



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN DINÁMICA CELULAR**

“Inflamación y Transformación celular: Merlín y los microRNAs”

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

Lic. Nilda del Carmen Sánchez Castellanos

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

**Sinodales**

Dra. María Angélica Santana Calderón

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

CUERNAVACA, MORELOS

Septiembre 2019

**Universidad Autónoma del Estado de Morelos**

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN DINÁMICA CELULAR

“Inflamación y Transformación celular: Merlín y los microRNAs”

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

Lic. Nilda del Carmen Sánchez Castellanos

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

**Sinodales**

Dra. María Angélica Santana Calderón

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

CUERNAVACA, MORELOS

*Septiembre 2019*

## **Jurado Revisor**

Dr. Vicente Madrid Marina

Dra. Verónica Narváez Padilla

Dra. María Angélica Santana Calderón

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Dr. Iván Martínez–Dunker Ramírez

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias

**DR. VICTOR BARBA LÓPEZ  
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Inflamación y transformación celular: Merlín y los microRNAs" que presenta la alumna Nilda del Carmen Sánchez Castellanos (5920130401) para obtener el título de Doctor en Ciencias.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Vicente Madrid Marina INSP-CISEI	Aprobado	
Dra. Verónica Narváez Padilla CIDC-UAEM	Aprobado	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	Aprobado	
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama FM-UAEM	Aprobado	
Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez CIDC-UAEM	Aprobado	
Dra. Rosana Pelayo Camacho CIBIOR	Aprobado	
Dra. Ma. de Lourdes Gutiérrez Xicotencatl INSP-CISEI	Aprobado	

*Dedicado a mi amada familia,  
A mi mamá, a mi papá,  
A mi hermano y mi sobrina  
A mi esposo y nuestro hijo  
A mis abuelos  
A todos mis amigos  
A mis maestros  
A mis tutores*

## **AGRADECIMIENTOS**

***La realización de este trabajo ha sido posible gracias al apoyo y la participación de muchas personas, a quienes quiero hacer llegar mi más profundo y sincero agradecimiento, con todo mi amor y mucho cariño, quiero decirles: GRACIAS!!!***

*Le agradezco a toda mi familia, en especial a mis amados padres, por ser ese ejemplo de vida a seguir y el soporte indispensable para mi hermano y para mí. Gracias a Uds. y a la educación que nos dieron, hoy nosotros, sus hijos, nos hemos realizado personal y profesionalmente.*

*También quiero agradecer a mi querido hermano, porque es mi orgullo y ha sido mi inspiración, gracias por tu amor de hermano inigualable! Gracias por el apoyo, por la guía y por ser mi ejemplo a seguir. También por reglarme una tierna princesita, como sobrina.*

*También quiero agradecer a mi adorado esposo y nuestro pequeño hijo Thiago, todo el amor, el apoyo, por ser el motor que me impulsa cada día a seguir con más ánimo y por ser parte de esa familia que todos soñamos formar.*

*Gracias a mis abuelos queridos, por sembrar la semilla que hoy da frutos en esta familia inmensa, también por ser ejemplo e inspiración de nuestros padres que hoy nos han legado. También por todo el amor y cariño que nos dieron a sus nietos, por los que hoy con la conclusión de este trabajo quiero hacerles un homenaje, aunque ya no están con nosotros los recordamos con mucho cariño.*

*Gracias también a las todas las tías y los primos, que aunque estemos lejos, siempre se han mantenido en contacto y muy al pendiente de nosotros por acá. Gracias por todo el afecto y el cariño y por mantener unida nuestra familia.*

*Gracias todos los amigos!!! A mis amigas de la infancia Judi y Triana, por mantenerse siempre cerca a pesar de la distancia. A los amigos de la familia y vecinos de Alamar, en especial a Oraida, Lissy y Lázaro (Cintanegra) por todo su afecto para nosotros y porque ya son miembros de la familia.*

*A mis amigos de la Facultad de Biología: Arelis, Betzaida, Leomar, Eber, por todo lo vivido y lo que compartimos juntos. A todos los miembros de la muchachera del CIM: Alex, Denise, Soto, Víctor, Karina, Lili, Yasser, Ailem, por todo lo que nos divertimos mientras trabajamos juntos. También al Dr., Joel de León, Dr. Rolando y la Dra. Belinda que contribuyeron a mi formación profesional en durante mi estancia en el CIM.*

*Gracias a todos mis amigos de aventura del Doctorado: Andrés, Ramón, José.A, Gilberto, Maikel, Berto, Gerson y Ayixon por todo el apoyo y porque aquí en México se fortalecieron esos lazos de amistad que nos unían desde Cuba.*

*También gracias, a los amigos de generaciones más jóvenes: Viri, Arline, Leydis, Jazmin, Eya, Reinier, Yordanis, Mirza y familia, Mabel y familia.*

*A mis amigos del laboratorio: Elisa, Cristina, Angelica, Sol, Dra Martha, Jhonathan, Clarita, Luis, Marieli, Jorgito, Eladio, Erick, Alex, Rubi, Roly, Edgardo, Karla, Nohemi, Kenya, Daniela, Ruben .A nuestras maravillosas vecinas del laboratorio: Laura y Maru, gracias por su amistad y todo el apoyo que me han brindado.*

*También a los técnicos que hacen posible que salga el trabajo de laboratorio Dr. Tomas, Tec. Vicky, y Tec. Oswaldo, a la Dra Graciela, Dra Elizabeth del bioterio.*

*A mis maestros todos, desde preescolar hasta la universidad y estudios de posgrado les agradezco, porque todos han contribuido a mi formación y a que hoy pueda culminar esta etapa profesional.*

*También quiero agradecer a Lupita y familia, por todo: por acogernos como familia, por brindarnos su amistad, por todas las atenciones que han tenido conmigo y mi familia.*

*También quiero agradecer a Adrián y familia, porque gracias al servicio que nos brinda de transporte seguro a casa todas las noches le avanzamos al trabajo. Gracias, por tu amistad y por compartimos tus vivencias, que son maravillosas!*

*También a mis tutores: Dra Leonor Pérez y al Dr., Gustavo Pedraza por aceptarme como en estudiante de Doctorado en su grupo. Especialmente al Dr. Gustavo por asesorarme en este trabajo. Gracias, por todos los conocimientos que me han compartido y porque ha sido un gusto poder aprender y trabajar con Uds.*

**A TODOS, MUCHAS GRACIAS!!!**

## Índice

Lista de abreviaturas .....	1
Resumen.....	3
Resumen Gráfico .....	4
Summary / Abstract .....	5
Introducción .....	6
Cáncer de pulmón .....	6
Adenocarcinoma .....	8
Carcinogénesis.....	9
Metástasis .....	10
Inflamación asociada al cáncer y la metástasis.....	11
Genes supresores de tumores .....	13
Merlín: producto del gen de la Neurofibromatosis tipo 2(NF2) .....	14
NF2/Merlín: gen supresor de tumores.....	15
Inactivación de Merlín en el cáncer .....	16
MicroRNAs.....	19
MiRNAs y cáncer .....	19
MiRNAs en adenocarcinoma de pulmón.....	21
MiRNAs que regulan a Merlín en la inflamación asociada al cáncer .....	23
Justificación y planteamiento del problema .....	25
Hipótesis:.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
Materiales y Métodos .....	27
Pacientes .....	27
Animales.....	27
Cultivo Celular .....	27
Diseño de oligos y PCR para la generación de construcciones. ....	28
Vectores plasmídicos y construcciones.....	28
Transfecciones en células A549 .....	29
Extracción de proteínas totales.....	29
Ensayos de actividad de luciferasa.....	30
Clonación por dilución limitante .....	30
Selección de clones con bajos niveles de mir-146a .....	30

Líneas celulares estables y generación de clonas .....	31
Ensayos de proliferación celular .....	31
Ensayos de cicatrización de herida en monocapa de cultivo.....	32
Extracción de ADN genómico a partir de células de mamíferos en cultivo .....	32
Ensayo de Dot Blot para ADN.....	33
Electroforésis de proteínas y Western Blot .....	33
RT-PCR semi-cuantitativo y cuantitativa de miRNAs .....	34
Ensayos de metástasis experimental .....	35
Análisis estadístico .....	36
Resultados .....	37
Predicción bioinformática de sitios de unión para miRNAs en la UTR 3' de Merlín y análisis termodinámico y de conservación.....	37
La región 3' UTR de Merlín es regulada por miRNAs: miR-146a, miR-7a, miR-32 y mir-25.....	39
La citocina proinflamatoria TNF $\alpha$ induce el aumento de miRNAs en las células A549. ....	41
La disminución de los niveles de Merlín en presencia de TNF $\alpha$ es mediada por el aumento de miR-146a.....	43
La citocina proinflamatoria TNF promueven la migración de las A549. ....	45
El miR-146a media el efecto positivo de TNF.....	48
TNF $\alpha$ promueve la capacidad metastásica de las células A549 a través de inducir la expresión de miR-146a y la inhibición de Merlín.....	50
El aumento de miR-146a por TNF $\alpha$ se correlaciona con la inhibición de la proteína Merlín en pacientes con cáncer de pulmón. ....	54
Discusión .....	59
Conclusiones .....	65
Perspectivas .....	66
Referencias Bibliográficas .....	67
ANEXO I: .....	80
Estandarización de qPCR para miRNAs .....	80
ANEXO II: Tablas.....	83
Tabla 1. Datos clínicos de pacientes.....	83
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para RT-PCR y qPCR.....	84
Tabla 3. Anticuerpos utilizados .....	85
ANEXO III: Publicaciones .....	86

## Lista de abreviaturas

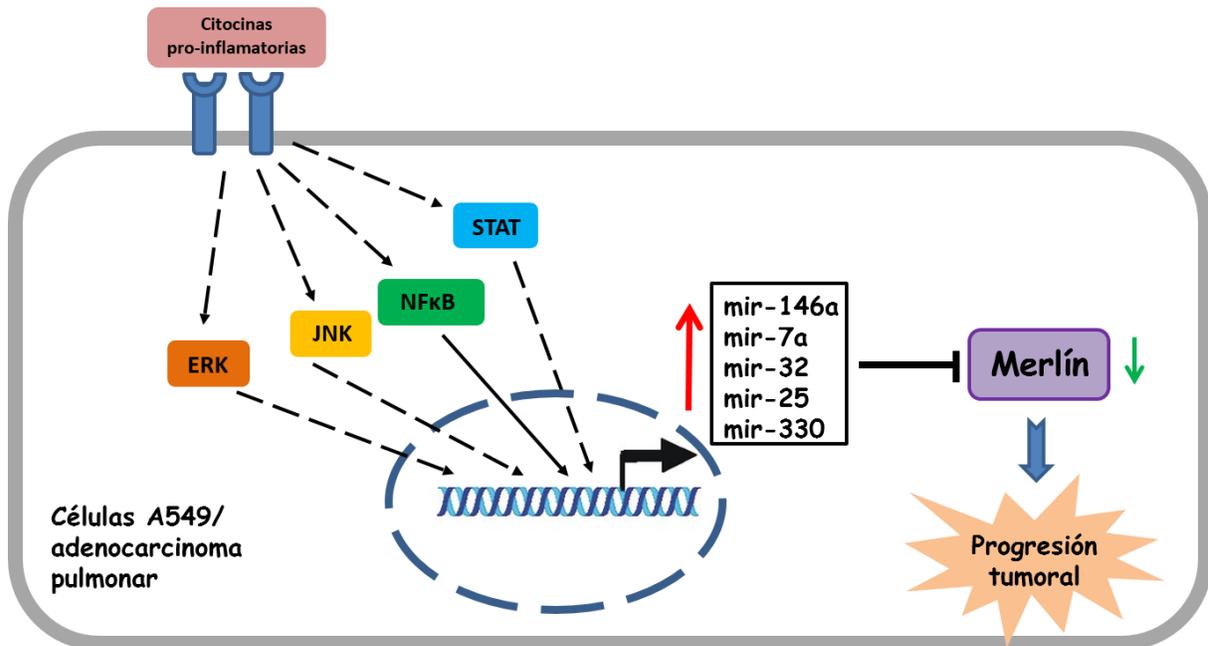
**3´UTR:** untranslated regions 3´  
**A549:** línea celular de adenocarcinoma de pulmón  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**AKT:** AKT serine/threonine kinase1  
**ANOVA:** ANalysis Of VAriance  
**APC:** adenomatosis polyposis coli protein  
**Ara-c:** cytosine arabinoside (inhibidor de la proliferación celular)  
**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**ATF1:** activating transcription factor 1  
**BRCA1:** breast cancer 1(DNA repair associated)  
**BrdU:** Bromodesoxiuridina  
**CDK4:** cyclin dependent kinase 4  
**CDKN2:** cyclin dependent kinase inhibitor 2A  
**cDNA:** ADN complementario  
**DMEM/F12:** Medio Eagle modificado de Dulbecco con Mezcla de nutrientes F-12  
**dNTP:** desoxirribonucleótidos trifosfato  
**DTT:** Ditionitrotol  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético  
**ERK2:** mitogen-activated protein kinase 1(MAPK1)  
**ERM:** domain common to Ezrin/Radixin/Moesin  
**FERM:** For 4.1 protein/Ezrin/ Radixin/ Moesin  
**HDGF:** heparin binding growth factor  
**HIV-1:** virus de inmunodeficiencia humana tipo 1  
**hMLH1:** human mutL homolog 1  
**HRP:** horseradish peroxidase  
**IFN $\beta$ :** Interferón beta  
**IKK $\beta$ :** inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase beta  
**IL1- $\beta$ :** Interleucina 1-beta  
**KLF4:** Krüppel-like factor 4  
**LPS:** Lipopolissacarids  
**MDM2:** murine doble minute 2 (inhibidor de p53)  
**miRNAs:** microRNAs  
**MSH2:** mutS homolog 2  
**MYC:** myelocytomatosis viral oncogene homolog  
**MYPT-1-PPT1 $\delta$ :** myosin phosphatase target subunit 1  
**NF2:** gen de neurofibromatosis tipo 2  
**NF $\kappa$ B:** nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells  
**NSG:** inmunodeficient mouse NOD scid gamma  
**nt:** nucleótidos  
**nu/nu:** inmunodeficient nude mouse  
**p14:** proteína de 14kDa  
**p16:** proteína de 16kDa  
**p21:** proteína de 14kDa

**p53:** proteína de 53kDa  
**PAK:** p21 activated kinase  
**pb:** pares de base  
**PBS:** Phosphate Buffer Solution  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PDCD4:** proteína de muerte celular programada 4  
**p-ERK1:** phosphorylated mitogen-activated protein kinase 1(MAPK1)  
**p-IKK $\alpha$ :** phosphorylated inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase alpha  
**PKA:** protein kinase A, dependiente de AMP cíclico  
**PMSF:** phenylmethylsulfonyl fluoride (inhibidor de proteasas)  
**pNF2:** proteína del gen de neurofibromatosis tipo 2 fosforilada  
**pRb:** proteína de retinoblastoma fosforilada  
**PTEN:** phosphatase and tensin homolog  
**qPCR:** quantitative Polymerase Chain Reaction  
**RAC:** Rac type GTPase protein family  
**RAS:** Ras type GTPase protein family  
**Rb:** proteína de retinoblastoma  
**RET:** ret proto-oncogene receptor tyrosine kinase  
**RLU:** Relative Luciferase Unit  
**RTPCR:** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction  
**SBF:** serum bovine fetal  
**STAT3:** signal transducer and activator of transcription 3  
**Tat C:** tyrosine aminotransferase C  
**TBE:** Tris-Borate-EDTA buffer  
**TBS:** Tris Buffer Solution  
**TE:** Tris-EDTA buffer  
**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor beta  
**TNF $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor alpha  
**TNFR1:** Tumor Necrosis Factor Receptor 1  
**TNFR2:** Tumor Necrosis Factor Receptor 2  
**TPM1:** tropomiosina 1  
**TRAF3:** TNF Receptor Associated Factor 3  
**VHL:** von Hippel-Lindau tumor suppressor  
 **$\Delta\Delta G$ :** diferencia entre las energías libres de Gibbs miRNA: mRNA

## Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños ARNs, de 19-24nt de largo, que tienen la función de regular la expresión génica, induciendo la degradación de ARNm específicos o inhibiendo su traducción, uniéndose por complementariedad a la región 3' UTR de los ARNm blanco. Disminuyendo la expresión de sus blancos, los miRNAs controlan múltiples procesos biológicos como, la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación celular. La desregulación de la expresión de miRNAs se ha asociado a distintas patologías como el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. Los miRNAs en la carcinogénesis pueden actuar como genes supresores de tumores, si tienen como blanco oncogenes o como oncomiRNAs, si su blanco es un gen supresor de tumores. La proteína Merlín codificada por el gen NF2, tiene funciones supresoras de tumores, por lo que la inactivación o la deficiencia de dicho gen promueven la transformación maligna y la progresión tumoral. Se ha observado que modificaciones postraduccionales de la proteína, como la fosforilación, inhiben su función o pueden conducir a su degradación. Evidencias experimentales de nuestro laboratorio muestran que la expresión de Merlín también es regulada a nivel post-transcripcional, mediante ellos mir-7 y mir-146a, que contribuyen a mantener bajos los niveles de la proteína, promoviendo la proliferación, la migración celular y la formación de tumores. También se ha reportado que la expresión de miR-146a es regulada positivamente por señales inflamatorias como LPS, IL1- $\beta$  o TNF $\alpha$ , por lo que proponemos que los miRNAs que regulan negativamente a Merlín, podrían ser parte de los mecanismos moleculares mediante los cuales la inflamación favorece el proceso de progresión tumoral. Nuestros resultados muestran que TNF $\alpha$  promueve el aumento de mir-146a en las células A549, lo que conlleva a la disminución de los niveles del supresor de tumores Merlín, potenciando la capacidad migratoria de estas células. También observamos que el aumento de mir-146 inducida por TNF $\alpha$  incrementa la formación de metástasis de las células A549 en ratones inmunodeficientes. También; además encontramos que en las muestras de adenocarcinoma de pulmón invasor/ metastásico existe una fuerte correlación entre los altos niveles de mir-146 con los bajos niveles de proteína Merlín, lo cual indica que estos dos blancos podrían ser utilizados como biomarcadores de progresión tumoral.

## Resumen Gráfico



**Resumen Gráfico: Las citocinas proinflamatorias promueven la progresión tumoral induciendo el aumento de miRNAs que tienen como blanco a Merlín promoviendo la progresión tumoral en adenocarcinoma de pulmón.** La señalización de citocinas proinflamatorias en células de adenocarcinoma pulmonar A549, a través de diferentes factores de transcripción, podría promover el incremento de la expresión de miR-146a, miR-7a, miR-32, miR-25 y miR-330, los cuales tienen como blanco el ARNm-NF2, esto inhibe la traducción del ARNm-NF2 provocando que disminuyan los niveles de proteína del supresor de tumores Merlín. La disminución de los niveles de Merlín en las células de adenocarcinoma promueve la migración y la invasión de estas células tumorales y con ello se potencia la progresión tumoral.

## Summary / Abstract

The miRNAs (miRNAs) are small RNAs, 19-24nt long, which have the function of regulating gene expression, inducing the degradation of specific mRNAs or inhibiting their translation, joining by complementarity to the 3'UTR region of the white mRNAs. By decreasing the expression of their targets, miRNAs control multiple biological processes such as cell proliferation, apoptosis and cell differentiation. The deregulation of the expression of miRNAs has been associated with different pathologies such as the development of various diseases, including cancer. The miRNAs in carcinogenesis can act as tumor suppressor genes, whether they target oncogenes or oncomiRNAs, if their target is a tumor suppressor gene. The Merlin protein encoded by the NF2 gene has tumor suppressor functions, so inactivation or deficiency of this gene promotes malignant transformation and tumor progression. It has been observed that post-translational modifications of the protein, such as phosphorylation, inhibit its function or can lead to its degradation. Experimental evidences from our laboratory show that Merlin expression is also regulated at the post-transcriptional level, by means of mir-7 and mir-146a that contribute to maintain low levels of the protein, promoting proliferation, cell migration and formation of tumor. It has also been reported that the expression of miR-146a is regulated positively by inflammatory signals such as LPS, IL1- $\beta$  or TNF $\alpha$ . We propose that the miRNAs that negatively regulate Merlin could be part of the molecular mechanisms by which the Inflammation favors the process of tumor progression. Our results show that TNF $\alpha$  promotes the overexpression of mir-146a in A549 cells, which leads to a decrease in the levels of the suppressor of merlin tumors, enhancing the migratory capacity of these cells. We also observed that the overexpression of mir-146 induced by TNF $\alpha$  increases the formation of metastasis of A549 cells in immunodeficient mice. We also found that in patients with invasive / metastatic lung adenocarcinomas there is a strong correlation between the overexpression of mir-146 and the decrease in the levels of merlin protein, which indicates that these two targets could be used as biomarkers of tumor progression.

## **Introducción**

El cáncer fue la primera o la segunda causa de muerte en personas menores de 70 años en 91 de 172 países, en el 2015. Se estima que en el 2018 se diagnosticaron 18.1 millones de nuevos casos en todos el mundo y se registraron 9.1 millones de defunciones debido al cáncer. Tanto la incidencia del cáncer como la mortalidad han aumentado en los últimos 5 años. Aunque el cáncer afecta a toda la humanidad, existe una marcada variabilidad cuando se analiza a nivel local, regional, nacional e internacional; siendo los países de mayores recursos en los que se observa una mayor incidencia y prevalencia de esta enfermedad.

En México, en el 2017 el cáncer fue la tercera causa de muerte con un total de 904 581 defunciones, y se espera que para el 2020 esta cifra aumente hasta 1 262 861 defunciones (Mohar-Betancourt et al. 2017), por lo que se convierte en un tema de particular relevancia en el país. En México la mortalidad por cáncer, constituye la tercera causa de muerte en el país, con una tasa de 61 muertes por cada 100 000 habitantes, registrada en el 2018(WHO 2018).

Dentro de los tumores de mayor incidencia a nivel mundial se encuentran: el cáncer de pulmón (2.09 millones de casos, el 11,6% del total), el cáncer de mama (2.08 millones de casos, 11,6%) y el cáncer de próstata (1.2 millones de casos, 7.1%).El cáncer de pulmón alcanza la mayor mortalidad (1,7 millones de defunciones, el 18.4% del total), seguido por el cáncer de colon y recto (0,8 millones, 9,2%) y el cáncer de estómago (0,7 millones, 8,2%)(Bray et al. 2018).

### ***Cáncer de pulmón***

El cáncer de pulmón se encuentra entre los 5 primeros de mayor incidencia y coincide con una alta mortalidad, es por ello que entender la biología del cáncer, resulta un paso fundamental para el desarrollo y diseño de estrategias terapéuticas y preventivas contra esta enfermedad.

La causa más común de cáncer de pulmón es el tabaquismo (Hackshaw et al, 1997)

ya que el 95% de los pacientes que desarrollan esta enfermedad son fumadores y ex-fumadores. Este padecimiento, así como ocurre para otros tipos de cáncer, también se ha asociado con la combinación de factores genéticos con otros factores de riesgo, como la exposición a la contaminación atmosférica, asbestos, al humo del cigarro y al estilo de vida (Hackshaw et al, 1997; Gorlova et al, 2007; Kabir Z, Bennett K 2007; O'Reilly et al, 2007).

El cáncer de pulmón clasifica en dos grupos histológicos principales: carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC, 15% de todos los cánceres de pulmón) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, 85% de todos los cánceres de pulmón). Los NSCLC generalmente se subcategorizan en adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. Más del 70% de los pacientes con NSCLC presentan enfermedad avanzada, y la tasa de supervivencia general a 5 años para el NSCLC es solo del 16%. El cáncer de pulmón representa un grupo de enfermedades heterogéneas histológicamente y molecularmente, incluso dentro del mismo subtipo histológico (Inamura 2017).

Para el cáncer de pulmón en estadio temprano o localmente avanzado, la cirugía es el tratamiento más efectivo, y la quimioterapia combinada es el enfoque adyuvante estándar. Para el tratamiento de cáncer de pulmón la clasificación histopatológica del en adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas ha sido de uso obligatorio; debido a las alteraciones genéticas distintivas y bien identificadas que hacen muy diferentes a estos dos tipos de tumores. También el uso de medicamentos para adenocarcinoma son inapropiados para pacientes diagnosticados con carcinoma, debido a los efectos secundarios que ha tenido en estos. Antes de la clasificación de la OMS de 2015, el adenocarcinoma se definía como carcinoma con una estructura acinar / tubular o producción de mucina, mientras que carcinoma de células escamosas se definía por la queratinización o puentes intercelulares que se observaba en la inmunohistoquímica (Bishop et al. 2012). En la actualidad adicionalmente, se requieren el uso de técnicas moleculares para corroborar el diagnóstico histopatológico de este tipo de tumores, por lo que la clasificación de la OMS se actualizó en función de los perfiles moleculares recientemente identificados y las alteraciones genéticas dirigidas en el cáncer de pulmón (Travis et al. 2015).

### *Adenocarcinoma de pulmón*

La clasificación de la OMS de 2015 divide los adenocarcinomas en adenocarcinoma in situ (AIS, lesión preinvasiva), adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) o adenocarcinoma invasivo (manifiesto) según el grado de invasividad. La tasa de supervivencia libre de enfermedad de AIS y MIA cuando se reseca por completo es del 100% (Noguchi 1995). Además, aproximadamente el 75% de los adenocarcinomas de pulmón examinaron alteraciones genéticas albergadas que promueven la vía de señalización RTK / RAS / RAF. De todos los casos, el 62% mostró alteraciones genéticas impulsoras que promueven la vía RTK / RAS / RAF (Collisson 2014).

La mutación EGFR es una de las mutaciones más comunes en el adenocarcinoma de pulmón, y este tipo de mutación se caracteriza en la etnia del este asiático, el género femenino y con antecedentes de no fumar (Shigematsu et al. 2005). Patológicamente, los adenocarcinomas de pulmón mutantes en EGFR muestran típicamente inmunotinción nuclear TTF-1 (NKX2-1) y un tipo de célula de uña. Los adenocarcinomas con un patrón micropapilar tienen una mayor frecuencia de mutaciones EGFR que los adenocarcinomas sin este patrón (Inamura et al. 2010; Ninomiya et al. 2009).

Los genes de fusión fueron identificados recientemente como conductores oncogénicos. En adenocarcinoma de pulmón, se han reportado genes reorganizados, incluidos ALK, ROS1, RET, NTRK1 y NRG1. El adenocarcinoma reordenado con ALK comprende del 4 al 5% de los adenocarcinomas (Takeuchi et al. 2012). En el adenocarcinoma de pulmón, se ha demostrado que las fusiones de ALK, RET y ROS1 son alteraciones genéticas dirigibles (Kohno et al. 2012; Takeuchi et al. 2012). En IMA, las nuevas fusiones de NTRK1, NRG1, ERBB4, BRAF y RET se identificaron como alteraciones genéticas dirigibles (Nakaoku et al. 2014; Shim et al. 2015). El perfil molecular integral en el adenocarcinoma de pulmón por la red de investigación TCGA ha demostrado que el 75% de los adenocarcinomas de pulmón tienen alteraciones genéticas que promueven la vía RTK / RAS / RAF; Estas alteraciones genéticas incluyeron mutaciones recientemente identificadas de NF1 y RIT1, ambas potencialmente dirigibles (Collisson 2014).

## ***Carcinogénesis***

La carcinogénesis define el proceso a partir del cual se genera el cáncer y resume todos los eventos de transformación que ocurren en una célula normal, que conllevan a que se convierta en una célula cancerosa. La transformación maligna desregula el proceso de división celular, provocando que la célula transformada prolifere más rápido que las otras del tejido, rompiendo así, con la homeostasia de mantenimiento y crecimiento del mismo, por lo que da lugar a la formación de una masa tumoral (Nowell, 1976).

La transformación maligna se inicia por daños acumulativos en el ADN de la célula y por cambios epigenéticos (Vogelstein and Kinzler 2002). Aunque puede existir cierta predisposición genética en los individuos, se ha visto que la mayoría de los eventos genéticos en cáncer, no son hereditarios (Hemminki 2002), sino que resultan de la combinación de factores de genéticos con múltiples factores ambientales como: la radiación ultravioleta (físicos), exposición a agentes intercalantes (químicos) o la infección con virus oncogénicos (biológicos)( IARC, 2006). Específicamente los genes con mutaciones que son relevantes durante el proceso de carcinogénesis son: los genes supresores de tumores y los proto-oncogenes (Futreal et al, 2004). La mayoría de los proto-oncogenes están relacionados con la transducción de señales de regulación positiva de la proliferación celular, por tanto una mutación activadora en uno de los alelos es suficiente para inducir la transformación. En cambio los genes supresores de tumores codifican proteínas que funcionan como reguladores negativos de la división celular y la apoptosis. Luego cuando hay pérdida de función de alguna de estas moléculas se promueve la transformación maligna. Las mutaciones en el ADN resultan en cambios en la expresión génica y conlleva a una reprogramación de la célula transformada, mediante la cual adquiere nuevas capacidades que le permiten dar origen a un tumor.

Las células transformadas se caracterizan por presentar sobreactivadas vías de señalización de factores de crecimiento, o de los receptores para estos, que promueven la proliferación celular descontrolada, la capacidad de evadir señales supresoras del crecimiento y resistencia a la inducción de muerte por apoptosis. Las

células transformadas tienen desregulados procesos celulares esenciales como el metabolismo de glucosa y otros nutrientes, con lo cual mantienen una proliferación exacerbada. También presentan inestabilidad genómica, la cual además promueve la aparición de más mutaciones y la ganancia de inmortalidad replicativa. Además adquieren la capacidad de inducir angiogénesis, de evadir la respuesta antitumoral del sistema inmune, así como, de invasión de tejidos y el establecimiento de metástasis, lo cual contribuye con la formación y la progresión de los tumores. Se ha visto que la inflamación generada por el infiltrado de células del sistema inmune en los tumores, así como la promovida por el tumor, favorece la inestabilidad y la evolución genética de las células tumorales a estados malignos e invasivos (Hanahan and Weinberg 2011).

Así mismo, la carcinogénesis pulmonar es un proceso de varios pasos, que resulta de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores. Los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de NSCLC todavía no se conocen bien. Por lo tanto, una mejor comprensión de estos mecanismos será útil para desarrollar nuevos blancos terapéuticos y estrategias para el tratamiento del NSCLC (Custodio et al. 2012).

### ***Metástasis***

La metástasis es una fase progresiva del cáncer donde las células que forman parte de un tumor primario adquieren la capacidad de migrar e invadir otros tejidos. La metástasis constituye el 90% de las causas de muerte asociadas con el cáncer (Chaffer and Weinberg 2011), a pesar de su relevancia clínica, todavía sabemos muy poco acerca de los mecanismos genéticos y moleculares que confieren capacidad metastásica a las células tumorales. La metástasis implica una serie de pasos secuenciales, como la invasión de tejido adyacente, la migración a través del sistema circulatorio, la detención en un sitio lejano, la extravasación y la colonización de un nuevo tejido (Chaffer and Weinberg 2011; Guan 2015; Turajlic and Swanton 2016). Aunque la respuesta inflamatoria regulada puede tener actividad antitumoral y ser importante en la supresión del crecimiento tumoral (Butterfield 2015; Ghirelli and Hagemann 2013), la inflamación crónica es un factor determinante en la progresión neoplásica, incluidas las metástasis (Landskron et al. 2014; Mantovani et al. 2008; Quail and Joyce 2013).

## ***Inflamación asociada al cáncer y la metástasis***

En biopsias de tumores se han observado infiltrados de células del sistema inmune innato y adaptativo, lo que genera un ambiente proinflamatorio (Page` s et al, 2010). Sin embargo, se ha visto que la inflamación asociada al cáncer no tiene actividad antitumoral, debido a que el tumor evade la destrucción mediada por las células infiltradas, y que por el contrario los mediadores pro-inflamatorios que estas liberan en el microambiente tumoral, promueven la tumorigénesis y la progresión tumoral (Colotta et al, 2009; DeNardo et al, 2010; Grivennikov et al, 2010). La inflamación en el entorno del tumor mantiene y potencia las características del cáncer, contribuyendo a la transformación maligna.

En el estudio de la inflamación que promueve el cáncer, se ha visto que el microambiente inflamatorio puede ser generado por dos vías: por la actividad de células del sistema inmune en el microambiente tumoral (vía extrínseca) y también por el hecho de que las alteraciones genéticas en la célula tumoral, conduzcan a la activación de vías proinflamatorias (vía intrínseca). La activación de vías proinflamatorias conllevan a la expresión y producción de citocinas proinflamatorias que a través de mecanismos autócrinos y parácrinos promueven el desarrollo de la neoplasia (Mantovani et al. 2008).

La inflamación crónica favorecida por una vía extrínseca al tumor, se origina por una respuesta inflamatoria sostenida por las células del sistema inmune, las que liberan especies reactivas de oxígeno que son mutagénicas, lo cual favorece la inestabilidad genética de los tumores (Colotta et al, 2009). Los radicales libres pueden causar aumento de la expresión de metiltransferasas de ADN, conduciendo a una hipermetilación global del genoma. Esta hipermetilación provoca el silenciamiento de genes con funciones de reparación del ADN, como hMLH1, así como genes supresores de tumores: APC, CDKN2, BRCA1, Rb y MDM2, lo cual contribuye a la carcinogénesis (Das and Singal 2004; Fleisher et al, 2000). También se ha visto que durante la respuesta inflamatoria contra la colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica se promueve la metilación genes supresores de tumores y esta hipermetilación se asocia con mayor riesgo del desarrollo de cáncer gástrico (Dong et

al, 2009; Kaise et al, 2008).

Durante la inflamación crónica también se liberan factores de crecimiento que incrementan las señales de proliferación sostenida que están activadas, así como factores de supervivencia que evitan la activación de señales de muerte en las células tumorales. También se secretan factores pro-angiogénicos y enzimas que modifican la matriz extracelular, promoviéndose así la formación de nuevos vasos sanguíneos, la invasión a otros tejidos y la formación de metástasis (Grivennikov et al, 2010; Qian and Pollard 2010).

La inflamación crónica asociada al cáncer originada por la vía intrínseca, ocurre cuando en las células transformadas se activan oncogenes y se inactivan genes supresores de tumores. Esto conduce a la activación de un programa transcripcional similar al que ocurre durante la inflamación. Por ejemplo, la expresión de la proteína tirosina cinasa RET en el carcinoma papilar de tiroides, se ha observado es un evento temprano, necesario y suficiente para el desarrollo de cáncer. La activación de RET está asociada con la expresión de factores de supervivencia para leucocitos, citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, enzimas que degradan la matriz extracelular y moléculas de adhesión para linfocitos (Borrello et al, 2005). La expresión de estas moléculas por las células tumorales le confieren al tumor la capacidad de generar un ambiente proinflamatorio que recluta células del sistema inmune que van a promover más inflamación y con ello la progresión tumoral. También se ha visto que la activación de oncogenes como RAS y MYC induce la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias que promueven la progresión tumoral (Sparmann and Bar-Sagi 2004; Shchors et al, 2006; Guerra et al, 2007; Soucek et al, 2007). Por otra parte, proteínas supresoras de tumores como von Hippel-Lindau (VHL), el TGF- $\beta$  y PTEN también puede inhibir la producción de mediadores de la inflamación, se encuentran disminuidas (Staller et al, 2003; Phillips et al, 2005; Kobiela and Fuchs 2006).

La producción sostenida de citocinas inflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , ya sea por las células inmunes o por las células tumorales, favorece la malignidad y la capacidad metastásica (Apte et al. 2006; Ham, Fernandez, D'Costa, et al. 2016; Kumari et al. 2016). Particularmente, el TNF $\alpha$  promueve la proliferación, la migración,

la invasión, la transición epitelio-mesenquimal y la angiogénesis de diferentes células cancerosas (Bigatto et al. 2015; Hong et al. 2016; Jing et al. 2011; X.-H. Wang et al. 2015; Y. Wu and Zhou 2010; Yu et al. 2014). La señalización sostenida de  $TNF\alpha$  conduce a la pérdida de las funciones de los genes supresores tumorales tales como p53, PTEN y  $TGF\beta$  en células tumorales o inmunitarias (Balkwill 2006; Pallai et al. 2016; L. Yang and Karin 2014) promoviendo la liberación de factores de crecimiento, quimiocinas y citoquinas proinflamatorias, aumento del microambiente tumoral proinflamatorio (Sheng, Li, and Qin 2018). Por lo tanto,  $TNF\alpha$  desempeña un papel importante en la progresión tumoral y la metástasis (Drane et al. 2002; Ham, Fernandez, D'Costa, et al. 2016; S. Kim et al. 2004).

### ***Genes supresores de tumores***

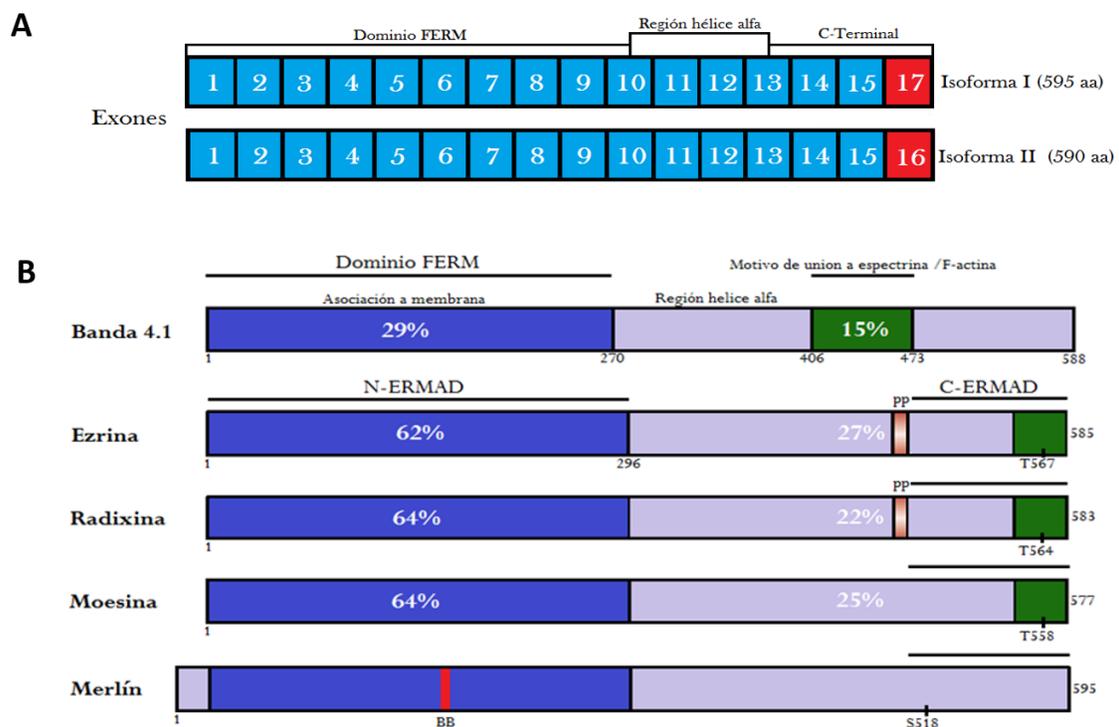
Los genes supresores de tumores, son genes cuya inactivación o alteración de su expresión génica promueve el crecimiento de células malignas (Martincorena and Campbell 2015). Estos genes también conocidos como guardianes del genoma, regulan los procesos involucrados en la reparación del ADN, inhiben el proceso de división celular, promueven la apoptosis e inhiben la metástasis. Por lo que la pérdida de la función de los genes supresores de tumores en la célula conlleva al desarrollo y a la progresión del cáncer (W. Sun and Yang 2010). La inactivación o pérdida de función de los genes supresores de tumores está dada por mutaciones sin sentido en la secuencia génica, deleciones o inserciones de nucleótidos o al silenciamiento epigenético. Se ha visto que para favorecer el desarrollo tumoral deben existir mutaciones en ambas copias del gen supresor de tumores (Vogelstein y Kinzler, 2004; Sun y Yang, 2010).

Los principales genes supresores de tumores y sus productos proteicos han sido clasificados ampliamente en 5 grupos: i) genes que codifican proteínas intracelulares que regulan la progresión del ciclo celular, como por ejemplo: la proteína Rb, p53, APC( adenomatous polyposis coli protein), p15, p16, p18, p19, p21, p27y Nf2 (McClatchey and Giovannini 2005; W. Sun and Yang 2010) ii) genes que codifican para receptores o transductores de señales para hormonas o desarrollan señales que inhiben la proliferación celular:  $TGF-\beta$ , APC y Nf2 (McClatchey and Giovannini 2005;

Smith, Robin, and Ford 2012); iii) genes que codifican proteínas que controlan el arresto del ciclo celular en respuesta a daño del ADN: BRCA, p16 y p14 (Savage and Harkin 2015); iv) genes que codifican proteínas que inducen apoptosis: p53, Fas, Bin1, PTEN y BCL-2(Nayak, Panesar, and Kumar 2009; W. Sun and Yang 2010); v) genes que codifican proteínas que reparan errores en la secuencia del ADN: p53, MSH2, MLH1, ATM y BRCA (Rahman and Scott 2007; W. Sun and Yang 2010). Los genes supresores de tumores juegan un rol muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, controlando diferentes procesos, por lo que la inactivación funcional de estos genes y sus productos por contribuye a la tumorigénesis.

### **Merlín: producto del gen de la Neurofibromatosis tipo 2(NF2)**

El gen de la neurofibromatosis tipo 2 (NF2), está ubicado en el cromosoma 22q12.2 con una extensión de 95kb. El transcrito primario de este gen es procesado por la maquinaria de splicing generando 10 isoformas proteicas, de las cuales la 1 y la 2 son las más representativas por lo que han sido más estudiadas.



**Figura 1: Estructura de Merlín y los miembros de la familia ERM. A.** El gen Nf2 se conforma por 17 exones. Las dos isoformas que más se expresan se conforman por los exones 1-15 y 17 (isoforma I, 595 aa) y los exones 1- 15 y 16 (isoforma II, 590 aa). **B.** Merlín junto con los miembros de la familia ERM comparte una estructura similar. Debido a que todos ellos forman parte de la superfamilia de proteínas de la banda 4.1, todos presentan una estructura conformada por un dominio N-terminal, un dominio de asociación a membrana tri-globular denominado FERM, una región  $\alpha$ -hélice y un dominio COOH-terminal con un motivo de unión a espectrina / F-actina (verde). Merlín se encuentra dentro de esta familia debido a la gran homología que presenta su dominio FERM con el de los demás miembros de la familia ERM. La estructura de Merlín presenta un dominio

Como se observa en la figura 1A ambas isoformas son codificadas por 16 exones, pero la isoforma 1 es codificada por los exones 1-15 y el 17, dando lugar a una proteína de 595 aminoácidos, relacionada con las funciones de gen supresor de tumores (Hovens and Kaye 2001). Mientras que la isoforma 2 se origina de los exones 1-16, que codifican para una proteína de 590 aminoácidos que regula el desarrollo y el mantenimiento axonal, por lo que su deficiencia está relacionada con el desarrollo de polineuropatías (Schulz et al, 2013).

La proteína codificada por el gen NF2 fue nombrada Merlín o Schwannomina (del inglés, moesin-exrin-radixin like protein) y pertenece a la familia de las proteínas 4.1, que se caracterizan por unir elementos del citoesqueleto (Rouleau et al, 1993; Trofatter et al, 1993; Bretscher et al, 2000). La proteína Merlín presenta un dominio trilobulado FERM (siglas del inglés For 4.1 protein-Ezrin-Radixin-Moesin) (residuos 1-302), conservado en el extremo N-terminal de la familia de proteínas 4.1, una región  $\alpha$ - helicoidal central (residuos 303-478) y un dominio C-terminal único (residuos 479-595) (Fig.1B) (Shimizu et al, 2002).

#### *NF2/Merlín: gen supresor de tumores*

El gen NF2 codifica para el supresor de tumores Merlín, que a través de la regulación de la vía del hipo inhibe la transición epitelio-mesénquima y la proliferación celular mediante el mecanismo conocido como inhibición por contacto de la proliferación (Morrison et al. 2001; Xie et al. 2015). Merlín detiene el ciclo celular en la fase G1 (Ikeda et al. 1999) y promueve la muerte celular (H. Kim et al. 2004). Por lo tanto, las mutaciones o la pérdida de los alelos en el gen NF2 se han asociado al desarrollo de la neurofibromatosis tipo 2, que se caracteriza por el desarrollo de tumores del sistema nervioso central como: schwannomas, meningiomas, ependimomas y gliomas (Plotkin et al. 2011; Stemmer-Rachamimov et al. 1997; Ueki et al. 1999). Sin embargo, la disminución de los niveles de Merlín también se ha asociado con el desarrollo de mesoteliomas, osteosarcomas, hepatocarcinoma, cáncer de páncreas, colon y cáncer de mama (Couderc et al. 2016; Z.-L. Luo et al. 2015; Morrison et al. 2001; Quan et al.

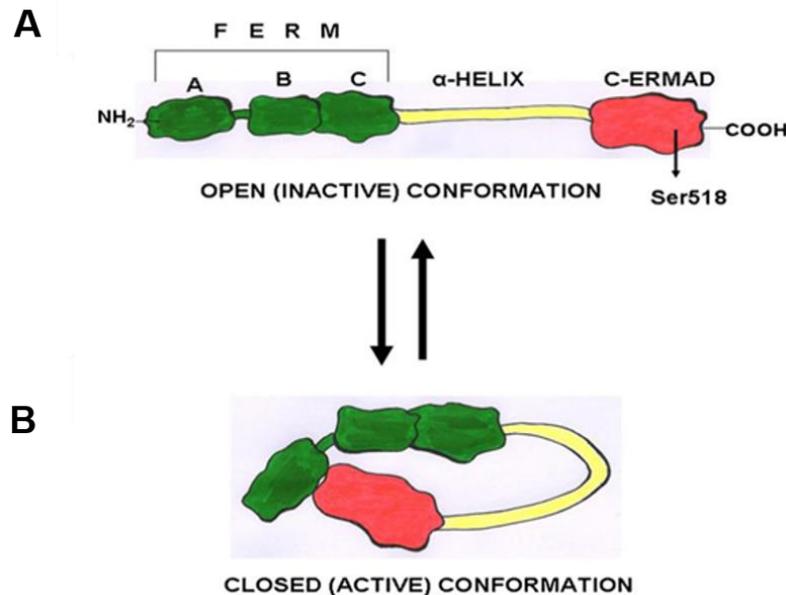
2015; Y Sekido et al. 1995). Curiosamente, la ausencia de Merlín también resulta en la inducción de un ambiente inflamatorio (Shi et al. 2016).

Merlín actúa como supresor tumoral inhibiendo el crecimiento celular dependiente de contacto, ya que se observó que el aumento de Merlín en las células transformadas deficientes para esta proteína, inhibe la señalización de Ras y Rac recuperando la inhibición del crecimiento por contacto (Morrison et al, 2007). Otras evidencias experimentales demuestran que el aumento de Merlín en células deficientes de esta proteína, inhibe la proliferación celular mediante el arresto del ciclo celular en fase G1. La presencia de Merlín disminuye la expresión de ciclina D, inhibe la actividad de CDK4 y promueve la desfosforilación de pRB (Xiao et al, 2005). El aumento de Merlín también puede promover la apoptosis, ya que incrementa la estabilidad y función del supresor de tumores p53 induciendo la degradación de su regulador negativo Mdm2. (Kim et al, 2004). Por otro lado la inactivación o la deficiencia de Merlín también se ha visto asociada con la transformación maligna y la progresión tumoral (Jin et al, 2006; Morrow et al, 2011; Sekido et al, 2011).

#### *Inactivación de Merlín en el cáncer*

También se ha observado que de manera normal, Merlín sufre modificaciones postraduccionales que inhiben su función. Por ejemplo, la fosforilación de la serina 518, mediada por las cinasas PAK y PKA, inhiben la interacción intramolecular de Merlín y su función como supresor de tumores (Alfthan et al, 2004; Thaxton et al,2008). En cambio la fosforilación de las serina 10 y 315 por la cinasa AKT, así como en la treonina 230 conduce a la degradación de Merlín (Morrow et al,2011; Laulajainen et al, 2008; Tang, et al, 2007). Mientras que la proteína fosfatasa MYPT-1-PPT1δ lo activa por desfosforilación, permitiendo que Merlín adopte su forma cerrada activa (Jin et al,2006; Sher et al, 2012). Estos eventos que promueven el paso de una conformación cerrada y activa a una conformación abierta e inactiva, ocurren de manera normal cuando en algún tejido específico se requiere promover la proliferación celular para restablecer el número celular. Por el contrario la desfosforilación promoverá que adquiera su estado cerrado y activo lo que resulta en el arresto de la progresión del ciclo celular (Fig.2). Para sus funciones como supresor de tumores,

Merlín requiere la unión del dominio N-terminal al C-terminal involucra a los residuos 302-308 y esta interacción intramolecular requiere que el dominio N-terminal tenga un plegamiento adecuado (Gutmann et al, 1999; Sherman et al, Gutmann 1997).



**Figura 2: Esquema de la estructura de Merlín y las dos conformaciones que puede adoptar (abierta o cerrada).** El dominio FERM consiste de tres subunidades (A, B y C), seguido de una región alfa-hélice y un dominio COOH- terminal que contiene una Serina518 (flecha A). La conformación abierta o inactiva de Merlín se da cuando no hay interacción entre el dominio COOH y el dominio N de Merlín. Esta conformación se da cuando la Serina518 se encuentra fosforilada. B. Cuando la Serina518 es desfosforilada se da una interacción "Head to tail" entre el dominio COOH con la región que se encuentra entre las subunidades A y B dando como resultado la conformación cerrada o activa de Merlín (Pećina-Šlaus 2013a)

Las mutaciones del gen NF2 y las modificaciones postraduccionales de la proteína como la fosforilación y la degradación de Merlín previenen las funciones de este supresor tumoral, lo cual favorece la carcinogénesis. Pero la expresión de Merlín también puede estar siendo regulada a nivel pos-transcripcional, mediante miRNAs que contribuyan a mantener bajos los niveles de la proteína, promoviendo también la tumorigénesis. En nuestro laboratorio se predijeron, mediante un análisis bioinformático, 10 miRNAs que por su complementariedad con la región 3' no traducida de Merlín (3'UTR), podrían regular la expresión de este supresor de tumores (Tabla 1), de los cuales ya se demostró que el mir-7, el mir-146a, mir-32 y mir-25 regulan negativamente los niveles proteicos de Merlín (Perez-Garcia et al. 2015)

**Tabla 1. MiRNAs que resultaron significativos para la formación de un dúplex con la 3'UTR de Merlín**

miRNA	Número de sitios (posición dentro de la región 3'UTR- NF2)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	% Puntaje de Contexto
miR-330	2 (3494–3501)	-11.92	95
	(528–534)	-2.18	21
miR-326	2 (3494–3501)	-9.86	95
	(528–534)	-7.95	26
miR-7	3 (247–253)	-9.10	93
	(778–784)	-9.63	38
	(1919–1925)	-3.47	5
miR-146a	1 (210–216)	-8.12	88
miR-32	2 (159–165)	-7.05	81
	(2816–2822)	0.12	7
miR-25	2 (159–165)	-6.76	79
	(2816–2822)	-8.47	7
miR-193b	1 (79–85)	-6.03	75
miR-367	2 (159–165)	-4.53	77
	(2816–2822)	-14.87	9
miR-92a/b	2 (159–165)	-4.43	81
	(2816–2822)	-12.57	8
miR-363	2 (159–165)	-2.34	78
	(2816–2822)	-3.97	11

El valor de  $\Delta\Delta G$  resulta del cálculo de la diferencia entre las energías libres de Gibbs de la formación dúplex ( $\Delta G_{\text{Duplex}}$ ) y la de la apertura del ARNm para liberar el sitio para la unión del miRNA ( $\Delta G_{\text{Open}}$ ). Se ha informado que un  $\Delta\Delta G$  inferior a -10 kcal / mol es un parámetro muy preciso para predecir las interacciones de miRNA: ARNm. Sin embargo, un  $\Delta\Delta G$  de -7 kcal / mol todavía se precisa para varios casos. El percentil de puntaje de contexto se refiere al porcentaje de sitios para cada miRNA con un puntaje de contexto menos favorable. La posición de los sitios de unión (nt) se indica con relación al comienzo del NF2 3'UTR humano.

De acuerdo con esto, en nuestro laboratorio observamos que el aumento independiente de miR-146a y de miR-7 en células A549 promueve la proliferación, la migración celular (Meza-Sosa, Pérez-García, et al. 2014; Pérez-García et al. 2015). Además, la sobreexpresión de mir-146a promueve la progresión tumoral y metástasis a través de regular negativamente los niveles proteicos de Merlín; ya que la expresión de una versión de Merlín resistente a la regulación por estos miRNAs, rescata la función supresora de tumor de la proteína y previene los efectos oncogénicos del mir-146a (Pérez-García et al. 2015).

Por lo anterior, podemos resumir que la pérdida de las funciones supresoras de Merlín en un contexto tumoral puede estar regulado a diferentes niveles: i) a nivel genético por mutaciones en el gen NF2 (Merel et al. 1995; Pecina-Šlaus 2013b); ii) a nivel epigenético, mediante la metilación del promotor del gen NF2 (B. Wang et al. 2016) y iii) a nivel postraduccional, donde la fosforilación de S518 inhibe su función como supresor tumoral (Alfthan et al. 2004) y la fosforilación de S315 conduce a su degradación (X. Tang et al. 2007). Además, nuestro grupo demostró que la activación

sostenida de colon, cuello uterino y pulmón, lo que resulta en una mayor transformación celular (Camacho-Concha et al. 2013) y recientemente descrito a iv) a nivel postranscripcional, donde encontramos que Merlín es regulado negativamente por diferentes miRNAs: miR-146a, miR-7, miR-25, miR-32 y miR-92a lo cual favorece la proliferación, migración y la invasión de células de cáncer pulmonar y colorectal (Alcantara and Garcia 2019; Pérez-García et al. 2015).

### ***MicroRNAs***

Los microRNAs (miRNAs) son una clase abundante de pequeños ARNs, no codificantes, de 19-24nt de largo (Ambros 2001). Estos tienen la función de regular la expresión génica, induciendo la degradación de ARNm específicos o inhibiendo su traducción, uniéndose por complementariedad a la 3´UTR de los ARNm blanco (Sun et al, 2005). Así, los miRNAs regulan negativamente los niveles proteicos de sus blancos y controlan múltiples procesos biológicos de gran importancia como, la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación y la homeostasis en el organismo adulto. De acuerdo con esto, la desregulación de la expresión de miRNAs se ha asociado a distintas patologías como en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias, desórdenes autoinmunes, incluido el cáncer (Ardekani and Naeini 2010; Meza-sosa et al, 2013).

### ***MiRNAs y cáncer***

Se ha demostrado que más del 50% de los genes de miRNAs están localizados en regiones genómicas o en sitios asociados con el cáncer (Calin et al,2004) lo cual sugiere que los miRNAs tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Los patrones de expresión específica de miRNAs se han asociado con desarrollo de determinados tipos de tumores, por lo que pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico, pronóstico de progresión tumoral y respuesta a la terapia antitumoral, así como también han sido propuestos como blancos terapéuticos (Guz et al, 2014; Lu et al, 2012; Mirnezami et al, 2009; Vannini, Fanini, and Fabbri 2013; Yanaihara et al, 2006). Los miRNAs en la carcinogénesis pueden tener como blanco ARNs mensajeros que codifican para oncogenes y tener actividad de genes supresores. También

pueden inducir la inhibición de la expresión de proteínas supresoras de tumores, actuando como oncomiRNAs, lo cual depende del contexto celular en que se expresen (revisado por Zhang et al, 2007). La tabla 2 resume los principales miRNAs que se han reportado en el desarrollo de cáncer, sus genes blanco y los posibles mecanismos en los que están involucrados (revisado por (Weige Tan et al. 2018)).

**Tabla 2. MicroRNAs, sus blancos y posibles mecanismos en el cáncer**

Cáncer	miRNA	Desregulación	mRNA-Blanco	Ref.
Cáncer de mama	Let-7, mir-98*	Disminuído	E2F2*, c-Myc*, KRAS	(Deng et al. 2014; Sun et al. 2012)
	mir-27a, mir-96	Aumentado	FOXO1	(Guttilla et al. 2009)
	mir-19-3p	Disminuído	p53	(X. Li et al. 2014)
Cáncer de pulmón	mir-7	Aumentado	KLF4, EGFR	(Meza-Sosa et al. 2014; Webster et al. 2009)
	mir-25	Aumentado	Ciclina E2	(Z. Zhao et al. 2014)
	mir-330	Aumentado	PRKCA	(Arora et al. 2011)
Gástrico	mir-25	Aumentado	p57	(H. Zhao et al. 2014)
	mir-106b	Aumentado	p21, p73	(Choi and Lim 2011; Ivanovska et al. 2008)
	mir-512	Disminuído	Mcl-1	(Sarkar et al. 2013)
Glioma	mir-221	Disminuído	PTEN/AKT	(X. Li et al. 2014)
	mir-324-5	Disminuído	GLI-1	(Xu et al. 2014)
Hepato-carcinoma celular	mir-195	Disminuído	LAST2	(X. Yang et al. 2012)
	mir-18a	Aumentado	ER $\alpha$ , ESR-1	(L. Li et al. 2012)
	mir-145	Disminuído	IGF-1R	(Law et al. 2012)

\*Blanco que regula ese miRNA

El mir-7 puede tener funciones supresoras de tumores en schwannomas, glioblastomas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon y en cáncer de mama, así como inhibir la formación de metástasis cerebral (Kefas et al, 2008; Kong et al, 2012; Masuda et al, 2012; Okuda et al, 2013; Saydam et al, 2011; Xiong et al, 2011). Aunque también se ha visto que en cáncer de pulmón, el EGFR activa la expresión del mir-7, el cual inhibe la expresión del represor transcripcional del EGFR favoreciendo así la progresión tumoral (Chou et al, 2010). En el laboratorio, también

hemos observado la actividad oncogénica de mir-7, regulando la expresión de genes supresores de tumores como KLF4 y Merlín en células A549, promoviendo la proliferación, la migración celular y la progresión tumoral (Meza-Sosa, et al. 2014; Pérez-García et al. 2015).

El mir-32 está relacionado con la tumorigénesis del carcinoma colorectal y es expresado en leucemia mieloide aguda, donde muestra un efecto anti-apoptótico (Gocek et al, 2011; Wu et al, 2013). También se ha observado que el mir-25 se encuentra sobreexpresado en cáncer de próstata, de colon, de ovario y en adenocarcinoma de pulmón favoreciendo la transformación (Dacic et al, 2010; Marchi et al, 2013; Zhang et al, 2012). El mir-330 también tiene un papel oncogénico en células de glioblastoma, por lo que se encuentra expresado significativamente en este tipo de tumores y se ha asociado con el desarrollo de cáncer de pulmón de células no pequeñas y de cáncer de próstata (Arora et al, 2011; Medina-Villaamil et al, 2014; Qu et al, 2012; Visani et al, 2014; Yao et al, 2014).

#### *MiRNAs en adenocarcinoma de pulmón*

Los miRNAs desempeñan importantes funciones reguladoras en la carcinogénesis pulmonar (Bartel 2004; Inamura and Ishikawa 2016; Jahagirdar et al. 2016). Mediante el análisis del perfil de expresión de miRNAs en adenocarcinomas subclasificados por la OMS de 2015, se demostró que los diferentes subtipos histológicos de adenocarcinoma de pulmón tienen distintos perfiles de expresión de miRNAs. De esta forma los adenocarcinomas se dividieron en tres grupos principales, que se correlacionaron con los subtipos histológicos de la clasificación de la OMS de 2015. El grupo 1) adenocarcinomas lepidicos o IMA: incluye casi todos los tumores menos adenocarcinomas acinares y sólidos; grupo 2) adenocarcinomas acinares y grupo 3) adenocarcinomas sólidos: se caracterizó por la sobreexpresión de miR-27a, miR-212 y miR-132 (Nadal et al. 2014).

El adenocarcinoma entérico es una de las nuevas variantes del adenocarcinoma de pulmón en la clasificación de la OMS de 2015. Se define como un adenocarcinoma con un componente predominante que muestra diferenciación entérica (Inamura et al.

2005). Interesantemente, el perfil de los adenocarcinomas entéricos muestra similitudes con los NSCLC y los adenocarcinomas pancreáticos, pero no con los adenocarcinomas colorrectales. Los adenocarcinomas entéricos comparten miRNAs oncogénicos (miR-31, miR-126, miR-506, miR-508-3p y miR-514) con los adenocarcinomas pancreáticos (Garajova et al. 2015).

Numerosos estudios se han realizado utilizando líneas celulares que provienen de tumores NSCLC para tratar de entender el papel de los miRNAs en este entorno celular y dilucidar sus moléculas blanco (Inamura and Ishikawa 2016; Shang et al., 2017; Shiozaki et al. 2012). Particularmente, las células A549 son un adenocarcinoma de pulmón de origen epitelial depositadas en la ATTC (Giard et al. 1973). Las células A549 celular por su alto potencial de transfección, su alta tasa de proliferación en cultivo, son un modelo muy utilizado para los estudios *in vitro* de adenocarcinoma de pulmón (Bihl et al., 1998; Weige et al. 2018). Las células A549 responde a citocinas proinflamatorias por lo que han sido utilizadas para estudiar en procesos proinflamatorios (Cheng et al. 2010; Kawata et al. 2012; J. N. Lu et al. 2017). Además en las células A549 se ha caracterizado el perfil de expresión de miRNAs después del tratamiento con resveratrol (Bae et al. 2011), con flavonoides y otros estímulos (Silva et al. 2016; Weige Tan et al. 2018) en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. También para las A549, se ha caracterizado su respuesta de citocinas y quimiocinas a infecciones por patógenos (Lin et al., 1998; Yang et al. 2003). Los estudios relacionados con miRNAs involucrados la carcinogénesis de las células A549, como modelo de adenocarcinoma *in vitro* han encontrado que miR146, mir-21 y miR-25 actúan como oncomiRs en este contexto celular (Kunita et al. 2018; Perez-Garcia et al. 2015; Wenfeng Tan et al. 2018). Mientras otros miRNAs, como por ejemplo miR-7 y miR -149-3p se ha descrito que actúan como supresores de tumores en estas células (Silva et al. 2016; Xiong et al. 2011). Luego, las células A549 resultan un buen escenario para estudiar el impacto del ambiente inflamatorio en la inducción de miRNAs que tengan como blanco genes supresores de tumores, como por ejemplo Merlín.

### *MiRNAs que regulan a Merlín en la inflamación asociada al cáncer*

La expresión de miRNAs también se ha visto alterada en condiciones inflamatorias asociadas al cáncer. Existen miRNAs específicos que pueden ser regulados por estímulos pro-inflamatorios y otros que actúan como mediadores de la inflamación, contribuyendo con la carcinogénesis. Por ejemplo, se ha visto que la IL-6 a través de la activación STAT3 promueve la expresión de mir-21, el cual tiene como blanco genes supresores de tumores como, la proteína de muerte celular programada 4 (PDCD4), PTEN y tropomiosina (TPM1), por lo que promueve la oncogénesis en cáncer de colon, en mieloma múltiple, en hepatocarcinoma y en mama (Frankel et al, 2008; Loffler et al, 2007; Meng et al, 2007; Schetter et al, 2009; Zhu et al, 2007). El mir-155 inducido por TNF $\alpha$  y IFN $\beta$ , tienen como blanco una proteína pro-apoptótica inducida por p53, por lo que se ha visto incrementado en pacientes con leucemia de médula ósea y en modelos murinos de leucemia y linfoma B (Costinean et al, 2006; Gironella et al, 2007; O'Connell et al, 2007; Tili et al, 2007).

**Tabla 3. MicroRNAs y la inflamación asociada al cáncer**

miRNAs	mRNA Blanco	Cáncer	Inflamación
mir-146a	TRAF6 SMAD4 NF2	•Favorece la proliferación, la migración celular y la formación de metástasis en A549 •Cáncer de tiroides papilar, páncreas, cervical, glioblastoma	•Promotor presenta sitios de unión para NF $\kappa$ B •Inducido por LPS, IL1- $\beta$ o TNF $\alpha$
mir-7a	KLF4 NF2	•Favorece la proliferación, la migración celular y la formación de tumores en A549 •Linfoma de células B, cáncer de pulmón, de mama, urotelial	•Promotor presenta sitios de unión para NF $\kappa$ B
mir-32	PTEN BIM TRAF3	•Carcinoma colorectal, leucemia mieloide aguda, inhibiendo la apoptosis en estas células	•Inducido por la proteína Tat C de HIV-1, la cual se ha visto que induce la expresión de IL-6 y TNF $\alpha$ por la célula infectada
mir-25	PTEN BIM TRAIL-DR4 TOB1	•Tumores gástricos, de próstata, páncreas, ovario, esófago, neuroblastoma y adenocarcinoma de pulmón.	Se expresan en niveles altos en tumores a los que se ha asociado un estado inflamatorio sistémico
mir-330	SH3GL2	Glioblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y de cáncer de próstata	Se expresan en niveles altos en tumores a los que se ha asociado un estado inflamatorio sistémico

Merlín podría ser regulado negativamente por diferentes miRNAs, según se muestran Tabla 1. A partir de estos datos bioinformáticos en nuestro grupo se demostró experimentalmente que la traducción del ARNm de Merlín es inhibida por miR-146, miR-7, miR-32 y miR-25 (Perez-Garcia et al. 2015). Recientemente otro grupo corroboró experimentalmente que miR-92a inhibe directamente a Merlín en células de cáncer colorectal y de pulmón, favoreciendo la proliferación, la migración y la sobrevivencia celular (Alcantara and Garcia 2019). Interesantemente estos miRNAs: miR-146a, miR-7, miR-32, miR-25, y miR-330, además de tener como blanco a Merlín, se han asociado al desarrollo de cáncer y a procesos inflamatorios (Tabla 3).

En el caso de miR-146a se ha observado que aunque su expresión es regulada positivamente por señales inflamatorias como LPS, IL1- $\beta$  o TNF $\alpha$ , este miRNA actúa como supresor de tumores (Chen et al, 2013; Taganov et al 2006; Wu et al, 2014). Sin embargo, resultados obtenidos en el laboratorio indican que el aumento de miR-146a, inhibe la expresión de Merlín en células A549, favoreciendo así la proliferación, la migración celular y la formación de metástasis (Pérez-García et al. 2015).

Se ha reportado que la expresión del miR-32 es inducida por la proteína Tat C del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), la cual induce la expresión de IL-6 y TNF $\alpha$  en la célula infectada. También se ha visto que la expresión de miR-32 disminuye los niveles de TRAF3 promoviendo la activación de NF $\kappa$ B por la vía no canónica y con ello la inflamación (Mishra et al, 2012; Romani et al, 2010). No se ha reportado que se induzcan en condiciones proinflamatorias, ni el miR-330 ni el miR-25, pero se expresan en niveles altos en tumores a los que se ha asociado un estado inflamatorio sistémico (Enewold et al, 2009; Erez et al, 2013; Kantola et al, 2012; Keerthivasan et al, 2014; Tazaki et al, 2011; Ten Kate et al, 2004). Estos datos sugieren que existe un conjunto de miRNAs con actividad oncogénica que podrían regular negativamente los niveles proteicos de Merlín, cuya expresión se puede asociar a un ambiente inflamatorio. Por lo que proponemos que a través de regular negativamente a Merlín, estos miRNAs podrían ser parte de los mecanismos moleculares mediante los cuales la inflamación favorece el proceso de transformación celular.

### ***Justificación y planteamiento del problema***

La inactivación del supresor de tumores Merlín se ha asociado con diversos tipos de cáncer, que promueve la progresión tumoral. La expresión de Merlín está regulada negativamente por miR-146, miR-7, miR-32 y miR-25, los cuales se sobreexpresan en diferentes tipos de tumores. Además, tanto el incremento de  $TNF\alpha$  y el de miR-146a promueven la migración celular y la invasión en las células de cáncer de pulmón; nos preguntamos si la disminución de los niveles de proteína de Merlín se relaciona inversamente con la activación de la ruta de señalización de  $TNF\alpha$  /  $NF\kappa B$  / miRNAs en tejidos de cáncer de pulmón humano. Ya que poder identificar moléculas como biomarcadores de estadios de progresión tumoral, permitiría dar un diagnóstico más preciso a los pacientes que se les hizo biopsia tumoral. Dado que las terapias antitumorales convencionales no tienen éxito en estadios avanzados del cáncer, conocer los mecanismos moleculares que promueven la progresión tumoral permite dirigir la inmunoterapia antitumoral hacia blancos específicos para que sean más eficientes.

## **Hipótesis:**

La inflamación potencia la progresión tumoral mediante la expresión de miRNAs que tienen como blanco a la proteína Merlín.

## **Objetivo general**

Evaluar el papel de la inflamación en la expresión de miRNAs cuyo blanco es Merlín y si este proceso favorece la progresión tumoral en un modelo de cáncer de pulmón.

## ***Objetivos específicos***

1. Evaluar si Merlín es blanco de los miRNAs 32, y 25.
2. Estudiar si un ambiente inflamatorio regula la expresión de los miRNAs mir-32, y mir-25 y mir-330.
3. Evaluar si el efecto potenciador del ambiente inflamatorio sobre la progresión tumoral involucra la actividad los miRNAs 146, 32, 25 y 330.
4. Evaluar si existe una relación directa entre un proceso inflamatorio y la expresión de los miRNAs y una relación inversa con los niveles de Merlín en adenocarcinomas humanos de pulmón.

## **Materiales y Métodos**

### **Pacientes**

Las muestras tumorales se obtuvieron de 16 pacientes (6 masculinos y 10 femeninos). El promedio de edad fue de 72 años, rango: 48-84 años. Las muestras tumorales se recogieron quirúrgicamente durante el período de junio de 2015 a enero de 2018. El diagnóstico de cáncer de pulmón fue confirmado por tres patólogos (CM, BJ y RD) en el American British Cowdray Hospital (Ciudad de México, México). Ninguno de los pacientes recibió radiación preoperatoria o quimioterapia antes de la cirugía. Además, se utilizaron como controles no tumorales, 4 fragmentos de tejidos pulmonares adyacentes a la tumoración. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente. Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (REF 1501).

### **Animales**

Los ratones NSG (NOD scid gamma) y nu / nu de los laboratorios Jackson, se mantuvieron en nuestras instalaciones para animales en un estante ventilado con alimentos y agua *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales y aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Se utilizaron machos o hembras de al menos 8 semanas, para formar grupos experimentales. Una vez concluidos los experimentos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los órganos viscerales fueron explorados para la determinación de metástasis.

### **Cultivo Celular**

Las células A549 de adenocarcinoma alveolar humano se obtuvieron de ATCC. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12) (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF), L-glutamina 2 mM (Sigma), penicilina 50 U/ml y 50 mg/ml de estreptomycin (Invitrogen) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Antes del tratamiento con TNF $\alpha$ , la monocapa de células A549

se lavó una vez con PBS y se cultivó en medio de suero libre con  $TNF\alpha$  (5 ò 20 ng/ml) en diferentes momentos.

### **Diseño de oligos y PCR para la generación de construcciones.**

La amplificación de la región 3' UTR de NF2 a partir de ADN genómico humano se realizó previamente en el laboratorio (Pérez-García et al., 2015). La clonación de los miRNAs se realizó considerando que el aumento eficiente de miRNAs, requiere clonar el precursor del miRNA (pre-miRNA) con un mínimo de 40pb flanqueándolo de cada lado (Chen et al., 2004). Con ayuda del programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) para el diseño de oligos para los pre-miRNAs con la secuencia: hsa-pre-miR-32 (ENSG00000207698) y hsa-pre-miR-25 (ENSG00000207547), cumpliendo el requisito de ser flanqueados al menos por 40pb de cada lado. Se amplificaron los pre-miR-32 y pre-miR-25 con oligos específicos para las secuencia de los pre-miRNA+40pb y con sitios de restricción para BamHI y EcoRI. Una vez que los pre-miRNAs fueron clonados en el plásmido correspondiente, la orientación y autenticidad de las secuencias fueron confirmadas por secuenciación y digestión enzimática. Todos los oligos fueron analizados para calcular su  $T_m$  y para evitar la formación de dímeros con el programa Perl Primer (Marshall, 2004).

### **Vectores plasmídicos y construcciones**

Los ensayos de luciferasa se realizaron con el vector psiCHECK™-2 vector (Promega) donde se insertaron las primeras 858pb de la 3'UTR de Merlín de Homo sapiens, el fragmento NF2-3'UTR clonado corriente abajo del vector Renilla en psicheck (Luc-wtNF2-3'UTR). Se generó una versión mutante del NF2-3'UTR (Luc-mutNF2-3'UTR) mediante la sustitución de los nucleótidos TT por AA en el sitio de unión de mir-146a en la UTR, utilizando QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) (Pérez-García et al., 2015).

Para las transfecciones transitorias y estables se utilizaron los siguientes plásmidos: pcDNA™3.1/myc-His (Invitrogen) como vector vacío, al que se le insertaron las secuencias de pre-miR-146a, pre-mir-32 y pre-mir-25 amplificados por PCR a partir de ADN genómico humano para generar los vectores pc/mir-146a, pc/mir-32 y pc/mir-25 respectivamente (Pérez-García et al., 2015). También se utilizaron los vectores

pc/mir-7 y pc/miR-881 generados previamente en el laboratorio por Meza y colaboradores (Meza-Sosa et al.2014). Aunque la secuencia utilizada para generar pre-mir-7 y pre-mir-881 pertenece a ratón, se utilizaron estas construcciones debido a que la secuencia semilla de ambos miRNAs es idéntica para las dos especies por lo que tienen la misma actividad biológica. En el caso de mir-7 tiene sitios de unión en la 3'UTR de Merlín, mientras que mir-881 no, por lo que fue utilizado como control de especificidad en el ensayo de luciferasa.

### **Transfecciones en células A549**

Para los ensayos de actividad luciferasa y de aumento de miRNAs en las A549 se sembraron 250,000 células en cajas de 35 mm, cuando el cultivo alcanzó el 70% de confluencia se les sustituyó el medio suplementado por 1.5ml de medio no suplementado para adicionarle la mezcla de transfección. Las células se co-transfectaron con 400ng de uno de los vectores de expresión para miRNAs: pc/mir-146a, pc/mir-32, pc/mir-25, pc/ mir-7 y pc/miR-881, con uno de los plásmidos Luc-wtNF2-3'UTR o Luc-mutNF2-3'UTR (400ng) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Como controles se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente transfectadas con los vectores psiCHECK2 y pcDNA3.1 (400 ng). Después de 4 horas, el medio de transfección fue retirado y reemplazado por medio suplementado. Las células se cultivaron 48 horas, se cosecharon y se obtuvieron lisados proteicos para ensayos de actividad luciferasa.

Las células A549 se transfectaron con un antimirRNA específico para miR-146a (anti-miR-146a) previamente reportado (Matysiak et al., 2013) como control se utilizó un oligo con secuencia inespecífica. Utilizando Lipofectamina se transfectaron 40nM del oligo anti-miR-146a por cada condición. La mezcla de transfección se incubó durante 4h, luego se reemplazó por medio suplementado. Las células transfectadas se cultivaron por 24h y se cosecharon para el ensayo biológico correspondiente.

### **Extracción de proteínas totales**

Las monocapas transfectadas se lavaron con 1ml de PBS 1X y se colocaron en hielo. Posteriormente a cada caja se le agregó 100µl de Tampón de Lisis (25mM Tris-fosfato (pH 7.8), 2mM DTT, 2mM ácido trans-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético

monohidratado, 10% glicerol y 1% Triton® X-100) del Kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Las monocapas se rasparon, se recuperó el lisado total y se colocó en tubos de 1.5 ml durante 15 min en hielo. Posteriormente los lisados celulares se centrifugaron a 4°C, durante 10 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante se colectó en tubos nuevos y se almacenó a -70°C hasta su uso, para los ensayos de actividad luciferasa o para Western Blot.

### **Ensayos de actividad de luciferasa**

La actividad de luciferasa se determinó a partir de los lisados proteicos obtenidos de las células transfectadas, los cuales se prepararon de acuerdo a lo indicado por el Kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Las Unidades Relativas de Luciferasa (RLU) se obtuvieron primero con la obtención de los cocientes de las muestras: (MUESTRA Renilla/MUESTRA firefly). A continuación, se obtuvieron los cocientes de los cocientes de las muestras: (MUESTRA Renilla/MUESTRA firefly) / (CONTROL Renilla/ CONTROL firefly). Finalmente se calcularon los RLU de los miRNA transfectados de manera independiente y co-transfectados; normalizando sus valores, tomando como 1 los experimentos hechos con Luc-wtNF2-3`UTR + pcDNA 3.1.

### **Clonación por dilución limitante**

Las células A549 cultivadas en pozos de placas de 24 pozos se lavaron con 1ml de PBS, se incubaron con 200 µl de tripsina durante 5min a 37°C y se inactivó el efecto de la tripsina con 500 µl de medio completo. El número total de células en cada suspensión celular se determinó contando con la cámara de Neubauer y se resuspendieron 60 células en 12 ml de medio. Se sembraron 100 µl por pozo en una placa de 96 pozos de la suspensión celular. Después de 11días de cultivo se seleccionaron los pozos donde crecieron clones individuales y se pasaron a placa de 24 pozos.

### **Selección de clones con bajos niveles de mir-146a**

Las clones pasadas a placa de 24 pozos se dejaron crecer hasta llegar a un 80% de confluencia, se tripsinizaron y de los 700 µl de la suspensión celular se sembraron 100 µl en una placa testigo y el resto de cada una de las clones se les extrajo ADN

genómico. Se utilizaron 100 ng de ADN genómico de cada una de las clonas para preparar la siguiente mezcla de reacción para PCR de 12.5 µl: Amortiguador 10X 1.25 µl; MgCl<sub>2</sub> 20X 0.625 µl; dNTP 10µM 0.25 µl; oligo Fw- premir146 y oligo Rev-premir146 25µM 0.25µl; Amplificasa 5 U/µl 0.25 µl. Las muestras se corrieron en un termociclador usando los siguientes parámetros: 94°C 1:30min; ciclo1-35 (94°C 15`s, 68°C 30`s, 72°C 30`s); ciclo 36 72°C 3min. Los fragmentos amplificados se resolvieron y se visualizaron en gel de agarosa al 2% en tampón TBE1X. Estos productos de PCR fueron desnaturalizados para formar heterodúplex, a 95°C 5min y re-hibridados a temperatura ambiente incubando las muestras por más de 5 min. Los heterodúplex fueron resueltos y visualizados en gel de acrilamida al 10% en tampón TBE1X.

### **Líneas celulares estables y generación de clonas**

Las líneas celulares estables de A549 (pcDNA, miR-146a y miR-146a / NF2) se generaron previamente (Pérez-García et al., 2015). El aumento de miR-146a en clonas estables se determinó mediante qPCR y los niveles de proteína de Merlín se determinaron mediante Western Blot. Se obtuvieron clonas con diferentes niveles de expresión de mir146 (alto, bajo 1, bajo 2 y bajo 3) limitando la dilución de células A549 en placas de 96 pocillos. Los niveles de expresión de miR-146a se determinaron mediante qPCR y los niveles de proteína de Merlín se determinaron mediante Western blot de clonas aislados A549. Se seleccionó una clona miR-146a que sobreexpresa (Alto) y tres clonas con niveles bajos de miR-146a (Bajo1, Bajo2 y Bajo3).

### ***Ensayos de proliferación celular***

Para los ensayos de proliferación celular el número total de células por condiciones de cultivo, se determinó por conteo celular utilizando la cámara de Neubauer. A las células en cultivo se les retiró el medio, se lavaron con PBS 1X, se les agregó tripsina (0.25%) y se incubaron durante 3 minutos a 37°C. La monocapa celular despegada se resuspendió en 2 volúmenes de medio suplementado para inactivar la tripsina. De la suspensión celular se tomaron 20 µl y se mezclaron en una relación 1:1 con azul de tripano, posteriormente 10 µl de la mezcla se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo. Luego el número total de células se determinó usando la siguiente fórmula Número total de células = Promedio de células contadas \* factor de dilución en tripano\*10000\* Volumen suspensión celular.

## **Ensayos de cicatrización de herida en monocapa de cultivo**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en cajas de 35 mm y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, en el centro de la caja se realizó una herida pasando una punta para micropipeta sobre la monocapa celular. Se retiró el medio, la caja se lavó con PBS 1X para eliminar las células muertas, se colocó medio nuevo sin suero y se tomaron fotografías de la herida recién hecha (0h). Para determinar si  $\text{TNF}\alpha$  (20ng/ml) promueve el cierre de la herida de monocapa en las A549 se trataron las células con esta citocina luego de hacer la herida. Para determinar si el cierre de la herida se debe a proliferación y/o migración celular se añadió el inhibidor de la proliferación Ara-c (10 $\mu$ M) junto con el  $\text{TNF}\alpha$  en el tiempo 0h y se marcaron las células en proliferación con BrdU (10 $\mu$ M) durante 1h a 37°C, antes de cosecharlas. La cicatrización de la herida fue monitoreada por medio de fotografías que se tomaron cada 24 horas a partir del tiempo cero y hasta las 72h. El porcentaje del área de la herida abierta de cada fotografía se determinó utilizando el programa "Tscratch" (Computational Science and Engineering Laboratory); posteriormente, con todos estos datos se obtuvo un promedio total de porcentaje de herida abierta de cada tiempo. El porcentaje del área abierta de los tiempos iniciales (0h) se estandarizó con valor de 100% con el fin de obtener un porcentaje final de área cerrada de los siguientes tiempos.

## **Extracción de ADN genómico a partir de células de mamíferos en cultivo**

Las células cultivadas se cosecharon y el pellet se re-suspendió en 250 $\mu$ l de Tampón de lisis (10mM Tris-HCl pH7.5; 10mM EDTA; 10mM NaCl, 0.5 % sarcosyl (N-lauryl sarcosine); 10 $\mu$ g/ml Proteinasa K) y se incubaron durante 2h a 60°C. Posteriormente se le añadieron 500 $\mu$ l de isopropanol y 10  $\mu$ l de NaCl 5M y se incubaron 1h a -20°C para precipitar el ADN. Las muestras precipitadas se centrifugaron 13,000 rpm en una microcentrífuga durante 15 min a 4°C. El pellet se lavó con 1ml de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente 5 min a máxima velocidad. Luego se eliminó el sobrenadante y los pellets se dejaron secar a temperatura ambiente. El ADN genómico purificado se re-suspendió en 25  $\mu$ l de Tampón TE, se cuantificó con el Nanodrop y se almacenó a -20°C hasta su uso.

## **Ensayo de Dot Blot para ADN**

El ADN genómico purificado de las células proveniente de ensayos de cicatrización de herida en presencia de  $TNF\alpha$  (20ng/ml) y Ara-c (10 $\mu$ M), se desnaturalizó (2 $\mu$ g) con 10 volúmenes de NaOH 0.4N durante 30min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se pusieron en hielo para evitar que las cadenas de ADN desnaturalizado re-hibridaran y se neutralizó con igual volumen de Tris-HCl 1M pH6.8. Se realizaron diluciones seriadas (100, 50 y 25ng) del ADN desnaturalizado y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara de Dot Blot. Las muestras de ADN se fijaron a la membrana con radiación de luz ultravioleta (1800 $\mu$ J) en un "Stratalinker" (CL-100, UVP). La membrana se incubó con un anticuerpo anti-BrdU mouse (Santa Cruz) a una dilución de 1/500 en leche al 1% en TBS-Tween, durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween y se agregó el anticuerpo secundario (anti-mouse HRP) diluido 1/5000 en leche al 1% en TBS-Tween. Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween y uno con TBS sin Tween. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del fabricante (PerkinElmer Inc.)

## **Electroforesis de proteínas y Western Blot**

Las células o tejidos se lisaron en 100  $\mu$ l de tampón de lisis tritónico frío (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, b) glicerofosfato 25 mM pH 7,4, PPINa 2 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1%, glicerol al 10%) suplementado con 1 mM de  $Na_3VO_4$ , 1 mM de PMSF, 0.5 mM de DTT y coctel de inhibidor de proteasa completo (Roche), durante 15 minutos a 4 ° C. Los lisados celulares se centrifugaron a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína usando el reactivo Bradford (Bio-Rad). Los extractos celulares totales (20 o 30  $\mu$ g) se resolvieron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en tampón salino Tris (TBS: Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) con Tween-20 al 0,1% (Sigma) (TBS-T), seguido de incubación con el anticuerpo indicado diluido en TBS-T con 5% de leche descremada. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T después de cada incubación con anticuerpo. Después, las membranas se incubaron con

anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology) o avidina acoplada a HRP (Biolegend, Cat. 430204). Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia (Perkin Elmer) usando un c-Digit Blot Scanner (LI-COR) siguiendo las instrucciones del fabricante. Anticuerpos primarios utilizados de Santa Cruz Biotechnology, Inc: NF2 (C-18, sc-322); p-NF2 (Ser-518, sc-101735); BrdU (Bu20A, sc-20045) y TNFR2 (H-202, sc-7862). Anticuerpos primarios utilizados por Cell Signaling Technology:  $\beta$ -actina (8H10D10); p-IKK $\alpha$  /  $\beta$  (Ser176 / 180, 16A6), IKK $\beta$  (2C8), p-ERK1 / 2 (Thr202 / Tyr204, 9101S) y ERK2 (9108S). Anticuerpo primario humano utilizado de Biolegend: biot-hTNF (MAb11). Los anticuerpos utilizados se relacionan en la Tabla 2. (ANEXO II).

### **RT-PCR semi-cuantitativo y cuantitativa de miRNAs**

El ARN total de las células se extrajo conforme al método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). La concentración de ARN se cuantificó en un NanoDrop (Thermo Scientific). Los oligonucleótidos utilizados para retrotranscribir y amplificar miR-146a, mir-7, mir-32, mir-25, mir-330 se diseñaron según lo reportado por Varkonyi-Gasic y colaboradores; también por Chen y colaboradores (Chen et al., 2005; Varkonyi-Gasic, Wu, et al., 2007). Los oligonucleótidos fueron analizados para calcular su T<sub>m</sub> y para evitar la formación de dímeros con el programa Perl Primer. La reversotranscripción se realizó para cada miRNA con la siguiente mezcla de reacción: Tampón First Strand 5X (4  $\mu$ l), DTT 0.1M (2 $\mu$ l), dNTP 10  $\mu$ M (0.5  $\mu$ l), oligo RT stem-loop miRNA 1  $\mu$ M (1  $\mu$ l) en agua DEPC para completar 20  $\mu$ l de volumen total por reacción. En todos los casos se utilizaron 100 ng de ARN total para la reacción de reversotranscripción simple (miRNA) y la reacción doble (miRNA+ U6). La reacción doble de reversotranscripción se realizó para los miRNA con PCR estandarizada y la mezcla de reacción se incluyen el oligo reverso U6 1  $\mu$ M (1.5  $\mu$ l). Se utilizó la Transcriptasa reversa termoestable M-MLV(0.25  $\mu$ l) de acuerdo al protocolo de referencia (Varkonyi-Gasic et al., 2007). Se incluyeron como controles negativos de la RT, una reacción sin enzima y otra sin ARN. Las reacciones de PCR para los miRNAs se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por Varkonyi-Gasic, utilizando la siguiente mezcla de reacción para 1  $\mu$ l de cDNA como templado en cada caso: Tampón amortiguador 10x (2  $\mu$ l), MgCl<sub>2</sub> 20X (1), dNTP 10  $\mu$ M (0.4  $\mu$ l), oligo forward miRNA 10  $\mu$ M (0.4  $\mu$ l), oligo reverso universal 10  $\mu$ M (0.4  $\mu$ l), Amplificasa 5 U/ $\mu$ l (0.2

μl), ajustado con agua para completar 20μl de volumen total por reacción. Para la estandarización de 20-40 ciclos para los miRNAs, mir-32, mir-25, mir-330, mientras que para los miRNAs ya estandarizados (mir-146 y mir-7) se hicieron a 30 ciclos. Como control de la reversotranscripción se utilizaron en la mezcla de reacción oligos forward y reverso 800 nM (1 μl) para snRNA U6.

Para la qPCR, se adicionó 1 μl del cDNA obtenido en la siguiente mezcla de reacción para 10 μl: Platinum Syber qPCR 2X 5 μl; oligo Fw qPCR mir-146 (5 μM) 1μl; Universal qPCR Primer (5 μM) y H<sub>2</sub>O libre de nucleasa 2 μl. El snRNA U6 se utilizó como control de gen de referencia y para este caso en la mezcla de reacción se utilizaron dos pares de oligos específicos Fw qPCR U6 (10 μM) y Rev qPCR U6 (10 μM). Las muestras se corrieron en un equipo de PCR tiempo real (Applied Biosystem) con los siguientes parámetros: 95°C 10min; ciclo1-40 (95°C 15`s, 60°C 10`s); ciclo 41 95°C 15`s, 65°C 1min; 95°C15`s. La T<sub>m</sub> de mir-146 y U6 es de 60°C. La secuencia de cebadores utilizada se enumera en la Tabla 1 (ANEXO I).

### **Ensayos de metástasis experimental**

Se inocularon ratones NSG o nu / nu de 6 a 8 semanas de edad en la vena lateral de la cola con 10<sup>6</sup> células A549, o A549 pre-tratados con TNF $\alpha$  (5ng/ml) en medio de suero libre durante 24 horas o A549 transfectadas con antimir-146a (40nM) 24h antes del tratamiento con TNF $\alpha$  (5ng/ml) en medio de suero libre durante 24h. Los ratones también se inocularon en la vena lateral de la cola con 10<sup>6</sup> células de diferentes clonas derivadas de la línea celular A549: clonas con altos (High) o bajos niveles de expresión de miR-146a diferentes clonas (Low1, Low2 y Low3). Los ratones inmunodeficientes también recibieron con 10<sup>6</sup> células de clonas estables de A549 (pcDNA, miR-146a y miR-146a+NF2) generadas en nuestro laboratorio (Perez-Garcia et al. 2015). Después de 8 semanas, se sacrificaron los animales y se determinó la presencia de nódulos metastásicos y se contaron utilizando el estereoscopio. En los casos donde las metástasis fueron numerosas y fusionadas donde se dificultó el conteo visual, se pesaron los tumores en una balanza analítica (Mettler Toledo, MS304TS). Los niveles de miR-146a y la proteína Merlín en nódulos metastásicos se determinaron mediante ensayos RT-qPCR y Western blot, respectivamente.

## **Análisis estadístico**

Los datos se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar. Todos los experimentos *in vitro* se repitieron al menos tres veces. El grado de significancia estadística de los datos se determinó usando la prueba t de Student (dos colas) o unidireccional, ANOVA cuando se compararon más de 2 grupos y Post-test Bonferroni se usaron para determinar los valores de  $p$ . En todas las pruebas,  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo, utilizando el programa Prism5. Los datos de los pacientes se analizaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

## Resultados

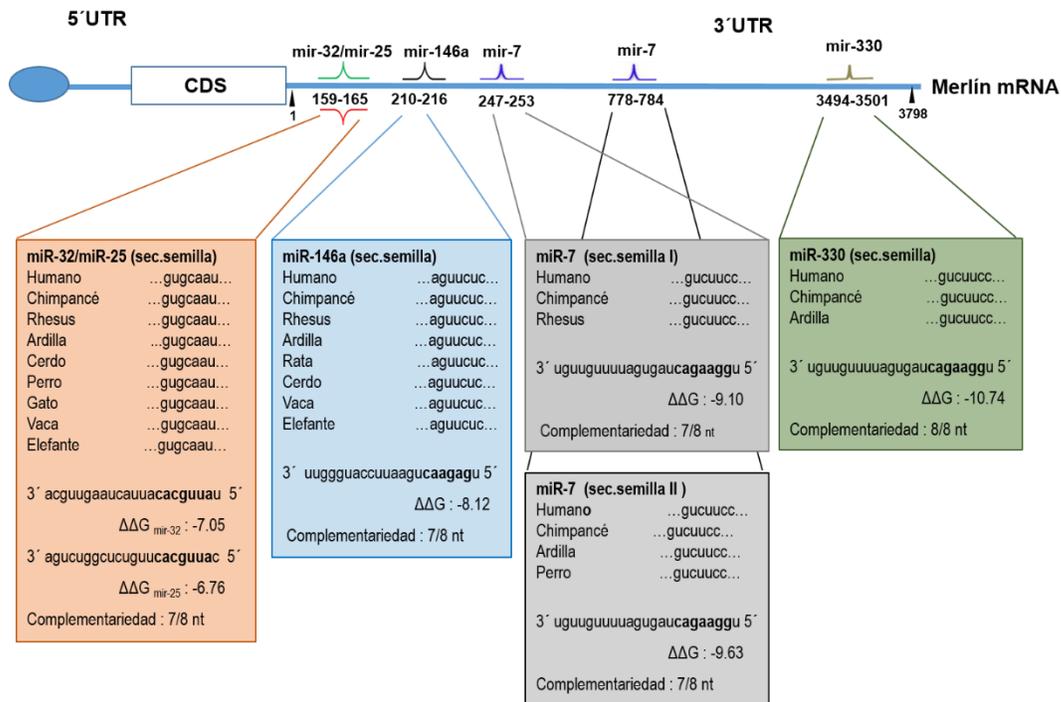
### **Predicción bioinformática de sitios de unión para miRNAs en la UTR 3' de Merlín y análisis termodinámico y de conservación**

Mediante un análisis bioinformático realizado en nuestro grupo, se destacaron 12 miRNAs en humanos, que podrían tener como blanco la región 3'UTR de Merlín (Pérez-García et al. 2015). Dentro de estos, se encontraban el miR-146a, miR-7a, miR-32, miR-25 y miR-330, los cuales obtuvieron valores bioinformáticos que sugieren que podrían estar regulando traduccionalmente a Merlín. Estos cuatro miRNAs resultaron de gran interés en los estudios de cáncer dado que el aumento del miR-146a, miR-7a, miR-32, miR-25 y miR-330 se han asociado con la progresión diferentes tipos de tumores (Mesci et al. 2017; Wenfeng Tan et al. 2018; T. Wu et al. 2015; Yan et al. 2015; X.-D. Zhao et al. 2015).

El análisis bioinformático realizado en la base de datos TargetScanHuman (Lewis et al. 2003) mostró que el miR-146a tiene un sitio blanco en la 3'UTR de Merlín, ubicado en las bases 210-216, formando complementariedad con 7 de las 8 bases, de la región semilla (Fig 1). También para miR-146a el programa miRanda (John et al. 2004) dio un miRsvr score de -0.1309, y el programa PiTa (Kertesz et al. 2007) dio una  $\Delta\Delta G$  de -8.12, ambos datos indican que la formación del dúplex entre la región 3'UTR de Merlín y el miR-146a es termodinámicamente estable y altamente probable. Adicionalmente, el sitio blanco reconocido por el miR-146a está altamente conservado, presentándose en las regiones 3'UTR de Merlín de diferentes especies de vertebrados (Fig. 1). La conservación de este sitio a lo largo de la evolución sugiere que la inhibición de Merlín por miR-146a tiene relevancia funcional a nivel celular, razón por la cual evolutivamente se ha conservado (Pérez-García et al. 2015).

En el caso de miR-7a, el análisis bioinformático mostró que existen 2 sitios blanco en la región 3'UTR de Merlín, ubicados en las bases 247-253 y 778-784, formando complementariedad con 7 de las 8 bases de la región semilla (Fig. 1). El programa miRanda dio un miRsvr score de -0.3048 solo para el primer sitio, mientras que el programa PiTa dio una  $\Delta\Delta G$  de -9.10 y -6.03, respectivamente. Estos datos indican

que la formación del dúplex entre la región 3'UTR de Merlín y el miR-7a es termodinámicamente estable y muy probable para el primer sitio, no tanto así para el segundo sitio de unión. Interesantemente aunque la conservación de ambos sitios blanco de miR-7a se restringe a algunos mamíferos, sus valores termodinámicos de unión con el ARNm-NF2 sugieren que la inhibición de Merlín por este miRNA podría tener relevancia funcional (Pérez-García et al. 2015).



**Figura 1. Representación esquemática de los sitios blanco de miR-146a, miR-7a, miR-32, miR-25 y miR-330 en la región 3'UTR de Merlín.** En las posiciones 159-166nt (posiciones relativas al sitio de inicio de la región 3'UTR en 2228 nt) se encuentra el sitio de unión para el miR-32/25 (en rojo y verde). En la posición 210-216nt se encuentra el sitio blanco de miR-146a (color negro), mientras que en la posición 247-253 y 778-784nt, se encuentran los dos sitios de unión para miR-7a (color azul). Finalmente en la posición 3494-3501nt se encuentra el sitio blanco de miR-330 (color café). Los sitios de la posición 159 para miR-32/25 y el 210nt para el miR-146a se encuentran altamente conservados en vertebrados, mientras que los sitios de unión de miR-7a y miR-330 solo están conservados en algunos mamíferos (Base de datos TargetScanHuman).

Los miR-32 y el miR-25 presentan la misma secuencia semilla, por lo cual también comparten el mismo sitio de unión a la región 3'UTR del ARNm de Merlín. En la base de datos TargetScanHuman se observó que miR-32 y el miR-25 tienen dos sitios de unión en la región 3'UTR, el primero ubicado de las bases 159-166 y el segundo de las bases 2816-2822. Solo el primer sitio presenta una complementariedad de 7 de las 8 bases de la secuencia semilla y es el único que se encuentra altamente conservado en diferentes vertebrados, por lo que el análisis termodinámico de la

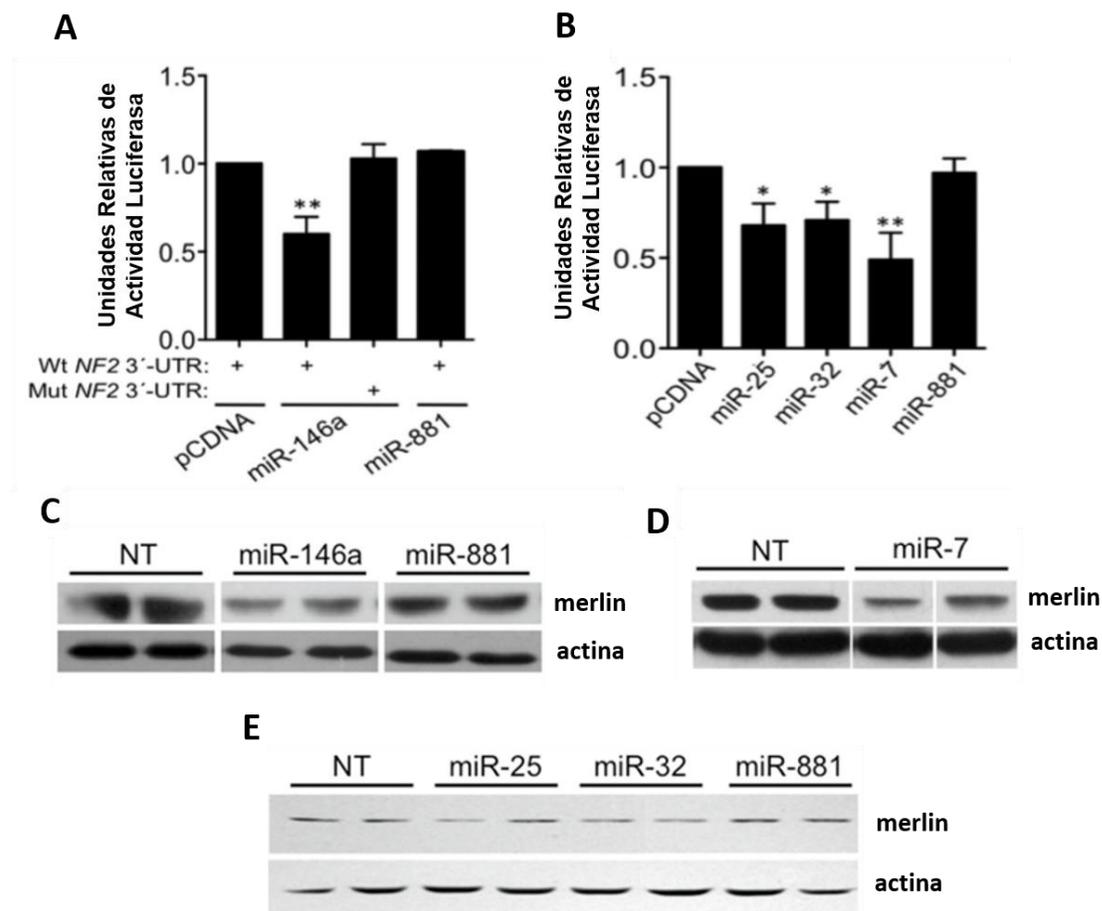
formación del heteroduplex, se realizó únicamente para el primer sitio (Fig. 1). Para el mir-25 y el miR-32 el programa miRanda dio un miRsvr score de -0.1779 y -0.1763, mientras que el programa PiTa dio una  $\Delta\Delta G$  de -6.76 y -7.05, respectivamente. En ambos casos, los datos sugieren que la formación del dúplex entre la región 3'UTR de Merlín y estos ms es termodinámicamente estable y altamente probable. El programa TargetScanHuman mostró un context score percentile de 79% para el mir-25 y de 81% para el mir-32, lo que nos permite considerar a ambos miRNAs como posibles candidatos para regular negativamente a Merlín.

Para el caso de miR-330, este tiene un sitio blanco en la 3'UTR de Merlín, ubicado en las bases 3494-3501, formando complementariedad con las 8 bases, de la región semilla del miR-330 (Fig 1). El programa miRanda dio un miRsvr score de -0.1684, mientras que el programa PiTa dio una  $\Delta\Delta G$  de -10.74, ambos datos indican que la formación del dúplex entre la región 3'UTR de Merlín y el miR-330 es termodinámicamente estable y altamente probable. Como se observa, el sitio blanco reconocido por el miR-330 está conservado solo en algunos mamíferos. Luego, tanto la conservación de este sitio a lo largo de la evolución, así como sus valores termodinámicos de formación del heteroduplex, sugieren que la inhibición de Merlín por miR-330 puede tener relevancia funcional a nivel celular (Pérez-García et al. 2015). En conjunto estos datos sugieren que Merlín puede ser regulado postranscripcionalmente por distintos miRNAs.

### **La región 3' UTR de Merlín es regulada por miRNAs: miR-146a, miR-7a, miR-32 y mir-25.**

Para validar el análisis bioinformático se utilizó el vector psi/NF2. Este vector tiene clonado un fragmento (1-858nt) de la región 3'UTR de Merlín que contiene los sitios de unión de los miR-146a y mir-32/mir-25, y miR7 corriente abajo del gen reportero de luciferasa, por lo que nos permite probar si la expresión de los miRNAs disminuye actividad de luciferasa derivada del plásmido. Para esto, las células A549 se co-transfectaron con psi/NF2 y el vector de expresión de los distintos miRNAs (pc/miRNA) y la actividad luciferasa relativa se midió a las 48h pos-transfección. De acuerdo con resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, la expresión de miR-146a

disminuye la actividad de luciferasa derivada del plásmido psi/NF2 en la línea celular A549 en un 40% al compararse con los niveles de luciferasa de las células transfectadas con miR-881 (control negativo) o transfectadas con el vector vacío (pcDNA) (Pérez-García et al. 2015). También se observa que la mutación del sitio de unión de miR-146a en la región 3'UTR de Merlín, previene el efecto inhibitorio de este miRNA sobre la expresión de luciferasa (Fig.2A). De igual manera, la expresión del miR-32 y el miR-25 disminuyen la actividad luciferasa en un 30%, niveles similares a los del mir-146a, cuando se transfectan 600ng de vector pc/miRNA (Fig. 2B). Mientras que miR-7a redujo en un 50% la actividad luciferasa (Fig. 2B). Estos resultados indican que la región 3'UTR de Merlín es regulada negativamente por miR-146a, miR-7a, miR-32 y mir-25, inhibiendo la traducción del ARNm.



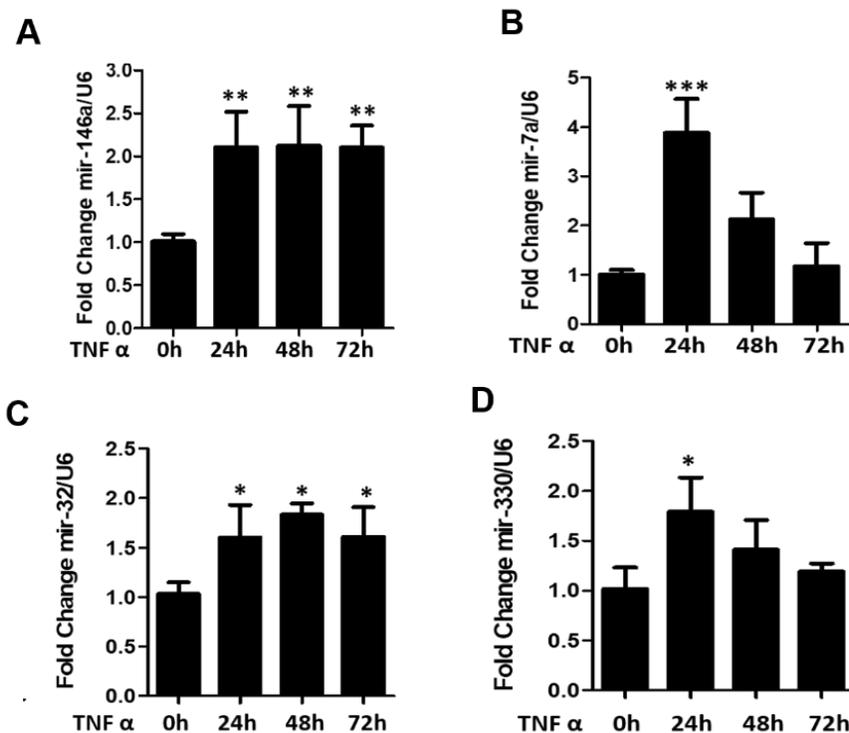
**Figura 2. La región 3'UTR del mensajero de Merlín es blanco de miR-146a, miR-7a, miR-32 y mir-25.** (A) Las células A549 se co-transfectaron con los vectores conteniendo la región 3'UTR salvaje (Wt-NF2 3'UTR o mutada (Mut-NF2-3'UTR) para el sitio de unión del miR-146a. A las 48h pos-transfección se realizaron los ensayos de luciferasa. (B) Las células A549 se co-transfectaron con 400ng de la construcción psi/NF2 y/o del vector vacío pcDNA3.1, el vector de expresión de miR-881, mientras que 200ng de miR-7a y 600ng de los miRNAs 32 y 25 se co-transfectaron con el vector psi/NF2. (C) Determinación niveles proteicos de Merlín por WB, en células A549 transfectadas con 1ug de los vectores pcDNA3.1 (No Tratadas, NT), pcDNA/miR-

881y miR-146a. (D) Determinación niveles proteicos de Merlín por WB, en células A549 transfectadas con 200ng de los vectores pcDNA3.1 (NT) y pcDNA/miR-7a. (E) Determinación niveles proteicos de Merlín por WB, en células A549 transfectadas con 600ng de los vectores pcDNA3.1 (NT) y pcDNA/miR-32y mir-25. Se utilizó actina como control de carga. Los resultados representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Two-way ANOVA, Bonferroni posttests \*,  $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ .

De acuerdo con los datos presentados arriba, el aumento de miR-146a, miR-7a, miR-32 y miR-25, conlleva a una disminución de los niveles proteicos de Merlín en las células A549, lo que no se observa cuando se sobre-expresa miR-881, un miRNA que no tienen sitios de unión en la región 3'UTR de Merlín (Fig.2 C-E). Estos resultados indican que la región 3'UTR de Merlín es blanco de miR-146a, miR-7a, miR-32y miR-25, y que el aumento de estos miRNAs en regulan negativamente la traducción del ARNm de Merlín, las A549 y por tanto reducen los niveles proteicos de este supresor tumoral.

### **La citocina proinflamatoria $TNF\alpha$ induce el aumento de miRNAs en las células A549.**

Recientemente hemos demostrado que miR-146a potencia las capacidades migratorias e invasivas de la línea celular de tumor pulmonar A549, a través de un mecanismo que en parte implica la regulación negativa del supresor de tumores Merlín (Perez-Garcia et al. 2015). Teniendo en cuenta que i) la expresión de miR-146a está regulada por estas citoquinas (Kutty et al., 2013; Taganov et al., 2006) y ii) que los miRNAs miR-7a, miR-32 y miR-330, que regulan negativamente a Merlín (Pérez-García et al. 2015), se han asociado con la progresión tumoral y un ambiente inflamatorio (Mesci et al. 2017; Yan et al. 2015; X.-D. Zhao et al. 2015) evaluamos si el  $TNF\alpha$  regula la expresión de estos miRNA en las células A549.



**Figura 3. La citocina pro-inflamatoria TNF $\alpha$  induce el aumento de miR-146a, miR-7a, miR-32 y miR-330 en las células A549.** Cuantificación relativa por qPCR de miR-146a(A), miR-7a(B), miR-32(C) y miR-330(D) a partir de 100ng de ARN total obtenido de células A549 cultivadas durante 24, 48 y 72h, en presencia de TNF $\alpha$  (20ng/ml). Como control de la reversotranscripción se utilizaron oligos para snRNA U6. Este resultado es de 3 experimentos individuales con todos los controles de la RTPCR. Los resultados representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Two-way ANOVA, Bonferroni posttests \*,  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

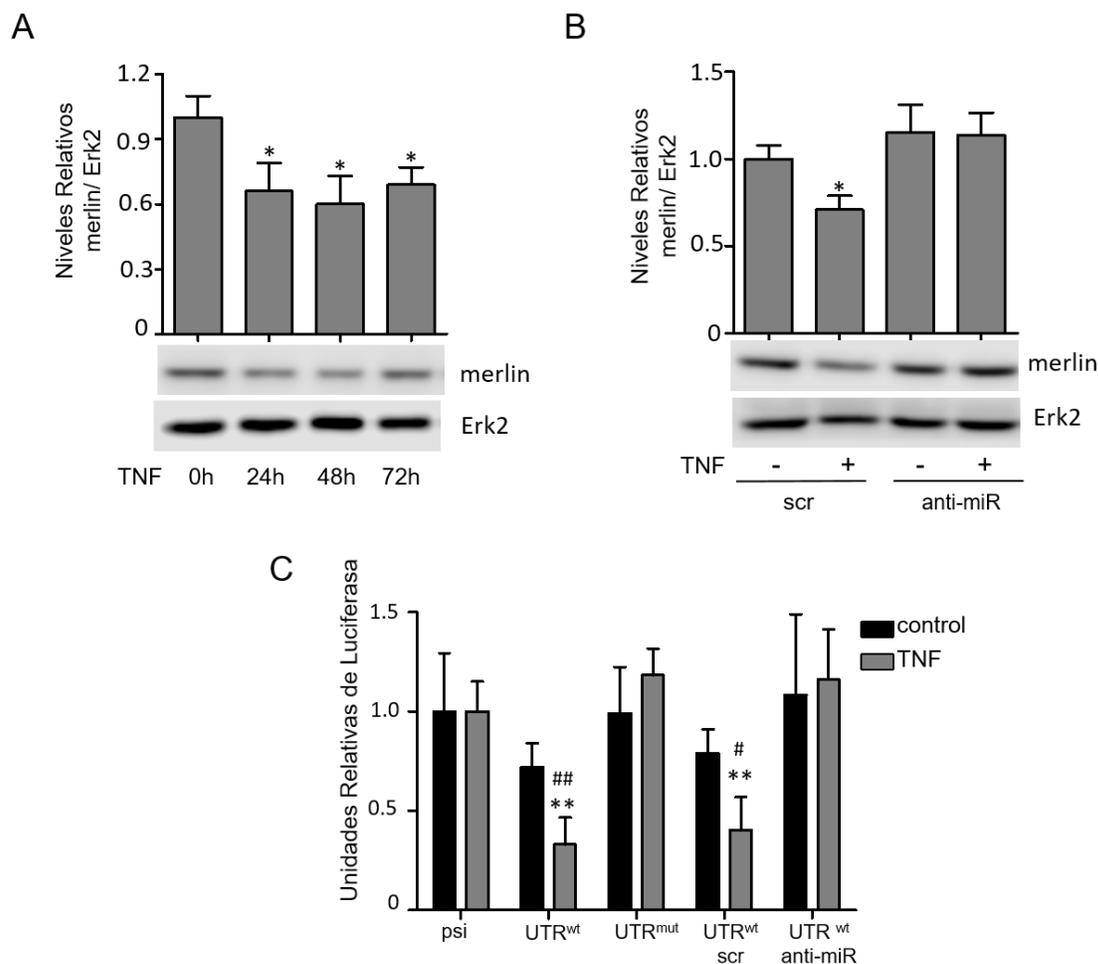
Para determinar los niveles de miR-146a, miR-7a, miR-32, miR-25 y miR-330 se estandarizaron las condiciones de PCR de cuantificación relativa para cada miRNA respecto al ARN nucleolar pequeño U6, lo cual se logró excepto para el miR-25 (Anexo I).

El tratamiento de las células A549 con TNF $\alpha$  aumentó significativamente (valores) la expresión de miR-146a a las 24, 48 y 72h (Fig. 3A). Mientras que el miR-7a solo aumenta su expresión significativamente a las 24h de tratamiento con TNF $\alpha$  (Fig. 3B). También observamos que TNF $\alpha$  induce significativamente la expresión de miR-32 a partir de las 24h hasta las 72h mientras que miR-330 sólo se indujo significativamente a 24h en las células A549 (Fig.3C, D). Estos resultados indican que el TNF $\alpha$  induce la expresión de miR-146a, miR-7a, miR-32 y miR-330 en las células A549. También observamos que, aunque estos miRNAs se inducen en presencia de TNF $\alpha$ , cada uno presenta un perfil de expresión diferente. Para el caso de miR-146a y miR-7a corroboramos lo reportado anteriormente, debido a que esperábamos que se

indujeran ante la señalización de  $TNF\alpha$ , porque los promotores de estos dos miRNAs tienen sitios de unión para el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Taganov 2006; Zhao et al. 2015). Sin embargo, para el miR-32 y el miR-330, esta es la primera evidencia experimental de que estos miRNAs son inducidos directamente por la señalización de citocinas proinflamatorias, como  $TNF\alpha$ . Estos resultados indican que  $TNF\alpha$  induce el aumento de miR-146a, miR-7a, miR-32 y miR-330 en las células A549.

### **La disminución de los niveles de Merlín en presencia de $TNF\alpha$ es mediada por el aumento de miR-146a.**

Dado que un ambiente inflamatorio favorece la transformación celular y que  $TNF\alpha$  aumenta significativamente los niveles de miR-146a, miR-7a, miR-32 y miR-330 en las células tumorales de pulmón y que estos miRNAs regulan negativamente los niveles de proteína Merlín, evaluamos si  $TNF\alpha$  promueve la transformación celular a través de regular negativamente a Merlín. Los niveles proteicos de Merlín mostraron una disminución significativa después del tratamiento con  $TNF\alpha$ , que se mantuvo durante 72 horas después del tratamiento (Fig.4A). Estos resultados muestran una relación inversa entre los altos niveles de miRNAs inducidos por  $TNF\alpha$  (Fig. 3A-D) y los bajos niveles de proteína de Merlín por el tratamiento con esta citocina (Fig.4A). Los antimRNAs son pequeños ARN de doble cadena, que se unen con alta afinidad a la secuencia semilla de los miRNAs, impidiendo así que los miRNAs se unan a sus ARNm blanco. Los antimRNAs han sido ampliamente utilizados para inhibir la función de miRNAs específicos (Stenvang et al. 2012), por lo que utilizamos un antimir-146a para inhibir la función de mir-146a inducido por  $TNF\alpha$  (Matysiak et al. 2013). Observamos que los niveles de proteína de Merlín no se redujeron en presencia  $TNF\alpha$  cuando se transfectaron las células A549 con un antimir-146a, mientras que cuando se transfectaron con un antimRNA control se disminuyeron significativamente los niveles de proteína de Merlín (Fig. 4B). Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de proteína de Merlín inducida por  $TNF\alpha$  es mediada por el incremento en la expresión de miR-146a.



**Figura 4. La disminución de Merlín en presencia de TNF $\alpha$  es mediada por el aumento de miR-146a.** A) Se trataron células A549 con TNF $\alpha$  (20ng/ml) durante 24, 48 y 72 h. Los niveles de proteína de Merlín se determinaron mediante ensayos de Western Blot utilizando un anticuerpo específico. La proteína ERK2 se utilizó como control de carga. Los datos densitométricos se normalizaron considerando el valor de 0h as 1. B) Las células A549 se transfectaron con anti-miR-146a o oligo de ARN inespecífico (40nM) y se recogieron 24h después de la transfección. Los niveles de proteína de Merlín se determinaron por Western Blot. La proteína actina se utilizó como control de carga. Los datos densitométricos se normalizaron considerando el valor de 0h as 1. C) Las células A549 se transfectaron con 200ng de plásmido reportero que contiene corriente abajo el reportero de luciferasa, vacío (psi) o con un fragmento de tipo salvaje de NF2 3'UTR (Wt-NF2 3'UTR) o mutado (Mut NF2-3'UTR). Además, las células A549 se co-transfectaron con Wt-NF2 3'UTR y anti-miR-146a o oligo de ARN inespecífico (40nM). Las células transfectadas y co-transfectadas se cultivaron en medio completo durante 24 horas después de la transfección. Todas las condiciones se trataron con TNF $\alpha$  (20ng/ml) durante 24h en medio de suero libre. La actividad de la luciferasa se determinó 48h después de la transfección. Los resultados representan la media y la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía \*\* p < 0.01 vs psi ## p < 0.01, # p < 0.05 vs control, \* p < 0.05 vs 0h.

Luego, para demostrar que el efecto negativo de TNF $\alpha$  sobre la expresión de proteína de Merlín es resultado de la interacción de miR-146a con la región 3'UTR del gen NF2, se transfectaron células A549 con un plásmido con el gen reportero de luciferasa vacío, o que contiene la secuencia de tipo silvestre o con una mutación en el sitio de unión para miR-146a, en la región 3'UTR del gen NF2 corriente abajo del gen de luciferasa. Posteriormente, las células transfectadas se trataron con TNF $\alpha$  durante 24

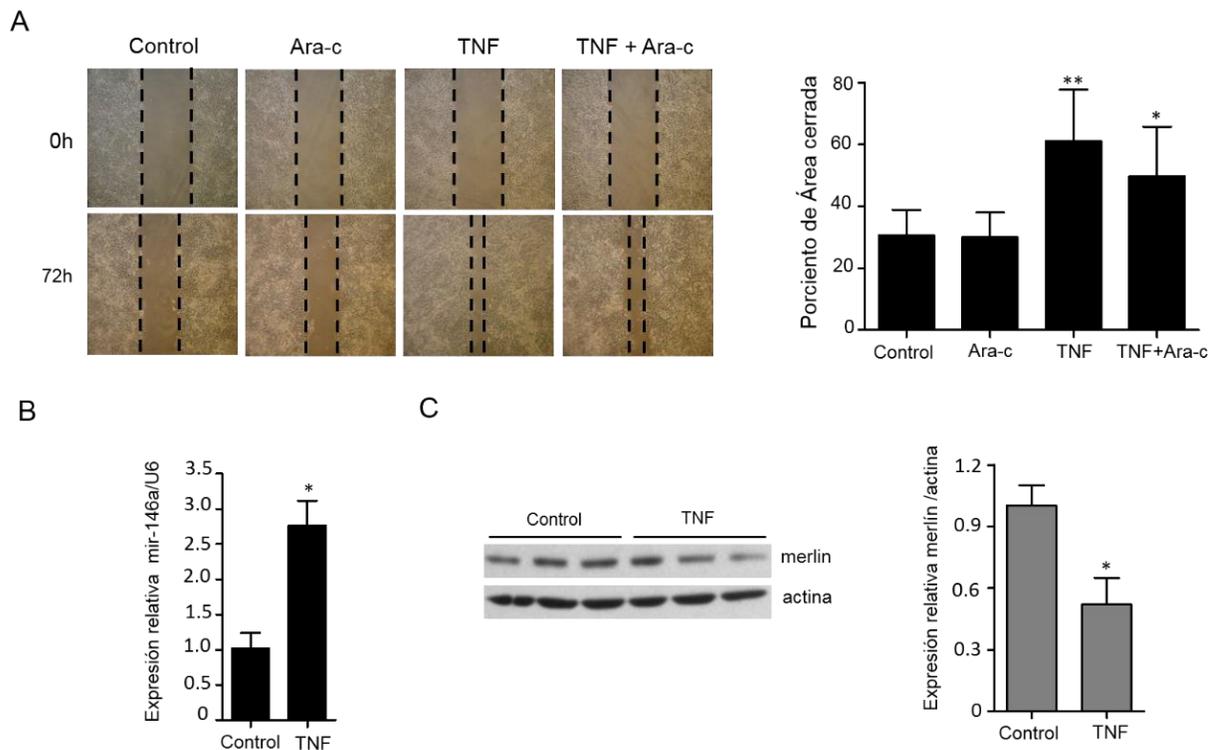
horas y se midió la actividad luciferasa. Como se esperaba, el  $\text{TNF}\alpha$  redujo la actividad luciferasa derivada del vector reportero que contiene la región 3'UTR silvestre del gen NF2, pero no tuvo efecto cuando se transfectó el vector que contenía mutado el sitio de unión de miR-146a en la región 3'UTR del gen NF2 (Fig. 4C). Además, este efecto se bloqueó cuando se co-transfectó el antimir-146a con la región 3'UTR del gen NF2 en células A549, pero no así cuando se usó un antagomiR control (Fig.4C). En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto negativo de  $\text{TNF}\alpha$  sobre los niveles de proteína Merlín está mediado por la inducción de los niveles de miR-146a y la interacción de miR-146a con la región 3'UTR del gen NF2.

### **La citocina proinflamatoria TNF promueven la migración de las A549.**

Las citocinas proinflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  también promueven un fenotipo metastásico en células A549 y que promueve la migración celular de esta línea mediante la expresión de la metaloproteinasa 9 (Cheng et al., 2010; Lin et al., 2008). Consistente con esto, la incubación de las A549 con una mezcla de citocinas proinflamatorias ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) por 48h, potencia el efecto del  $\text{TGF-}\beta$  sobre la transición epitelial-mesenquimal y la migración celular (Liu et al., 2008). Considerando estos antecedentes y los datos presentados anteriormente, donde se observa que la que  $\text{TNF}\alpha$  promueven la expresión de los miR-146a, miR-7a y miR-32 en células A549, evaluamos si un ambiente inflamatorio potencia la capacidad de migrar de las células A549 a través de regular negativamente a Merlín.

Para esto, evaluamos el efecto de  $\text{TNF}\alpha$  sobre la capacidad de migración de las células A549. Teniendo en cuenta que el proceso de cierre de la herida en la monocapa puede resultar tanto del incremento en la proliferación como en la migración celular, las células se trataron con  $\text{TNF}\alpha$  en ausencia o en presencia de Ara-c, un inhibidor de la proliferación celular, y se evaluó la capacidad de cierre de la herida. Las células en presencia de  $\text{TNF}\alpha$  cierran la herida significativamente antes que las células no tratadas (Fig. 5A). Cuando se cuantifica el área de cicatrización de la monocapa de células, observamos que las A549 tratadas con  $\text{TNF}\alpha$  durante 72h, cierran significativamente más la herida que las células no tratadas (Fig. 5A, panel de la derecha). En las células tratadas con  $\text{TNF}\alpha$  y Ara-c, observamos una ligera disminución en la cicatrización de la herida con respecto a las células tratadas

solamente con  $TNF\alpha$ , pero la capacidad de cierre de la herida observada en las células tratadas con  $TNF\alpha$  y Ara-c se mantiene significativamente incrementada respecto a la de las células control tratadas solamente con Ara-c.

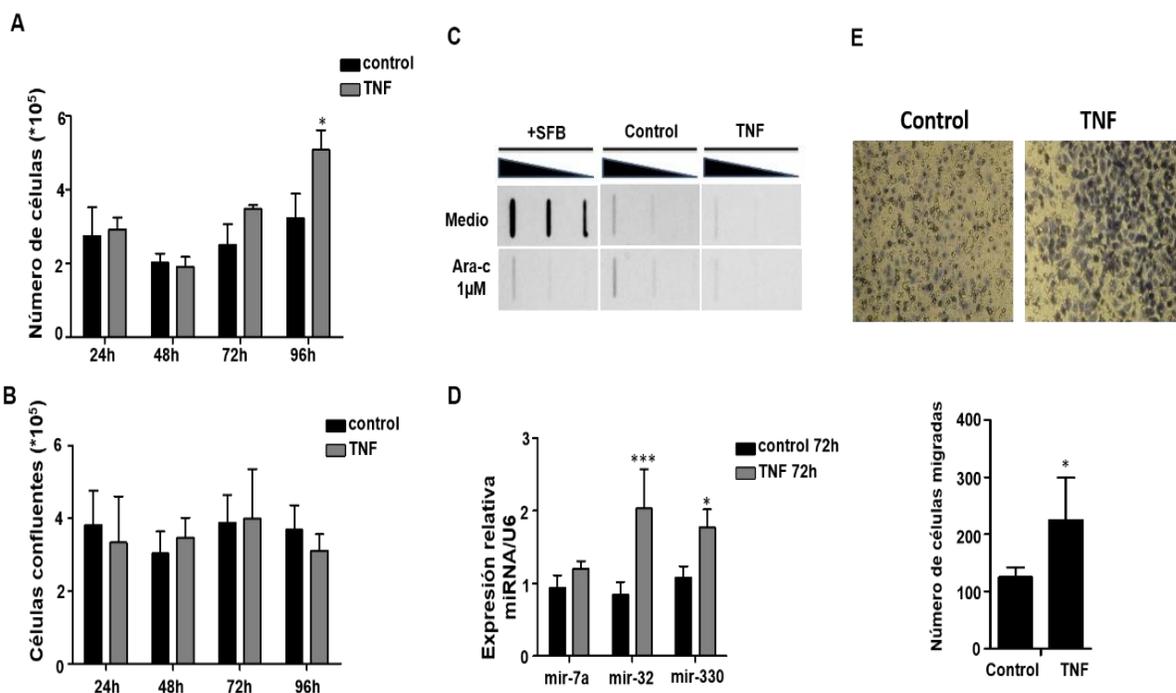


**Figura 5. La citocina pro-inflamatoria  $TNF\alpha$  promueve la migración de las A549.** (A) Se sembraron células A549 y se dejaron llegar a confluencia y se les realizó una herida. La monocapa herida se cultivó en presencia de  $TNF\alpha$  (20ng/ml) y/o el inhibidor de la proliferación Ara-c (1 $\mu$ M) o en medio sin suplementar. Se determinó el área de cicatrización de la herida en la monocapa a las 72h utilizando el programa TScratch (panel de la derecha). (B) La expresión relativa de miR-146a en la monocapa herida de células A549 tratadas con  $TNF\alpha$  (20ng/ml) en medio sin suplementar durante 72h. Se utilizó como control de transcripción el ARN nuclear U6. (C) Los niveles proteicos de Merlín del ensayo de herida anterior, se analizaron por WB, utilizando el anticuerpo anti-NF2 (Merlín) y un anti-actina como control de carga (panel de la izquierda). Análisis por densitometría de la intensidad de las bandas de proteína Merlín respecto actina (panel de la derecha). Los resultados representan la media y la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. Two-way ANOVA, Bonferroni posttests \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  vs control. t- Student test \*  $p < 0.05$  vs control.

Dado que miR-146a es fundamental en la disminución de los niveles de proteínas de Merlín inducidos por  $TNF\alpha$ , analizamos los niveles de este miRNA en la monocapa 72h después de la herida. Observamos que miR-146a se sobre-expresa significativamente en presencia de  $TNF\alpha$  (Fig. 5B). En correspondencia con esto, los niveles de proteína Merlín en la monocapa herida, a las 72h de tratamiento con  $TNF\alpha$  están disminuidos significativamente (Fig. 5C). Estos resultados están acorde con lo observado anteriormente, donde el aumento de miR-146a, inducido por la señalización de  $TNF\alpha$  en las A549, se corresponde con la disminución de los niveles

de Merlín en estas células.

Adicionalmente, para descartar la contribución de la proliferación celular en el cierre de la monocapa, se evaluó el efecto de  $TNF\alpha$  sobre la proliferación de células A549 en condiciones de subconfluencia y confluentes. Como se observa  $TNF\alpha$  promueve la proliferación de las células A549 en condiciones óptimas de espacio, pero no en células confluentes (Fig. 6A-B). Estos resultados reafirman que  $TNF\alpha$  no promueve proliferación en células confluentes pero si promueve la migración celular.



**Figura 6.  $TNF\alpha$  promueve el aumento de miR-32/miR-330 durante la cicatrización de heridas y la migración en células A549.** A) Se sembraron células A549 ( $2 \times 10^5$  células por pozo) en medio sin suplementar durante 96h. El conteo de células se realizó cada 24h mediante exclusión de tripano azul. B) Se cultivaron células A549 hasta completar la confluencia. Las células confluentes se cultivaron en medio de suero libre durante 96h y se contaron cada 24 horas. C) Las células A549 del ensayo de cicatrización de heridas con  $TNF\alpha$  (20ng/ml) y/o Arac (1μM) se trataron con BrdU (1μM). El ADN extraído de las células (100, 50 y 25ng) se transfirieron por Dot Blot a la membrana de nitrocelulosa y se revelaron con un anticuerpo específico anti-BrdU. Se usaron células que crecían en medios complementados completos como control. D) Expresión relativa de miR-7a/miR-32/miR-330 vs U6 por qPCR en la monocapa de la herida de células A549 después de 72h tratadas con  $TNF\alpha$ . E) Ensayo de migración en transwell de células A549 tratadas con  $TNF\alpha$  (20ng/ml) en medio sin suplementar durante 16h. Imágenes representativas de células migradas. Ampliación 60x (panel superior). Cuantificación del número de células migradas (panel inferior). Los resultados representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA de dos vías \*\*\*  $p < 0,001$  \*  $p < 0,05$  vs control. t Student test \*  $p < 0,05$ .

Para confirmar que  $TNF\alpha$  no induce proliferación celular en el ensayo de cierre de la herida, las células se trataron con BrdU durante una hora antes de ser cosechadas a las 72h. Se extrajo el ADN genómico y se transfirió a una membrana para Dot Blot, la cual se reveló con un anticuerpo específico contra BrdU. Como se esperaba, la

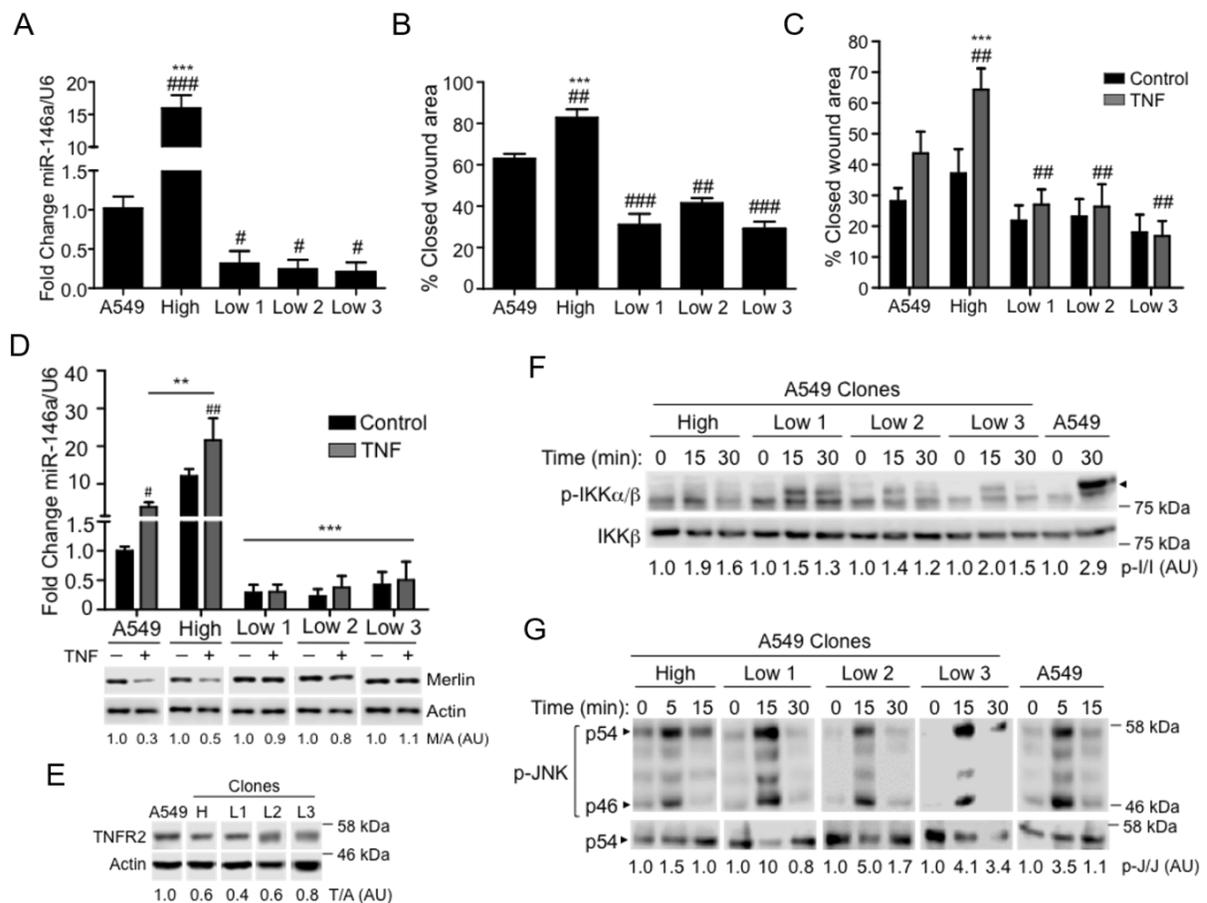
incorporación de BrdU en células cultivadas en presencia de suero fue inhibida por Ara-c (Fig 6C) y en células cultivadas sin suero la incorporación disminuyó aun en ausencia de Ara-c. No observamos diferencias en la incorporación de BrdU entre las células tratadas con  $TNF\alpha$  y las tratadas con  $TNF\alpha$  y Ara-c (Fig.6C). Esto confirma que el  $TNF\alpha$  promueve el cerrado de la herida a través de inducir migración y no proliferación celular.

De acuerdo con esto, también observamos que en presencia de  $TNF\alpha$ , las células cultivadas en transwell migraron significativamente más que las condiciones control (Fig. 6D). Estos resultados indican que  $TNF\alpha$  aumenta la capacidad de migración de células A549.

***El miR-146a media el efecto positivo de  $TNF\alpha$  sobre la migración celular.***

Considerando que  $TNF\alpha$  promueve la migración de células A549 e induce la sobre-expresión de miR-146a y la inhibición de Merlín en estas células, evaluamos si el miR-146a media el efecto positivo de  $TNF\alpha$  sobre la migración celular. Para esto, seleccionamos clonas, derivadas de la línea A549, con niveles de miR-146a endógenos incrementados (miR-146<sup>high</sup>) o reducidos (miR-146<sup>low</sup>) en comparación con los niveles encontrados en la línea parental A549 (Fig. 7A). En estas clonas evaluamos la capacidad de cierre de herida en la monocapa en condiciones normales de cultivo, con medio suplementado y observamos que las clonas de A549 con miR-146<sup>low</sup> presentan menor capacidad de cierre de la herida en comparación con la clona miR-146<sup>high</sup> (Fig.7B).

Las clonas miR-146<sup>low</sup> no lograron cerrar el área de la herida después de 72h de tratamiento con  $TNF\alpha$  mientras que la clona miR-146<sup>high</sup> cerró el 49% de la herida (Fig. 7C). La incapacidad de las clonas miR-146<sup>low</sup> para cerrar el área herida en respuesta al  $TNF\alpha$  está asociada con una nula inducción de miR-146A (Fig, 7D, panel superior) lo que conlleva a que no disminuyan los niveles de Merlín (Fig 7D, panel inferior). Mientras que la clona miR-146<sup>high</sup> en respuesta a  $TNF\alpha$  aumentó ligeramente los niveles de este miRNA (Fig, 7D, panel superior) y redujo los niveles de proteína Merlín (Fig. 7D, panel inferior).



**Figura 7. El cierre de herida depende del aumento de miR-146a y la inhibición de Merlín.** A) Niveles de expresión de miR-146a en cuatro clones derivadas células A549 en cultivo y la línea parental. La expresión relativa de miR-146a vs U6 se determinó mediante qPCR. B) Cuantificación del porcentaje del área de la herida cerrada por las cuatro clones cultivadas en medio completo durante 48h. C) Cuantificación del porcentaje del área de la herida cerrada de cuatro clones diferentes tratados con TNF $\alpha$  (20ng/ml) en medio sin suplementar durante 72h. D) Niveles de expresión de miR-146a de las cuatro clones al final del ensayo de cierre de la herida: tratadas con TNF $\alpha$  (20ng/ml) en medio sin suplementar durante 72h. La expresión relativa de miR-146a vs U6 se determinó mediante qPCR. Se determinaron mediante Western Blot los niveles de proteína de Merlín al final del ensayo de cicatrización de la herida. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. E) Las células A549 parentales y las clones miR-146<sup>high</sup> y miR-146<sup>low</sup> se estimularon con TNF $\alpha$  (20ng/ml) en medio sin suplementar durante 15 y 30 min. Las células se cosecharon y se determinaron mediante Western Blot los niveles de TNFR2, F) p-IKK, IKK G) p-JNK, JNK con anticuerpos específicos. Se utilizó actina como control de carga. Los resultados representan la media y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Two Way ANOVA de dos vías \*\*\* p < 0,001, \* p < 0,05 vs High+TNF $\alpha$ .

Para descartar que las diferencias en la inducción de miR-146a y la capacidad de cierre de la herida en respuesta al tratamiento con TNF $\alpha$  se deban a diferencias en las vías de señalización de TNF $\alpha$  entre las clones miR-146<sup>high</sup> y miR-146<sup>low</sup> evaluamos los niveles del receptor de TNF $\alpha$  y la activación de IKK en respuesta a TNF $\alpha$ . Todas las clones A549 presentaron niveles similares de TNFR2, y respondieron a la exposición a TNF $\alpha$  induciendo la fosforilación de IKK (Fig. 7E). En conjunto, estos resultados indican que los niveles de miR-146a son críticos para promover la motilidad

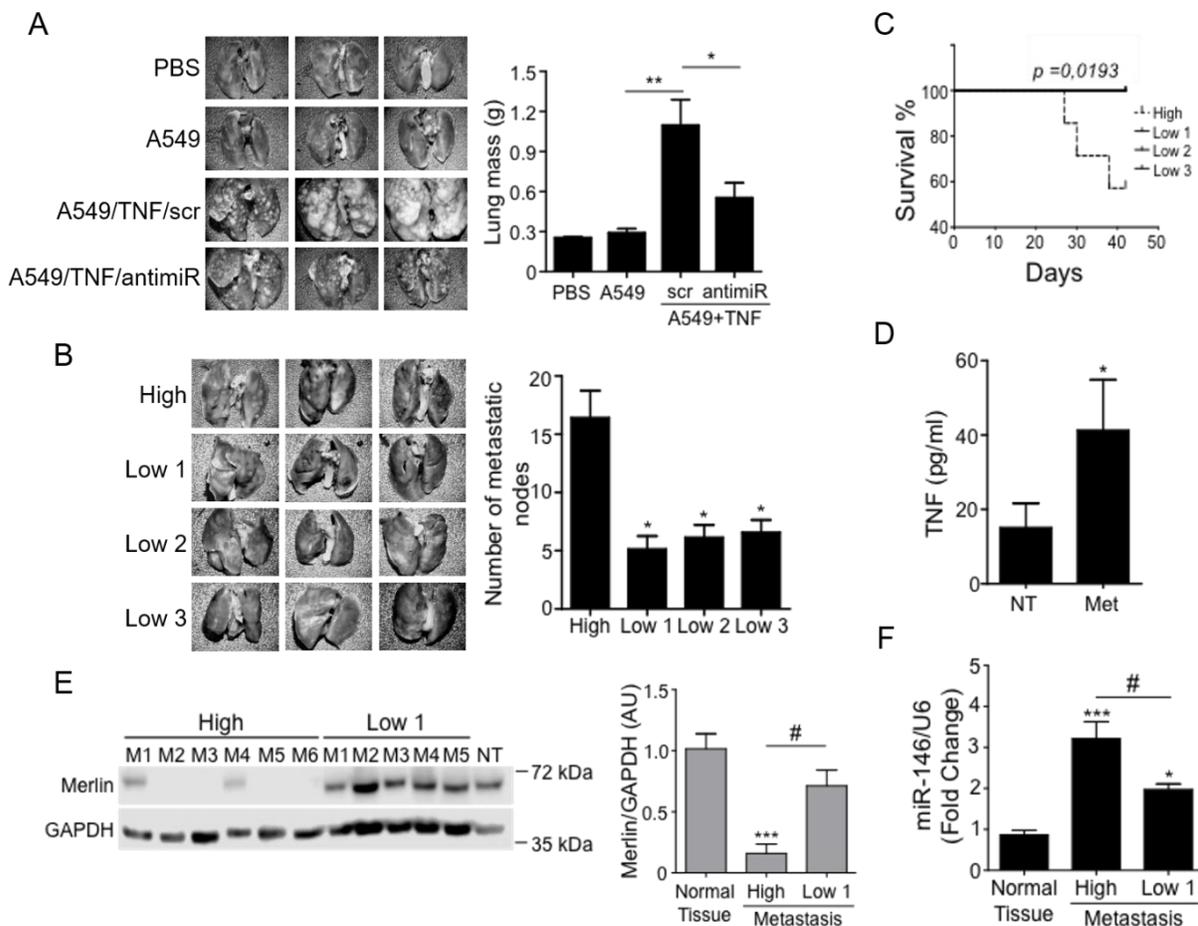
celular A549 y que  $TNF\alpha$  promueve la migración celular a través del aumento de miR-146a y la inhibición de la expresión de Merlín.

### **TNF $\alpha$ promueve la capacidad metastásica de las células A549 a través de inducir la expresión de miR-146a y la inhibición de Merlín**

Considerando que  $TNF\alpha$  induce la expresión de miR-146a y este inhibe la expresión de Merlín en las células A549, promoviendo la progresión tumoral y la metástasis de estas células (Balkwill et al., 2006; Ham et al., 2016; Hong et al., 2016), evaluamos si los efectos pro-metastásicos de  $TNF\alpha$  dependen del incremento de miR-146a y la regulación negativa de los niveles proteicos de Merlín. Las células A549 transfectadas con un oligonucleótido de ARN anti-miRcontrol o antimir-146a y tratadas con  $TNF\alpha$  durante 24h, se inocularon en la vena de la cola de ratones inmunodeficientes NSG. Los ratones inoculados con línea celular A549 sin tratamiento se consideraron el grupo de control. Ocho semanas después de la inoculación, observamos que  $TNF\alpha$  aumentó la capacidad metastásica de las células A549 en comparación con las células no tratadas (Fig. 8A, panel izquierdo). Dado que las metástasis formadas fueron incontables y muchas estaban fusionadas entre sí, se determinó la masa pulmonar para determinar la contribución en peso de la metástasis a la masa de tejido pulmonar sano. Los pulmones sin metástasis de los ratones no tratados se utilizaron como control. Los pulmones de los ratones inoculados con células A549 transfectadas con el anti-miRcontrol y tratados con  $TNF\alpha$  mostró un aumento significativo de la masa pulmonar aportado por las metástasis comparado con los ratones inoculados con células no tratadas y el grupo control (Fig. 8A, panel derecho). Mientras que los pulmones de los animales inoculados con las células A549 transfectadas con el antimir-146a y tratadas con  $TNF\alpha$  presentaron una masa menor que los animales que recibieron células A549 expuestas a  $TNF\alpha$  solamente o a las tratadas con  $TNF\alpha$  pero transfectadas con el oligonucleótido control (Fig. 8A panel derecho). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el miR-146a media el efecto del  $TNF\alpha$  para promover el potencial metastásico de las células A549.

Para confirmar que la metástasis inducida por  $TNF\alpha$  implica al miR-146a, se inocularon clones de A549 con diferentes niveles de miR-146a (miR-146<sup>high</sup> y miR-146<sup>low</sup>) en ratones inmunodeficientes. Después de 6 semanas, los ratones que

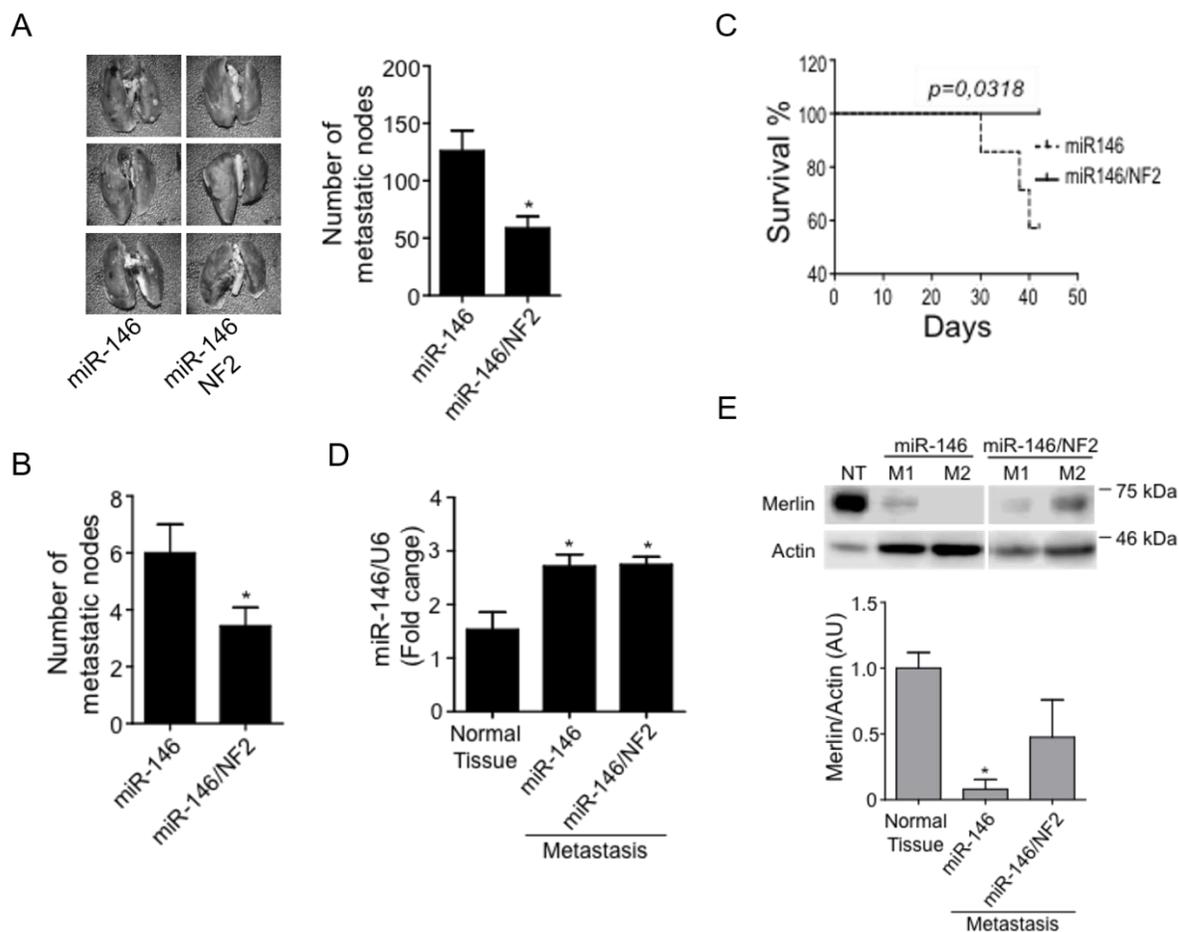
recibieron la clona miR-146<sup>high</sup> presentaron significativamente más nódulos metastásicos en varios órganos viscerales que los ratones inoculados con las clonas miR-146<sup>low</sup> (Fig. 8B). De acuerdo con esto, los ratones NSG inoculados con las clonas miR-146<sup>low</sup> mostraron una mejor supervivencia que los ratones inoculados miR-146<sup>high</sup> (Fig. 8C). Estos resultados indican que los altos niveles de miR-146a favorecen las propiedades metastásicas de las células A549. También observamos que los niveles de miR-146a en los nódulos metastásicos se encontraron aumentados significativamente en comparación con los niveles de miR-146a encontrados en los tejidos normales adyacentes (Fig. 8F). En consecuencia, las metástasis formadas que presentaron niveles elevados de miR-146a presentaron niveles proteicos de Merlin disminuidos significativamente, en comparación con los tejidos normales adyacentes (Fig. 8E panel derecho).



**Figura 8. Los bajos niveles de miR-146a en las clonas reduce la formación de metástasis en ratones inmunodeficientes.** (A) Las células A549 se transfectaron con antimiRcontrol o antimiR-146a (40 nM) 24h y luego se trataron con TNF $\alpha$  (5ng/ml) durante 24h. Se utilizaron células A549 no tratados con TNF $\alpha$  como control. En todos los casos se inocularon 10<sup>6</sup> células en la vena lateral de la cola de ratones inmunocomprometidos (NSG). Ocho semanas post-inoculación se disectaron y se pesaron los

pulmones. Se muestra el panel derecho el peso promedio de los pulmones por grupo (n=6). (B)  $10^6$  células de las clonas miR-146<sup>high</sup> y miR-146<sup>low</sup> se inyectaron en la vena lateral de la cola de ratones inmunocomprometidos. Seis semanas después de la inoculación se contaron los nódulos metastásicos formados en diferentes órganos. Se muestra el panel derecho el promedio de nódulos metastásicos en pulmones por grupo (n=11). (C) El análisis de supervivencia de ratones inoculados con clonas miR-146<sup>high</sup> y miR-146<sup>low</sup> los 42 días en que se finalizó el experimento: (n=11) ratones por grupo. Prueba de log-rank (Mantel-Cox)  $p = 0.0565$ . (D) Las metástasis intestinales formadas por los miR-146<sup>high</sup> y miR-146<sup>low</sup> y los fragmentos de tejidos adyacentes se explantaron en una placa de 24 pozos con medio RPMI sin suplementar. Los medios condicionados por los explantes se recogieron después de 24h. Se determinaron los niveles de TNF $\alpha$  de ratón mediante ensayos de ELISA específicos. Los resultados representan la media y la desviación estándar de 2 experimentos independientes. (E) Los niveles de proteína relativa de Merlín contra GAPDH se determinaron por Western Blot en varios nódulos metastásicos formados por las diferentes clonas, High y Low1. Se utilizó tejido normal adyacente a los nódulos como control. Se muestra una imagen representativa del Blot (panel izquierdo). Análisis por densitometría de la intensidad de las bandas de proteína Merlín respecto actina (panel de la derecha). (F) Niveles de expresión relativos de miR-146a vs U6 se determinó por qPCR en varios nódulos metastásicos formados por las diferentes clonas: High y Low1. Se utilizó tejido normal adyacente a los nódulos como control de expresión basal. One-way ANOVA, Bonferroni posttests \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$  vs control. t-Student test \*  $p < 0.05$  vs control.

De acuerdo con los datos que indican que un ambiente inflamatorio promueve la capacidad metastásica y que Merlín ha mostrado efectos anti-inflamatorios (Takahashi, Haga, and Tanihara 2015) la cuantificación de TNF $\alpha$  en explantes intestinales a partir de nódulos metastásicos provenientes de ratones inoculados con las clonas miR-146<sup>high</sup> y miR-146<sup>low</sup>, reveló que los explantes del nódulo metastásico intestinal liberaron significativamente más TNF $\alpha$  que los tejidos normales adyacentes (Fig. 8D), nuevamente los niveles aumentados de TNF $\alpha$ , coinciden con los niveles aumentados de miR-146a (Fig. 8F) y niveles disminuidos de Merlín (Fig. 8E) en los nódulos metastásicos. Estos resultados en conjunto indican que los altos niveles de miR-146a favorecen las capacidades metastásicas de las células A549 y sugieren que los niveles de miR-146a pueden ser inducidos *in vivo* por los altos niveles de TNF $\alpha$  asociados a los nódulos metastásicos. Para demostrar que el potencial metastásico de miR-146a implica la regulación negativa de Merlín, se utilizaron dos clonas estables de A549 que sobre-expresan miR-146a y fueron generadas previamente (Pérez-García et al. 2015). La clona estable miR-146a sobre-expresa y presenta bajos niveles de Merlín, mientras que la clona miR-146a/NF2 sobre-expresa a miR-146 junto con una variante de NF2 con un región 3'UTR resistente a la regulación negativa por miR-146a, miR-7a, miR-32 y miR-330, por lo que aun cuando presenta altos niveles de miR-146a también sobre-expresa la proteína de Merlín (Pérez-García et al. 2015).



**Figura 9. La inhibición de Merlín mediada por miR-146a promueve la metástasis en ratones inmunodeficientes.** (A)  $10^6$  células de dos clonas estables que sobreexpresan miR-146a y/ o NF2 (miR-146a y miR-146a/ NF2 se inyectaron en la vena lateral de la cola de ratones inmunocomprometidos NSG. Seis semanas después de la inoculación se contaron los nódulos metastásicos formados en diferentes órganos. Se muestra el panel derecho el promedio de nódulos metastásicos en pulmones por grupo (n=8). (B)  $10^6$  células de dos clonas estables que sobreexpresan miR-146a y/ o NF2 (miR-146a y miR-146a/ NF2) se inyectaron en la vena lateral de la cola de ratones inmunocomprometidos *nu/nu* (n=3). Seis semanas después de la inoculación se contaron todos los nódulos metastásicos formados en diferentes órganos. (C) Análisis de supervivencia de ratones inoculados con clonas que sobreexpresan miR-146a y miR-146a/ NF2 los 42 días en que se finalizó el experimento: (n=11) ratones por grupo. Prueba de log-rank (Mantel-Cox)  $p = 0.0318$ . (D) Niveles de expresión relativos de miR-146a vs U6 se determinó por qPCR en varios nódulos metastásicos formados por las diferentes clonas. Se utilizó tejido normal adyacente a los nódulos como control de expresión basal. (E) Los niveles de proteína relativa de merlín contra actina se determinaron por Western Blot en varios nódulos metastásicos formados por las diferentes clonas. Se utilizó tejido normal adyacente a los nódulos como control. Se muestra una imagen representativa del Blot (panel de arriba). Análisis por densitometría de la intensidad de las bandas de proteína Merlín respecto actina (panel de abajo). Los resultados representan la media y la desviación estándar de 2 experimentos independientes. t Student's test \*  $p < 0,05$  contra clona miR-146a. One way ANOVA \*\*\*  $p < 0,001$  \*  $p < 0,05$  contra tejido normal.

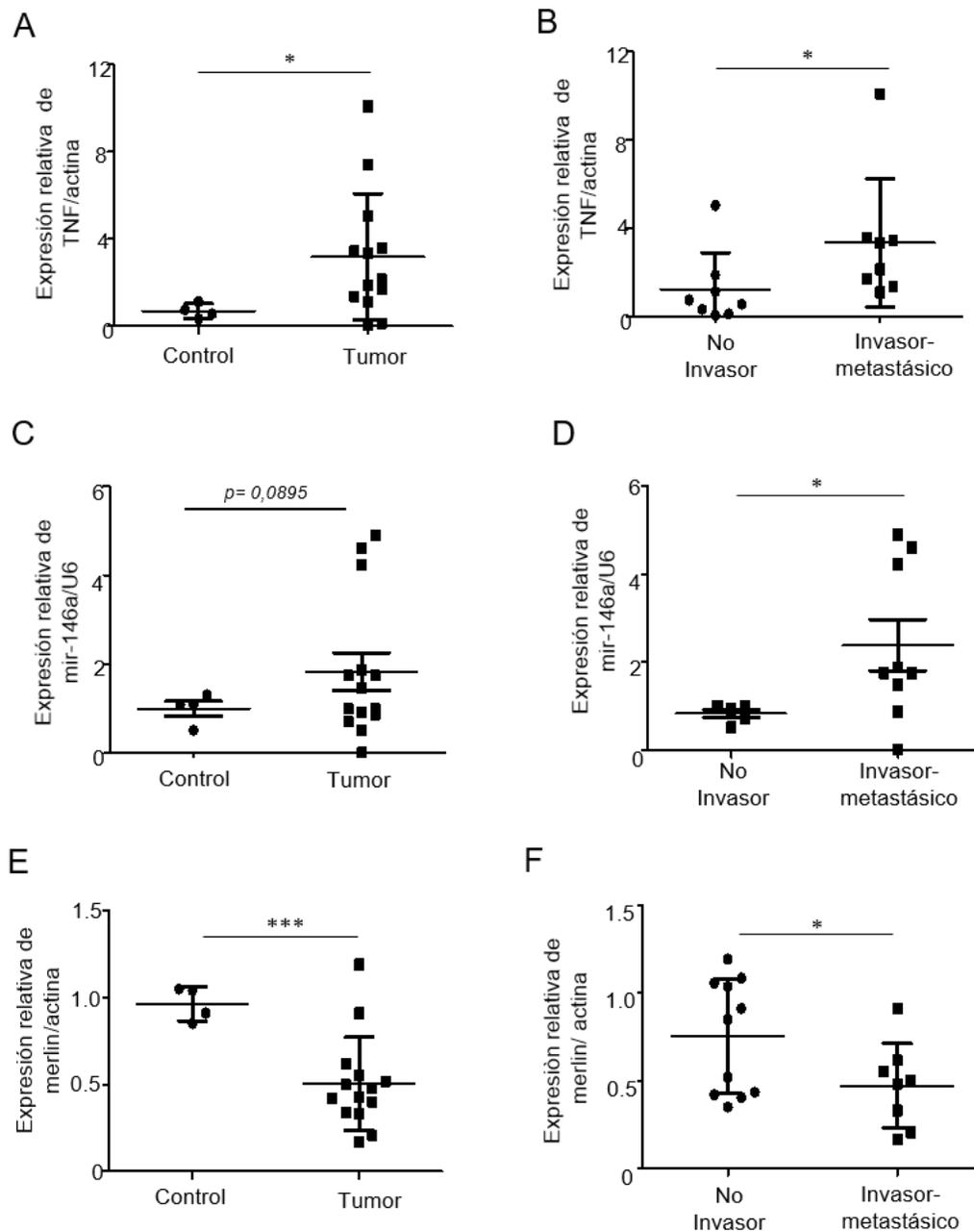
Las clonas estables miR-146a y miR-146a/NF2 se inocularon en ratones inmunodeficientes para evaluar el efecto de la expresión de merlín en la capacidad metastásica de las células. Observamos que impedir el efecto negativo de miR-146a sobre los niveles proteicos de Merlín disminuyó significativamente el número de metástasis en comparación con las células que sobreexpresan miR-146a solamente (Fig. 9A y 9B). De acuerdo con esto, los ratones NSG inoculados con la clona estable miR-146a mostraron menor supervivencia en comparación con el grupo que recibió las

células miR-146a+NF2 (Fig. 9C).

Como se esperaba, la metástasis derivadas de ambas clonas estables miR-146a y miR-146a+NF2, presentan significativamente aumentados los niveles de miR-146a en comparación con los de tejidos normales adyacentes (Fig.9D) reafirmando la relevancia de este miRNA para la formación de la metástasis. Curiosamente, los niveles de proteína Merlín se redujeron significativamente en los nódulos metastásicos derivados de clonas estables miR-146a y no así en los derivados de la clona miR-146a/NF2 en comparación con los niveles de proteína Merlín encontrados en tejido normal (Fig.9E), lo que reafirma que la inhibición de Merlín mediada por miR-146 promueve la formación de metástasis. Estos resultados indican que el  $TNF\alpha$  promueve la capacidad metastásica de las células A549 de manera dependiente de miR-146a a través de la inhibición de los niveles de proteína de Merlín.

#### **El aumento de miR-146a por $TNF\alpha$ se correlaciona con la inhibición de la proteína Merlín en pacientes con cáncer de pulmón.**

Considerando los resultados presentados anteriormente donde observamos que  $TNF\alpha$  promueve la capacidad metastásica de las células A549 *in vivo* de manera dependiente de miR-146a mediante la inhibición de las funciones supresoras de la proteína Merlín y teniendo en cuenta que se ha reportado que: i) los niveles de  $TNF\alpha$  aumentan en varios tipos de tumores, como el melanoma, cáncer de próstata y mama (Ham et al., 2016); ii) que los niveles de miR-146a también están regulados positivamente en varios tumores, como melanoma, cáncer gástrico y de mama (Forloni et al. 2014; Sandhu et al. 2014; Xiao et al. 2012); iii) que la señalización de  $TNF\alpha$  induce el aumento de miR-146a (Xiang et al. 2014); y iv) que miR-146a regula negativamente los niveles proteicos de Merlín (Pérez-García et al. 2015) evaluamos si en el tumor pulmonar humano existe una relación inversa entre los niveles de  $TNF\alpha$  y miR-146a con los niveles de proteína Merlín.

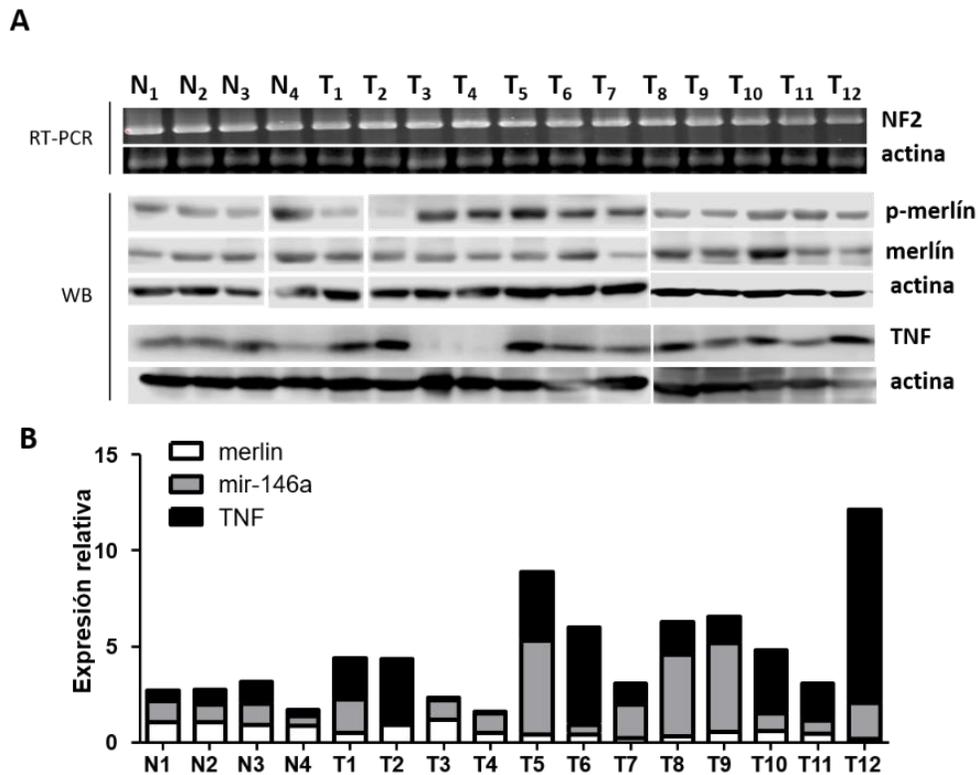


**Figura 10. El aumento de  $TNF\alpha$  y miR-146a coinciden con la disminución de Merlín en biopsias de pacientes.** A) Los niveles de proteína de  $TNF\alpha$  contra actina se determinaron mediante Western Blot para muestras no tumorales y tumorales. B) Los niveles de proteína de  $TNF$  contra actina se determinaron mediante Western Blot para muestras tumorales agrupadas por características histopatológicas: tumor no invasor e invasor / metastásico. C) Los niveles de expresión relativos de miR-146a contra U6 se determinaron mediante qPCR para muestras no tumorales y tumorales. t Prueba de los estudiantes  $p = 0.0895$ . D) Niveles de expresión relativos de miR-146a para tumores no invasores e invasores / metastásicos. E) Niveles de proteína de Merlín contra actina determinados por Western Blot para muestras no tumorales y tumorales. F) Niveles de expresión relativos de la proteína Merlín para tumores no invasores e invasores / metastásicos. Los resultados representan la media y la desviación estándar para cada grupo. Los datos tumorales se normalizaron frente a las muestras no tumorales. t Prueba de estudiante \*\*\*  $p < 0,001$  \*  $p < 0,05$ .

Para esto, se procesaron 16 biopsias de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma o carcinoma de pulmón, cuyos datos histopatológicos se muestran

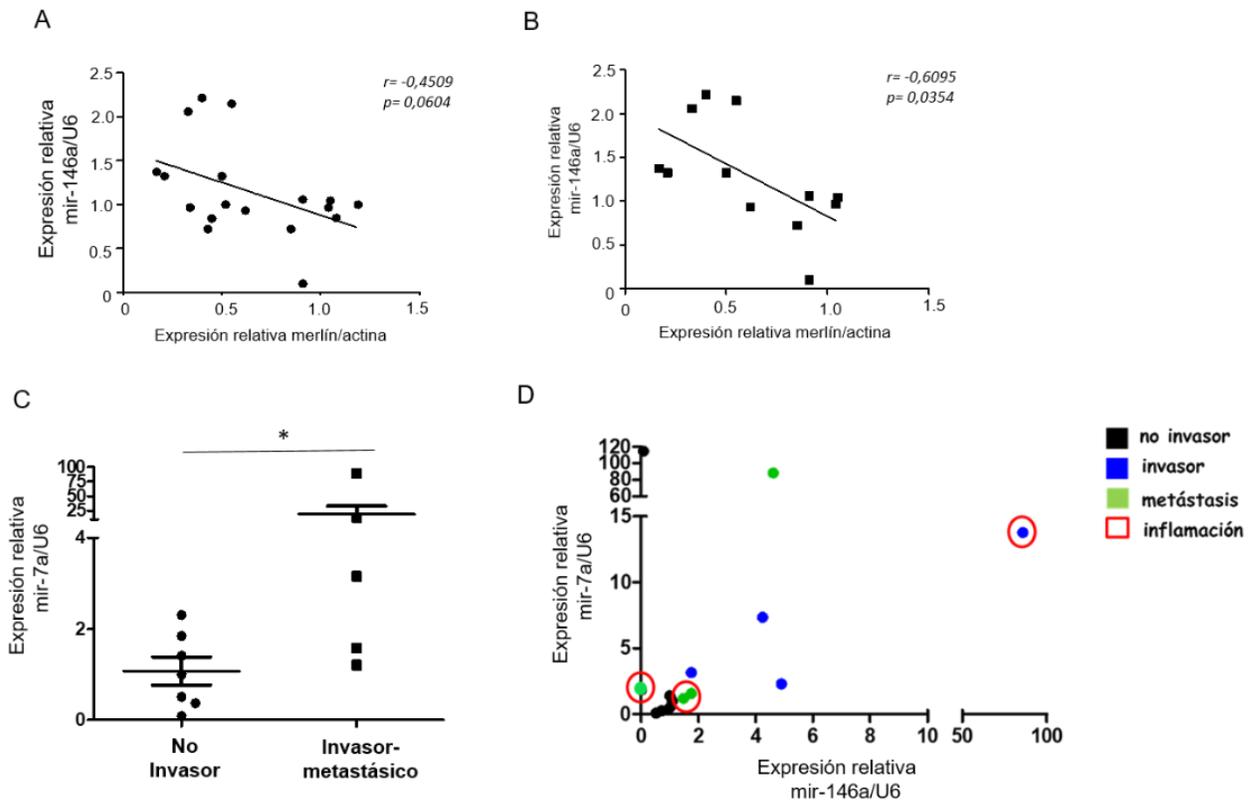
en la tabla 1 de la sesión de ANEXO II. A partir de las 16 biopsias de pacientes se aisló tanto ARN como proteínas. Como controles se utilizaron biopsias de tejido no tumoral adyacente tomada en algunos pacientes. De acuerdo con lo reportado en estudios previos (Ham et al., 2016), observamos que los niveles de proteicos de  $TNF\alpha$  aumentaron significativamente en muestras clínicas de tumores en relación con sus tejidos pulmonares adyacentes no cancerosos (Fig. 10A y B), sin embargo, esto no correlacionó con los niveles de miR-146a ya que no se encontraron diferencias en los niveles de miR-146a entre muestras tumorales y tejidos no tumorales (Fig. 10C). No obstante, cuando analizamos los datos teniendo en cuenta la característica patológica del tumor pulmonar primario, como tumor no invasor versus invasor o metastásico, los niveles de  $TNF\alpha$  y miR-146a aumentaron significativamente en la muestra pro-metastásica (Fig. 10B y 10D). De acuerdo con esto, observamos una disminución significativa de los niveles de proteína Merlín al comparar tejido no tumoral versus tumor o al comparar muestras no invasivas versus invasivas-metastásicas (Fig. 10E y 10F). Estos resultados confirman que en tumores de pulmón humanos existe una relación inversa entre altos niveles de  $TNF\alpha$  y el aumento de miR-146a con la disminución de los niveles de Merlín. Lo cual sugiere una relevancia biológica de la vía  $TNF\alpha$ / miR-146a/Merlín en la progresión de cáncer de pulmón.

Se descartó la posibilidad de que los niveles reducidos de proteína Merlín observados en tumores de pulmón resultaran de la represión transcripcional del gen NF2 (Wang y otros, 2016), ya que las biopsias no tumorales y tumorales mostraron niveles similares del ARNm de NF2 (Fig. 11A panel de arriba). Además, la proteína residual de Merlín observada en muestras tumorales se encontró inactiva por fosforilación en el residuo S508 (Fig. 11A, panel central). También observamos que los tumores con niveles bajos de proteína Merlín presentaban altos niveles de  $TNF\alpha$  y miR-146a (Fig. 11A y B). En conjunto, estos resultados indican que la regulación positiva de miR-146a por el  $TNF\alpha$  en adenocarcinoma de pulmón promueve la inhibición de la proteína Merlín.



**Figura 11. Expresión de ARNm de NF2, proteína de Merlín, TNF $\alpha$  y miR-146a en biopsias de cáncer de pulmón.** A) Se extrajo ARN total de biopsias de pacientes con cáncer de pulmón y se realizó RT-PCR para un fragmento de codificante del gen NF2. Biopsias no tumorales (N) y tumorales (T). El gen de actina se utilizó como control de amplificación (panel superior). Los niveles de fosforilación de la proteína Merlín, los niveles totales de Merlín y TNF $\alpha$  de las muestras de tumores se determinaron mediante Western Blot. La proteína actina se utilizó como control de carga (panel inferior). B) Se graficaron juntos los datos obtenidos de niveles de proteína relativos de Merlín/actina, TNF $\alpha$  /actina y los niveles de expresión relativos de miR-146a / U6 para cada biopsia de tumor.

Cuando analizamos los niveles de miR-146a en relación con los niveles relativos de proteína Merlín en los todos los tumores (adenocarcinoma y carcinoma) encontramos que existe una correlación negativa entre el aumento de miR-146a y la reducción de la expresión de Merlín en muestras de cáncer de pulmón (Fig.12A). Mientras que cuando analizamos la relación miR-146a/Merlín en los adenocarcinomas, encontramos una correlación fuerte y significativa entre el aumento de los niveles de miR-146a y la disminución de la proteína Merlín en estas muestras (Fig. 12B). Estos resultados sugieren que los niveles de ambas moléculas en las biopsias de adenocarcinoma de pulmón podrían ser útiles como marcadores de progresión tumoral.



**Figura 12.** El aumento de miR-146a se correlaciona con la disminución de Merlín y el aumento de miR-7 en el adenocarcinoma de pulmón humano. G) Análisis de correlación entre la expresión de miR-146a y los niveles de proteína Merlín para todas las muestras de cáncer de pulmón. H) Análisis de correlación entre la expresión de miR-146a y los niveles de proteína Merlín para muestras de adenocarcinoma de pulmón.

También evaluamos los niveles de miR-7 en las biopsias de pacientes, dado que este miRNA también es inducido por  $TNF\alpha$  y tiene como blanco a Merlín. De acuerdo a lo que esperábamos, observamos que miR-7 está incrementado significativamente en los tumores invasores o metastásicos (Fig.12C). También observamos que existe una correlación positiva entre los niveles sobre-expresados de miR-146a y miR-7a en muestras de adenocarcinoma de pulmón (Fig.12D) lo cual sugiere que ambas moléculas podrían ser marcadores de progresión tumoral de adenocarcinoma de pulmón.

## Discusión

La actividad supresora de tumores de la proteína Merlín ha sido ampliamente documentada desde que se observó que las mutaciones asociadas al gen *NF2* son responsables de la formación de schwannomas y meningiomas (Trafatter et al. 1993). Además, la inactivación bialélica del gen *NF2* también ha sido encontrada en mesotelioma maligno (Bianchi and Mitsunaga 1995; Yoshitaka Sekido et al. 1995), y se han encontrado mutaciones de este gen en tumores de diferentes órganos como en cáncer de mama, próstata, hígado, riñón y páncreas (W. Li et al. 2012; Petrilli 2016). Estos antecedentes evidencian el importante papel del gen *NF2* y la proteína que codifica en el control del desarrollo de varias enfermedades malignas.

Diferentes evidencias experimentales, generadas en los últimos 15 años, indican que las mutaciones genéticas en el gen *NF2* no son el único mecanismo que afecta las funciones supresoras de tumores de Merlín. A nivel transcripcional, se ha reportado que la hipermetilación del promotor del gen *NF2* conduce a la reducción de la proteína Merlín y por tanto se favorece el desarrollo de cáncer (B. Wang et al. 2016). Adicionalmente, las modificaciones postraduccionales también conducen a la inactivación de esta proteína. La fosforilación de Merlín en la serina 518, mediada por las proteínas cinasas PAK (K. Ye 2007) y PKA (Laulajainen et al. 2008), que se sobreactivan en diferentes tipos de cáncer (Sapio et al. 2014; D. Z. Ye and Field 2012), afecta la función inhibitoria de Merlín sobre el crecimiento y la motilidad celular (Yoon et al. 2011). Por otra parte, la cinasa AKT fosforila a Merlín en la treonina 230 y en la serina 315 la cual conduce a la degradación dependiente de ubiquitinación (Rong et al. 2004). En cambio, la sumoilación de Merlín es requerida para las funciones supresoras de tumores de esta proteína (Qi et al. 2014).

La regulación de Merlín a nivel postranscripcional también afecta sus funciones supresoras de tumores. El corte y empalme alternativo del ARNm-*NF2* modula la localización subcelular de la proteína (Schmucker, Tang, and Kressel 1999). También se ha reportado que una variante de splicing de Merlín que carece de los exones 2, 3 y 4 se amplifica en hepatocarcinoma celular. Esta variante trunca de Merlín interfiere con la capacidad de Merlín para unir  $\beta$ -catenina y ERM. De esta forma la variante

trunca de Merlín incrementan los niveles de  $\beta$ -catenina y promueve la migración celular *in vitro* y la formación de metástasis pulmonares *in vivo* (Z. L. Luo et al. 2015). Además, trabajos previos de nuestro grupo demostraron que la traducción del ARNm de Merlín puede ser regulada negativamente por miRNAs; entre los que están miR-146a, miR-7, miR-32 y miR-25. Así, la reducción de los niveles de la proteína Merlín, debido a la sobreexpresión del mir-146a favorece la transformación celular (Perez-Garcia et al. 2015). La expresión de miR-146a se ha visto incrementada en diferentes tumores, donde promueve la progresión tumoral y metástasis (Pérez-García et al. 2015; Wenfeng Tan et al. 2018; C. Wu et al. 2014; Xiao et al. 2012). También el miR-7 se ha encontrado sobreexpresado en cáncer gástrico y cáncer de pulmón (Chou et al. 2010; Meza-Sosa, Pérez-García, et al. 2014; X. Di Zhao et al. 2015). Adicionalmente, se ha reportado que el aumento de miR-32 (Xia et al. 2017; Yan et al. 2015) y miR-330 (Mesci et al. 2017; Qu et al. 2012; Yao et al. 2014) también promueve la progresión del cáncer. Dado que estos miRNAs regulan negativamente los niveles de Merlín y se encuentran sobreexpresados en diferentes tipos de tumores, nos preguntamos qué señales del ambiente tumoral podrían inducir el aumento de estos miRNAs y por tanto favorecer la progresión del cáncer de pulmón.

En los últimos años se ha evidenciado que un ambiente inflamatorio promueve el desarrollo de cáncer (Hoesel and Schmid 2013; O'Callaghan et al. 2010; Porta et al. 2009). De las citocinas inflamatorias encontradas comúnmente en el microambiente tumoral, el papel de  $TNF\alpha$  en la promoción del cáncer y el proceso de metástasis ha sido ampliamente reportado (Drane et al. 2002; Ham, Fernandez, D'Costa, et al. 2016; S. Kim et al. 2004), pero los mecanismos mediante los cuales  $TNF\alpha$  promueve la progresión del cáncer continúan en estudio (Reddy 2018; Sheng, Li, and Qin 2018). En el suero de pacientes con cáncer de pulmón se han detectado incrementados los niveles de esta citoquina proinflamatoria (Aydin et al. 2012; Michalaki et al. 2004). De acuerdo con esto, en este estudio mostramos que el  $TNF\alpha$  promueve la progresión tumoral y la metástasis en el cáncer de pulmón a través de incrementar los niveles de expresión del miR-146a, el cual inhibe la traducción del ARNm de NF2 y reduce los niveles de Merlín. Nuestros resultados experimentales y los datos clínicos obtenidos, reafirman el papel del Merlín como supresor de la carcinogénesis y el proceso de

metástasis.

En este estudio demostramos que  $TNF\alpha$  induce la expresión de los miR-146a, miR-7, miR-32 y miR-330 en células A549. La regulación de la expresión de miR-146a y miR-7 en respuesta a  $TNF\alpha$  ya había sido reportada previamente y se ha propuesto que es regulada por el factor transcripcional NF $\kappa$ B ya que estos miRNAs presentan sitios de unión para NF $\kappa$ B en la secuencia de sus promotores (K. D. et al Taganov 2006; X. Di Zhao et al. 2015). Mientras que en el caso de miR-32 y miR-330 es la primera vez que se demuestra que su expresión es regulada por la señalización de  $TNF\alpha$ , la que podría estar mediada por ATF1 y HDGF, respectivamente (Adiseshaiah, Kalvakolanu, and Reddy 2006; Yoon et al. 2011).

Dado que la expresión de miR-146a, miR-7, miR-32 y miR-330 está asociada a la señalización de  $TNF\alpha$ , y que el aumento de estos miRNAs promueve la progresión del cáncer (Mesci et al. 2017; Perez-Garcia et al. 2015; Xia et al. 2017; J. Zhao et al. 2015), es posible que los efectos pro-tumorigénicos de  $TNF\alpha$  estén mediados en parte por la regulación positiva de la expresión de estos miRNAs. Por lo que nos preguntamos si las señales inflamatorias, como el  $TNF\alpha$ , podrían promover la metástasis inhibiendo la función supresora de tumores de Merlín, favoreciendo el aumento de miRNAs específicos para la región 3'UTR de NF2 y si esto es relevante para la progresión del cáncer de pulmón.

De acuerdo con esta idea, nuestros datos indican que el  $TNF\alpha$  induce la migración de las células A549 del cáncer de pulmón en ausencia de señales mitogénicas, acorde con lo que se ha reportado sobre el papel de  $TNF\alpha$  en la promoción de metástasis (Ham, Fernandez, D'Costa, et al. 2016); y que la migración inducida por  $TNF\alpha$  es en parte mediada por la regulación negativa de los niveles de Merlín, al inducir la expresión de miRNAs como miR-146a, miR-32 y miR-330, que se dirigen al 3'UTR del ARNm de NF2. Aquí centramos nuestro estudio en miR-146a, ya que al mutar la secuencia de unión para este miRNA en la región 3'UTR del ARNm de NF2, observamos que este mensajero recupera totalmente su potencialidad de ser traducido. De igual manera, al bloquear las funciones de miR146a con un oligonucleótido antimir-146a se recuperó totalmente la expresión de luciferasa y no

así cuando se utilizó un antimiRNA inespecífico. Lo que confirma que miR146a regula negativamente los niveles de Merlín. En correspondencia con los resultados anteriores, el antimiR-146a evitó la disminución niveles de proteína Merlín como resultado de la señalización de  $TNF\alpha$ . Sin embargo, esto no descarta que exista un efecto cooperativo de miR-7, miR-32 y miR-330 para reducir los niveles de proteína Merlín y por lo tanto, que se favorezca la migración de células A549 en respuesta al  $TNF\alpha$ . No obstante, se requieren experimentos adicionales para determinar el papel específico de cada miRNA inducido por  $TNF\alpha$  en la metástasis de adenocarcinoma de pulmón.

Estudios previos destacan que los niveles de miR-146a aumentan en diferentes tumores primarios y metastásicos, lo que sugiere un papel relevante para este miRNA en la metástasis (Labbaye and Testa 2012; Wenfeng Tan et al. 2018). En correspondencia con lo previamente reportado, nuestros resultados indican que la migración celular inducida por  $TNF\alpha$  en células de adenocarcinoma de pulmón, implica el aumento de miR-146a y la disminución de los niveles de proteína Merlín. Esto se confirmó utilizando clonas de A549 con diferentes niveles de expresión de miR-146a: altos niveles de miR-146a (miR-146a<sup>High</sup>) y bajos niveles de miR-146a (miR-146a<sup>Low</sup>), observamos que las clonas miR-146a<sup>Low</sup> presentan mayores niveles de Merlín que la clona miR-146a<sup>High</sup>, de hecho esta clona presenta niveles de Merlín menores a las células A549 parentales en condiciones normales de cultivo. En correspondencia con esto, las clonas miR-146a<sup>Low</sup> tienen significativamente reducida la capacidad de migración en comparación con las células miR-146a<sup>High</sup>. Estos resultados reafirman el efecto negativo que ejerce la proteína Merlín sobre la motilidad celular (Surace, Haipek, and Gutmann 2004) y la metástasis (Galcheva-Gargova et al. 2008), y son consistentes con nuestros datos que muestran que miR-146a es necesario para la migración de células A549 (Perez-Garcia et al. 2015). También observamos que las células miR-146a<sup>Low</sup>, en las cuales los niveles de miR-146a no aumentan en respuesta a  $TNF\alpha$  y por tanto no se afectan los niveles basales de Merlín, mostraron una menor capacidad migratoria en el ensayo de cierre de herida en la monocapa celular tanto en ausencia como en presencia de  $TNF\alpha$ . La incapacidad para inducir la expresión de miR-146a exposición respuesta a  $TNF\alpha$  en

las clonas miR-146a<sup>Low</sup>, no es debido a alteraciones en la vía de señalización intracelular de TNF $\alpha$ . Ya que cuando analizamos esta vía de señalización observamos que tanto la clona miR-146a<sup>High</sup> como las clonas miR-146a<sup>Low</sup> presentaron los mismos niveles del TNFR2 y activaron la ruta de señalización de NF $\kappa$ B de forma similar cuando se expusieron a TNF $\alpha$ . En conjunto estos resultados indican que el efecto de TNF $\alpha$  sobre la motilidad celular es mediado por el miR146a a través de impedir la traducción del ARN de NF2 y reducir de este modo los niveles de Merlín.

De acuerdo todo lo anterior, también mostramos que las células A549 expuestas al TNF $\alpha$  exhibieron una mayor capacidad metastásica cuando se inocularon en ratones inmunodeficientes. Curiosamente, este efecto resultó en parte, de la actividad de miR-146a ya que el número de nódulos metastásicos derivados de células A549 expuestas a TNF $\alpha$ , en presencia de un oligo anti-miR146a se redujo en comparación con las células expuestas a TNF $\alpha$  y transfectadas con un oligo inespecífico. Congruente con esto, los ratones inmunodeficientes inoculados con células miR-146a<sup>Low</sup> desarrollaron menos metástasis y mejor supervivencia que los ratones que recibieron células miR-146a<sup>High</sup>. Como se esperaba, los nódulos metastásicos contenían niveles más altos de TNF $\alpha$  y miR-146a y niveles reducido de Merlín que los observados en el tejido normal adyacente. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la migración celular y la metástasis inducida por TNF $\alpha$  en las células A549 implican la regulación positiva de los niveles de miR-146a y la regulación negativa de los niveles de proteína Merlín. De acuerdo con esta idea, al rescatar los niveles de proteína de Merlín en células A549 que expresan miR-146a, disminuyó su capacidad metastásica y resultó en una mayor supervivencia de los animales.

El hecho de que los nódulos metastásicos derivados de las células A549 mostraron niveles elevados de TNF $\alpha$ , reafirman que la metástasis está asociada con un entorno inflamatorio, no solo en modelos animales, sino también en muestras clínicas (Ham, Fernandez, D'Costa, et al. 2016) lo que correlaciona con los niveles elevados de TNF $\alpha$  en el suero de pacientes con cáncer (Shang, Liu, and Qin 2017). Nuestros datos, obtenidos de biopsias de pacientes con cáncer de pulmón, señalan que los tumores de pulmón tienen aumentado los niveles de TNF $\alpha$  con respecto al tejido pulmonar

normal. Esto indica que los niveles de  $TNF\alpha$  aumentan aún más en el tumor invasivo en comparación con los tumores de pulmón no invasivos. Curiosamente, el aumento de los niveles de  $TNF\alpha$  en el tumor invasivo correlaciona con el aumento de los niveles de miR-146a. De acuerdo con nuestra hipótesis, los niveles de proteína de Merlín en las biopsias de tumores de pulmón se encontraron reducidos en comparación con los niveles del tejido pulmonar normal, esto es consistente con los niveles reducidos de Merlín en otros tumores, como el cáncer de páncreas y de mama (Couderc et al. 2016; Quan et al. 2015). Además, los niveles de proteína Merlín encontrados en el tumor invasivo o metastásico fueron significativamente más bajos que los encontrados en los tumores no invasivos. En correspondencia, encontramos una correlación negativa entre los altos niveles de miR-146a y los niveles reducidos de proteína de Merlín en todas las muestras de tumor de pulmón analizadas. En particular, esta correlación negativa fue estadísticamente significativa para los casos de adenocarcinoma de pulmón. Curiosamente, en los tumores que mostraron niveles normales de proteína Merlín a pesar del hecho de que también contenían miR-146a, la proteína estaba fosforilada en el residuo S518. La fosforilación en este residuo impide las funciones supresoras de Merlín al inducir un cambio conformacional (Surace, Haipek, and Gutmann 2004). Por lo tanto, indica que en los tumores de pulmón, Merlín también se puede inactivar mediante fosforilación por PAK y PKA. Curiosamente, tanto PAK como PKA se han implicado en metástasis (Rider, Oladimeji, and Diakonova 2013; Sapio et al. 2014) y se activan en respuesta a  $TNF\alpha$  (Frost et al. 2000; Van Herreweghe et al. 2002). Así, nuestros resultados sugieren que las citocinas inflamatorias como el  $TNF\alpha$  promueven la metástasis del cáncer de pulmón al inactivar las funciones supresoras de Merlín postranscripcionalmente, al inducir la expresión de miR-146a y postraduccionalmente activando PAK y PKA.

En resumen, en este estudio confirmamos que Merlín es un importante gen supresor tumoral en el cáncer de pulmón. Identificamos que la ruta  $TNF\alpha$  /miR-146a/Merlín favorece la progresión del cáncer de pulmón. Destacando el papel principal a la señalización del  $TNF\alpha$  en la progresión del cáncer y la metástasis (Balkwill 2006; D. Tang et al. 2017; X.-H. Wang et al. 2015). Nuestro estudio contribuye a comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la activación de la señalización del

TNF $\alpha$  en el contexto del cáncer de pulmón. Finalmente, proponemos la vía TNF $\alpha$  /miR-146a/Merlín como un nuevo blanco terapéutico para inhibir la progresión del adenocarcinoma de pulmón.

## Conclusiones

- La región 3'UTR de Merlín es blanco de mir-146a, mir-7, mir-32 y mir-25.
- La citocina proinflamatoria TNF $\alpha$ , induce el aumento de mir-146a, mir-7, mir-32 y mir-330, mientras que disminuye los niveles de mir-25 en las células A549.
- La citocina proinflamatoria TNF $\alpha$  promueve la migración de las células A549, mediante el aumento de mir-146a, mir-7, mir-32 y mir-330 que tienen como blanco a Merlín.
- El aumento de mir-146 inducido por TNF $\alpha$  incrementa la formación de metástasis de las células A549 en ratones inmunodeficientes.
- En las muestras de adenocarcinomas de pulmón invasor/ metastásico existe una relación directa e inversa entre los altos niveles de TNF $\alpha$  y de mir-146 con la disminución de los niveles proteína de Merlín.

## Perspectivas

- Determinar si la región 3'UTR de Merlín es blanco de miR-330.
- Determinar si otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 inducen el aumento de mir-146a, mir-7, mir-32, mir-25 y mir-330 en las células A549 y si tienen un efecto negativo sobre los niveles de Merlín.
- Determinar si otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 promueven el cierre de la herida en monocapa y la migración de las A549 mediante el aumento de mir-146a, mir-7, mir-32, mir-25 y mir-330 y en correspondencia con la disminución de los niveles de Merlín.
- Evaluar si existe un efecto cooperativo de miR-7, miR-32 y miR-330 disminuyendo los niveles de proteína Merlín y por lo tanto, que se favorezca la migración de células A549 en respuesta IL-1 $\beta$  e IL-6.
- Determinar el papel específico de cada miR-7, miR-32 y miR-330 inducido por TNF $\alpha$  en la metástasis de cáncer de pulmón, generando clonas estables que los sobreexpresen y utilizando oligos inhibidores específicos antimiR-7, antimiR-32 y antimiR-330 en los ensayos formación de metástasis con ratones inmunodeficientes.
- Evaluar en biopsias de cáncer de pulmón los niveles de mir-146a y Merlín en un mayor número de pacientes.
- Evaluar la expresión de miR-7, miR-32 y miR-330 biopsias de cáncer de pulmón y determinar si existe una correlación negativa respecto a los niveles de Merlín

## Referencias Bibliográficas

- Adisheshaiah, Pavan, Dhananjaya V Kalvakolanu, and Sekhar P Reddy. 2006. "A JNK-Independent Signaling Pathway Regulates TNF $\alpha$ -Stimulated, c-Jun-Driven FRA-1 Protooncogene Transcription in Pulmonary Epithelial Cells." *The Journal of Immunology* 177(10): 7193 LP-7202.
- Alcantara, Krizelle Mae M, and Reynaldo L Garcia. 2019. "MicroRNA92a Promotes Cell Proliferation, Migration and Survival by Directly Targeting the Tumor Suppressor Gene NF2 in Colorectal and Lung Cancer Cells." *Oncology reports* 41(4): 2103–16.
- Alfthan, Kaija et al. 2004. "Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylates Merlin at Serine 518 Independently of P21-Activated Kinase and Promotes Merlin-Ezrin Heterodimerization." *The Journal of biological chemistry* 279(18): 18559–66.
- Ambros, V. 2001. "MicroRNAs: Tiny Regulators with Great Potential." *Cell* 107(7): 823–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779458>.
- Apte, Ron N et al. 2006. "The Involvement of IL-1 in Tumorigenesis, Tumor Invasiveness, Metastasis and Tumor-Host Interactions." *Cancer metastasis reviews* 25(3): 387–408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043764> (January 23, 2014).
- Ardekani, Ali M, and Mozghan Moslemi Naeini. 2010. "The Role of MicroRNAs in Human Diseases." *Journal of Medical Biotechnology* 2(4).
- Arora, Shilpi et al. 2011. "MicroRNA-328 Is Associated with (Non-Small) Cell Lung Cancer (NSCLC) Brain Metastasis and Mediates NSCLC Migration." *International Journal of Cancer*.
- Aydin, Yener et al. 2012. "Plasma Levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in Patients with Esophageal Cancer." 42(5): 762–67.
- Bae, Seunghee et al. 2011. "Resveratrol Alters MicroRNA Expression Profiles in A549 Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells." *Molecules and Cells*.
- Balkwill, Frances. 2006. "TNF-Alpha in Promotion and Progression of Cancer." *Cancer metastasis reviews* 25(3): 409–16.
- Bartel, David P. 2004. "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function." *Cell* 116(2): 281–97.
- Bianchi, AB, and SI Mitsunaga. 1995. "High Frequency of Inactivating Mutations in the Neurofibromatosis Type 2 Gene (NF2) in Primary Malignant Mesotheliomas." *Proceedings of the ...* 92(November): 10854–58. <http://www.pnas.org/content/92/24/10854.short> (June 4, 2014).
- Bigatto, Viola et al. 2015. "TNF- $\alpha$  Promotes Invasive Growth through the MET Signaling Pathway." *Molecular Oncology* 9(2): 377–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.09.002>.
- Bihl, Michel et al. 1998. 19 Am. J. Respir. Cell Mol. Biol *Proliferation of Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines: Role of Interleukin-6*. [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).
- Bishop, Justin A et al. 2012. "P40 (DeltaNp63) Is Superior to P63 for the Diagnosis of Pulmonary Squamous Cell Carcinoma." *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 25(3): 405–15.
- Borrello, M. G. et al. 2005. "Induction of a Proinflammatory Program in Normal Human Thyrocytes by the RET/PTC1 Oncogene." *Proc. Natl Acad. Sci USA* 102: 14825–14830.

- Bray, Freddie et al. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(6): 394–424.
- Butterfield, Lisa H. 2015. "Cancer Vaccines." *BMJ* 350.
- C. Thaxton, J. Lopera, M. Bott, C. Fernandez-Valle. 2008. "Neuregulin and Laminin Stim- Ulate Phosphorylation of the NF2 Tumor Suppressor in Schwann Cells by Distinct Protein Kinase A and P21-Activated Kinase-Dependent Pathways." *Oncogene* 27: 2705–2715.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dan Dumitru, C., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M. 2004. "Human MicroRNA Genes Are Frequently Located at Fragile Sites and Genomic Regions Involved in Cancers." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 2999–3004.
- Camacho-Concha, Nohemi et al. 2013. "CD43 Promotes Cells Transformation by Preventing Merlin-Mediated Contact Inhibition of Growth." *PloS one* 8(11): e80806.
- Chaffer, Christine L, and Robert A Weinberg. 2011. "A Perspective on Cancer Cell Metastasis." *Science (New York, N. Y.)* 331(6024): 1559–64.
- Chen, Gang et al. 2013. "MiR-146a Inhibits Cell Growth, Cell Migration and Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells." *PloS one* 8(3): e60317.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3608584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 3, 2014).
- Cheng, Ching-Yi et al. 2010. "IL-1beta Induces Expression of Matrix Metalloproteinase-9 and Cell Migration via a c-Src-Dependent, Growth Factor Receptor Transactivation in A549 Cells." *British journal of pharmacology* 160(7): 1595–1610.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2936833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 5, 2014).
- Choi, Ok Ran, and In Kyoung Lim. 2011. "Loss of P21(Sdi1) Expression in Senescent Cells after DNA Damage Accompanied with Increase of MiR-93 Expression and Reduced P53 Interaction with P21(Sdi1) Gene Promoter." *Biochemical and biophysical research communications* 407(2): 406–11.
- Chou, Yu-ting, Hua-heng Lin, Yung-chang Lien, and Transcriptional Repressor. 2010. "EGFR Promotes Lung Tumorigenesis by Activating MiR-7 through a Ras / ERK / Myc Pathway That Targets the Ets2 Transcriptional Repressor ERF." : 8822–31.
- Collisson, EA. 2014. "Comprehensive Molecular Profiling of Lung Adenocarcinoma." *Nature* 511(7511): 543–50.
- Colotta, Francesco et al. 2009. "Cancer-Related Inflammation, the Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability." *Carcinogenesis* 30(7): 1073–81.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19468060> (January 21, 2014).
- Costinean, S. et al. 2006. "Pre-B Cell Proliferation and Lymphoblastic Leukemia/High-Grade Lymphoma in E(Mu)-MiR155 Transgenic Mice." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 7024–7029.
- Couderc, Christophe et al. 2016. "AMOTL1 Promotes Breast Cancer Progression and Is Antagonized by Merlin." *Neoplasia (New York, N. Y.)* 18(1): 10–24.
- Custodio, Ana, Miriam Mendez, and Mariano Provencio. 2012. "Targeted Therapies for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Status and Future Implications." *Cancer treatment reviews* 38(1): 36–53.

- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens L.M. 2010. "Interactions between Lymphocytes and Myeloid Cells Regulate Pro- versus Anti-Tumor Immunity." *Cancer Metastasis Rev* 29: 309–316.
- Deng, Zhao-Qun et al. 2014. "Over-Expression of MiR-98 in FFPE Tissues Might Serve as a Valuable Source for Biomarker Discovery in Breast Cancer Patients." *International journal of clinical and experimental pathology* 7(3): 1166–71.
- Drane, P et al. 2002. "Accumulation of an Inactive Form of P53 Protein in Cells Treated with TNF Alpha." *Cell death and differentiation* 9(5): 527–37.
- Forloni, Matteo et al. 2014. "MiR-146a Promotes the Initiation and Progression of Melanoma by Activating Notch Signaling." : 1–20.
- Frankel, L.B. et al. 2008. "Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA MiR-21 in Breast Cancer Cells." *J. Biol. Chem.*, 283 118: 1026–1033.
- Frost, J A et al. 2000. "Stimulation of NFkappa B Activity by Multiple Signaling Pathways Requires PAK1." *The Journal of biological chemistry* 275(26): 19693–99.
- Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., et al. 2004. "A Census of Human Cancer Genes." *Nat. Rev. Cancer* 4: 177–183.
- Galcheva-Gargova, Zoya et al. 2008. "Overexpression of Merlin in B16F10 Mouse Melanoma Cells Reduces Their Metastatic Activity: Role of the Cell Surface Heparan Sulfate Glycosaminoglycans." *International journal of oncology* 32(6): 1237–43.
- Garajova, Ingrid et al. 2015. "MicroRNA Profiling of Primary Pulmonary Enteric Adenocarcinoma in Members from the Same Family Reveals Some Similarities to Pancreatic Adenocarcinoma—a Step towards Personalized Therapy." *Clinical epigenetics* 7: 129.
- Ghirelli, Cristina, and Thorsten Hagemann. 2013. "Targeting Immunosuppression for Cancer Therapy." *Journal of Clinical Investigation* 123(6): 2355–57.
- Giard, D J et al. 1973. "In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors." *Journal of the National Cancer Institute* 51(5): 1417–23.
- Gironella, M. et al. 2007. "Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1 Expression Is Repressed by MiR-155, and Its Restoration Inhibits Pancreatic Tumor Development." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104: 16170–16175.
- Gorlova, Olga Y et al. 2007. "Aggregation of Cancer among Relatives of Never-Smoking Lung Cancer Patients." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 121(1): 111–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304511> (May 27, 2014).
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. 2010. "Immunity, Inflammation, and Cancer." *Cell* 140: 883–899.
- Guan, Xiangming. 2015. "Cancer Metastases: Challenges and Opportunities." *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5(5): 402–18.
- Guerra, C. et al. 2007. "Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice." *Cancer Cell* 11: 291–302.
- Guttilla, Irene K, and Bruce A White. 2009. "Coordinate Regulation of FOXO1 by MiR-27a, MiR-96, and MiR-182 in Breast Cancer Cells." *The Journal of biological chemistry* 284(35): 23204–16.
- Guz, Małgorzata et al. 2014. "MicroRNAs-Role in Lung Cancer." *Disease Markers* 2014: 1–13. <http://www.hindawi.com/journals/dm/2014/218169/>.

- H. Jin, T. Sperka, P. Herrlich, H. Morrison. 2006. "Tumorigenic Transformation by CPI-17 through Inhibition of a Merlin Phosphatase." *Nature* 442(576–579).
- Hackshaw, a K, M R Law, and N J Wald. 1997. "The Accumulated Evidence on Lung Cancer and Environmental Tobacco Smoke." *BMJ (Clinical research ed.)* 315(7114): 980–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729086>.
- Ham, Boram, Maria Celia Fernandez, Zarina D'Costa, and Pnina Brodt. 2016. "The Diverse Roles of the TNF Axis in Cancer Progression and Metastasis." *Trends in cancer research* 11(1): 1–27.
- Ham, Boram, Maria Celia Fernandez, Zarina D 'costa, and Pnina Brodt. 2016. "The Diverse Roles of the TNF Axis in Cancer Progression and Metastasis." *Trends Cancer Res* 11(1): 1–27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5138060/pdf/nihms6118.pdf>.
- Hanahan, Douglas, and Robert a Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5): 646–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> (January 20, 2014).
- Hemminki, K. 2002. "Genetic Epidemiology of Cancer: Interpreting Family and Twin Studies and Their Implications for Molecular Genetic Approaches." *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 423.
- Van Herreweghe, Franky et al. 2002. "Tumor Necrosis Factor-Induced Modulation of Glyoxalase I Activities through Phosphorylation by PKA Results in Cell Death and Is Accompanied by the Formation of a Specific Methylglyoxal-Derived AGE." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2): 949–54.
- Hoesel, Bastian, and Johannes a Schmid. 2013. "The Complexity of NF-KB Signaling in Inflammation and Cancer." *Molecular cancer* 12(1): 86. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3750319&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (January 20, 2014).
- Hong, HaiJie et al. 2016. "TNF-Alpha Promotes Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis of Gallbladder Cancer through the ERK1/2/AP-1/VEGF-D Pathway." *BMC Cancer* 16: 240. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4799527/>.
- Ikeda, K et al. 1999. "Inhibition of NF2-Negative and NF2-Positive Primary Human Meningioma Cell Proliferation by Overexpression of Merlin Due to Vector-Mediated Gene Transfer." *Journal of neurosurgery* 91(1): 85–92.
- Inamura, Kentaro et al. 2005. "Pulmonary Adenocarcinomas with Enteric Differentiation: Histologic and Immunohistochemical Characteristics Compared with Metastatic Colorectal Cancers and Usual Pulmonary Adenocarcinomas." *The American journal of surgical pathology* 29(5): 660–65.
- . 2017. "Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification." *Frontiers in oncology* 7: 193. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28894699>.
- Inamura, Kentaro, and Yuichi Ishikawa. 2016. "MicroRNA In Lung Cancer: Novel Biomarkers and Potential Tools for Treatment." *Journal of Clinical Medicine* 5(3).
- Inamura, Kentaro, Hironori Ninomiya, Yuichi Ishikawa, and Osamu Matsubara. 2010. "Is the Epidermal Growth Factor Receptor Status in Lung Cancers Reflected in Clinicopathologic Features?" *Archives of pathology & laboratory medicine* 134(1): 66–72.
- Ivanovska, Irena et al. 2008. "MicroRNAs in the MiR-106b Family Regulate P21/CDKN1A and Promote Cell Cycle Progression." *Molecular and cellular biology* 28(7): 2167–74.
- Jahagirdar, Devashree, Shruti Purohit, Aayushi Jain, and Nilesh Kumar Sharma. 2016. "Export of MicroRNAs: A Bridge between Breast Carcinoma and Their Neighboring Cells." *Frontiers in oncology* 6: 147.

- Jing, Yingying et al. 2011. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Promotes Tumor Growth by Inducing Vascular Endothelial Growth Factor." *Cancer investigation* 29(7): 485–93.
- John, Bino et al. 2004. "Human MicroRNA Targets." *PLoS biology* 2(11): e363.
- K.A. Morrow, S. Das, B.J. Metge, K. Ye, M.S. Mulekar, J.A. Tucker, R.S. Samant, L.A. Shevde. 2011. "Loss of Tumor Suppressor Merlin in Advanced Breast Cancer Is Due to Post-Translational Regulation." *J. Biol. Chem.* 286: 40376–40385.
- Kabir Z, Bennett K, Clancy L. 2007. "Lung Cancer and Urban Air-Pollution in Dublin: A Temporal Association?" *Ir Med J.* Feb;100((2)): 367–9.
- Kawata, Mikiko et al. 2012. "TGF-Beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of A549 Lung Adenocarcinoma Cells Is Enhanced by pro-Inflammatory Cytokines Derived from RAW 264.7 Macrophage Cells." *Journal of biochemistry* 151(2): 205–16.
- Kefas, Benjamin et al. 2008. "MicroRNA-7 Inhibits the Epidermal Growth Factor Receptor and the Akt Pathway and Is down-Regulated in Glioblastoma." *Cancer research* 68(10): 3566–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483236> (January 31, 2014).
- Kertesz, Michael et al. 2007. "The Role of Site Accessibility in MicroRNA Target Recognition." *Nature Genetics* 39(10): 1278–84. <https://doi.org/10.1038/ng2135>.
- Kim, Hongtae et al. 2004. "Merlin Neutralizes the Inhibitory Effect of Mdm2 on P53." *Journal of Biological Chemistry*.
- Kim, Sunghoon et al. 2004. "Down-Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ /Nuclear Factor-KB (NF-KB)-Inducing Kinase/NF-KB Pathway Is Linked to a Default I $\kappa$ B- $\alpha$  Autoregulatory Loop." *Journal of Biological Chemistry* 279(6): 4285–91. <http://www.jbc.org/content/279/6/4285.abstract>.
- Kobiela, A. & Fuchs, E. 2006. "Links between  $\alpha$ -Catenin, NF-KB, and Squamous Cell Carcinoma in Skin." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 2322–2327.
- Kohno, Takashi et al. 2012. "KIF5B-RET Fusions in Lung Adenocarcinoma." *Nature medicine* 18(3): 375–77.
- Kong, D et al. 2012. "Inflammation-Induced Repression of Tumor Suppressor MiR-7 in Gastric Tumor Cells." *Oncogene* 31(35): 3949–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22139078> (February 21, 2014).
- Kumari, Neeraj, B. S. Dwarakanath, Asmita Das, and Anant Narayan Bhatt. 2016. "Role of Interleukin-6 in Cancer Progression and Therapeutic Resistance." *Tumor Biology* 37(9): 11553–72. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>.
- Kunita, Akiko et al. 2018. "MicroRNA-21 in Cancer-Associated Fibroblasts Supports Lung Adenocarcinoma Progression." *Scientific Reports* 8(1): 8838. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27128-3>.
- Kutty, R Krishnan et al. 2013. "Differential Regulation of MicroRNA-146a and MicroRNA-146b-5p in Human Retinal Pigment Epithelial Cells by Interleukin-1beta, Tumor Necrosis Factor-Alpha, and Interferon-Gamma." *Molecular vision* 19: 737–50.
- Labbaye, Catherine, and Ugo Testa. 2012. "The Emerging Role of MIR-146A in the Control of Hematopoiesis, Immune Function and Cancer." *Journal of hematology & oncology* 5: 13.
- Landskron, Glauben et al. 2014. "Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment." *Journal of Immunology Research* 2014: 149185.

- Laulajainen, M, T Muranen, O Carpén, and M Grönholm. 2008. "Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation of the NF2 Tumor Suppressor Protein Merlin at Serine 10 Affects the Actin Cytoskeleton." *Oncogene* 27(23): 3233–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18071304> (February 27, 2014).
- Law, Priscilla T-Y et al. 2012. "MiR-145 Modulates Multiple Components of the Insulin-like Growth Factor Pathway in Hepatocellular Carcinoma." *Carcinogenesis* 33(6): 1134–41.
- Lewis, Benjamin P et al. 2003. "Prediction of Mammalian MicroRNA Targets." *Cell* 115(7): 787–98. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3).
- Li, Lihua et al. 2012. "Serum MiR-18a: A Potential Marker for Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma Screening." *Digestive diseases and sciences* 57(11): 2910–16.
- Li, Wei, Jonathan Cooper, Matthias a. Karajannis, and Filippo G. Giancotti. 2012. "Merlin: A Tumour Suppressor with Functions at the Cell Cortex and in the Nucleus." *EMBO reports* 13(3): 204–15. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.embor.2012.11> (May 31, 2014).
- Li, Xiaoting et al. 2014. "Curcumin Modulates MiR-19/PTEN/AKT/P53 Axis to Suppress Bisphenol A-Induced MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation." *Phytotherapy research : PTR* 28(10): 1553–60.
- Lin, Chih-Chung et al. 2008. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces MMP-9 Expression via P42/P44 MAPK, JNK, and Nuclear Factor-KappaB in A549 Cells." *Toxicology and applied pharmacology* 229(3): 386–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336852> (April 18, 2014).
- Lin, Yuanguang, Ming Zhang, and Peter F Barnes. 1998. 66 INFECTION AND IMMUNITY *Chemokine Production by a Human Alveolar Epithelial Cell Line in Response to Mycobacterium Tuberculosis*.
- Loffler, D. et al. 2007. "Interleukin-6 Dependent Survival of Multiple My- Eloma Cells Involves the Stat3-Mediated Induction of MicroRNA-21 through a Highly Conserved Enhancer." *Blood* 110: 1330–1333.
- Lu, Jing Nan et al. 2017. "Anthocyanins from the Fruit of Vitis Coignetiae Pulliat Inhibit TNF-Augmented Cancer Proliferation, Migration, and Invasion in A549 Cells." *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 18(11): 2919–23.
- Lu, Yan et al. 2012. "MicroRNA Profiling and Prediction of Recurrence/Relapse-Free Survival in Stage I Lung Cancer." *Carcinogenesis* 33(5): 1046–54. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3334512&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (April 5, 2014).
- Luo, Zai-Li et al. 2015. "A Splicing Variant of Merlin Promotes Metastasis in Hepatocellular Carcinoma." *Nature communications* 6: 8457.
- Luo, Zai Li et al. 2015. "A Splicing Variant of Merlin Promotes Metastasis in Hepatocellular Carcinoma." *Nature Communications* 6: 1–11.
- Mantovani, Alberto, Paola Allavena, Antonio Sica, and Frances Balkwill. 2008. "Cancer-Related Inflammation." *Nature* 454(7203): 436–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650914> (January 20, 2014).
- Martincorena, Inigo, and Peter J Campbell. 2015. "Somatic Mutation in Cancer and Normal Cells." *Science (New York, N. Y.)* 349(6255): 1483–89.
- Masuda, Mariko et al. 2012. "An Induction of MicroRNA, MiR-7 through Estrogen Treatment in Breast Carcinoma." *Journal of Translational Medicine* 10(Suppl 1): S2. <http://www.translational-medicine.com/content/10/S1/S2> (February 21, 2014).

- Matysiak, M et al. 2013. "MicroRNA-146a Negatively Regulates the Immunoregulatory Activity of Bone Marrow Stem Cells by Targeting Prostaglandin E2 Synthase-2." *J. Immunol.* 190.
- McClatchey, Andrea I, and Marco Giovannini. 2005. "Membrane Organization and Tumorigenesis--the NF2 Tumor Suppressor, Merlin." *Genes & development* 19(19): 2265–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16204178> (February 24, 2014).
- Meng, F. et al. 2007. "MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer." *Gastroenterology* (133): 647–658.
- Merel, P et al. 1995. "Predominant Occurrence of Somatic Mutations of the NF2 Gene in Meningiomas and Schwannomas." *Genes, chromosomes & cancer* 13(3): 211–16.
- Mesci, Aruz et al. 2017. "Targeting of CCBE1 by MiR-330-3p in Human Breast Cancer Promotes Metastasis." *British Journal Of Cancer* 116: 1350.
- Meza-Sosa, Karla F, Erick I Perez-Garcia, et al. 2014. "MiR-7 Promotes Epithelial Cell Transformation by Targeting the Tumor Suppressor KLF4." *PloS one* 9(9): e103987.
- Meza-Sosa, Karla F, Erick I Pérez-García, et al. 2014. "MiR-7 Promotes Epithelial Cell Transformation by Targeting the Tumor Suppressor KLF4" ed. Barbara Bardoni. *PLoS ONE* 9(9).
- Meza-sosa, Karla F, David Valle-garcía, Gustavo Pedraza-Alva, and Leonor Pérez-Martínez. 2013. "MicroARNs, Los Pequeños Grandes Actores Del Sistema Nervioso." *Ciencia*.
- Michalaki, V, K Syrigos, P Charles, and J Waxman. 2004. "Serum Levels of IL-6 and TNF-  $\alpha$  Correlate with Clinicopathological Features and Patient Survival in Patients with Prostate Cancer." : 2312–16.
- Mirnezami, a H F et al. 2009. "MicroRNAs: Key Players in Carcinogenesis and Novel Therapeutic Targets." *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 35(4): 339–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644693> (February 19, 2014).
- Mohar-Betancourt, Alejandro et al. 2017. "Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies." *Journal of Global Oncology* 3(6): 740–48.
- Morrison, Helen et al. 2001. "The NF2 Tumor Suppressor Gene Product, Merlin, Mediates Contact Inhibition of Growth through Interactions with CD44." *Genes and Development* 15: 968–80.
- Nadal, Ernest et al. 2014. "A MicroRNA Cluster at 14q32 Drives Aggressive Lung Adenocarcinoma." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20(12): 3107–17.
- Nakaoku, Takashi et al. 2014. "Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20(12): 3087–93.
- Nayak, Surendra Kumar, Paramjit Singh Panesar, and Harish Kumar. 2009. "P53-Induced Apoptosis and Inhibitors of P53." *Current medicinal chemistry* 16(21): 2627–40.
- Ninomiya, Hironori et al. 2009. "Correlation between Morphology and EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas Significance of the Micropapillary Pattern and the Hobnail Cell Type." *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 63(2): 235–40.
- Noguchi. 1995. "Small Adenocarcinoma of the Lung. Histologic Characteristics and Prognosis." *Cancer* 75(12): 2844–52.

- Nowell P C. 1976. "The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations." *Science*. 194((4260)): 23–8.
- O'Callaghan, Dermot S, Dearbhaile O'Donnell, Finbarr O'Connell, and Kenneth J O'Byrne. 2010. "The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 5(12): 2024–36. <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f387e4>.
- O'Connell, R.M. et al. 2007. "MicroRNA-155 Is Induced during the Mac- Rophage Inflammatory Response." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104: 1604– 1609.
- O'Reilly, Katherine M a, Anne Marie Mclaughlin, William S Beckett, and Patricia J Sime. 2007. "Asbestos-Related Lung Disease." *American family physician* 75(5): 683–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375514>.
- Okuda, Hiroshi et al. 2013. "MiR-7 Suppresses Brain Metastasis of Breast Cancer Stem-like Cells by Modulating KLF4." *Cancer research* 73(4): 1434–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384942> (February 16, 2014).
- Page` s, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Saute` s-Fridman, C., and Fridman, W.H. 2010. "Immune Infiltration in Human Tumors: A Prognostic Factor That Should Not Be Ignored." *Oncogene* 29: 1093–1102.
- Pallai, Anna et al. 2016. "Transmembrane TNF- $\alpha$  Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF- $\beta$ : Therapeutic Implications." *The Journal of Immunology* 196(3): 1146–57. <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1501573>.
- Pećina-Šlaus, Nives. 2013a. "Merlin, the NF2 Gene Product." *Pathology oncology research : POR* 19(3): 365–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666797> (May 25, 2014).
- . 2013b. "Merlin, the NF2 Gene Product." *Pathology and Oncology Research*.
- Pérez-García, Erick I. et al. 2015. "Merlin Negative Regulation by MiR-146a Promotes Cell Transformation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468(4): 594–600.
- Perez-Garcia, Erick I et al. 2015. "Merlin Negative Regulation by MiR-146a Promotes Cell Transformation." *Biochemical and biophysical research communications*.
- Petrilli, Alejandra M. 2016. "HHS Public Access." 35(5): 537–48.
- Phillips, R. J. et al. 2005. "Epidermal Growth Factor and Hypoxia-Induced Expression of CXC Chemokine Receptor 4 on Non-Small Cell Lung Cancer Cells Is Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway and Activation of Hypoxia Ind." *J. Biol. Chem* 280: 22473–22481.
- Plotkin, Scott R et al. 2011. "Spinal Ependymomas in Neurofibromatosis Type 2: A Retrospective Analysis of 55 Patients." *Journal of neurosurgery. Spine* 14(4): 543–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294614> (May 30, 2014).
- Porta, Chiara et al. 2009. "Cellular and Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer." *Immunobiology* 214(9–10): 761–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616341> (January 24, 2014).
- Qi, Q, X Liu, D J Brat, and K Ye. 2014. "Merlin Sumoylation Is Required for Its Tumor Suppressor Activity." *Oncogene* 33(41): 4893–4903.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. 2010. "Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis." *Cell* 141: 39–51.

- Qu, Shengtao et al. 2012. "MicroRNA-330 Is an Oncogenic Factor in Glioblastoma Cells by Regulating SH3GL2 Gene." *PloS one* 7(9): e46010.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3448729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 28, 2014).
- Quail, D F, and J A Joyce. 2013. "Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis." *Nature medicine* 19(11): 1423–37.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3954707/>.
- Quan, Ming et al. 2015. "Merlin/NF2 Suppresses Pancreatic Tumor Growth and Metastasis by Attenuating the FOXM1-Mediated Wnt/Beta-Catenin Signaling." *Cancer research* 75(22): 4778–89.
- Rahman, Nazneen, and Richard H Scott. 2007. "Cancer Genes Associated with Phenotypes in Monoallelic and Biallelic Mutation Carriers: New Lessons from Old Players." *Human molecular genetics* 16 Spec No: R60-6.
- Reddy, P. 2018. "A JNK-Independent Signaling Pathway Regulates TNF  $\alpha$  -Stimulated, c-Jun-Driven FRA-1 Protooncogene Transcription in Pulmonary Epithelial Cells."
- Rider, Leah, Peter Oladimeji, and Maria Diakonova. 2013. "PAK1 Regulates Breast Cancer Cell Invasion through Secretion of Matrix Metalloproteinases in Response to Prolactin and Three-Dimensional Collagen IV." *Molecular Endocrinology* 27(7): 1048–64.
- Rong, Rong et al. 2004. "Serine 518 Phosphorylation Modulates Merlin Intramolecular Association and Binding to Critical Effectors Important for NF2 Growth Suppression." *Oncogene* 23(52): 8447–54.
- Sandhu, Rupninder et al. 2014. "Overexpression of MiR-146a in Basal-like Breast Cancer Cells Confers Enhanced Tumorigenic Potential in Association with Altered P53 Status." 35(11): 2567–75.
- Sapio, Luigi et al. 2014. "Targeting Protein Kinase A In Cancer Therapy: An Update." : 843–55.
- Sarkar, Shaan et al. 2013. "Down-Regulation of MiR-221 Inhibits Proliferation of Pancreatic Cancer Cells through up-Regulation of PTEN, P27(Kip1), P57(Kip2), and PUMA." *American journal of cancer research* 3(5): 465–77.
- Savage, Kienan I, and D Paul Harkin. 2015. "BRCA1, a 'complex' Protein Involved in the Maintenance of Genomic Stability." *The FEBS journal* 282(4): 630–46.
- Saydam, Okay et al. 2011. "MiRNA-7 Attenuation in Schwannoma Tumors Stimulates Growth by Upregulating Three Oncogenic Signaling Pathways." *Cancer research* 71(3): 852–61.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3072568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (January 31, 2014).
- Schetter, A.J. et al. 2009. "Association of Inflammation-Related and Micro- RNA Gene Expression with Cancer-Specific Mortality of Colon Adenocarcinoma." *Clin. Cancer Res* 15: 5878–5887.
- Schmucker, B, Y Tang, and M Kressel. 1999. "Novel Alternatively Spliced Isoforms of the Neurofibromatosis Type 2 Tumor Suppressor Are Targeted to the Nucleus and Cytoplasmic Granules." *Human molecular genetics* 8(8): 1561–70.
- Sekido, Y et al. 1995. "Neurofibromatosis Type 2 (NF2) Gene Is Somatic Mutated in Mesothelioma but Not in Lung Cancer." *Cancer research* 55(6): 1227–31.
- Sekido, Yoshitaka et al. 1995. "Neurofibromatosis Type 2 ( NF2 ) Gene Is Somatic Mutated in Mesothelioma but Not in Lung Cancer." *Cancer research* 55: 1227–31.

- Shang, Guan-Sheng, Lunxu Liu, and Yi-Wei Qin. 2017. "IL-6 and TNF-Alpha Promote Metastasis of Lung Cancer by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition." *Oncology letters* 13(6): 4657–60.
- Shchors, K. et al. 2006. "The Myc-Dependent Angiogenic Switch in Tumors Is Mediated by Interleukin 1 $\beta$ ." *Genes Dev* 20: 2527–2538.
- Sheng, Yuqiao, Feng Li, and Zihai Qin. 2018. "TNF Receptor 2 Makes Tumor Necrosis Factor a Friend of Tumors." *Frontiers in Immunology* 9(May): 1170.  
[https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01170/full?utm\\_source=F-NTF&utm\\_medium=EMLX&utm\\_campaign=PRD\\_FEOPS\\_20170000\\_ARTICLE](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01170/full?utm_source=F-NTF&utm_medium=EMLX&utm_campaign=PRD_FEOPS_20170000_ARTICLE).
- Sher, Ifat, C Oliver Hanemann, P Andrew Karplus, and Anthony Bretscher. 2012. "The Tumor Suppressor Merlin Controls Growth in Its Open State, and Phosphorylation Converts It to a Less-Active More-Closed State." *Developmental cell* 22(4): 703–5.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3725555&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 27, 2014).
- Shi, Yuhao et al. 2016. "Rac1-Mediated DNA Damage and Inflammation Promote Nf2 Tumorigenesis but Also Limit Cell-Cycle Progression." *Developmental cell* 39(4): 452–65.
- Shigematsu, Hisayuki et al. 2005. "Clinical and Biological Features Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers." *Journal of the National Cancer Institute* 97(5): 339–46.
- Shim, Hyo Sup et al. 2015. "Unique Genetic and Survival Characteristics of Invasive Mucinous Adenocarcinoma of the Lung." *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 10(8): 1156–62.
- Shiozaki, Atsushi et al. 2012. "Claudin 1 Mediates TNF $\alpha$ -Induced Gene Expression and Cell Migration in Human Lung Carcinoma Cells." *PLoS ONE* 7(5): e38049.  
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0038049>.
- Silva, Brenda de Oliveira da et al. 2016. "MicroRNA Profiling of the Effect of the Heptapeptide Angiotensin-(1-7) in A549 Lung Tumor Cells Reveals a Role for MiRNA149-3p in Cellular Migration Processes." *PloS one* 11(9): e0162094–e0162094.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27598578>.
- Smith, Anna L, Tyler P Robin, and Heide L Ford. 2012. "Molecular Pathways: Targeting the TGF-Beta Pathway for Cancer Therapy." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18(17): 4514–21.
- Soucek, L. et al. 2007. "Mast Cells Are Required for Angiogenesis and Macroscopic Expansion of Myc-Induced Pancreatic Islet Tumors." *Nature Med* 13: 1211–1218.
- Sparmann, A. & Bar-Sagi, D. 2004. "Ras-Induced Interleukin-8 Expression Plays a Critical Role in Tumor Growth and Angiogenesis." *Cancer Cell* 6: 447–458.
- Staller, P. et al. 2003. "Chemokine Receptor CXCR4 Downregulated by von Hippel-Lindau Tumour Suppressor PVHL." *Nature* 425: 307–311.
- Stamenkovic, Ivan, and Qin Yu. 2010. "Merlin, a 'Magic' Linker between Extracellular Cues and Intracellular Signaling Pathways That Regulate Cell Motility, Proliferation, and Survival." *Current protein & peptide science* 11(6): 471–84.
- Stemmer-Rachamimov, a O et al. 1997. "Universal Absence of Merlin, but Not Other ERM Family Members, in Schwannomas." *The American journal of pathology* 151(6): 1649–54.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1858373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Stenvang, Jan et al. 2012. "Inhibition of MicroRNA Function by AntimiR Oligonucleotides." *Silence* 3(1): 1–17. <http://www.silencejournal.com/content/3/1/1>.
- Sun, M., Hurst, L.D., Carmichael, G.G., Chen, J.J. 2005. "Evidence for a Preferential Targeting of 3'-UTRs by Cis-Encoded Natural Antisense Transcripts." *Nucleic acids research* 33: 5533–5543.
- Sun, Wanpeng, and Jian Yang. 2010. "Functional Mechanisms for Human Tumor Suppressors." *Journal of Cancer* 1: 136–40.
- Sun, Xin et al. 2012. "[Role of let-7 in maintaining characteristics of breast cancer stem cells]." *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* 28(8): 789–92.
- Surace, Ezequiel I, Carrie a Haipek, and David H Gutmann. 2004. "Effect of Merlin Phosphorylation on Neurofibromatosis 2 (NF2) Gene Function." *Oncogene* 23(2): 580–87.
- Taganov, K.D. et al. 2006. "NF-KappaB-Dependent Induction of Micro- RNA MiR-146, an Inhibitor Targeted to Signaling Proteins of Innate Immune Responses." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 12481–12486.
- Taganov, Konstantin D, Mark P Boldin, Kuang-Jung Chang, and David Baltimore. 2006. "NF-KappaB-Dependent Induction of MicroRNA MiR-146, an Inhibitor Targeted to Signaling Proteins of Innate Immune Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(33): 12481–86.
- Takahashi, Eri, Akira Haga, and Hidenobu Tanihara. 2015. "Merlin Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition of ARPE-19 Cells via TAK1-P38MAPK-Mediated Activation." *Investigative ophthalmology & visual science* 56(4): 2449–58.
- Takeuchi, Kengo et al. 2012. "RET, ROS1 and ALK Fusions in Lung Cancer." *Nature medicine* 18(3): 378–81.
- Tan, Weige et al. 2018. "MicroRNAs and Cancer: Key Paradigms in Molecular Therapy (Review)." *Oncology Letters* 15(3): 2735–42.
- Tan, Wenfeng et al. 2018. "MiRNA 146a Promotes Chemotherapy Resistance in Lung Cancer Cells by Targeting DNA Damage Inducible Transcript 3 (CHOP)." *Cancer letters* 428: 55–68.
- Tang, Daofang et al. 2017. "TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma." *Medical Science Monitor Basic Research* 23: 141–49.
- Tang, Xiaoling et al. 2007. "Akt Phosphorylation Regulates the Tumour-Suppressor Merlin through Ubiquitination and Degradation." *Nature cell biology* 9(10): 1199–1207.
- Tili, E. et al. 2007. "Modulation of MiR-155 and MiR-125b Levels Following Lipopolysaccharide/TNF-Alpha Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock." *J. Immunol.* 179: 5082–5089.
- Travis, William D et al. 2015. "Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart." *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 10(9): 1240–42.
- Trofatter, J a et al. 1993. "A Novel Moesin-, Ezrin-, Radixin-like Gene Is a Candidate for the Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor." *Cell* 75(4): 826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242753>.
- Turajlic, Samra, and Charles Swanton. 2016. "Metastasis as an Evolutionary Process." *Science (New York, N.Y.)* 352(6282): 169–75.

- Ueki, K et al. 1999. "Tight Association of Loss of Merlin Expression with Loss of Heterozygosity at Chromosome 22q in Sporadic Meningiomas." *Cancer research* 59(23): 5995–98.
- Vannini, Ivan, Francesca Fanini, and Muller Fabbri. 2013. "MicroRNAs as Lung Cancer Biomarkers and Key Players in Lung Carcinogenesis." *Clinical biochemistry* 46(10–11): 918–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396164> (March 24, 2014).
- Vogelstein, B, and KW Kinzler. 2002. *The Genetic Basis of Human Cancer*. <http://shiyros.fulba.com/data/the-genetic-basis-of-human-cancer-by-bert-vogelstein-kenneth-w-kinzler.pdf> (May 27, 2014).
- Wang, Baofeng et al. 2016. "The Role and Regulatory Mechanism of IL-1 b on the Methylation of the NF2 Gene in Benign Meningiomas and Leptomeninges." 2277(197): 2268–77.
- Wang, Xiao-Hu et al. 2015. "Tumor Necrosis Factor Alpha Promotes the Proliferation of Human Nucleus Pulposus Cells via Nuclear Factor-KB, c-Jun N-Terminal Kinase, and P38 Mitogen-Activated Protein Kinase." *Experimental Biology and Medicine* 240(4): 411–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4935371/>.
- Webster, Rebecca J et al. 2009. "Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Human Cancer Cells by MicroRNA-7 \* □."
- WHO. 2018. "Mexico Globocan 2018." <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>.
- Wu, Chaohui et al. 2014. "Serum Levels of MiR-19b and MiR-146a as Prognostic Biomarkers for Non-Small Cell Lung Cancer." *The Tohoku journal of ...* (55): 85–95. <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/tjem/232.85?from=Google> (September 29, 2014).
- Wu, Tangwei et al. 2015. "MiR-25 Targets the Modulator of Apoptosis 1 Gene in Lung Cancer." *Carcinogenesis* 36(8): 925–35.
- Wu, Y, and B P Zhou. 2010. "TNF-Alpha/NF-KappaB/Snail Pathway in Cancer Cell Migration and Invasion." *British journal of cancer* 102(4): 639–44.
- X. Tang, S.W. Jang, X. Wang, Z. Liu, S.M. Bahr, S.Y. Sun, D. Brat, D.H. Gutmann, K. Ye. 2007. "Akt Phosphorylation Regulates the Tumour-Suppressor Merlin through Ubiquitination and Degradation." *Nat. Cell Biol* 9: 1199–1207.
- Xia, Wei et al. 2017. "MicroRNA-32 Promotes Cell Proliferation, Migration and Suppresses Apoptosis in Breast Cancer Cells by Targeting FBXW7." *Cancer cell international* 17: 14.
- Xiang, Michael et al. 2014. "STAT3 Induction of MiR-146b Forms a Feedback Loop to Inhibit the NF- k B to IL-6 Signaling Axis and STAT3-Driven Cancer Phenotypes." 7(310): 1–14.
- Xiao, B I N et al. 2012. "Increased MiR-146a in Gastric Cancer Directly Targets SMAD4 and Is Involved in Modulating Cell Proliferation and Apoptosis." : 559–66.
- Xie, Dacheng et al. 2015. "Hippo Transducer TAZ Promotes Epithelial Mesenchymal Transition and Supports Pancreatic Cancer Progression." *Oncotarget* 6(34): 35949–63.
- Xiong, Shudao et al. 2011. "MicroRNA-7 Inhibits the Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells through Targeting BCL-2." *International journal of biological sciences* 7(6): 805–14. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3133888&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Xu, H-S et al. 2014. "MiR-324-5p Inhibits Proliferation of Glioma by Target Regulation of GLI1." *European review for medical and pharmacological sciences* 18(6): 828–32.

- Yan, Shi-yan et al. 2015. "MiR-32 Induces Cell Proliferation , Migration , and Invasion in Hepatocellular Carcinoma by Targeting PTEN." : 4747–55.
- Yanaihara, Nozomu et al. 2006. "Unique MicroRNA Molecular Profiles in Lung Cancer Diagnosis and Prognosis." *Cancer cell* 9(3): 189–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530703> (April 5, 2014).
- Yang, Jun et al. 2003. "Induction of Proinflammatory Cytokines in Human Lung Epithelial Cells during Chlamydia Pneumoniae Infection." *INFECTION AND IMMUNITY* 71(2): 614–20.
- Yang, L, and M Karin. 2014. "Roles of Tumor Suppressors in Regulating Tumor-Associated Inflammation." *Cell Death and Differentiation* 21(11): 1677–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211367/>.
- Yang, Xiaoyan et al. 2012. "MiR-195 Regulates Cell Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting LATS2." *Die Pharmazie* 67(7): 645–51.
- Yao, Yilong et al. 2014. "MIR-330-Mediated Regulation of SH3GL2 Expression Enhances Malignant Behaviors of Glioblastoma Stem Cells by Activating ERK and PI3K/AKT Signaling Pathways." *PLoS ONE*.
- Ye, Diana Zi, and Jeffrey Field. 2012. "PAK Signaling in Cancer." *Cellular Logistics* 2(2): 105–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3490961/>.
- Ye, Keqiang. 2007. "Phosphorylation of Merlin Regulates Its Stability and Tumor Suppressive Activity." *Cell adhesion & migration* 1(4): 196–98.
- Yoon, Jong Hyuk et al. 2011. "Proteomic Analysis of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ )-Induced L6 Myotube Secretome Reveals Novel TNF- $\alpha$ -Dependent Myokines in Diabetic Skeletal Muscle." *Journal of Proteome Research* 10(12): 5315–25.
- Yu, Liang et al. 2014. "Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Promotes Metastasis via NF-KappaB Signaling Pathway-Mediated TWIST Expression in Hypopharyngeal Cancer." *Oncology reports* 31(1): 321–27.
- Zhang, Baohong, Xiaoping Pan, George P Cobb, and Todd a Anderson. 2007. "MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors." *Developmental biology* 302(1): 1–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16989803> (February 20, 2014).
- Zhao, Hongying et al. 2014. "MiR-25 Promotes Gastric Cancer Cells Growth and Motility by Targeting RECK." *Molecular and cellular biochemistry* 385(1–2): 207–13.
- Zhao, Juanjuan et al. 2015. "MicroRNA - 7 : A Promising New Target in Cancer Therapy." *Cancer Cell International*: 1–8.
- Zhao, Xiao-Di et al. 2015. "MicroRNA-7/NF-KB Signaling Regulatory Feedback Circuit Regulates Gastric Carcinogenesis." *The Journal of Cell Biology* 210(4): 613–27.
- Zhao, Xiao Di et al. 2015. "MicroRNA-7 / NF-  $\kappa$  B Signaling Regulatory Feedback Circuit Regulates Gastric Carcinogenesis." 210(4): 613–27.
- Zhao, Zhengyuan et al. 2014. "MicroRNA-25 Regulates Small Cell Lung Cancer Cell Development and Cell Cycle through Cyclin E2." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*.
- Zhu, Shuomin, Min-Liang Si, Hailong Wu, and Yin-Yuan Mo. 2007. "MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1)." *The Journal of biological chemistry* 282(19): 14328–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363372> (May 27, 2014).

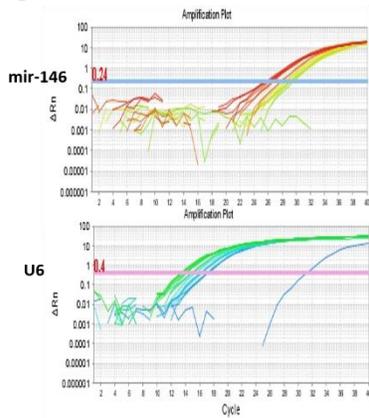
## **ANEXO I:**

### ***Estandarización de qPCR para miRNAs***

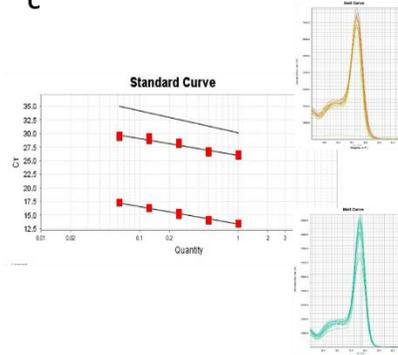
A

	Tm	oligos	cDNA	Ct	NTC	Melt curve
mir-146	60	250nM	SN 24h+	30	limpio	1 pico
U6	60	500nM	A549 RT+	14	31-34	1 pico

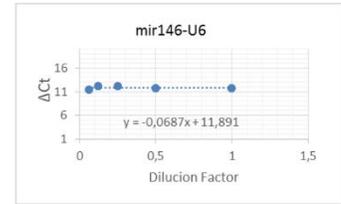
B



C



D

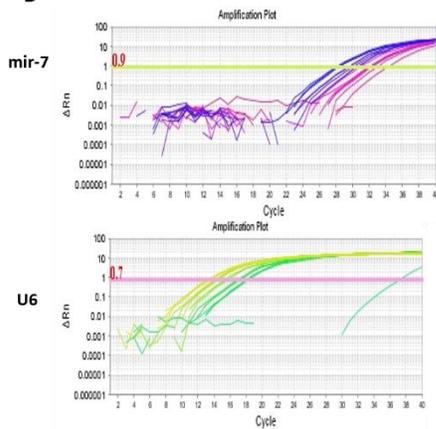


**Figura 1 ANEXO I: Estandarización de qPCR de miR-146a.** A. Resumen de condiciones de qPCR para medir miR-146 vs U6 en células A549. B. Gráfico de amplificación de la curva de diluciones de cDNA de A549 para mir146 y U6. C. Análisis de las curvas estándar para miR-146 y U6. A la derecha se muestra los pico de la temperatura de melt para cada condición: miR-146a (panel de arriba) y U6 (panel de abajo). D. Grafico  $\Delta C_t$  vs dilución de cDNA. Se grafica la recta de comparación de las curvas estándar, si la pendiente está en el rango de - 0.1 a 0.1 las curvas son comparables.

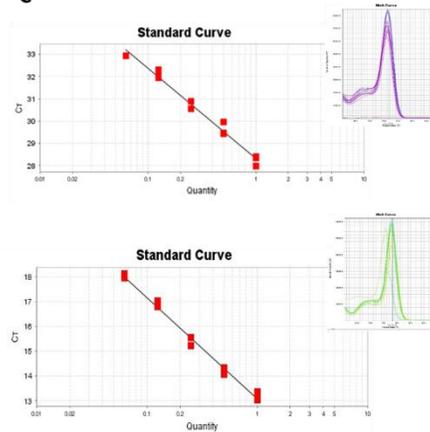
A

	Tm	oligos	cDNA	Ct	NTC	Melt curve
mir-7	60	1000nM	TNF 72h+	28	limpio	1 pico
U6	60	250nM	SN 24h+	13	35	1 pico

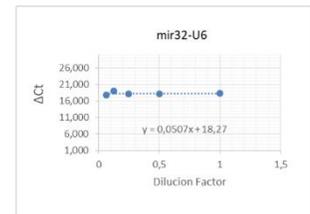
B



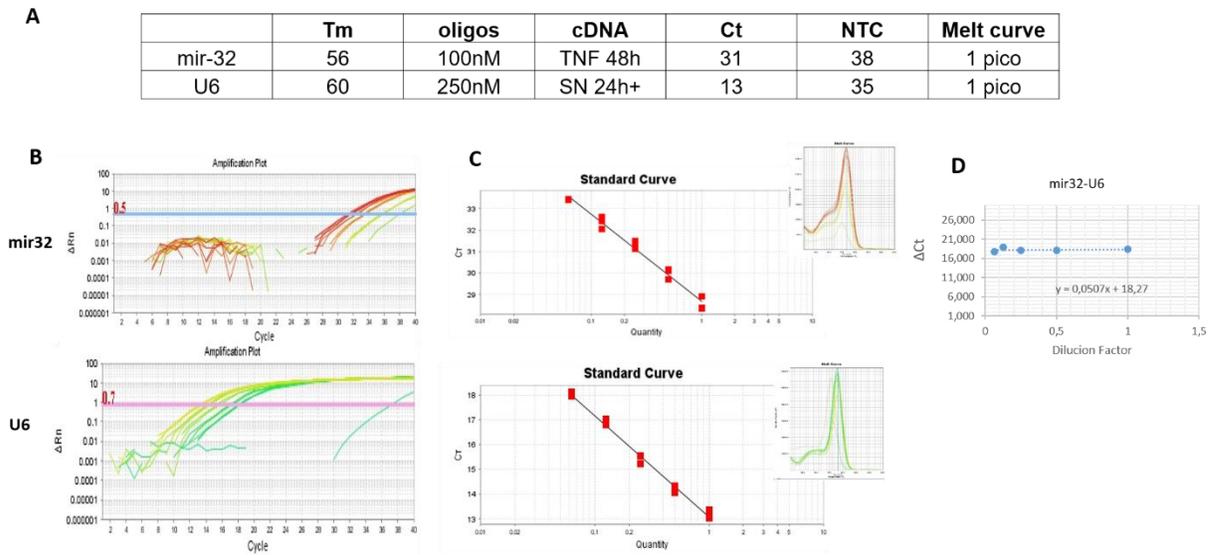
C



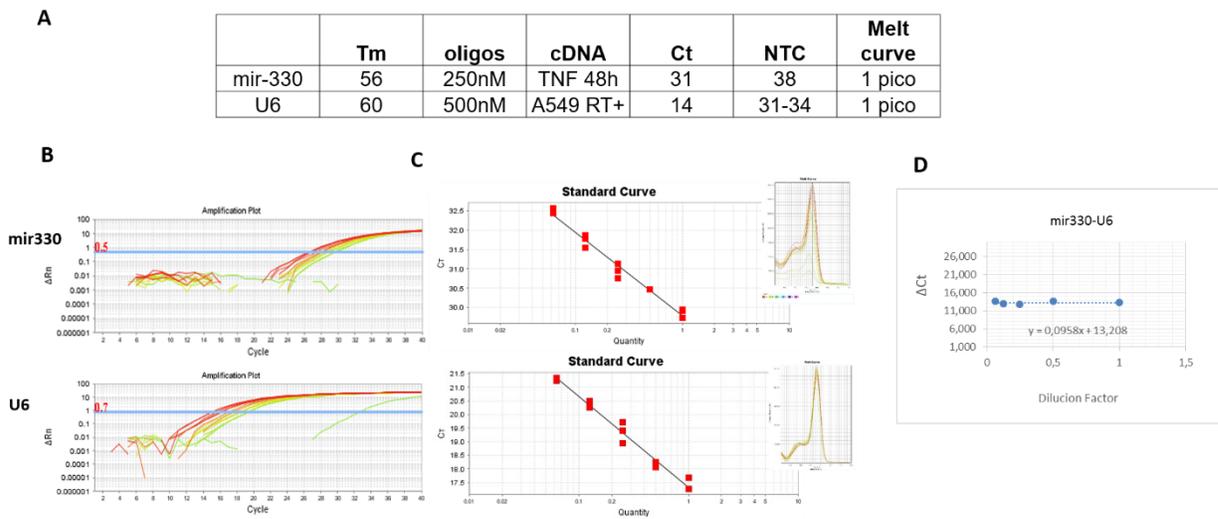
D



**Figura 2 ANEXO I: Estandarización de qPCR de miR-7.** A. Resumen de condiciones de qPCR para medir miR-7 vs U6 en células A549. B. Gráfico de amplificación de la curva de diluciones de cDNA de A549 para miR-7 y U6. C. Análisis de las curvas estándar para miR-7 y U6. A la derecha se muestra los pico de la temperatura de melt para cada condición: miR-7 (panel de arriba) y U6 (panel de abajo). D. Gráfico  $\Delta C_t$  vs dilución de cDNA. Se grafica la recta de comparación de las curvas estándar, si la pendiente está en el rango de - 0.1 a 0.1 las curvas son comparables.



**Figura 3 ANEXO I: Estandarización de qPCR de miR-32.** **A.** Resumen de condiciones de qPCR para medir miR-32 vs U6 en células A549. **B.** Gráfico de amplificación de la curva de diluciones de cDNA de A549 para miR-32y U6.**C.** Análisis de las curvas estándar para miR-32 y U6. A la derecha se muestra los pico de la temperatura de melt para cada condición: miR-32 (panel de arriba) y U6 (panel de abajo). **D.** Gráfico  $\Delta C_t$  vs dilución de cDNA. Se grafica la recta de comparación de las curvas estándar, si la pendiente está en el rango de - 0.1 a 0.1 las curvas son comparables.



**Figura 4 ANEXO I: Estandarización de qPCR de miR-330.** **A.** Resumen de condiciones de qPCR para medir miR-330 vs U6 en células A549. **B.** Gráfico de amplificación de la curva de diluciones de cDNA de A549 para miR-330 y U6.**C.** Análisis de las curvas estándar para miR-330 y U6. A la derecha se muestra los pico de la temperatura de melt para cada condición: miR-330 (panel de arriba) y U6 (panel de abajo). **D.** Gráfico  $\Delta C_t$  vs dilución de cDNA. Se grafica la recta de comparación de las curvas estándar, si la pendiente está en el rango de - 0.1 a 0.1 las curvas son comparables.

## ANEXO II: Tablas

**Tabla 1. Datos clínicos de pacientes.**

Nombre	Muestra	Sexo	Edad	Diagnóstico histopatológico	Metástasis	Invasión	Inflamación del tejido
<b>N1</b>	C1	F	76	no tumoral	-	-	-
<b>N2</b>	C5	F	57	no tumoral	-	-	-
<b>N3</b>	C6	F	70	no tumoral	-	-	-
<b>N4</b>	P2	F	58	neoplasia benigna	-	-	-
<b>T1</b>	P1	F	79	adenocarcinoma primario	si	si	neumolitis / bronquiolitis
<b>T2</b>	P3	M	73	carcinoma neuroendocrino	si		acúmulo de macrófagos alveolares e infiltración linfoplasmocitario
<b>T3</b>	P4	F	81	adenocarcinoma primario	no	no	no
<b>T4</b>	P5	M	79	adenocarcinoma invasor	no	no	extensa inflamación crónica inespecífica
<b>T5</b>	P8	F	76	adenocarcinoma invasor	no	si	no
<b>T6</b>	P10	F	75	carcinoma NSCLC	NE	NE	NE
<b>T7</b>	P11	M	82	adenocarcinoma invasor	no	si	no
<b>T8</b>	P13	M	72	adenocarcinoma invasor	no	si	NE
<b>T9</b>	P14	M	76	adenocarcinoma primario	si	NE	NE
<b>T10</b>	P16	F	57	carcinoma neuroendocrino	no	si	inflamación crónica inespecífica
<b>T11</b>	P17	F	48	carcinoma neuroendocrino	no	no	NE
<b>T12</b>	P18	F	70	carcinoma neuroendocrino	no	si	inflamación crónica inespecífica

**Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos para RT-PCR y qPCR.**

Gen Blanco	Secuencia de oligo (5' to 3')	Producto de PCR (nt)
ARNm-NF2	Fw: CGTGAATGAAATCCGAAAC Rw: GAAAGCCGCTTCATGTCAGT	784
ARNm- Actina	Fwd: GGGTCAGAAGGACTCCTATG Rev: GGTCTCAAACATGATCTGGG	238
human/mouse-sncARN U6	Fwd: CTCGCTTCGGCAGCACA Rev: AACGCTTCACGAATTTGCGT	94
miR-146a stem-loop RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAA CCA	N/A
qPCR miR-146a	Fwd: GCGCACTCTTGACTTAAGGT	63
miR-7 stem-loop RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTT CTC	N/A
qPCR miR-7	Fwd: GCGCACCTTCTGATCACTAAAA	63
miR-32 stem-loop RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTG CAC	N/A
qPCR miR-32	Fwd: GGCGGCTATTGCACATTACTAA	63
miR-330 stem-loop RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCTC Fwd: GCAAAGCACACGGCCTG	N/A
qPCR miR-330 Universal	Rev: GTGCAGGGTCCGAGGT	63
N/A, no aplicable		

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados**

<b>Nombre del Antígeno</b>	<b>Inmunógeno</b>	<b>Especies hospederas; isotipo, fuente; No de catálogo; clona</b>	<b>Dilución de trabajo</b>
NF2	C-terminal de NF2 de origen humano	Policlonal de Conejo (IgG), Santa Cruz Biotechnology catálogo # sc-332, (C-18)	1:2500
p-NF2	Secuencia corta de aminoácidos que contiene NF2 fosforilada en Ser 518 de origen humano.	Policlonal de Conejo (IgG), Santa Cruz Biotechnology catálogo # sc-101735	1:2000
BrdU	Bromodeoxiuridina (BrdU) conjugada con una proteína transportadora	Monoclonal de Ratón (IgG1) Santa Cruz Biotechnology catálogo # sc-20045, (Bu20A)	1:1000
TNFR2	Aminoácidos 260-461 en el C-terminal de TNFR2 de origen humano	Policlonal de Conejo (IgG), Santa Cruz Biotechnology catálogo sc-7862,(H-202)	1:1000
$\beta$ -actina	Péptido correspondiente a residuos amino-terminales de $\beta$ -actina humana	Monoclonal de Ratón (IgG) Santa Cruz Biotechnology Cell Signaling Technology catálogo # 3700, (8H10D10)	1:6000
p-IKK $\alpha$ / $\beta$ (Ser176/180)	Fosfopéptido correspondiente a los residuos que rodean Ser176 / 180 de IKK $\alpha$ humano	Policlonal de Conejo (IgG), Cell Signaling Technology catálogo # 2697, (16A6)	1:1000
IKK $\beta$	Péptido correspondiente a residuos en el carboxilo terminal de la proteína IKK $\beta$ humana.	Monoclonal de Conejo (IgG), Cell Signaling Technology catálogo # 2370, (2C8)	1:1000
ERK2	Péptido correspondiente a la p42 MAP quinasa humana (Erk2)	Policlonal de Conejo (IgG), Cell Signaling Technology catálogo # 9108S	1:4000
biot-hTNF	TNF- $\alpha$ Humano	Monoclonal de ratón de biotinilado (IgG),Biolegend catálogo # 502913, (MAb11)	1:500

## ANEXO III: Publicaciones

**Artículo original:** Pérez-García, Erick I. Meza-Sosa, Karla F. López-Sevilla, Yaxem Camacho Concha, Nohemi. **Sánchez, Nilda C.** Pérez-Martínez, Leonor Pedraza-Alva, Gustavo. Merlin negative regulation by miR-146a promotes cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;468(4):594-600

**Artículo original:** **Nilda C. Sánchez,** Elisa Medrano-Jiménez, Diana Aguilar-León, Leonor Pérez-Martínez, Gustavo Pedraza-Alva. TNF-induced miR-146a upregulation promotes human lung adenocarcinoma metastasis. 2019 (Sometido, en revisión)