

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**UACM**

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE *SUN2* Y SUS  
IMPLICACIONES FUNCIONALES EN  
CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

PRESENTA:

**FIGUEROA RIVERA LESLIE OLIMPIA**

**DIRECTORA**

DRA. ANGELES C. TECALCO CRUZ, UACM

**CODIRECTORA**

DRA. MARINA MACÍAS SILVA, UNAM



## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

**Universidad Autónoma de la Ciudad de México**

**Plantel del Valle**

**Integración de Jurado**

Presidente: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Secretario: Dra. Lilia López Cánovas

Vocal: Dra. Marina Macías Silva

## **Agradecimientos académicos**

Este trabajo se llevó a cabo en el cubículo A-38 del Plantel del Valle, Posgrado en Ciencias Genómicas (PCG)-UACM y en el laboratorio 224N del Instituto de Fisiología Celular (IFC)-UNAM.

Esta tesis fue apoyada por los Proyectos de Investigación del Colegio de Ciencia y Tecnología (CCyT) de la UACM con el número de folio **CCYT-2022-08**.

Se reconoce a la **Dra. Angeles C. Tecalco Cruz** por la dirección del trabajo de investigación de la presente tesis. Se agradece la colaboración de la **Dra. Marina Macías Silva** como codirectora del presente trabajo.

Se reconoce y agradece la beca a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Genómicas de la UACM.

Se reconoce y agradece el apoyo otorgado por:

Dr. Carlo César Cortés González (INCan)  
Dr. Josué O. Ramírez Jarquín (IFC-UNAM)  
Biol. Marcela Sosa Garrocho (IFC-UNAM)  
Dra. Bibiana Ortega Domínguez (IFC-UNAM)

Se agradece a la **Unidad de Bioinformática y Manejo de Información del IFC-UNAM**, particularmente a la asesoría del Dr. Augusto César Poot Hernández y Carlos Alberto Peralta Álvarez.

Se agradece a la **Unidad de Microarreglos del DNA del IFC-UNAM**; al Dr. Jorge Ramírez, Lorena Chávez González y Simón Guzmán León.

Se agradece a la **Unidad de Imagenología del IFC-UNAM**; a la Dra. Ruth Rincón Heredia y Dr. Abraham Rosas Arellano.

Se agradece al **Taller de Mantenimiento Electrónico, Eléctrico y Mecánico**; Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortíz Benavides.

Se reconocen y agradecen al **Comité Asesor** de la presente tesis, conformado por:

Dr. César López Camarillo (PCG, UACM)  
Dra. Liliana López Cánovas (PCG, UACM)  
Dra. Elisa Azuara Liceaga (PCG, UACM)

Se reconocen y agradecen las sugerencias de los lectores de tesis:

Dra. Liliana López Cánovas (PCG, UACM)  
Dra. Elisa Azuara Liceaga (PCG, UACM)  
Dra. Helena Solleiro Villavicencio (PCG, UACM)

## **Agradecimientos personales y dedicatoria**

Este trabajo ha sido el fruto de muchas horas de desvelo, dedicación y disciplina, lo que gracias a mi mamá se me ha inculcado desde niña, pues paso a paso y haciendo cada día lo que debes hacer siempre tendrás a cambio la recompensa de tú esfuerzo, pero esto no hubiera sido posible sin ella, quién me impulso a continuar aún cuando pensé por un momento que era imposible, pero los limites solo se encuentran en tú mente pues, a pesar del cansancio tienes que luchar por y para ti, pues rendirse nunca ha sido una opción.

A mi tutora Ángeles por su orientación, a quién con paciencia y dedicación me impulso a sacar una mejor versión de mi como estudiante y como persona, reconociendo mis fortalezas y trabajando en ellas.

A mi cotutora Marina por su tiempo y esfuerzo, a quién con sus observaciones y comentarios el proyecto se fue enriqueciendo al paso del tiempo.

Al doctor Carlo Cesar quién me asesoro, e impulso a mejorar cuando tuve la oportunidad de trabajar con él, y por los consejos brindados para mejorar como profesionista.

Al doctor Josué y a la doctora Bibi, quienes me orientaron y aclararon mis dudas, por su tiempo e interés en mi proyecto, a quienes a través de sus asesorías podían visualizar desde otra perspectiva el proyecto.

A mis asesoras la doctora Lili, Elisa, y Helena por tomarse el tiempo y dedicación de leer mi tesis y hacer las correcciones necesarias para que esto fuera posible, gracias por su orientación.

A mi compañera Lucero quién me compartió su conocimiento y me ayudo a mejorar en cada técnica planteada, gracias por su tiempo y paciencia.

Y a mi compañero y amigo Marcos a quién a pesar del tiempo ha sido parte importante de mi vida y en esta etapa de mi vida no fue la excepción, gracias por recordarme el camino que he recorrido y lo que soy capaz de lograr.

*“Un paso a la vez siempre de la mano de Dios, si Dios esta  
conmigo nada me faltara”*

## INDÍCE

1. INTRODUCCIÓN .....	16
1.1 La envoltura nuclear y la regulación de la expresión génica.....	16
1.2 Complejo LINC.....	19
1.3 Características de la proteína SUN2 .....	20
1.4 Generalidades de los tumores del SNC.....	22
1.5 Meduloblastoma .....	27
2. ANTECEDENTES.....	34
2.1 Participación de la proteína SUN2 en cáncer .....	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	44
4. HIPÓTESIS .....	44
5. OBJETIVOS.....	44
5.1 Objetivo General.....	44
5.2 Objetivos particulares .....	44
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	45
7. METODOLOGÍA.....	46
7.1 Línea celular. ....	46
7.2 Microarreglo de tejido e inmunohistoquímica (IHC) .....	46
7.3 Análisis histológico de la IHC .....	48
7.4 Transfección transitoria del siRNA para SUN2 .....	48
7.5 Obtención de extractos totales .....	48
7.6 Electroforesis SDS-PAGE y Western blot.....	49
7.7 Ensayo de inmunofluorescencia .....	49
7.8 Microarreglo de cDNA y análisis ontológico .....	50
7.9 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de <i>SUN2</i> .....	50
7.10 Análisis estadístico .....	51
8. RESULTADOS .....	52
8.1 Expresión de <i>SUN2 in silico</i> en neoplasias malignas. ....	52
8.2 Análisis de expresión de <i>SUN2</i> en meduloblastoma. ....	59
Detección de <i>SUN2</i> en un microarreglo de meduloblastoma. ....	61
8.3 Identificación de genes modulados por la deficiencia de <i>SUN2</i> en células de meduloblastoma DAOY. ....	65
8.4 Análisis ontológico de los genes regulados por la deficiencia de <i>SUN2</i> .....	68

8.5 Investigación de los genes <i>TAS2R</i> .....	71
9. DISCUSIÓN .....	72
10. CONCLUSIONES .....	79
11. PERSPECTIVAS .....	80
12. REFERENCIAS .....	81

## Índice de tablas

Tabla I: Clasificación de tumores del SNC según la OMS de acuerdo a su histología e inmunohistoquímica (Louis <i>et al.</i> 2021). .....	22
Tabla II. La expresión de <i>SUN2</i> en diferentes carcinomas humanos .....	54
Tabla III. Análisis de score patológico por paciente, sexo, edad y tipo de tumor. ....	63
Tabla IV. Investigación bibliográfica de genes <i>TAS2R</i> modulados por <i>SUN2</i> .....	72

## Índice de figuras

Figura 1. Elementos de la envoltura nuclear. ....	18
Figura 2. Complejo LINC.....	19
Figura 3. Complejo LINC en la envoltura nuclear.....	20
Figura 4. Estructura de la proteína SUN2. ....	21
Figura 6. Vía canónica WNT .....	30
Figura 7. Vía Sonic Hedgehog .....	31
Figura 8. La relación de SUN2 con diferentes tipos de cáncer .....	38
Figura 9. SUN2 componente del complejo LINC.....	40
Figura 10. SUN2 y su asociación a las proteínas dedicadas a la exportación nuclear. ....	41
Figura 11. Asociación de SUN2 factores del complejo corte y empalme .....	42
Figura 12. Asociación de SUN2 al modular la expresión de genes asociados a cáncer. ....	43
Figura 13. Línea celular de meduloblastoma DAOY .....	46
Figura 14. Abundancia de la proteína SUN2 en cada órgano del cuerpo humano.....	52
Figura 15. Perfil de expresión en transcripciones por millón de RNAm de <i>SUN2</i> en el cerebro humano.....	53
Figura 16. La expresión de <i>SUN2</i> es reducida en neoplasias malignas respecto al tejido normal (UALCAN) .....	53
Figura 17. La expresión de <i>SUN2</i> es reducida en neoplasias malignas respecto al tejido normal (GEPIA).....	55
Figura 18. La expresión de <i>SUN2</i> en Leucemia mieloide aguda .....	57
Figura 19. Expresión de <i>SUN2</i> en neoplasias malignas del SNC. ....	57
Figura 20. Nivel de expresión de <i>SUN2</i> en cáncer pediátrico cerebral. ....	58
Figura 21. Expresión de <i>SUN2</i> en glioblastoma (SNC) es reducida en comparación con el tejido normal.....	59
Figura 22. La expresión de <i>SUN2</i> en meduloblastoma es mayor en comparación con el tejido normal.....	59
Figura 23. La expresión de <i>SUN2</i> se encuentra reducida en cáncer de colon con respecto al tejido normal. ....	60
Figura 24. <i>SUN2</i> se expresa en tejido de meduloblastoma y en el tejido normal de cerebelo no. ....	61
Figura 25. Detección de <i>SUN2</i> en tejidos de meduloblastoma obtenidos de diferentes zonas.....	62

Figura 26. Detección de SUN2 en tejidos de meduloblastoma obtenidos de hombres y mujeres.....	63
Figura 27. La detección de SUN2 es mayor en tejidos de meduloblastoma con respecto al grupo control.....	64
Figura 28. Inhibición de la expresión de SUN2 en células DAOY.....	66
Figura 29. Localización de SUN2.....	66
Figura 30. Volcano plot de genes expresados diferencialmente en las células DAOY-siSUN2.....	67
Figura 31. Análisis ontológico de genes que redujeron su expresión en células DAOY-siSUN2.....	69
Figura 32. Análisis de ontología génica de genes expresados diferencialmente en las células DAOY-siSUN2.....	70
Figura 33. Genes expresados diferencialmente al inhibir a SUN2.....	71
Figura 34. La expresión de SUN2 modifica la expresión de genes asociados a receptores de la familia TAS2R.....	78

## Abreviaturas

- ACC:** Del inglés Carcinoma of the adrenal cortex
- APC:** Del inglés Adenomatous polyposis coli
- ATP:** Del inglés Adenosine triphosphate
- ATRT:** Del inglés Atypical teratoid/rhabdoid tumor
- BDNF:** Del inglés Brain-Derived Neurotrophic Factor
- BDNF:** Del inglés Brain-derived neurotrophic factor
- BLCA:** Del inglés Urothelial of the bladder carcinoma
- BRCA:** Del inglés Invasive breast carcinoma
- CCK-8:** Del inglés Cell Counting Kit-8
- CESC:** Del inglés Squamous cell carcinoma of the uterine cervix and endocervical adenocarcinoma
- CFCT:** Del inglés CCCTC-binding factor
- CHOL:** Del inglés Cholangiocarcinoma
- CK1:** Del inglés casein kinase 1
- COAD:** Del inglés Adenocarcinoma of the colon
- DLBC:** Del inglés Diffuse large B-cell lymphoma
- DNA:** Del inglés Deoxyribonucleic acid
- Dvl:** Del inglés Disheveled
- EMBL-EBI:** Del inglés The European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute
- EN:** Envoltura nuclear
- ESCA:** Del inglés Esophageal carcinoma
- ESPL1:** Del inglés Extra Spindle Pole Bodies Like 1, Separase
- Fz:** Del inglés frizzled
- GBM:** Del inglés Glioblastoma multiforme
- GDP:** Del inglés Guanosine diphosphate
- GEPIA:** Del inglés Gene Expression Profiling Interactive Analysis
- GLUT1:** Del inglés Glucose transporter 1
- GPCRs:** Del inglés G protein-coupled receptors
- GSK3:** Del inglés glycogen synthetase kinase 3
- HNSC:** Del inglés Head and neck Squamous cell carcinoma

**HPA:** Del inglés The Human Protein Atlas

**IFC:** Instituto de Fisiología Celular

**IHC:** Del inglés Immunohistochemistry

**INCan:** Instituto Nacional de Cancerología

**KASH:** Del inglés Klarsicht, ANC-1, Syne homology

**KEGG:** Del inglés Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**KICH:** Del inglés Kidney Chromophobe

**KIRC:** Del inglés Kidney Renal clear cell carcinoma

**KIRP:** Del inglés Kidney renal papillary cell carcinoma

**LADs:** Del inglés Lamina-Associated Domains

**LAML:** Del inglés Acute Myeloid Leukemia

**LCR:** Líquido ceforraquídeo

**LDHA:** Del inglés Lactate Dehydrogenase A

**LEF:** Del inglés Lymphoid stimulating factor

**LGG:** Del inglés Brain Lower Grade Glioma

**LIHC:** Del inglés Liver hepatocellular carcinoma

**LINC:** Del inglés Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton

**LRP:** Del inglés LDL receptor protein

**LUAD:** Del inglés Lung adenocarcinoma

**LUSC:** Del inglés Lung squamous cell carcinoma

**MAU2:** Del inglés Sister Chromatid Cohesion Factor

**MeCP2:** Del inglés Methyl-CpG binding protein 2

**MESO:** Del inglés Mesothelioma

**NHP2L1:** Del inglés Non-Histone Chromosome Protein 2-Like 1

**NPC:** Del inglés Nuclear Pore Complexes

**nTPM:** Del inglés Normalized Transcriptions per million

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OV:** Del inglés Ovarian serous cystadenocarcinoma

**PAAD:** Del inglés Pancreatic adenocarcinoma

**PCPG:** Del inglés Pheochromocytoma and Paraganglioma

**PRAD:** Del inglés Prostate adenocarcinoma

**PRPF4B:** Del inglés pre-mRNA processing factor 4B

**PTCH1:** Del inglés Protein patched homolog 1  
**RAB5:** Del inglés Ras-related protein in brain 5  
**READ:** Del inglés Rectal adenocarcinoma  
**RMN:** Resonancia magnética nuclear  
**RNA:** Del inglés Ribonucleic acid  
**SAA1:** Del inglés Serum myeloid A1  
**SARC:** Del inglés Sarcoma  
**SF3B3:** Del inglés Splicing factor 3b subunit 3  
**SG:** Supervivencia global  
**SHH:** Del inglés Sonic Hedgehog  
**SKCM:** Del inglés Skin Cutaneous Melanoma  
**SMC1:** Del inglés Structural maintenance of chromosomes protein 1  
**SMO9:** Del inglés Smoothed  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**SNRPD2:** Del inglés Small Nuclear Ribonucleoprotein D2 Polypeptide  
**SNRPD3:** Del inglés Small Nuclear Ribonucleoprotein D3 Polypeptide  
**STAD:** Del inglés Stomach adenocarcinoma  
**SUN1:** Del inglés Sad1 And UNC84 Domain Containing 1  
**SUN2:** Del inglés Sad1 And UNC84 Domain Containing 2  
**SWI/SNF:** Del inglés SWItch/Sucrose Non-Fermentable  
**SYNE2:** Del inglés Pectrin repeat containing nuclear envelope protein 2  
**TADs:** Del inglés Topologically Associating Domains  
**TAS2R1:** Del inglés Taste 2 receptor member 1  
**TAS2R4:** Del inglés Taste 2 receptor member 4  
**TASR13:** Del inglés Taste 2 receptor member 13  
**TASR16:** Del inglés Taste 2 receptor member 16  
**TCF:** Del inglés T cell factor  
**TGCT:** Del inglés Testicular Germ Cell Tumors  
**THCA:** Del inglés Thyroid carcinoma  
**THYM:** Del inglés Thymoma  
**TNBC:** Del inglés Triple-negative breast cancer  
**UCEC:** Del inglés Uterine Corpus Endometrial Carcinoma

**UCS:** Del inglés Uterine Carcinosarcoma

**UVM:** Del inglés Uveal Melanoma

**WB:** Del inglés Western Blot

**WNT:** Del inglés Wingless

## RESUMEN

SUN2 es una proteína integral de la membrana nuclear que participa en la comunicación entre el núcleo y el citoplasma, y el mantenimiento de la integridad nuclear. SUN2 se asocia con las proteínas de la lámina nuclear, por lo que se ha propuesto que SUN2 podría estar implicada en los mecanismos reguladores de la expresión génica. En algunos carcinomas, SUN2 tienen una expresión disminuida en comparación con el tejido sano y muestra actividades supresoras de tumores, correlacionando negativamente su expresión con la de algunos genes, entre ellos, genes asociados al efecto Warburg con actividad pro-tumoral. Sin embargo, no se conoce si la expresión de *SUN2* tiene algún efecto sobre el perfil de expresión de otros genes en otros tipos de cáncer como el meduloblastoma. El meduloblastoma es un tumor pediátrico grado IV que se origina en el cerebelo y se expande al resto del sistema nervioso central (SNC). Este trabajo tiene como objetivo analizar el efecto de SUN2 sobre la expresión génica en células derivadas de meduloblastoma, realizando un análisis *in silico* e *in vitro*, mediante el uso de un microarreglo de tejido de meduloblastoma, y un microarreglo de cDNA. En este trabajo, se encontró que la expresión de *SUN2* varía dependiendo del tipo de cáncer. Particularmente, en meduloblastoma, la expresión de *SUN2* es mayor que en el tejido normal correspondiente. La detección de la proteína SUN2 mediante inmunohistoquímica, también fue mayor en tejido de meduloblastoma humano que en tejido del SNC libre de enfermedad. Para ver el efecto de la disminución de la expresión de *SUN2* se transfectó un RNA interferente (siSUN2) en las células de meduloblastoma DAOY, reduciendo los niveles de la proteína SUN2 en la envoltura nuclear. De acuerdo al análisis ontológico, los genes subexpresados en células deficientes de SUN2 participan en vías de transducción de señales, principalmente de los receptores del gusto del sabor amargo TAS2R. Estos receptores se expresan en tejido oral y extraoral y han sido implicados en algunos tipos de cáncer, pero no existen a la fecha estudios en meduloblastoma. Nuestros resultados sugieren por primera vez que la deficiencia de SUN2 en el contexto de meduloblastoma podría disminuir la expresión de los receptores TAS2R, pero es necesario más estudios para corroborarlo y demostrar la relevancia funcional de estos resultados.

## **Abstract**

SUN2 is an integral protein of the nuclear membrane involved in communicating between the nucleus and the cytoplasm and maintaining nuclear integrity. SUN2 is associated with nuclear lamina proteins, so it has been proposed that SUN2 could be involved in the regulatory mechanisms of gene expression. In some carcinomas, it has been reported that SUN2 has a decreased expression compared to healthy tissue and shows tumor suppressors, negatively correlating its expression with some genes with protumoral activity, such as genes associated with the Warburg effect. However, it is not known whether the expression of SUN2 has any effect on the expression profile of other genes, particularly in other types of cancer, such as medulloblastoma. Medulloblastoma is a grade IV tumor that originates in the cerebellum and can spread to other areas of the central nervous system (CNS), mainly appearing in pediatric patients. This work found that the expression of SUN2 varies in various types of malignant neoplasms depending on the cell type. Particularly, in medulloblastoma, the expression of SUN2 is higher than in the corresponding normal tissue.

Consequently, the detection of SUN2 protein by immunohistochemistry was higher in human medulloblastoma tissue than in disease-free CNS tissue. Therefore, to see the effect of the decrease in the expression of SUN2, an interfering RNA (siSUN2) was transfected into the DAOY medulloblastoma cells, observing a significant decrease in the levels of the SUN2 protein in the nuclear envelope. According to the results of the ontological analysis of genes underexpressed in SUN2-deficient cells, they participate in signal transduction pathways, and genes encoding the TAS2R family of bitter taste receptors are enriched. These receptors are expressed in oral and extraoral tissue and have been implicated in some types of cancer, but to date, there are no studies in medulloblastoma. Our results suggest for the first time that SUN2 deficiency in the context of medulloblastoma could decrease the expression of TAS2R receptors. Still, more studies are needed to confirm this and demonstrate the functional relevance of these results.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 La envoltura nuclear y la regulación de la expresión génica

La envoltura nuclear (EN) en las células eucariontes es un sistema de endomembranas que sirve como barrera para separar al núcleo del citoplasma y se encarga de organizar al genoma dándole estabilidad, además de que tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y de la reparación del DNA. La envoltura nuclear también brinda integridad a la estructura nuclear dentro de la célula y se conoce que cumple un papel importante en el ciclo celular, al actuar como un ancla para el centrosoma, además de que se le ha implicado en la señalización y la mecanotransducción a través de las membranas nucleares (Hampoelz, et, al. 2022).

La EN se divide principalmente en tres dominios con diferencias morfológicas que se encuentran interconectados: membrana nuclear interna (INM), membrana nuclear externa (ONM) y el espacio perinuclear entre las membranas de 30 a 50 nm. Estas membranas son atravesadas por los poros nucleares que permiten el transporte de macromoléculas (Figura 1).

La OMN se conecta al citoesqueleto a través de proteínas integrales, las cuales se conectan con las proteínas de la INM en el espacio perinuclear, permitiendo una comunicación del citoesqueleto con el nucleoesqueleto conformado por la lámina nuclear (Alvarado, et, al. 2019). Las proteínas de la lámina nuclear denominadas láminas corresponden a polipéptidos de 65 kDa y cuatro de estas proteínas están expresadas en células somáticas de mamíferos. Las proteínas lámina tipo A se clasifican en A y C, las cuales son codificadas por el gen *LMN* y generadas por corte y empalme del ARN mensajero (mRNA por sus siglas en inglés). Las proteínas lámina tipo B en B1 y B2, y están codificadas por los genes *LMNB1* y *LMNB2*, respectivamente. Además, las láminas C2 y B3 son codificadas por los genes *LMNA* y *LMNB1*, respectivamente (Alvarado, et, al. 2019).

La INM está conformada por diversas proteínas dentro de las que se encuentran las proteínas de dominio LEM (LAP2, Emerin y MAN1), que se caracterizan por asociarse con otras proteínas que forman parte de complejos capaces de modificar la estructura de la cromatina.

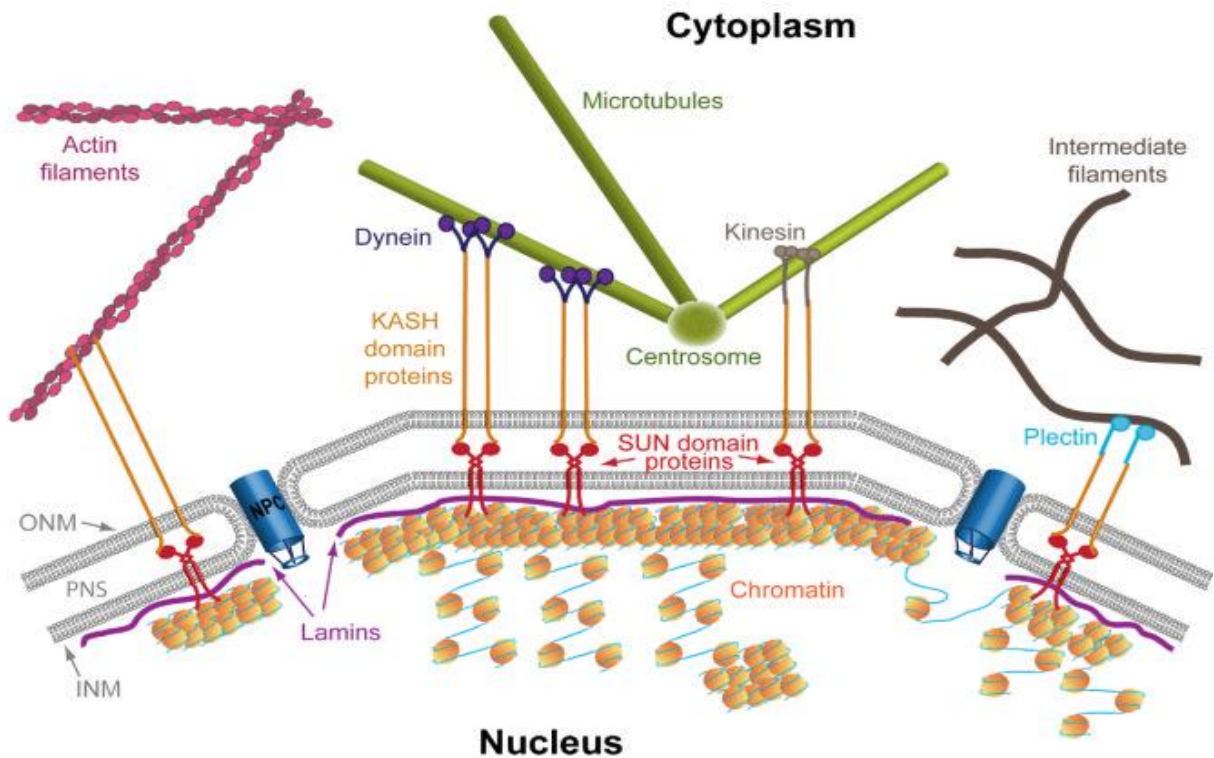
Por otro lado, los complejos de poros nucleares están conformados por ~1000 copias de 30 nucleoporinas que se ensamblan en subcomplejos implicados en el transporte de moléculas (Hampoelz, et, al. 2022). Por lo tanto, la INM está vinculada con los diversos mecanismos para la modulación de la expresión génica, siendo este proceso determinante para la morfología y funcionalidad de diferentes tipos de células, e impacta en el desarrollo de enfermedades y el envejecimiento. Entre dichos mecanismos se encuentran: la modificación de histonas (desacetilación y acetilación), la remodelación de la cromatina por SWI/SNF y la metilación del DNA, por mencionar algunos (Tecalco, et. al, 2021).

Cabe señalar que en el nucleoplasma la cromatina se encuentra organizada en compartimentos denominados LAD, TAD (del inglés, Lamin-associated domains, y, *Topologically associating domains*) y territorios cromosómicos. Los LAD son dominios de la cromatina que se asocian a la lámina nuclear, mientras que los TAD son dominios de la cromatina distales. En la periferia nuclear (compartimento B-organizado en TAD) se encuentra la cromatina inactiva (heterocromatina), en donde hay genes silenciados que codifican para distintas proteínas y hay elementos transponibles, mientras que en el interior del núcleo (compartimento A-organizado en TAD) se encuentra la cromatina activa que está menos condensada (eucromatina), y para mantener la estabilización de estos *loops* en la cromatina se requiere de la participación de las proteínas estructurales como CFCT (del inglés CCCTC-binding factor) y los complejos de cohesinas (Tecalco, et. al., 2021).

Por lo tanto, las proteínas de los poros nucleares y las proteínas transmembranales de la INM pueden asociarse con la cromatina para su organización. Un ejemplo de esto es el receptor de lámina B (LBR) y el polipéptido asociado a timopoyetina/lámina (LAP)2 $\beta$ , los cuales se unen a lámina B (Figura 1); LAP2 $\beta$  proporciona sitios de acoplamiento para la cromatina, manteniendo la asociación con histonas. Además, otras proteínas como LAMP2 $\beta$  y emerina se unen en la periferia nuclear con la desacetilasa de histona HDAC3, la cual puede participar en la represión de genes a través de la desacetilación de histonas. Otro ejemplo es NET39, una proteína de

envoltura nuclear que al asociarse con la lámina reprime al gen *Nid1* en las primeras etapas de la miogénesis (Briand, y Collas, 2020).

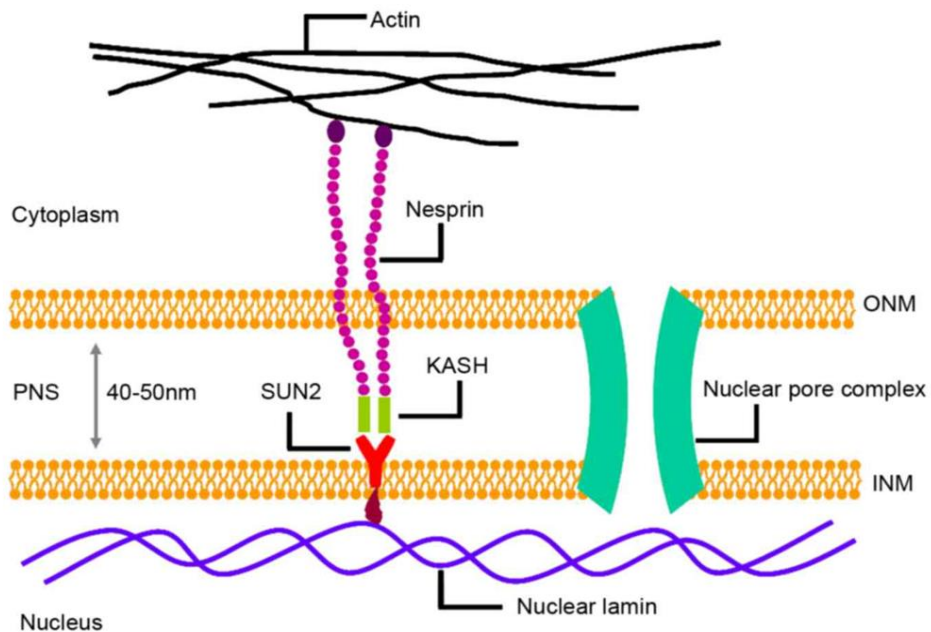
En resumen, los componentes de la envoltura nuclear conducen a que esta estructura celular sirva no solo como barrera si no también regulando al transporte núcleo-citoplasmático, a la organización de la cromatina y a la expresión génica.



**Figura 1.** Elementos de la envoltura nuclear. SUN2 es una proteína de envoltura nuclear que está involucrada en la comunicación nucleoesqueleto-citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios) permitiendo la estabilidad celular. Por su interacción con la lámina, SUN2 podría estar involucrada en procesos de regulación génica que ocurren en la cromatina. Abreviaturas: ONM: membrana nuclear externa, INM: membrana nuclear interna, PNS: espacio entre membranas, complejo LINC. (Tomado de Gerlitz, G. y Bustin, M. Trends in Cell Biology, 2011).

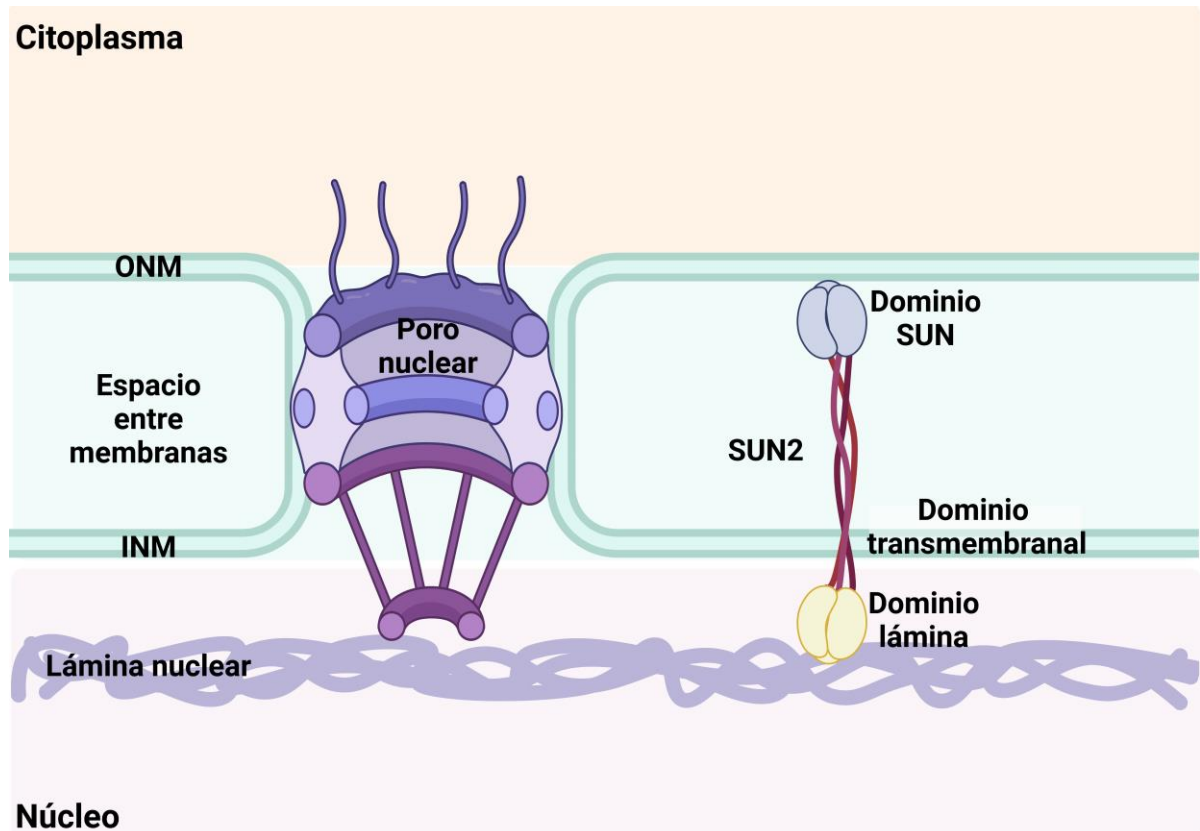
## 1.2 Complejo LINC

El complejo LINC (del inglés, *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) permite una conexión entre el citoesqueleto y el núcleoesqueleto, y está conformado por una proteína con dominio KASH (del inglés, *Klarsicht, ANC-1, Syne homology*) de la ONM y por una proteína con dominio SUN (del inglés, *Sad1 And UNC84 Domain*) de la INM, que mantienen una estrecha asociación con la lámina nuclear (Khilan, 2021). Una de las más importantes proteínas con dominio SUN es SUN2, la cual se asocia con el dominio KASH de la proteína Nesprina, la cual une a elementos del citoesqueleto, como, por ejemplo: nesprina-1 y -2 con filamentos de actina, nesprina-3 con filamentos intermedios y nesprina-4 con microtúbulos. Por lo tanto, el complejo LINC estabiliza a la envoltura nuclear contra las fuerzas citoplasmáticas y de esta manera facilita el posicionamiento del núcleo, regulando algunos procesos celulares, como son: la división celular, el establecimiento de la polaridad celular, la migración celular y la diferenciación (Figura 2) (Bouzid, *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Complejo LINC: lámina nuclear, SUN1 y SUN2, dominio KASH de Nesprina, elementos del citoesqueleto: actina, microtúbulos, filamentos intermedios (Tomado de Chen, X. *et al.* *Oncology Letters*. 2018).

De los elementos del complejo LINC, este trabajo se centra en estudiar a la proteína SUN2, la cual es una proteína que se encarga de transmitir estímulos a través de la conexión mecánica a la cromatina, a la lámina y al complejo del poro nuclear (NPC) (Figura 3).



**Figura 3.** Complejo LINC en la envoltura nuclear. SUN2 es una proteína conformada por tres dominios (dominio lámina, dominio transmembranal, y dominio SUN) y forma parte del complejo LINC el cual sirve como puente para comunicar elementos del nucleoesqueleto y citoesqueleto, permitiendo la estabilidad celular. Abreviaturas: Lámina nuclear, INM: membrana nuclear interna, espacio entre membranas, ONM: membrana nuclear externa, citoplasma, poro nuclear, dominio lámina, dominio transmembranal, proteína SUN2, dominio SUN2 y citoplasma (Tomado de Figueroa *et al.* 2023).

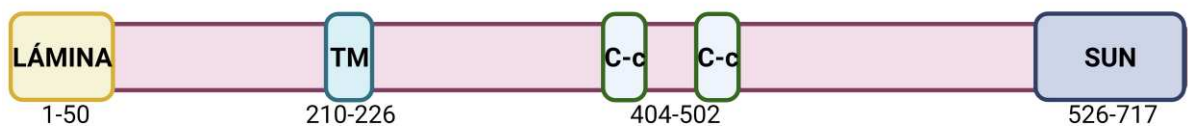
### 1.3 Características de la proteína SUN2

La proteína SUN2 es un miembro de la familia de proteínas con dominio SUN. Todos los miembros de la familia SUN (SUN1, SUN2, SUN3, SPAG4 y SPAG4L) son proteínas de la INM que están conservadas y contienen al menos un dominio

transmembranal y un dominio SUN C-terminal. Dentro de estas, las que se expresan principalmente son SUN1 y SUN2, las cuales contienen tres dominios transmembranales que se encuentran localizados en la INM, mientras que el dominio SUN C-terminal está en el espacio periplásmico entre la ONM y la INM. Es importante destacar que el dominio N-terminal es capaz de unir a las láminas de tipo A, además de que presenta dominios enrollados en espiral y participa en la formación de homodímeros y heterodímeros (Méjat, et al., 2010).

SUN2 es una proteína de la envoltura nuclear, conservada en los eucariotas y codificada por el gen *UNC84B*. La proteína SUN2 contiene 717 aminoácidos y presenta tres importantes dominios: dominio transmembranal (TM), dominios helicoidales (CC) y dominio SUN (Figura 4); forma un trímero y tiene un peso molecular de 80 kDa (Liang et. al, 2011).

## SUN2



**Figura 4.** Estructura de la proteína SUN2. De izquierda a derecha dominios de la proteína SUN2: dominio lámina, dominio TM: transmembrana, C-c: dominio *coiled coil*, dominio SUN (Tomado de Figueroa et, al. 2023).

Dentro de las modificaciones postraduccionales de SUN2 se ha descrito la glucosilación en Asn636, la ubiquitinación en Lys300, Lys392, Lys409, Lys491, Lys533 y Lys570, así como la fosforilación de SUN2, sin conocerse completamente las implicaciones funcionales de estas modificaciones (Jahed, 2015).

SUN2 cumple un papel importante en el complejo LINC (Figura 5) y por lo tanto en el ciclo celular, participando así en el anclaje, migración y posicionamiento del núcleo en la meiosis, así como en la localización del centrómero. Las alteraciones en SUN2 pueden causar enfermedades tales como la distrofia muscular de Emery-Dreifuss y la emerinopatía (Meinke, et al. 2014).

Además, en algunos tipos de cáncer la expresión de *SUN2* se ha reportado desregulada, por lo cual este trabajo, se enfocó a estudiar a *SUN2* en el contexto de del meduloblastoma. Para tener un mejor entendimiento del modelo de estudio, a continuación, se describen las generalidades de los tumores del SNC y particularmente del meduloblastoma.

#### 1.4 Generalidades de los tumores del SNC

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales. En general, las causas de su desarrollo se deben a factores externos (agentes químicos, consumo de tabaco, infecciones y radiaciones) e internos (mutaciones heredadas, consecuencia del propio metabolismo, hormonas, y condiciones inmunológicas (Barrios y Garau, 2017).

Los tumores cerebrales ocupan el lugar 19 entre todas las neoplasias, los tumores primarios tienen una incidencia de 21.42 por 10000 habitantes y los secundarios de 10 por 10000 habitantes, siendo la segunda causa de mortalidad en el mundo debida a tumores del SNC en edad pediátrica (Contreras, 2017). Al respecto, Globocan reportó que en el 2020 hubo 2,571 muertes asociadas a tumores del SNC en México (Contreras, 2017). Por otra parte, en el 2021 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a los tumores del SNC, de la siguiente manera (Tabla I):

**Tabla I:** Clasificación de tumores del SNC según la OMS de acuerdo a su histología e inmunohistoquímica (Louis *et al.* 2021).

<b>Clasificación de tumores del SNC central de la OMS</b>
<b>Gliomas, tumores glioneuronales y tumores neuronales</b>
Gliomas difusos de tipo adulto
Astrocitoma, IDH-mutante
Oligodendroglioma, IDH-mutante y 1p/19q-codeleciónado
Glioblastoma, tipo salvaje IDH
<b>Gliomas difusos de bajo grado de tipo pediátrico</b>

Astrocitoma difuso, MYB - o MYBL1 - alterado
Glioma angiocéntrico
Tumor neuroepitelial polimorfo de bajo grado del joven
Glioma difuso de bajo grado, alterado en la vía MAPK
<b>Gliomas difusos de alto grado de tipo pediátrico</b>
Glioma difuso de línea media, H3 K27-alterado
Glioma hemisférico difuso, H3 G34-mutante
Glioma difuso de alto grado de tipo pediátrico, H3-wildtype e IDH-wildtype
Glioma hemisférico de tipo infantil
<b>Gliomas astrocíticos circunscritos</b>
Astrocitoma pilocítico
Astrocitoma de alto grado con características piloides
Xantoastrocitoma pleomórfico
Astrocitoma subependimario de células gigantes
Glioma cordoideo
Astroblastoma, MN1 -alterado
<b>Tumores glioneuronales y neuronales</b>
Ganglioglioma
Ganglioglioma infantil desmoplásico / astrocitoma infantil desmoplásico
Tumor neuroepitelial disembrionárico
Tumor glioneuronal difuso con características similares a oligodendroglioma y grupos nucleares
Tumor glioneuronal papilar
Tumor glioneuronal formador de rosetas
Tumor glioneuronal mixoide
Tumor glioneuronal leptomeníngeo difuso
Gangliocitoma
Tumor neuronal multinodular y vacuolizante
Gangliocitoma cerebeloso displásico (enfermedad de Lhermitte-Duclos)
neurocitoma central
neurocitoma extraventricular

Liponeurocitoma cerebeloso
<b>Tumores ependimarios</b>
Ependimoma supratentorial
Ependimoma supratentorial, fusión ZFTA positiva
Ependimoma supratentorial, fusión YAP1 positiva
Ependimoma de fosa posterior
Ependimoma de fosa posterior, grupo PFA
Ependimoma de fosa posterior, grupo PFB
ependimoma espinal
Ependimoma espinal, MYCN -amplificado
Ependimoma mixopapilar
subependimoma
<b>Tumores del plexo coroideo</b>
Papiloma del plexo coroideo
Papiloma de plexo coroideo atípico
Carcinoma de plexo coroideo
<b>Tumores embrionarios</b>
Meduloblastoma
Meduloblastomas, definidos molecularmente
Meduloblastoma, activado por WNT
Meduloblastoma, activado por SHH y TP53 de tipo salvaje
Meduloblastoma, activado por SHH y mutante en TP53
Meduloblastoma, no WNT/no SHH
Meduloblastomas, definidos histológicamente
<b>Otros tumores embrionarios del SNC</b>
Tumor teratoideo/rabdoideo atípico
Tumor neuroepitelial cribiforme
Tumor embrionario con rosetas multicapa
Neuroblastoma del SNC, activado por FOXR2
Tumor del SNC con duplicación interna en tándem de BCOR
Tumor embrionario del SNC

<b>Tumores pineales</b>
Pineocitoma
Tumor del parénquima pineal de diferenciación intermedia
pineoblastoma
Tumor papilar de la región pineal
Tumor mixoide desmoplásico de la región pineal, SMARCB1 - mutante
<b>Tumores de los nervios craneales y paraespinales</b>
Schwanoma
Neurofibroma
Perineurioma
Tumor híbrido de la vaina nerviosa
Tumor maligno de la vaina del nervio melanótico
Tumor maligno de la vaina del nervio periférico
Paraganglioma
<b>Meningiomas</b>
Meningioma
<b>Tumores mesenquimales, no meningoteliales</b>
Tumores de tejidos blandos
Tumores fibroblásticos y miofibroblásticos
Tumor fibroso solitario
Tumores vasculares
Hemangiomas y malformaciones vasculares
hemangioblastoma
Tumores del músculo esquelético
Rabdomiosarcoma
Diferenciación incierta
Tumor mesenquimatoso intracraneal, fusión FET-CREB positiva
CIC -sarcoma reordenado
Sarcoma intracraneal primario, mutante DICER1
sarcoma de Ewing
<b>Tumores condroóseos</b>

Tumores condrogénicos
condrosarcoma mesenquimatoso
condrosarcoma
Tumores notocordales
Cordoma (incluyendo cordoma pobremente diferenciado)
<b>Tumores melanocíticos</b>
Neoplasias melanocíticas meníngeas difusas
Melanocitosis meníngea y melanomatosis meníngea
Neoplasias melanocíticas meníngeas circunscritas
Melanocitoma meníngeo y melanoma meníngeo
<b>Tumores hematolinfoides</b>
Linfomas
Linfomas del SNC
Linfoma primario difuso de células B grandes del SNC
Linfoma del SNC asociado a inmunodeficiencia
Granulomatosis linfomatoide
Linfoma intravascular de células B grandes
Varios linfomas raros en el SNC
Linfoma MALT de la duramadre
Otros linfomas de células B de bajo grado del SNC
Linfoma anaplásico de células grandes ( ALK +/- ALK -)
Linfomas de células T y NK/células T
<b>Tumores histiocíticos</b>
Enfermedad de Erdheim-Chester
Enfermedad de Rosai-Dorfman
Xantogranuloma juvenil
Histiocitosis de células de Langerhans
Sarcoma histiocítico
<b>Tumores de células germinales</b>
Teratoma maduro
Teratoma inmaduro

Teratoma con malignidad de tipo somático
germinoma
Carcinoma embrionario
Tumor del saco vitelino
coriocarcinoma
Tumor mixto de células germinales
<b>Tumores de la región selar</b>
Craneofaringioma adamantinomatoso
Craneofaringioma papilar
Pituicitoma, tumor de células granulares de la región selar y oncocitoma de células fusiformes
Adenoma hipofisario/PitNET
Blastoma hipofisario
<b>Metástasis al SNC</b>
Metástasis en el cerebro y el parénquima de la médula espinal
Metástasis a las meninges

Sin embargo, en este trabajo solo nos enfocamos en el meduloblastoma, del cual se hablará a profundidad en las siguientes secciones.

### **1.5 Meduloblastoma**

El meduloblastoma representa el 20% de los tumores malignos presentes en el SNC en edad pediátrica, representando un importante problema de morbilidad y mortalidad (Dhanyamraju, *et al.*, 2020). De acuerdo con lo reportado por la OMS en el 2016, el meduloblastoma se considera un tumor de clasificación IV, por ser de rápido crecimiento, con alta tasa mitótica, presentando vasos de neoformación y áreas de necrosis. Este tipo de cáncer se presenta preferentemente en la población pediátrica (menores de 16 años) (Sinning, 2017). Se ha reportado que en países desarrollados solo se tiene una supervivencia del 14% (pueden vivir más de 10 años) para los casos de meduloblastoma (Alegría, *et al.*, 2017).

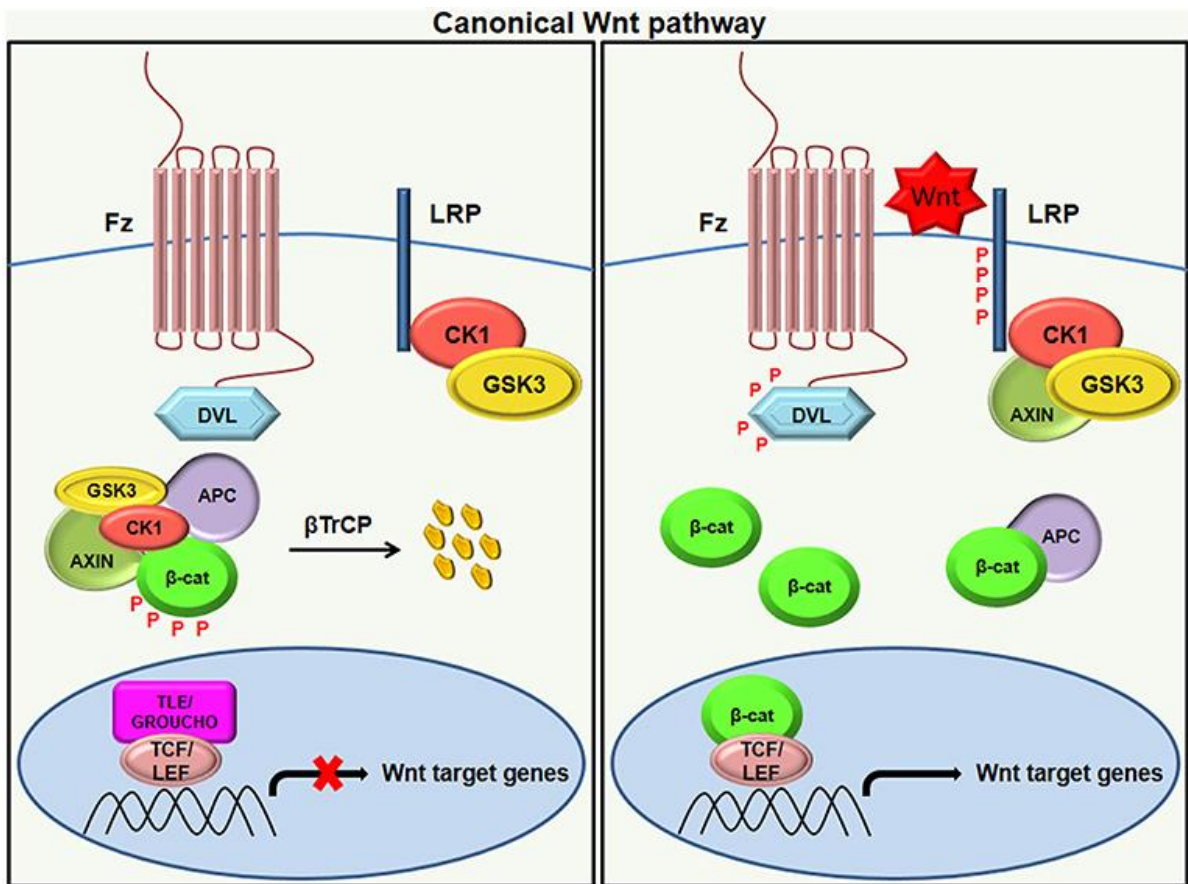
El meduloblastoma (un tumor neuroectodérmico primitivo) se origina en la capa granular externa del cerebelo y tiene la capacidad de migrar al pedúnculo cerebeloso y al IV ventrículo, teniendo la capacidad de diseminarse a través del líquido cefalorraquídeo intracranalmente hasta llegar a la médula espinal y a cualquier zona del cerebro (Pabón, *et al*, 2018). En general, se ha reportado que gracias a la barrera hematoencefálica, el meduloblastoma no suele migrar hacia otros tejidos, por lo que afecta solamente al SNC (Pabón, *et al*, 2018).

Hasta el momento hay cuatro tipos histológicos en el meduloblastoma: meduloblastoma clásico, meduloblastoma de células grandes/anaplásico, meduloblastoma desmoplásico/nodular y meduloblastoma con nodularidad extensa. La variante más comúnmente vista es la desmoplásica, la cual se presenta preferentemente en niños mayores de 16 años y adultos (10% y 20% de todos casos de meduloblastoma, respectivamente) y tiene un alto contenido de colágeno y reticulina en espacios intersticiales, asociándose con mutaciones en el gen *patched-1 (PTCH1)* en el cromosoma 9; este tipo de variante se le ha asociado con un mejor pronóstico. Por otro lado, se encuentra el meduloblastoma de células grandes, también llamado anaplásico, su principal característica es que tiene la capacidad de diseminarse a través del líquido cefalorraquídeo, por lo que se considera más agresivo, con una actividad de mitosis alta y se asocia con el grupo 4 en adultos, y 3 en niños. Por último está el meduloblastoma con nodularidad extensa, el cual se presenta en niños y tiene un patrón lobulado, poca reticulina, y tiene un pronóstico favorable (Louis, *et al*. 2021).

La OMS en el 2021 publicó una clasificación del meduloblastoma según su perfil molecular, dividiéndolo en cuatro subtipos: el primero denominado Wingless (WNT), el segundo denominado Sonic Hedgehog (SHH) que se subdivide en TP53-mutant y TP53-wildtype, el nombre de los subtipos antes mencionados se debe a la vía de señalización que se encuentra activada en dichos tumores (Hovestadt, *et al.*, 2020), el grupo III donde se sobreexpresa el oncogen *MYC* y el grupo IV donde se sobreexpresa el oncogen *MYCN*. La tasa de supervivencia global a los 5 años de los pacientes con meduloblastoma es del 64.7%, aunque el pronóstico varía mucho entre los diferentes subgrupos tumorales.

**Meduloblastoma del grupo WNT.** El primer subtipo denominado Wingless (WNT) representa el 10% de los casos, se presenta principalmente en mayores de 3 años, tanto en hombres como en mujeres. Su histología suele ser clásica y, al momento del diagnóstico, rara vez son metastásicos; los pacientes presentan una supervivencia a los 5 años del 95 %, y la línea celular característica es la MDE5R (Louis et al. 2021).

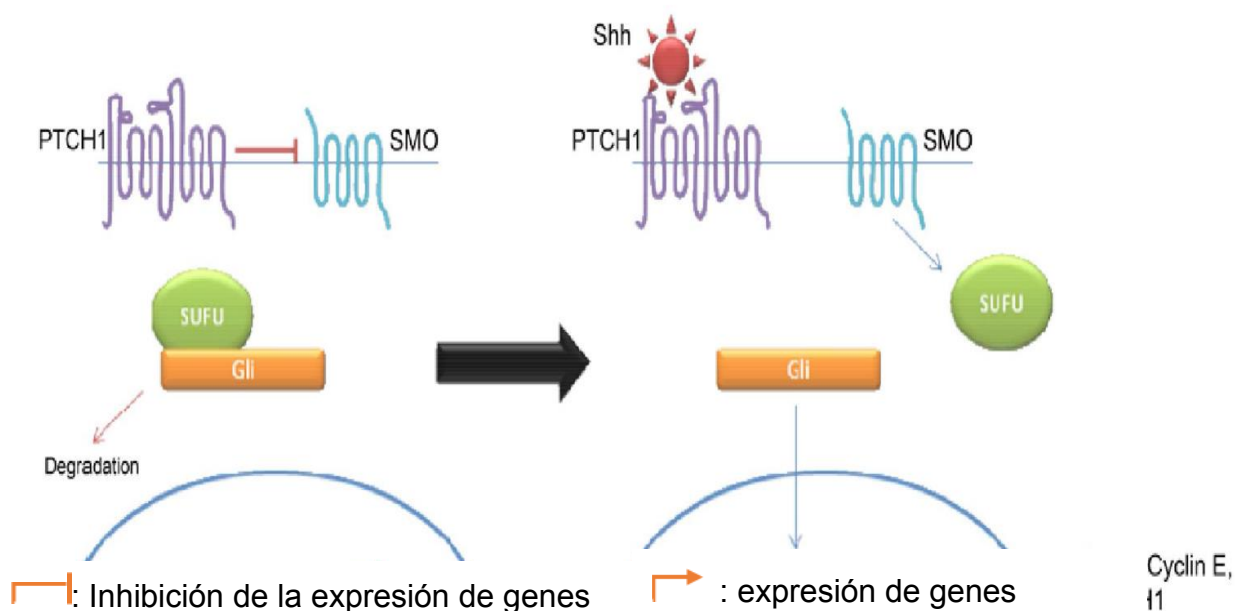
La vía canónica Wnt depende de la estabilidad de la beta-catenina. Las proteínas Wnt se acoplan al receptor Fz (frizzled), el cual forma un complejo con la proteína receptora de LDL (LRP), esta unión activa una cascada de señalización en donde participan las proteínas intracelulares Dvl (Disheveled), la cinasa 3 de la sintetasa del glucógeno (GSK3), la proteína APC (poliposis adenomatosa coli) y la cinasa 1 de caseína (CK1) (Giraldo, et al, 2015). En reposo, la beta-catenina es fosforilada por la GSK30 y forma un complejo con APC, axina y CK1, conduciendo a que la beta-catenina sea marcada mediante ubiquitinación para proteólisis. En estado activo, la unión Wnt con el complejo Fz/LRP activa a la proteína Dvl, y desacopla el complejo multiproteico inactivando la GSK30, favoreciendo la acumulación de beta-catenina en el citoplasma y posterior translocación al núcleo, en donde se asocia con LEF (factor estimulador linfoide) y TCF (factor de célula T) causando así la activación transcripcional de genes específicos (Figura 6) (Giraldo, et al, 2015).



**Figura 6. Vía canónica WNT:** En la izquierda esta la ausencia de ligando Wnt, se fosforila la  $\beta$ -catenina por el complejo (APC, CK1, y GSK3 $\beta$ ) produciendo la ubiquitinación por  $\beta$ -TrCP dirigiéndolo a la degradación proteasomal, la ausencia de la  $\beta$ -catenina permite la unión del complejo represor (TCF/LEF y TLE) reprimiendo la actividad el gen objetivo. En la derecha se encuentra la presencia del ligando Wnt que se une al receptor Frizzled y al correceptor LRP, los receptores LRP se fosforilan por CK1 y GSK3 $\beta$ , y permite el reclutamiento de proteínas Dvl a la membrana plasmática activando y construyendo el complejo de  $\beta$ -catenina, y al acumularse  $\beta$ -catenina en el citoplasma permite la formación del complejo TCF/LEF permitiendo la transcripción de los genes diana. Abreviaturas: Fz: frizzled, LRP, complejo con la proteína receptora de LDL, Dvl: proteínas intracelulares (Disheveled), GSK30: glucógeno sintasa cinasa 30, APC: poliposis adenomatosa coli y CK1: caseína quinasa 1, LEF: Factor estimulador linfoide, TCF: Factor de célula T que causa la activación transcripcional de genes específicos,  $\beta$ -cat:  $\beta$ -catenina (Tomado de Patel, *et al.* 2017)

**Meduloblastoma del grupo Sonic Hedgehog.** Sonic Hedgehog (SHH) se subdivide en TP53-mutante y TP53-silvestre, representa el 30% de los casos de meduloblastoma y se presenta principalmente entre los 3-16 años, y excepcionalmente se ha reportado en mayores de 16 años, presentándose tanto en hombres como en mujeres, además es el subtipo más común en bebés y adultos,

con un pronóstico favorable (77% de supervivencia a los 10 años en lactantes) (Louis et al. 2021). Su histología es desmoplásica y la línea celular característica es DAOY. La vía SHH es activada por el ligando SHH que se une al receptor transmembranal PATCHED1 (PTCH1). Al estar ausente la proteína SHH, el receptor PTCH1 se une a la proteína SMO (smothened) para inhibirla, conduciendo a que la proteína SUFU inhiba a los factores de transcripción Gli que son los encargados de llevar a cabo la transcripción de genes blanco de la vía SHH (figura 7). En presencia del ligando SHH, es posible la acumulación de Gli en el núcleo para promover la expresión que genes pro-tumorigénicos (Figura 7) (De la Cruz, *et al*, 2017).



**Figura 7.** Vía Sonic Hedgehog: En la izquierda está la ausencia de la proteína shh y el complejo SUFU-Gli se forma llevándolo a degradación y no permitiendo la expresión de genes diana. En la derecha está la presencia de la proteína shh que al unirse al receptor de membrana PTCH1 evita la inhibición de la proteína SMO y de esta manera se evita la formación del complejo SUFU-Gli, y Gli permite la expresión de genes pro-tumorigénicos. Abreviaturas: receptor transmembrana PTCH1, proteína SHH, proteína SMO.

**Meduloblastoma del Grupo III.** El grupo III representa el 25% de los casos y afecta principalmente a personas menores de 16 años, principalmente hombres, que sobreexpresan al oncogen *MYC*. Este grupo tiene la mayor frecuencia de metástasis y el peor pronóstico entre todos los subtipos, con una tasa de SG a 5 años del 45% y del 58% en bebés y niños, respectivamente. Su histología suele ser anaplásica y la línea celular característica es D341.

**Meduloblastoma del grupo IV.** Representa el 35% de los casos, afectando a niños de entre los 3 y 16 años. Los dos últimos grupos mencionados (III y IV) sobreexpresan al oncogen *MYCN*. El grupo IV representa el subtipo más común en general entre los diferentes grupos de edad, con un pronóstico intermedio (una tasa de SG a 5 años del 50% en bebés y niños). Por otro lado, el meduloblastoma del grupo IV se desarrolla en el ángulo pontocerebeloso, presentando una histología característica que suele ser anaplásica. Una línea celular característica derivada de este tipo de meduloblastoma es conocida como D283 (Louis et al. 2021).

## **1.6 Diagnóstico y tratamiento del meduloblastoma**

Las características clínicas del meduloblastoma son difíciles de detectar inicialmente en la niñez, lo que a veces lleva a un diagnóstico tardío, cuando el paciente ya presenta metástasis en zonas del cerebro, generalmente conduciendo a la muerte. Los síntomas generales incluyen cefaleas, torpeza, náuseas o vómitos matutinos, fatiga o bajo rendimiento escolar, los cuales pueden deberse a una alta presión intracraneal resultado ya sea de una hidrocefalia o de un efecto directo que esté causando dicho tumor, y dentro de los síntomas más específicos podemos encontrar: ataxia, dificultades con habilidades motoras y problemas de visión (Dhanyamraju, et al., 2020).

Además de los síntomas, para dar un diagnóstico, es necesario tomar una resonancia magnética nuclear (RMN) del cerebro y la columna vertebral; para evaluar el tumor de primer nivel, realizar una citología del líquido cefalorraquídeo (LCR) para observar posible metástasis y por último hacer un análisis histopatológico y molecular. Una vez hecho el diagnóstico, para evaluar los resultados y saber en qué etapa se encuentra dicho tumor, se ocupa el sistema de estadificación de Chang,

el cual se clasifica en M0 cuando no se presenta metástasis en la RMN y el LCR, M1 cuando hay células tumorales microscópicas en el LCR, M2 cuando se presentan depósitos metastásicos intracraneales en la RMN, M3 cuando hay depósitos metastásicos en el espacio subaracnoideo espinal y M4 cuando hay metástasis fuera del eje cerebroespinal (Northcott, *et al.*, 2019).

Una vez hecho el diagnóstico se debe emplear un tratamiento y a la fecha las estrategias de tratamiento para el meduloblastoma son tres: 1) extracción casi total o total del tumor, en donde deberá tomarse en cuenta que los nervios cerebrales y el tronco cerebral no se vean afectados y posteriormente se realizará un análisis histopatológico y molecular, ya que al extirparse suelen quedar secuelas irreparables en el cerebro. 2) La radioterapia del neuroeje se toma por todo el eje cráneo-espinal, pero este tratamiento no puede aplicarse a personas menores de tres años, ya que podría ser nocivo para su salud, y puede llevarse a cabo al mismo tiempo que 3) la quimioterapia, para la cual los medicamentos más utilizados son: cisplatino, carboplatino, vincristina, ciclofosfamida y lomustina, los cuales son costosos (DeSouza *et al.*, 2014).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Participación de la proteína SUN2 en cáncer

La expresión y función de las proteínas de envoltura nuclear también se han reportado desreguladas en algunos tipos de cáncer. Particularmente, para SUN2 existen algunos reportes que señalan cambios en su expresión en un contexto de cáncer, así como el impacto en la transcripción de algunos genes específicos (Figuroa et al, 2023) En conjunto estos datos sugieren que SUN2 tiene función de supresor tumoral en algunos carcinomas, como se describe a continuación.

**SUN2 en el cáncer de próstata.** El cáncer de próstata es el más diagnosticado en los hombres, y ha resultado un reto el predecir su inicio y progresión. Yajun y colaboradores en el 2017 reportan una baja expresión de SUN2 en los tejidos del cáncer de próstata respecto a los tejidos normales (Yajun *et al.*, 2017). El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, indicó que pacientes con una baja expresión de SUN2 correlaciona con una menor supervivencia. La sobreexpresión de SUN2 en células de cáncer de próstata inhibió su proliferación y promovió su apoptosis. El estudio *in vivo* realizado con un xenoinjerto mostró que el peso medio del tumor se redujo significativamente en los tumores con la sobreexpresión de SUN2 en comparación con el grupo control (Yajun *et al.*, 2017).

**SUN2 en el cáncer oral.** El cáncer oral alcanza una tasa de supervivencia a 5 años, por lo que se ha optado por investigarlo y desarrollar estrategias terapéuticas. Al respecto, se sabe que para el crecimiento de las células cancerosas se obtiene energía mediante la glicolisis anaeróbica y este proceso es denominado efecto Warburg. Liao y colaboradores en el 2021 demostraron que los pacientes, así como las líneas celulares de cáncer oral humano (HSC-6, SCC-9, HN13, HSC-3 y TSCC1) presentaban bajos niveles de SUN2 en comparación con las células de queratinocitos orales humanos normales (hNOK).

Además, se demostró que la sobreexpresión de SUN2 en células HSC-6 reduce la glucólisis, al suprimir la captación de glucosa. En contraste, la reducción de la

expresión de SUN2 en las células HSC-6 reestableció la producción de lactato y aumentó la captación de glucosa. Para dilucidar el papel de SUN2 en la glucólisis se detectaron los niveles de expresión de *GLUT1* (Glucose transporter 1), y *LDHA* (Lactate Dehydrogenase A)

La sobreexpresión de SUN2 redujó el nivel de los RNAm de GLUT1 y de LDHA, mientras que la depleción de SUN2 incrementó los niveles de los RNAm y de las proteínas de GLUT1 y LDHA. Por lo tanto, SUN2 parece actuar como un supresor tumoral en el cáncer oral, inhibiendo la expresión de genes importantes para el efecto Warburg (Liao, *et al.*, 2021).

**SUN2 en el cáncer de colon.** El cáncer de colon es la cuarta causa de muerte a nivel mundial. El inicio y la progresión del cáncer de colon, se ha relacionado con la inactivación de genes supresores de tumores o con la sobreexpresión de oncogenes, los cuales se encuentran implicados en características biológicas de las células cancerosas, tales como: el crecimiento celular, la migración, la apoptosis, la invasión y el metabolismo. Liu y colaboradores en el 2021, observaron, que los niveles de SUN2 son significativamente más bajos en tumores primarios y metastásicos de cáncer de colon en comparación con los tejidos normales de colon, además una alta expresión de *SUN2* está relacionada con una mayor supervivencia.

La sobreexpresión de SUN2 inhibe la migración y la invasión *in vitro* en células de cáncer de colon y el silenciamiento de SUN2 promueve la metástasis *in vivo*, indicando que SUN2 tiene funciones supresoras de tumores al disminuir la expresión de *BDNF* (Brain Derived Neurotrophic Factor). Por otro lado, SUN2 se asocia con SIRT1 dando lugar a un aumento de la acetilación de MeCP2 (la proteína 2 de unión a metil-CpG). De esta manera SUN2 actúa como un inhibidor de la metástasis en el cáncer de colon (Liu, *et al.*, 2021).

**SUN2 en el cáncer de mama.** El cáncer de mama ha sido el cáncer más prevalente en mujeres, siendo el triple negativo (TNBC) el subtipo que se ha relacionado con una mayor mortalidad en comparación con los otros subtipos (Koedoot et al, 2021), Algunos mecanismos de empalme alternativo se han relacionado con vías para la progresión del cáncer (apoptosis, metabolismo, oncogenes, genes supresores de tumores y angiogénesis). Aproximadamente 250 proteínas se encargan de catalizar

la reacción de empalme y algunos estudios correlacionan la deficiencia en el empalme con una segregación cromosómica aberrante en la mitosis, además algunos factores de empalme, tales como PRPF4B y SF3B3, se relacionan con el receptor hormonal en la proliferación del cáncer de mama (Koedoot et al, 2021)

Koedoot y colaboradores en el 2021 realizaron un análisis de iRNA para evaluar sistemáticamente el papel de 24 factores de empalme y conocer su relación con la proliferación celular en TNBC, como resultado se identificaron nueve factores de empalme en donde el silenciamiento de SNRPD2, SNRPD3 y NHP2L1 inhibió la proliferación *in vitro*, buscaron asociaciones proteína–proteína de SNRPD2, SNRPD3 y NHP2L1, encontrando que SUN2 se asocia con el complejo del espliceosoma, permitiendo un empalme eficiente de sororina, ya que se conoce que los niveles de transcripción de sororina están relacionados con marcadores de proliferación celular. Por lo tanto, SUN2 podría estar regulando la proliferación celular a través de la asociación con el complejo del espliceosoma (SNRPD2, SNRPD3 y NHP2L1) (Koedoot, *et al.*, 2021).

**SUN2 en el cáncer de pulmón.** El cáncer de pulmón está catalogado como la principal causa de mortalidad a nivel mundial, teniendo una tasa de supervivencia de 5 años inferior al 16%, para el inicio, progresión y resistencia a la terapia, su desarrollo está relacionado con la desregulación de oncogenes o genes supresores de tumores que se encuentran implicados en las características biológicas de las células cancerosas como son el crecimiento celular, la migración, la apoptosis, la invasión y el metabolismo, y es importante encontrar dianas terapéuticas para este tipo de cáncer (Lv, et al., 2016).

Como hemos revisado, la gran mayoría de células cancerosas tienen una captación de glucosa y una producción de lactato elevadas (efecto Warburg), lo que promueve el crecimiento de las células cancerosas y la inhibición de la apoptosis (Lv, et al., 2016). El efecto Warburg se ha relacionado con la pérdida de supresores de tumores o con la activación de oncogenes, un ejemplo de ello son los oncogenes *AKT*, *c-Myc* y *Ras* que promueven el efecto Warburg, y los supresores de tumores p53 y PTEN

que inhiben este efecto en células cancerosas; sin embargo, aún no está claro este mecanismo (Lv, *et al.*, 2016).

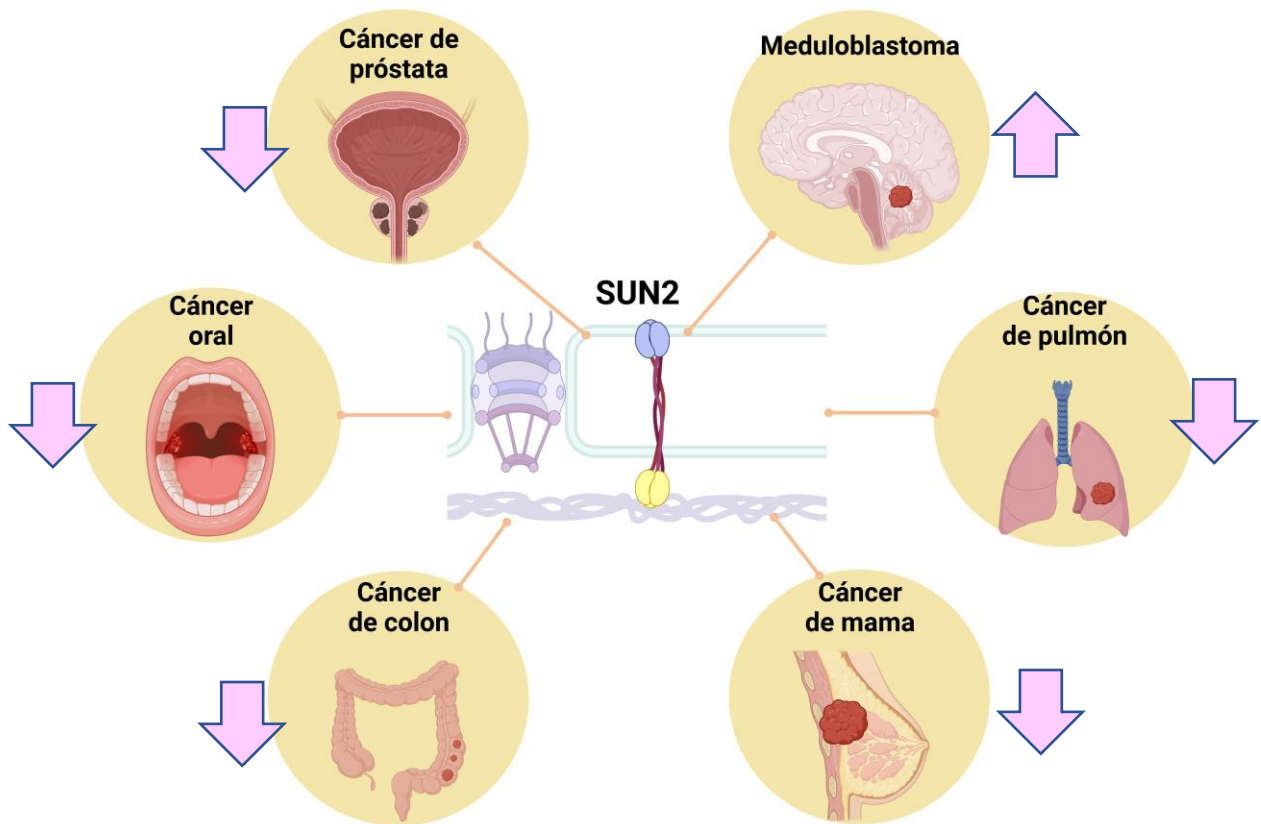
Lv y colaboradores en el 2016 reportaron que los niveles de SUN2 están reducidos en tejidos con cáncer de pulmón en comparación con los tejidos normales y concluyeron que la sobreexpresión de *SUN2* inhibe la proliferación y la migración de las células derivadas de cáncer de pulmón. Por lo tanto, se analizó el efecto de *SUN2* sobre la expresión de los genes *GLUT1* y *LDHA*, los cuales están asociados con el efecto Warburg y son necesarios para la captación de glucosa y la conversión de piruvato en lactato, respectivamente. Como resultado, la sobreexpresión de *SUN2* disminuye la expresión de *GLUT1* y *LDHA*, mientras que la expresión de estos genes aumenta al silenciar a *SUN2*. Por lo que, *SUN2* parece inhibir el efecto Warburg (Lv, *et al.*, 2016).

**SUN2 en meduloblastoma.** Como se ha mencionado, a la fecha, en los carcinomas estudiados se ha observado una reducción en los niveles de *SUN2* y su actividad en la inhibición de las características pro-tumorigénicas (Figura 8). Poco se sabe sobre su expresión y actividad en otros tipos de tumores. Hsieh y colaboradores en el 2014 llevaron a cabo una investigación titulada “La regulación a la baja de *SUN2*, un supresor de tumores novedoso, media la malignidad inducida por miR-221/222 en tumores embrionarios del SNC”, en la que reportaron que el miRNA-221/222 incrementa la proliferación celular, acelerando el crecimiento tumoral marcadamente ortotópico de células del cerebelo (DAOY) en ratones inmunodeficiente (Hsieh, *et al.*, 2014).

Los autores analizaron los genes que podrían estar regulados por el miRNA-221/222 y uno de ellos correspondió a *SUN2*. Los estudios indicaron que la expresión de *SUN2* se regula negativamente por el miRNA221/222. Además, demostraron que se tiene un nivel más bajo de la proteína *SUN2* en los tumores de AT/RT con respecto a meduloblastoma. Los autores concluyen que *SUN2* es capaz de regular la proliferación celular y la malignidad tumoral en los tumores embrionarios, y proponen que *SUN2* puede actuar como una proteína supresora de tumores (Hsieh, *et al.*,

2014). Cabe señalar que es el único estudio hasta ese momento sobre el papel de SUN2 en meduloblastoma.

Respecto a las líneas celulares de meduloblastoma, se cuenta con algunas, pero no todas han sido completamente caracterizadas. Casciati y colaboradores en el 2020, evaluaron el potencial tumorigénico *in vivo* de tres líneas celulares derivadas del meduloblastoma (DAOY, D341 y D283), al inyectar subcutáneamente  $6 \times 10^6$  de células de cada línea a ratones desnudos, para evaluar la progresión y el volumen del tumor, observando que la línea D341 tiene el mejor potencial tumorigénico, seguido de las células D283 y DAOY (Casciati, *et al.*, 2020).

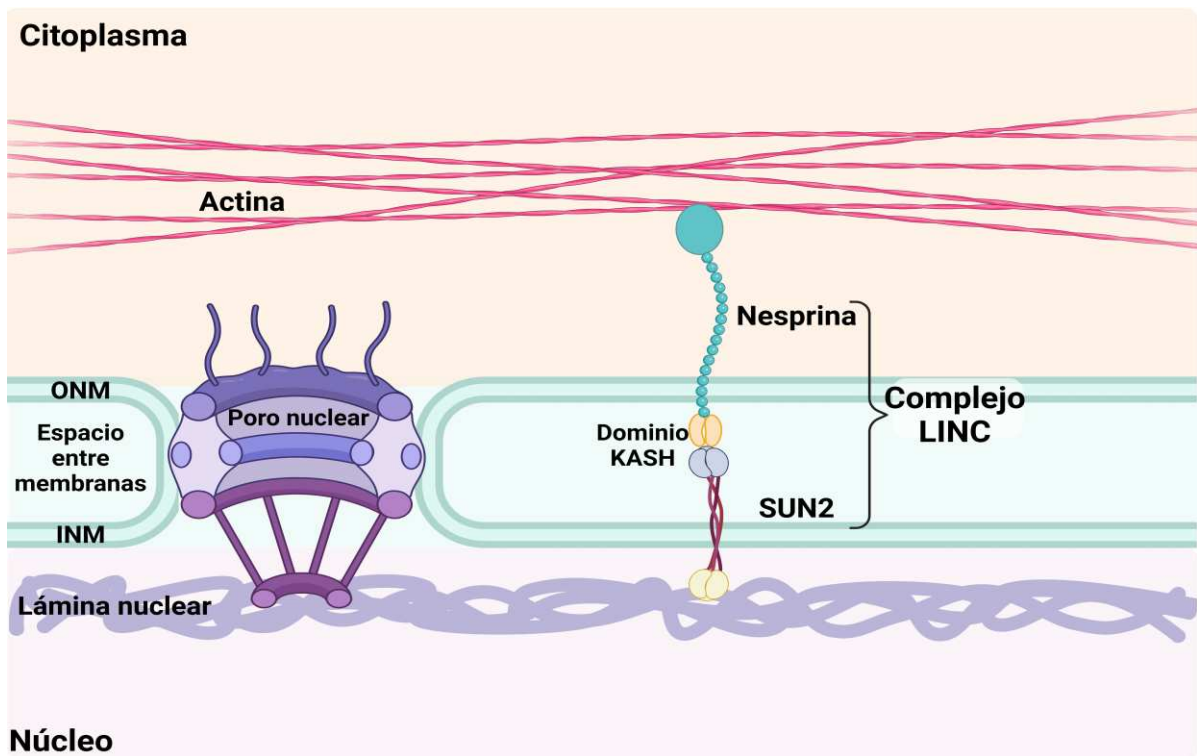


**Figura 8.** La relación de SUN2 con diferentes tipos de cáncer. SUN2 ha tenido una baja expresión de carcinomas como en cáncer de próstata, cáncer oral, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de pulmón, y otro tipo de cáncer como es el meduloblastoma la expresión de SUN2 se encuentra incrementada, (Tomado de Figueroa, *et al.* 2023).

## **2.2 Funciones moleculares asociadas a la proteína SUN2**

### **SUN2 es un componente del complejo LINC.**

Como se mencionó previamente, el complejo proteico LINC se compone de una proteína con dominio KASH localizada en la ONM. KASH es de gran importancia en el complejo LINC porque mantiene asociaciones con proteínas que forman parte del citoesqueleto. El complejo LINC también está conformado por proteínas de la familia SUN como son SUN1 y SUN2; dichas proteínas están en la INM, manteniendo una interacción con las proteínas lámina que conforman la lámina nuclear. En consecuencia, las interacciones de las proteínas con dominio KASH y dominio SUN permiten generar una conexión molecular del citoesqueleto con el nucleoesqueleto (Khilan *et al.* 2021). Particularmente, SUN2 se asocia con el dominio KASH de las proteínas nesprina 1, 2 y 3. Nesprina 1 y 2 tienen una interacción con los filamentos de actina, mientras que la nesprina 3 y 4 se asocia con los filamentos intermedios y microtúbulos, respectivamente. A través de este complejo, SUN2 participa en dar estabilidad a la EN, contribuyendo a su morfología, organización, y actividad durante diversos procesos celulares que incluyen la división, la polaridad, la migración y la diferenciación celular (Figura 9) (Bouzid *et al.* 2019).

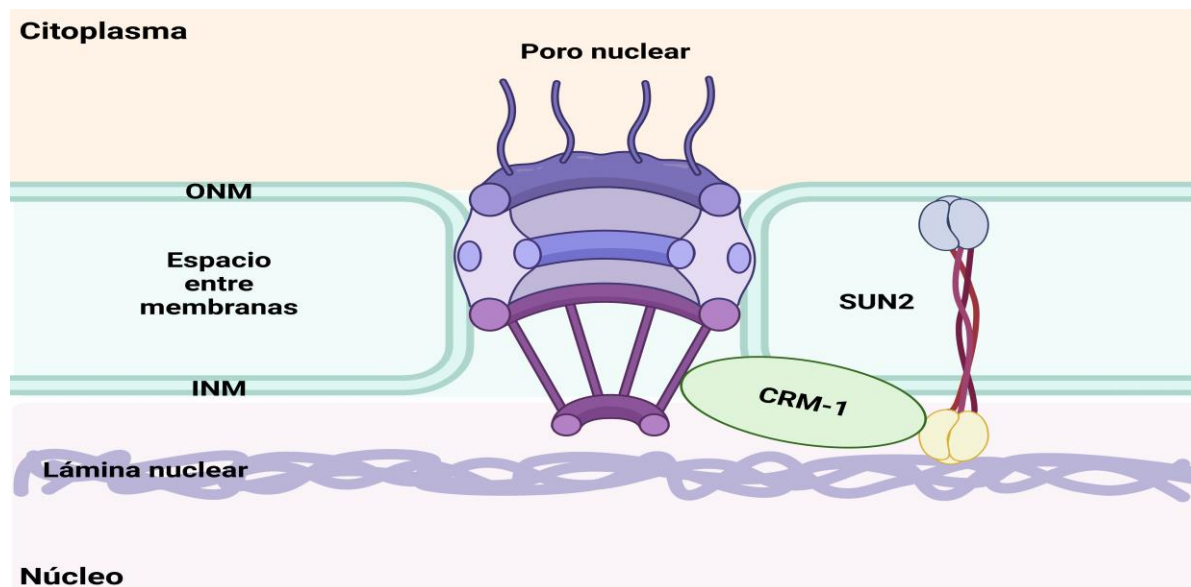


**Figura 9.** SUN2 componente del complejo LINC. Lámina nuclear, INM: membrana nuclear interna, espacio entre membranas, ONM: membrana nuclear externa, citoplasma, poro nuclear. Complejo LINC: proteína SUN2, dominio KASH, Nesprina, elementos del citoesqueleto (actina, filamentos intermedios, microtúbulos) (Tomado de Figueroa et, al. 2023).

### **SUN2 participa en los procesos de la exportación nuclear molecular**

El transporte de macromoléculas incluye los procesos de importación y/o exportación nuclear, que ocurren a través del NPC ocupando mecanismos de difusión pasiva y facilitada. Las proteínas que deben ser transportadas presentan motivos NLS (por su nombre en inglés *Nuclear Localization Sequence*) y NES (por su nombre en inglés *Nuclear Export Signal*). Los NLS y NES son reconocidos por importinas y exportinas, respectivamente. Como su nombre lo indica, las importinas están implicadas en la entrada de macromoléculas al núcleo celular, mientras que las exportinas promueven el efecto contrario (Paci, et al. 2021). La proteína CRM-1 (por su nombre en inglés *Chromosomal Maintenance 1*) es también conocida como exportina 1, por favorecer el transporte núcleo-citoplasma algunas moléculas de RNA y

proteínas específicas. Al respecto, se ha demostrado que las proteínas SUN1 y SUN2 tienen la capacidad de mantener una interacción con CRM-1 (Cruz-Ramos, *et al.* 2019). Aunque no se conocen los mecanismos moleculares y las implicaciones funcionales, estos datos sugieren que las proteínas SUN1 y SUN2 podrían ser elementos importantes en los procesos de exportación nuclear de moléculas (Figura 10) (Figuerola *et al.* 2023).

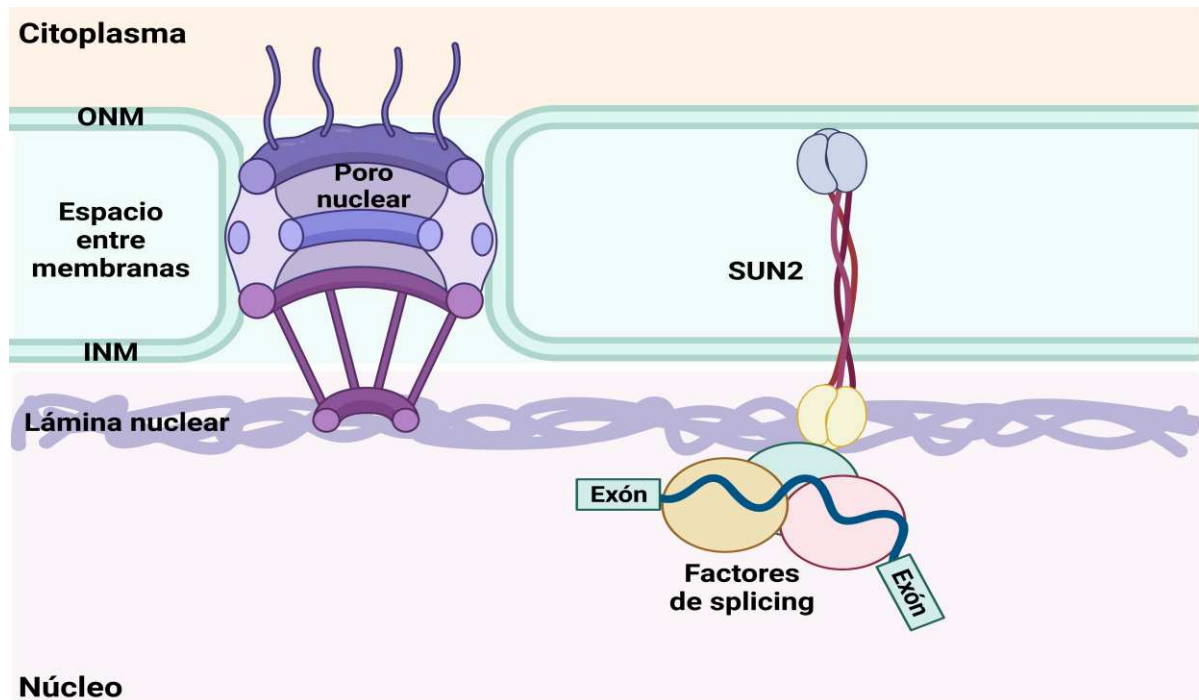


**Figura 10.** SUN2 y su asociación a las proteínas dedicadas a la exportación nuclear como CRM-1/ exportina. Lámina nuclear, INM: membrana nuclear interna, espacio entre membranas, ONM: membrana nuclear externa, citoplasma, poro nuclear, proteína SUN2, proteína CRM-1, dominio SUN2 y citoplasma (Tomado de Figuerola *et al.* 2023).

### **SUN2 se asocia con proteínas implicadas en los procesos co-transcripcionales.**

El empalme alternativo ocurre co-transcripcionalmente para generar mRNA maduros, resultado de la eliminación de regiones no codificantes intrónicas y la unión de exones que son las regiones codificantes de un gen. Por tanto, mediante el empalme alternativo es posible la generación de isoformas funcionalmente diferentes del mismo gen, como consecuencia de la eliminación o retención de ciertos intrones. A través de ensayos de co-inmunoprecipitación se demostró que SUN2 se asocia con factores de corte y empalme, tales como SNRPD2, SNRPD3 y NHP2L1. Cuando los niveles de SUN2 se reducen por RNA interferente, su interacción con SNRPD2,

SNRPD3 y NHP2L1 se reduce, generando un incremento en la retención del intrón 1 correspondiente al RNAm de *CDCA5*, el cual participa en los eventos de la división celular (Koedoot, *et al.* 2021). Estos resultados, indican que SUN2 podría participar colaborar empalme alternativo del gen *CDCA5*, pero también de muchos otros genes que hasta ahora se desconocen (Figura 11) (Figueroa *et al.* 2023).

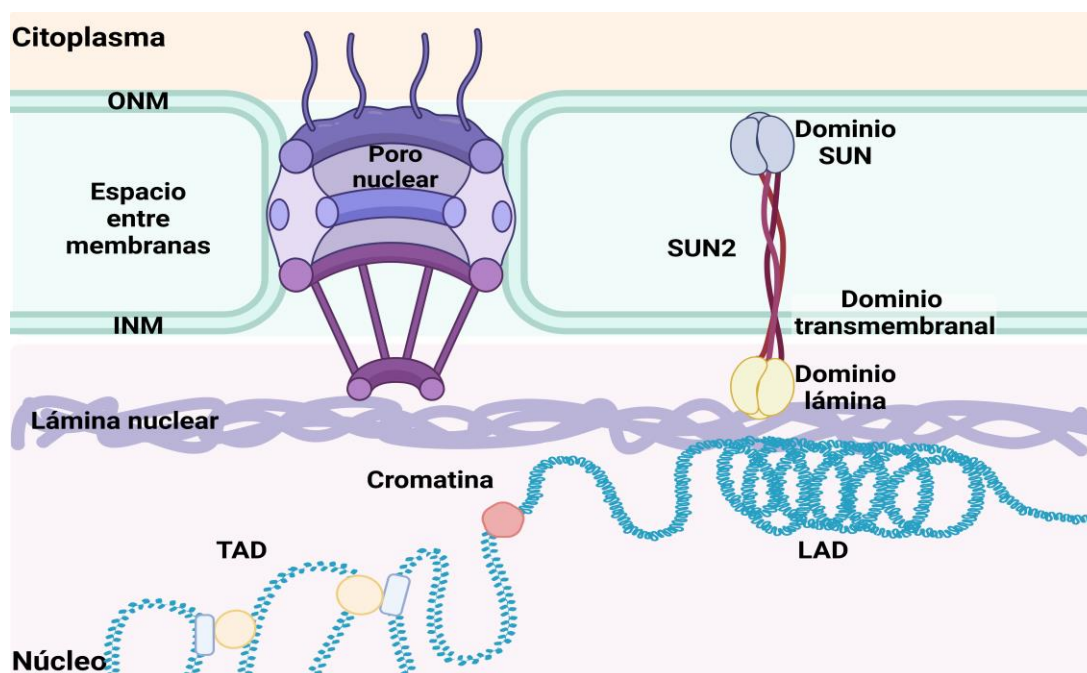


**Figura 11.** Asociación de SUN2 factores del complejo corte y empalme (Factores de splicing). Lámina nuclear, INM: membrana nuclear interna, espacio entre membranas, ONM: membrana nuclear externa, citoplasma, poro nuclear, proteína SUN2, factores de splicing, y citoplasma (Tomado de Figueroa *et al.* 2023).

### **SUN2 se ha vinculado a la modulación de la expresión de algunos genes asociados a cáncer**

La asociación con la lámina nuclear, con las láminas A y C, que mantiene la proteína SUN2, sugiere su posible implicación en la modulación de la expresión génica. La expresión génica se modula por la modificación química de las histonas como la desacetilación y acetilación, pero también por la metilación del DNA, así como la organización de la cromatina en lo que se conoce como LAD y TAD (Tecalco *et al.* 2021). A pesar de ello, a la fecha, existe una limitada evidencia de la relación de la regulación de la expresión

de genes con SUN2. No obstante, algunos grupos de investigación han demostrado que la expresión de SUN2 correlaciona negativamente con la expresión de algunos genes con relevancia funcional en cáncer tales como *GLUT1LDHA* y *BDNF* en cáncer oral, de pulmón y colon, respectivamente (Liao *et al.* 2021, Lv *et al.* 2015, Liu, *et al.* 2021). Por lo tanto, indagar sobre la participación de SUN2 en la modulación de la expresión de genes y sus implicaciones funcionales, resulta central en el estudio de cáncer, donde SUN2 se encuentra desregulada (Figura 12) (Figuroa *et al.* 2023).



**Figura 12.** Asociación de SUN2 al modular la expresión de genes asociados a cáncer mediante la formación de LAD's y TAD's. Núcleo, cromatina, dominio LAD, (del inglés Lamina-Associated Domain), dominio TAD (del inglés Topologically Associating Domains), lámina nuclear, INM: membrana nuclear interna, espacio entre membranas, ONM: membrana nuclear externa, citoplasma, poro nuclear, dominio lámina, dominio transmembranral, proteína SUN2, dominio SUN2 y citoplasma (Tomado de Figuroa *et al.* 2023).

## **2.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Con los antecedentes presentados surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Los niveles de la proteína SUN2 podrían afectar la modulación de la expresión de genes implicados en la progresión de meduloblastoma?

## **3. JUSTIFICACIÓN**

A la fecha existe un número limitado de estudios sobre la relación de SUN2 y cáncer. Algunos de ellos muestran que hay una reducción en la expresión de SUN2 en los tumores en comparación con el tejido sano. Además, no se sabe claramente cuál es el efecto de SUN2 sobre la expresión de genes. Por lo que resulta importante evaluar si los cambios en la expresión de la proteína de SUN2 podrían afectar el perfil de expresión génica en las células cancerosas, en particular en las derivadas de meduloblastoma.

## **4. HIPÓTESIS**

Los cambios en la expresión de la proteína SUN2 modificarán la expresión génica en las células de meduloblastoma.

## **5. OBJETIVOS**

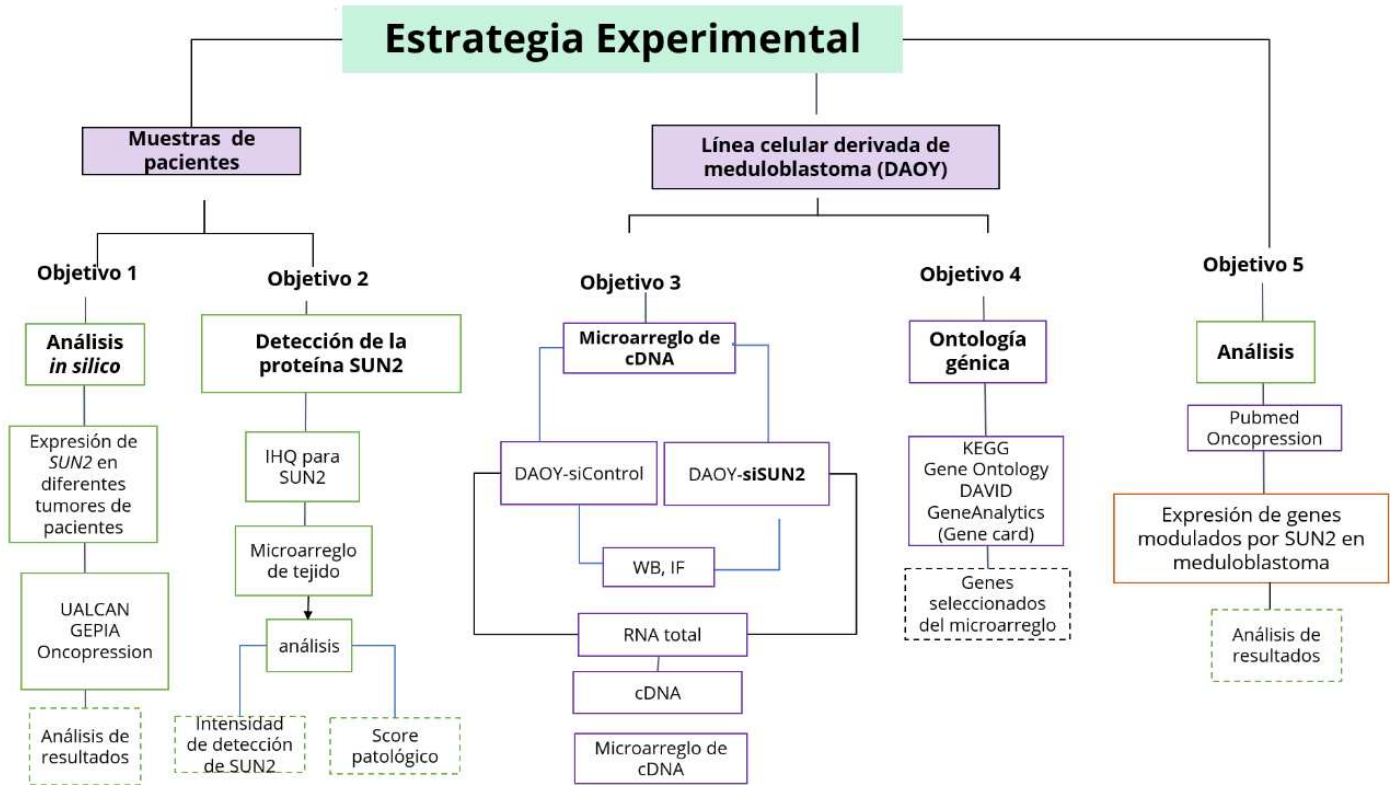
### **5.1 Objetivo General**

Analizar el efecto que tienen los cambios en los niveles de la proteína SUN2 sobre la expresión génica en células derivadas de meduloblastoma.

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Analizar *in silico* la expresión de *SUN2* en neoplasias malignas humanas.
2. Analizar los niveles de la proteína de *SUN2* en muestras de meduloblastoma.
3. Identificar genes modulados por la deficiencia de *SUN2* en células de meduloblastoma DAOY.
4. Realizar un análisis ontológico de los genes regulados por la deficiencia de *SUN2*.
5. Investigar en la bibliografía la función de los genes modulados por la deficiencia de *SUN2* en células de meduloblastoma.

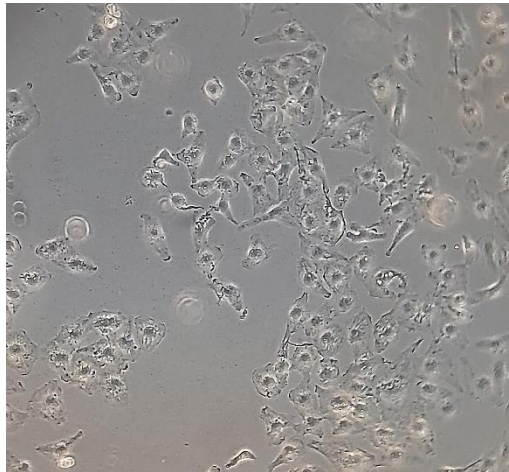
## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Línea celular.

Para el desarrollo de los experimentos se utilizó la línea celular derivada de meduloblastoma denominada DAOY. Las células de meduloblastoma DAOY son una línea celular humana tomada de un tumor del cerebelo que limita con la fosa posterior craneal de un niño de 4 años, perteneciente al tipo histológico desmoplásico, con una morfología poligonal regular, con núcleos grandes y múltiples nucléolos, presentando las células indiferenciadas uniones intercelulares y cilios (Figura 13) (Valencia, 2018).



**Figura 13.** Línea celular de meduloblastoma DAOY, tipo histológico desmoplásico, con una morfología poligonal regular, con núcleos grandes y múltiples nucléolos.

### 7.2 Microarreglo de tejido e inmunohistoquímica (IHC)

Se realizaron cortes de tejidos de 3 micras de grosor, correspondientes a colon, astrocitoma, cerebelo y útero, los tejidos se montaron en laminillas y al siguiente día se hizo la desparafinación y ejecución de IHC. Estos experimentos iniciales fueron importantes para estandarizar las condiciones de la IHC, antes de utilizar el microarreglo comercial de tejido (TMA, del inglés Tissue Microarray) conteniendo muestras de meduloblastoma (Biomax- C17012C).

Para la desparafinación, la laminilla se incubó 15 min a 62°C. Después de la desparafinación, la laminilla se sumergió durante 10 min en xilol 1 y posteriormente en xilol 2 (sumergir la laminilla 10 veces), seguido de etanol absoluto (sumergir 10 veces) y etanol 70% (10 veces), finalizando con H<sub>2</sub>O bidestilada (10 veces). La laminilla se colocó en la cámara con el buffer de citratos 10 min a 92°C- 94°C, para que se expongan los epítomos. Posteriormente, la laminilla se incubó 10 min a temperatura ambiente, y en seguida se colocó en una cámara de agua. Se realizaron 4 lavados con PBS y una incubación en peróxido por 30 min, para posteriormente sumergir la laminilla 4 veces en el buffer de lavado. En seguida la laminilla se trató con tritón al 0.2% por 10 min para permeabilizar, y después se lavó con buffer de lavado. Para la detección de la proteína se ocupó el Kit de Millipore (DAB500 - 500 Slide Kit) que contiene todos los elementos para la realización de los siguientes pasos que se describen a continuación. Primero se realizó la incubación en la solución bloqueadora por 10 min, seguida de la incubación con el anticuerpo primario, o solamente el buffer de la dilución del anticuerpo en caso de tratarse del control negativo, durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se incubó con el anticuerpo secundario por 10 min de acuerdo al protocolo del kit, seguido de lavados. La parte final, consistió en la incubación con Streptavidina peroxidasa contenida en el mismo kit durante 10 min, luego se lavó con buffer de lavado, se incubó posteriormente con cromógeno 10 min, se lavó con buffer de lavado, y por último se colocó hematoxilina por 7 min y se enjuagó con buffer de lavado.

Para el análisis específico de meduloblastoma, se utilizó un TMA (tissue microarray) que contenía 20 casos de meduloblastoma por triplicado. Además, el TMA tenía 3 muestras de tejido normal (cerebelo y cerebro) y 1 marcador de tejido (glándula adrenal, feocromocitoma). Utilizando este TMA, se llevó a cabo la detección de la proteína SUN2 por medio de Inmunohistoquímica (IHC). Se utilizó una concentración 1: 250 del anticuerpo para SUN2 y se dejó incubando durante una noche a 4°C, al día siguiente se efectuaron los pasos antes descritos de acuerdo con el protocolo del kit de Millipore (DAB500 - 500 Slide Kit) utilizado. Para el montaje primero se sumergió la laminilla en 10 ocasiones en agua bidestilada, después se pasó a etanol 70% (10 veces), luego a etanol absoluto y por último a xilol de igual manera en 10 ocasiones (se trata de quitar el exceso entre una solución y otra). Por último, se

colocó 2 gotas de resina en la laminilla y con cuidado se les colocó el cubreobjetos cuidando que no queden burbujas.

### **7.3 Análisis histológico de la IHC**

Para el análisis histológico de la detección de SUN2, se utilizó la herramienta exclusiva para IHQ de Image J, la cual, de acuerdo al área total de la imagen, contabiliza la densidad de tinción en píxeles y es expresada en %, señalando así la positividad de SUN2 en el tejido (Lara, *et al.*, 2021). La segunda estrategia consistió en un análisis patológico establecido por patólogos del INCan, los cuales se basan en algunos criterios como: celularidad, marca específica e intensidad de la marca, para determinar la expresión de SUN2 en el tejido, indicando si era positiva (leve (1), moderada (2), alta (3)) o negativa.

### **7.4 Transfección transitoria del siRNA para SUN2**

Se realizó una transfección transitoria del siRNA (sc-153930, Santa Cruz) en las células DAOY con una densidad del 70% al 90%, usando lipofectamina 2000 y siguiendo las indicaciones del fabricante (catálogo 11668027, Invitrogen). A las 48 h después de la transfección, se corroboró la reducción de la expresión de SUN2 mediante un Western Blot, con el uso de anticuerpos, anti-SUN2 (HPA001209 Sigma, 1:1000) y anti- $\alpha$ -Tubulina (B7, sc-5286 Santa-Cruz Biotechnology, 1:1000) como control de carga.

### **7.5 Obtención de extractos totales**

El medio de cultivo fue retirado de las cajas de las células DAOY y se adicionó PBS para hacer lavados, posteriormente a cada caja se le adicionó 500  $\mu$ l de buffer de lisis TNTE 0.5%, después se raspó la caja para desprender y coleccionar las células. Se incubó el extracto por 15 min a 4°C, se centrifugó 5 min a 13,200 rpm y se recuperó el sobrenadante. Para cuantificar las proteínas se utilizó el método de Bradford, para ello se agregaron 800  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O en un microtubo, se agregaron 2  $\mu$ l del extracto

total de proteínas y 200µl de Bradford, y se realizaron lecturas de la absorbancia a 595 nm. Se utilizó una curva patrón de albúmina para interpolar los datos.

## **7.6 Electroforesis SDS-PAGE y Western blot**

Se prepararon geles de acrilamida al 7.5% para la realización de la electroforesis SDS-PAGE. Se colocó el marcador de peso molecular en el primer carril y en los demás carriles se colocó las muestras correspondientes. Para la transferencia de las proteínas llevada a cabo a 100V por 70 min, se utilizó una membrana de PVDF, después de esto se bloqueó la membrana con leche al 5% en TBS-T 1x. La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-SUN2 (1:1000)(HPA001209, Sigma-Aldrich), o bien con anti- $\alpha$ -Tubulina (1:1000)(B7, sc-5286 Santa-Cruz Biotechnology) para la detección de Tubulina como control de carga. Se mantuvo la membrana en agitación durante toda la noche a 4°C. Después se lavó la membrana con TBS x1 y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente en agitación durante 1 h a temperatura ambiente; posteriormente se hicieron 3 lavados con TBS-T 1x. Para detectar a las proteínas se utilizaron ensayos de quimioluminiscencia, usando un kit de Super Signal West Pico Plus (Thermo Fisher 34580).

## **7.7 Ensayo de inmunofluorescencia**

Para investigar la localización subcelular de SUN2 en las células de meduloblastoma DAOY y DAOY-siSUN2 se utilizó la técnica de inmunofluorescencia con el uso de un anticuerpo específico para SUN2. Las células DAOY fueron sembradas sobre cubreobjetos tratados previamente con polilisina. Posteriormente, se retiró el medio y se lavó la monocapa de las células con PBS. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se hicieron lavados con PBS, después se permeabilizó con Tritón al 0.1% durante 8 min y se hicieron 3 lavados con PBS, posteriormente se bloqueó con albumina al 1% por 1 h, después de enjuagar se dejó incubando con un anticuerpo primario anti-SUN2 (HPA001209 Sigma, 1:100) durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se hicieron 3 lavados con PBS por 5 min entre

cada uno, y se incubo con el anticuerpo secundario (Alexa 488, ab201540- Abcam) en condición de oscuridad durante 1.5 h. Por último, se hicieron lavados con PBS y se hizo el montaje con DAPI para teñir el núcleo, y se observó en un microscopio confocal LSM.

## **7.8 Microarreglo de cDNA y análisis ontológico**

Se utilizó la línea celular de cáncer de meduloblastoma DAOY transfectada con un siRNA (sc-153930, Santa Cruz) dirigido a SUN2 o con un siRNA control. Con estas dos condiciones, se realizó la extracción de RNA total mediante el kit (Direct-zol RNA Miniprep), el cual fue empleado para el ensayo del microarreglo de cDNA. Dicho microarreglo (Gene Chip Human Mapping 10 K Array) se analizó en colaboración con la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (IFC)-UNAM.

La finalidad de este ensayo es la identificación de genes que potencialmente puedan ser afectados por la expresión de *SUN2*. Los datos de los genes resultantes del análisis de este microarreglo, se ocuparon para realizar un análisis de ontología génica de los genes regulados por la deficiencia de *SUN2*. El enriquecimiento de ontología génica (GO) ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) y el estudio de vías KEGG ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)) se realizaron para analizar y clasificar los genes expresados diferencialmente. El análisis también se realizó con las bases contenidas en [gene cards/ gene analytics \(https://geneanalytics.genecards.org/\)](https://geneanalytics.genecards.org/).

## **7.9 Análisis *in silico* de la expresión de *SUN2***

Se utilizó UALCAN, GEPIA y Oncoexpression, las cuales son herramientas que nos proporcionan información de diferentes bases de datos sobre la expresión de *SUN2* en neoplasias malignas de pacientes con respecto al tejido sano, así como para conocer la expresión de *SUN2*, *TAS2R16*, *TAS2R4*, *TAS2R1*, *TAS2R13*, en meduloblastoma con respecto al tejido normal.

Utilizando la plataforma de Pubmed se llevó a cabo una investigación bibliográfica de los genes seleccionados que modificaron su expresión por la deficiencia de *SUN2*

en células de meduloblastoma DAOY, para analizar su papel en un contexto de cáncer o SNC, que pudieran tener relevancia en meduloblastoma.

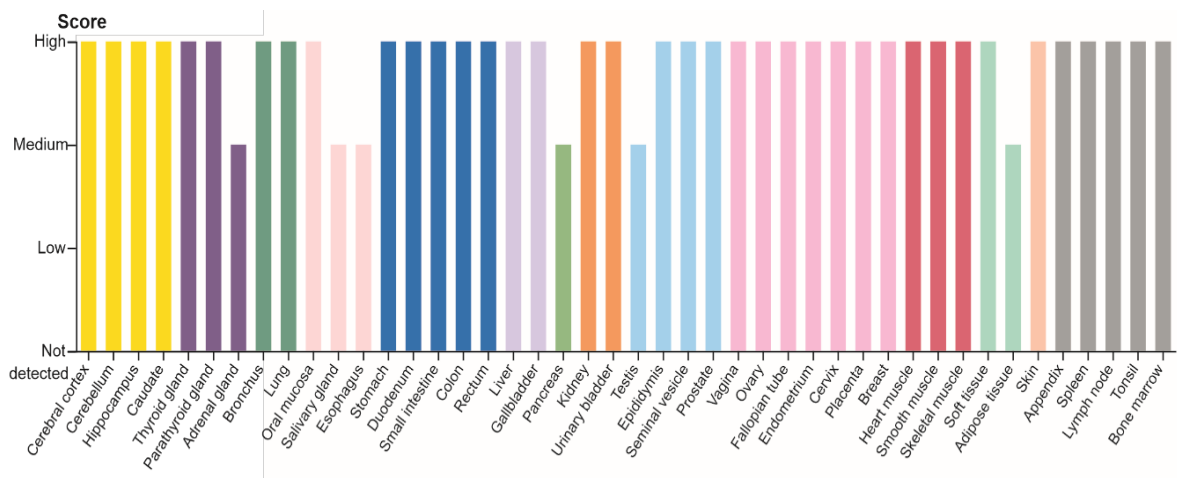
### **7.10 Análisis estadístico**

Utilizando herramientas como GraphPad Prism 5, se realizó una prueba T de student y una ANOVA, así como gráficas de correlación para comparar el análisis de score patológico e intensidad de detección de SUN2, normalización de datos. Los resultados se consideraron significativos con una  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*).

## 8. RESULTADOS

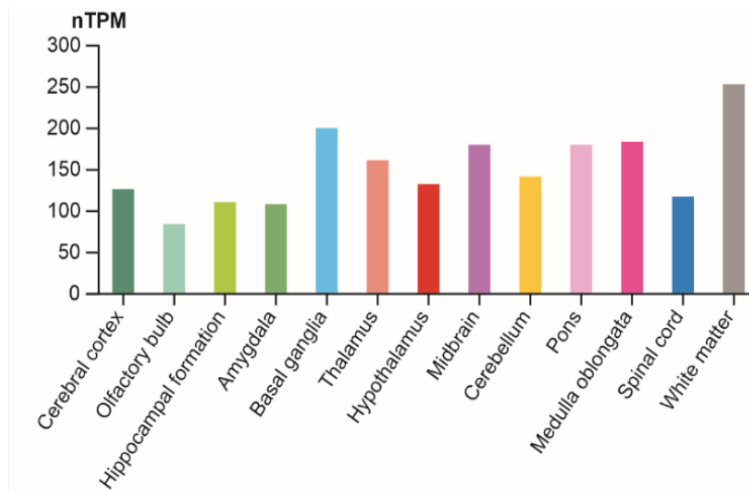
### 8.1 Expresión de *SUN2 in silico* en neoplasias malignas.

El primer estudio que se realizó, consistió en analizar los niveles de SUN2 en tejido humano saludable. Para examinar la abundancia de la proteína SUN2 en diferentes tejidos humanos en condiciones normales se usó la base de datos HPA (The Human Protein Atlas). Como se muestra en la Figura 14, la abundancia de SUN2 está dada por un score o puntaje de confiabilidad, en el cual se toma en cuenta el patrón de tinción y una estimación de los niveles de la proteína por medio de inmunohistoquímica. La abundancia de SUN2 se evaluó en 44 tejidos del cuerpo humano en condiciones normales, con un score alto en la mayoría de ellos y solamente en 6 tejidos con un score medio. De color amarillo se muestra a la proteína SUN2 en el SNC, la cual presenta un score alto.



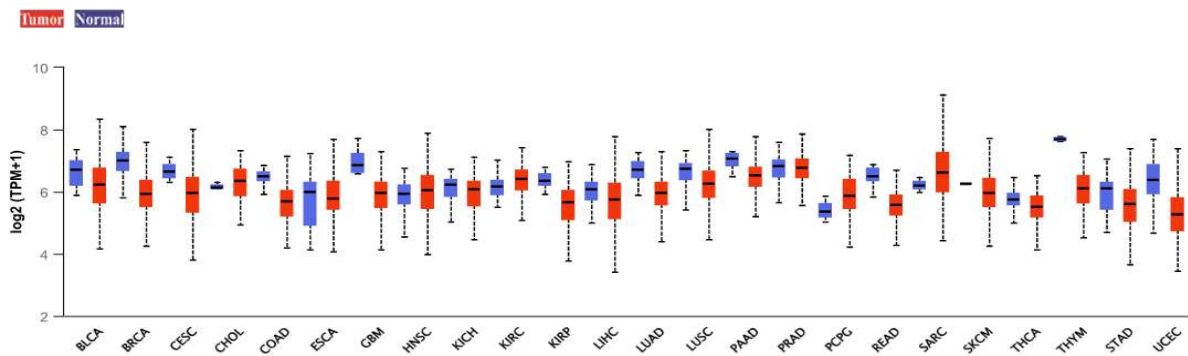
**Figura 14.** Abundancia de la proteína SUN2 en cada órgano del cuerpo humano, barras amarillas: abundancia de SUN2 en el SNC (The Human Protein Atlas, 2021).

Posteriormente se analizó el perfil de expresión del RNAm de *SUN2* en el SNC humano. Para permitir comparaciones entre las muestras, se utilizó la media, normalizando la expresión en transcritos por millón (nTPM) en cada muestra (Figura 15). Los datos muestran que *SUN2* está presente en los diferentes tejidos que conforman el SNC.



**Figura 15.** Perfil de expresión en transcripciones por millón de RNAm de *SUN2* en el cerebro humano, de color amarillo (The Human Protein Atlas, 2021).

Para evaluar la expresión de *SUN2* en 24 neoplasias malignas se utilizó la base de datos UALCAN. Como se observa en la Figura 16, en la mayoría de los tipos de cáncer evaluados, la expresión de *SUN2* es mayor en tejido normal con respecto al tejido neoplásico. Sin embargo, hay 4 neoplasias: CHOL (colangiocarcinoma), KIRC (carcinoma renal de células claras de riñón), PCPG (feocromocitoma y paraganglioma) y SARC (sarcoma), en donde la expresión de *SUN2* en el tejido canceroso es mayor o igual que en el tejido normal.



**Figura 16.** La expresión de *SUN2* es reducida en neoplasias malignas respecto al tejido normal (UALCAN), cajas rojas: tejido tumoral, cajas azules: tejido normal, se consideraron significativos con una  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Para realizar un análisis más profundo, se observó que, de las 24 neoplasias, solo 18 son carcinomas y de estos 12 resultaron ser estadísticamente significativos y los otros 6 no (Tabla II). Estos datos son importantes, dado que los carcinomas se caracterizan por desarrollarse en células epiteliales, y son los tipos más comunes de cáncer.

**Tabla II.** La expresión de *SUN2* es reducida en todos los carcinomas

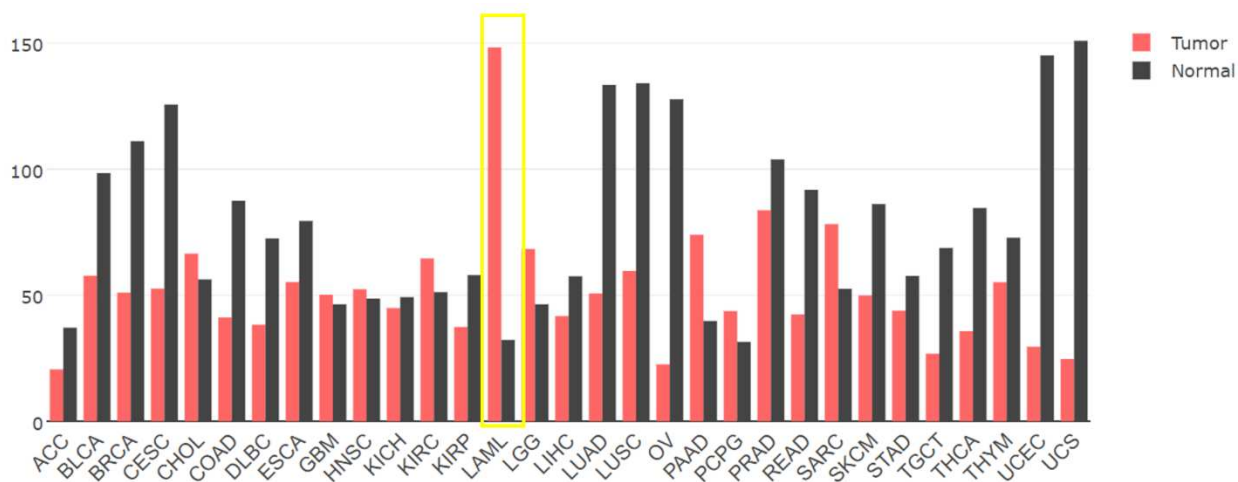
Carcinomas (18)

Abreviatura	Nombre completo	T.T vs T.N UALCAN	
12 *			
BRCA	Carcinoma invasivo de mama	* ↓	
COAD	Adenocarcinoma de colon	* ↓	
HNSC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	* ↓	
KIRP	Carcinoma de células papilares renales de riñón	* ↓	
LUAD	Adenocarcinoma de pulmón	* ↓	
LUSC	Carcinoma de células escamosas de pulmón	* ↓	
PAAD	Adenocarcinoma de páncreas	* ↓	
READ	Adenocarcinoma de recto	* ↓	
SKCM	Melanoma cutáneo de pie	* ↓	
THCA	Carcinoma de tiroides	* ↓	
STAD	Adenocarcinoma de estómago	* ↓	
UCEC	Carcinoma endometrial del cuerpo uterino	* ↓	
6 N.S			
Abreviatura	Nombre completo	T.T vs T.N UALCAN	
PRAD	Adenocarcinoma de próstata	N.S ↓	
BLCA	Carcinoma urotelial de vejiga	N.S ↓	
CESC	Carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma endocervical	N.S ↓	
ESCA	Carcinoma de esófago	N.S ↓	
KICH	Cromóforo de riñón	N.S ↓	
LIHC	Carcinoma hepatocelular de hígado	N.S ↓	

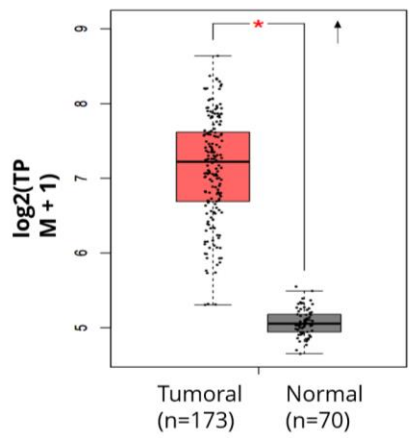
Se analizó en la base de datos GEPIA la expresión de *SUN2* en neoplasias malignas y se observó de igual manera una mayor expresión de *SUN2* en el tejido normal con respecto al tejido tumoral (Figura 17); sin embargo, cabe mencionar que de todos los tipos de cáncer, resaltó el resultado observado en la leucemia mieloide aguda, debido a que hay una mayor expresión de *SUN2* muy marcada en el tejido tumoral con respecto al tejido normal siendo esto estadísticamente significativo (\*) (Figura 18).

Con la finalidad de analizar la expresión de *SUN2* en neoplasias malignas del SNC (astrocitoma, glioblastoma y tumor teratoide/rabdoide) se utilizó el atlas de expresión







de EMBL-EBI. Al evaluar y comparar el nivel de expresión del gen *SUN2* en neoplasias malignas del SNC se reporta que es menor con respecto al tejido normal, con una  $p < 0.05$ . En la Figura 19 se muestran estos resultados.



**Figura 17.** La expresión de *SUN2* es reducida en neoplasias malignas respecto al tejido normal (GEPIA). Barras rojas: tejido tumoral, barras negras: tejido normal, se consideraron significativos con una  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*). Abreviaturas: ACC: Carcinoma of the adrenal cortex, BLCA: Urothelial of the bladder carcinoma, BRCA: Invasive breast carcinoma, CESC: Squamous cell carcinoma of the uterine cervix and endocervical adenocarcinoma, CHOL: Cholangiocarcinoma, COAD: Adenocarcinoma of the colon, DLBC: Diffuse large B-cell lymphoma, ESCA: Esophageal carcinoma, GBM: Glioblastoma multiforme, HNSC: Head and neck Squamous cell carcinoma, KICH: Kidney Chromophobe, KIRC: Kidney Renal clear cell carcinoma, KIRP: Kidney renal papillary cell carcinoma, READ: Rectal adenocarcinoma, LAML: Acute Myeloid Leukemia, LGG: Del inglés Brain Lower Grade Glioma, LIHC: Liver hepatocellular carcinoma, LUAD: Lung adenocarcinoma, LUSC: Lung squamous cell carcinoma, OV: Ovarian serous cystadenocarcinoma, PAAD: Pancreatic adenocarcinoma, PCPG: Del inglés Pheochromocytoma and Paraganglioma, PRAD: Prostate adenocarcinoma, SARC: Sarcoma, SKCM: Skin Cutaneous Melanoma, STAD: Stomach adenocarcinoma, TGCT: Testicular Germ Cell Tumors, THCA: Thyroid carcinoma, THYM: Thymoma, UCEC: Uterine Corpus Endometrial Carcinoma, UCS: Uterine Carcinosarcoma.



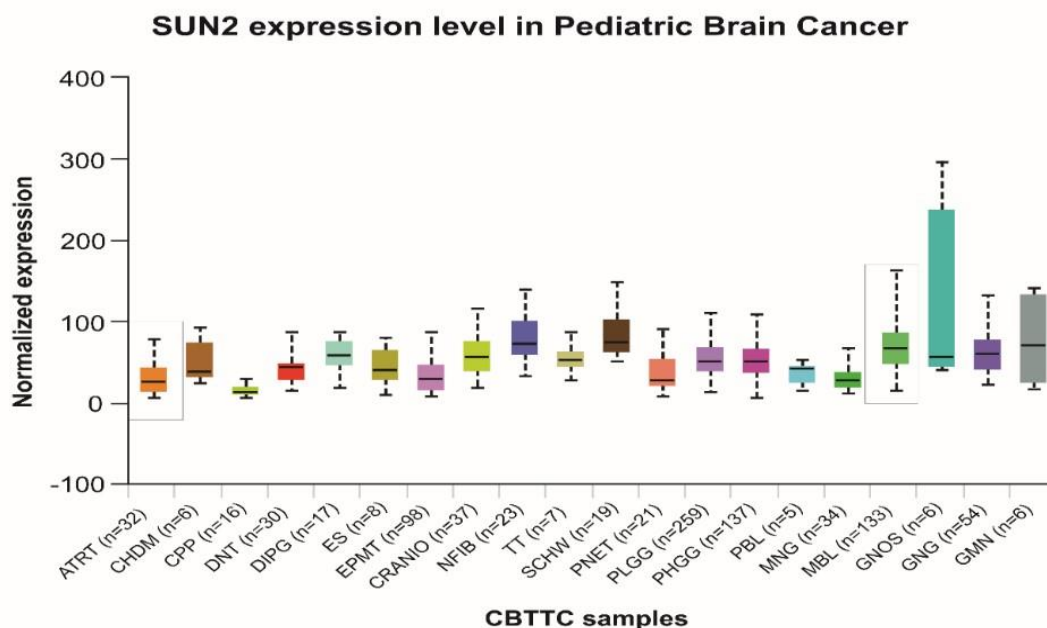
**Figura 18.** La expresión de SUN2 en Leucemia mieloide aguda es mayor con respecto al tejido normal, caja roja: tejido tumoral (n=173), caja negra: tejido normal (n=70), se consideraron significativos con una  $p < 0.05$ : \*.

Cambio de log <sub>2</sub> veces	Especies	Nombre del gen	Comparación	Variables experimentales	Nombre del experimento
-1,6		SUN2	'astrocitoma subependimario de células gigantes' frente a 'normal'	enfermedad	Perfiles de transcripción por matriz de tumores cerebrales de astrocitoma de células gigantes subependimarios humanos
-1,5		SUN2	'glioblastoma' vs 'normal'	bloqueo, enfermedad	RNA-seq de plaquetas sanguíneas de seis tipos de tumores y donantes sanos
-1,4		SUN2	'núcleo que mejora el contraste; glioma 'vs' normal'	sitio de biopsia, enfermedad	Perfiles de transcripción por secuenciación de alto rendimiento en los márgenes del glioblastoma
-1,4		SUN2	'tumor teratoideo / rabdoide atípico' versus 'normal'	enfermedad	Perfil de expresión génica de tipos de tumores cerebrales pediátricos y adultos y cerebro normal
-1,2		SUN2	'masa tumoral de glioblastoma' vs 'control'	histología	Genes candidatos para la recurrencia del glioblastoma multiforme identificados por microarrays
-1,1		SUN2	'tumor teratoideo / rabdoide atípico' versus 'normal'	enfermedad	Los tumores rabdoideos pediátricos de riñón y cerebro muestran muchas diferencias en la expresión génica, pero comparten la desregulación del ciclo celular y los genes efectores.

**Figura 19.** Expresión de SUN2 en neoplasias malignas del SNC.

La imagen muestra la expresión de SUN2 reportada hasta ahora en otras neoplasias malignas del SNC diferentes al meduloblastoma. Gris: menor a 0.5 TPM. Azul claro: 0.5 a 10 TPM. Azul medio: entre 11 y 1000 TPM. Azul oscuro: más de 1000 TPM.

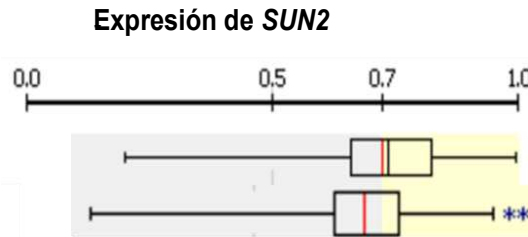
Para analizar el nivel expresión de *SUN2* en el cáncer cerebral pediátrico se ocupó la base de datos de UALCAN. En la Figura 13 se muestra un gráfico box-plot para mostrar la expresión del RNAm de *SUN2* en distintos tipos de cáncer cerebral pediátrico, dentro de los que se encuentra el meduloblastoma y el AT/RT (tumor teratoide/rabdoide), el cual es una importante neoplasia maligna pediátrica del SNC, que como se observó en la figura 20, presenta una expresión baja de *SUN2* con respecto al tejido normal.



**Figura 20.** Nivel de expresión de *SUN2* en cáncer pediátrico cerebral, MBL: meduloblastoma, ATRT: tumor teratoide/rabdoide, se consideraron significativos con una \*  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , y \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Se realizó una búsqueda de bases de datos de expresión génica para tumores del SNC y se logró identificar la base de datos “*Oncopression*” para tumores del SNC incluyendo glioblastoma y meduloblastoma. Cabe señalar, que el glioblastoma multiforme (GB), es una neoplasia maligna grado IV importante que se presenta en el SNC, pero a diferencia del meduloblastoma que inicia en el cerebelo en pacientes pediátricos, el glioblastoma inicia en lóbulos del cerebro y se asocia al envejecimiento. Se analizó la expresión de *SUN2* en muestras de pacientes con glioblastoma; los resultados indicaron una menor expresión *SUN2* en glioblastoma

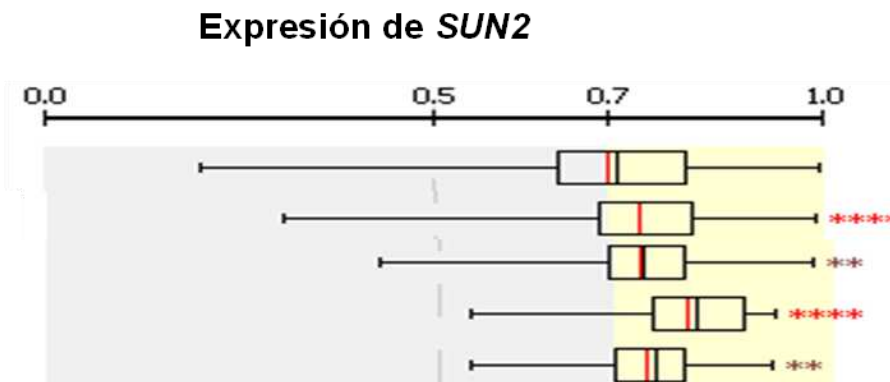
en comparación al tejido sano, siendo esto estadísticamente significativo como se observa en la Figura 21.



**Figura 21.** Expresión de *SUN2* en glioblastoma (SNC) es reducida en comparación con el tejido normal. De arriba abajo: tejido SNC normal (n=723), glioblastoma (n=84), \*\*:p < 0.01, \*: sub-expresión en comparación con el tejido

## 8.2 Análisis de expresión de *SUN2* en meduloblastoma.

Utilizando la base de datos de *Oncopression* se analizó la expresión de *SUN2* en meduloblastoma, la cual resultó ser significativamente mayor respecto al tejido del SNC normal (Figura 22).



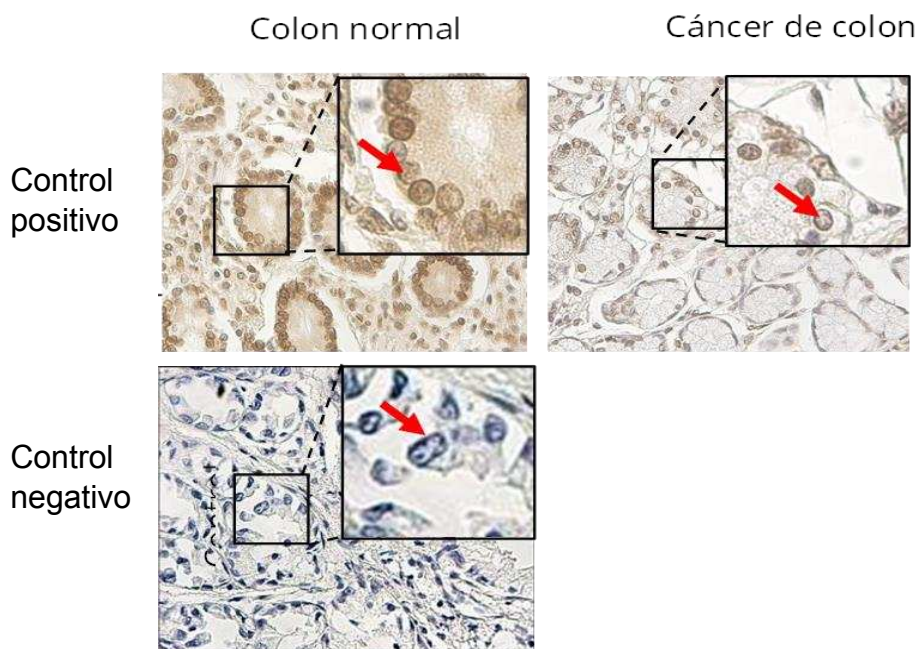
**Figura 22.** La expresión de *SUN2* en meduloblastoma es mayor en comparación con el tejido normal. De arriba a abajo: tejido SNC normal (n=723), meduloblastoma (n= 273), meduloblastoma clásico (n= 66), meduloblastoma desmoplástico (n=40), meduloblastoma sin evidencia de invasión (n=42). \*\*:p < 0.01, \*\*\*\* :p < 0.0001.

De acuerdo a los resultados del estudio *in silico*, se encontró que a nivel de RNAm *SUN2* tiene una baja expresión en la mayoría de las neoplasias malignas con respecto a su tejido sano, y se observó que dichas neoplasias eran de origen epitelial, es decir, carcinomas. En contraste, en algunas neoplasias como sarcomas

y leucemias, la expresión de SUN2 es alta con respecto al tejido normal. Además, una expresión diferencial se vio también reflejada en los tumores del SNC, donde en glioblastoma SUN2 tuvo una menor expresión con respecto al tejido normal. De manera interesante, en el caso del meduloblastoma se observó una mayor expresión de SUN2 en este tipo de tumores con respecto al tejido normal, por lo que estos datos sugieren que la expresión de SUN2 presenta una expresión diferencial de acuerdo al tipo de tumor. De acuerdo a este análisis, la expresión de *SUN2* es más alta en meduloblastoma que en el tejido normal del SNC.

### **Análisis de los niveles de la proteína de SUN2 en muestras de meduloblastoma.**

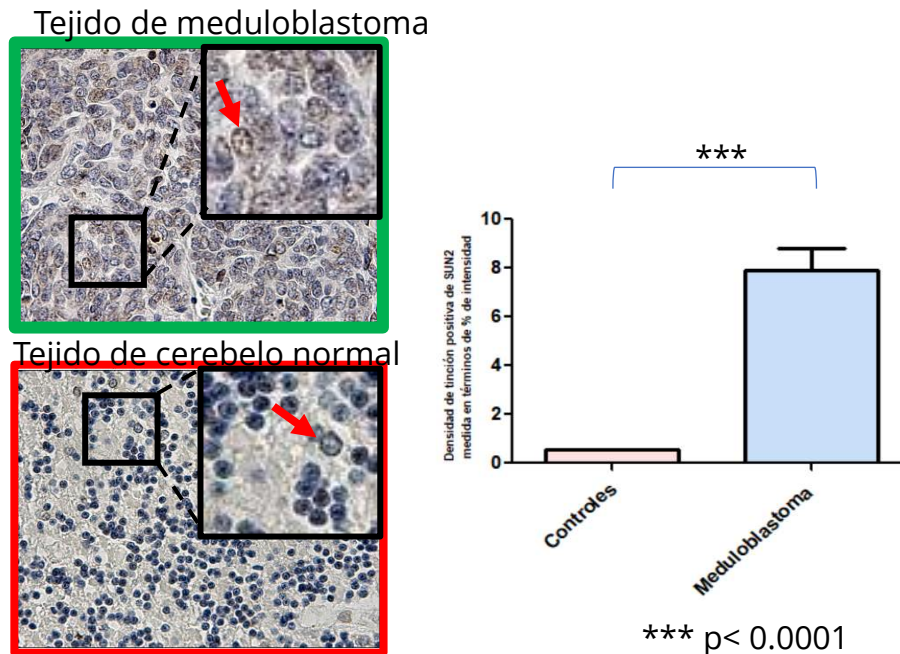
Con la finalidad de analizar los niveles de la proteína SUN2 en meduloblastoma, se realizó una IHQ en un microarreglo de tejido. Se determinó como óptima la dilución de 1:250 del anticuerpo anti-SUN2, utilizando tejido de colon normal y tejido de cáncer de colon. Se detectó una alta señal de SUN2 en el tejido de colon normal con respecto al tejido de cáncer de colon, reproduciendo el resultado reportado por Liu y colaboradores en el 2021 (Figura 23).



**Figura 23.** La expresión de SUN2 se encuentra reducida en cáncer de colon con respecto al tejido normal de colon de acuerdo al análisis de inmunotinción realizado en Image J en la técnica de IHC. Superior: Microfotografía representativa de la expresión de SUN2 en cáncer de colon, y tejido normal de colon. Abajo: Control negativo.

## Detección de SUN2 en un microarreglo de meduloblastoma.

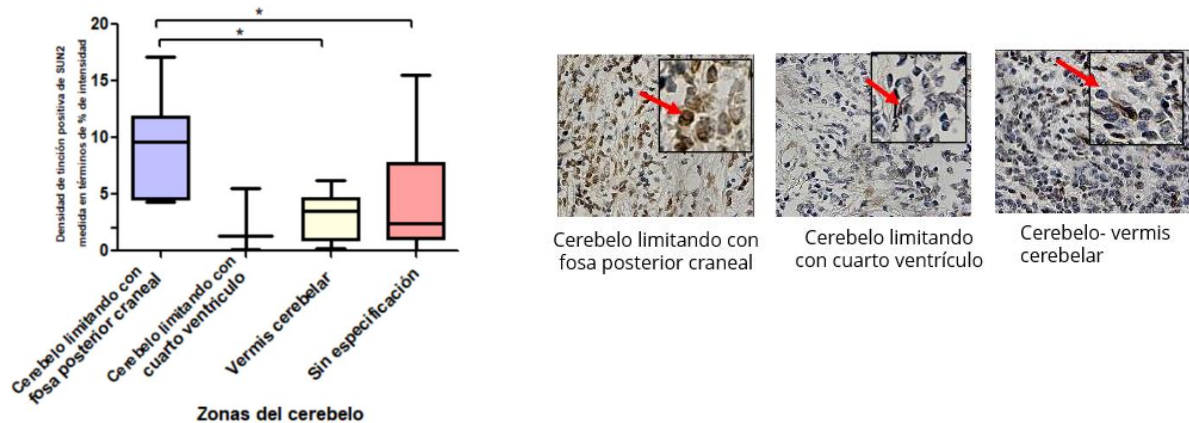
Una vez determinada la dilución adecuada de anticuerpo anti-SUN2 para la detección de dicha proteína mediante IHC, se llevó a cabo el análisis del microarreglo de meduloblastoma. Los resultados muestran una mayor inmunorreactividad estadísticamente significativa en meduloblastoma con respecto al tejido normal del SNC (Figura 24). Mientras el análisis de intensidad de detección de SUN2 indican una alta abundancia de la proteína SUN2 en meduloblastoma, el análisis de las muestras del tejido normal del SNC resulta en una baja o nula señal de SUN2.



**Figura 24.** SUN2 se expresa en tejido de meduloblastoma y en el tejido normal de cerebelo no. De acuerdo al análisis de densidad de inmunotinción, realizado en Image J en la técnica de IHC. Izquierda: microfotografías representativas de las muestras con meduloblastoma y tejido de cerebelo normal. Derecha: Gráfica de barras del análisis de densidad de inmunotinción, normalizando los datos de las muestras de Meduloblastoma (n:20 ) con respecto a el grupo control (n:3)\*\*\* $p < 0.05$ .

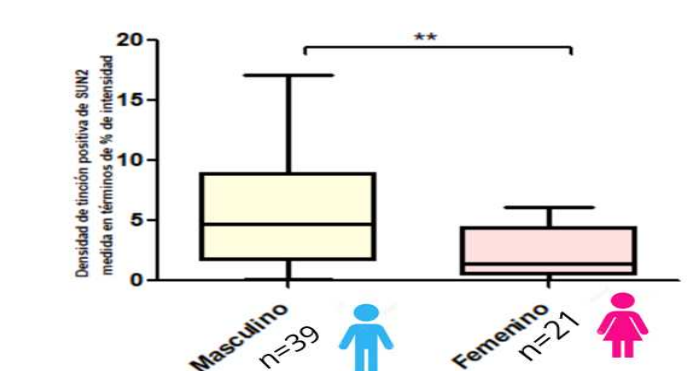
Se analizaron los niveles de SUN2 por medio del programa Image J, de acuerdo a las zonas donde fue extraído el tejido de meduloblastoma. La mayor abundancia de SUN2 se detectó en la fosa craneal, seguida del vermis cerebelar y el cuarto ventrículo, detectándose además en un grupo de meduloblastoma sin un origen anatómico especificado. Estos datos sugieren que los niveles de la proteína SUN2 podrían variar dependiendo de la zona en

donde se encuentra el meduloblastoma (Figura 25); sin embargo, de acuerdo al score patológico no hay diferencias significativas de acuerdo a las zonas de donde se extrajo dicho tejido.



**Figura 25.** Detección de SUN2 en tejidos de meduloblastoma obtenidos de diferentes zonas. Imágenes representativas de la IHQ procedente de muestras de meduloblastoma: Derecha: gráficas box-plot correspondientes a muestras de meduloblastoma de acuerdo a su análisis de densidad inmunotinción (Image J) agrupados de acuerdo a la zona donde fue obtenida dicha muestra: limitado con la fosa craneal, limitado con el cuarto ventrículo, vermis cerebelar, y origen anatómico no especificado (meduloblastoma), Izquierdo: microfotografía de la muestra representativa de la zona donde fue obtenido el meduloblastoma y su análisis semicuantitativo, \*  $p < 0.05$ .

También mediante IHC se analizaron los niveles de SUN2 de acuerdo al sexo, mostrando mayores niveles de la proteína en el sexo masculino que en el femenino (\*\* $p < 0.05$ ) (Figura 26). Una vez analizados los resultados del microarreglo de tejido por medio del porcentaje de densidad de tinción medida en pixeles, se analizó de acuerdo a un score patológico, en donde los patólogos del INCan obtuvieron los resultados descritos en la tabla III de acuerdo a cada muestra.



**Figura 26. Detección de SUN2 en tejidos de meduloblastoma obtenidos de hombres y mujeres.** Gráfica de box-plot del análisis de densidad de inmunotinción por medio de Image J, de acuerdo al sexo del paciente **\*\*p<0.05.**

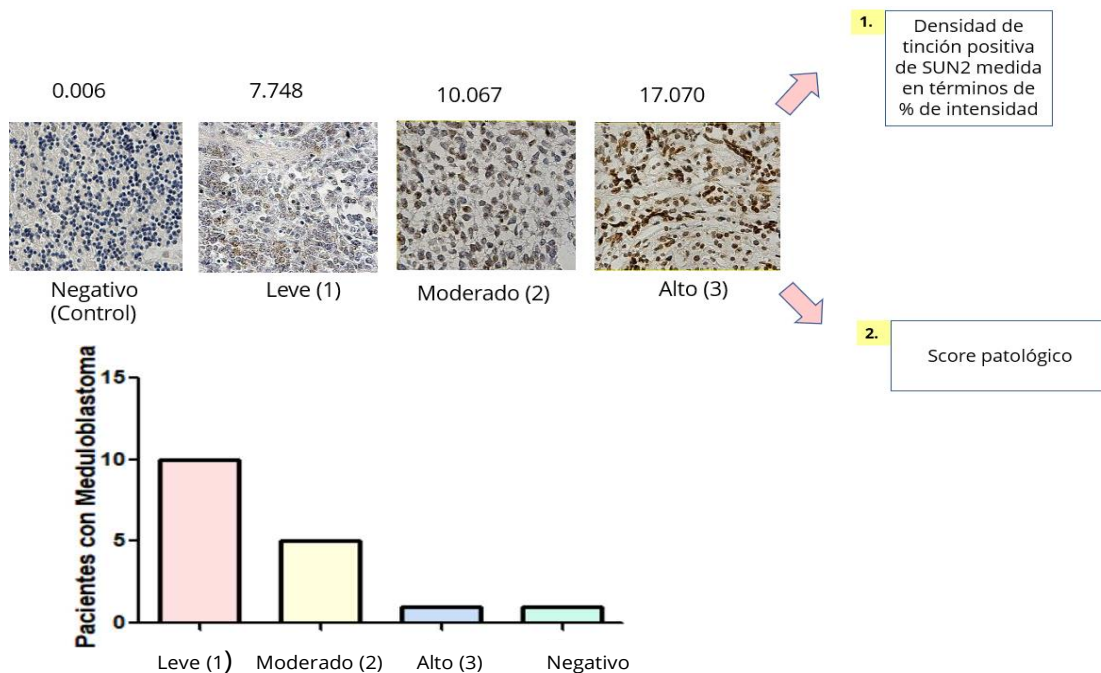
**Tabla III.** Análisis de score patológico por paciente, sexo, edad y tipo de tumor.

Paciente	Sexo	Edad	Tipo de tumor	Score patológico
1	M	8	Meduloblastoma	1
2	F	27	Meduloblastoma	2
3	M	16	Meduloblastoma	1
4	M	42	Meduloblastoma del vermis cerebelo	N.R
5	M	14	Meduloblastoma	1
6	M	9	Meduloblastoma	3
7	M	7	Meduloblastoma	1
8	F	12	Meduloblastoma	N.R
9	M	34	Meduloblastoma	1
10	F	33	Meduloblastoma de fosa craneal posterior	2
11	F	8	Meduloblastoma	negativo
12	M	30	Meduloblastoma	2
13	M	41	Meduloblastoma	1
14	F	14	Meduloblastoma del vermis cerebelo	N.R
15	F	4	Meduloblastoma del vermis cerebelo	1
16	M	6	Meduloblastoma del vermis cerebelo	2
17	F	6	Meduloblastoma	1
18	M	41	Meduloblastoma de fosa craneal posterior	1
19	M	49	Meduloblastoma de fosa craneal posterior	2
20	M	25	Meduloblastoma del cuarto ventrículo	1
Control	M	35	tejido cerebral normal	negativo
Control	M	48	tejido cerebral normal	negativo
Control	F	24	tejido del cerebelo normal	negativo

De acuerdo al análisis de score patológico y al análisis semicuantitativo se determinó la abundancia de SUN2 desde leve hasta alta en el tejido de meduloblastoma, donde de los 17 pacientes que tuvieron una muestra representativa para ser evaluada, 10 presentaron un score leve, 5 un score

moderado, un paciente un score alto y un paciente un score negativo, y en los controles no hay detección de SUN2. Ambas estrategias de evaluación de IHC mostraron una correlación (Figura 27).

En resumen, se evaluó la abundancia de SUN2 en muestras de pacientes utilizando un microarreglo de tejido de meduloblastoma, en donde se observan altos niveles de SUN2 en una condición de meduloblastoma con respecto al tejido normal del SNC, mostrando una correlación con los resultados de IHC por medio de las dos estrategias de análisis (semicuantitativo y score patológico). Por lo tanto, la expresión de SUN2 a nivel de RNAm y proteína en meduloblastoma se encuentra en ambos casos incrementada con respecto al tejido sano (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ). Con base en estos resultados, se propone que la expresión de *SUN2* podría estar determinada por el tipo del tumor, y que específicamente para meduloblastoma la desregulación de SUN2 aumenta su expresión, a diferencia de lo observado en carcinomas y otros tumores del SNC como glioblastoma.

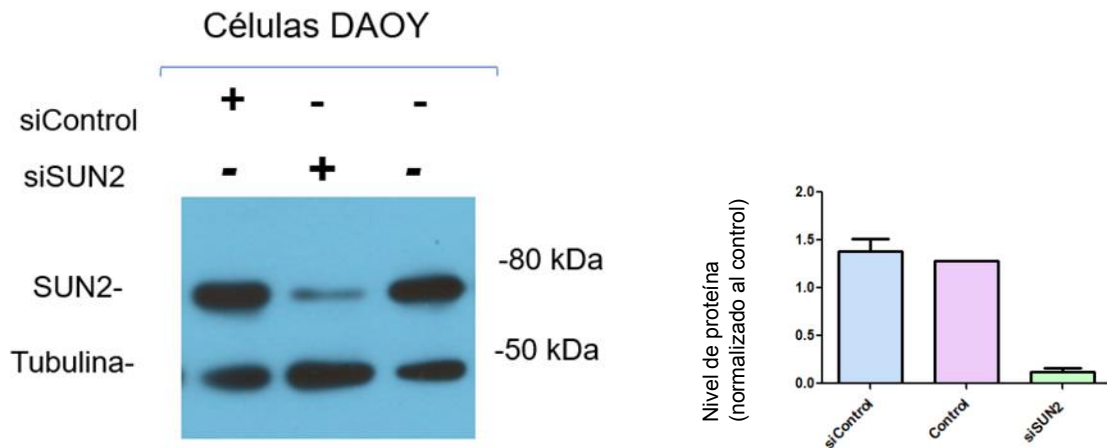


**Figura 27.** La detección de SUN2 es mayor en tejidos de meduloblastoma con respecto al grupo control. Superior: Imágenes analizadas por Image J, debajo de las imágenes se observa el score patológico determinado para cada muestra de IHC respectivamente. Abajo: Gráfica de pacientes con meduloblastoma de acuerdo a su score patológico.

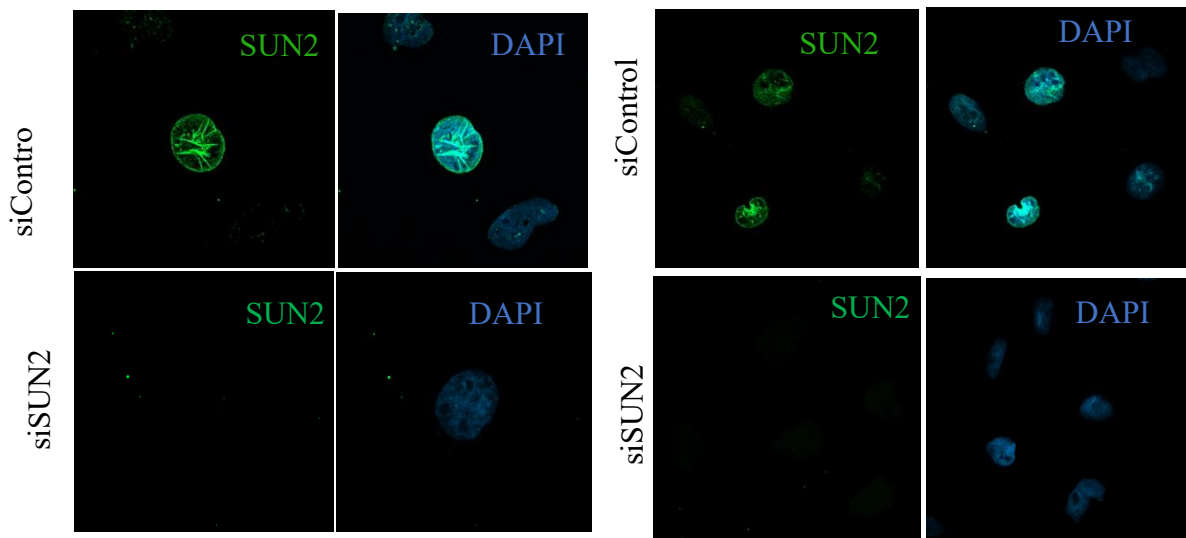
### **8.3 Identificación de genes modulados por la deficiencia de *SUN2* en células de meduloblastoma DAOY.**

Considerando que la expresión y abundancia de *SUN2* se encuentra elevada en las muestras de meduloblastoma en comparación con el tejido normal, se decidió utilizar como un modelo de estudio de meduloblastoma a las células DAOY. Además, se empleó la estrategia de RNA interferente para la reducción de los niveles de *SUN2*. Con esta estrategia, fue posible analizar el efecto de los cambios en los niveles de *SUN2* sobre la expresión génica en el contexto de meduloblastoma. Sin embargo, como primer punto, se evaluó mediante WB (Western Blot), si el uso de una mezcla de RNA interferentes específicos para *SUN2* fue eficiente reduciendo su abundancia. Adicionalmente, mediante ensayos de inmunofluorescencia, se evaluó la reducción de *SUN2* sobre la envoltura nuclear de las células DAOY.

Los resultados obtenidos mediante WB muestran los niveles de *SUN2* en células de meduloblastoma DAOY, en las células DAOY transfectadas con el RNA interferente para *SUN2* (DAOY-si*SUN2*), y en las células DAOY transfectadas con un RNA interferencia control (DAOY-siControl). Como se observa en la figura 28, y como se esperaba, los niveles de *SUN2* se encuentran reducidos en las células DAOY que expresan el si*SUN2* en comparación con las células que expresan siControl, y las células parentales DAOY. Estos resultados también se visualizan a través del análisis de densitometría. Por lo tanto, el si*SUN2* fue eficiente para reducir los niveles de la proteína *SUN2*. Adicionalmente, mediante los ensayos de inmunofluorescencia, también se corroboró la reducción de la proteína *SUN2* en la envoltura nuclear de las células DAOY (Figura 29). De color verde *SUN2* se encuentra en la periferia nuclear y en algunas invaginaciones de la membrana nuclear que son características en algunos tipos de cáncer, mientras que el núcleo celular se observa en color azul, por su tinción con DAPI. En conjunto estos datos, validaron el uso de las células DAOY-si*SUN2* para el análisis de expresión génica mediante microarreglos de cDNA.



**Figura 28.** Inhibición de la expresión de SUN2 en células DAOY. Se observa una reducción de SUN2 en células DAOY-siSUN2 con respecto a DAOY-siControl. Derecho: gráficas que corresponden a la densidad óptica relativa.

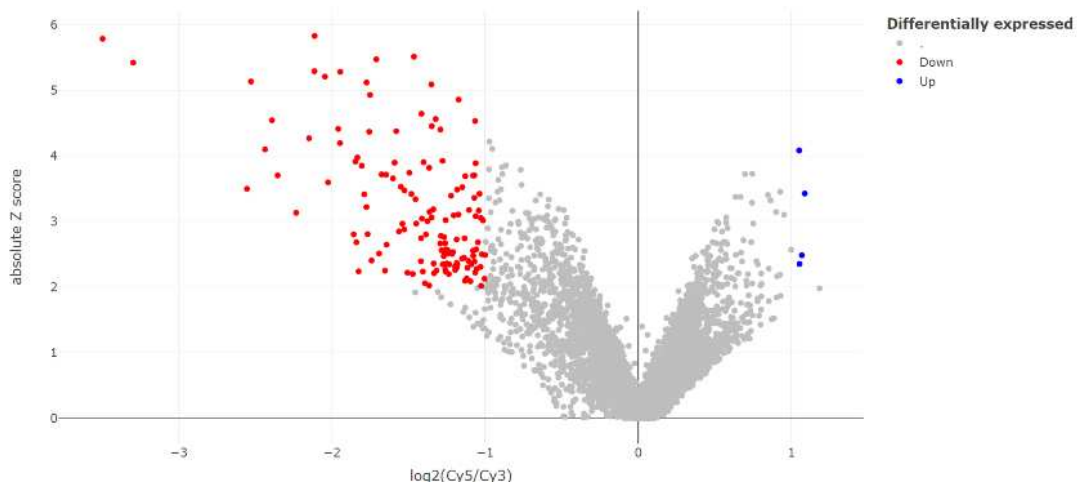


**Figura 29.** Localización de SUN2. En las células DAOY en el grupo siSUN2, la proteína SUN2 disminuyó su expresión con RNA interferente por lo que en la periferia del núcleo no se alcanza a visualizar a SUN2, sin embargo, en las células DAOY con el RNA interferente control, se observa en la periferia nuclear la expresión de SUN2 de color verde. Izquierdo: x63, Derecho: 40x Verde: SUN2, Azul: Núcleo teñido con DAPI, y Merge de las imágenes.

## Efecto de la deficiencia de SUN2 sobre la expresión génica en células de meduloblastoma DAOY.

Con la finalidad de analizar si SUN2 se asocia con la expresión de en meduloblastoma, se llevó a cabo un microarreglo de cDNA en el cual se compararon los perfiles de expresión de SUN2 en células de Meduloblastoma DAOY-siSUN2 y DAOY-si Control. De este modo, se analizaron los genes que modificaban su perfil expresión en la línea celular DAOY tras la reducción de la expresión *SUN2* por efecto de un RNA interferente específico.

Como resultado se obtuvo un volcano plot (Figura 30), del cual se seleccionaron genes por medio de dos parámetros: genes con un Z-score igual o mayor a 2, y el doble del cambio de expresión ( $-\log_2(\text{Cy5/Cy3})$ ). Como se observa hay 123 genes que disminuyeron su expresión en células DAOY-siSUN2 con respecto al control y 4 genes que incrementaron su expresión en células DAOY-siSUN2 con respecto al control. Por lo que hay una mayor cantidad de genes que reducen su expresión cuando los niveles de SUN2 están disminuidos.



**Figura 30.** Volcano plot de genes expresados diferencialmente en las células DAOY-siSUN2. Se muestra una dispersión de los datos, considerando los que tienen un z score mayor a 2, hay 123 genes que se regulan a la baja y 4 genes que se regulan al alta. El grupo siSUN2 permite la reducción de la expresión de un mayor número de genes.

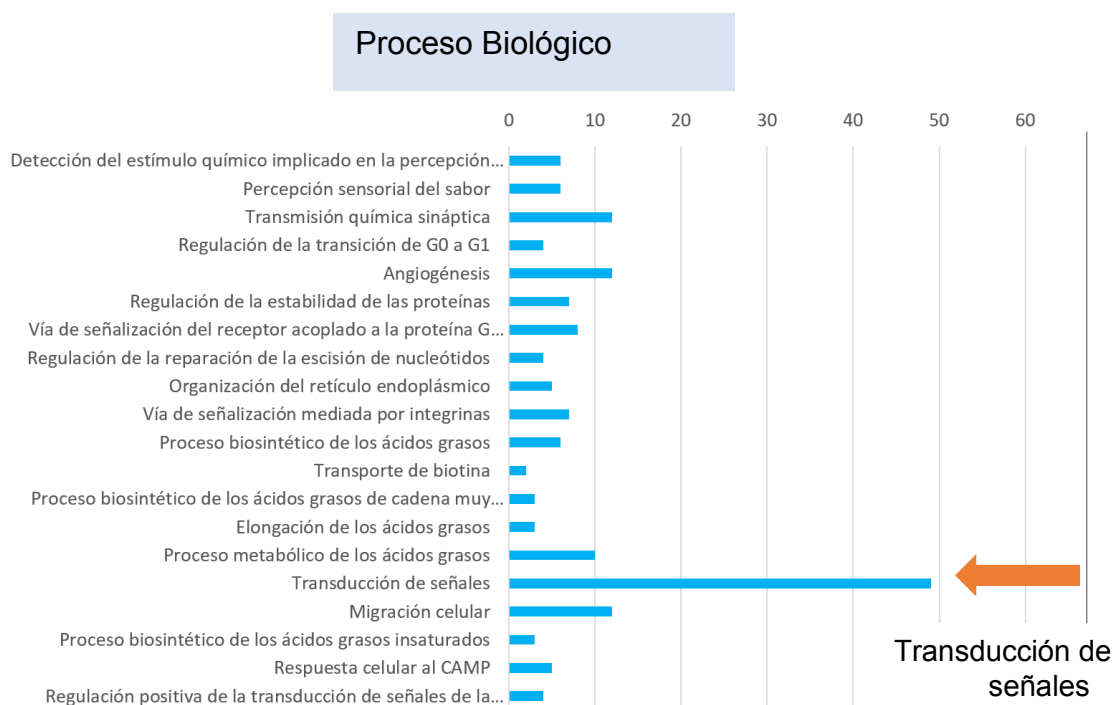
**Rojo:** genes que redujeron su expresión (123)

**Azúl:** genes que aumentaron su expresión (4)

Estos resultados indican que SUN2 podría promover la expresión de 123 genes cuando sus niveles se encuentran incrementados en el contexto de meduloblastoma, aunque los mecanismos moleculares que podrían estar implicados están pendientes de ser investigados.

#### 8.4 Análisis ontológico de los genes regulados por la deficiencia de SUN2

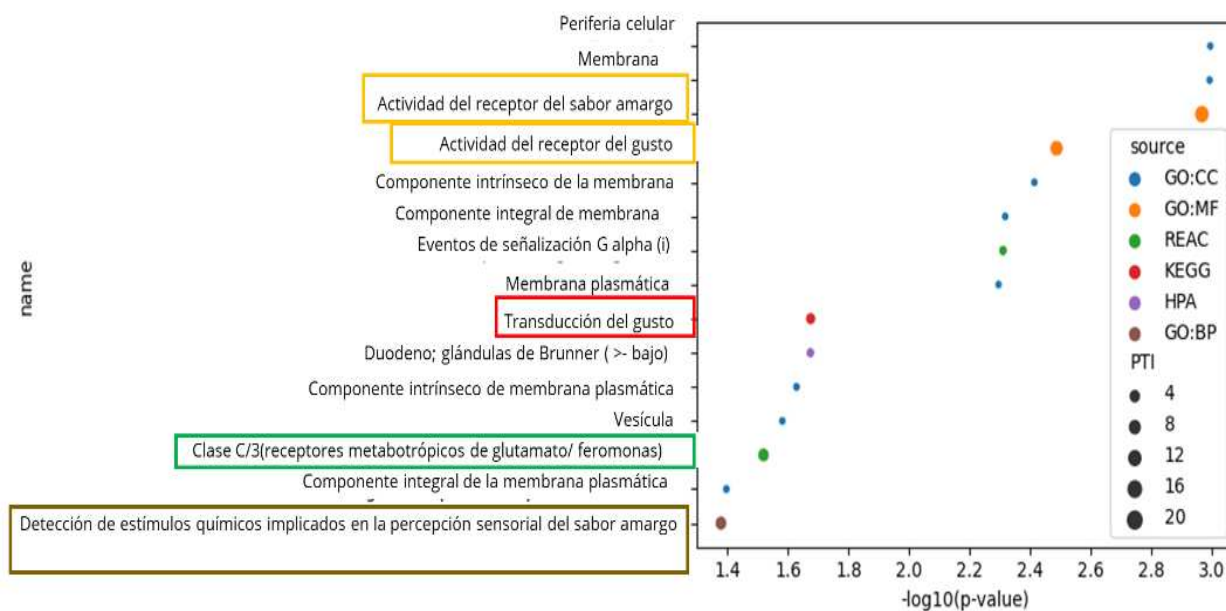
De los genes que redujeron su expresión, se hizo un análisis de ontología génica utilizando como herramienta *Gene Panther* (Figura 31), para determinar las principales vías moleculares afectadas en respuesta al cambio en el perfil de expresión génica por la reducción de los niveles de SUN2 en meduloblastoma. Para ello se analizó la ontología de procesos biológicos, componente celular y función molecular. De esta forma, se identificaron los siguientes procesos en donde están involucrados: transducción de señales (procesos biológicos), asociados a membrana y citoplasma (componente celular), interacción de proteínas y señalización por GPCRs (función molecular).



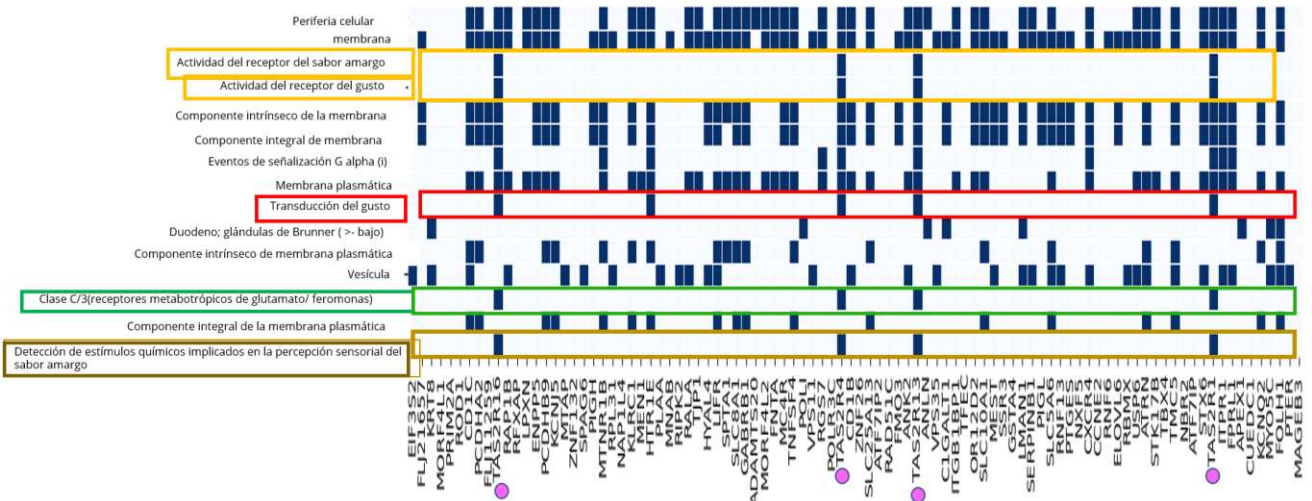


**Figura 31.** Análisis ontológico de genes que redujeron su expresión en células DAOY-siSUN2, y las principales vías implicadas a nivel biológico, celular y molecular (Realizado con Gene Panther).

De los genes que redujeron su expresión en células DAOY-siSUN2 con respecto al grupo control, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento génico (Figura 32), en el cual se obtuvo un dot-plot y se analizó, a través unas bases de datos, la probabilidad que hay de que se encuentre enriquecida por la presencia de un gen, de acuerdo a eso se determinaron las siguientes clasificaciones: actividad del receptor amargo, actividad del receptor del gusto, transducción del gusto, Clase C/3n (receptores metabotrópicos de glutamato/feromonas) y detección de estímulos químicos implicados en la percepción sensorial del sabor amargo. De esas clasificaciones se obtuvieron algunos genes de interés (Figura 33).



**Figura 32.** Análisis de ontología génica de genes expresados diferencialmente en las células DAOY-siSUN2. Los colores representan diferentes bases de datos, el tamaño de los círculos representa las clasificaciones con mayor enriquecimiento génico. Izquierda se muestran las clasificaciones de interés.



**Figura 33.** Genes expresados diferencialmente al inhibir a SUN2. La figura muestra cada ontología sobrerrepresentada, señalados con un círculo rosa los genes presentes en el mayor número de clasificaciones. Izquierdo: se muestran las clasificaciones de interés.

### 8.5 Investigación de los genes *TAS2R*

Los genes que redujeron su expresión por SUN2 que se encuentran involucrados en un mayor número de procesos biológicos fueron: *TAS2R1*, *TAS2R4*, *TASR16* y *TASR13*. Además, se hizo una investigación bibliográfica que incluyera reportes que relacionen al gen de interés con un contexto de cáncer o del SNC (Tabla IV). El receptor *TAS2R4* se ha estudiado en cáncer de mama y ovario, y se encontró una reducción de su expresión en comparación con el tejido sano. *TAS2R1* incrementa o disminuye su expresión en cáncer de ovario, dependiendo de la línea celular, mientras que en cáncer de cabeza y cuello mantuvo su expresión estable. Aún faltan más investigaciones enfocadas al estudio de los receptores del gusto relacionadas a cáncer, pues hasta el momento la información es limitada.

**Tabla IV** Funciones de los genes *TAS2R*

Genes	Tipo celular o tejido	Actividad	Referencia
<b>TAS2R</b>	líneas celulares y muestras de tejido cancerosas (baja)	Antitumor	(Zehentner, ET AL. 2021)
<b>TAS2R16</b>	tejidos neuronales humanos y la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.	La salicina podría modular el crecimiento de neuritas mediante la activación del receptor del sabor amargo	(Wölfle, 2015)
<b>TAS2R4</b>	• Células de cáncer de mama (baja)	Antitumor	(Singh et al.2014)
	• Muestras clínicas de cáncer de mama (baja)	Antitumor	(Singh et al. 2019)
	• Células epiteliales de ovario (OVCAR8). (bajo)	Antitumor	(Martín et al. 2019)
<b>TAS2R13</b>	• Tejido cerebral de pacientes post mortem con EP se obtuvo del Banco de Cerebros del Instituto de Neuropatología (HUB-ICO-IDIBELL Biobanco)	aumentaron en las etapas premotora y parkinsoniana	(García et al, 2013)
<b>TAS2R1</b>	• Familias con múltiples individuos afectados (múltiples) de los repositorios ampliamente estudiados de Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) y del Instituto Nacional de Salud Mental de EE. UU. (NIMH)	SNP en el cromosoma 5p15 (entre SEMA5A y TAS2R1 ) se asoció significativamente con el autismo	(Weiss, et al. 2009) (Martín et al. 2019) (Tsutsumi et al. 2015)
	• Células epiteliales de ovario  • pacientes que recibieron quimiorradioterapia y cinco pacientes que recibieron radioterapia por cáncer de cabeza y cuello	Es variable  T1R1 permanecieron sin cambios	

Hasta el momento los datos bioinformáticos, y el microarreglo de tejido de meduloblastoma, indican que la expresión de SUN2 en meduloblastoma es alta con respecto al tejido normal, y que hay 123 genes que reducen su expresión por SUN2 dentro de los que destacan 4 genes receptores del gusto: TAS2R1, TAS2R4, TAS2R13 y TAS2R16.

## 9. DISCUSIÓN

El meduloblastoma es un tumor maligno grado IV pediátrico que se desarrolla en el cerebelo y puede invadir otras regiones del SNC conduciendo a la muerte de los pacientes. Dada su afectación principalmente en el sector infantil, resulta importante, evidenciar proteínas clave que puedan estar implicados en la progresión del meduloblastoma, por lo que en este trabajo nos enfocamos a investigar a la proteína SUN2 en este tipo de neoplasia. Por otra parte, la proteína SUN2, por su localización en la envoltura nuclear, se ha propuesto como un factor que podría participar en algunos mecanismos de regulación de la expresión génica. Ejemplo de ello, es que SUN2 puede mantener una interacción con la lámina nuclear, la cual es central en la generación de LADs y regiones de heterocromatina caracterizadas por un

silenciamiento de expresión génica (Khilan, 2021). Sin embargo, al momento de comenzar esta investigación, solo se conocía que la expresión de los genes *GLUT1*, *LDHA* y *BDNF* podría modularse en respuesta a los niveles de *SUN2* en un contexto de carcinomas (Liao *et al.* 2021, Lv *et al.* 2015, Liu, *et al.* 2021). Estos antecedentes resultan importantes, dado que demuestran en primer lugar, una reducción de la expresión de *SUN2* en carcinomas, tales como el carcinoma de tejido mamario, próstata, pulmón, de colon y oral. En segundo lugar, estos antecedentes sugieren una participación de *SUN2* en los procesos de regulación transcripcional, modulando a la baja la expresión de genes asociados con la progresión maligna. No obstante, los mecanismos implicados tanto en la modulación a la baja de *SUN2* en carcinomas, como su efecto sobre el transcriptoma y los mecanismos implicados, no han sido definidos. En consecuencia, otros tipos de tumores malignos como los desarrollados en el SNC y su relación con *SUN2*, tampoco han sido investigados a profundidad. En este trabajo, nos interesó indagar la expresión de *SUN2* en meduloblastoma en comparación con tejido saludable, y establecer su posible impacto sobre la expresión génica.

### **SUN2 tiene una expresión diferencial en los diferentes tipos de cáncer.**

Cabe nuevamente resaltar, que la mayoría de los estudios efectuados a la fecha indican que los niveles de *SUN2* están reducidos en carcinoma de mama (Koedoot *et al.* 2021), colon (Liu *et al.* 2021), pulmón (Lv *et al.* 2015), próstata (Yajun *et al.* 2017) y oral (Liao *et al.* 2021). Dichos estudios han relacionado la reducción de los niveles de *SUN2* con el incremento de algunos sellos del cáncer, como la proliferación y la inhibición de la apoptosis, sugiriendo acciones supresoras de tumores para *SUN2* en los carcinomas. Aunque los carcinomas son los tipos de cáncer más comunes, existen también neoplasias malignas desarrolladas en la sangre (leucemias), en el tejido conectivo (sarcomas) y en las células del SNC, en los que no necesariamente ocurren los mismos procesos tumorigénicos que en los carcinomas (NCI, 2021). Con base en esto, nuestro estudio evidenció que la desregulación de la expresión de *SUN2* ocurre diferencialmente dependiendo del tipo de tumor. De este modo, la expresión de *SUN2* se encuentra reducida de manera estadísticamente significativa en la mayoría de los carcinomas. En contraste, en

tumores desarrollados en el sistema conectivo como los sarcomas, y en leucemias, los niveles de *SUN2* tienden al alza y llegan a ser significativamente más altos que en una condición saludable, respectivamente. La evaluación de las funciones de *SUN2* en estos contextos de cáncer también resultaría muy interesante, pero al momento no se conocen.

En nuestra investigación, nos enfocamos en el contexto de meduloblastoma, no obstante, también investigamos la expresión de *SUN2* en muestras de glioblastoma. El glioblastoma se desarrolla en los lóbulos y es también muy invasivo a otras regiones del SNC, pero con la diferencia que es común en las personas mayores a 65 años. Nuestro análisis indicó que, aunque ambos tumores son desarrollados en regiones del SNC, también presentan diferencias en la expresión de *SUN2*. En el caso del glioblastoma, los niveles de *SUN2* se encuentran a la baja, mientras que son elevados en meduloblastoma con respecto al tejido saludable. Estos datos, podrían sugerir que en la desregulación de la expresión de *SUN2* podrían implicar a diversos factores asociados al tipo de célula, y también de factores ligados al envejecimiento, entre otros, pero se requieren más estudios al respecto.

Hasta ahora, nuestros datos, son los primeros en analizar y comparar la expresión de *SUN2* en diversas neoplasias, observando diferencias que podrían tener implicaciones funcionales en los diversos tipos de carcinomas, sarcomas, leucemias y los tumores del SNC, que son nuestro principal interés. Adicionalmente, *SUN2* a nivel de proteína en muestras de pacientes con meduloblastoma, coincidió con los altos niveles de RNAm *SUN2*. Por lo tanto, altos niveles tanto de RNAm como de proteína *SUN2* son detectados en meduloblastoma en comparación con el tejido saludable.

### ***SUN2* modula la expresión génica en meduloblastoma.**

Dado que *SUN2* se expresa al alza en muestras de pacientes con meduloblastoma, se utilizó como un modelo de estudio las células DAOY, y se utilizó la estrategia de RNA interferente específico para *SUN2* con el objetivo de reducir sus niveles de proteína, y determinar su efecto sobre el perfil de expresión génica.

Como se mencionó, *GLUT1*, *LDHA*, y *BDNF* están asociados con la progresión de carcinomas, y presentan una correlación negativa con SUN2, es decir, mientras disminuyen los niveles de SUN2, la expresión de dichos genes aumenta (Liao et al. 2021, Lv et al. 2015, Liu, et al. 2021). Sin embargo, hasta este punto, no era claro si los niveles de SUN2 podrían afectar la expresión de otros genes diferentes, y si esto podría ocurrir en el contexto específico de meduloblastoma, donde el patrón de expresión de SUN2 (al alza) es diferente respecto a los carcinomas.

Primero, SUN2 se detectó en la envoltura nuclear coincidiendo en lo reportado en la literatura (Cruz, et al. 2019). Por ejemplo, Liu y colaboradores en el 2021, localizaron a SUN2 en la envoltura nuclear de células de cáncer de colon. En el microarreglo de cDNA, se evidencio que la reducción de SUN2 resulta principalmente en una disminución de la expresión génica. Dentro de los genes cuya expresión se redujo como consecuencia de la disminución de SUN2 se encuentran genes implicados en vías de transducción de señales. Al respecto, un resultado muy interesante y no esperado, consistió en la afectación de genes que codifican para la familia de receptores del sabor, particularmente del sabor amargo, tales como: *TAS2R1*, *TAS2R4*, *TAS2R13* y *TAS2R16*.

Estos genes de la familia TAS2R codifican para proteínas que tienen una localización en la membrana plasmática de las células. Su función se asocia a una actividad de receptores celulares, que se encuentran clasificadas como receptores del gusto tipo II (Lambert, et al. 2019). Aunque originalmente fueron descubiertos y estudiados por sus implicaciones bucales, para la detección del sabor, hoy en día se sabe que son proteínas que tienen una localización oral y extra-oral (Tuzim & Korolczuk, 2021).

Dentro de la literatura, de acuerdo con Zehentner y colaboradores en el 2021, estudiaron a la familia de TAS2R en líneas celulares y muestras de tejido de carcinomas, encontrando una expresión baja (Zehentner et al, 2021). Singh y colaboradores en el 2014 y Martín y colaboradores en el 2019, realizaron una investigación en células de cáncer de mama y células epiteliales de ovario respectivamente, y encontraron que la expresión de *TAS2R4* se encontraba

disminuida, (Singh *et al.*, 2014 y Martín *et al.*, 2019). En contraparte Martín y colaboradores en el 2019 al estudiar la expresión de *TAS2R1* en células epiteliales de ovario observó que dependiendo de la línea celular la expresión de *TAS2R1* era diferencial (Martín *et al.*, 2019).

Respecto al contexto del SNC, se ha estudiado a *TAS2R16*, *TAS2R13* y *TAS2R1* y se ha sugerido que podrían ser importantes para la homeostasis cerebral y que su desregulación podría conducir a la neuroinflamación (Duarte, 2022). Wölfle en el 2015 realizó un estudio en tejidos neuronales humanos y la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, y encontró que la salicina podría modular el crecimiento de neuritas mediante la activación del receptor amargo *TAS2R16*. Además, García y colaboradores en el 2013, realizó una investigación en donde encontró que *TAS2R13* en el tejido cerebral de pacientes *post mortem* con enfermedad de Parkinson aumentó en las etapas premotora y parkinsoniana (García *et. al.*, 2013). De acuerdo con estos antecedentes, la familia *TAS2R* se le ha relacionado con afectaciones a nivel del SNC, pero hasta ahora no hay un dato de su asociación con tumores del SNC, ni mucho menos en particular con el meduloblastoma.

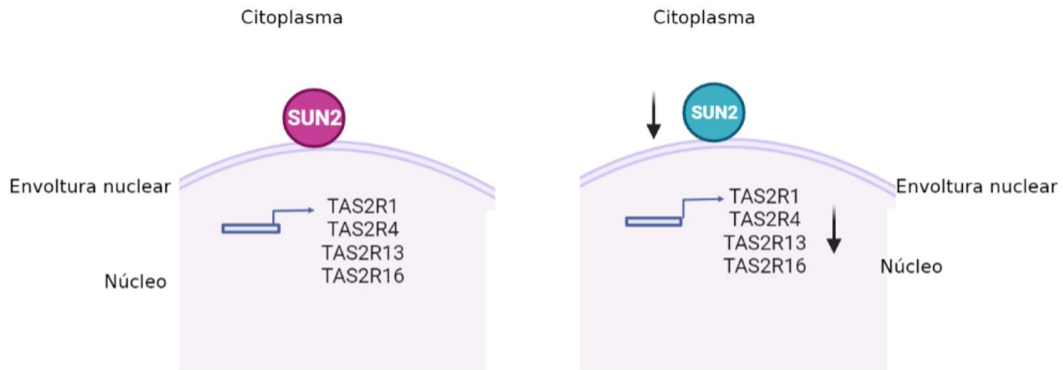
En este trabajo, analizamos la expresión de estos receptores en meduloblastoma respecto al tejido saludable utilizando *Oncopression*, para determinar si existía alguna correlación con la expresión de *SUN2* en dicha neoplasia. A través de este análisis *in silico*, solamente la expresión de *TAS2R16* en meduloblastoma se correlacionó con la expresión de *SUN2*, es decir, ambos se encuentran incrementados en meduloblastoma en comparación al tejido sin cáncer. Sin embargo, aún es necesario corroborar si la expresión de *SUN2* tiene impacto sobre la expresión de *TAS2R* y determinar las posibles consecuencias funcionales que pudiera tener en meduloblastoma. No obstante, resulta relevante el hallazgo sobre la identificación de genes cuya expresión es afectada por los cambios de expresión de *SUN2*, y que estos genes sean todo un campo abierto de investigación en el contexto del cáncer (Figura 33).

### **Acciones de SUN2 en meduloblastoma.**

En este trabajo quedó pendiente el conocer las acciones moleculares que SUN2 puede tener en el contexto de meduloblastoma. Aunque hemos identificado genes de la familia TAS2R que se afectan por SUN2 en meduloblastoma, la limitación que se presenta es que, tampoco se conoce la función de dichos receptores en este tipo de cáncer, generándose nuevas áreas de oportunidad para ser investigadas. Sin embargo, es importante mencionar, que se cuenta en la literatura con un estudio previo, el cual buscaba identificar RNAm modulados por miRNA221/222 en meduloblastoma (Hsieh, *et al.* 2014). Los autores encontraron que el RNAm de SUN2 era un blanco de dichos miRNAs, los cuales al ser sobreexpresados en las células DAOY incrementaban su viabilidad, y el desarrollo tumoral en un modelo *in vivo*, en comparación con las células DAOY control (que no sobreexpresaban los miRNA221/222). En concordancia con esto, los autores observaron que al sobreexpresar SUN2 la viabilidad celular se reducía en las células DAOY. Los resultados de este estudio sugieren que SUN2 actúa como supresor tumoral en meduloblastoma. En contraste, basados en nuestros datos, el incremento de SUN2 en meduloblastoma podría sugerir una actividad contraria, actuando como una proteína pro-tumorigénica. Sin embargo, en el caso de nuestra investigación, son necesarios estudios funcionales, para demostrar qué acciones podría tener SUN2 en el contexto de meduloblastoma.

Por otro lado, considerando que se ha demostrado la asociación de SUN2 con las proteínas SUN1, Nesprina, Lámina, SIRT1 y CRM-1, es probable que SUN2 participe en el transporte molecular núcleo-citoplasmático, empalme alternativo, en la interacción con moduladores de la cromatina, en la distribución y organización de la cromatina dentro del núcleo y en la mecanotransducción (Figuroa *et al.* 2023), y estos mecanismos podrían también estar asociados a SUN2 en meduloblastoma. A través de estos eventos moleculares, SUN2 podría tener un impacto en la expresión génica, repercutiendo en las respuestas celulares pro o anti- tumorigénicas. Por tal motivo, se requieren más estudios sobre las rutas moleculares asociadas a SUN2 en contextos específicos, incluyendo el meduloblastoma.

### Células de meduloblastoma DAOY



**Figura 34.** La expresión de *SUN2* modifica la expresión de genes asociados a receptores de la familia TAS2R. De lado izquierdo se observa la expresión de *SUN2* que a su vez los genes *TAS2R1*, *TAS2R4*, *TAS2R13* Y *TAS2R16* se expresan. De lado derecho cuando hay una disminución de la expresión de *SUN2* los genes *TAS2R1*, *TAS2R4*, *TAS2R13* Y *TAS2R16* disminuyen su expresión.

## 10. CONCLUSIONES

- La expresión de SUN2 en neoplasias malignas es diferencial dependiendo del tipo de tumor.
- Particularmente en meduloblastoma, los niveles de SUN2 son más altos que en tejido normal.
- Se identificaron genes regulados por la expresión de *SUN2* en células de meduloblastoma, los cuales mayoritariamente presentan una expresión disminuida en células DAOY-siSUN2.
- Los genes identificados que presentan una expresión disminuida en las células DAOY-siSUN2 están asociados con la transducción de señales, principalmente con receptores de tipo GPCRs, dentro de los que se encuentran genes que codifican para receptores del sabor de la familia TAS2R, tales como: TAS2R1, TAS2R16, TAS2R4, y TAS2R13
- De acuerdo a la investigación bibliográfica, los genes TAS2R extra-orales tienen implicaciones en algunos tipos de cáncer, pero la información es limitada a la fecha. Por lo tanto, representan un campo abierto de estudio en el contexto del meduloblastoma y su relación con SUN2.

## **11. PERSPECTIVAS**

Partiendo de este estudio, es requerido evaluar las consecuencias de la reducción de los niveles de SUN2 sobre algunos sellos del cáncer, entre ellos proliferación, migración y la resistencia a la apoptosis, en el contexto del meduloblastoma.

También es importante, analizar el interactoma de SUN2 en los contextos de cáncer, considerando que el conocer sus patrones de interacción con otras proteínas podría contribuir a entender sus mecanismos moleculares de acción.

Además, la caracterización del patrón de expresión de los receptores de la familia de TAS2R en diversos tipos de cáncer, incluyendo el meduloblastoma, demanda atención. Del mismo modo, es necesario investigar las acciones de los TAS2R extra-orales, para entender la posible conexión molecular y funcional con SUN2, así como su transcendencia en la progresión maligna, lo cual a la fecha es desconocido.

## 12. REFERENCIAS

1. Alegría, L., MA, Galnares, O., JA & Mercado M. (2017) Tumores del sistema nervioso central. *Rev Med Inst Mex Seg Soc* ;55(3):330-340.
2. Alvarado-Kristensson, M., & Rosselló, C. A. (2019). The Biology of the Nuclear Envelope and Its Implications in Cancer Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2586. <https://doi.org/10.3390/ijms20102586>
3. Barrios, E. & Garau, M. (2017) Epidemiología del cáncer en Uruguay y el mundo. *An Facultad Med (Univ Repúb Urug)*;4(1):9-46.
4. Bouzid, T., Kim, E., Riehl, B. D., Esfahani, A. M., Rosenbohm, J., Yang, R., Duan, B., & Lim, J. Y. (2019). The LINC complex, mechanotransduction, and mesenchymal stem cell function and fate. *Journal of Biological Engineering*, 13(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0197-9>
5. Briand, N., & Collas, P. (2020). Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biology*, 21(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02003-5>
6. Casciati, A., Tanori, M., Manczak, R., Saada, S., Tanno, B., Giardullo, P., Porcù, E., Rampazzo, E., Persano, L., Viola, G., Dalmay, C., Lalloué, F., Pothier, A., Merla, C., & Mancuso, M. (2020). Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype. *Cancers*, 12(1), 226. <https://doi.org/10.3390/cancers12010226>
7. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Rodriguez IP, Chakravarthi BVSK y Varambally S. UALCAN: un portal para facilitar la expresión génica de subgrupos tumorales y análisis de supervivencia. *Neoplasia*. Agosto de 2017; 19 (8): 649-658. doi: 10.1016 / j.neo.2017.05.002 [PMID: 28732212]
8. Contreras, L. E. (2017). EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES CEREBRALES. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(3), 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2017.05.001>
9. Contreras, L. E. (2017). Epidemiología de tumores cerebrales. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(3), 332-338.

10. Cruz-Ramos, E., Sandoval-Hernández, A., & Tecalco-Cruz, A. C. (2019). Differential expression and molecular interactions of chromosome region maintenance 1 and calreticulin exportins in breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 185, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.07.003>
11. De la Cruz Pabón, J. R., Patiño Hoyos, M. A., Quiceno Restrepo, E., & Toro Montoya, A. E. (2018). Medulloblastoma: de la clasificación histológica a la molecular. *Medicina UPB*, 37(1), 47–54. <https://doi.org/10.18566/medupb.v37n1.a06>
12. Denais, C. M., Gilbert, R. M., Isermann, P., McGregor, A. L., te Lindert, M., Weigelin, B., Davidson, P. M., Friedl, P., Wolf, K., & Lammerding, J. (2016). Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6283), 353–358. <https://doi.org/10.1126/science.aad7297>
13. DeSouza, R.-M., Jones, B. R. T., Lowis, S. P., & Kurian, K. M. (2014). Pediatric Medulloblastoma “Update on Molecular Classification Driving Targeted Therapies. *Frontiers in Oncology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00176>
14. Dhanyamraju, P. K., Patel, T. N., & Dovat, S. (2020). Medulloblastoma: «Onset of the molecular era». *Molecular Biology Reports*, 47(12), 9931-9937. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05971-w>
15. Duarte, A. C., Costa, A. R., Gonçalves, I., Quintela, T., Preissner, R., & Santos, C. R. A. (2022). The druggability of bitter taste receptors for the treatment of neurodegenerative disorders. *Biochemical Pharmacology*, 197, 114915. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.114915>
16. Figueroa, R., Zamora, S., Macías, S. y Tecalco, C., (2023). SUN2: Una proteína de envoltura nuclear con acciones supresoras de tumores, *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 42 (2), *en prensa*.
17. Garcia-Esparcia, P., Schlüter, A., Carmona, M., Moreno, J., Ansoleaga, B., Torrejón-Escribano, B., Gustincich, S., Pujol, A., & Ferrer, I. (2013). Functional Genomics Reveals Dysregulation of Cortical Olfactory Receptors in Parkinson Disease: Novel Putative Chemoreceptors in the Human Brain. *Journal of*

- Neuropathology & Experimental Neurology, 72(6), 524-539.  
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318294fd76>
18. Genic Insights From Integrated Human Proteomics in GeneCards (Citations: 132) Fishilevich S, Zimmerman S, Kohn A, Iny Stein T, Safran M, and Lancet D, Database (2016); doi: 10.1093/database/baw030
  19. Giraldo B, Rodrigo, Santos, Ana María, & Londoño, John. (2015). Vía de señalización Wnt en artritis reumatóide. Revista Colombiana de Reumatología, 22(2), 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2015.04.001>
  20. Gonzales Rengifo, Gustavo F, Gonzales Castañeda, Cynthia, Espinosa Guerinoni, Diego, & Rojas Tubeh, Cristina. (2007). Sobre expresión de genes de las enzimas de la vía glicolítica en células cancerígenas. Acta Médica Peruana, 24(3), 187-197. Recuperado en 17 de abril de 2023, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1728-59172007000300011&lng=es&tling=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172007000300011&lng=es&tling=es).
  21. Hampoelz, B., & Baumbach, J. (2022). Nuclear envelope assembly and dynamics during development. Seminars in Cell & Developmental Biology, S1084952122000672. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.028>
  22. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
  23. Hovestadt, V., Ayrault, O. Swartling, F.J. & et al. (2020). Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. Nat Rev Cancer 20, 42–56.
  24. Hsieh, T.-H., Chien, C.-L., Lee, Y.-H., Lin, C.-I., Hsieh, J.-Y., Chao, M.-E., Liu, D.-J., Chu, S.-S., Chen, W., Lin, S.-C., Ho, D. M.-T., Liu, R.-S., Lin, C.H., Wong, T.-T., & Wang, H.-W. (2014). Downregulation of SUN2, a novel tumor suppressor, mediates miR-221/222-induced malignancy in central nervous system embryonal tumors. Carcinogenesis, 35(10),
  25. Jahed, Z., Shams, H., & Mofrad, M. R. (2015). A Disulfide Bond Is Required for the Transmission of Forces through SUN-KASH Complexes. Biophysical journal, 109(3), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.057>

26. Khilan, A. A., Al-Maslamani, N. A., & Horn, H. F. (2021). Cell stretchers and the LINC complex in mechanotransduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 702, 108829. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108829>
27. Koedoot, E., van Steijn, E., Vermeer, M., González-Prieto, R., Vertegaal, A. C. O., Martens, J. W. M., Le Dévédec, S. E., & van de Water, B. (2021). Splicing factors control triple-negative breast cancer cell mitosis through SUN2 interaction and sororin intron retention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01863-4>
28. Lambert, J. D., VanDusen, S. R., Cockroft, J. E., Smith, E. C., Greenwood, D. C., & Cade, J. E. (2019). Bitter taste sensitivity, food intake, and risk of malignant cancer in the UK Women's Cohort Study. *European Journal of Nutrition*, 58(5), 2111-2121. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1772-4>
29. Lambert, J.D., VanDusen, S.R., Cockroft, J.E. et al. Bitter taste sensitivity, food intake, and risk of malignant cancer in the UK Women's Cohort Study. *Eur J Nutr* 58, 2111–2121 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1772-4>
30. Lara, H., Li, Z., Abels, E., Aeffner, F., Bui, M. M., ElGabry, E. A., Kozlowski, C., Montalto, M. C., Parwani, A. V., Zarella, M. D., Bowman, D., Rimm, D., & Pantanowitz, L. (2021). Quantitative Image Analysis for Tissue Biomarker Use: A White Paper From the Digital Pathology Association. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 29(7), 479-493. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000930>
31. Liang, Y., Chiu, P. H., Yip, K. Y., & Chan, S. Y. (2011). Subcellular localization of SUN2 is regulated by lamin A and Rab5. *PloS one*, 6(5), e20507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020507>
32. Liao, Y., Zhao, T., Li, L.-Y., & Wang, F.-Q. (2021). Elevated Sad1 and UNC84 Domain Containing 2 (SUN2) level inhibits cell growth and aerobic glycolysis in oral cancer through reducing the expressions of glucose transporter 1 (GLUT1) and lactate dehydrogenase A (LDHA). *Journal of Dental Sciences*, 16(1), 460-466. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.08.007>
33. Liu, L., Li, S., Yuan, W., Tang, J., & Sang, Y. (2021). Downregulation of SUN2 promotes metastasis of colon cancer by activating BDNF / TrkB signalling by

- interacting with SIRT1. *The Journal of Pathology*, 254(5), 531- 542.  
<https://doi.org/10.1002/path.5697>
34. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*,23(8),1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
35. Lv, X., Liu, L., Cheng, C., Yu, B., Xiong, L., Hu, K., Tang, J., Zeng, L., & Sang, Y. (2016). SUN2 exerts tumor suppressor functions by suppressing the Warburg effect in lung cancer. *Scientific Reports*, 5(1), 17940. <https://doi.org/10.1038/srep17940>
36. Martin, L. T. P., Nachtigal, M. W., Selman, T., Nguyen, E., Salsman, J., Delleire, G., & Dupré, D. J. (2019). Bitter taste receptors are expressed in human epithelial ovarian and prostate cancers cells and noscapine stimulation impacts cell survival. *Molecular and cellular biochemistry*, 454(1-2), 203–214. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3464-z>
37. Martirosian, V., Deshpande, K., Zhou, H., Shen, K., Smith, K., Northcott, P., Lin, M., Stepanosyan, V., Das, D., Remsik, J., Isakov, D., Boire, A., De Feyter, H., Hurth, K., Li, S., Wiemels, J., Nakamura, B., Shao, L., Danilov, C., ... Neman, J. (2021). Medulloblastoma uses GABA transaminase to survive in the cerebrospinal fluid microenvironment and promote leptomeningeal dissemination. *Cell Reports*, 35(13), 109302. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109302>
38. Matsumoto, A., Hieda, M., Yokoyama, Y., Nishioka, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., & Matsuura, N. (2015). Global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C, and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer. *Cancer medicine*, 4(10), 1547–1557. <https://doi.org/10.1002/cam4.495>
39. Meinke, P., Mattioli, E., Haque, F., Antoku, S., Columbaro, M., Straatman, K. R., Worman, H. J., Gundersen, G. G., Lattanzi, G., Wehnert, M., & Shackleton, S. (2014). Muscular dystrophy-associated SUN1 and SUN2 variants disrupt

- nuclear-cytoskeletal connections and myonuclear organization. *PLoS genetics*, 10(9), e1004605. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004605>
40. Méjat A, Misteli T. LINC complexes in health and disease. *Nucleus*. 2010 Jan-Feb;1(1):40-52. doi: 10.4161/nucl.1.1.10530. PMID: 21327104; PMCID: PMC3035119.
41. NCI ( National Cancer Institute), ¿Qué es el cáncer?:2021 (5-may-2021: 12-02-2023) Disponible en: <https://www.cancer.gov/>
42. Northcott, P. A., Robinson, G. W., Kratz, C. P., Mabbott, D. J., Pomeroy, S. L., Clifford, S. C., Rutkowski, S., Ellison, D. W., Malkin, D., Taylor, M. D., Gajjar, A., & Pfister, S. M. (2019). Medulloblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0063-6>
43. Oncopression. (2022). Obtenido de: <http://www.oncopression.com>
44. Pabón, J. R. de la C., Hoyos, M. A. P., Restrepo, E. Q., & Montoya, A. E. T. (2018). Medulloblastoma: De la clasificación histológica a la molecular. *Medicina U.P.B.*, 37(1), 47-54.
45. Paci, G., Caria, J., & Lemke, E. A. (2021). Cargo transport through the nuclear pore complex at a glance. *Journal of Cell Science*, 134(2), jcs247874. <https://doi.org/10.1242/jcs.247874>
46. Patel, S., Alam, A., Pant, R., & Chattopadhyay, S. (2019). Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. *Frontiers in Immunology*, 10, 2872. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02872>.
47. Rose, M., Burgess, J. T., O'Byrne, K., Richard, D. J., & Bolderson, E. (2022). The role of inner nuclear membrane proteins in tumourigenesis and as potential targets for cancer therapy. *Cancer metastasis reviews*, 41(4), 953–963. <https://doi.org/10.1007/s10555-022-10065-z>
48. Schaller, T., Bulli, L., Pollpeter, D., Betancor, G., Kutzner, J., Apolonia, L., Herold, N., Burk, R., & Malim, M. H. (2017). Effects of Inner Nuclear Membrane Proteins SUN1/UNC-84A and SUN2/UNC-84B on the Early Steps of HIV-1 Infection. *Journal of Virology*, 91(19), e00463-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00463-17>

49. Singh, N., Chakraborty, R., Bhullar, R. P., & Chelikani, P. (2014). Differential expression of bitter taste receptors in non-cancerous breast epithelial and breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(2), 499-503. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.140>
50. Singh, N., Shaik, F. A., Myal, Y., & Chelikani, P. (2020). Chemosensory bitter taste receptors T2R4 and T2R14 activation attenuates proliferation and migration of breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 465(1-2), 199-214. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03679-5>
51. Sinning, M. (2017). Clasificación de los Tumores Cerebrales. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(3), 339-342. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2017.05.002>
52. Tecalco-Cruz, A. C., Macías-Silva, M., Ramírez-Jarquín, J. O., Ríos-López, D. G., & Zepeda-Cervantes, J. (2021). Mecanismos básicos en la modulación de la expresión génica: Algunas implicaciones en el envejecimiento del cerebro. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.0.295>
53. Tsutsumi, R., Goda, M., Fujimoto, C., Kanno, K., Nobe, M., Kitamura, Y., Abe, K., Kawai, M., Matsumoto, H., Sakai, T., & Takeda, N. (2016). Effects of chemotherapy on gene expression of lingual taste receptors in patients with head and neck cancer: Effect of Chemotherapy on Taste Receptor mRNA. *The Laryngoscope*, 126(3), E103-E109. <https://doi.org/10.1002/lary.25679>
54. Tuzim, K., & Korolczuk, A. (2021). An update on extra-oral bitter taste receptors. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 440. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03067-y>
55. Tuzim, K., Korolczuk, A. Una actualización sobre los receptores de sabor amargo extraorales. *J Transl Med* 19 , 440 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03067-y>
56. Valencia, C., J. (2018). Contribución del citocromo P450 y de proteínas reguladoras del pH a la quimiorresistencia de células de meduloblastoma humano (DAOY) en condiciones de hipoxia, Para obtener el grado: Doctor en ciencias, en la especialidad de Neurobiología Celular y Molecular, IPN, pág 104.

57. Weiss, L. A., Arking, D. E., Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly, M. J., & Chakravarti, A. (2009). A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*, 461(7265), 802–808. <https://doi.org/10.1038/nature08490>
58. Wölfle, U., Haarhaus, B., Kersten, A., Fiebich, B., Hug, M. J., & Schempp, C. M. (2015). Salicin from Willow Bark can Modulate Neurite Outgrowth in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells: Salicin Can Promote Neurite
59. World Health Organization, Cáncer: 2022 (3-feb-2022: 06-01-2023) Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
60. Yajun, C., Chen, Y., Xiaosa, L., Xiao, W., Jia, C., Zhong, W., & Bin, X. (2017). Loss of Sun2 promotes the progression of prostate cancer by regulating fatty acid oxidation. *Oncotarget*, 8(52), 89620-89630. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19210>
61. Yamaki M, Saito H, Isono K, Goto T, Shirakawa H, Shoji N, Satoh-Kuriwada S, Sasano T, Okada R, Kudoh K, Motoi F, Unno M, Komai M. Genotyping Analysis of Bitter-Taste Receptor Genes TAS2R38 and TAS2R46 in Japanese Patients with Gastrointestinal Cancers. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2017;63(2):148-154. doi: 10.3177/jnsv.63.148. PMID: 28552880.
62. Zehentner, S., Reiner, A. T., Grimm, C., & Somoza, V. (2021). The Role of Bitter Taste Receptors in Cancer: A Systematic Review. *Cancers*, 13(23), 5891. <https://doi.org/10.3390/cancers13235891>

# ANEXO 1. Publicación del artículo, SUN2: Una proteína de envoltura nuclear con acciones supresoras de tumores.

Revista de Educación Bioquímica (REB) 42(2): 75-86, 2023

## ARTÍCULO DE REVISIÓN

### SUN2: UNA PROTEÍNA DE ENVOLTURA NUCLEAR CON ACCIONES SUPRESORAS DE TUMORES

Leslie Olimpia Figueroa-Rivera (1), Sayra Ximena Zamora-Salas (1), Marina Macías-Silva (2), Angeles C. Tecalco-Cruz\* (1)

(1) Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), Ciudad de México, México

(2) Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

\*Autor de correspondencia correo E: [angeles.tecalco@uacm.edu.mx](mailto:angeles.tecalco@uacm.edu.mx)

#### RESUMEN

SUN2 (por su nombre en inglés *Sad1 And UNC84 Domain Containing 2*) es una proteína de envoltura nuclear que mantiene asociaciones con diversas proteínas, promoviendo una comunicación entre el compartimento citoplásmico y el núcleo celular. La proteína SUN2 se ha involucrado en la regulación de la expresión génica y en la inhibición de la progresión de algunos carcinomas. En consecuencia, su desregulación es reportada en el contexto del cáncer. Las investigaciones sugieren que SUN2 participa en la regulación de la expresión génica actuando como un supresor tumoral, función que se pierde en diferentes carcinomas. Esta revisión presenta una descripción del perfil de expresión y de las acciones de SUN2 en algunos carcinomas, así como también analiza su potencialidad como una molécula para el diagnóstico y la terapia de diversos tipos de cáncer.

#### PALABRAS CLAVE:

SUN2, carcinoma, envoltura nuclear, supresor tumoral

#### ABSTRACT

SUN2 (*Sad1 and UNC84 Domain Containing 2*) is a nuclear envelope protein that maintains associations with several proteins, promoting communication between the cytoplasmic compartment and the cell nucleus. The SUN2 protein has been involved in the regulation of gene expression and the inhibition of the progression of some carcinomas. Consequently, its deregulation is reported in the context of cancer. Scientific evidence suggests that SUN2 participates in the regulation of gene expression acting as a tumor suppressor, a key function lost in different carcinomas. This review presents a description of the expression profile and actions of SUN2 in some carcinomas, as well as a discussion of its potential as a molecule for the diagnosis and therapy of various types of cancer.

#### KEYWORDS:

SUN2, carcinoma, the nuclear envelope, tumor suppressor

Recibido el 15 de septiembre de 2022 Aceptado el 06 de marzo de 2023