



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Participación de let-7g en la agresividad tumoral de células  
de meduloblastoma**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**FABIOLA RUIZ MADRIGAL**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DE LOURDES ÁLVAREZ ARELLANO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **1. Datos del alumno**

Ruiz  
Madrigal  
Fabiola  
55 54 62 56 66  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311194180

## **2. Datos del tutor**

Álvarez  
Arellano  
María de Lourdes

## **3. Datos del sinodal 1**

Eguía  
Aguilar  
María del Pilar

## **4. Datos del sinodal 2**

Gómez  
Manzo  
Saúl

## **5. Datos del sinodal 3**

Álvarez  
Arellano  
María de Lourdes

## **6. Datos del sinodal 4**

Corona  
Castillo  
Juan Carlos

## **7. Datos del sinodal 5**

Santibáñez  
Andrade  
Miguel

## **7. Datos del trabajo escrito**

Participación de let-7g en la agresividad tumoral de células de meduloblastoma

59p

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
Directora General  
Dirección General de Administración Escolar  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Participación de let-7g en la agresividad tumoral de células de meduloblastoma**

realizado por Fabiola Ruiz Madrigal con número de cuenta 311194180 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. María del Pilar Eguía Aguilar

Propietario Dr. Saúl Gómez Manzo

Propietaria Dra. María de Lourdes Álvarez Arellano  
Tutora

Suplente Dr. Juan Carlos Corona Castillo

Suplente Dr. Miguel Santibáñez Andrade

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 28 DE MARZO DE 2019

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de Lourdes Álvarez Arellano por permitirme integrarme en su grupo de trabajo y apoyarme académicamente a lo largo del proyecto.

A mis sinodales por su tiempo, contribuciones y observaciones que me permitieron enriquecer mi proyecto y fortalecerlo.

A la Bióloga Experimental Sandra Bordenave Encarnación por su ayuda y asesoría en diversas técnicas utilizadas a lo largo del proyecto.

Al Dr. Vadim Pérez Koldenkova, del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su asesoría y apoyo técnico en la realización de ensayos de inmunofluorescencia por microscopía confocal.

A la Dra. Pilar Eguía Aguilar y al Biólogo Jorge Luis García Quintana, del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica y Experimental, por su asesoría y apoyo técnico en la realización de las qPCR. Así como por su aportación de RNA de células U373, utilizadas como control de la técnica.

Al Dr. Juan Carlos Corona Castillo por su confianza y hospitalidad en el laboratorio a lo largo de mi estancia.

Al Dr. Pablo Enrique Domínguez López y la Dra. Luz María Rocha Ramírez por su apoyo y permitirme utilizar equipo de sus respectivos laboratorios.

Financiamientos CONACYT Ciencia Básica 253630, CONACYT Infraestructura 269149 y Secretaria de Salud HIM-2017-09-SSA-1304.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Elenita y Roberto, y a mi hermana, Sam, que siempre han creído en mí, me han ayudado a saber enfrentar todos los problemas y cumplir cada una de mis metas. Por darme siempre los mejores consejos y jalarme las orejas cuando debían. Sé que sin sus esfuerzos no sería quien soy ahora, ni quien seré mañana. Espero algún día poder devolverles un poco de lo mucho que me han dado. ♥

A Martín Popilín que me ha demostrado ser más que sólo mi pareja, es mi mejor amigo y compañero. Alentándome a ser mejor persona, apoyándome en mis logros personales, creciendo conmigo, aconsejándome, desvelándose conmigo, escuchando mis ocurrencias y aventuras, buenas o malas, y brindándome su amor de mil y un maneras. Siempre estaré agradecida por ser un gran apoyo para mí.

A mis amigos, casi familia, que siempre están al pendiente de mí, echándome porras, haciéndome saber que confían en mí y motivándome a ser mejor persona con todo su amor, y que a pesar de que no los veo tanto como quisiera forman parte importante en mi vida: Fer Bonilla, Erick Garduño, Andrea Trejo, Sra. Bere Juárez, Sr. Martín Morales, Miguelín y Andrés.

A mis amigos y colegas que siempre me apoyaron con consejos en la elaboración de experimentos y mi tesis, y me han ayudado a crecer como bióloga y persona: Gén Dehesa y Edgar Quezada. Los quiero mucho.

A todos mis profesores, en todos los niveles académicos, que me han ayudado a conocer nuevas áreas y a abrirme un mundo de oportunidades. Los recuerdo a todos con mucho cariño y agradezco infinitamente sus enseñanzas.

A mis tíos, primos y abuelitas que siempre están al pendiente de mis logros personales, estimulándome con sus consejos y sabias palabras. Los quiero.

A mis nuevos amigos que me apoyaron y ayudaron muchas noches para lograr adentrarme en una nueva meta que está por comenzar, por darme consejos para mejorar como científica, tesista y persona: Mariela, Fany y Alex.

# **PARTICIPACIÓN DE LET-7g EN LA AGRESIVIDAD TUMORAL DE CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA**

## **Índice**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>I. Meduloblastoma.....</b>	<b>9</b>
<b>II. microRNAs.....</b>	<b>12</b>
<b>III. Receptores tipo Toll (TLRs) .....</b>	<b>15</b>
<b>IV. ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
<b>V. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>VI. HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>VII. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>VIII. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>21</b>
<b>IX. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>X. Material biológico.....</b>	<b>23</b>
<b>XI. Extracción de RNA .....</b>	<b>23</b>
<b>XII. Retrotranscripción: obtención de cDNA.....</b>	<b>24</b>
<b>XIII. PCR tiempo real de let-7.....</b>	<b>26</b>
<b>XIV. Ensayos de migración.....</b>	<b>27</b>
<b>XV. Ensayos de invasión.....</b>	<b>28</b>
<b>XVI. Cuantificación de citocinas.....</b>	<b>29</b>

<b>XVII. Ensayos de colocalización con inmunofluorescencia y microscopía confocal .....</b>	<b>31</b>
<b>XVIII. Análisis estadístico.....</b>	<b>33</b>
<b>XIX. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>XX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>XXI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>XXII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
<b>XXIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>
<b>XXIV. ANEXOS</b>	
<b>1. Inactivación de Suero Fetal Bovino.....</b>	<b>58</b>
<b>2. Preparación de buffer de carbonatos de sodio (ELISA).....</b>	<b>58</b>
<b>3. Preparación PBS 10X.....</b>	<b>58</b>
<b>4. Tinción con violeta de Genciana.....</b>	<b>59</b>

## RESUMEN

Los meduloblastomas son tumores embrionarios primarios malignos del Sistema Nervioso Central que surgen en el cerebelo, principalmente en niños entre 5 a 7 años. Pese que actualmente existen diversos tratamientos para disminuir el crecimiento de los meduloblastomas, el criterio principal para discernir entre la aplicación de uno u otro es la presencia de metástasis en los pacientes, lo cual representa una problemática ya que no considera la heterogeneidad de los tumores. Aunado a esto se ha comenzado la búsqueda de moléculas pronóstico que permitan mejorar las técnicas de diagnóstico, así como la predicción de respuesta a las terapias y monitoreo de la enfermedad; un ejemplo de ello son los miRNAs. Estas son moléculas cortas de RNA no codificantes, de cadena sencilla, cuya función es regular la expresión génica (vía canónica). En los últimos años se ha reportado que pueden jugar papeles importantes en la regulación de la tumorigénesis, ya que al ser empaquetados en exosomas (vía no canónica) pueden ser transferidos de una célula tumoral a células sanas, e inducir su transformación a célula tumoral. Sin embargo, aún no se sabe el mecanismo por el cual ocurre esta transformación. Así mismo se ha reportado que estos miRNAs liberados en exosomas pueden ser reconocidos por TLRs presentes en células de la respuesta inmune innata, fibroblastos, células epiteliales, entre otros, resultando en la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, el cual participa en la progresión y agresividad del tumor. En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la expresión de TLRs en biopsias de pacientes con meduloblastoma, resultando en la detección de TLR7 y TLR8. Sin embargo, aún se desconoce la función que estos podrían estar cumpliendo en las células tumorales. Entre los ligandos que han sido reportados que pueden ser reconocidos por los TLRs encontramos a let-7g, el cual ha sido reportado en meduloblastoma con una menor expresión, con respecto a tejidos sanos, sin embargo, en el subtipo histológico más agresivo de meduloblastoma se reporta una mayor expresión del let-7g, con respecto al subtipo menos agresivo, lo cual indica un posible papel pro-tumoral por parte de este miRNA, pese a que se ha reportado generalmente con actividad anti-tumoral. En el presente trabajo se busca determinar el efecto de let-7g exógeno en la capacidad de migración e invasión de células de meduloblastoma, así como la producción de diferentes citocinas que pueden estar involucradas en la agresividad tumoral. Así mismo, se busca demostrar la colocalización de let-7g con TLR8, ya que las capacidades que promueven la agresividad tumoral podrían ser generadas a partir de dicha unión. Entre los resultados obtenidos se observó que mediante la estimulación de las células con let-7g exógeno, introducido a las células mediante liposomas, se inhibe la capacidad de migración e invasión. Aunado a ello se realizó la cuantificación de la producción de diversas citocinas posiblemente implicadas en ambos procesos: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10; sin embargo, no se detectó la presencia de ninguna en los sobrenadantes. Finalmente, se logró demostrar la colocalización de let-7g y TLR8 en endosomas, lo cual nos permite inferir sobre el posible mecanismo por el cual se está inhibiendo, en este caso, la agresividad tumoral.

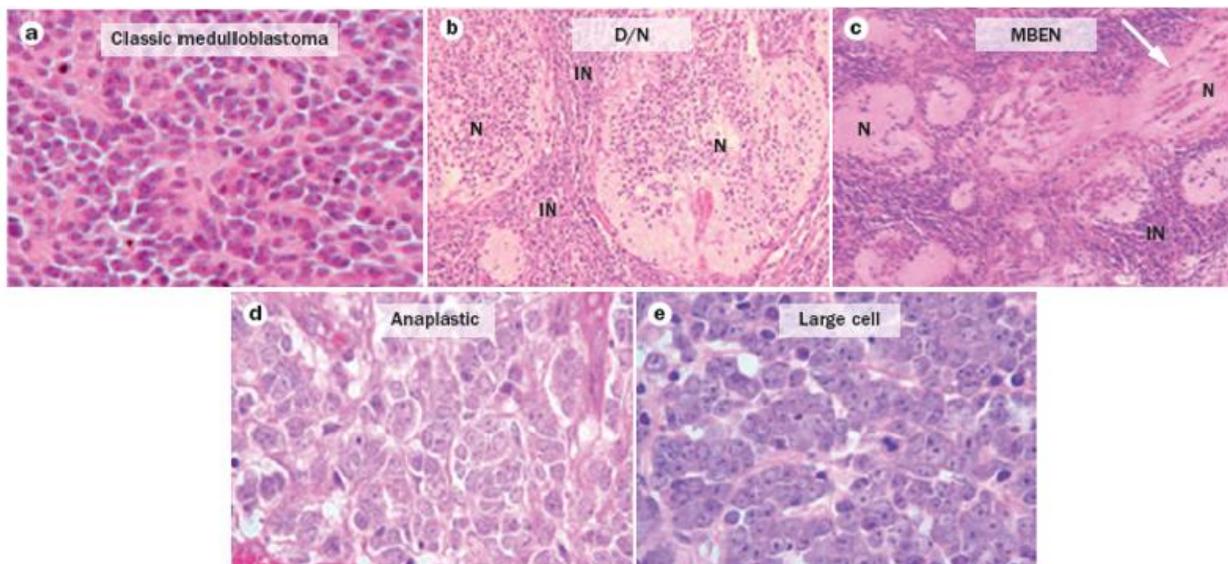
# INTRODUCCIÓN

## I. Meduloblastoma

Los meduloblastomas (MB) son tumores embrionarios primarios malignos del Sistema Nervioso Central (SNC) que surgen en el cerebelo, ubicado en la zona infratentorial [1]. Se ha reportado que en aproximadamente el 30% de los casos hay diseminación metastásica sobre las leptomeninges craneales y espinales [2]. Los meduloblastomas son el tipo de tumor en SNC más frecuente en niños (12-25%). Pese que el 12% de los niños con meduloblastoma son menores a 6 meses de edad, se ha reportado que la media es de 5 a 7 años con una ligera tendencia en varones (1.3:1) [1, 3]. En adultos la incidencia de meduloblastoma es del 0.4-1% [4, 5]. Entre las manifestaciones clínicas, los síntomas más frecuentes son el aumento de la presión intracraneal, dolores de cabeza y vómito persistente, así como ataxia troncal y nistagmo como consecuencia de la destrucción del vermis cerebral [6].

Actualmente para tratar a los meduloblastomas se utilizan terapias que combinan la resección quirúrgica; la radiación en el eje cerebroespinal, a modo de evitar la diseminación al líquido cefalorraquídeo; y quimioterapias con medicamentos como vincristina, cisplatino, lomustina, carboplatino, ciclofosfamida, entre otros [5], con una tasa de éxito del 70-80% [7]. Sin embargo, frecuentemente, los sobrevivientes tienen mala calidad de vida asociada con secuelas, a largo plazo, generadas a partir de los tratamientos, tales como déficits en funciones neurocognitivas y neuroendócrinas, problemas auditivos, infertilidad, problemas cardiopulmonares y de rendimiento físico [8, 9]. Con el fin de disminuir dichos efectos secundarios a largo plazo, se realiza la selección del tratamiento adecuado para cada paciente mediante su estratificación en dos grupos: pacientes de alto riesgo, los cuales presentan meduloblastoma con metástasis, y pacientes de riesgo medio o no metastásicos. Sin embargo, esta clasificación no considera la heterogeneidad del tumor, ya que existen diferentes subtipos de meduloblastoma, tanto a nivel histológico como a nivel molecular [9].

Histológicamente, los meduloblastomas se clasifican en diferentes subtipos. El subtipo clásico, caracterizado por la presencia de láminas de células pequeñas con una alta relación núcleo-citoplasma y leve polimorfismo nuclear; el subtipo nodular desmoplásico (D/N), el cual presenta nódulos de células neurocíticas diferenciadas que expresan proteínas neuronales, y regiones internodulares que se caracterizan por la presencia de células embrionarias indiferenciadas y cadenas de colágeno positivas para reticulina. El subtipo de meduloblastoma con nodularidad extensa (MBEN), presenta regiones nodulares e internodulares, sin embargo, presentan mayor abundancia de regiones nodulares a comparación del subtipo D/N. El subtipo anaplásico se caracteriza por presentar regiones extensas con marcado pleomorfismo nuclear y abundantes cuerpos apoptóticos; y de células largas, cuya histología se compone de células monomórficas con núcleos largos y nucléolos prominentes, generalmente es hallado junto a regiones con histología anaplásica (Figura 1) [9].



**Figura 1. Variantes histológicas de meduloblastoma (MB). a) MB clásico; b) MB nodular desmoplásico (D/N); c) MB con nodularidad extensa (MBEN); d) MB anaplásico; e) MB de células largas. (N)= regiones nodulares; (IN)= regiones internodulares [ Modificada de 9]**

Los últimos cuatro subtipos pueden ser agrupados en dos pares con morfologías superpuestas: tumores desmoplásicos, en los cuales se incluyen a D/N y MBEN; y anaplásicos y de células largas (LCA), por lo cual podemos clasificar al MB en 3 grandes grupos histológicos: los anaplásicos representan el tipo de MB más agresivo y menos frecuente, mientras que los tumores clásicos presentan un nivel de agresividad medio con una incidencia del 80%; y los tumores desmoplásicos son los menos agresivos y presentan una incidencia del 15% [9, 10]. Sin embargo, esta clasificación no refleja la variedad intertumoral dentro de los mismos tipos histológicos del meduloblastoma, por lo que otra clasificación, generalmente utilizada en los diagnósticos, es la que clasifica a los MB por sus variaciones a nivel molecular, principalmente a nivel genético, transcripcional y clínico. Esta clasificación consiste en cuatro subtipos moleculares: Subtipo Wingless (WNT), en el cual la vía de señalización canónica de WNT es regulado a la alta, y se caracteriza por ser el subtipo de mejor pronóstico, ya que la tasa de supervivencia, una vez aplicado el tratamiento, es mayor al 90%, con una tasa de incidencia del 10%. El subtipo Sonic Hedgehog (SHH), el cual presenta contrastes en la activación de la cascada de señalización de la vía SHH; el grupo 3, el cual se presenta el peor pronóstico, con una tasa de supervivencia, tras el tratamiento, del 40-60%. Y el grupo 4, que junto con el grupo SHH presentan un pronóstico medio con una tasa de supervivencia, posterior al tratamiento, del 75%, que puede variar dependiendo de la presencia o ausencia de metástasis, de las anormalidades moleculares y el subtipo histológico en el cual se clasifiquen [9, 11].

Considerando la necesidad de mejorar los diagnósticos, la predicción del comportamiento del tumor y la respuesta de este ante los tratamientos, así como la necesidad de incrementar la eficacia terapéutica, disminuir las secuelas a largo plazo que puedan generarse como consecuencia de los tratamientos, y mejorar la tasa de supervivencia, ha aumentado la demanda en la búsqueda de marcadores pronóstico confiables que complementen los análisis histológicos utilizados normalmente en la detección de los meduloblastomas. Entre las moléculas

propuestas en la actualidad para fungir como marcadores pronóstico, en la mayoría de los cánceres, se encuentran los microRNAs [12].

## II. microRNAs

Los microRNAs o miRNAs son moléculas cortas de RNA (de 18 a 24 nucleótidos) no codificantes, de cadena sencilla, caracterizados por fungir como reguladores post-transcripcionales negativos de la expresión génica (vía canónica), por lo que actúan, mayormente, sobre la región 3' UTR (región sin traducir) de los mRNA, promoviendo su desestabilización y reprimiendo diferentes regiones de traducción [13, 14, 15].

Debido a dicha actividad, los miRNAs juegan papeles importantes en la regulación de genes involucrados en diversos procesos celulares como inflamación, regulación del ciclo celular, respuesta celular, diferenciación, desarrollo embrionario, apoptosis, proliferación y migración celular [16].

La mayoría de los miRNAs tienen un perfil de expresión específica por tejido, de modo que las alteraciones detectadas en dichos perfiles se han asociado a variaciones en las condiciones fisiológicas y patológicas, principalmente en enfermedades como el cáncer [16, 17]. Algunos miRNAs se han encontrado reprimidos con respecto a tejidos sanos, como indicación de la pérdida general de diferenciación de células tumorales, jugando papeles como moléculas antitumorales. Sin embargo, existen diferentes tipos de miRNAs, que han sido detectados en diversos cánceres y reportados con sobreexpresión con respecto a tejidos sanos, por lo cual se observa que juegan un papel oncogénico [18]. Cabe mencionar que a pesar de que el perfil de expresión de un miRNA sea específico en un tejido o tipo de cáncer, no necesariamente tendrá la misma actividad como oncogén o supresor en todos los tejidos, pueden jugar ambos papeles, sin embargo, dependerá del tejido en el que se encuentren [16].

Además de la expresión en tejidos, se ha reportado la presencia de miRNAs circulantes en fluidos corporales, tales como sangre, saliva, orina y efusiones pleurales de pacientes con cáncer [18, 19]. En los últimos años se ha propuesto a los miRNAs circulantes como moléculas pronóstico, ya que, como se mencionó anteriormente, las alteraciones en los perfiles de expresión como consecuencia a variaciones en las condiciones fisiológicas y patológicas los hacen buenos indicadores o predictores de la respuesta a terapias y monitoreo de la enfermedad [16,18].

Estos miRNAs circulantes se encuentran empaquetados en exosomas, microvesículas o anclados a proteínas de unión, como Argonauta 2, los cuales le proveen a los miRNAs protección contra RNAsas, y habilitan su transferencia de una célula a otra durante diversos procesos biológicos [16, 20]. Uno de los mecanismos más estudiados es el transporte de miRNAs circulantes en exosomas. Los exosomas se caracterizan por tener la capacidad de fusionarse con la membrana plasmática, permitiendo la liberación del contenido del exosoma en la célula blanco, particularmente bajo condiciones ácidas, por lo que, mediante este mecanismo los miRNAs circulantes pueden estar jugando papel en la regulación de la tumorigénesis. Sin embargo, aún no se sabe el mecanismo por el cual podrían estar involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer [16]. Valadi *et. al* (2007) fueron los primeros en reportar evidencia de la liberación de miRNAs mediada por exosomas y su transferencia de células donadoras a células vecinas, siendo células cancerosas y células normales, respectivamente [21]. Un ejemplo de ello son las células tumorales de glioblastoma, las cuales generan exosomas liberadores de miR-21 y proteínas angiogénicas que son absorbidos por células endoteliales microvasculares del cerebro, resultando en la inducción de la transformación a células tumorales [22]. Se muestran a continuación algunos miRNAs reportados que pueden ser liberados por exosomas y su relación con diferentes tipos de cáncer (Tabla 1).

**Tabla 1. miRNAs liberados en exosomas y relacionados con diferentes tipos de cáncer.**

<b>Función</b>	<b>Células secretoras</b>	<b>Células blanco</b>	<b>miRNA</b>	<b>Blancos de miRNA</b>
<b>Angiogénesis</b>	Cáncer de mama en ratones (4T1) Melanoma Cáncer de mama (MDA-MB-231)	Células endoteliales ( <i>in vivo, in vitro</i> ) Células endoteliales Células endoteliales	miR-210 miR-9 miR-105	SOCS5 ZO-1
<b>Supresión de genes anti-tumorales</b>	Cáncer de mama (MCF-7) Ascitis maligna de glioblastoma		miR-21 miR-21	PTEN PDCD4
<b>Liberación de miRNAs supresores de tumores</b>	Cáncer gástrico metastásico (AX-P7a)		Let-7	RAS, HMGA2
<b>Dormancia</b>	Mesenquimales de la médula ósea	Células de cáncer de mama (MDA-MB-231)	miR-23b	MARCS
<b>Transferencia de resistencia a fármacos</b>	Cáncer de mama resistente a fármacos (MCF-7)	Cáncer de mama sensible a fármacos (MCF-7)	miR-100, miR-222, miR-30a	miR-222: PTEN
<b>Supresión de la respuesta inmune</b>	HEK-293	Macrófagos murinos	miR-21, miR-29a	Unión directa a TLRs
<b>Promoción de la capacidad de invasión</b>	Macrófagos M2 activados por IL-4	Células de cáncer de mama (SKBR3 y MDA-MB-231)	miR-223	MEF2C
<b>Metástasis</b>	Cáncer colorectal		miR-21	PDCD4
<b>Formación de nicho premetastásico</b>	Células madre de cáncer renal Adenocarcinoma metastásico de ratón	Células de pulmón ( <i>in vivo</i> ) Células del estroma de los nódulos linfáticos, fibroblastos de pulmón	miR-200c, miR-92, miR-141, miR-29a, miR-650, miR-151 miR-494, miR-542-3p	Cadherina-17
<b>Supresión de tumores</b>	Células epiteliales de próstata (PNT-2)	Células de cáncer de próstata (PC-3M)	miR-143	Supresión de KRAS y ERK5

**Tabla adaptada de [23].**

Una vez internalizados, se ha descrito que algunos miRNAs circulantes como miR-21, miR-29a, entre otros, pueden interactuar con los receptores tipo Toll (TLR) de las células inmunes para estimular la producción de citocinas inflamatorias prometastásicas e inducir procesos inflamatorios protumorales. Esto nos indica que los miRNAs circulantes tienen actividad como ligandos de unión, del tipo: patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), a los TLRs (vía no canónica) [16, 24].

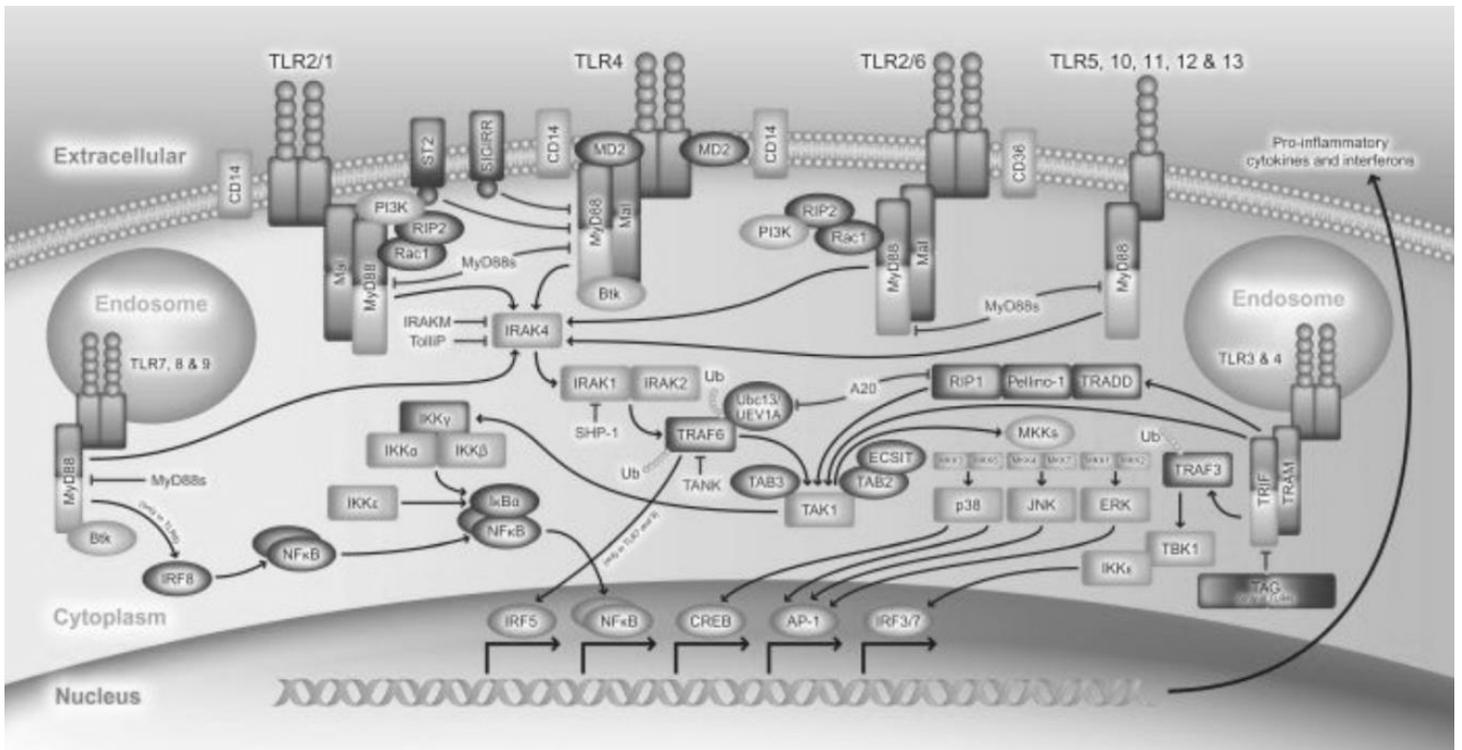
### III. Receptores tipo Toll (TLRs)

Los TLRs son receptores transmembranales presentes en células de la respuesta inmune innata, tales como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK, entre otras; y en otros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales, neuronas, etc. Se caracterizan por su capacidad de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se encuentran conservados entre patógenos, y que no están presentes en mamíferos [25]; y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), de células dañadas o en proceso de muerte [26]. Estos receptores representan la primera línea de defensa inmune innata, ya que dicho reconocimiento conduce a la activación de cascadas de señalización celular que activan respuestas inflamatorias y a la inmunidad adaptativa.

En mamíferos existen 13 diferentes tipos de TLRs, aunque únicamente los TLR1-9 se encuentran conservados en ratón y humano. Los TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se expresan en la membrana celular, mientras que los TLRs 3, 7, 8, 9 se expresan en la membrana endosomal [27]. Cada TLR necesita de diferentes moléculas de señalización para su activación, es decir, cada uno reconoce componentes específicos del patógeno. Los TLRs localizados en la membrana plasmática reconocen principalmente componentes de la membrana microbiana, como lípidos, proteínas, carbohidratos y lipoproteínas, mientras que los TLRs expresados en la membrana endosomal reconocen PAMPs como ácidos nucleicos derivados de virus y bacterias, y también DAMPs propios provenientes de daños en ácidos nucleicos como consecuencia de enfermedades autoinmunes [25, 26].

Una vez ocurrido el reconocimiento de los TLRs con su respectivo ligando, cada TLR generará mecanismos de defensa específicos en respuesta al estímulo mediante moléculas adaptadoras como MyD88 (proteína 88 de respuesta primaria para la diferenciación mieloide), TRIF (proteína adaptadora contenida en el dominio TIR con capacidad inductora de IFN- $\beta$ ), TIRAP (proteína adaptadora

contenida en el dominio TIR), o TRAM (molécula adaptadora contenida en el dominio TIR), las cuales son reclutadas al receptor (Figura 2). Estas moléculas adaptadoras facilitan el reconocimiento de los ligandos. Al activarse los TLRs, las moléculas adaptadoras son reclutadas al citoplasma de la célula y dirigen la activación de diferentes cascadas de señalización para la producción de citocinas, interferones, quimiocinas, proteínas inducibles [27, 28] y la participación de factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, que son activados y translocados al núcleo para inducir la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias, enzimas y mediadores de la respuesta inmune [29].

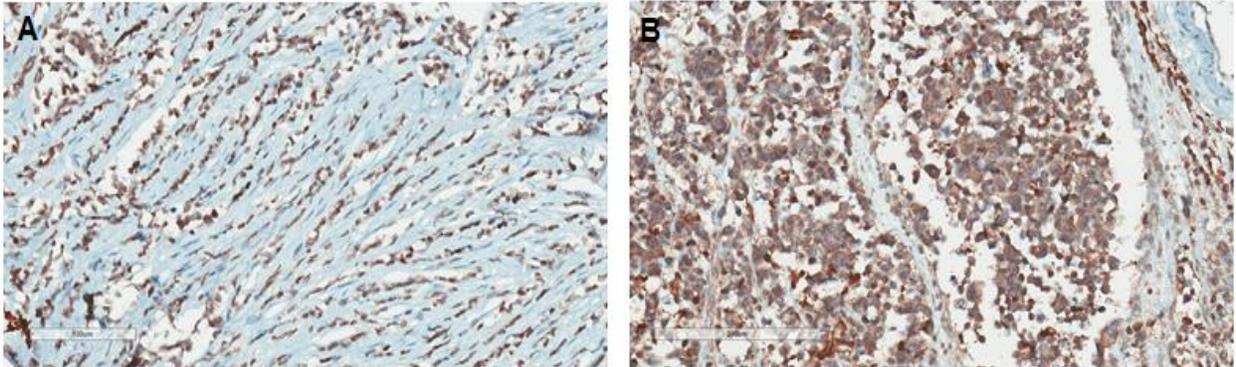


**Figura 2. Vías de señalización de los TLRs, y sus ligandos [30].**

**Al interactuar los TLRs con su respectivo ligando se generan mecanismos de defensa altamente específicos mediante la participación de moléculas adaptadoras cuya función consiste en activar diferentes cascadas de señalización para la producción de citocinas, interferones, quimiocinas, proteínas inducibles y factores de transcripción necesarios para la regulación de la respuesta inmune.**

#### IV. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo, previamente, se estudió la presencia de TLRs en biopsias de pacientes con meduloblastoma, resultando en la detección de los receptores endosomales, TLR7 y TLR8 (Figura 3). Pese que aún se desconoce la función que estos podrían estar cumpliendo en las células tumorales, así como los ligandos que podrían estarlos activando, se logró observar que, tras su activación con ligandos sintéticos específicos para ambos receptores, dicha interacción jugaba un papel importante en la capacidad de migración, proliferación e invasión de las células HTB-186, provenientes de meduloblastoma.



**Figura 3. Expresión de TLR7 (A) y TLR8 (B), marcados en color café, en biopsias de pacientes con meduloblastoma y detectados mediante Inmunohistoquímica.**

Aunado a esto, se ha descrito que tanto TLR7 como TLR8 pueden reconocer RNA monocatenario, tales como los miRNAs. Como resultado del reconocimiento pueden activar a NF- $\kappa$ B, el cual regula la expresión de genes cuyos productos pueden suprimir muerte celular del tumor, estimular la progresión del ciclo celular, potenciar la transición epitelio-mesénquima y promover el surgimiento de nuevos tumores con un microambiente tumoral que soporta su progresión, invasión a tejidos aledaños, angiogénesis y metástasis [31]. Un ejemplo de la activación de

NF- $\kappa$ B por el reconocimiento de miRNAs por TLR8 es el reportado por Fabbri *et al.* (2012) en donde demostraron que una vez reconocidos miR-21 y miR-29a (previamente liberados por células de cáncer de pulmón no pequeñas (NSCLC), por TLR8, resultaba en un incremento en la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Resultando en un aumento en el potencial metastásico y en la capacidad de proliferación de dichas células [20].

Otros ligandos que pueden ser reconocidos por los TLRs pertenecen a la familia de miRNAs let-7, la cual es una familia compuesta por 8 isoformas (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g y let-7i). Estas isoformas han sido descritas principalmente con actividad antitumoral en diferentes tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, pulmón, ovario próstata, sarcoma, entre otros, ya que su expresión se ha observado disminuida, y en la mayoría de los casos se ha relacionado con una baja tasa de sobrevivencia. Sin embargo, diferentes isoformas, en menor proporción, también se han descrito con actividad protumoral, en los mismos u otros tipos de cáncer como linfoma y leucemia linfoblástica aguda, reflejándose en un aumento en su expresión [32] (Tabla 2).

En el caso de meduloblastoma, se ha reportado a let-7g con una menor expresión, con respecto a tejidos sanos, sin embargo, en el subtipo anaplásico se observa una mayor expresión del gen de let-7g, con respecto al subtipo desmoplásico [33], lo cual nos permite realizar inferencias sobre el posible papel protumoral que este miRNA está realizando.

**Tabla 2. Expresión de las isoformas de let-7g en tejidos provenientes de diferentes tipos de cáncer.**

Isoforma	Expresión disminuida	Expresión incrementada	Referencia
7a	Mama		Sempere <i>et al.</i> (2007)
	Pulmón		Takamizawa <i>et al.</i> (2004)
	Melanoma		Muller & Bosserhoff (2008)
	Páncreas		Torrisani <i>et al.</i> (2009)
	PPNAD		Iliopoulos <i>et al.</i> (2009)
7b		Pulmón	Brueckner <i>et al.</i> (2007)
		Linfoma	Nie <i>et al.</i> (2008)
		Ovario	u <i>et al.</i> (2007)
	ALL		Mi <i>et al.</i> (2007)
	Melanoma		Schultz <i>et al.</i> (2008)
7c	Ovario		Nam <i>et al.</i> (2008)
	PPNAD		Iliopoulos <i>et al.</i> (2009)
	Próstata		Ozen <i>et al.</i> (2008)
	Retinonlastoma		Huang <i>et al.</i> (2007)
		GIST	Subramanian <i>et al.</i> (2008)
7d		Linfoma	Lawrie <i>et al.</i> (2008)
		Mesotelioma	Guled <i>et al.</i> (2009)
	Linfoma de Burkitt		Leucci <i>et al.</i> (2008)
	Pulmón		Tokumaru <i>et al.</i> (2008)
	PPNAD		Iliopoulos <i>et al.</i> (2009)
7e	Próstata		Ozen <i>et al.</i> (2008)
	HNSCC		Childs <i>et al.</i> (2009)
	Ovario		Shell <i>et al.</i> (2007)
7f	Próstata		Ozen <i>et al.</i> (2008)
	Ovario		Dahiya <i>et al.</i> (2008)
	Próstata		Ozen <i>et al.</i> (2008)
7g	Mesotelioma		Guled <i>et al.</i> (2009)
	Pulmón		Takamizawa <i>et al.</i> (2004)
	Ovario		Dahiya <i>et al.</i> (2008)
	Próstata		Ozen <i>et al.</i> (2008)
7h	Sarcoma		Subramanian <i>et al.</i> (2008)
		Mama	Yan <i>et al.</i> (2008)
	Pulmón		Johnson <i>et al.</i> (2005)
7i	PPNAD		Iliopoulos <i>et al.</i> (2009)
	Próstata		Ozen <i>et al.</i> (2008)
	Ovario		Yang <i>et al.</i> (2008)
7j	Próstata		Ozen <i>et al.</i> (2008)
		HNSCC	Chang <i>et al.</i> (2008)
		Linfoma	Lawrie <i>et al.</i> (2008)

**PPNAD: enfermedad adrenocortical nodular pigmentada primaria; ALL: leucemia linfoblástica aguda; GIST: tumores del estroma gastrointestinal; HNSCC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [Modificada de 32].**

## **JUSTIFICACIÓN**

Pese que existen estudios en los que se conocen las desregulaciones en la expresión y la actividad de let-7g en diferentes tipos de cáncer, aún no se ha estudiado el papel de este miRNA en un modelo biológico para meduloblastoma. Por lo que este estudio, además de aportar conocimiento de la participación de let-7g en la agresividad tumoral de células de meduloblastoma, podría contribuir al uso de let-7g como posible marcador molecular de la enfermedad, e incluso ser utilizado como una posible herramienta terapéutica.

## **VI. HIPÓTESIS**

Let-7g altera la capacidad de migración, invasión y producción de citocinas en células HTB-186, provenientes de meduloblastoma humano, posiblemente mediante la unión a TLR8 mediada por exosomas.

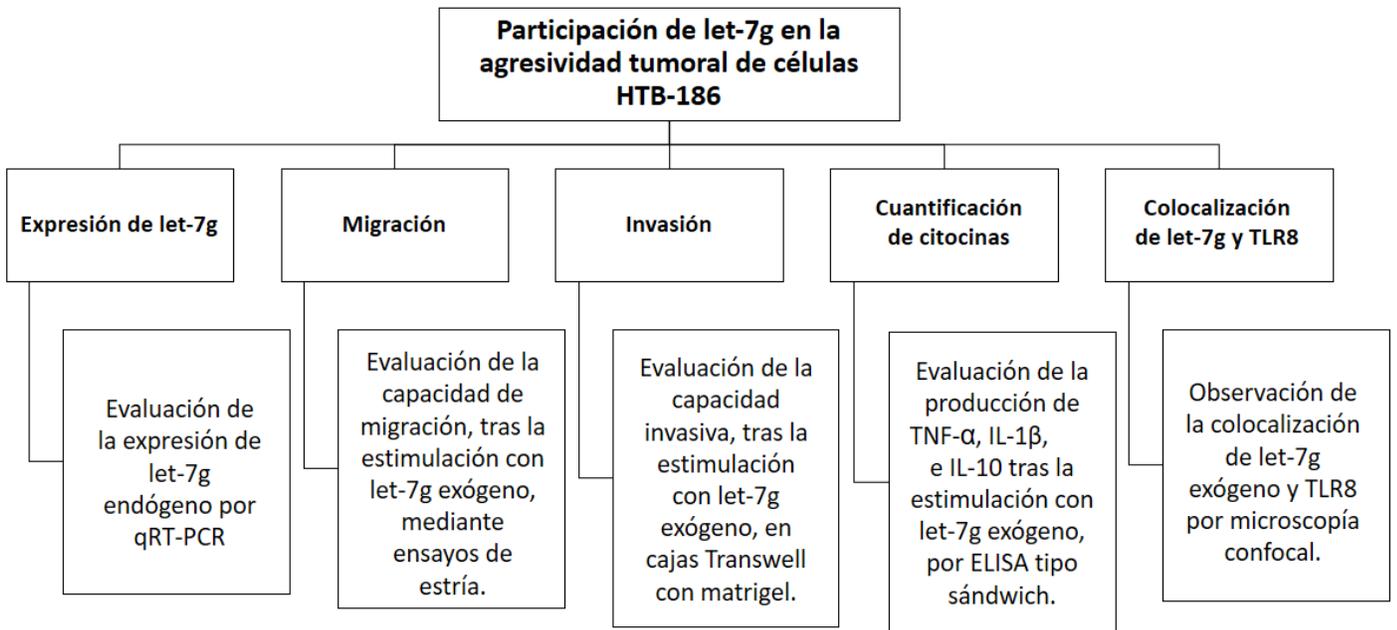
## **VII. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el efecto de let-7g en las características de agresividad de células de meduloblastoma.

## **VIII. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar los niveles de expresión endógena de let-7g en células HTB-186.
- Establecer el papel de let-7g exógeno en la capacidad de migración e invasión de células HTB-186.
- Determinar el efecto de let-7g exógeno sobre la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en células HTB-186.
- Demostrar la colocalización de let-7g con TLR8 en endosomas de células de meduloblastoma.

## IX. DISEÑO EXPERIMENTAL



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **X. Material biológico**

Para la realización de los experimentos se utilizaron células DAOY (ATCC HTB-186™), las cuales provienen de un aislado de meduloblastoma desmoplásico humano de un varón de 4 años. Esta línea celular fue cultivada y mantenida en medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) con L-Glutamina (ATCC), complementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino) (Biowest) inactivado (ver Anexo) y Antibiótico/Antimicótico (Penicilina, Streptomycin y Amfotericina B), (Gibco), a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% en incubadoras (Forma Scientific).

### **XI. Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA, a partir de células HTB-186, se realizó el protocolo de TRIzol desarrollado por el fabricante. Se añadió 1 mL de TRIzol (Life Technologies) a una caja grande de cultivo de células HTB-186 con confluencia del 100% (~10,000,000 de células). Se colocó la suspensión en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le añadieron 200 µL de cloroformo (IBI SCIENTIFIC), y se mezcló por inversión. Se incubó a temperatura ambiente 2-3 minutos, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm, en una centrífuga Biofuge (Fresco de Heraeus), por 15 minutos a 4 °C. Se retiró la fase acuosa y se colocó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Se le añadió 1 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich), y se dejó incubar toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante del tubo y se realizaron lavados al pellet formado con 1 mL de etanol frío (Sigma-Aldrich), al 70%. Se agitó por inversión y se centrifugó a 9,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se dejó secar pellet por 10 minutos y se resuspendió en 25 µL de agua inyectable (PiSA). Se procedió a realizar la cuantificación del RNA en un espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH), y se obtuvieron los valores de las relaciones 260/230 y 260/280. Una vez cuantificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen), al 1%

en TAE 1X (Promega) para observar la integridad del RNA extraído; para ello se cargó 1 µg del templado con 1 µL de buffer de carga 6x (Jena Bioscience), y 1 µL de Eva Green (Jena Bioscience). Se utilizó como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega). Al finalizar la electroforesis se observaron los resultados (no mostrados) en un fotodocumentador FUSION SOLO S (IVILBER).

## **XII. Retrotranscripción: obtención de cDNA**

Para la síntesis de cDNA, a partir del RNA extraído de las células HTB-186 y de células U373-MG (ATCC HTB-17™), de glioblastoma humano (utilizadas como control positivo, proporcionado por el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica y Experimental), se utilizó el kit TaqMan microRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) (Tabla 3).

**Tabla 3. Reactivos y concentraciones utilizadas para la retrotranscripción.**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen empleado por reacción</b>
Agua DEPC	4.38 µL
Buffer 10X RT	1 µL
dNTPs	0.1 µL
Inhibidor	0.12 µL
Reverse Transcriptase (enzima)	0.5 µL
Primer RT	2 µL
RNA (80 ng/µL)	2 µL
Volumen final	10 µL

El número de catálogo de los primers utilizados, tanto para la retrotranscripción (RT) y la PCR (TM), fueron:

- RNU48:

RT / TM RNU48 001006 PN 4427975 LOT. P171128-017 G05

- Let-7g-5p:

RT / TM hsa-let-7g 002282 PN 4427975 42C08 LOT. P180313-000 G10

Todos eran Taqman microRNA assays (Thermo Fisher Scientific).

El programa utilizado para la retrotranscripción del RNA de ambas líneas celulares, HTB-186 y U373-MG, sintetizado en el termociclador, fue el descrito a continuación en la Tabla 4:

**Tabla 4. Condiciones utilizadas para la retrotranscripción.**

<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
30 minutos	16 °C
30 minutos	42 °C
5 minutos	85 °C
1 minuto	22 °C

### XIII. PCR en tiempo real de let-7g

Una vez obtenido el cDNA de ambas líneas celulares se procedió a la amplificación de let-7g y RNU48, gen constitutivo utilizado como control de la técnica, para ello se utilizaron los siguientes reactivos (Tabla 5):

**Tabla 5. Reactivos utilizados para la PCR.**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen empleado por reacción</b>
Master Mix*	7.5 µL
Sonda TaqMan*	0.75 µL
cDNA	2 µL
Agua DEPC**	4.75 µL
Volumen final	15 µL

(\*) Applied Biosystems y (\*\*) Thermo Fisher.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR), en tiempo real, se realizó en el equipo AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies). El programa utilizado fue el descrito en la siguiente tabla (Tabla 6):

**Tabla 6. Condiciones utilizadas para la qPCR.**

<b># Ciclos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
1	2 minutos	50 °C
1	10 minutos	95 °C
40	15 segundos	95 °C
	1 minuto	60 °C

Los datos obtenidos se analizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Donde  $\Delta\Delta CT$  indica la diferencia del promedio del Ct obtenido para el gen de interés, en este caso let-7g, con respecto al promedio del Ct obtenido para el gen endógeno. Gracias a esta fórmula se puede calcular el valor de la expresión de los genes en un cDNA o DNA problema. Los cálculos fueron realizados en Excel y graficados en el programa GraphPad Prism 5.

#### **XIV. Ensayos de migración**

Para la evaluación de la capacidad de migración de las células HTB-186, posterior a la estimulación con la secuencia madura de let-7g exógeno (>hsa-let-7g-5p MIMAT0000414 UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU, producido por HGNC), se realizó la siembra de 500,000 células HTB-186, por pozo, en medio EMEM complementado al 10% con SFB inactivado, en placas de 24 pozos. Fueron incubadas 24 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. El conteo celular fue realizado mediante pruebas de viabilidad con Azul Tripán (Gibco) en una cámara de Neubauer. Una vez formada la monocapa, se procedió a realizar las “estrías” en los pozos sembrados con puntas estériles de 200 µL, y se realizó un lavado con medio EMEM sin complementar. Se utilizaron como estímulos independientes a let-7g exógeno a 100 nM y 200 nM. Con fin de recrear el mecanismo de internalización de los miRNAs a la célula mediante exosomas, se utilizaron en la estimulación a la lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) y DOTAP (Liposomal Transfection Reagent) (Roche), los cuales son compuestos lipídicos que forman liposomas y pueden encapsular ácidos nucleicos de interés, en este caso let-7g, e introducirlo a la célula por endocitosis. Ambos fueron utilizados bajo las condiciones recomendadas por el proveedor. Al no observarse diferencias entre un reactivo liposomal u otro, al momento de la internalización (tal como se observa en los ensayos de inmunofluorescencia por microscopía confocal), se decidió utilizar lipofectamina RNAiMAX en la internalización de let-7g a las células HTB-186 en los ensayos de migración e invasión. Con fin de garantizar que el cierre de estría

fuera consecuencia de la capacidad de migración celular y no por la capacidad de proliferación celular, se utilizó Colchicina (Sigma-Aldrich) a 0.01  $\mu$ M. La Colchicina es un compuesto caracterizado por inhibir la proliferación celular mediante la unión a tubulina, ya que interfiere en su papel para la correcta formación y funcionamiento de los husos mitóticos en el paso de metafase a anafase en la división celular. Se dio seguimiento a la capacidad de migración de las células HTB-186, es decir, a la evolución en el cierre de estría, mediante la toma de fotografías a las 0, 24, 48 y 72 h (a un objetivo 5X) con ayuda de un microscopio invertido modelo Leica DMI1 (Leica Microsystems), el cual cuenta una cámara fotográfica, y mediante el programa LAS EZ. Para mejorar la visualización del cierre de herida a las 72 h, se realizó la tinción de las células con violeta de Genciana (DROTASA) (ver Anexo 1). Las imágenes capturadas fueron analizadas en el programa Image J mediante el cálculo de las áreas sin cicatrizar. Los resultados obtenidos fueron convertidos a porcentaje y utilizados para obtener el porcentaje de cicatrización, para cada tratamiento, con respecto a los controles. Dichos porcentajes fueron graficados con el programa GraphPad Prism 5.

Cabe mencionar que, previo a la tinción, se recolectaron los sobrenadantes obtenidos tras 72 horas de estimulación para cada tratamiento, y se almacenaron a -20 °C. Dichos sobrenadantes fueron utilizados posteriormente para la cuantificación de citocinas.

## **XV. Ensayos de invasión**

Para evaluar la capacidad de invasión de las células HTB-186, posterior a la estimulación con la secuencia madura de let-7g exógeno (>hsa-let-7g-5p MIMAT0000414 UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU, producido por HGNC), se colocó una capa de matrigel matrix (Corning) a una dilución 1:4, con medio EMEM sin complementar, en el inserto de cajas Transwell de 12 pozos. Se dejó polimerizar el matrigel 1 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizó la siembra de 350,000 células HTB-186, por inserto, en medio EMEM sin complementar sobre el matrigel

polimerizado. El conteo celular fue realizado mediante pruebas de viabilidad con Azul Tripán en una cámara de Neubauer. Se utilizaron como estímulos independientes a let-7g exógeno a 100 nM y 200 nM. Para garantizar la inserción del miRNA a la célula, nuevamente se utilizó lipofectamina RNAiMAX bajo las condiciones recomendadas por el proveedor. Se colocó medio EMEM complementado al 10% con SFB inactivado en el pozo para fungir como quimioatrayente de las células presentes en el inserto. Se dejó incubar durante 48 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se retiró la membrana del inserto, la cual contiene a las células con mayor capacidad invasiva debido a que presenta poros que permiten la penetración de las células, y se tiñó con violeta de Genciana. Las membranas fueron montadas en portaobjetos para facilitar la toma de fotografías a un objetivo 20X. La toma de fotografías se realizó en 4 áreas representativas para cada tratamiento, y por membrana. La cuantificación de las células presentes en la membrana se realizó con el programa Image J. Los resultados obtenidos se graficaron como porcentaje de invasión con el programa GraphPad Prism 5. Se consideró a las células control, sin estímulo, como el 100% por lo que la comparación de los resultados obtenidos para cada tratamiento fue contra dicho grupo.

## **XVI. Cuantificación de citocinas**

Para la cuantificación de citocinas producidas, como consecuencia de la estimulación, se utilizaron los sobrenadantes de los ensayos de migración recuperados después de 72 h de estímulo. Las citocinas evaluadas fueron: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10. Dicha cuantificación se realizó mediante ensayos de ELISA (acrónimo de su nombre en inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) de tipo sándwich, con los respectivos kits para cada citocina (BD OptEIA). Cada kit contiene stocks de anticuerpos de detección y captura, enzimas y estándares específicos para cada citocina. Para ello, se utilizaron microplacas de ELISA en las cuales se colocaron 100  $\mu$ L, por pozo, del anticuerpo de captura de la citocina

de interés, a la dilución indicada en la tabla 7 (se utilizó como disolvente una solución amortiguadora de carbonatos de sodio a 0.1 M, con pH: 9.5 (ver anexo), y se dejó incubando a 4 °C toda la noche. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X (ver Anexo) complementado al 0.05% con Tween 20 (BIO-RAD), utilizado como buffer de lavado, y se realizó el bloqueo de los pozos con 200 µL, por pozo, de PBS 1X complementado al 10% con SFB inactivado (pH:7). Se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con el buffer de lavado. Se realizaron 7 diluciones seriadas, a partir del estándar, por citocina, tomando como concentración inicial la indicada en las hojas de seguridad para cada una (Tabla 7), con el fin de obtener la curva estándar, y se colocaron 100 µL de cada dilución, por duplicado, en los pozos. Se utilizó como blanco PBS 1X complementado al 10% con SFB inactivado, y se colocaron en otros pozos, por duplicado, 100 µL de los sobrenadantes, obtenidos a las 72 h del ensayo de migración, de las células con los tratamientos: control, let-7g 100 nM y let-7g 200 nM. Cada dilución y tratamiento fue colocado y analizado en pozos independientes. Se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados con el buffer de lavado. Se añadió a cada pozo el anticuerpo de detección y la enzima de cada citocina, a las concentraciones señaladas en la tabla 7, diluidos en PBS 1X complementado al 10% con SFB inactivado y se dejó incubando una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 7 lavados con la solución amortiguadora de lavado, dejando reposar de 30 segundos a 1 minuto entre cada lavado. Se añadieron 100 µL de la solución de sustrato a cada pozo y se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadieron 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N (Gibco), por pozo, con fin de frenar la reacción. Se leyó placa en un espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH) a una absorbancia de 450 nm con el programa MARS Data Analysis Software.

Los resultados de la cuantificación de las citocinas evaluadas fueron analizados en Excel, y extrapolados a los resultados obtenidos en la curva estándar, mediante gráficas de dispersión x y.

**Tabla 7. Citocinas cuantificadas en los sobrenadantes obtenidos de la estimulación con let-7g.**

Citocina	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección	Enzima	Concentración stock	Concentración inicial de diluciones seriadas
TNF- $\alpha$	1:250	1:250	1:250	38 ng/mL	500 pg
IL-1 $\beta$	1:250	1:1000	1:250	60 ng/mL	250 pg
IL-10	1:250	1:1000	1:250	105 ng/mL	500 pg

**Se muestran las concentraciones utilizadas para cada anticuerpo y enzimas, incluidos en el kit, así como la concentración del stock y la concentración inicial utilizada para la realización de las curvas estándar.**

## **XVII. Ensayos de colocación con inmunofluorescencia y microscopía confocal**

Para la evaluación de la colocación del let-7g y el TLR8 en endosomas, se realizaron cultivos de ~100,000 células HTB-186 por pozo, en cajas Lab-Tek de 4 pozos. Se dejó incubando toda la noche a 37 °C. Se utilizaron como estímulos independientes a let-7g, a 200 nM y 300 nM, acoplado a FAM. Para garantizar la inserción de los estímulos a la célula se utilizó lipofectamina RNAiMAX o DOTAP, bajo las condiciones recomendadas por el proveedor. Se dejaron incubar las células, con su respectivo tratamiento, a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizaron 2 lavados a las células con PBS 1X frío. Se utilizó paraformaldehído al 2% (Mallinckrodt) durante 45 minutos a temperatura ambiente para fijar las células. Se retiró el paraformaldehído, se realizaron dos lavados con PBS 1X frío y se permeabilizaron las células con tritón X-100 (BIO-RAD) al 0.1% en PBS durante

30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente 2 lavados con PBS 1x frío. El bloqueo fue realizado con PBS 1X con albúmina (BSA) (Sigma-Aldrich) al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente y se realizaron 2 lavados con PBS 1X frío. Se colocó el anticuerpo primario (Tabla 8), en solución amortiguadora de dilución (PBS 1X con albúmina al 10% y tritón al 0.1%) y se incubó toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío. Se incubó con el segundo anticuerpo (Tabla 8), en buffer de dilución durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío, y se añadió colorante para núcleo, DAPI (Novus Biological), a una dilución 1:3000, por 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío, se añadió PBS 1X frío a cada pozo y se almacenó la caja a 4 °C, protegido de la luz, hasta su análisis en el microscopio confocal.

Las muestras fueron observadas máximo 24 horas después en un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, sede Centro Médico Nacional Siglo XXI). Las fotos fueron tomadas a un objetivo de 60X.

**Tabla 8. Anticuerpos utilizados en la microscopía confocal.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Tipo de anticuerpo</b>	<b>Sintetizado en</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
TLR8	Primario	Ratón	Humano/ ratón	IgG1	Enzo	1:200
AF647	Secundario	Cabra	Ratón	IgG	Abcam	1:500
Rab11	Primario	Conejo	Perro/humano	IgG	Abcam	1:200
A555	Secundario	Cabra	Conejo	IgG1	Invitrogen	1:800

**Rab11 fue utilizado como marcador endosomal.**

## **XVIII. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en la evaluación de los niveles de expresión de let-7g endógeno fueron analizados mediante una prueba de T no pareada con una  $p < 0.05$ .

En los ensayos de migración e invasión los resultados obtenidos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con pruebas de Dunnett con una  $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos en las curvas estándar mediante la cuantificación de citocinas por ensayos de ELISA fueron evaluados estadísticamente mediante coeficientes de determinación.

La colocación de let-7g y TLR8 observada fue analizada mediante correlaciones de Pearson.

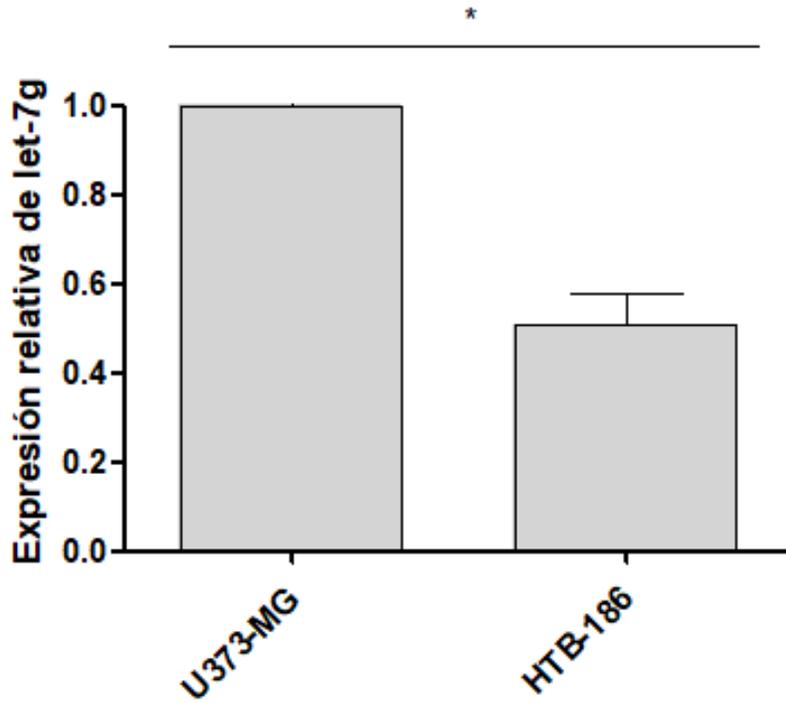
Las pruebas estadísticas fueron realizadas mediante Excel o utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5.

## XIX. RESULTADOS

**Los niveles de expresión de let-7g endógeno se encuentran disminuidos en células de meduloblastoma con respecto a células provenientes de glioblastoma.**

Con fin de conocer los niveles de expresión endógena de let-7g en células provenientes de meduloblastoma, se realizó qPCR para medir la expresión relativa del gen para let-7g. Para ello se utilizó como control positivo de let-7g a las células U373-MG (HTB-17), provenientes de glioblastoma (otro tipo de cáncer que afecta el SNC), y a RNU48, como gen constitutivo para la normalización. Durante la amplificación en tiempo real se puede cuantificar el material amplificado por ciclo, de modo que el programa nos proporciona un valor de Ct (threshold cycle), el cual nos indica la intersección entre la curva de amplificación y la línea de umbral, la cual, a su vez, indica el nivel de detección o el punto en el cual la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia encima de los niveles basales. Una vez obtenido el valor de Ct para ambos genes en ambas líneas celulares, se realiza la normalización de let-7g contra el gen constitutivo para eliminar el ruido generado por el manejo de la técnica, y con esos resultados se calculan los niveles de expresión relativa para let-7g.

Una vez calculados y graficados ambos niveles de expresión se logró observar que en las células HTB-186 los niveles de expresión de let-7g se encuentran disminuidos significativamente con respecto a la línea celular de glioblastoma (Figura 4).



**Figura 4. Expresión relativa de let-7g endógeno en células de U373-MG y HTB-186. La cuantificación se realizó por triplicado. Diferencias significativas entre ambos tipos celulares. Prueba de T no pareada. (\*)  $P < 0.05$**

## **Let-7g inhibe la capacidad de migración de células HTB-186**

Con fin de observar la participación de let-7g exógeno en la capacidad de migración de células HTB-186, mediante la internalización del miRNA con liposomas, se realizaron ensayos de cierre de estría. Con ellos se evaluó la capacidad de migración de las células a las regiones libres de la estría formada en monocapas y se cuantificó el porcentaje de cierre o cicatrización después de 72 h, con respecto al tiempo inicial, 0 h.

Para ello, el cierre de estría fue monitoreado a las 0, 24, 48 y 72 h, de la estimulación, tal y como se observa en la Figura 5. Se consideró 72 h como tiempo final del monitoreo ya que se logró observar que en ese tiempo las células control, es decir, aquellas que no fueron estimuladas con el miRNA, eran las primeras en lograr un cierre o cicatrización de la herida del 100%. El resto de los tratamientos se frenaron al mismo tiempo para realizar la comparación entre tratamientos.

En los resultados obtenidos para las células HTB-186 estimuladas con let-7g exógeno, a 100 nM y 200 nM, se observó que, en ambos casos, dicha capacidad disminuyó significativamente con respecto a las células control (Figura 6). A pesar de que se logró observar una mayor inhibición de la capacidad de migración a menor concentración de let-7g, esta diferencia no resultó ser significativa.

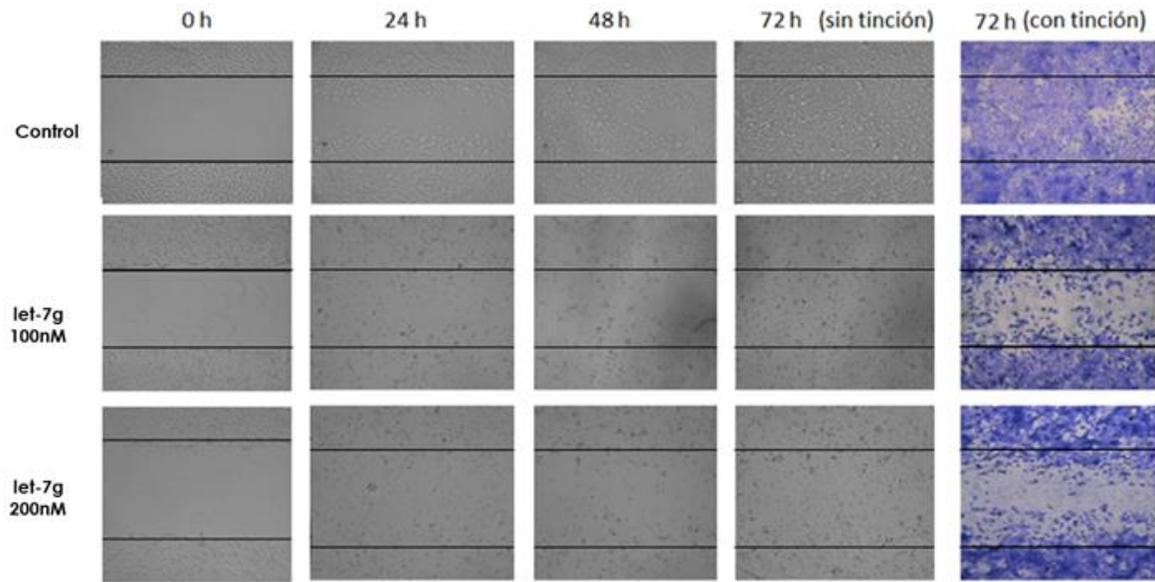


Figura 5. Efecto del let-7g sobre la capacidad de migración de las células HTB-186. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes realizados por duplicado cada uno.

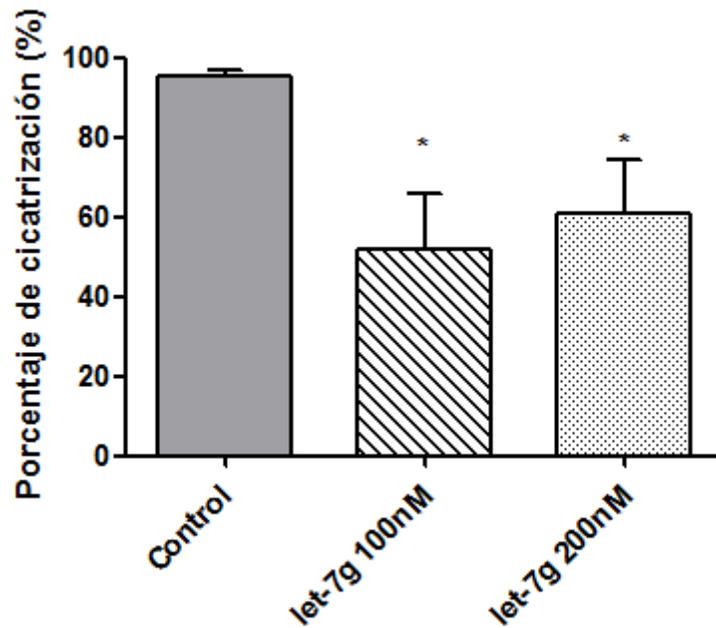


Figura 6. Cuantificación de la capacidad de migración de las células HTB-186 estimuladas con let-7g. Diferencias significativas con respecto al control. ANOVA de una vía. (\*)  $P < 0.05$

## **Let-7g inhibe la capacidad de invasión de células HTB-186**

La evaluación de la capacidad invasiva de las células HTB-186, posterior al estímulo con let-7g a 100 nM y 200 nM, fue medida mediante ensayos de invasión en cajas Transwell, caracterizadas por contener membranas porosas que permiten el paso a las células con capacidad invasiva. Para recrear el microambiente tumoral se colocó sobre las membranas una capa de matrigel, con fin de fungir como matriz extracelular. Dicho matrigel está compuesto por laminina, colágeno IV, entactina, proteoglicano de heparan sulfato, factores de crecimiento, entre otras moléculas. Después de 40 horas de estímulo se realizó la toma de 4 fotografías representativas de la membrana obtenida, las cuales contenían a aquellas células que lograron penetrar la capa de matrigel y atravesar la membrana de los insertos (Figura 7). Para el análisis se realizó el conteo celular de las 4 fotografías tomadas para cada tratamiento. Entre los resultados se observó una disminución significativa, hasta 5 veces menor, en la capacidad de invasión de las células tratadas con let-7g, tanto a 100 nM como a 200 nM, con respecto a las células control, es decir, sin estímulo (Figura 8). Nuevamente se logró observar un mayor efecto en las células tratadas con una menor concentración de let-7g, sin embargo, dicha variación no fue estadísticamente significativa.

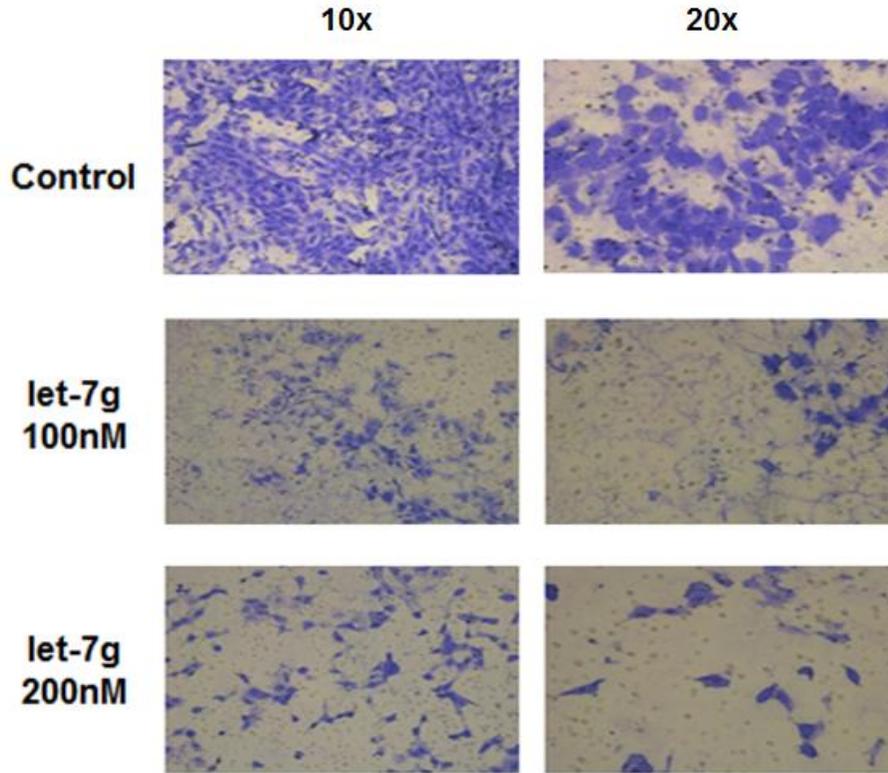


Figura 7. Efecto del let-7g sobre la capacidad de invasión en células HTB-186. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes a 10X y 20X.

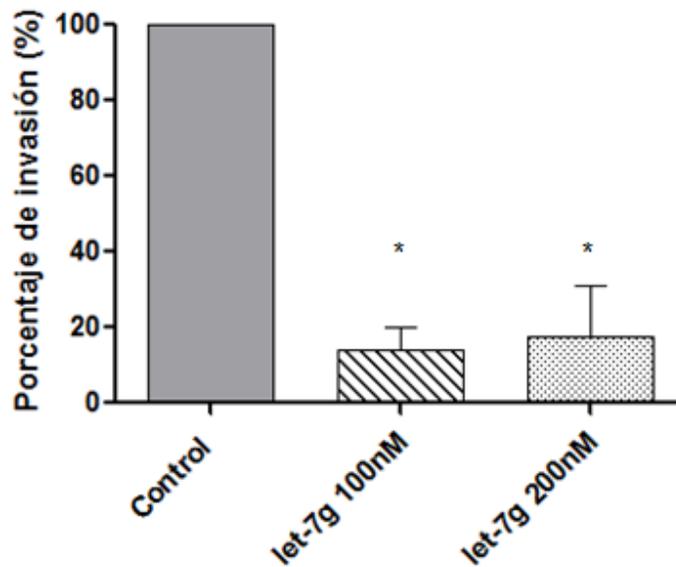


Figura 8. Porcentaje de invasión de células DAOY, después de la estimulación con let-7g 100 nM y let-7g 200 nM. Cada tratamiento se hizo por duplicado en tres experimentos independientes. Diferencias significativas con respecto al control. ANOVA de una vía con prueba Dunnett. (\*)  $P < 0.05$

## **Let-7g no induce la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-10 en células HTB-186**

Considerando que en el microambiente tumoral existe la presencia de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, que están involucradas en procesos de migración e invasión, se realizó la cuantificación de estas en sobrenadantes de células HTB-186 control y estimuladas previamente con let-7g, mediante ensayos de ELISA tipo sándwich; la cual se caracteriza por la alta especificidad y sensibilidad para la detección de anticuerpos específicos en una muestra problema.

Para ello se utilizaron los kits anteriormente descritos en Material y Métodos, y se cuantificó la absorbancia de las muestras para cada una de las citocinas. Para realizar la extrapolación de los datos obtenidos y conocer la concentración de cada citocina en los sobrenadantes, se realizaron curvas estándar, para todas las citocinas (Figura 9 A-C), a partir de diluciones seriadas de un stock (Tabla 7). De modo que esta curva estándar, a partir de la absorbancia obtenida y las concentraciones calculadas de las diluciones, permite comparar y conocer las concentraciones de cada citocina presente en nuestra muestra a partir de las absorbancias leídas en el espectrofotómetro. Pese a no haberse detectado la presencia de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en ninguno de los sobrenadantes obtenidos, tanto de controles como de células tratadas con let-7g a 100 nM y 200 nM, se puede corroborar la eficiencia de la técnica y los kits gracias a los resultados obtenidos en las curvas estándar. Los datos obtenidos en la curva estándar fueron graficados como gráficas de dispersión xy, y analizadas estadísticamente mediante el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el cual, mientras más cercano sea su valor a 1 significa que existe una correlación certera entre las concentraciones evaluadas y las absorbancias medidas para la curva estándar. En todos los casos el valor del coeficiente de determinación fue muy cercano a 1, lo cual corrobora la correcta realización de la técnica.

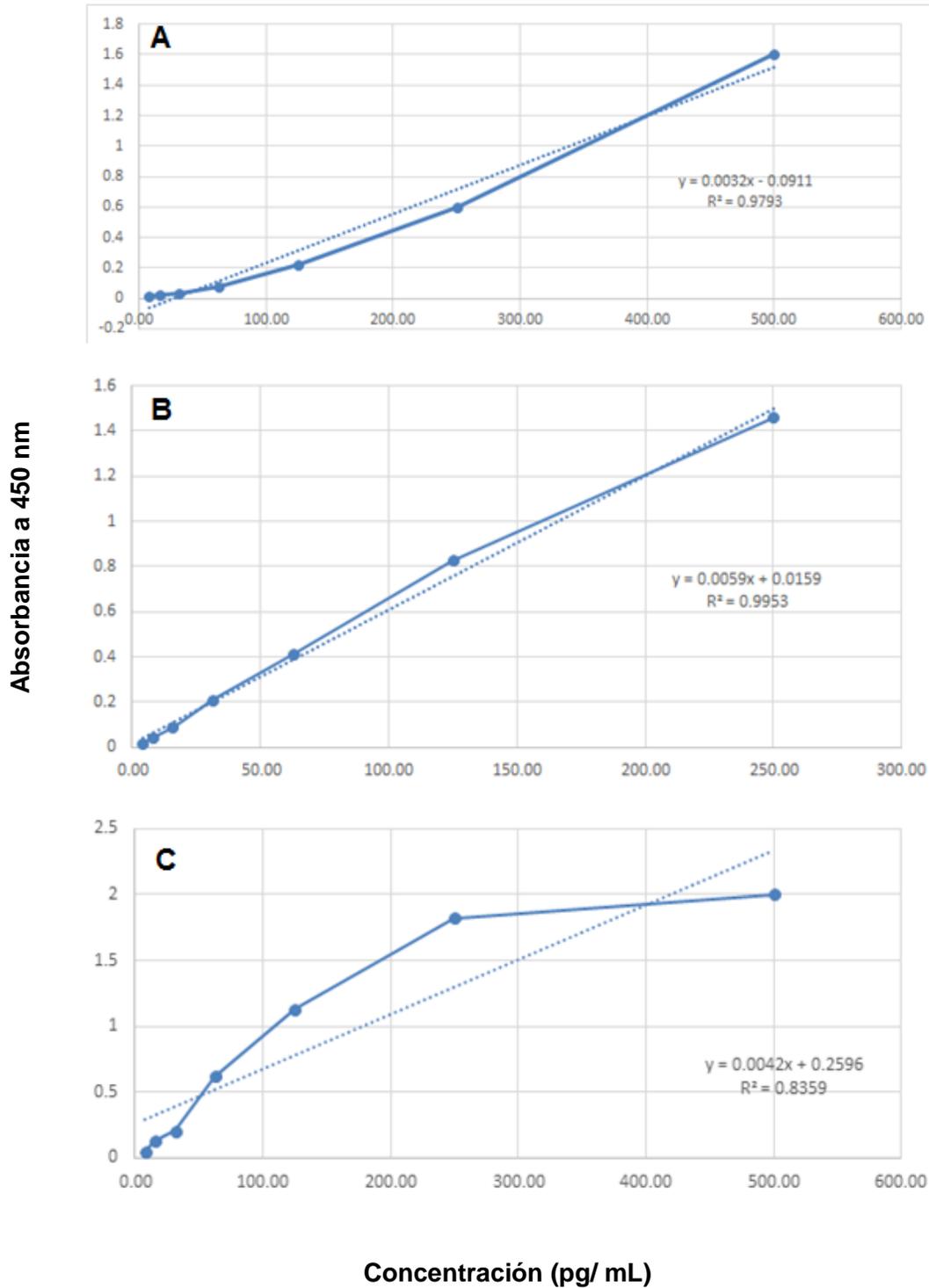


Figura 9 (A-C). Curvas estándar para (A) TNF-  $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$  y (C) IL-10 obtenidas a partir de diluciones seriadas con concentraciones iniciales de 500 pg, 250 pg y 500 pg, respectivamente.

## Let-7g colocaliza con TLR8 en células HTB-186

Para observar la colocalización de let-7g y TLR8 en el endosoma, mecanismo por el cual suponemos se están alterando las capacidades de invasión y migración, se utilizaron anticuerpos acoplados a fluorocromos que, mediante los láseres del microscopio confocal, fueron excitados a diferentes longitudes de onda de acuerdo a cada fluorocromo seleccionado. En este caso se utilizaron 403.8 nm para DAPI, 487.3 nm para FAM, 638.4 nm para Alexa Fluor 647 y 561.8 nm Alexa Fluor555 (Tabla 8).

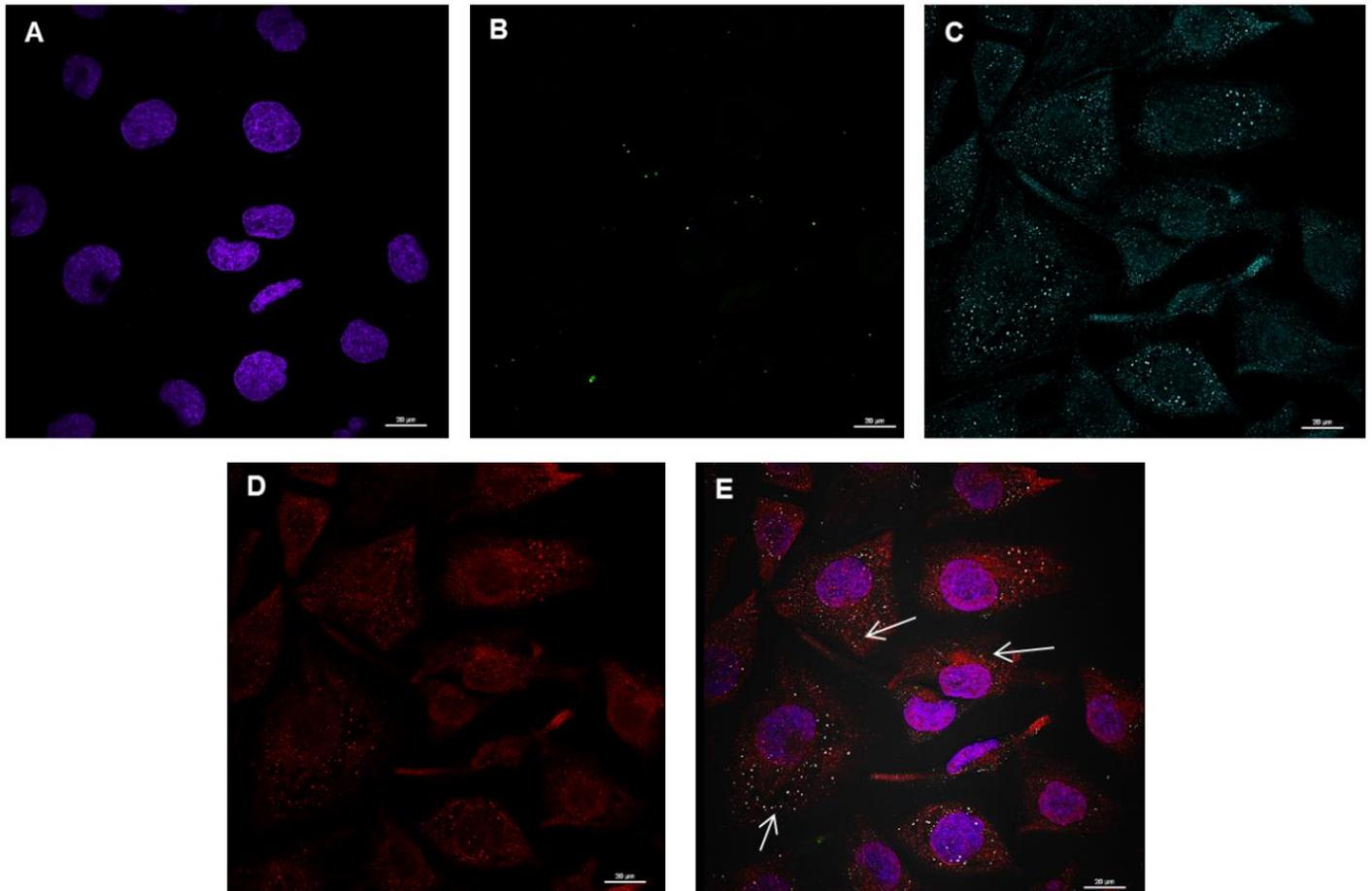
Las concentraciones utilizadas para la internalización de let-7g (acoplado a FAM) con lipofectamina RNAiMAX fueron 200 nM y 300 nM, mientras que para la internalización con DOTAP se utilizó a let-7g (acoplado a FAM) a 300 nM. La internalización con ambos reactivos liposomales, de manera independiente, se realizó con el objetivo de observar si existían diferencias en la internalización del let-7g, así como para el proceso de colocalización con TLR8 y Rab 11, el cual fue utilizado como marcador endosomal.

Entre los resultados obtenidos, por la internalización de let-7g con uno u otro compuesto liposomal, se logró observar la colocalización de TLR8, Rab 11 y let-7g (Figura 10-12), sin embargo, esta colocalización no fue diferencial entre uno u otro compuesto utilizado. Por otro lado, se logró observar que la internalización de let-7g en el endosoma era más rápida al utilizar DOTAP, con respecto a la lipofectamina RNAiMAX, siendo a los 15 minutos y 30 minutos, respectivamente.

En el caso de la lipofectamina RNAiMAX la colocalización fue más notoria a mayor concentración, por lo que en la internalización con DOTAP únicamente se utilizó a let-7g a 300 nM.

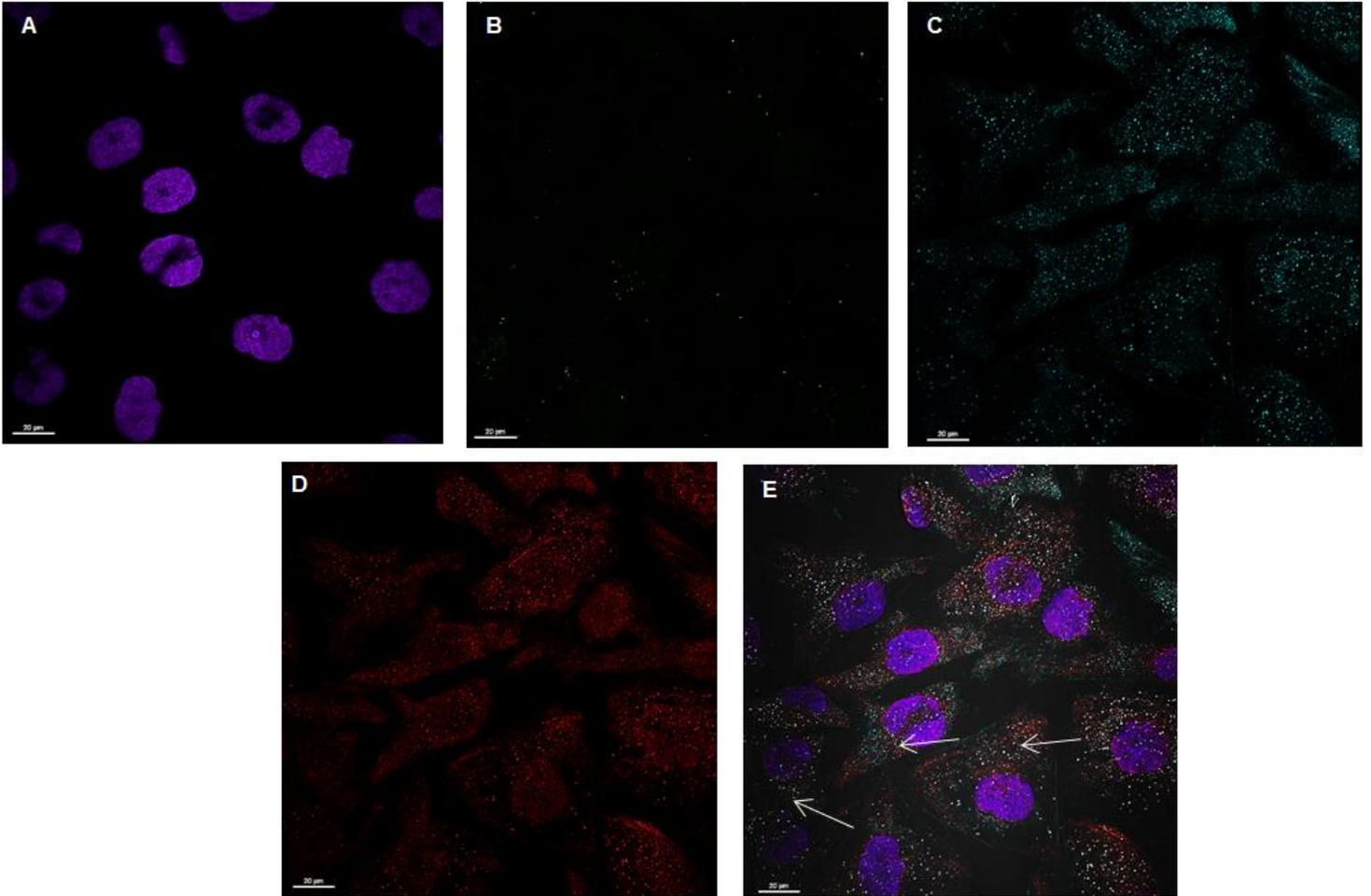
Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Image J mediante el coeficiente de Pearson para obtener los valores de correlación y colocalización entre let-7g y TLR8, por lo que mientras más cercano a 1 sea el valor obtenido,

mayor correlación hay entre ambos elementos. Los resultados obtenidos se muestran en Figuras 10-12.

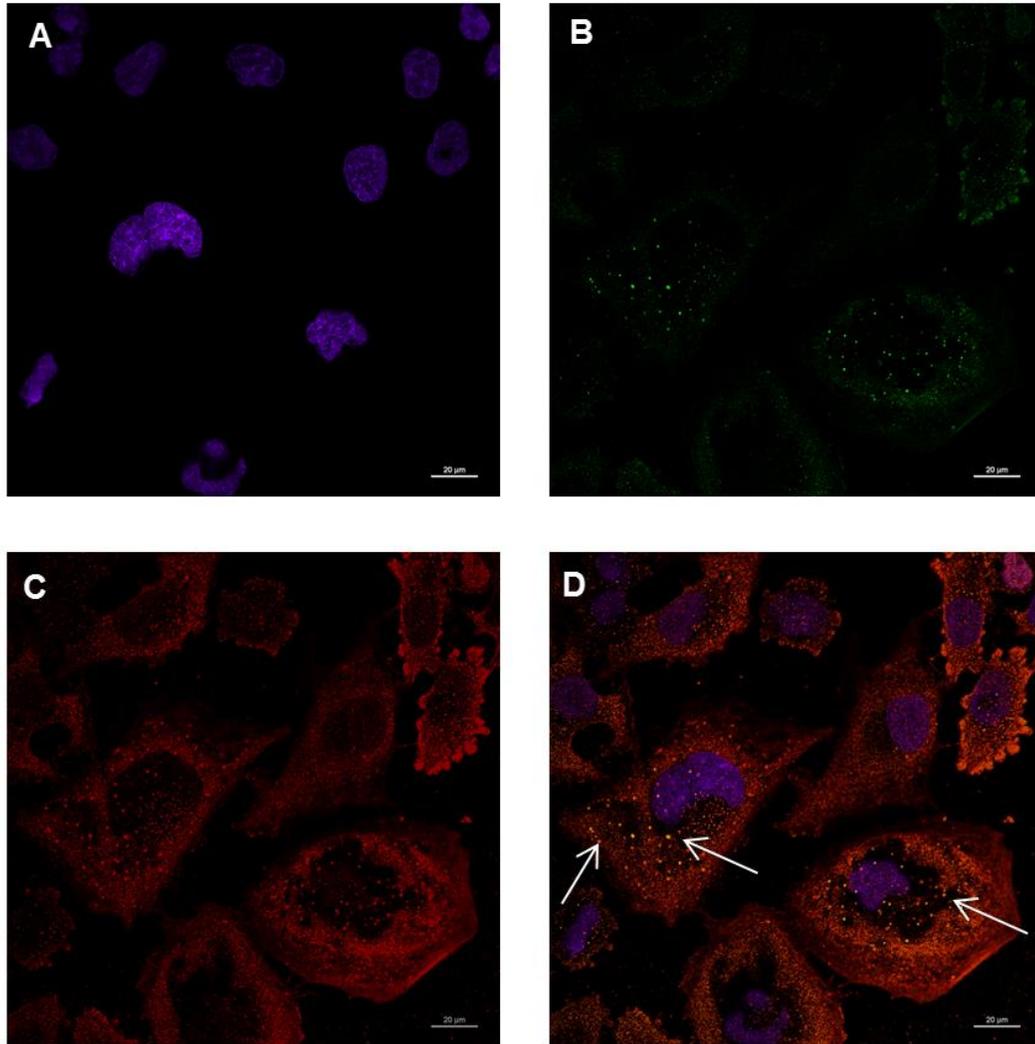


**Figura 10. Colocalización del let-7g y TLR8 en endosomas. Las células HTB-186 fueron estimuladas con let-7g 200 nM durante 30 min, posteriormente fijadas y teñidas: se muestra núcleo teñido con DAPI en morado (A), let-7g 200 nM acoplado a FAM en verde (B), TLR 8 en turquesa (C) y Rab 11 en rojo (D). Se muestran todos los marcadores y su colocalización en (E).**

**Valor del coeficiente de Pearson obtenido entre Rab, 11, let-7g y TLR 8: 0.678**



**Figura 11. Imágenes representativas de los ensayos de colocalización utilizando lipofectamina RNAiMAX. Las células fueron fijadas después de 30 minutos de la estimulación. Se muestra núcleo teñido con DAPI en morado (A), let-7g 300 nM acoplado a FAM en verde (B), TLR 8 en turquesa (C) y Rab 11 en rojo (D). Se muestran todos los marcadores y su colocalización (E). Valor del coeficiente de Pearson obtenido entre Rab 11, let-7g y TLR 8: 0.532**



**Figura 12. Imágenes representativas de los ensayos de colocalización utilizando DOTAP. Las células fueron fijadas después de 15 minutos de la estimulación. Se muestra núcleo teñido con DAPI en morado (A), let-7g 300 nM acoplado a FAM en verde (B), TLR 8 en rojo (C). Se muestran todos los marcadores y su colocalización en (D). Valor del coeficiente de Pearson obtenido entre let-7g y TLR 8: 0.842**

## XX. DISCUSIÓN

Los niveles de expresión de los miRNAs son dinámicamente alterados en el cáncer, con respecto a tejidos sanos, y descritos con actividades que participan en la inhibición o progresión tumoral. Interesantemente se ha reportado que, durante el cáncer, los niveles de miRNAs circulantes liberados en vesículas extracelulares, denominados exosomas, son mayores que en células sanas. Los miRNAs se caracterizan por presentar capacidades de regulación de genes implicados en diferentes procesos celulares que promueven o suprimen la progresión y agresividad del cáncer, tales como la capacidad de proliferación, migración, invasión, apoptosis, angiogénesis, metástasis, entre otros [23].

Pese que existen estudios en los que se conocen las desregulaciones en la expresión y la actividad de let-7g en diferentes tipos de cáncer, aún no se ha estudiado el papel de este miRNA en un modelo biológico para meduloblastoma. El presente estudio se enfocó en realizar la caracterización del papel que let-7g juega en la agresividad tumoral de células provenientes de meduloblastoma, en un modelo en el cual se simulaba la comunicación celular mediada por exosomas con el miRNA en su interior.

Inicialmente, con fin de observar el estado basal de la expresión de let-7g en meduloblastoma, se realizaron qPCR a partir de RNA proveniente de células HTB-186. Se logró observar una menor expresión, con respecto a las células U373, provenientes de glioblastoma, las cuales también han sido reportadas con una disminución en los niveles de expresión para let-7g [34].

Posteriormente se evaluó el efecto potencial de let-7g en las capacidades de migración e invasión de células HTB-186. En los resultados se puede observar claramente una inhibición en ambas capacidades. Dicha disminución puede ser resultado de una inhibición en la transición epitelio-mesénquima, la cual se caracteriza por conferir a las células tumorales propiedades similares a las de las células madre, promoviendo su capacidad de migración e invasión a tejidos

aledaños y generar resistencia a ciertas intervenciones terapéuticas. En células de glioblastoma se ha reportado que el subtipo let-7g-5p tiene la capacidad de disminuir esta transición, ya que actúa sobre la proteína VSIG4, la cual tiene un papel importante en la promoción de la transición epitelio-mesénquima [34].

En cánceres no relacionados con el SNC, tales como carcinoma hepatocelular, se ha reportado que la expresión de let-7g se encuentra disminuida en biopsias de pacientes con metástasis, resultando en una baja tasa de sobrevivencia. En cultivos celulares, se ha descrito que la sobreexpresión de let-7g resulta en una disminución de la motilidad celular y supresión de la capacidad de migración en células de hepatocarcinoma celular, teniendo como blanco principal al colágeno tipo I  $\alpha_2$ , el cual se ha descrito que junto con otros subtipos de colágeno contribuyen a la progresión metastásica [35, 36].

Por otro lado, entre los isotipos de let-7 con actividad supresora de tumores podemos hallar algunos ejemplos que comparten características similares con los resultados observados a lo largo del proyecto, tales como let-7a, let-7c, entre otros. En el caso de let-7a, en tejidos de carcinoma papilar de tiroides, se encontró que la expresión se encuentra disminuida con respecto a tejidos sanos, por lo que al sobreexpresarlo, *in vitro*, se afectan a las capacidades de proliferación, migración e invasión de las células que lo conforman, resultando en una inhibición de las capacidades mencionadas. Esta actividad se debe a la actividad de let-7a sobre AKT2, el cual es un oncogen involucrado en la progresión tumoral, principalmente por su actividad en procesos como progresión del ciclo celular, apoptosis, proliferación y migración [37]. En carcinomas nasofaríngeos, se ha descrito a let-7a con una actividad supresora de tumores mediante la inhibición de las capacidades de migración, invasión y transición epitelio-mesénquima mediante la regulación de HMGA2, oncoproteína implicada en la progresión de diferentes tipos de cáncer, y aumento en la agresividad tumoral mediante la potenciación de metástasis [38].

En carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, la expresión de let-7c también se ha reportado suprimida, con respecto a tejidos sanos. En cuanto a su función en este tipo de carcinoma, let-7c juega un papel importante en la inhibición de la proliferación, la capacidad de migración y la transición epitelio-mesénquima mediante la regulación de IGF1R y HMGA2, los cuales son factores importantes involucrados en la progresión del tumor, mediante la potenciación de su crecimiento, la capacidad de migración y la transición epitelio-mesénquima en este y otros tipos de cáncer [39]. Así mismo let-7c ha sido descrito como un regulador de ITGB3 y MAP4K3 en cáncer de pulmón de células no pequeñas, resultando en la inhibición de la capacidad de migración e invasión [40].

Estos reportes demuestran que diferentes isoformas de let-7 realizan funciones supresoras de tumores, sin embargo, no necesariamente son idénticas, ya que cada una actúa sobre diferentes moléculas blanco, por lo que sería interesante profundizar en los mecanismos y moléculas sobre las cuales let-7g actúa en meduloblastoma.

Por otro lado, con el fin de identificar diversas citocinas que participan en los procesos de migración e invasión, se realizó la cuantificación de la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, posterior a la estimulación con let-7g exógeno, ya que, como se mencionó anteriormente, la unión de miRNAs, provenientes de exosomas, con TLRs puede resultar en la activación de NF- $\kappa$ B, y con ello un incremento en la secreción de diversas citocinas pro y anti-inflamatorias [20, 41]. Así mismo, se ha descrito cómo las inflamaciones crónicas, resultado de fallas en la eliminación adecuada de patógenos o defectos en los mecanismos anti-inflamatorios favorecen la tumorigénesis y progresión tumoral [41]. Por ejemplo, el incremento en la secreción de TNF- $\alpha$  se ha relacionado con la promoción de inducción de genes codificantes de moléculas anti-apoptóticas, un incremento en la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), promoción de angiogénesis y metástasis, supresión de la actividad citotóxica de macrófagos, entre otros [40; 42]. Para IL-1 $\beta$  se ha reportado que en cáncer pueden jugar papeles de promoción de las capacidades de invasión mediante la producción de

metaloproteasas, tales como metaloproteína 9 (MMP9), inducción de la angiogénesis mediante el aumento en la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otros [42, 43]. Finalmente, para la IL-10, pese a ser una citocina anti-inflamatoria, se ha reportado una actividad dual, ya que su incremento en diferentes tipos de cáncer puede inhibir la angiogénesis mediante la regulación de VEGF y TNF- $\alpha$ , así como la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12. También puede favorecer la expresión de genes anti-apoptóticos como BCL-2 y BCL-XL, inhibir la respuesta inmune adaptativa y la activación de linfocitos T CD8+ y células NK. La actividad que realice dependerá de la interacción con otras citocinas [41; 42].

Pese a esperarse una presencia alta de las citocinas mencionadas en sobrenadantes obtenidos en células control y posteriormente, la estimulación con let-7g, sobre todo con los resultados obtenidos en los ensayos de migración e invasión, no se detectó la presencia de ninguna de las citocinas evaluadas. Posiblemente se deba a que sean otras citocinas las implicadas en estos procesos, tales como IL-6, la cual es una citocina inflamatoria pleiotrópica considerada clave en la progresión del ciclo celular y supresión de la apoptosis. IL-8, ya que se ha reportado que su incremento en cáncer es capaz de promover la angiogénesis e incrementar la proliferación, migración e invasión celular [44].

IL-12, la cual es una citocina capaz de inhibir la tumorigénesis e inducir regresiones en tumores establecidos mediante la promoción de la respuesta inmune tipo Th1, por otro lado junto con INF- $\gamma$  pueden tener efectos citotóxicos en los tumores y llevar a cabo procesos anti-angiogénicos. TGF- $\beta$ , la cual realiza actividades supresoras de tumores a través de la regulación de la inflamación mediada por células Treg, e inhibe el crecimiento celular en la tumorigénesis. Sin embargo, al igual que IL-10 juega un papel dual, ya que también participa en la progresión tumoral, mediante la potenciación de la transición epitelio-mesénquima, invasión y metástasis, además de inducir cambios en el microambiente tumoral

para favorecer la angiogénesis e inhibir a las células T CD8+ específicas con fin de promover el desarrollo tumoral [41].

Finalmente, después de realizar los ensayos de inmunofluorescencia por microscopía confocal se demostró que la internalización del miRNA con cualquiera de los dos compuestos liposomales es exitosa, y a simple vista no se logran observar diferencias entre ellos. Los resultados obtenidos en los ensayos de invasión y migración reflejan las alteraciones generadas como resultado de la estimulación con let-7g, es decir, el papel que juega este miRNA en la supresión de la agresividad tumoral. Así mismo se pudo observar que, efectivamente, let-7g y TLR8 colocalizan en el endosoma de las células HTB-186, lo cual nos indica la posible vía no canónica que realiza let-7g exógeno para inhibir los procesos de migración e invasión; sin embargo, para corroborar dicha hipótesis es necesario profundizar en el estudio de let-7g como ligando de TLR8.

En el presente trabajo se logró establecer el efecto en la biología del tumor que juega let-7g exógeno, una vez internalizada mediante exosomas en células de meduloblastoma. La importancia de su estudio radica en aportar conocimientos sobre las causas que podrían estar dando lugar a la agresividad tumoral, relacionadas con let-7g, y el papel que juega este miRNA en la respuesta inmune.

## XIX. CONCLUSIONES

Los niveles de expresión de let-7g en glioblastoma y meduloblastoma se encuentran disminuidos, lo cual parece mostrar un papel anti-tumoral importante en la regulación de ambos tipos de cáncer.

Let-7g exógeno juega un papel importante en la regulación de las capacidades de migración e invasión de las células de meduloblastoma. Se demostró que, efectivamente, let-7g presenta una actividad supresora de tumores.

La estimulación de células de meduloblastoma con let-7g exógeno no induce la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, pese a ser citocinas, tanto proinflamatorias y antiinflamatorias, importantes involucradas en la agresividad tumoral.

Existe una colocalización de let-7g con el receptor endosomal TLR8, en células de meduloblastoma. Sin embargo, los resultados observados no demuestran que los efectos observables en la biología del tumor, como la capacidad de migración e invasión, son generados a partir de la unión del miRNA evaluado con el TLR8 expresado en la célula tumoral, por lo que esta correlación únicamente nos puede dar un indicio de la posible ruta de acción del let-7g.

El estudio del papel de los miRNAs en la biología de los tumores enriquece nuestro entendimiento sobre las funciones que pueden estar jugando para inhibir o potenciar la tumorigénesis. El conocimiento de los procesos y moléculas involucradas puedan ser aprovechados para mejorar las técnicas de diagnóstico y terapias. Hoy en día los miRNAs circulantes comienzan a ser populares como moléculas pronóstico, tanto en detección de oncogénesis como para seguimiento en la evolución del tumor en respuesta a los tratamientos empleados. Sin embargo, aún hay mucho que estudiar sobre la señalización entre células y los papeles que los miRNAs juegan en esta.

## XXII. PERSPECTIVAS

- Abordar las causas de la inhibición en las capacidades de migración e invasión de las células HTB-186 una vez estimuladas con let-7g exógeno, analizando la expresión de genes blanco reportados para este miRNA e implicados en el favorecimiento de ambas actividades, tales como RAS [45], MYC [46] y HMGA2 [47, 48].
- Evaluar la capacidad de migración e invasión en una línea celular con alta expresión de let-7g tras el uso de Lin28A, el cual es un antagonista de let-7g.
- Profundizar en la caracterización y cuantificación de citocinas producidas como resultado del estímulo con let-7g exógeno, y que podrían estar favoreciendo o disminuyendo la agresividad tumoral, tales como IL-6, IL-8, IL-12 y TGF- $\beta$ .
- Profundizar en el estudio de la interacción de let-7g exógeno y TLR8. Demostrar si dicha interacción está correlacionada con lo observado en el presente trabajo.
- Estudiar el efecto de let-7g exógeno *in vivo* en tumores generados en ratones *nu/nu* (inmunodeficientes) mediante la inoculación de células HTB-186 en cerebelo.

### XXIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Farwell JR, Dohrmann GJ, Flannery JT. (1984) MB in childhood: an epidemiological study. *J Neurosurg*; 61(4):657-664.
- [2] Rutkowski S, Von Hoff K, Emser A, Zwiener I, Pietsch T, Figarella-Branger D, Giangaspero F, Ellison DW, Garre ML, Biassoni V, *et al.* (2010) Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: An international meta-analysis. *J Clin Oncol.* 28:4961–4968. [PubMed: 20940197]
- [3] Rivera-Luna R. (2006) Tumores del sistema nervioso central En: Rivera-Luna R, ed). *Hemato/Oncología pediátrica. Principios generales.* México: Editores de Textos Mexicanos; 335-366.
- [4] Packer, R.J., y Vezina, G. (2008). Management of and prognosis with medulloblastoma: therapy at a crossroads. *Arch. Neurol.* 65, 1419-1424
- [5] Bartlett, F. *et al.* (2013). Medulloblastoma. *Clinical Oncology*, 25, 36-45.
- [6] Park, TS, Hoffmann HJ, Hendrick EB, *et al.* (1983) MB: clinical presentation and management. Experience at the Hospital for Sick Children, Toronto, 1950-1980. *J Neurosurg*; 58 (4) 543-552.
- [7] Kool, M., Korshunov, A., Remke, M., Jones, D.T., Schlanstein, M., Northcott, P.A., Cho, Y.J., Koster, J., Schouten-van Meeteren, A., van Vuurden, D., *et al.* (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 123, 473-484
- [8] Moxon-Emre I, Bouffet E, Taylor MD, *et al.* (2014) Impact of craniospinal dose, boost volume and neurological complications on intellectual outcome in patients with medulloblastoma. *J Clin Oncol.* 32(17):1760–1769.
- [9] Gajjar, A. J. & Robinson, G. W. (2014) Medulloblastoma—translating discoveries from the bench to the bedside *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 714–722
- [10] Chung-sean Pang J, Kei Kwok W, Chen Z, Ng HK. (2009) Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *ActaNeuropatol*, 117, 599-611

[11] Kool, M. *et al.* (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of, WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 123, 473–484.

[12] Osman A. (2012) MicroRNAs in health and disease-basic science and clinical applications. *Clin Lab*; 58 (5-6): 393-402

[13] Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*; 116:281-297.

[14] Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, Caffarelli E, Screpanti I, Bozzoni I, Gulino A. (2009) MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer.*; 124:568-577

[15] Paschon V, Honda S, Midori J, Sousa E, *et al.* (2014). Interplay Between Exosomes, microRNAs and Toll-Like Receptors in Brain Disorders. *Mol Neurobiol.* 2016 Apr;53(3):2016-2028.

[16] Di Leva, G., Garofalo, M. y Croce, C. M. (2014). microRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.*, 9, 287–314.

[17] Wang, Chen (2014) Circulating miRNAs in cancer: from detection to therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 7:86.

[18] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, *et al.* (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.*; 435:834–38.

[19] He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435:828–833.

[20] Fabbri, M. (2012). TLRs as miRNA Receptors. *Cancer Research*, -, 6333-6337

[21] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 9:654–659.

- [22] Noah Hornick BSJH (2013) Hypoxia regulates exosomal microRNA content, trafficking and function of key elements in the AML microenvironment. *Blood* 122: s742
- [23] Nishida-Aoki, N. y Ochiya, T. (2015). Interactions between cancer cells and normal cells via miRNAs in extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* Cell. Mol. Life Sci., 72, 1849–1861.
- [24] Segura E, Guerin C, Hogg N, Amigorena S, Thery C (2007) CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol*, 179:1489–1496.
- [25] Takeda, K. y Akira, S. (2014). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16, 3-9
- [26] Satoh T, Akira S. (2016). Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Microbiol Spectrum* 4(6): MCHD-0040-2016.
- [27] Kawai T, Akira S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373–384.
- [28] Kenny, E.F. & O'Neill, L.A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* 43, 342-349 (2008).
- [29] Maslinska, D., Laure-Kamionowska, M. y Maslinski, S. (2012). Toll-like receptors as an innate immunity bridge to neuroinflammation in medulloblastoma. *Folia Neuropathologica*, 50 (4), 375-381.
- [30] Hennessy, E. y O'Neill, L. (-) Toll-like receptors: very clever molecules. 05 Diciembre 2018, de ABCAM Sitio web: [https://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=12189&utm\\_campaign=CFAImmunology&utm\\_source=Abcam.CFA&utm\\_medium=Email&utm\\_term=030210TLRarticle&cl=249&intGoUse r=15](https://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=12189&utm_campaign=CFAImmunology&utm_source=Abcam.CFA&utm_medium=Email&utm_term=030210TLRarticle&cl=249&intGoUse r=15)
- [31] Tong, L., Yuan, Y. y Wu, S. (2015). Therapeutic microRNAs targeting the NF-kappa B Signaling Circuits of Cancers. *Adv Drug Deliv Rev*, 0, 1-15.
- [32] Boyerinas, B *et al.* (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 17, F19-F36.

**[33]** Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS, Caffarelli E, Screpanti I, Bozzoni I, Gulino A. MiRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer*. 2009; 124:568-577

**[34]** Xin-Hua, Z., Yun, Q., Zheng, L., Ning-Ning, Z. y Yun-Jie, X. (2016). Let-7g-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition consistent with reduction of glioma stem cell phenotypes by targeting VSIG4 in glioblastoma. *ONCOLOGY REPORTS*, 36, 2967-2975.

**[35]** Balzeau J, Menezes MR, Cao S y Hagan JP (2017) The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front. Genet.* 8:31.

**[36]** Junfang, J., Lei, Z., Anuradha, B., Marshonna, F., Hu-Liang, J., Lun- Xiu, Q., Qing-Hai, Y., Jinming, Y., Xuetao, S., Zhao-You, T., y Xin Wei, W. (2010). Let-7g targets collagen type I  $\alpha 2$  and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 52(5), 690–697.

**[37]** Bin, Z., Hailin, S., Ying, S., Kai, X., Runlong, Z. y Qing, S. (2017). Let-7a inhibits migration, invasion and tumor growth by targeting AKT2 in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*, 8, (41), 69746-69755.

**[38]** Aibing, W., Kunpeng, W., Jinmei, L., Yanli, M., Yanming, L., Yuzhou, W., Xiang, S., Shujun, L., Lixia, L. y Zhixiong Y. (2015). Let-7a inhibits migration, invasion and epithelialmesenchymal transition by targeting HMGA2 in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 13, 105.

**[39]** Bo H., Hajime, I., Kaoru, M., Satoshi, N., Yusuke, H., Shinji O., Ning, M., Kazuhiko, T. y Mariko M. (2018). Let-7c inhibits migration and epithelial–mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma by targeting IGF1R and HMGA2. *Oncotarget*, 9 (10), 8927-8940.

**[40]** Bingtian, Z., Haibo, H., Jinfeng, C., Zhiqian, Z., Shaolei, L., Fang, F., Qingfeng, Z., Yuanyuan, M., Jianzhi, Z., Nan, W., Yue Y. (2014). MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. *Cancer Letters*, 342, 43-51.

**[41]** Wan-Wan, L., Michael, K. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*, 117(5), 1175-1183.

**[42]** Yang, Y., Chao, L., Feng, R., Bi, S. (2011). The TNF- $\alpha$ , IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137, 947–952.

**[43]** Tulotta, C. y Ottewell, P. (2018). The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocrine-Related Cancer*, 25, 421-434.

**[44]** Waugh, D. y Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res*, 14 (21), 6735-6741.

**[45]** Roush S, Slack FJ. (2008) The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*. 18:505–516.

**[46]** Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. (2008) MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res* 18:549–557.

**[47]** Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 39:673–677.

**[48]** Lee YS, Dutta A. (2007) The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*

## **XIV. ANEXOS**

### **Inactivación del Suero Fetal Bovino**

Una vez descongelado, se colocó el Suero Fetal Bovino a 56°C por 30 minutos en un baño maría Maxi Shake de Heto. Posteriormente, se realizaron alícuotas de 45mL cada una para uso personal.

### **Preparación de buffer de carbonatos de sodio (ELISA)**

En un litro de agua bidestilada, marca MIZU, se diluyeron 7.13g  $\text{NaHCO}_3$ , marca J. T. Baker S. A. de C. V., y 1. 59g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , marca Gibco BRL (ver anexo). Posteriormente, se midió el pH con un potenciómetro marca HANNA Instruments modelo pH 210, y se llevó a un pH de 9.5 con ayuda de HCl, marca J. T. Baker S. A. de C.V., y NaOH, marca Hycel.

### **Preparación PBS 10X**

En un litro de agua bidestilada se diluyeron 80g de NaCl, marca Hycel; 11.6g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , marca Merck; 2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , marca J.T. Baker S.A. de C.V.; y 2g de KCl, marca J. T. Baker S.A. de C.V. Posteriormente, se midió el pH y se llevó a 7 con ayuda de HCl y NaOH. Para realizar la dilución a 1X se utilizó agua bidestilada.

### **Tinción con violeta de Genciana**

Se retiró sobrenadante o tratamiento a las células o membrana a teñir. En caso de ser una membrana (ensayos de invasión) a teñir, se colocó en un pozo vacío de la caja Transwell. Se colocaron 400  $\mu$ L de etanol absoluto, por pozo, marca ICR S.A. de C.V., y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Se retiró etanol y se colocaron 400  $\mu$ L de cristal violeta marca DROTASA, por pozo, a una dilución 1:5 con agua bidestilada y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró cristal violeta y se realizaron 3 lavados con agua de la llave. En el caso de los ensayos de migración se añadieron 400 $\mu$ L de PBS 1X por pozo para la toma de fotografías. Para los ensayos de invasión se realizó el montaje de las membranas en portaobjetos usando medio de montaje Neo-Mount de Merck KGaA.