células troncales hematopoyéticas de corto plazo, del inglés <i>Short term – haematopoietic stem cells</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor- kB</i>	TNF-a	Factor de Necrosis Tumoral a, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i>
NK	Células Asesinas Naturales, del inglés <i>Natural Killer</i>	TLR	Receptor tipo Toll, del inglés <i>Toll Like Receptor</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés, <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>		

## II. RESUMEN

Las leucemias agudas constituyen la segunda causa de muerte en la infancia y un problema de salud pública en México y el mundo. Hallazgos recientes de nuestro laboratorio indican la alta producción de factores pro-inflamatorios en la médula ósea de pacientes que debutan con leucemia linfoblástica aguda (LLA), en ausencia de un mecanismo inductor aparentemente asociado a infección clínica. El reciente descubrimiento del papel de algunos miRNAs provenientes de tejidos tumorales como ligandos de receptores tipo Toll (del inglés, TLR), abre la posibilidad de su participación en el origen y mantenimiento de microambientes tumorales pro-inflamatorios. El objetivo de este trabajo fue determinar la posible contribución de los precursores leucémicos de la médula ósea en la regulación de elementos microambientales pro-inflamatorios a través de miRNAs que funcionen como ligandos de TLR8. Tras seleccionar por análisis *in silico* tres miRNAs altamente producidos en LLA (miR-199b, miR-181b y miR-146a) como candidatos agonistas de TLR8, éstos fueron sintetizados y cultivados con células mononucleares hematopoyéticas, demostrando su capacidad de inducir la fosforilación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la producción de elevadas cantidades de G-CSF, IL-10, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo de activación. Notablemente, cuando las células provenientes de aspirados de médula ósea de pacientes con LLA fueron expuestas al contenido de dichos sobrenadantes, éstos indujeron un aumento en la proliferación de una población primitiva que expresa CD34<sup>High</sup>.

Los tres miRNAs en estudio demostraron ser secretados naturalmente por las células leucémicas en exosomas, además de funcionar como ligandos agonistas de TLR8 y activar su vía de señalización, resultando en la substancial inducción de factores pro-inflamatorios.

En conclusión, hemos identificado a los microRNAs miR-199b, miR-181b y miR-146a como componentes tumorales que potencialmente contribuyen al mantenimiento y/o progresión de la enfermedad a través de vías de señalización pro-inflamatorias que inducen la activación de células progenitoras hematopoyéticas.



## ABSTRACT

Acute leukemias are the second leading cause of death in childhood and are a public Health problem in Mexico and worldwide. Recent findings in our laboratory indicate the abnormally high production of microenvironmental pro-inflammatory elements within the bone marrow (BM) from patients who debut with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in the absence of apparent clinical infection-associated mechanisms. The recent discovery of the role of some miRNAs from tumor tissues as agonists of Toll-like receptors (TLR) opens the possibility that microRNAs co-participate in the induction and maintenance of pro-inflammatory tumor microenvironments.

The aim of this study was to determine the possible contribution of bone marrow leukemic precursors in the regulation of pro-inflammatory microenvironmental elements through miRNAs that function as TLR8 ligands.

Synthetic miRNAs that are reported to be highly produced by ALL cells and were *in silico* identified as potential candidates for TLR8 ligation (miR-199b, miR-181b and miR-146a), were cultured with hematopoietic mononuclear cells, demonstrating their ability to induce phosphorylation of the transcription factor NF- $\kappa$ B and the production of high amounts of G-CSF, IL-10, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in culture supernatants. Notably, when cells from bone marrow aspirates from patients with ALL were exposed to the content of such supernatants, it induced substantial increases in the proliferation of a primitive population expressing CD34<sup>Hi</sup>. The three miRNAs under study were naturally secreted in exosomes by leukemic cells, and showed their functional capabilities as TLR8 agonist ligands by activating the TLR signaling pathway, resulting in the substantial induction of pro-inflammatory factors.

In conclusion, we have identified the microRNAs miR-199b, miR-181b and miR-146a as tumor components that potentially contribute to maintenance and/or progression of ALL by switching on pro-inflammatory pathways that further induce activation of hematopoietic progenitor cell populations.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 1. Hematopoyesis

La producción equilibrada y el reabastecimiento de todas las células de la sangre a lo largo de la vida está a cargo de las células troncales hematopoyéticas (HSCs, del inglés, *Hematopoietic stem cells*), las cuales residen principalmente en el hígado durante la etapa fetal y en la médula ósea en la etapa adulta<sup>1</sup>. Las HSCs corresponden al 0.01% de las células nucleadas presentes en la médula ósea y presentan dos características principales: su capacidad de autorenovación y su potencial de diferenciación en las múltiples estirpes celulares sanguíneas (multipotencialidad)<sup>2</sup>. Bajo condiciones de homeostasis, la mayoría de estas células se encuentran en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular y se dividen lenta e intermitentemente<sup>3</sup>. La entrada y salida de este estado es crucial para asegurar la producción del número correcto de células hematopoyéticas, procesos que se ven modificados bajo condiciones de estrés o durante la recuperación del tratamiento con quimioterapia, tras los que se induce la proliferación y diferenciación<sup>4</sup>. La hematopoyesis está organizada como un sistema jerárquico derivado de una célula primitiva común que es la HSC, cuya gradual diferenciación es concomitante a la pérdida de su multipotencialidad y al compromiso de linaje y adquisición de funciones especializadas<sup>4,5</sup>. La estructura jerárquica del sistema hematopoyético ha podido conocerse a través del aislamiento de subpoblaciones basado en marcadores celulares y en el análisis de sus potenciales de diferenciación, de acuerdo a lo cual se han identificado cinco compartimientos: el de las células troncales, el de los progenitores multipotenciales, el de los progenitores oligopotenciales, el de los precursores y el de las células maduras<sup>6</sup> (Figura 1).

Fenotípicamente, la población de HSC se encuentra enriquecida en la fracción Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> que presenta la capacidad de reconstituir a largo plazo el sistema hematopoyético. En humanos, el antígeno CD34 ha resultado el principal marcador para las HSC y progenitores multi y oligopotenciales. De las células hematopoyéticas en la médula ósea (MO), entre el 0.5-5% expresan CD34.<sup>5,6</sup>

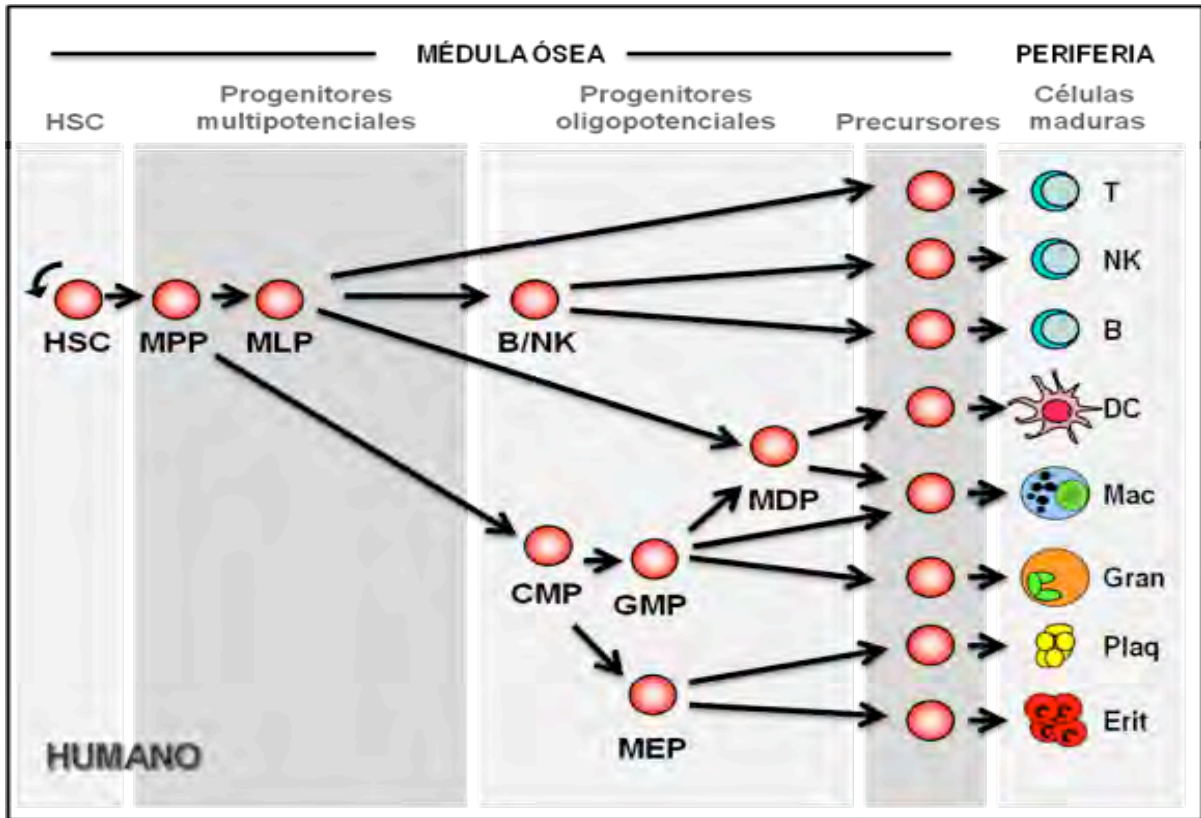


Figura 1. Estructura jerárquica del sistema hematopoyético. A partir de las células troncales hematopoyéticas con capacidad de autorenovación y multipotencialidad se generan gradualmente los progenitores hematopoyéticos multipotenciales que han perdido la capacidad de autorenovarse. Posteriormente, se originan los progenitores oligopotenciales que se diferencian a precursores comprometidos hacia un linaje, y finalmente las células maduras que serán exportadas a la periferia. Célula troncal hematopoyética (HSC), Progenitor Multipotente (MPP, del inglés *Multipotent progenitor*), Progenitor Multilinfoide (MLP, del inglés *Multilymphoid progenitor*), Progenitor Mieloide Común (CMP, del inglés *Common myeloid progenitor*), Progenitor de Megacariocitos y Eritrocitos (MEP, del inglés *erythro-megakaryocyte progenitor*), Progenitor de Granulocitos y Monocitos (GMP, del inglés *Granulocyte-monocyte progenitor*), Progenitor de macrófagos y células dendríticas (MDP, del inglés *Macrophage-DC progenitor*), Progenitor de células B y NK (B/NK). Figura tomada de <sup>6</sup>.

Las HSCs dan origen a los progenitores multipotenciales que conforman el segundo compartimento y han perdido la capacidad de autorenovación, aunque conservan sus potenciales de diferenciación múltiple. El compartimento de los progenitores oligopotenciales incluye a aquéllos que han aumentado su capacidad de proliferación pero sus potenciales de diferenciación se restringen a 2 o 3 tipos celulares. Estos progenitores dan origen a las células precursoras comprometidas a linaje, que se han vuelto unipotenciales y tienen alta capacidad proliferativa. Las células en este compartimento constituyen más del 90% de las células

hematopoyéticas residentes en la médula ósea. Finalmente, ellas producen las poblaciones hematopoyéticas maduras<sup>6</sup> que se dividen en dos grandes grupos: mieloide y linfoide. El primer grupo incluye a los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos y megacariocitos, mientras que el segundo grupo se compone de linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales (NK, del inglés, *Natural Killer*) y más recientemente descritas las células linfoides innatas<sup>1,2</sup>. El programa de diferenciación de las células dendríticas puede ser activado por la vía linfoide o mieloide<sup>1</sup>.

## 2. Linfopoyesis

El desarrollo linfoide ocurre a través de etapas críticas de diferenciación controladas por factores de transcripción y señales microambientales que culminan en la restricción funcional de las células maduras<sup>6</sup>. Es un proceso dinámico y complejo, en el que la diferenciación de los progenitores, en términos de fenotipo de superficie y expresión de genes funcionalmente importantes, comienza a ser activada mucho antes de que el compromiso sea completado<sup>1</sup>. Los modelos en ratón, donde se ha demostrado que la especificación linfoide inicia en los progenitores linfoides multipotentes (LMPP, del inglés, *Lymphoid-primed multipotent progenitors*)<sup>7</sup>, han permitido identificar a los progenitores linfoides tempranos (ELP, del inglés, *Early lymphoid progenitors*) con la capacidad de diferenciarse hacia células T, B, NK, células dendríticas convencionales (cDC, del inglés *conventional Dendritic cells*), células dendríticas plasmacitoides (pDC, del inglés *plasmacytoid Dendritic cells*) y células dendríticas asesinas productoras de interferón (IKDC, del inglés, *Interferon-producing killer dendritic cells*)<sup>8</sup>. Los ELP originan a los progenitores linfoides comunes (CLP, del inglés, *Common lymphoid progenitors*)<sup>6</sup>.

En el ser humano se ha identificado como el progenitor linfoide más temprano al progenitor multilinfoide (MLP), que fenotípicamente se caracteriza con los marcadores Lin-CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-/lo</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+4</sup> y puede dar origen a todas las células de linaje linfoide y algunas células del linaje mielo-monocítico, pero carece de potencial eritroide y granulocítico<sup>9</sup>. Las células con fenotipo Lin-CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>, que se diferencian principalmente a células B y NK,

son consideradas como la contraparte del CLP. Siguiendo en la vía de diferenciación, los progenitores comprometidos a linaje linfoide dan origen a las células pro-B CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, posteriormente éstas a las células pre-B CD34<sup>-</sup>CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> de las cuales surgirán células B inmaduras que irán a la periferia para colonizar tejidos linfoides<sup>10</sup>. Durante este proceso, las señales del IL-7 son críticas para la actividad de los factores de transcripción involucrados en el desarrollo temprano de las células B<sup>4,6</sup>, mientras que el desarrollo de las células NK es críticamente dependiente de interleucina-15<sup>6</sup>. Por su parte, los linfocitos T terminan su diferenciación en el timo, el cual se ha observado que puede ser colonizado por múltiples progenitores, entre ellos el LMPP/ELP es el que exhibe mayor robustez, evento para el cual es indispensable la expresión del receptor de quimiocina CCR9 en los progenitores<sup>1,6</sup>.

### **3. Regulación de la diferenciación linfoide**

El desarrollo hematopoyético es un proceso altamente controlado por factores de transcripción regulados por elementos intrínsecos genéticos y epigenéticos, así como señales externas provenientes del microambiente.

En el desarrollo temprano del linaje B es esencial el papel de IL-7, ya que activa la vía JAK-STAT (Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription) , siendo STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) el principal mediador en esta etapa<sup>4</sup>. Ikaros y PU.1 también tienen un papel relevante en los eventos tempranos de la diferenciación linfopoyética, su deficiencia ocasiona que *Flt3* no sea expresado adecuadamente y un bloqueo en la diferenciación de las células B y T. Posteriormente *Bcl11a* es requerido para el desarrollo de las células pre-proB<sup>6</sup>. E2A, EBF1 y PAX5 también son críticos, ya que la pérdida de E2A y EBF1 bloquea la entrada al linaje B. E2A es crucial para la activación de RAG y sus productos regulan la expresión de *Pax5*, el cual a su vez regula la expresión de genes específicos de células B como CD19<sup>1</sup>. PAX5 está involucrado en que se lleve a cabo la recombinación VDJ, la pérdida de este factor ocasiona la diferenciación hacia otros linajes, ya que además de ser regulador positivo de genes específicos de células B, también actúa como represor de genes que no corresponden al linaje

B. E2A, PAX5, IKZF1 y RUNX1 son también responsables de la expresión de las recombinasas RAG, requeridas para el rearreglo de inmunoglobulinas<sup>6</sup>.

Por otro lado, en cuanto a la diferenciación linfoide de células NK, que recientemente han sido incluida dentro de la clasificación de las ILCs (células linfoides innatas, del inglés, Innate Lymphoid Cells) emergentes de CLPs Id2<sup>+10</sup>, la expresión del factor de transcripción E4bp4 en la etapa de CLP es esencial para su diferenciación, ya que regula la expresión de los factores de transcripción Eomes e Id2.<sup>11</sup> De las células T, su producción depende de la colonización del timo por progenitores tempranos donde el factor GATA3 es esencial para el arreglo apropiado de genes del receptor de células T<sup>6,10</sup>.

#### **4. Microambiente hematopoyético**

La hematopoyesis inicia en la médula ósea donde residen las HSCs y progenitores hematopoyéticos, que no existen como entidades aisladas, sino que están rodeadas de diferentes tipos celulares: células mesenquimales, osteoblastos, células endoteliales, células del sistema inmunológico, adipocitos, inervación del sistema nervioso simpático. Las células presentes en la médula ósea interactúan y tienen diversos tipos de comunicación entre ellas: interacción célula-célula, comunicación intercelular a través de factores solubles (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento) y a través de la secreción de microvesículas. Todos estos elementos, importantes para la fina regulación del proceso hematopoyético, conforman el microambiente de la médula ósea, en la cual se pueden distinguir al menos 3 tipos diferentes de nichos que dan soporte a las células troncales y progenitores hematopoyéticos y les proveen de señales regulatorias esenciales para su mantenimiento, proliferación y diferenciación<sup>12</sup>.

El nicho endosteal está constituido principalmente por osteoblastos que residen en la superficie del endosteo en una zona hipóxica de la médula ósea. También se ha identificado en este nicho la presencia de células SNO (del inglés, *Spindle-shaped N-cadherin<sup>+</sup>CD45 osteoblastic cells*) y de osteoclastos que reabsorben la matriz mineralizada del hueso<sup>13</sup>. La primera evidencia que sugirió la participación de los osteoblastos en hematopoyesis fue que éstos estimulan la

proliferación de células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> *in vitro*<sup>14</sup>. Posteriormente se reportó que la delección de osteoblastos provoca la movilización de HSCs y progenitores hacia la periferia y que un mayor número de osteoblastos correlaciona con un mayor número de HSCs *in vivo*<sup>12</sup>. La activación de los osteoblastos a través sus receptores PPR produce un aumento en la producción del ligando de Notch Jagged1 por parte de los osteoblastos y la consiguiente activación de Notch 1 en las células hematopoyéticas, lo cual correlacionó con un aumento en el número de HSCs<sup>15</sup>. Estas células producen moléculas que se sabe pueden estar relacionadas con la retención de las HSCs y mantenimiento de su estado quiescente como SDF-1 (del inglés, Stromal Cell Derived Factor 1), N-cadherina, Angiopoyetina-1, trombopoyetina y SCF (del inglés, Stem Cell Factor)<sup>12</sup>. Cabe mencionar que el papel de los osteoblastos en la regulación de las HSCs, aún es controversial. En los modelos donde existe un incremento de número de osteoblastos correlacionan con un aumento de HSCs, sin embargo, en los modelos donde los osteoblastos son eliminados, las HSCs disminuyen pero no desaparecen<sup>16</sup>, lo que podría indicar que además otros elementos están involucrados en su regulación. Morrison et al<sup>17</sup>. crearon un modelo de delección condicional de SCF en diferentes poblaciones presentes en la médula ósea para evaluar su efecto en el comportamiento de la población de HSCs y encontraron que la delección de SCF en los osteoblastos no redujo la frecuencia de células HSCs en la médula ósea y estas células presentaban capacidad normal de reconstitución hematopoyética. En cambio, la falta de producción de SCF por parte de las células endoteliales sí redujo significativamente la frecuencia de HSCs en la médula ósea y afectó su capacidad de reconstitución<sup>17</sup>.

Las células endoteliales que forman los sinusoides vasculares presentes en la médula ósea son el principal componente de otro de los nichos, llamado nicho vascular o nicho endotelial. Se han localizado HSCs asociadas a este endotelio y en modelos de ratón en donde la regeneración de las células endoteliales sinusoidales está inhibida se ha observado una pobre reconstitución hematopoyética, por lo que se ha considerado que estas células son importantes para la regulación de las células troncales hematopoyéticas<sup>12</sup>. Las células endoteliales son capaces de dar soporte a la hematopoyesis a través de la expresión de receptores de superficie

como E-selectina, así como por el aumento de factores como FGF2 (del inglés, *Fibroblast Growth Factor 2*), DLL1 (del inglés, *delta-like 1*), IGFBP2 (del inglés, *insulin-like growth factor-binding protein 2*), angiopoietina 1, DHH (del inglés, *desert hedgehog*) and EGF (del inglés, *epidermal growth factor*)<sup>18</sup>.

El tercer nicho de la médula ósea es el nicho reticular/perivascular, conformado principalmente por células perivasculares nestina<sup>+</sup> y células CAR<sup>12</sup> (del inglés, *CXCL12-abundant reticular cells*), que se han identificado como progenitores osteoadipogénicos que se requieren para la proliferación de células troncales hematopoyéticas, células B y progenitores eritroides, así como para el mantenimiento de las HSCs<sup>14</sup>. Se ha identificado que estas células se localizan alrededor del endotelio que conforma los sinusoides presentes en la médula ósea<sup>12,18</sup>. SDF-1 es una quimiocina que ha demostrado tener un papel crucial en la hematopoyesis, para el *homing* y mantenimiento de las células troncales hematopoyéticas<sup>14</sup>. La delección de esta quimiocina o de su receptor CXCR4 (del inglés, *C-X-C chemokine receptor 4*) provocan el agotamiento de las HSCs en la médula ósea<sup>19</sup>. SDF-1 es principalmente producida por las células estromales perivasculares y en menores niveles por las células endoteliales, osteoblastos y algunas células hematopoyéticas. Mediante la delección condicional por tipo celular de SDF-1 se mostró que el mantenimiento de las HSCs se relaciona con la secreción de esta quimiocina por las células perivasculares y células endoteliales, mientras que la delección en osteoblastos afectó principalmente la frecuencia de ciertos progenitores linfoides tempranos, pero no de las HSCs. Esto sugiere que las células troncales hematopoyéticas ocupan principalmente el nicho perivascular/reticular, mientras que los progenitores linfoides tempranos ocupan el nicho endosteal<sup>19</sup>. También se ha mostrado que las células perivasculares son las principales productoras de SCF, factor que ha sido identificado también como necesario para el mantenimiento de las HSCs<sup>17</sup>. La identificación de células troncales quiescentes en ausencia de células CAR ha dado pie a la propuesta de la existencia de una población de HSCs en estado latente que podría residir en la zona endosteal, mientras que otra población más activa de HSCs podría estar asociada con el endotelio y células CAR<sup>12</sup>. También se ha subclasificado a las células troncales hematopoyéticas en diferentes poblaciones de acuerdo a sus



patrones de reconstitución post-trasplante<sup>20</sup> o con base en su reconstitución hematopoyética si es de largo (LT-HSCs, del inglés, *long term – haematopoietic stem cells*) o corto plazo (ST-HSCs, del inglés, *short term – haematopoietic stem cells*), cuyos detalles de la relación de cada una de estas poblaciones con el microambiente aún están siendo dilucidados.

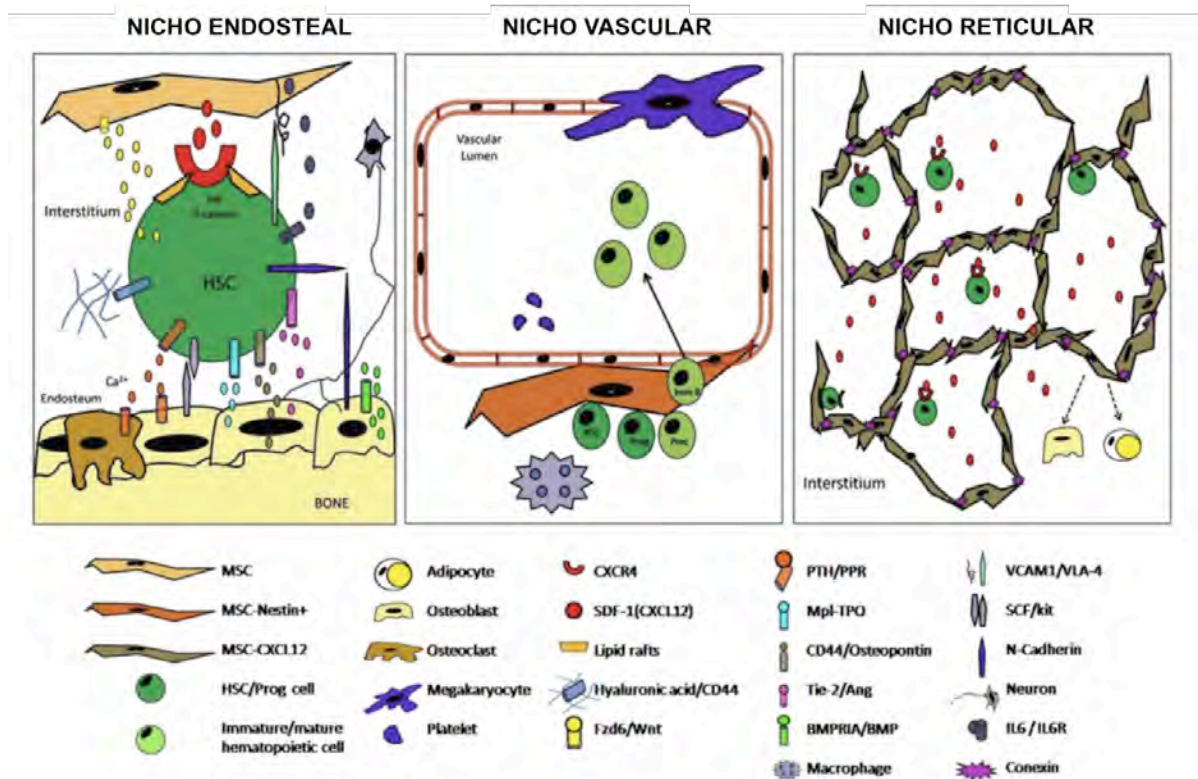


Figura 2. Nichos hematopoyéticos presentes en la médula ósea. El nicho endosteal formado principalmente por osteoblastos, osteoclastos y células SNO, mientras que el nicho vascular está principalmente conformado por células endoteliales y perivasculares mesenquimales Nestina+, y en el nicho reticular se encuentran mayoritariamente células CAR. Cada uno de los nichos aportan señales para la fina regulación del mantenimiento, proliferación y diferenciación de las células troncales y progenitores hematopoyéticos. Figura tomada de <sup>12</sup>.

## 5. Leucemia Linfoblástica Aguda

La desregulación del proceso hematopoyético puede dar origen a malignidades hematológicas, las cuales representan entre el 40-60% de los tumores que se presentan en los primeros 15 años de vida<sup>21</sup>. Las leucemias agudas se caracterizan

por la producción descontrolada de células precursoras hematopoyéticas de la estirpe mieloide o linfoide<sup>22</sup>, siendo de entre ellas la Leucemia Linfoblástica Aguda la más frecuente en la población infantil a nivel mundial, con una incidencia de 50 casos por millón<sup>21</sup>. Tiene un pico de incidencia entre los 2-6 años y otro más de los 8-10 años<sup>23</sup>. De entre las LLA, las de inmunofenotipo de precursores de células B (definidas por la expresión de CD19 y CD10) son las más frecuentes con aproximadamente 85% de los casos, mientras que las de células T (que expresan CD2, CD7, CD5 o CD3) ocupan el 15% restante<sup>24</sup>. Esta enfermedad se ha identificado como un proceso aberrante de proliferación descontrolada de precursores de células linfoides<sup>24</sup>. Gracias a acercamientos mediante cultivos celulares, detección de características genotípicas en la población CD34<sup>+</sup> y datos de trasplante de células con fenotipo inmaduro capaces de reconstituir la leucemia en modelos de ratón, se ha sugerido que la LLA potencialmente inicia en poblaciones primitivas de la médula ósea<sup>12</sup>. Sin embargo, a diferencia del modelo jerárquico que se presenta en la leucemia mieloide aguda, en la LLA no se ha identificado una Célula Troncal Cancerosa (CSC, del inglés *Cancer Stem Cell*) que sea la responsable del origen y mantenimiento de la LLA; si no que aparentemente los diferentes estadios de diferenciación pueden funcionar como células Iniciadoras de la leucemia (LICs, del inglés *Leukemia Initiating Cells*), en las cuales hay un daño en el programa de diferenciación normal que conlleva a presentar cierta troncalidad y plasticidad<sup>25,10</sup>. El conocimiento alrededor de los mecanismos que dañan los programas tempranos de diferenciación linfoide está aún en progreso.

La leucemia se caracteriza por la activación de programas que llevan a un arresto en las vías de diferenciación, aumento en la proliferación, promoción de la auto-renovación, disminución en la tasa de apoptosis y mantenimiento de los telómeros, que llevan a la generación de clonas leucémicas de células inmaduras altamente proliferativas y con ventaja intrínseca de supervivencia<sup>4</sup>. La hipótesis de Greaves respecto al origen de la leucemia plantea la ocurrencia de múltiples hits carcinogénicos<sup>4</sup> que podrían consistir en la iniciación pre-natal de clonas leucémicas (probablemente debido a la existencia de translocaciones cromosómicas) seguidos de hits secundarios postnatales que pueden estar relacionados con mutaciones, infecciones u otras causas<sup>26</sup>. Anormalidades

citogenéticas se detectan en el 90% de los casos<sup>27</sup>, entre las que son frecuentes las translocaciones cromosómicas que resultan en la formación de proteínas de fusión con funciones alteradas y propiedades oncogénicas en pacientes con LLA<sup>10</sup>. La proteína de fusión ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) es resultado de la translocación t(12;21)(p12;q21), la cual está relacionada con buen pronóstico y rápida respuesta al tratamiento<sup>28</sup> que en el estudio más reciente realizado en México se encontró con una prevalencia del 7.4%<sup>29</sup>. La translocación t(9;22)(q34;q11) (cromosoma Ph) lleva a la expresión de BCR/ABL1 que lleva a la activación constitutiva de tirosin-cinasa con alteraciones de IKZF1 (Ikaros)<sup>10</sup>. Los rearrreglos MLL (del inglés, Mixed Lineage Leukemia) son translocaciones que involucran el gen *MLL* en el cromosoma 11q23, es mucho más frecuente en leucemia infantil que en adultos y se relaciona con mal pronóstico y resistencia a la terapia<sup>10,28</sup>. A pesar de que una serie de eventos genéticos o epigenéticos sean necesarios para iniciar el proceso oncogénico pueden no ser suficientes, se ha sugerido que se requiere un microambiente permisivo para el desarrollo tumoral<sup>30</sup>.

En cuanto al tratamiento, actualmente se usan agentes anti-neoplásicos que han demostrado alta eficiencia. A pesar de esto, escenarios tales como la resistencia a fármacos y el establecimiento de infecciones e inflamación, a menudo ponen en riesgo el éxito del tratamiento. Los mecanismos moleculares involucrados en estos fenómenos no han sido totalmente definidos, en parte porque se desconoce la contribución de factores microambientales intrínsecos y externos en la protección, el mantenimiento o la activación de los precursores leucémicos.

## **6. Alteraciones microambientales en neoplasias hematológicas malignas**

Las enfermedades hematológicas malignas, incluyendo el síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y las leucemias mieloides y linfoides, han mostrado, además de alteraciones en las células hematopoyéticas, anormalidades en células mesenquimales, en células endoteliales y en la matriz extracelular<sup>12</sup>. Existe evidencia creciente en leucemia de aberraciones microambientales que pueden tener un papel directo o indirecto en la generación y/o mantenimiento de la

enfermedad<sup>31</sup>. El número y proliferación de células de estirpe mieloide y eritroide se han encontrado disminuidos en estudios *in vitro* de cultivos de células de pacientes con leucemia<sup>27</sup>, además de mostrar niveles elevados de IL-6 y TNF- $\alpha$  en cultivos a largo plazo de células provenientes de paciente con LLA en comparación con los controles normales. Una pregunta recurrente es si las células del microambiente presentan las mismas alteraciones genéticas que las clonas leucémicas. Al respecto, en algunos pacientes que presentan LLA Ph+ se ha encontrado el cromosoma Philadelphia en células de estirpe eritroide y mieloide<sup>32</sup>, y en pacientes con rearreglo MLL-AF4, este mismo rearreglo está presente en las células troncales mesenquimales<sup>12</sup>.

Cambios respecto a los ejes de señalización por citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento también han sido reportados. En un modelo de xenotrasplante en ratón de células de LLA pre-B se mostró que en las zonas de mayor crecimiento tumoral se encontraba disminuido SDF-1 e incrementado SCF, producido principalmente por las células tumorales, provocando la migración de las células CD34<sup>+</sup> a estos nuevos nichos, mientras que los nichos donde normalmente prevalecían las células CD34<sup>+</sup> fueron incapaces de mantener el *pool* de estas células primitivas, aportando evidencia de la alteración de los nichos en relación a la proliferación leucémica<sup>33</sup>.

En línea con lo observado en otras neoplasias, la inflamación crónica pudiera contribuir al microambiente tumoral idóneo para el desarrollo y diseminación de células cancerosas, participando en el daño a los procesos normales de proliferación y diferenciación celulares de la médula ósea, concomitante al desarrollo y mantenimiento de células malignas. Se han identificado elementos clave que pueden participar en este proceso inflamatorio, como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B que se ha visto activado en células del microambiente tumoral como macrófagos y fibroblastos<sup>34</sup>. Así mismo, en el caso de leucemia mieloide aguda, hay evidencia que sugiere la participación de este factor en el mantenimiento de las células troncales leucémicas, ya que se ha observado constitutivamente activado en una población leucémica quiescente CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, fenómeno que no se observó al evaluar células normales con este fenotipo<sup>35</sup>. Dicho factor tiene como blanco genes que codifican para citocinas inflamatorias y otros que impactan procesos celulares como apoptosis y diferenciación<sup>36</sup>, por lo que se

ha relacionado con inflamación y progresión tumoral. Entre los factores solubles secretados por las células tumorales o las células que forman parte del microambiente que pueden estar asociados a este microambiente tumoral y favorecer la participación de células del sistema inmunológico en esos procesos, están las citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN $\gamma$  y quimiocinas como CCL2 y CXCL12<sup>37</sup>. Hallazgos recientes del laboratorio indican la existencia de un grupo de pacientes con LLA al debut, en cuya médula ósea prevalecen factores microambientales pro-inflamatorios y factores de crecimiento hematopoyético, dentro de los que se distingue la producción elevada de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 y GM-CSF. Dichos productos resultaron potentes inductores de la proliferación y diferenciación de células troncales y progenitores tempranos<sup>31</sup>. De manera interesante, factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B y STAT3 parecen cooperar en este proceso<sup>31</sup>. Sin embargo, se desconoce el posible estímulo intrínseco y/o extrínseco que origina este estado de inflamación en LLA en ausencia de infección clínica aparente. Indicando la posible existencia de ligandos endógenos en el microambiente tumoral que estén actuando como DAMPs (del inglés, *Damage associated molecular patterns*), siendo reconocidos por receptores como TLRs que provocan la activación de vías inflamatorias. Se ha identificado un papel importante de la señalización a través de TLRs en el desarrollo hematopoyético. Las células hematopoyéticas primitivas expresan TLRs funcionales y la activación con sus ligandos influye en sus decisiones de diferenciación y en la secreción de citocinas y factores de crecimiento, favoreciendo la presencia de un perfil pro-inflamatorio mediado principalmente por la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B e IRF3/7<sup>38</sup>. Asimismo, ha sido reportado en leucemias agudas, la capacidad de precursores hematopoyéticos CD34+ de responder ante la estimulación con ligandos de TLR, favoreciendo la producción de células mieloides y NK, así como el incremento en la secreción de MCP-1 (del inglés, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), aportando evidencia de la posible contribución de la activación de TLRs en la generación de desequilibrios microambientales en la médula ósea de pacientes con enfermedades hematológicas<sup>22</sup>.

## 7. miRNAs

Los miRNAs son secuencias de RNA de alrededor 21-22 nucleótidos de longitud que han sido caracterizados como reguladores pos-transcripcionales de la expresión génica al tener generalmente sitios de unión en la región 3'UTR de sus mRNA blanco. En el ser humano, más del 60% de los genes que codifican para proteínas contienen al menos un sitio conservado de unión para un miRNA<sup>39,40</sup>. Los miRNAs son transcritos por una RNA polimerasa II que genera el pri-miRNA. En el núcleo, la RNAsa Drosha y su cofactor DGCR8 forman el complejo microprocesador e inician el proceso de maduración cortando la secuencia y dejando un pre-miRNA en forma de *hairpin* de unos 65 nucleótidos (Figura 3). El pre-miRNA es exportado al citoplasma mediante un complejo formado con exportina 5. En el citoplasma el pre-miRNA es cortado del asa por la RNAsa Dicer, dejando un dúplex de RNA que es cargado en la proteína AGO (Argonauta) para formar el complejo RISC (del inglés, *RNA Induced Silencing Complex*)<sup>39</sup> que va a seleccionar la cadena guía para unirla con su respectivo mRNA sirviendo como guía para unirse principalmente en la región 3'UTR de sus mRNA blanco y reclutar proteínas efectoras que inducen la represión traduccional o degradación del mRNA<sup>41</sup>.

### 7.1 miRNAs en hematopoyesis

Es creciente la evidencia del relevante papel de los miRNAs en la regulación hematopoyética. El conocimiento de la participación de los miRNAs en el desarrollo y diferentes procesos proviene de la alteración de la expresión de proteínas involucradas en su procesamiento. En modelos de ratón deficientes en Dicer se ha visto que los embriones no logran completar su desarrollo y sufren muerte prematura, así como en diferentes tejidos con alteraciones de la expresión de genes de proteínas que forman el complejo RISC se ha visto afectada la población de células troncales<sup>42</sup>.

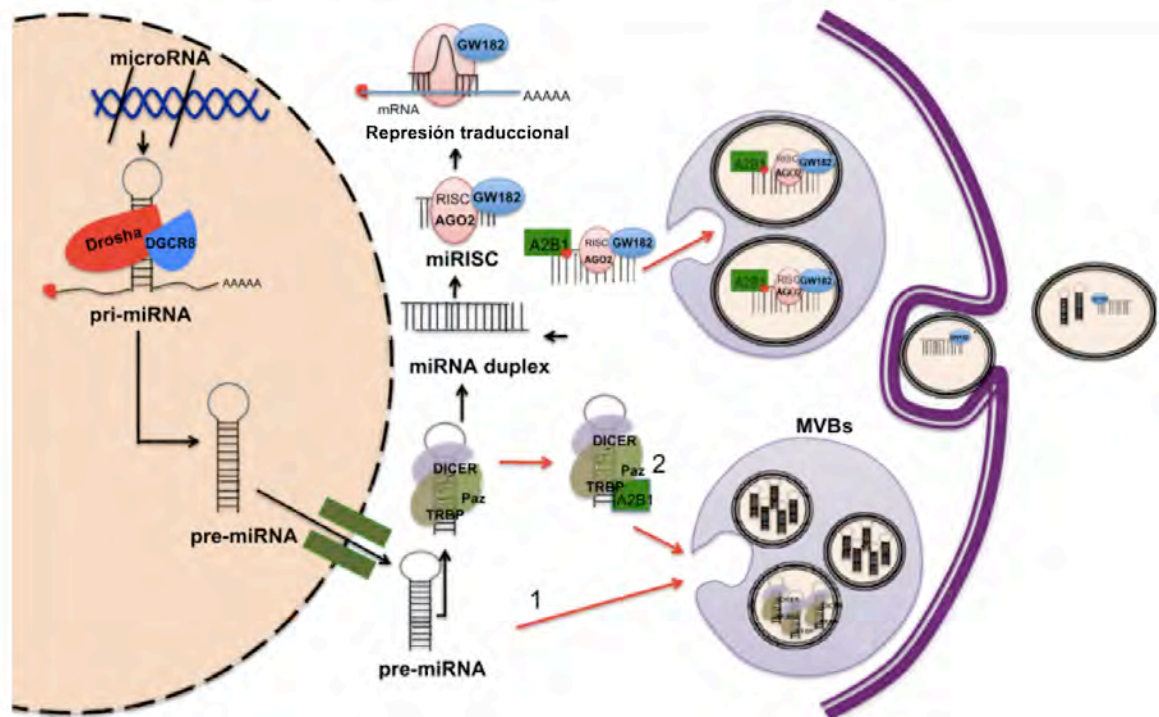


Figura 3. Biogénesis y función de los miRNAs. Los genes que codifican para miRNAs son transcritos en el núcleo por la RNA Polimerasa II en un pri-miRNA que es procesado a pre-miRNA por el complejo microprocesador conformado por Drosha y DGCR8. El pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma por la exportina 5 en presencia del cofactor Ran-GTP donde Dicer escinde el *loop* y deja un miRNA dúplex, el cual es reclutado por la proteína AGO para formar el complejo efector RISC donde se selecciona una de las cadenas que es la que ejercerá la función efectora en los mRNA blanco. Adicionalmente, los miRNAs pueden ser enviados a vesículas dentro de Cuerpos Multivesiculares (MVBs del inglés, *Multivesicular Bodies*), detalles de este proceso aún están siendo dilucidados. Se ha sugerido que la proteína hnRNA2BI está involucrada en su regulación y que los miRNAs pueden estar presentes en las microvesículas en su forma madura o en un estado previo unidos a complejos procesadores. La fusión de la membrana de los MVBs con la membrana plasmática libera al espacio extracelular estas microvesículas cargadas con miRNAs conocidas como exosomas<sup>39,43,44</sup>. Modificado de<sup>45</sup>.

Con base en la integración de datos provenientes de microarreglos y predicciones *in silico* de sus mRNAs blanco, se han podido identificar miRNAs que tienen un papel en la diferenciación hacia todos los linajes hematopoyéticos como miR-181 y miR-128, así como otros que pueden tener impacto en sólo un tipo como miR-221 en el caso de la eritropoyesis<sup>46</sup>. Algunos análisis bioinformáticos y funcionales también han encontrado miRNAs relacionados con el mantenimiento de las células troncales o de progenitores en etapas tempranas de la hematopoyesis, como miR-146, que se ha visto implicado en el mantenimiento de la autorenovación

de las HSCs de largo plazo<sup>47</sup>. En cuanto a la linfopoyesis, la delección condicional de *Dicer* en progenitores tempranos de células B resulta en el bloqueo de la diferenciación del estado pro-B a pre-B<sup>48</sup>. La ausencia del *cluster* miR-17-92 inhibe la transición del estado pro-B al pre-B, su papel en esta etapa está probablemente relacionado con la regulación de sus blancos *Bmi* y *PTEN*<sup>49</sup>. Por otro lado, la sobreexpresión aberrante de miRNAs también se ha visto que puede afectar la transición de estos estadios de maduración como es el caso de miR-150, uno de los más expresados en tejidos linfoides, sobretodo en linfocitos T y B maduros, pero no en sus progenitores. En estudios en el modelo de ratón, la expresión ectópica de este miRNA afecta la formación de células B maduras porque inhibe la transición del estado pro-B al pre-B por lo que sus blancos son probablemente genes importantes en esta etapa de diferenciación<sup>50</sup>.

## 7.2 miRNAs en neoplasias hematológicas malignas

De gran interés actual ha sido la identificación de alteraciones en la expresión de miRNAs en procesos neoplásicos respecto a su contraparte normal en diferentes tejidos y entre diferentes tipos de tumores, mostrando perfiles característicos de expresión<sup>51</sup>. Las primeras evidencias de la participación de miRNAs en procesos tumorales se obtuvieron en estudios de LLC (Leucemia Linfocítica Crónica) donde se identificó una baja expresión de miR-15 y miR16 que se encontró relacionada con la delección de la región cromosómica 13q14 observada frecuentemente en los pacientes, ya que las secuencias que codifican para estos miRNAs se localizan en dicha región<sup>52</sup>. Estos dos miRNAs funcionan como supresores de tumor al regular oncogenes como *Bcl-2* en LLC, melanoma y cáncer colorectal<sup>53</sup>.

Además de su papel intracelular de regulador post-transcripcional, se ha identificado que los miRNAs pueden formar parte de la comunicación intercelular, ya que ha sido ampliamente reportada su presencia en exosomas, que son microvesículas menores a 150nm secretadas por las células tras la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática<sup>54</sup>. Entre los elementos extrínsecos que conforman el microambiente, el papel de las vesículas extracelulares ha adquirido creciente relevancia con hallazgos de su participación en la modulación del microambiente durante procesos tumorales. En leucemia



linfocítica crónica, mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*, se encontró que las células leucémicas secretan exosomas que son capaces de ser transferidos a células endoteliales y mesenquimales, induciendo la activación de vías de señalización y la expresión de patrones genéticos relacionados con crecimiento celular, supervivencia e inflamación. Estos exosomas promueven la transición de las células estromales hacia un fenotipo de CAFs (del inglés, *Cancer Associated Fibroblasts*), los cuales se han encontrado presentes en diferentes tipos tumorales y cuyas funciones son dependientes de la señalización a través de NF- $\kappa$ B. Aparentemente estos efectos son principalmente mediados por el contenido de miRNAs de los exosomas<sup>55</sup>. La posible participación de los miRNAs tanto en la homeostasis como en la oncogénesis se ha documentado con la delección de *Dicer1* (RNAsa esencial para el procesamiento de los miRNAs) de osteoprogenitores de ratón, resultando en la alteración de la diferenciación osteoblástica y con ello afectando la integridad hematopoyética al generarse mielodisplasia y posterior leucemia mieloide aguda<sup>56</sup>.

Más allá de su función de reguladores post-transcripcionales, recientemente se ha reportado una novedosa función de miRNAs como ligandos del receptor TLR7 murino y TLR8 humano<sup>30,57</sup>. TLR7 y TLR8 forman parte de la familia de receptores tipo Toll, característicos de la inmunidad innata, que a su vez, forman parte de los Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern recognition receptors*) que reconocen PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés, *Pathogen-associated molecular patterns*) y DAMPs (Patrones moleculares asociados a daño, del inglés, *Damage-associated molecular patterns*)<sup>58</sup>. Tras la unión con estos ligandos, la interacción de su dominio TIR con Myd88 inicia una cascada de señalización que llevará a la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B e IRFs (Factores reguladores de interferón, del inglés, *Interferon regulatory factors*) teniendo como consecuencia la secreción de citocinas inflamatorias e interferones<sup>58</sup>. En particular, se han reportado como ligandos del TLR7 y TLR8 compuestos sintéticos denominados imidazoquinolinas y secuencias de cadena sencilla de RNA (ssRNA, del inglés *single-stranded RNA*)<sup>59</sup>. En cuanto a los miRNAs, se ha identificado a let-7 como ligando de TLR7 en la microglía y macrófagos, induciendo la producción de citocinas inflamatorias y provocando daño

neuronal, lo que podría estar relacionado con enfermedades como Alzheimer, enfermedad en la que se ha encontrado elevada expresión de dicho miRNA<sup>30</sup>. De forma interesante, en cáncer de pulmón se encontró que miR-21 y miR-29a son capaces de unirse y activar estos receptores en células del sistema inmunológico induciendo una respuesta pro-inflamatoria favorecedora del crecimiento tumoral<sup>57</sup>. Este nuevo mecanismo indudablemente aporta luz a la patobiología de los procesos oncológicos, basada en la presencia de ligandos endógenos que contribuyen a su progresión o mantenimiento.

## IV. JUSTIFICACIÓN

Hallazgos recientes del laboratorio indican la existencia de un grupo de pacientes con LLA al debut, en cuya médula ósea prevalecen factores microambientales y factores de crecimiento con actividad pro-inflamatoria. Dichos productos resultaron potentes inductores de la proliferación y diferenciación de células troncales y progenitores hematopoyéticos tempranos, fenómeno en el que factores de transcripción, tales como NF- $\kappa$ B y STAT3, parecen cooperar. Sin embargo, se desconoce el posible estímulo intrínseco y/o extrínseco que origina este estado de pro-inflamación en ausencia de infección clínica aparente. Recientemente ha sido documentado el papel de miRNAs tumorales como ligandos de TLR, promoviendo la comunicación intercelular en el microambiente tumoral, y detonando la liberación de citocinas pro-inflamatorias como resultado de su interacción y señalización. Hasta el momento se desconoce la contribución de los miRNAs secretados por las células leucémicas al microambiente pro-inflamatorio observado en la médula ósea de pacientes con LLA. Su estudio permitiría conocer el impacto de estos elementos genéticos en la remodelación del microambiente de la médula ósea leucémica que favorece el mantenimiento y progresión de las clonas tumorales a expensas de la hematopoyesis normal. La noción de un asa de retroalimentación endógena microambiental modificaría la perspectiva genocentrista de la progresión tumoral leucémica.

## **V. HIPÓTESIS**

Las células leucémicas producen miRNAs que actúan como ligandos de TLR8 autócrina o parácrinamente, y, tras la activación de la vía de señalización de los TLR, inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias que contribuyen al microambiente pro-inflamatorio en la médula ósea de LLA.

## **VI. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Determinar si los precursores leucémicos de la médula ósea contribuyen al microambiente inflamatorio a través de la liberación de miRNAs que actúan como ligandos de TLR8.

### **2. Objetivos particulares**

- 2.1** A partir de bases de datos de expresión de miRNAs en LLA, identificar los miRNAs sobre-expresados y seleccionar posibles candidatos que puedan actuar como ligandos de TLR8.
- 2.2** Determinar si los miRNAs seleccionados, producidos por precursores leucémicos, son capaces de unir TLR8 e inducir la activación de la vía de NF- $\kappa$ B.
- 2.3** Identificar la contribución de estos miRNAs al microambiente inflamatorio leucémico mediante la medición de citocinas pro-inflamatorias.
- 2.4** Determinar si los miRNAs candidatos leucémicos son secretados por las células leucémicas a través de exosomas.
- 2.5** Evaluar el efecto de los sobrenadantes inflamatorios en el contexto leucémico al colocarlos en cultivo con células provenientes de aspirados de médula ósea de pacientes con LLA.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Análisis *in silico*

El análisis *in silico* se llevó a cabo usando las bases de datos disponibles en GEO DataSets <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>, resultantes de microarreglos que han evaluado la expresión de miRNAs en muestras de médula ósea de pacientes con leucemia linfoblástica aguda y se hayan comparado con controles hematológicamente sanos. Se utilizó el software GEOR2R disponible en línea <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/> para realizar el análisis comparativo de los miRNAs sobre-expresados y que fueran mejores clasificadores entre la LLA y la normalidad.

### 2. Síntesis secuencias miRNAs

Para ser evaluadas individualmente, se sintetizaron las siguientes secuencias de miRNAs a IDT (Integrated DNA Technologies):

miR-146a (5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU-3'), miR-181b (5'-  
ACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU-3'), miR-199b (5'-  
ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA-3'), RNA41 (5'-GCCCGACAGAAGAGAGACAC-  
3') (RNA41 es la secuencia mutada de ssRNA40 de HIV-1 que al no tener uridinas se ha reportado que pierde la actividad como ligando de hTLR8<sup>59</sup>). Para los experimentos de inmunoprecipitación del TLR8 y ensayo de reportero de NF-κB realizados en el laboratorio del Dr. Muller Fabbri (*Children's Hospital Los Angeles*) se utilizaron como controles una secuencia de RNA aleatoria Scramble y miR-21 como control positivo, ya que previamente se ha reportado su actividad como ligando de este receptor<sup>60</sup>. Esto fue a causa de la falta de disponibilidad del control positivo R848 y el control negativo RNA41.

### **3. Líneas celulares**

Las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron: de Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores de células B: RS4;11, REH y Nalm-6, de estroma de médula ósea normal se usó la línea celular HS-5. Para el ensayo de inmunoprecipitación se usó la línea celular HEK293. Para el ensayo de reportero de NF- $\kappa$ B la línea HEK-Blue TLR8, células HEK293 co-transfectadas con *hTLR8* y el gen reportero *SEAP* (fosfatasa alcalina embrionaria secretada, del inglés, *Secreted embryonic alkaline phosphatase*) (InvivoGen) . Las células RS4;11, REH, Nalm-6, HEK293 y HEK-Blue TLR8 fueron cultivadas en medio RPMI (Gibco) y las HS-5 en medio DMEM (Gibco), ambos suplementados con 10% suero fetal bovino (Gibco) y 1% penicilina-estreptomicina (Gibco). Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo con 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

### **4. Obtención de células mononucleares**

A partir de muestras de aspirado de médula ósea de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) o muestras de Sangre de Cordón Umbilical (SCU), (representativas de una población hematopoyética normal, dada la escasez de muestras de médula ósea de sujetos hematológicamente sanos) se separó la fracción de células mononucleares mediante gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus (GE HealthcareBioscience). Se colectó la fracción correspondiente a células mononucleares (CMN) y se cuantificaron las células viables mediante cuenta con azul de tripano. Las muestras fueron obtenidas como parte del proyecto autorizado por el Comité Local de Ética de la UMAE Hospital de Oncología del IMSS con número de registro R-2014-785-041.

### **5. Inmunoprecipitación del Receptor tipo Toll 8 (TLR8)**

Un día antes de realizar el ensayo, se transfectaron células HEK293 con un plásmido que contenía la secuencia para expresar TLR8-flag. Para realizar la inmunoprecipitación se usaron como referencia protocolos previamente reportados

<sup>61,60</sup>. Brevemente, cada miRNA fue complejado con DOTAP para ser colocado con las células a una concentración final de 50nM, 100nM o 150nM. 20 minutos después de la adición de los miRNAs al cultivo se colectaron las células en frío, se lavaron y fueron lisadas con *Polysome Lysis Buffer*. Los lisados fueron incubados overnight a 4°C en rotación con perlas magnéticas anti-flag M2 (Sigma-Aldrich). Al terminar la incubación, las perlas fueron lavadas extensivamente y después incubadas 30min a 55°C con proteinasa K. Tras esto, se procedió a la extracción de RNA y sucesiva RT-PCR. Se realizó un Western Blot, con una fracción de las perlas tomadas previas a la extracción de RNA, usando un anticuerpo anti-flag para corroborar la obtención del receptor TLR8.

## **6. Tratamiento celular con miRNAs / exosomas**

Para la medición de citocinas y la activación de NF-κB por inmunofluorescencia, las CMN obtenidas a partir de muestras de SCU se colocaron en cultivo en una placa de 96 pozos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células /200uL por pozo. Las células fueron incubadas con 20ug/mL de miR-146a, miR-181b, miR-199b, RNA41, R848 o DOTAP solo. Cada uno de los miRNAs fue complejado con DOTAP para ser añadido al cultivo, como previamente ha sido descrito<sup>59</sup>. Se llevó a un volumen total de 200uL con medio DMEM suplementado con 10% SFB libre de exosomas y 2% penicilina-estreptomina. R848 (InvivoGen) se usó como control positivo, ya que es un compuesto que ha sido reportado como ligando de TLR8. RNA41 y DOTAP fueron usados como controles negativos del sistema. En el caso de exosomas, se utilizaron CMN SCU y células HS-5, las células fueron tratadas con 50ug/mL de exosomas purificados de la línea celular RS4;11. Para los ensayos de activación de NF-kB por inmunofluorescencia las células fueron tratadas por 60, 90 o 120 minutos. Para la inducción de producción de citocinas, las células fueron incubadas durante 24 horas tras el tratamiento con los miRNAs y a este tiempo se colectó el sobrenadante, se centrifugó a 1500rpm/5min para remover células y se almacenaron a -20 °C.

## **7. Inmunofluorescencia para NF-kB**

Las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% y permeabilizadas con 0.25% de Tritón X-100 . El bloqueo se realizó con BSA 2% a 37 °C. Se utilizaron los anticuerpos anti-pNF-kB p65 93H1 (ser536) (Cell signaling) o anti-NF-kB p50 4D1 FITC (Biolegend) y se incubaron overnight a 4 °C. En el caso del anti-pNFkB p65 se usó un anticuerpo secundario anti-rabbit acoplado a FITC. El medio de montaje usado fue vectashield con yoduro de propidio o DAPI. Las laminillas fueron evaluadas mediante microscopía confocal.

## **8. Producción de citocinas**

Las concentraciones de G-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-10, MCP-1 y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes del cultivo de CMN con miRNAs fueron determinadas a través de un ensayo Multiplex Milliplex HCYTOMAG-60K (Merck Millipore) siguiendo las recomendaciones del protocolo del proveedor (<https://www.merckmillipore.com>).

## **9. Purificación de exosomas**

La purificación de exosomas se realizó a partir de sobrenadantes de 48 horas de cultivos a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/mL con suero libre de exosomas de las líneas celulares RS4;11, REH y Nalm-6 a través de cromatografía de exclusión molecular usando Sepharose CL-2B. Para el análisis comparativo entre las resinas Sepharose CL-2B y Sephacryl S-300 se usaron sobrenadantes de RS4;11. Se colectó una fracción cada 11 gotas obtenidas de la columna (600uL). La cuantificación se llevó a cabo mediante el equipo Nanosight. La caracterización se realizó mediante la cuantificación de proteína por el método de Bradford y Western Blot de los marcadores de exosomas CD81 y TSG101. De las fracciones identificadas ricas en exosomas se llevó a cabo la extracción de RNA y mediante RT-PCR se evaluó la presencia de nuestros miRNAs candidatos.

Los exosomas de REH utilizados para la estimulación de células mononucleares y HS-5 con exosomas y posterior medición de la activación de NF-



kB fueron purificados mediante ultracentrifugación diferencial. Brevemente, se colectaron los sobrenadantes y se filtraron. Se colocaron en ultracentrífuga y la primera centrifugación fue a 9900rpm/40 min/4C, se colectó el medio, se colocó en un nuevo tubo y se realizó una segunda centrifugación a 9900rpm/40 min/4C. Se colectó nuevamente el medio y la tercera centrifugación se realizó a 31200rpm/2hrs/4C, en esta ocasión se colectó el pellet y se descartó el sobrenadante. Se llevó a cabo una cuarta centrifugación a 31200rpm/2hrs/4C. Tras esta centrifugación, se retiró todo el volumen y se resuspendió el pellet en 400ul de PBS estéril. En este caso, la cuantificación de exosomas fue con base en la cuantificación de proteína mediante el Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific).

## **10. Identificación de miRNAs por RT-PCR**

La extracción de RNA de exosomas y de la inmunoprecipitación se realizó usando Trizol de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Invitrogen) y se cuantificó por espectrometría en un equipo Nanophotometer. Se llevó a cabo la reacción para cDNA usando el TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y con ello se realizaron RT-PCR de cada condición con los Taqman microRNA Assays primers (Applied Biosystems) para miR-146a, miR-181b y miR-199b. Del RNA obtenido de exosomas se usaron 100ng de RNA por reacción de cDNA. En el caso de las IP, el RNA utilizado para las reacciones, se normalizó a la concentración de la muestra con menor cantidad de RNA por experimento, para tener la misma cantidad de RNA en todas las condiciones.

## **11. Ensayo con Reportero de NF-kB**

Para evaluar la activación del factor de transcripción NF-kB se llevaron a cabo experimentos usando células HEK Blue TLR8 (InvivoGen). Esta línea celular tiene el reportero SEAP (Secreted embryonic alkaline phosphatase), que al activarse la vía de señalización de NF-kB, la SEAP es secretada al medio que puede ser detectada colorimétricamente midiendo la absorbancia a 620nm. Células HEK-Blue TLR8 fueron estimuladas con diferentes concentraciones de los miRNAs

candidatos (100nM-15ug/mL) durante determinados periodos de tiempo (24h-96h). Seguido a la incubación a 37°C, se colectó el sobrenadante de cada condición, se centrifugó a 14000g/15 minutos y en una placa de 96 pozos se colocaron 20uL de sobrenadante con 180uL del reactivo Quanti-Blue (InvivoGen). La placa se incubó a 37°C (3h-24h) y se leyó la absorbancia a 620nm. La medida de actividad de NF-κB está expresada en unidades de absorbancia resultado de la sustracción de la absorbancia del control (condición únicamente con el medio de cultivo utilizado en el ensayo) a la lectura de absorbancia de cada condición.

## **12. Ensayo de proliferación**

Las CMN obtenidas de pacientes con LLA fueron teñidas con Cell Trace Violet (Life Technologies) y se colocaron en una placa de 96 pozos 100,000 células/pozo. El cultivo se montó con una relación 1:1 (medio de cultivo: sobrenadante de células estimuladas con cada miRNA). El medio utilizado fue RPMI suplementado con 10% SFB y 1% penicilina-estreptomicina. El tiempo cero (T0) se leyó por citometría de flujo al momento de montar el ensayo. Tras 72 horas de cultivo, se colectaron las células de cada condición se realizó una tinción con los anticuerpos CD34-PE (BD Biosciences), CD19-APC (Biolegend) y CD45-PECy5 (BD Biosciences) para la lectura por citometría de flujo. Para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo (FlowJo X 10.0.7r2).

## VIII. RESULTADOS

### 1. Análisis *in silico* de la expresión de miRNAs en LLA

El análisis *in silico* en GEO Datasets se llevó a cabo con la información de bases de datos de miRNAs provenientes de muestras de pacientes con LLA con número de acceso GSE56489 y GSE23024, donde se identificaron los miRNAs con mayor sobre-expresión en LLA al comparar con controles normales. La secuencia de cada uno de estos miRNAs fue analizada en base a la información reportada hasta el momento sobre las características de los ligandos de TLR8. A este respecto, la cristalización del receptor TLR8<sup>62</sup> se identificó que tiene 2 sitios distintos de unión para nucleótidos. El primero es un sitio de unión a uridinas que coincide con el sitio al que se unen las moléculas químicas que actúan como ligando de este receptor; mientras que al segundo se unen oligonucleótidos cortos que pueden ser UG/GU, UUG o UA/AU y se ha encontrado de especial relevancia la presencia de estos nucleótidos en las posiciones 18-20<sup>57</sup> de la secuencia del miRNA. Con fundamento en estos dos criterios, sobre-expresión y secuencia, se eligieron como miRNAs candidatos los siguientes: miR-146a-5p, miR-181b-5p, miR-199b-3p (Tabla 1).

miRNA	Secuencia
hsa-miR-181b	AACAUUCAUUGCUGUCGUGGGU
hsa-miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
hsa-miR-199b-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA

**Tabla 1.** miRNAs seleccionados como candidatos para ser evaluados como ligandos de TLR8.

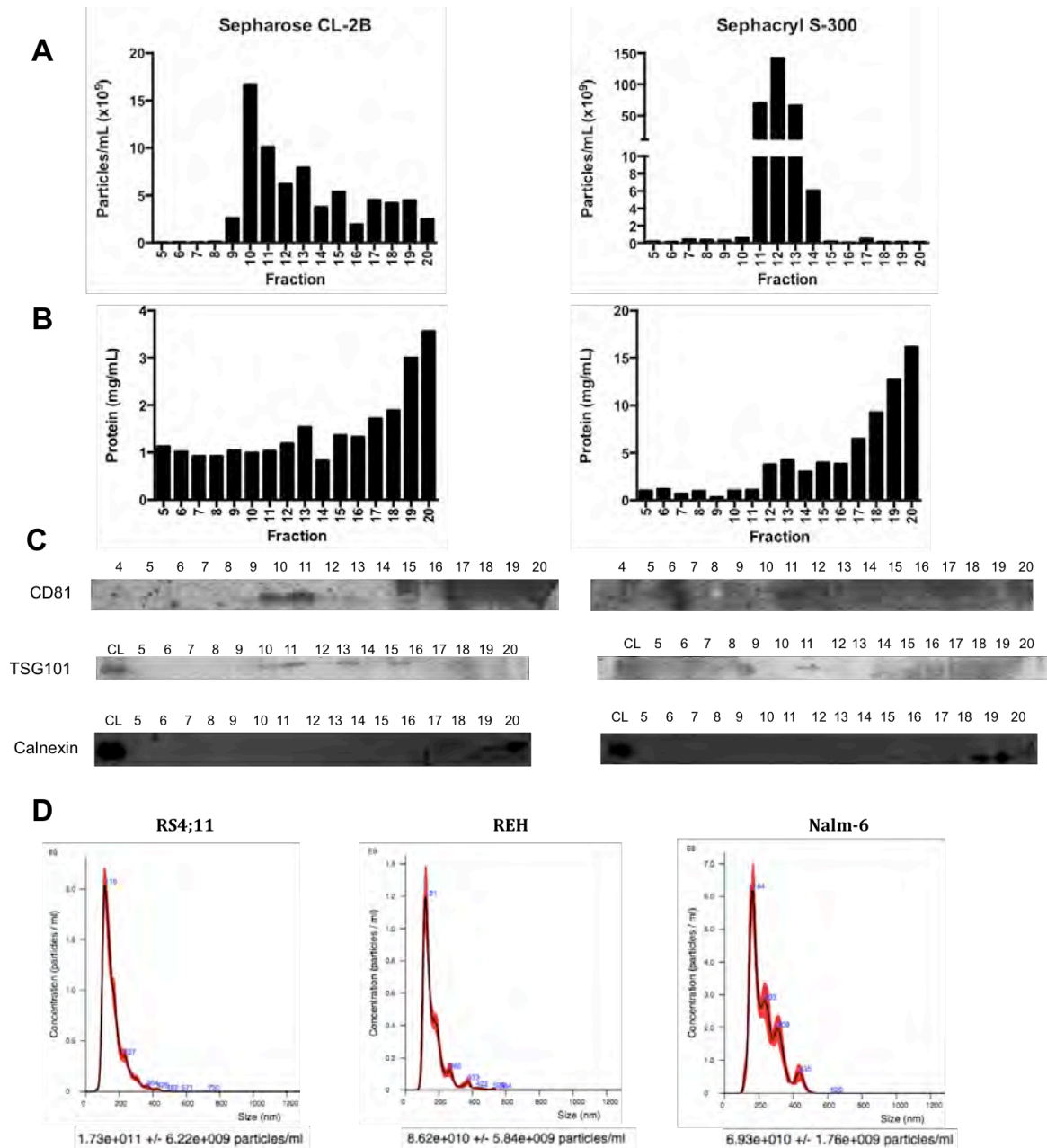
### 2. Caracterización de exosomas producidos por líneas celulares de LLA

Una de las principales vías de participación de los miRNAs en la comunicación intercelular es a través de su secreción en exosomas<sup>63</sup>, por lo que para evaluar la presencia de los miRNAs candidatos llevamos a cabo la purificación de estas microvesículas de 3 líneas celulares de leucemia. Tras 48 horas de cultivo de las líneas celulares RS4;11, REH y Nalm-6, se colectaron los sobrenadantes para llevar a cabo la purificación de exosomas mediante cromatografía de exclusión molecular. Para la purificación se probaron 2 diferentes resinas Sepharose CL-2B y Sephacryl

S-300 con las cuales se corrió el sobrenadante y se colectaron cada una de las fracciones provenientes de la columna. La caracterización se llevó a cabo con las fracciones provenientes del cultivo de RS4;11 (Figura 4A, B, C). Usando la matriz CL-2B se obtuvieron exosomas a partir de la fracción 10 hasta la fracción 15 principalmente, identificados por la cuantificación de partículas. Las fracciones enriquecidas con exosomas presentaron las proteínas CD81 y TSG101, mientras que la ausencia de calnexina corrobora la ausencia de contaminación con microvesículas de otros compartimentos. En fracciones posteriores se cuantificaron partículas que podrían corresponder aún a la presencia de microvesículas. En cuanto al uso de la S-300, parece ser una mejor matriz para separar exosomas ya que los concentró principalmente en 3 fracciones (11-13) y se recuperaron mayores concentraciones. Así mismo, identificamos que la cantidad de proteína no correlaciona necesariamente con la cantidad de exosomas presentes, ya que en algunas fracciones fueron encontradas proteínas no correspondientes a microvesículas. En la Figura 4D se muestran los resultados del *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) realizado con el equipo NanoSight NS300 para las fracciones ricas en exosomas obtenidos de cada línea celular.

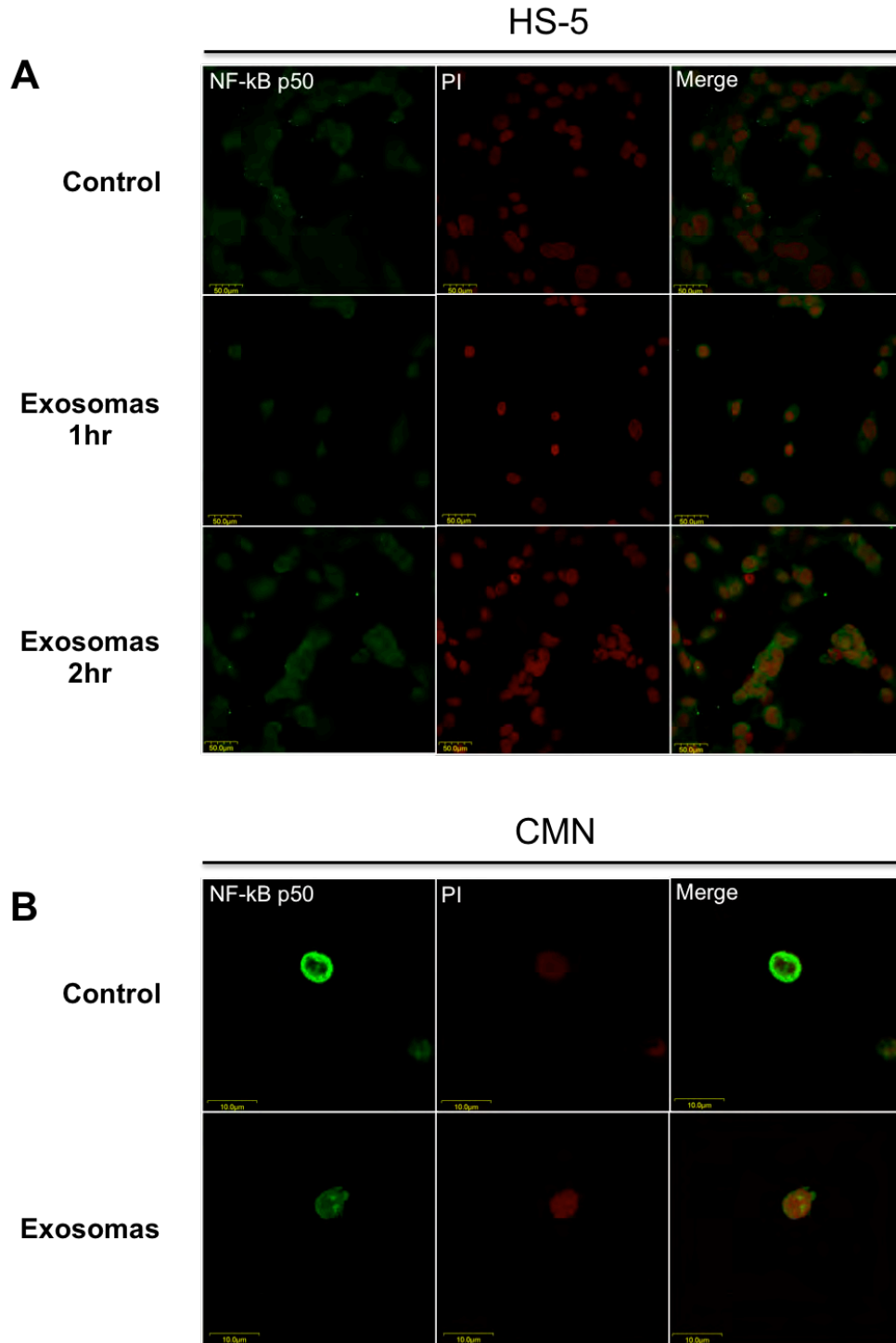
### **3. Exosomas de LLA activan el factor de transcripción NF-kB**

Una vez comprobada la secreción de exosomas por los blastos leucémicos, decidimos plantear un escenario experimental de lo que podría estar ocurriendo en la médula ósea durante la enfermedad, para saber si los exosomas secretados por las células leucémicas podrían ser recibidos por otras células del microambiente. Los exosomas pueden ser internalizados por células diferentes a las que les dieron origen, ya sea por fusión de la membrana del exosoma con la membrana plasmática o por otros mecanismos como endocitosis mediada por receptor<sup>64</sup>. A un cultivo de células HS-5, línea celular de estroma de médula ósea, y a un cultivo de células mononucleares provenientes de sangre de cordón umbilical, les adicionamos exosomas producidos por la línea celular de LLA REH e identificamos tras 60, 90 o 120 minutos, la activación del factor de transcripción NF-kB como la translocación al



**Figura 4. Purificación y caracterización de exomas de líneas celulares de LLA.**

$5 \times 10^5$  células/mL de RS4;11, REH y Nalm-6 fueron cultivadas independientemente durante 48 horas en medio con suero libre de exomas, el medio fue colectado y mediante cromatografía de exclusión molecular se obtuvieron diferentes fracciones para identificar las enriquecidas en exomas. Para esta técnica, se realizó un análisis comparativo usando 2 diferentes resinas, Sepharose CL-2B y Sephacryl S-300 con sobrenadante de cultivos de RS4;11 (A, B y C). Para la caracterización de exomas se llevó a cabo la cuantificación del número de partículas contenida en cada una de las fracciones (A), la cuantificación del contenido de proteína de cada una de las fracciones (B) y por Western Blot se evaluaron marcadores de exomas CD81 y TSG101 y la proteína de retículo endoplásmico calnexina. (C). Tras colectar las fracciones enriquecidas en exomas de sobrenadantes de las líneas celulares RS4;11, REH y Nalm-6 se realizó un *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) para validar la purificación de exomas mediante el número y tamaño de partículas (D).

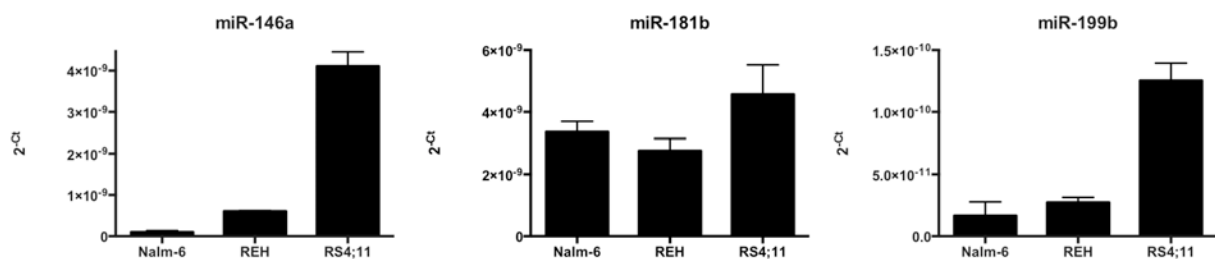


**Figura 5. Exosomas purificados de la línea celular de LLA son capaces de inducir la activación de vías de señalización inflamatorias.** Las células HS-5 fueron estimuladas durante 1 y 2 horas (A), mientras que las células mononucleares de SCU durante 90 minutos (B) con exosomas de la línea celular REH a una concentración de 50ug/mL. La activación del factor de transcripción NF-kB se evaluó por la translocación al núcleo de la subunidad p50 mediante microscopía confocal. Como control se usaron las células únicamente con medio de cultivo sin presencia de ningún tratamiento. Imágenes de microscopía confocal representativas de un experimento con múltiples mediciones. PI= Yoduro de propidio, del inglés, propidium iodide.

núcleo de su subunidad p50 en ambos tipos celulares (Figura 5A y 5B). Este resultado aporta evidencia de que los exosomas secretados por los blastos pueden tener efecto en otras células que formen parte del microambiente, induciendo en ellas la activación de vías de señalización inflamatorias, probablemente mediado por la señalización a través de TLRs.

#### 4. Secreción de microRNAs candidatos a ser ligandos agonistas de TLR8 en exosomas de células leucémicas

Para conocer si los miRNAs seleccionados como candidatos podrían estar involucrados en la inducción del ambiente inflamatorio, se exploró primeramente su inclusión en exosomas secretados por las células leucémicas. Se realizó la extracción de RNA contenido en los exosomas de RS4;11, REH y Nalm-6 y mediante RT-PCR buscamos la presencia de nuestros miRNAs candidatos de LLA (Figura 6). Los 3 miRNAs se encontraron presentes en los exosomas de las tres líneas celulares. miR-181b fue el expresado mayoritariamente y más homogéneamente, seguido por miR-146a y por último miR-199b. De las tres líneas celulares, RS4;11, que representa un tipo de leucemia de alto riesgo, son los que contienen mayor cantidad de los tres miRNAs en exosomas, sugiriendo la participación de estos miRNAs, que se han visto sobre-expresados en pacientes con LLA, en la intercomunicación celular en el microambiente tumoral de la médula ósea leucémica.

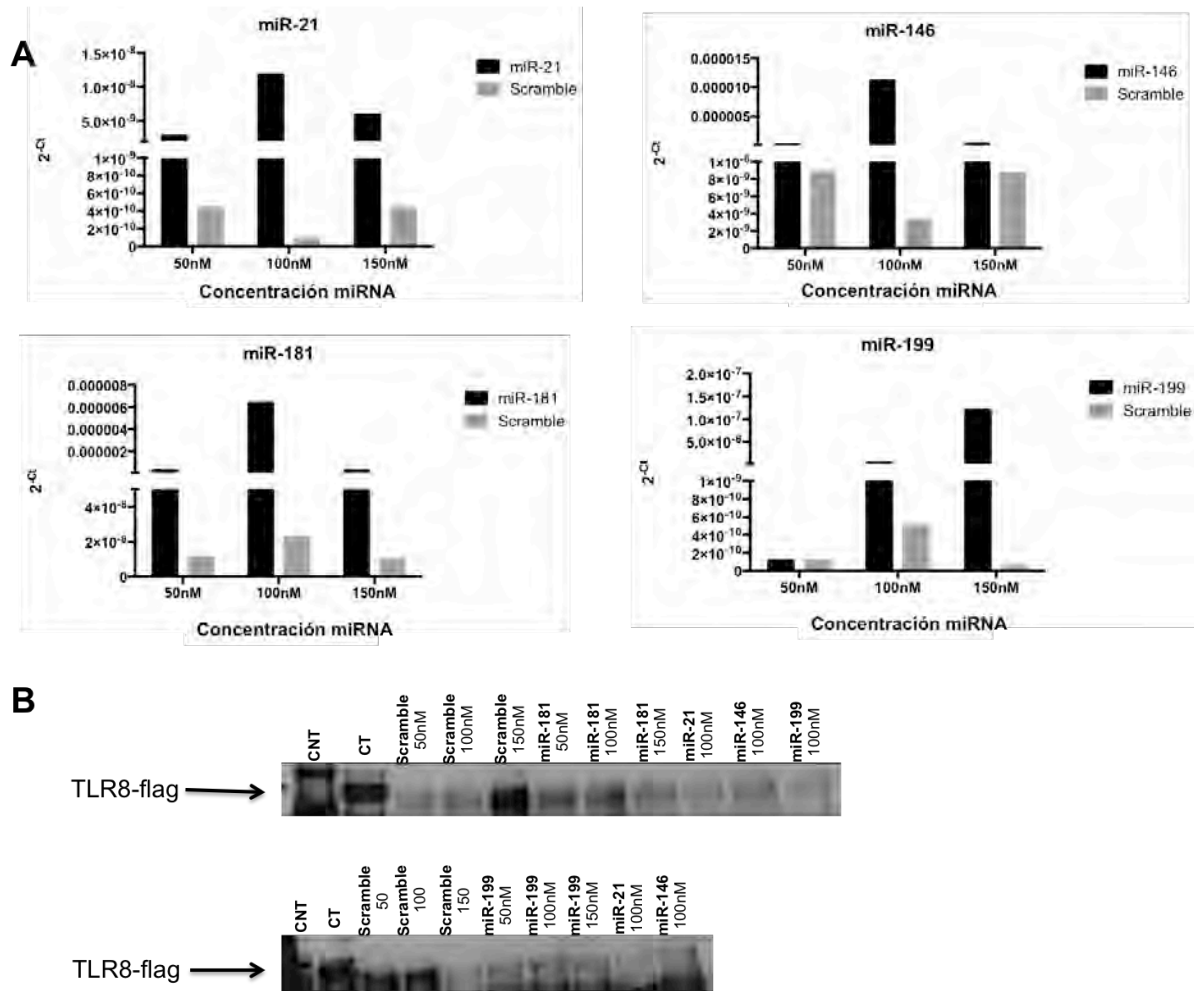


**Figura 6. Las células leucémicas secretan miRNAs de posible unión a TLR a través de exosomas.** La presencia de los miRNAs candidatos en exosomas se evaluó a través de RT-PCR a partir de RNA extraído de los exosomas purificados de cada una de las líneas celulares de LLA Nalm-6, REH y RS4;11. Resultados de una extracción de RNA, media y desviación estándar de RT-PCR de la misma muestra realizada por triplicado.

## **5. Los miRNAs secretados por blastos leucémicos en exosomas unen TLR8 e inducen la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B**

Lo siguiente a evaluar fue si los miRNAs candidatos secretados por blastos de LLA son capaces de interactuar con el receptor TLR8. Para esto, utilizamos como modelo la línea celular HEK293 transfectada para expresar un TLR8-flag. Las células fueron estimuladas con cada uno de los miRNAs por separado y posteriormente fueron colectadas y lisadas para llevar a cabo la inmunoprecipitación del TLR8, posterior a la cual se realizó una extracción de RNA y por PCR en tiempo real se buscó si los miRNAs se habían unido al receptor y por lo tanto habían precipitado junto con él. Los miRNAs fueron evaluados a tres diferentes concentraciones: 50nM, 100nM y 150nM. Se tomó una pequeña fracción de cada condición previo a la extracción de RNA con la que se realizó un Western Blot usando un anticuerpo anti-flag, corroborando con ello la exitosa precipitación del receptor TLR8 (Figura 7B). Con el resto se extrajo RNA para realizar la PCR, donde observamos la amplificación de los miRNAs a las 3 diferentes concentraciones probadas (Figura 7A), siendo la concentración de 100nM a la que hubo mayor unión casi en todos los casos, excepto con miR-199b, condición que presentó un comportamiento independiente de la concentración. Esto sugirió que las secuencias de RNA seleccionadas tienen la capacidad de unir al TLR8, abriendo la posibilidad de actuar como su ligando e inducir el inicio de su señalización. Como control de la precipitación específica de secuencias de RNA unidas al receptor, con el RNA obtenido de cada condición, se realizó una RT-PCR para el RNA pequeño nuclear U6, obteniendo mínimas cantidades de este RNA en comparación con las de los miRNAs evaluados (Figura suplementaria 1). Para conocer la especificidad del anticuerpo anti-flag utilizado sería importante llevar a cabo la inmunoprecipitación usando un control de isotipo o realizarla usando células tratadas con los miRNAs que no han sido transfectados con el TLR8-flag.





**Figura 7. Los microRNAs miR-146a, miR-181b y miR-199b se unen al receptor TLR8.**

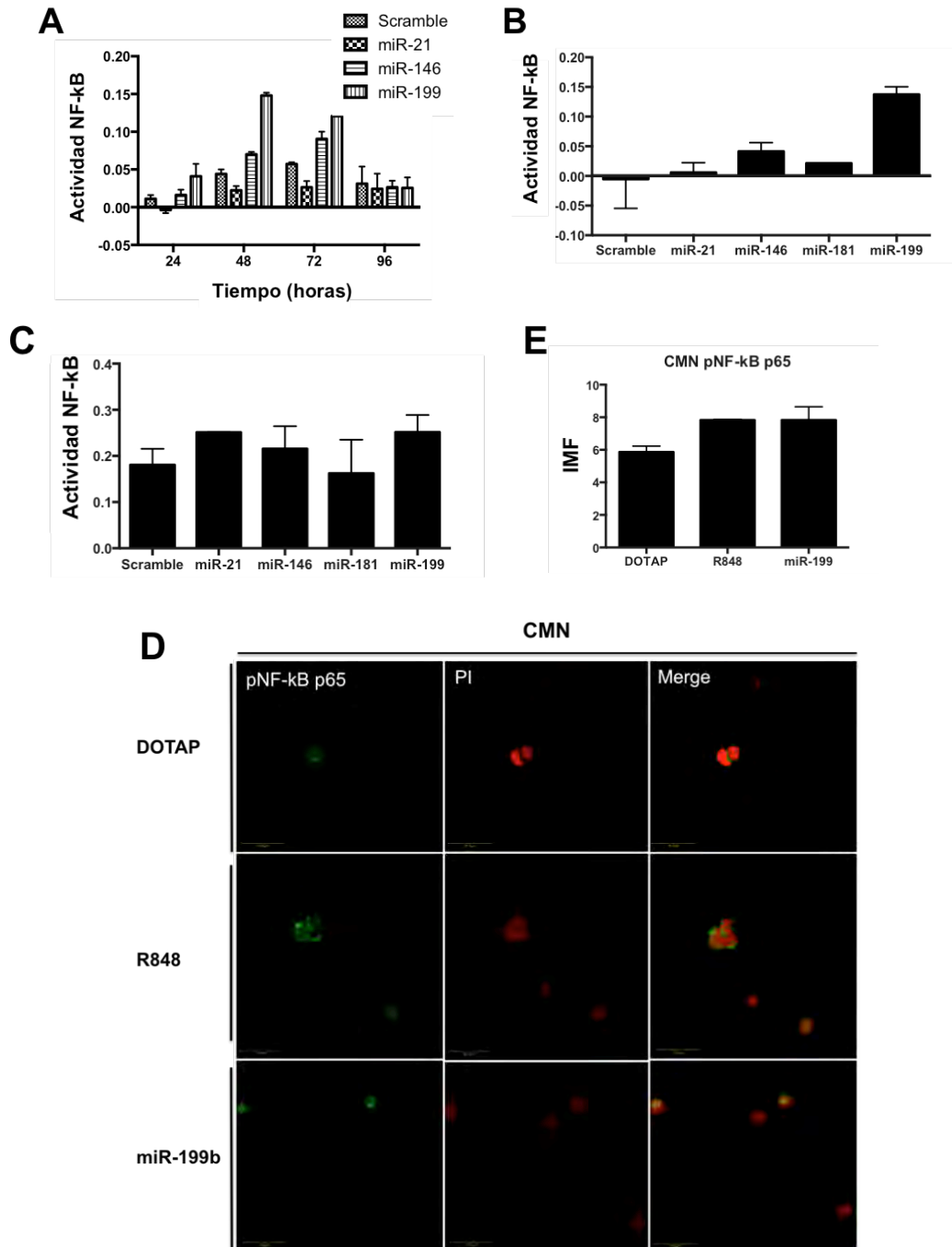
Los ensayos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo usando células HEK293 que expresan un TLR8-flag cultivadas con tres diferentes concentraciones de miRNA (50nM, 100nM y 150nM). Se obtuvo el RNA de los inmunoprecipitados y mediante RT-PCR se identificó la presencia de cada miRNA (A). Una pequeña fracción del inmunoprecipitado se utilizó para corroborar la presencia del TLR8 por inmunoblot. miR-21 fue utilizado como control positivo, previamente reportado con la capacidad de actuar como ligando de TLR8<sup>60</sup>. Scramble es una secuencia aleatoria de RNA. Datos representativos de un experimento a las concentraciones de 50nM y 150nM para cada miRNA, RT-PCR por triplicado; tres experimentos independientes a la concentración de 100nM para cada miRNA, RT-PCR por triplicado (Figura suplementaria 1). CNT = Control de No transfección (sin transfectar), CT = Control de transfección.

La activación del TLR8 tras la unión con sus ligandos inicia una señalización mediada por MyD88 que lleva a la activación de los factores de transcripción NF-κB, IRF5 e IRF7.<sup>65</sup>, por lo que para investigar la funcionalidad de la unión de los miRNAs al TLR8 evaluamos si ocurría la activación del factor de transcripción NF-κB en ensayos con células HEK-Blue que tienen acoplado un reportero para este

factor. Primero realizamos una cinética de 24-96 horas para evaluar la activación del factor de transcripción en este sistema con cada uno de los miRNAs usando una concentración de 100nM, de donde se determinó que tras las 48 y 72 horas se alcanza la mayor activación (Figura 8A).

El resultado de dos experimentos independientes a las 48hrs a esta concentración muestra la tendencia de una mayor activación de NF- $\kappa$ B con miR-146a y miR-199b en comparación con miR-21 y el control scramble (Figura 8B). Previamente se ha observado la activación de NF- $\kappa$ B con ligandos de cadena sencilla de RNA a concentraciones de 15-25ug/mL de RNA.<sup>57,59</sup>, por lo que también evaluamos los miRNAs en el ensayo de reportero a 15ug/mL, donde se observa aún una ligera tendencia a una mayor activación por miR-199b, sin embargo, en todas las condiciones se observa una mayor activación y una disminución de la diferencia entre ellas, probablemente por el uso de una mayor cantidad de vehículo en el sistema que tras el largo periodo de tratamiento pudiera estar induciendo cierta activación inespecífica (Figura 8C). El uso de R848 (Imidazoquinolina reportada como ligando de TLR8) como control positivo y una secuencia como RNA41 (que no contiene nucleótidos U ni G reportados como necesarios para la unión al TLR8) como control negativo en este ensayo, podrían servir para observar más claramente el efecto de los miRNAs en la activación de NF- $\kappa$ B.

Adicionalmente, para tener un acercamiento a la médula ósea, evaluamos el efecto de los miRNAs en células mononucleares, midiendo por inmunofluorescencia la fosforilación de la subunidad p65 (ser536) de NF- $\kappa$ B indicativo de su activación, estabilización y favorecimiento de su importación al núcleo<sup>66</sup>. Con este acercamiento fue observada mayor activación de NF- $\kappa$ B a las 2 horas de estímulo con el control positivo R848 y con miR-199b, en comparación con el control usando únicamente el vehículo, DOTAP, sin miRNAs (Figura 8D, 8E).

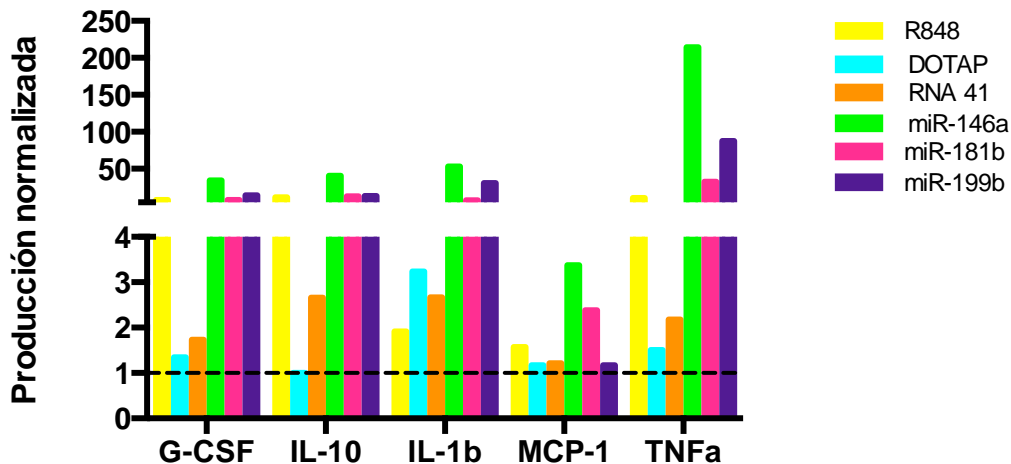


**Figura 8. Activación del factor de transcripción NF-kB por los miRNAs candidatos.**

Células HEK Blue TLR8 fueron cultivadas con 100nM (0.7ug/mL) de cada miRNA y a cada periodo de tiempo indicado se tomó una muestra del medio para evaluar la activación de NF-kB (A), se muestra el resultado de un experimento cuantificado por espectrofotometría por su absorbancia a 620nm al menos por duplicado. Se evaluó la activación del factor de transcripción a diferentes concentraciones de miRNAs: 100nM (0.7ug/mL) a 48 horas (B) y 15ug/mL a 24 horas (C), se muestran resultados de dos experimentos independientes, cuantificados por sextuplicado. Actividad NF-kB= Absorbancia de cada condición - absorbancia células sin tratamiento. En CMN la activación de NF-kB fue evaluada por inmunofluorescencia tras 2 horas de cultivo con 20ug/mL de cada miRNA a través de la fosforilación de la subunidad p65 del factor de transcripción (D) y se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (IMF) del canal de FITC (verde) por célula para cada condición, resultados representativos de un experimento.

## 6. Los miRNAs secretados por blastos leucémicos de LLA inducen la producción de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento en células mononucleares

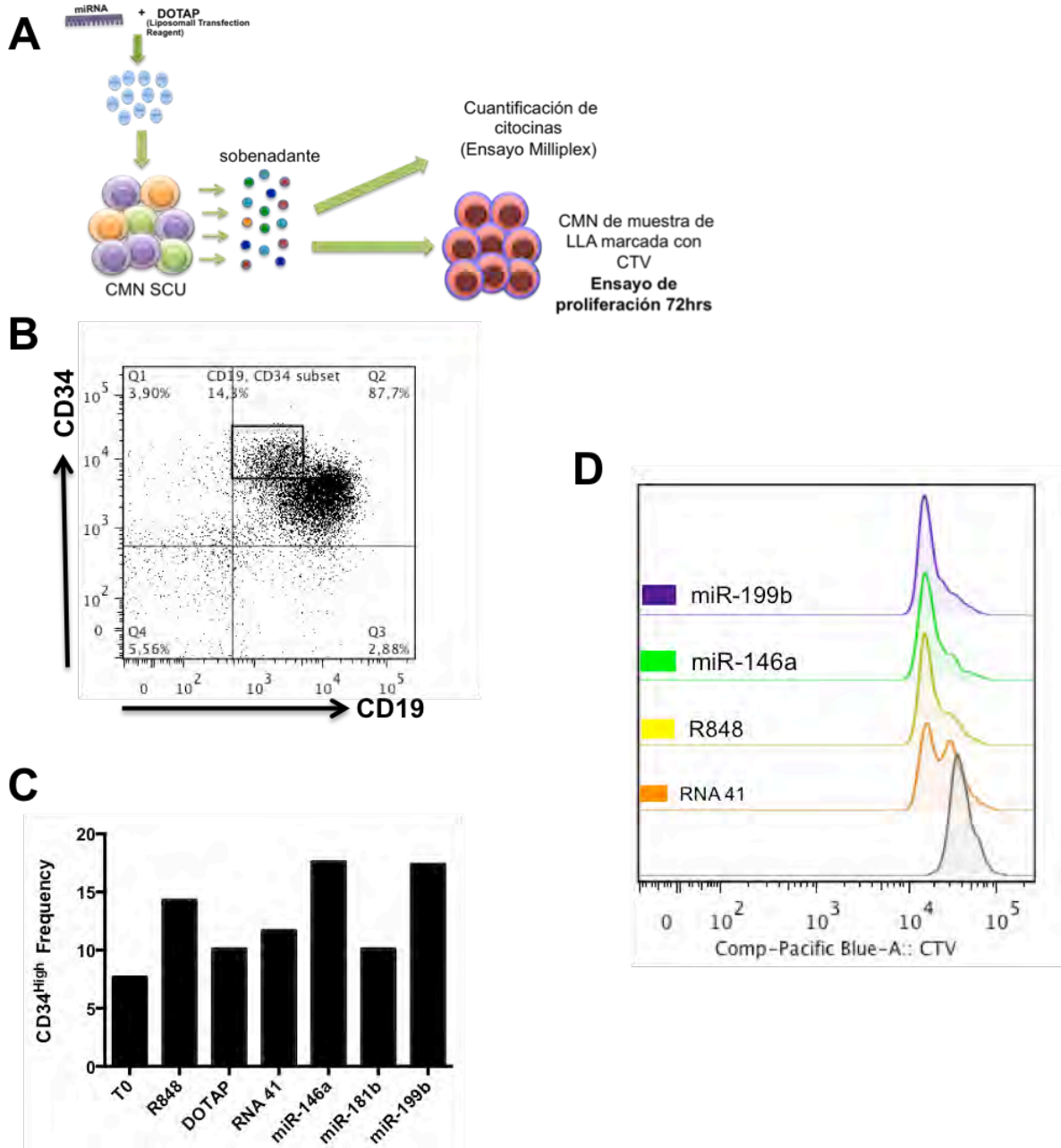
La señalización que resulta de la unión del TLR8 con sus ligandos, ya sean cadena sencilla de RNA o agonistas químicos, induce la producción de algunas citocinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento, principalmente mediado por la activación de NF- $\kappa$ B. Por ello, para conocer si la unión de nuestros miRNAs con el TLR8 provoca la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento y por tanto pudiera influir en el balance de estos factores en el microambiente de la médula ósea, se colectaron sobrenadantes de 24 horas de células mononucleares que fueron estimuladas independientemente con cada miRNA. Con ellos se llevó a cabo un ensayo Milliplex con el que se mostró un incremento en la producción de G-CSF, IL-10, IL-1 $\beta$ , MCP-1 y TNF- $\alpha$ , todos regulados por NF- $\kappa$ B, en las condiciones con miRNAs respecto a los controles sin estímulo, DOTAP y RNA41 (Figura 9). En conjunto, estos datos sugieren una posible contribución de dichos miRNAs producidos aberrantemente en LLA a la presencia de factores pro-inflamatorios en la médula ósea leucémica.



**Figura 9. Producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por células mononucleares tras la estimulación con miRNAs sobre-expresados en LLA.**  $2 \times 10^5$  CMN de SCU fueron cultivadas con 20ug/mL de cada miRNA durante 24 horas, a este tiempo se colectaron los sobrenadantes de cada condición y la concentración de citocinas fue evaluada con un ensayo Milliplex. Datos normalizados a la producción en la condición sin tratamiento, representativos de un experimento.

## **7. Los factores solubles producidos por las células hematopoyéticas tras la estimulación con miRNAs aumentan la frecuencia de una población primitiva CD34<sup>+High</sup> e inducen su proliferación**

Es incierto el impacto de la constante señalización de TLRs inducida por miRNAs en la activación de vías inflamatorias dentro del órgano central de la hematopoyesis en humanos. Para investigarlo, el sobrenadante de las células mononucleares que fueron estimuladas con miRNAs durante 24 horas fue utilizado en un cultivo de células mononucleares provenientes de médula ósea de paciente con LLA, previo a la evaluación de la proliferación tras 72 horas. Se encontró un incremento en la proliferación y frecuencia de una población primitiva CD34<sup>+High</sup> CD19<sup>+</sup> con los sobrenadantes provenientes de células estimuladas con R848, miR-146a y miR-199b (Figura 10C, 10D), siendo ambos miRNAs los que mostraron mayor inducción de activación del factor de transcripción NF-κB en las células receptoras y mayor producción de las citocinas y factores evaluados, sugiriendo un efecto indirecto mediado por el microambiente en respuesta a los miRNAs.



**Figura 10. Los sobrenadantes de cultivos de células estimuladas con miRNAs inducen la proliferación de una población CD34<sup>High</sup> en LLA.**  $1 \times 10^5$  CMN provenientes de una muestra de MO de un paciente con LLA de recién diagnóstico se marcaron con Cell Trace Violet (CTV) y se pusieron en cultivo 1:1 con sobrenadantes provenientes de las CMN SCU previamente estimuladas con cada uno de los miRNAs (1 parte de medio de cultivo por una parte de sobrenadante) como se muestra en (A). Tras 72 horas de cultivo, se colectaron las células y se realizó una tinción para citometría de flujo de los marcadores CD34 y CD19, con lo que se identificó una población hematopoyética CD34<sup>High</sup> (B) de las cuales se cuantificó su frecuencia (C) y se evaluó su proliferación a través de la dilución de CTV (D). Los datos representan los resultados obtenidos con una muestra de LLA.

## IX. DISCUSIÓN

Las células troncales y progenitoras hematopoyéticas se encuentran en la médula ósea, no como unidades independientes, sino inmersas en un microambiente con el cual mantienen señales interdependientes críticas para su mantenimiento, proliferación y diferenciación. El microambiente de la médula ósea es una estructura tridimensional altamente organizada, constituida por una red celular entre las que se encuentran células mesenquimales, osteoblastos, endoteliales, fibroblastos, adipocitos, macrófagos y sus productos (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento)<sup>12</sup>. Dentro de las interacciones microambientales, el eje CXCL12-CXCR4 entre las células del estroma y células hematopoyéticas ha sido identificado como crucial para el desarrollo más temprano de células B. FLT3L e IL-7 también han demostrado ser esenciales para el desarrollo linfóide, ésta última identificada por su habilidad para inducir la proliferación de células pro-B<sup>67</sup>. Mientras que la expresión de SCF en células endoteliales y perivasculares parece ser esencial para el mantenimiento de HSCs<sup>17</sup>.

La leucemia linfoblástica aguda se caracteriza por una hematopoyesis aberrante, cuyos mecanismos subyacentes responsables del origen, desarrollo y mantenimiento de la enfermedad aún están siendo dilucidados. Ha sido mostrado que la proliferación leucémica en la médula ósea es capaz de provocar alteraciones en el microambiente en detrimento de la hematopoyesis normal<sup>33</sup>. En muestras de pacientes con leucemia se ha encontrado abatido el número de células hematopoyéticas primitivas, las cuales han demostrado tener deficiencias funcionales en cuanto a su diferenciación y generación de células linfoides maduras<sup>12</sup>. De especial interés en nuestro laboratorio ha sido entender la contribución de factores microambientales en el mantenimiento de los precursores leucémicos. El reciente hallazgo de células mononucleares altamente productoras de factores pro-inflamatorios en la MO leucémica, probablemente mediados por la activación de NF- $\kappa$ B y STAT3<sup>31</sup>; así como la identificación de una elevada producción de factores pro-inflamatorios por células mesenquimales derivadas de médula ósea de pacientes con leucemia<sup>68</sup> han aportado luz en el conocimiento de los fenómenos que podrían estar ocurriendo en la médula ósea y que podrían ser

identificadores de leucemias de peor pronóstico cuyas implicaciones clínicas aún son inciertas, sugiriendo la presencia de un estímulo inductor endógeno de factores causantes de un microambiente inflamatorio, ya que clínicamente estos pacientes no presentan datos de infección subyacente.

Recientemente se ha reportado el descubrimiento de ligandos no patogénicos como los miRNAs para el receptor TLR7 murino y TLR8 humano en enfermedades neurodegenerativas y en cáncer de pulmón respectivamente<sup>30,57</sup>, lo cual ha aportado una nueva pieza dentro del contexto del microambiente en la enfermedad. La desregulación de la expresión de miRNAs se ha reportado en diferentes tipos de cáncer y se han identificado marcas características de expresión de miRNAs en tejidos transformados respecto a su contraparte normal<sup>52</sup>. Además de esto, su participación en la comunicación intercelular se ha demostrado al identificar la presencia de ciertos miRNAs en exosomas secretados por las células tumorales capaces de ser recibidos por las otras células del microambiente, sin embargo, su actividad más allá de su regulación post-transcripcional se encuentra poco explorada. El conocimiento sobre la participación de los miRNAs en la comunicación intercelular en el contexto de la leucemia linfoblástica aguda es limitado. Nuestro trabajo constituye el primero en evaluar su función como inductores inflamatorios en este microambiente leucémico.

Los mecanismos a través de los cuales las células leucémicas participan en la inducción y/o mantenimiento de una inflamación microambiental que afecte la biología de la hematopoyesis normal, aún están siendo identificados. Este proyecto surge de investigar el posible papel de los miRNAs tumorales de actuar como DAMPs, induciendo un estímulo inflamatorio sutil pero constante como ligandos de TLR8. Por tanto, adicional a su papel de reguladores post-transcripcionales, podrían influir en el balance de factores solubles en la MO y contribuir a la alteración de los nichos hematopoyéticos observada en LLA.

Los exosomas purificados de la línea celular de LLA, REH mostraron ser activadores de la vía de NF- $\kappa$ B en células estromales HS-5 y en células mononucleares, indicando que diversos tipos celulares que forman parte del microambiente de la médula ósea pueden ser receptores de exosomas tumorales. Este resultado coincide con lo observado con exosomas de otros tipos tumorales,



sin embargo, hay evidencia que apunta a diferentes moléculas responsables de la activación de NF- $\kappa$ B, ya que se han identificado diferentes ligandos de TLRs en exosomas: Hsp72 de TLR2, FN1 de TLR4 y miRNAs de TLR8<sup>57,69,70</sup>. La transferencia de RNA funcional de los exosomas hacia las células receptoras ha sido documentada, por lo que para enfocarnos en ciertos miRNAs, usamos herramientas *in silico* para proponer candidatos a estar presentes en exosomas secretados por los blastos leucémicos, ya que no se conoce información al respecto.

Los datos sobre miRNAs secretados en LLA son escasos y los que existen son con muestras de sangre periférica, que podrían no estar reflejando lo que ocurre en la médula ósea<sup>71</sup>. Nosotros seleccionamos 3 miRNAs con base en su sobre-expresión en LLA y en su secuencia: miR-146a-5p, miR-181b-5p y miR-199b-3p. En este trabajo mostramos que estos 3 miRNAs sobre-expresados en leucemia son secretados en exosomas de 3 diferentes líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda de precursores de B: Nalm-6, REH y RS4;11, líneas celulares que fueron aisladas de pacientes en recaída. De los tres miRNAs, miR-181b fue el que se encontró mayormente presente y de manera más homogénea en los exosomas de las tres líneas, este miRNA se ha reportado como sobre-expresado en LLA tanto de linaje B como T<sup>72</sup>. Interesantemente, los tres miRNAs se encontraron más abundantemente presentes en los exosomas de la línea celular RS4;11. Dicha línea es derivada de una muestra de médula ósea y es del tipo MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) con la translocación t(4;11)(q21;q23) que se clasifica como una leucemia de alto riesgo y en general se ha relacionado con baja respuesta al tratamiento<sup>73</sup>. Por lo que sería importante, investigar más extensamente si la secreción de estos miRNAs se puede relacionar con leucemias de alto riesgo.

La inmunoprecipitación mostró la unión al TLR8 de cada uno de los miRNAs evaluados, y una mayor unión a la concentración de 100nM para casi todos los miRNAs, posiblemente debido a una saturación del receptor. Para miR-199b se necesitó una mayor concentración del miRNA para alcanzar una unión similar a la de los otros 2 miRNAs.

En células humanas se ha visto que los ligandos del receptor TLR8 son imidazoquinolinas y secuencias de RNA de cadena sencilla. La unión al receptor

tiene que ver con la composición de la secuencia de RNA. No se ha identificado una determinante específica para la activación, sin embargo, varios reportes han evaluado la activación del receptor con diferentes combinaciones de nucleótidos. Se conoce que una secuencia rica en uridinas y en motivos GU actuará como un mejor ligando, ya que los 2 sitios de unión al receptor actúan de manera sinérgica, así como se cree que el nucleótido en la posición #20 de la secuencia es importante en la modulación de la activación<sup>30,57,59,62,74</sup>. Los motivos GGUU (miR-199b), GUGG (miR-181b) y GGGU (miR-146a) presentes en posiciones terminales de secuencias de RNA han sido evaluadas en otros trabajos en su capacidad para activar TLR7 y TLR8 han mostrado activar la vía de NF-κB, siendo de entre las 3, GGUU la que mostró mayor activación<sup>57</sup>. Esto coincide con lo observado por nosotros, donde miR-199b fue el que a las diferentes concentraciones y tiempos evaluados indujo mayor activación de este factor de transcripción en los ensayos de reportero y también se observó su activación por inmunofluorescencia. Sin embargo, para conocer con certeza los nucleótidos indispensables para su actividad como ligando, habría que mutar éstos de la secuencia y evaluar el efecto en la activación del receptor. Así como también será de gran importancia medir experimentalmente las interacciones electrostáticas específicas de cada una de las secuencias de estos miRNAs con los sitios de unión identificados del receptor, para poder entender más claramente su avidéz como ligandos. Cabe la posibilidad que existan otros miRNAs con secuencias ricas en U y motivos GU que pudieran estar teniendo esta actividad, sin embargo, miR-199b, miR-146a y miR-181b son los primeros miRNAs identificados como secretados en exosomas de las líneas celulares de LLA. Datos obtenidos de otros estudios de miRNAs en muestras de pacientes con LLA, utilizados para el análisis *in silico*, indican que posiblemente estos miRNAs se encuentren sobre-expresados durante la enfermedad, lo cual incrementa la relevancia de su participación en la comunicación intercelular y posibilidad de fungir como ligandos de TLR8 induciendo un constante estímulo inflamatorio en la células del microambiente de la médula ósea.

La relación entre inflamación y cáncer ha sido extensamente estudiada, algunos autores coinciden en que las primeras asociaciones fueron hechas por Virchow alrededor de 1863. A partir de entonces, elementos inflamatorios han sido

identificados en tumores en diferentes tejidos. En algunos casos, la inflamación ha sido asociada a algún patógeno como es el caso de *Helicobacter pylori* en cáncer gástrico y Virus de Papiloma Humano en cáncer cervicouterino. NF-κB ha sido identificado como el principal vínculo de asociación entre inflamación y cáncer, ya que se ha encontrado constitutivamente activo en diferentes tipo de tumores sólidos y en malignidades hematológicas. Se ha identificado la ocurrencia de mutaciones que provocan esta actividad, sin embargo, las alteraciones genéticas en este factor de transcripción sólo dan explicación en algunos casos como amplificaciones del gen *Rel* en linfomas no-Hodgkin<sup>75</sup>. La activación constitutiva de NF-κB se ha identificado como una característica de células troncales leucémicas en Leucemia Mieloide Aguda y recientemente por los hallazgos de nuestro laboratorio, también se ha identificado en algunos pacientes con LLA la activación constitutiva de este factor de transcripción. En este trabajo identificamos que miRNAs secretados por células leucémicas podrían estar contribuyendo a este fenómeno observado en LLA, ya que tras comprobar la unión al TLR8, observamos la activación del factor de transcripción NF-κB en células estimuladas con nuestros miRNAs candidatos, siendo miR-199b el que indujo una mayor activación seguido de miR-146a y por último en menor medida miR-181b. Coincidiendo con este resultado, tras la estimulación, también observamos un aumento en la producción de factores regulados por este factor de transcripción, entre ellos las citocinas pro-inflamatorias IL-1β y TNF-α. El aumento en la producción de estos factores puede tener consecuencias importantes en la médula ósea leucémica. Ambos elementos se han visto involucrados en un aumento en la supervivencia de células leucémicas probablemente por la activación de la vía PI3K-Akt<sup>76,77</sup>. Ante incrementos de TNF-α se ha visto la movilización de células hematopoyéticas primitivas a la periferia probablemente como consecuencias de una disminución de CXCL12<sup>78</sup>. G-CSF se ha visto implicado en la movilización de células hematopoyéticas fuera de la médula ósea, ya que interfiere en las uniones CXCR4/CXCL12<sup>79</sup>, eje que se ha visto afectado en LLA. En pacientes con LLA en recaída de ha documentado la sobreexpresión de IL-10 en comparación con controles normales<sup>80</sup>, sugiriendo su participación en el mantenimiento de la enfermedad. Además, MCP-1 ha sido

documentada por nosotros tras la estimulación de precursores hematopoyéticos de LLA por ligandos de TLRs<sup>22</sup>.

El fenómeno que estamos observando podría ser una para-inflamación, término acuñado por Medzhitov para hacer referencia a una inflamación de bajo grado iniciada por disfunción de un tejido, inicialmente para restaurar la homeostasis pero que si se vuelve crónica puede contribuir a la progresión hacia la enfermedad<sup>81</sup>. Este tipo de estado inflamatorio ha sido reportado en escenarios como la degeneración macular y en tumores como el cáncer colorectal<sup>82,83</sup>. En la leucemia, los miRNAs elevados tras la transformación celular podrían ser un estímulo sutil pero constante de daño celular en las células del microambiente, induciendo una respuesta inflamatoria sostenida como consecuencia de la activación del TLR8. En este trabajo únicamente se evaluaron los miRNAs secretados a través de exosomas, sin embargo debemos considerar también que en el microambiente tumoral hay constante muerte celular, por lo que de esta forma, entre otros DAMPs, también podrían estarse liberando miRNAs de las células tumorales que puedan ser recibidos por células circundantes. Se han identificado extracelularmente miRNAs en complejos con la proteína Argonauta2<sup>84</sup> y asociados a lipoproteínas de alta densidad (HDL), que se ha visto pueden participar en la comunicación intercelular al ser entregados y funcionales en células diferentes a las que les dieron origen<sup>85</sup>. Recientemente también se ha reportado la transferencia intercelular de miRNAs a través de uniones tipo gap, siendo más permeable para este tipo de moléculas Cx43<sup>86</sup>. Conocer qué tipo celular dentro del grupo de células mononucleares son las que están respondiendo, está actualmente bajo evaluación. Así como también será interesante conocer si miRNAs pueden ser efectores en otras células del microambiente como las células mesenquimales, osteoblastos o endoteliales.

La activación del TLR8 podría tener consecuencias en la médula ósea a diferentes niveles. Además de la producción de factores inflamatorios, se ha descrito en células CD34<sup>+</sup> provenientes de médula ósea que la interacción de TLR7/8 con sus ligandos, sin la adición de citocinas, induce su diferenciación hacia células de linaje mieloide<sup>87</sup>. En el caso de la estimulación de precursores leucémicos, los ligandos de TLR7/8 indujeron la producción de células mieloides y

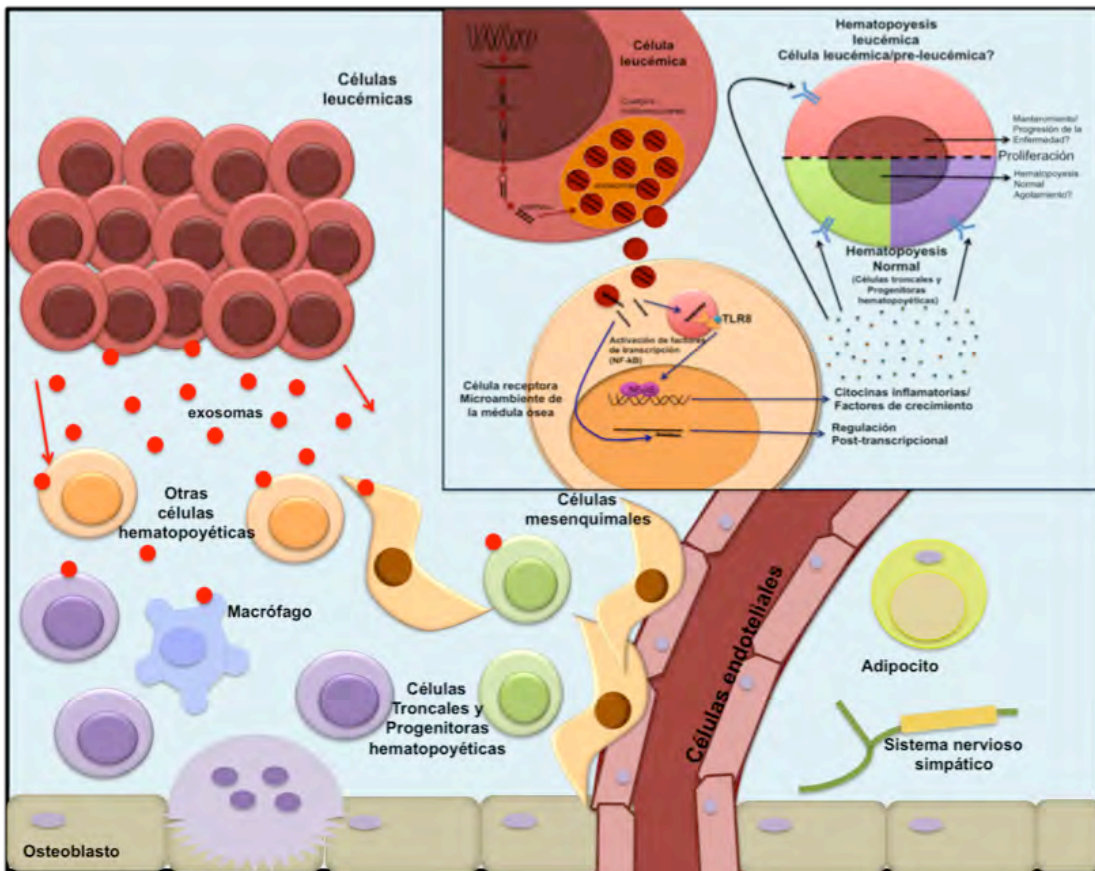
NK<sup>22</sup>. También se ha reportado un aumento en la expresión de la molécula de co-estimulación CD40 tras la activación del TLR8<sup>59</sup>, la cual se ha encontrado sobre-expresada en los blastos de pacientes con LLA en recaída<sup>80</sup>.

Además del efecto directo sobre las células que recibieron los miRNAs, observamos que podría estar ocurriendo un efecto *bystander* como consecuencia de la alteración de factores solubles en el microambiente inducidos por la ligación del TLR8. Esto lo vimos al trasladar estos sobrenadantes a un contexto leucémico al usar CMN de un paciente con LLA. El cultivo con los sobrenadantes descritos anteriormente, provocó la proliferación de una población primitiva CD34<sup>+High</sup>, así como un aumento en su frecuencia con los sobrenadantes provenientes de CMN estimuladas con R848, miR-146a y miR-199, siendo estos los 2 miRNAs que habían inducido una mayor producción de citocinas inflamatorias. Ha sido reportado que la presencia de condiciones inflamatorias induce la proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos normales<sup>31</sup> y que factores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$  influyen en el comportamiento de poblaciones hematopoyéticas primitivas<sup>87-89</sup>. Un constante estímulo inflamatorio pudiera favorecer una hematopoyesis emergente a costa de la proliferación y diferenciación del acervo de HSCs normales residuales.

Hasta el momento desconocemos si las células que están respondiendo ante la presencia de los sobrenadantes son células hematopoyéticas normales o leucémicas. En cualquiera de los casos, estos hallazgos aportan una pieza importante en el entendimiento de la enfermedad, que nos permite proponer un modelo (Figura 11) en el cual las células leucémicas estén llevando a cabo un mecanismo basado en la secreción de algunos de sus miRNAs para remodelar el microambiente de la médula ósea. Estos miRNAs pueden ser secretados a través de exosomas y ser recibidos por las demás células presentes en el microambiente de la MO, actuando como un estímulo sutil pero constante activador de TLR8, y contribuyendo a la producción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que ejercen un efecto en células hematopoyéticas primitivas. Ante esto planteamos 2 escenarios tentativos: si las células impactadas, son células hematopoyéticas normales que están siendo inducidas a proliferar, esto podría implicar un progresivo agotamiento del acervo de la hematopoyesis normal residual aún presente en la

médula ósea. Por otro lado, si las células que están respondiendo son células leucémicas o pre-leucémicas a las cuales se induce su proliferación, sugeriría que este ambiente pudiera contribuir al mantenimiento y progresión de la enfermedad expandiendo la población de células malignas en la médula ósea.

Sería interesante conocer si en los efectos observados tras la estimulación con miRNAs también están participando otros mecanismos celulares relacionados, como podría ser el inflamasoma, del cual se conoce que la activación de NF- $\kappa$ B incrementa la expresión de NLRP3, y que la activación por ligandos de TLR causa el *priming* de NLRP3 mediado por caspasa 8<sup>88</sup>. En concordancia, en pacientes con LLA resistente a quimioterapia con glucocorticoides se ha identificado una sobreexpresión de *NALP3* y *CASP1*<sup>89</sup>.



**Figura 11. Modelo propuesto de la participación de miRNAs tumorales en la remodelación del microambiente de la médula ósea.** Los miRNAs secretados por las células leucémicas pueden actuar como elementos de la comunicación intercelular con la capacidad de actuar como ligandos de TLR8, induciendo la producción de factores inflamatorios que influyen en la proliferación de una población de células hematopoyética primitivas.

## **X. CONCLUSIONES**

Las células tumorales en la leucemia linfoblástica aguda secretan exosomas que pueden fungir como elementos de la intercomunicación celular con el microambiente y ser recibidos por otras categorías celulares hematopoyéticas. Los microRNAs miR-199b, miR-146a y miR-181b contenidos en dichos exosomas pueden actuar como ligandos de TLR8, inducir la activación de NF- $\kappa$ B, la producción de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento hematopoyético, y promover la activación de vías de señalización pro-inflamatorias. Este fenómeno pudiera contribuir a la remodelación de los nichos hematopoyéticos e inducir intermitentemente la proliferación de una población hematopoyética primitiva.

## **XI. PERSPECTIVAS**

1. Identificar la estirpe celular que responde ante la estimulación con los miRNAs leucémicos.
2. Evaluar los efectos de estos microRNAs en otros compartimientos de la médula ósea, como células mesenquimales, osteoblastos y células endoteliales.
3. Evaluar la participación del inflamasoma en el fenómeno observado.
4. Investigar la relación de los efectos observados con la función de los miRNAs como reguladores post-transcripcionales.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Welner, R. S., Kincade, P. W. & Pelayo, R. Linfopoyesis temprana en médula ósea adulta. *Inmunología* **26**, 135–144 (2007).
2. Mayani, H., Flores-Figueroa, E. & Pelayo, R. Hematopoyesis. *Cancerología* **2**, 95–107 (2007).
3. Seita, Jun; Weissman, I. L. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 640–653 (2010).
4. Pelayo, R., Dorantes-acosta, E., Vadillo, E. & Fuentes-pananá, E. From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. *InTech* 277–298 (2012).
5. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).
6. Vadillo, E. & Pelayo, R. *Células Troncales y Medicina Regenerativa: El Sistema Hematopoyético a partir de Células Troncales*. (2010).
7. Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H. & Suda, T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* **141**, 4656–66 (2014).
8. Welner, R. S., Pelayo, R. & Kincade, P. W. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol* **8**, 95–106 (2008).
9. Doulatov, S. *et al.* Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat. Immunol.* **11**, 585–593 (2010).
10. Mejía-aranguré, J. M. *Etiology of Acute Leukemias in Children*.
11. Male, V. *et al.* The transcription factor E4bp4 / Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. **211**, (2014).
12. Purizaca, J., Meza, I. & Pelayo, R. Early Lymphoid Development and Microenvironmental Cues in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Arch. Med. Res.* **43**, 89–101 (2012).
13. Sugiyama, T. & Nagasawa, T. Bone Marrow Niches for Hematopoietic Stem Cells and Immune Cells. 201–206 (2012).
14. Nagasawa, T., Omatsu, Y. & Sugiyama, T. Control of hematopoietic stem cells



- by the bone marrow stromal niche: The role of reticular cells. *Trends Immunol.* **32**, 315–320 (2011).
15. Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841–846 (2003).
  16. Flores-Figueroa, E. in *Células Troncales y medicina Regenerativa* (eds. Pelayo, R., Santa-Olalla, J. & Velasco, I.) 175–193 (Universidad Nacional Autónoma de México, 2011).
  17. Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G. & Morrison, S. J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457–62 (2012).
  18. Mendelson, A. & Frenette, P. S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* **20**, 833–846 (2014).
  19. Ding, L. & Morrison, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 1–7 (2013). doi:10.1038/nature11885
  20. Ema, H., Morita, Y. & Suda, T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **42**, 74–82.e2 (2014).
  21. Wild, C. P. World Cancer Report 2014.
  22. Dorantes-Acosta, E. *et al.* TLR stimulation of bone marrow lymphoid precursors from childhood acute leukemia modifies their differentiation potentials. *Biomed Res. Int.* **2013**, 846724 (2013).
  23. Pérez-Saldivar, M. L. *et al.* Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* **11**, 355 (2011).
  24. Pelayo, R. Linfopoyesis temprana y leucemia aguda linfoblástica infantil. **12**, 78–80 (2011).
  25. le Viseur, C. *et al.* In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Blasts at Different Stages of Immunophenotypic Maturation Have Stem Cell Properties. *Cancer Cell* **14**, 47–58 (2008).
  26. Greaves, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 193–203 (2006).
  27. Espinoza-herna, L., Cruz-rico, J., Beni, H., Rodri, C. & Mayani, H. In vitro characterization of the hematopoietic system in pediatric patients with acute

- lymphoblastic leukemia Guadalupe Martí ´ a Antonieta Ve. **25**, 295–303 (2001).
28. Mrózek, K., Harper, D. P. & Aplan, P. D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **23**, 991–1010, v (2009).
  29. Bekker-méndez, V. C. *et al.* Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia : A Population Study — Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. **2014**, (2014).
  30. Lehmann, S. M. *et al.* An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* **15**, 827–35 (2012).
  31. Vilchis-Ordoñez, A. *et al.* Bone Marrow Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia Create a Proinflammatory Microenvironment Influencing Normal Hematopoietic Differentiation Fates. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–14 (2015).
  32. Lauer, J. & Raimondi, C. Philadelphia Lymphoblastic. *Nature* **70**, (1987).
  33. Colmone, A. *et al.* Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* **322**, 1861–5 (2008).
  34. Erez, N., Truitt, M., Olson, P. & Hanahan, D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Cancer Cell* **17**, 135–147 (2010).
  35. Guzman, M. L. *et al.* Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **98**, 2301–7 (2001).
  36. Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431–436 (2006).
  37. Balkwill, F. R. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 33–40 (2012).
  38. Sioud, M. & Fløisand, Y. TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitors into CD11c+ CD80/86+ DC capable of inducing a Th1-type response. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2834–2846 (2007).

39. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524 (2014).
40. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 99–110 (2011).
41. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**, 102–114 (2008).
42. Bernstein, E. *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* **35**, 215–217 (2003).
43. Ling, H., Fabbri, M. & Calin, G. a. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 847–65 (2013).
44. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
45. Salido-Guadarrama, I., Romero-Cordoba, S., Peralta-Zaragoza, O., Hidalgo-Miranda, A. & Rodríguez-Dorantes, M. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco. Targets. Ther.* **7**, 1327–1338 (2014).
46. Georgantas, R. W. *et al.* CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2750–5 (2007).
47. Zhao, J. L. & Starczynowski, D. T. Role of microRNA-146a in normal and malignant hematopoietic stem cell function. *Front. Genet.* **5**, 219 (2014).
48. Koralov, S. B. *et al.* Dicer Ablation Affects Antibody Diversity and Cell Survival in the B Lymphocyte Lineage. *Cell* **132**, 860–874 (2008).
49. Havelange, V. & Garzon, R. Micrnas: Emerging key regulators of hematopoiesis. *Am. J. Hematol.* **85**, 935–942 (2010).
50. Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D. P. & Lodish, H. F. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7080–5 (2007).

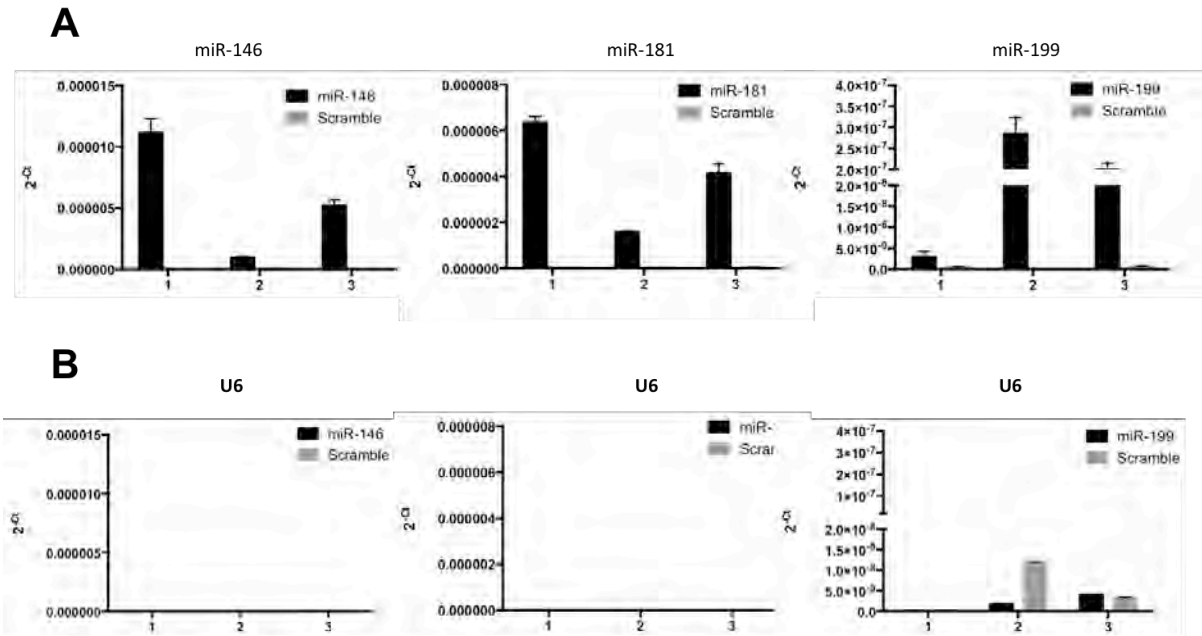
51. Calin, G. a & Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 857–66 (2006).
52. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–9 (2002).
53. Pekarsky, Y. & Croce, C. M. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ.* 1–6 (2014). doi:10.1038/cdd.2014.87
54. Tkach, M. & Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226–1232 (2016).
55. Paggetti, J. *et al.* Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* **126**, blood-2014-12-618025 (2015).
56. Raaijmakers, M. H. G. P. *et al.* Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852–7 (2010).
57. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. **109**, (2012).
58. O'Neill, L. a J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–60 (2013).
59. Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–1529 (2004).
60. Challagundla, K. B. *et al.* Exosome-Mediated Transfer of microRNAs Within the Tumor Microenvironment and Neuroblastoma Resistance to Chemotherapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**, djv135-djv135 (2015).
61. Keene, J. D., Komisarow, J. M. & Friedersdorf, M. B. RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nat. Protoc.* **1**, 302–7 (2006).
62. Tanji, H. *et al.* Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 109–115 (2015).
63. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
64. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular

- Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **30**, 255–89 (2014).
65. Qin, J. *et al.* TLR8-mediated NF-kappaB and JNK activation are TAK1-independent and MEKK3-dependent. *J. Biol. Chem.* **281**, 21013–21 (2006).
  66. Hoesel, B. & Schmid, J. a. The complexity of NF-kB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86 (2013).
  67. Nagasawa, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 107–116 (2006).
  68. Balandran, J. C. *et al.* Pro-inflammatory-related loss of CXCL12 niche promotes acute lymphoblastic leukemic progression at the expense of normal lymphopoiesis. *Front. Immunol.* **7**, 1–14 (2017).
  69. Chalmin, F. *et al.* Membrane associated Hsp72 from tumor derived exosomes mediates STAT3 dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 467–471 (2010).
  70. Zhang, B. *et al.* Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev.* **23**, 1233–44 (2014).
  71. Lu, L. *et al.* Regulation of the expression of zinc finger protein genes by micrnas enriched within acute lymphoblastic leukemia-derived microvesicles. *Genet. Mol. Res.* **14**, 11884–11895 (2015).
  72. Duyu, M. *et al.* Prospective evaluation of whole genome microRNA expression profiling in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biomed Res Int* **2014**, 967585 (2014).
  73. Behm, F. G. *et al.* Rearrangement of the MLL Gene Confers a Poor Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Regardless of Presenting Age. **87**, 2870–2877 (1996).
  74. Forsbach, A. *et al.* Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J. Immunol.* **180**, 3729–3738 (2008).
  75. Gilmore, T. D. The Rel/NF-KB/IKB Signal Transduction Pathway and Cancer. *Signal Transduct. Cancer* 241–265 (2004).
  76. Turzanski, J., Grundy, M., Russell, N. H. & Pallis, M. Interleukin-1beta maintains an apoptosis-resistant phenotype in the blast cells of acute myeloid

- leukaemia via multiple pathways. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **18**, 1662–1670 (2004).
77. Gu, L., Findley, H. W., Zhu, N. & Zhou, M. Endogenous TNFalpha mediates cell survival and chemotherapy resistance by activating the PI3K/Akt pathway in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* **20**, 900–904 (2006).
  78. Ueda, Y., Yang, K., Foster, S. J., Kondo, M. & Kelsoe, G. Inflammation Controls B Lymphopoiesis by Regulating Chemokine CXCL12 Expression. *J. Exp. Med.* **199**, 47–58 (2004).
  79. Bendall, L. J. & Bradstock, K. F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 355–367 (2014).
  80. Kebelmann-Betzing, C. *et al.* Characterization of Cytokine, Growth Factor Receptor, Costimulatory and Adhesion Molecule Expression Patterns of Bone Marrow Blasts in Relapsed Childhood B Cell Precursor All. *Cytokine* **13**, 39–50 (2001).
  81. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
  82. Chen, M. & Xu, H. Parainflammation , chronic inflammation , and age-related macular degeneration. **98**, 713–725 (2016).
  83. Pribluda, A. *et al.* A Senescence-Inflammatory Switch from Cancer-Inhibitory to Cancer-Promoting Mechanism. *Cancer Cell* **24**, 242–256 (2013).
  84. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5003–8 (2011).
  85. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* **13**, 423–433 (2011).
  86. Zong, L., Zhu, Y., Liang, R. & Zhao, H.-B. Gap junction mediated miRNA intercellular transfer and gene regulation: A novel mechanism for intercellular genetic communication. *Sci. Rep.* **6**, 19884 (2016).
  87. Sioud, M., Floisand, Y., Forfang, L. & Lund-Johansen, F. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+

- progenitor cells along the myeloid lineage. *J Mol Biol* **364**, 945–954 (2006).
88. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **21**, 677–687 (2015).
  89. Paugh, S. W. *et al.* NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat. Genet.* **47**, 607–614 (2015).

### XIII. ANEXO



**Figura suplementaria 1.** Resultados de tres experimentos independientes de la inmunoprecipitación del TLR8 a partir de células HEK293 que expresan un TLR8-flag cultivadas con 100nM del respectivo miRNA (A) la RT-PCR se llevó a cabo por triplicado para cada condición. A la vez se realizó una RT-PCR para el RNA pequeño nuclear U6 como control de la especificidad de la inmunoprecipitación (B).