



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS RELACIONADAS
CON EL METABOLISMO DEL RNA. VALORACIÓN DE SU
PAPEL EN CARCINOGENÉISIS PULMONAR.

Tesis doctoral

Iñaki Vallés Díez

Pamplona, junio de 2009



Universidad de Navarra
Facultad de Ciencias

BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS RELACIONADAS
CON EL METABOLISMO DEL RNA. VALORACIÓN DE SU
PAPEL EN CARCINOGENESIS PULMONAR.

Tesis doctoral

Memoria presentada por D. Iñaki Vallés Díez para aspirar al grado
de Doctor por la Universidad de Navarra

Iñaki Vallés Díez
Pamplona, junio de 2009

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el laboratorio de Biomarcadores del Área de Oncología del Centro de Investigación Médica Aplicada y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, junio de 2009

Dr. Rubén Pío Osés

Dr. Luis Montuenga Badía

El presente trabajo ha sido presentado en la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Navarra
para optar al título de Doctor en Bioquímica

Este trabajo ha sido realizado con las siguientes ayudas económicas:

UTE “proyecto CIMA”.

“Ayuda para la realización de proyectos de investigación”, del Departamento de Educación del Gobierno de Navarra (2007-2008).

“Convenio para el desarrollo de la acción transversal del cáncer”, del Instituto de Salud Carlos III (2008).

Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC).

“Ayuda para la formación de personal investigador”, de la Fundación para la Investigación Médica Aplicada (2009).



A mis padres, Luis y María José

A mi hermana, Aitziber

A mis abuelos

A Raquel

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad de Navarra y al Área de Oncología del CIMA el haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en el Laboratorio de Biomarcadores, del que he formado parte durante este tiempo.

Por supuesto, quiero agradecer a Rubén Pío, de quien he aprendido muchísimo, toda la ayuda que me ha proporcionado. No sólo me ha transmitido todos sus conocimientos, contribuyendo a realizar la mejor ciencia posible, sino que lo ha hecho enseñándome a valorar el esfuerzo y cada pequeño avance conseguido, siempre desde la humildad. Muchas gracias por la dirección de la tesis y por la confianza que has depositado en mí.

También deseo darle las gracias a Luis Montuenga, por todas las opiniones y consejos que me ha dado, avalados por su gran experiencia, que han ayudado a mejorar el trabajo realizado. Sin tus recomendaciones todo esto no habría sido posible.

No puedo olvidarme de mis compañer@s de fatigas del grupo de Biomarcadores: Javi, Alberto, Leti, Cris, Txiki, Amaya, David, Maribel, Jackie, María José, Teresa, Marta, Patricia, Ana, Rebeca y Uxúa. También a aquell@s con l@s que coincidí, pero que ya se fueron: Inma, Dani, Zafira... Perdonadme si me he dejado a alguien.

Me habéis ayudado mucho y hemos compartido tantos momentos... Cuánto tiempo hablando de la jornada de fútbol del domingo anterior, de pelis y series de televisión, de las miles de cosas que circulan por Internet, de “cómo discurre la gente”, de chistes malos y “vallesadas”, de formar un frente ribero común, del Ebro, el Arga y el Bidasoa, de las pizzas de papel con anchoas, de que las “cosas” muchas veces “se rompen” solas, de la E. coli, de rellenar cajas y cajas de puntas, de que los microsátélites no tienen nada que ver con galaxias y nebulosas (o tal vez sí), del buen tiempo que hace en la “Villa del Sol”, de hacer nuestros pinitos escribiendo relatos, de las diapositivas de fauna autóctona, de riquísimas recetas de cocina, de las carreras de Fórmula 1, de los robos arbitrales a Osasuna, de cómo mimar a las células en cultivo, de la canción de la PCR, de política nacional y regional, de las porras del Mundial y la Eurocopa, de *gincanas* de última hora... del buen rollo que hemos tenido. ¡Qué bien nos lo hemos pasado!

Utilizando un símil ciclista, puedo decir que habéis pedaleado conmigo día tras día, escalando los puertos de montaña en búsqueda de resultados y disfrutando de los descensos en los momentos de relajación. Pese a que muchas veces el viento ha soplado en contra y ha habido situaciones de trabajo contra-reloj, con vosotr@s he pasado muchas horas de risas y cachondeo, teniendo siempre el sentimiento de avanzar en el mismo pelotón. Muchas gracias a tod@s vosotr@s por vuestro afecto. La amistad que se ha creado, reforzada además fuera del CIMA, nunca desaparecerá. Os echaré de menos.

Gracias también al Laboratorio de Microambiente Tumoral: Erik (¡Eeeyyy!), Marta, Saray, Álvaro, Lili y Ana, por permitirme ser un “Okupa” de vuestros despachos y compartir algún que otro almuerzo y merienda con vosotr@s. Curiosamente, he aprendido también algo sobre meteorología y regatas de vela, el Ibex-35 y a cómo hacer una “guerra de pandillas”. Esto también es ciencia...

Dedicatoria aparte merecen todos los miembros del grupo “masdeporte”: los Pablos, Jorges, Iker, Diego, Alberto, Erik, Javi, Manolo, Raúl, José, Pedro, Miguel, Canario y todos los que en alguna ocasión han participado en los partidos de futbito de los miércoles. Hemos disfrutado de grandes encuentros, mejorando nuestra técnica y fondo físico, jugando bajo la lluvia, a temperaturas bajo cero y con cierzo, pero siempre con una sonrisa. Las ampollas, agujetas y contracturas del día siguiente han merecido la pena, pues se ha creado una gran amistad entre todos nosotros. Gracias, chicos, por tantos momentos “galácticos”, por tantos goles y por el *fair play*.

Quiero además mencionar a todas las personas de la planta de Oncología, especialmente del laboratorio de Nuevas Dianas Terapéuticas, así como de otras áreas del CIMA a las que he conocido (compañer@s de otros laboratorios, secretarias, etc.). Ya sea por los pasillos, en cultivos, en el animalario, o durante los sabrosos almuerzos en el punto de encuentro, he tenido la ocasión de enriquecerme como persona. Mi gratitud también para vosotr@s por haberme echado una mano cuando lo he necesitado.

Gracias también a mis amigos de Tudela, por el interés en saber qué tal me iba por la capital, por escucharme mientras se lo contaba y por entender que sólo iba a poder estar en casa unos pocos fines de semana al año.

Muchas gracias a mis padres, por todo el ánimo y apoyo que de ellos he recibido a lo largo de estos años y por enseñarme a que no puedo “ahogarme en un vaso de agua”. Gracias también a mi hermana, a Miguel y al resto de mi familia. Esta tesis es también vuestra y va dedicada especialmente a mi abuelo Ignacio, ejemplo de cómo con trabajo, esfuerzo y sacrificio es posible la superación personal.

Para Pepita sólo tengo palabras de agradecimiento, por haberme recibido con los brazos abiertos siempre que he ido al pueblo, aunque fuera para unos pocos días.

Finalmente, a Raquel quiero agradecerle todos sus consejos, comprensión y el cariño durante esta larga etapa. Has supuesto mi más bonita motivación, el motor que me ha impulsado cada día y la ilusión por alcanzar un sueño común.

¡¡¡MUCHÍSIMAS GRACIAS A TOD@S!!!

ABREVIATURAS

ABC	Complejo avidina-biotina-peroxidasa
ADAR	Deaminasa de adenosina que actúa sobre RNA (del inglés, <i>Adenosine Deaminase Acting on RNA</i>)
AMP/ADP/ATP	Adenosina mono/di/trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Seroalbúmina bovina (del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
cDNA	DNA complementario
CMV	Citomegalovirus
DEPC	Di-etil-piro-carbonato
DMSO	Di-metil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos
dsRNA	RNA de doble hebra (del inglés, <i>double-stranded RNA</i>)
DTT	Di-tio-treitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EGTA	Ácido etilen-glicol-tetra-acético
FAM	Carboxi-fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
gDNA	DNA genómico
GO	<i>Gene Ontology</i>
HEPES	Ácido hidroxietil-piperacino-etano-sulfónico
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (del inglés, <i>heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins</i>)
HPRT	Hipoxantina-fosforribosil-transferasa
IPTG	Iso-propil-tio-galactopiranósido
kDa	KiloDaltons
LB	Luria Broth
LOH	Pérdida de heterocigosidad (del inglés, <i>Loss Of Heterozygosity</i>)
LPS	Lipopolisacárido
miRNA	MicroRNA
MOPS	Ácido morfolino-propano-sulfónico
mRNA	RNA mensajero

MSP	PCR específica de metilación (del inglés, <i>Methylation-Specific PCR</i>)
MTT	Bromuro de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio; azul de tiazol
NHBE	Epitelio bronquial humano normal (del inglés, <i>Normal Human Bronchial Epithelium</i>)
NMD	Decaimiento mediado por secuencia sin sentido (del inglés <i>Nonsense-Mediated Decay</i>)
NSCLC	Cáncer de pulmón no microcítico (del inglés, <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino de fosfato (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PM	Peso molecular
PNC	Compartimento perinucleolar (del inglés, <i>PeriNucleolar Compartment</i>)
PTB	Proteína de unión a tracto de poli-pirimidinas (del inglés, <i>Polypyrimidine Tract-Binding protein</i>)
PVDF	Fluoruro de poli-vinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Retro-transcripción
SAEC	Células epiteliales de vías aéreas pequeñas (del inglés, <i>Small Airway Epithelial Cells</i>)
SCLC	Cáncer de pulmón microcítico (del inglés, <i>Small Cell Lung Cancer</i>)
SCR	Control negativo de siRNA (del inglés, <i>Scramble</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
siRNA	RNA corto de interferencia (del inglés, <i>short interference RNA</i>)

Abreviaturas

SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (del inglés, <i>small nuclear RiboNucleoProteins</i>)
TBS	Tampón salino de tris (del inglés, <i>Tris Buffered Saline</i>)
Th	Temperatura de hibridación
tRNA	RNA de transferencia
UTR	Región no traducida (del inglés, <i>UnTranslated Region</i>)
UV	Ultravioleta
X-GAL	Bromo-cloro-indolil-galactopiranosido

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1-29
1. CÁNCER DE PULMÓN: ASPECTOS CLÍNICOS	3-7
1.1. Epidemiología	3-4
1.2. Clasificación de los tumores de pulmón	5
1.3. Estadificación del cáncer de pulmón	5-6
1.4. Etiología del cáncer de pulmón	7
2. PROCESO DE CARCINOGENESIS PULMONAR	8-16
2.1. Lesiones pre-neoplásicas	8-9
2.2. Alteraciones moleculares frecuentes en cáncer de pulmón	9-16
3. METABOLISMO DEL RNA MENSAJERO	16-21
3.1. Expresión del RNA mensajero en eucariotas y su regulación	16-17
3.2. Procesamiento del mRNA en eucariotas	18-20
3.3. Otras funciones mediadas por proteínas de unión al mRNA	20-21
3.4. Interferencia de RNA	21
4. CORTE Y EMPALME ALTERNATIVO EN CÁNCER	21-25
5. CORTE Y EMPALME ALTERNATIVO EN CÁNCER DE PULMÓN	25-29
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
III. MATERIAL Y MÉTODOS	37-114
A. MATERIAL	37-40
1. BASES DE DATOS DE <i>MICROARRAYS</i> DE EXPRESIÓN EN CÁNCER DE PULMÓN	37
2. LÍNEAS CELULARES TUMORALES DE PULMÓN HUMANAS	37-38
3. MATERIAL CLÍNICO: MUESTRAS DE PACIENTES CON CARCINOMA DE PULMÓN	39
4. RATONES ATÍMICOS	39
B. METODOLOGÍA	41-114
1. SELECCIÓN DE GENES MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO ...	41-42
1.1. Selección de las categorías relacionadas con el metabolismo del RNA	41
1.2. Análisis estadístico de las bases de datos	41-42
2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES	42-45
2.1. Sub-cultivos	43
2.2. Congelación/descongelación	43-44

2.3. Prueba de <i>Mycoplasma</i>	44-45
2.4. Contaje del número de células.....	45
3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE RNA.....	46-55
3.1. Extracción de RNA.....	46-48
3.2. Cuantificación de RNA.....	48
3.3. Retro-transcripción (RT).....	48-49
3.4. Diseño de cebadores.....	49-50
3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.....	51-52
3.6. RT-PCR a tiempo real.....	52-55
4. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	56-65
4.1. Extractos de líneas celulares de pulmón.....	56-58
4.1.1. Extracción de proteínas totales.....	56-57
4.1.2. Extracción de proteínas por fraccionamiento sub-celular.....	57-58
4.2. Extractos de proteínas de cerebro de rata.....	58-60
4.2.1. Extracción de proteínas totales.....	58-59
4.2.2. Extracción de proteínas por fraccionamiento sub-celular.....	59-60
4.3. Cuantificación de proteínas.....	60-61
4.4. <i>Western blot</i>	61-65
5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GLUR-B EN LÍNEAS CELULARES DE PULMÓN.....	65-66
6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE ADARB1.....	66
6.1. Isoformas con / sin el exón 6.....	66
6.2. Isoformas con / sin inclusión de un fragmento del intrón 1.....	66
7. ESTUDIO DE ALTERACIONES GENÉTICAS.....	67-75
7.1 Extracción de DNA genómico (gDNA).....	67-68
7.2. Cuantificación de gDNA.....	68
7.3. Búsqueda de mutaciones en el gen de ADARB1.....	68-70
7.4. Análisis de la pérdida de heterocigosidad.....	70-75
7.4.1. Estudio de microsatélites en la región cromosómica 21q22.3.....	70-72
7.4.2. Estudio del polimorfismo rs1051367 (A/G) de ADARB1.....	73-74
7.4.3. Estudio de otros SNPs que flanquean el locus de ADARB1.....	74-75
8. ESTUDIO DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS.....	75-82
8.1. Diseño de cebadores.....	76
8.2. Tratamiento del gDNA con bisulfito sódico.....	76-79

8.3. PCR específica de metilación (MSP)	79-81
8.4. Estudio de la expresión de ERG en líneas celulares.....	81
8.5. Reversión de la metilación: tratamiento con 5-Aza-2'-desoxicitidina	81-82
9. SOBRE-EXPRESIÓN DE ADARB1	82-100
9.1. Elección de las zonas de policlonaje en el vector pcDNA 3.1 (-).....	82-84
9.2. Digestión del vector pcDNA3.1 con enzimas de restricción y purificación.....	84-85
9.3. Clonado de las secuencias completas del cDNA de ADARB1	85-88
9.3.1. Diseño de cebadores.....	85-86
9.3.2. PCR convencional y purificado de las muestras	86-88
9.4. Ligación en el vector pCR®II	88-89
9.5. Transformación de células competentes.....	90-92
9.6. <i>Minipreps</i>	92
9.7. Digestión de los plásmidos, purificación de los insertos y secuenciación ..	92-93
9.8. Ligación en el vector pcDNA 3.1 (-).....	94
9.9. Transformación de bacterias, <i>minipreps</i> y digestión de las construcciones en el vector pcDNA 3.1 (-)	94-95
9.10. <i>Maxipreps</i>	95-97
9.11. Purificación por precipitación con fenol: cloroformo : isoamílico	97
9.12. Transfección de los plásmidos en líneas celulares con lipofectamina	98-100
9.12.1. Transfección transitoria.....	98-99
9.12.2. Transfección estable por selección con geneticina	99-100
10. COMPROBACIÓN DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE ADARB1	101
11. INHIBICIÓN DE ADARB1 Y DE PTB MEDIANTE siRNA	101-104
12. ESTUDIOS FUNCIONALES <i>IN VITRO</i>	104-108
12.1. Valoración de la actividad editasa de ADARB1	104
12.2. Ensayo de proliferación (MTT).....	105-106
12.3. Ensayo de la capacidad clonogénica en agar blando.....	106-108
13. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	108-114
13.1. Generación de tumores en ratones y estudio de su crecimiento	108-109
13.2. Procesamiento de los tumores	110-111
13.3. Inmunocitoquímica.....	111-114

IV. RESULTADOS	117-159
1. SELECCIÓN INICIAL DE GENES MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	117-121
2. EXPRESIÓN DE LOS GENES SELECCIONADOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN Y EN CULTIVOS PRIMARIOS	121-126
3. VALIDACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LOS RESULTADOS	127-129
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE ADARB1 Y PTB EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN	129-130
5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN BASAL DE LAS PROTEÍNAS ADARB1 Y PTB.....	131-132
6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE ADARB1	133-134
6.1. Isoformas con / sin el exón 6	133
6.2. Isoformas con / sin un fragmento del intrón 1	134
7. ESTUDIO DE ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA REGIÓN CROMOSÓMICA DE ADARB1	134-144
7.1. Análisis de la pérdida de heterocigosidad (LOH)	134-142
7.2. Búsqueda de mutaciones en el gen de ADARB1	143-144
8. ESTUDIO DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS	144-145
9. ESTUDIOS FUNCIONALES DE ADARB1 Y PTB EN CÁNCER DE PULMÓN	146-159
9.1. Sobre-expresión de ADARB1 en líneas celulares	146-148
9.2. Inhibición de la expresión de ADARB1 y de PTB mediante siRNA	149-150
9.3. Estudios funcionales <i>in vitro</i>	150-157
9.3.1. Estudio de la actividad editasa de ADARB1	151
9.3.2. Estudio de la morfología celular.....	151
9.3.3. Ensayo de proliferación (MTT).....	152-154
9.3.2. Ensayo de la capacidad clonogénica en agar blando.....	155-157
9.4. Crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	158-159
V. DISCUSIÓN	163-189
1. IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL RNA QUE PRESENTAN EXPRESIÓN ALTERADA EN CÁNCER DE PULMÓN	164-168

2. VALORACIÓN DE ADARB1 COMO UN POSIBLE GEN IMPLICADO EN CARCINOGENESIS PULMONAR	168-182
2.1. Papel de ADARB1 como editasa de RNA.....	168-172
2.2. Expresión de isoformas de ADARB1	172-173
2.3. Dianas moleculares de ADARB1	174
2.4. ¿Está implicado ADARB1 en el desarrollo del cáncer de pulmón?	175-182
2.4.1. Pérdida de heterocigosidad en 21q22.3 en pacientes con cáncer de pulmón	176-178
2.4.2. Ausencia de mutaciones relevantes y de metilación del promotor del gen de ADARB1 en líneas celulares de cáncer de pulmón	178-179
2.4.3. ADARB1 en la funcionalidad celular.....	179-182
3. VALORACIÓN DE PTB COMO UN POSIBLE GEN IMPLICADO EN CARCINOGENESIS PULMONAR	183-189
3.1. Papel de PTB en la célula	183-186
3.2. El compartimento perinucleolar (PNC)	186-187
3.3. PTB, PNC y cáncer	187-189
VI. CONCLUSIONES	193-194
VII. BIBLIOGRAFÍA	197-223
VIII. ANEXOS	227-234
Anexo I: CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES EPITELIALES MALIGNOS DE PULMÓN	227-228
Anexo II: ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN SEGÚN EL SISTEMA TNM	229-230
Anexo III: CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES ANALIZADOS EN EL ESTUDIO DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS	231-233
Anexo IV: CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES DE PULMÓN PARA EL SNP rs1051367 DE ADARB1	234

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias más frecuentes y con mayor tasa de mortalidad en los países occidentales. El pronóstico del carcinoma pulmonar es malo en general, aunque varía según el momento en el que se realice el diagnóstico. Cuando éste se realiza en estadios iniciales, se consiguen supervivencias a los cinco años elevadas; cuando los tumores se encuentran en fases avanzadas, las expectativas de larga supervivencia son mucho menores. Desgraciadamente, tan sólo una pequeña proporción de los tumores malignos de pulmón se encuentran en fases precoces en el momento del diagnóstico. Además, los innegables avances terapéuticos de los últimos años apenas han contribuido a mejorar esta situación.

Por estos motivos, se hace indispensable contar con una batería de medidas que reduzcan la mortalidad causada por cáncer de pulmón. Entre ellas, se incluyen la prevención primaria, el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección precoz y el diseño de nuevos tratamientos a partir del estudio de los mecanismos biológicos implicados en la carcinogénesis pulmonar. Se pretende, de este modo, que el cáncer de pulmón deje de ser un problema de salud pública como lo es en la actualidad.

En el presente trabajo, se ha profundizado en la búsqueda de nuevos marcadores que puedan ayudar al diagnóstico precoz de cáncer de pulmón o a la identificación de genes implicados en la carcinogénesis tumoral que puedan servir como nuevas dianas terapéuticas. Concretamente, el estudio se ha centrado en el rastreo de moléculas implicadas o relacionadas con el metabolismo del RNA.

1. Cáncer de pulmón: aspectos clínicos

1.1. Epidemiología

Tanto en Europa como en España, el cáncer de pulmón constituye la segunda neoplasia más común en hombres, tras el cáncer de próstata y la cuarta en mujeres, tras el cáncer de mama, el colo-rectal y el de útero. Además, supone la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la tercera en mujeres (Ferlay y col., 2007). Se estima que en el año 2006 la incidencia de cáncer de pulmón en Europa ascendió a 386.300 nuevos casos, mientras que el número de muertes se estableció en 334.800 (**Figura 1**).

En Estados Unidos, el cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más frecuente, tanto en hombres (por detrás del de próstata) como en mujeres (tras el de mama). En ambos sexos, ya se ha convertido en la primera causa de mortalidad por cáncer (Jemal y col., 2008).

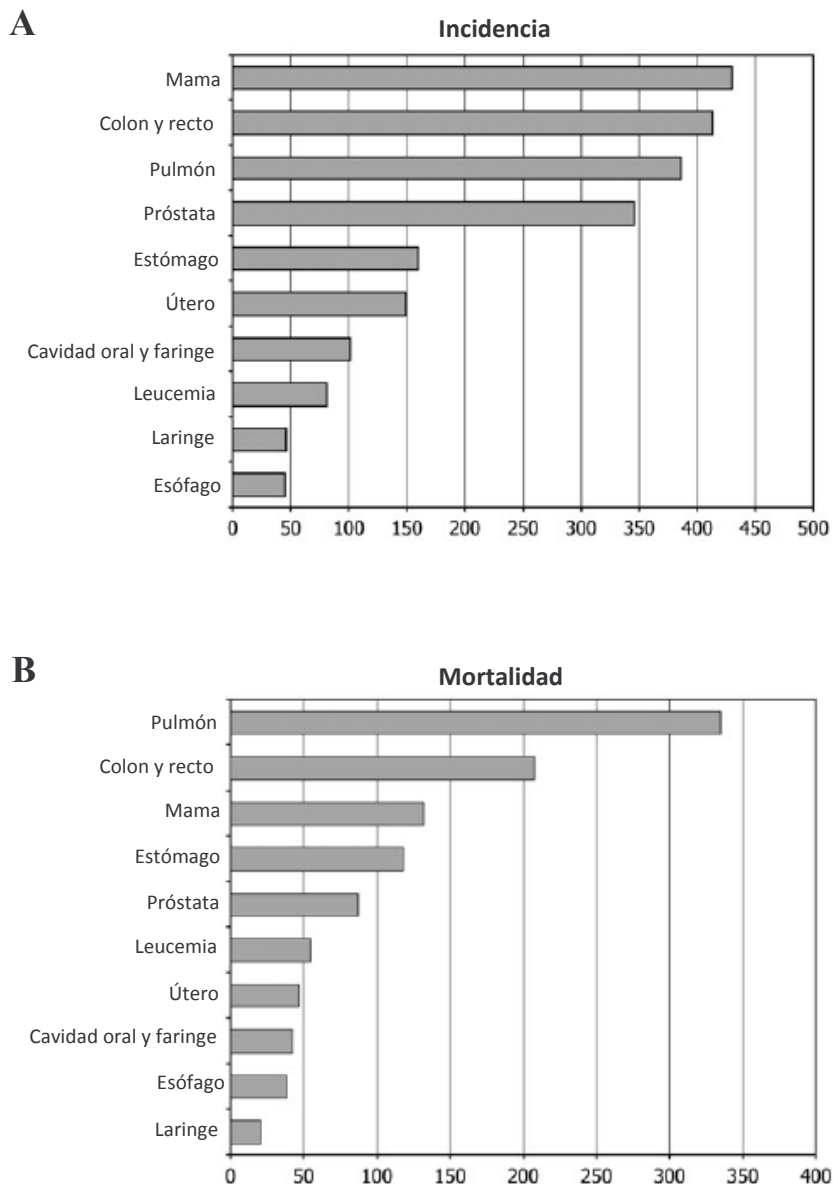


Figura 1. Estimación de nuevos casos (A) y mortalidad (B) por distintos tipos de cáncer en Europa, durante el año 2006. Se indican las cifras en miles, sumados ambos sexos. Adaptado de Ferlay y col., 2007.

Durante los últimos 25 años, la tasa de supervivencia a 5 años del cáncer del pulmón apenas se ha visto modificada y se sitúa casi invariablemente en torno al 15% (Ries y col., 2007), sin distinción entre razas ni sexos. Esto es debido sobre todo a que la mayoría de las veces el diagnóstico de esta neoplasia se realiza en estadios avanzados, cuando la enfermedad es prácticamente incurable. Por esta razón, resulta fundamental poder detectar el cáncer de pulmón de forma temprana, mediante la utilización de sistemas de visualización de tumores de menor tamaño y de biomarcadores que indiquen la presencia del cáncer de manera precoz.

1.2. Clasificación de los tumores de pulmón

La Organización Mundial de la Salud publicó por primera vez una clasificación histológica de los tipos de cáncer de pulmón en el año 1967. Posteriormente, realizó una revisión en el año 1982 y luego otra actualización (Travis y col., 1999), que es la que continúa vigente en la actualidad. En el **Anexo I** se recogen los principales tipos de tumores epiteliales malignos de pulmón.

En la práctica, los tumores de pulmón suelen dividirse en dos grandes grupos, basándose para ello en sus diferentes características histológicas, su evolución y su respuesta al tratamiento: cáncer de pulmón microcítico (SCLC, del inglés *small cell lung cancer*) y no microcítico (NSCLC, del inglés *non-small cell lung cancer*). El primer grupo incluye en torno al 15% de los casos (Sher y col., 2008), mientras que el segundo engloba al 85% restante. Dentro de éste, el adenocarcinoma y el carcinoma escamoso son los subtipos más frecuentes (Sato y col, 2007), mientras que el de células grandes y otros sub-tipos son más minoritarios.

Los tumores NSCLC se originarían a partir de células epiteliales presentes en el pulmón (Montuenga y col., 2003). Se trata de tumores que, en general, presentan una menor agresividad que los SCLC. Sin embargo, su detección suele ser tardía. En torno a un 40% de los casos se detecta como enfermedad metastásica, en un 35% como enfermedad extendida regionalmente y sólo un 25% en forma localizada. En este último caso (estadios poco avanzados), la cirugía se presenta como la mejor opción terapéutica. Para el resto de situaciones (estadios más avanzados de la enfermedad), se opta por combinaciones de quimioterapia y radioterapia (Molina y col., 2008).

Los SCLC son tumores que podrían originarse a partir de células neuroendocrinas. Se trata de un tipo de neoplasia muy agresiva (Zakowski, 2003). De hecho, posee la velocidad de duplicación más rápida de todos los tipos de cáncer de pulmón. Aunque inicialmente es un tumor muy sensible al tratamiento con quimioterapia (cisplatino y etopósido) y radioterapia, presenta una elevada frecuencia de recidivas (Sher y col., 2008).

1.3. Estadificación del cáncer de pulmón

La determinación del estadio es importante por sus implicaciones pronósticas y terapéuticas. Es crítico llevar a cabo una cuidadosa evaluación diagnóstica inicial para definir la ubicación y determinar el grado de compromiso del tumor primario y metastásico con el fin de ofrecer el cuidado más apropiado a los pacientes en cada

situación. El estadio de la enfermedad se basa en una combinación de factores clínicos, como el examen físico, estudios radiológicos y de laboratorio, así como factores patológicos, es decir, biopsia de ganglios linfáticos, broncoscopia, etc. (Pfister y col., 2004).

El Sistema Internacional de Clasificación para el Cáncer de Pulmón Revisado fue adoptado por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *Union Internationale Contre Le Cancer* (Mountain, 1997). A esta clasificación se le conoce como sistema TNM, ya que se basa en el tamaño y localización del tumor primario (T), grado de afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis a distancia (M). En el **Anexo II** se recogen las características del sistema TNM. No obstante, en la práctica clínica suelen emplearse agrupaciones por estadios para describir en conjunto la situación de cada paciente (**Tabla 1**).

Agrupación por estadios	Características TNM
Carcinoma oculto	• TX, N0, M0
Estadio 0	• Tis, N0, M0
Estadio IA	• T1, N0, M0
Estadio IB	• T2, N0, M0
Estadio IIA	• T1, N1, M0
Estadio IIB	• T2, N1, M0 • T3, N0, M0
Estadio IIIA	• T1, N2, M0 • T2, N2, M0 • T3, N1, M0 • T3, N2, M0
Estadio IIIB	• Cualquier T, N3, M0 • T4, cualquier N, M0
Estadio IV	• Cualquier T, cualquier N, M1

Tabla 1. Estadificación del cáncer de pulmón, según la agrupación de estadios basados en el sistema TNM (AJCC).

1.4. Etiología del cáncer de pulmón

El aumento del número de casos de cáncer de pulmón en el siglo XX se atribuye sin ninguna duda al consumo del tabaco. El humo del tabaco provoca todos los tipos de cáncer de pulmón, pero está especialmente vinculado a buena parte de los carcinomas escamosos y, sobre todo, a los SCLC, pues es la causa del 95% de los casos (Otterson y col., 1992). El adenocarcinoma, sin embargo, es el tipo más frecuente en pacientes que nunca han fumado (Sun y col., 2007). Los fumadores pasivos, además, tienen un riesgo entre 1.14 y 5.2 veces mayor de desarrollar cáncer de pulmón, al convivir con un fumador (Whitrow y col., 2003).

En cuanto a la alimentación, se ha sugerido que las frutas y vegetales ricos en vitaminas antioxidantes (C y E, pero no A) y otros elementos como los carotenos, reducen el riesgo de padecer cáncer de pulmón y de otros órganos (Krinsky y col., 2005). Por el contrario, alimentos como la carne curada o el chile tendrían un efecto adverso (Ruano y col., 2006).

La exposición acumulada a polución ambiental también es un factor a tener en cuenta. Las emisiones que contienen compuestos hidrocarbonados aromáticos policíclicos inducirían estrés oxidativo, inflamación y tendencia a un estado procoagulatorio (Vineis, 2005). Por lo tanto, la contaminación ambiental, sola o en combinación con otros factores, sería la responsable de una parte de los casos de cáncer de pulmón (Boffetta, 2006).

Por último, muchos pacientes desarrollan cáncer de pulmón por estar expuestos diariamente a carcinógenos ocupacionales. El polvo de sílice y los asbestos se incluirían en esta categoría, así como el uranio y otras partículas radioactivas en el caso de trabajadores de plantas nucleares (Boffetta, 2004).

Todos los factores descritos pueden ocasionar *per se* el proceso de carcinogénesis, pero puede ser que esto sólo ocurra en personas que presentan una susceptibilidad o predisposición genética.

2. Proceso de carcinogénesis pulmonar

2.1. Lesiones pre-neoplásicas

Las células tumorales se diferencian de las normales en que adquieren las siguientes características: capacidad de evasión de la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad frente a las señales de parada del crecimiento, potencial ilimitado de replicación, capacidad de angiogénesis y capacidad invasiva y de metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

El proceso de carcinogénesis incluye una serie de eventos moleculares, que suceden en varias etapas a lo largo el tiempo. En el caso del cáncer de pulmón, se cree que éste surge después de pasar por varias situaciones patológicas intermedias en la mucosa respiratoria. Estas lesiones, llamadas precursoras o pre-neoplásicas, consisten principalmente en tres entidades morfológicas: el carcinoma *in situ* (CIS), la hiperplasia adenomatosa atípica (AAH) y la hiperplasia pulmonar idiopática difusa de células neuroendocrinas (DIPENECH) (Travis y col., 2004). No obstante, estas entidades explicarían sólo el desarrollo de algunos tipos de cáncer de pulmón (Wistuba y Gazdar, 2006).

Los cambios preneoplásicos secuenciales se han definido con bastante precisión en el carcinoma escamoso, pero los datos relativos al carcinoma de células grandes, adenocarcinoma y SCLC son más limitados (Colby y col., 1998; Kerr, 2001). En la **Figura 2** se muestra el modelo propuesto de carcinogénesis para el carcinoma escamoso de origen central. La acumulación sucesiva de alteraciones moleculares en distintas etapas conllevaría cambios histopatológicos progresivos en el epitelio respiratorio, hasta que finalmente éste se convertiría en carcinoma invasivo. La displasia escamosa y el carcinoma *in situ* serían las principales entidades intermedias.

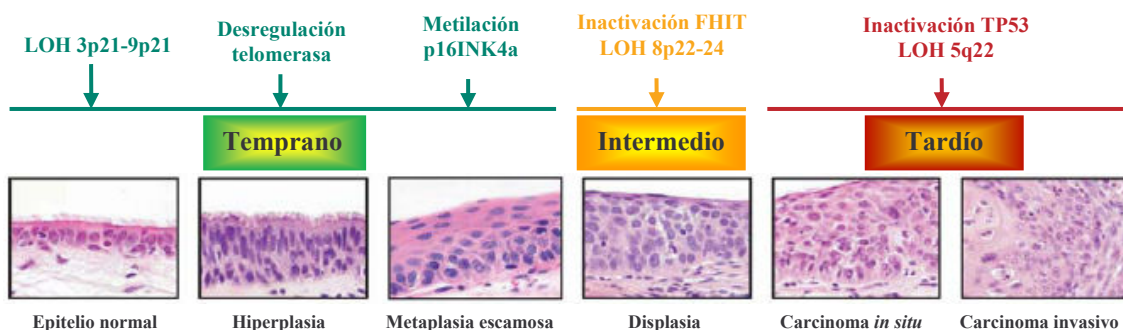


Figura 2. Modelo de patogénesis en el carcinoma escamoso de pulmón. Se indican los cambios histopatológicos y moleculares más frecuentes que acontecen secuencialmente a lo largo de los estadios temprano, intermedio y tardío. LOH: Pérdida de heterocigosidad. Adaptado de Wistuba y Gazdar, 2006.

Se ha postulado que el adenocarcinoma invasivo presente en el epitelio de vías aéreas periféricas sería precedido por dos principales entidades intermedias: la AAH y el carcinoma bronquioloalveolar. En fumadores, la ruta de señalización afectada más frecuentemente sería la de RAS; en no fumadores, la de EGFR (Westra, 2000).

En cuanto a los tumores neuro-endocrinos más frecuentes, los SCLC, todavía no se conocen cambios preneoplásicos específicos en el epitelio respiratorio, aunque la exposición a carcinógenos del tabaco induciría lesiones extensivas y multifocales en forma de hiperplasia bronquial (Wistuba y col., 2002). La entidad intermedia DIPENECH se ha asociado a otros tumores neuro-endocrinos, los carcinoides típicos y atípicos (Armas y col., 1995).

2.2. Alteraciones moleculares frecuentes en cáncer de pulmón

Las lesiones pre-neoplásicas descritas anteriormente van asociadas a cambios moleculares. La transformación neoplásica se produce como consecuencia de alteraciones en genes implicados en procesos clave de la actividad celular, como la proliferación, la apoptosis, el control del ciclo celular, la reparación del DNA o la regulación de la expresión génica.

En el caso del cáncer de pulmón, se han realizado estudios moleculares que demuestran múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, de forma que pueden aparecer más de 20 de estas aberraciones en cada tumor (Sekido y col., 2003). Algunas contribuirían al inicio de la enfermedad, otras a su evolución y otras a su mantenimiento, de modo que actuarían secuencialmente.

Parte de las alteraciones que son frecuentes en cáncer de pulmón se originan mediante un conjunto de mecanismos moleculares agrupados en lo que se conoce como **inestabilidad genómica**. Este fenómeno se manifiesta de dos maneras: a nivel cromosómico y a nivel de microsatélites (Lengauer, 1998).

Respecto a la primera situación, se incluyen tanto ganancias como pérdidas de fragmentos de material genético. Mediante *arrays* de SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphism*), se han descrito en cáncer de pulmón hasta 57 alteraciones de *copy number* a gran escala, en 26 de 39 brazos de cromosomas autosómicos, así como 31 eventos (24 amplificaciones y 7 deleciones homocigotas) más focalizados (Weir y col, 2007).

Entre las ganancias de pequeñas regiones, la más recurrente es la amplificación de 14q13.3, que ocurre en un 12% de las muestras. Por su parte, la **pérdida de fragmentos en el brazo corto del cromosoma 3** es uno de los principales eventos de la carcinogénesis pulmonar y ocurre en estadios tempranos, estando presente en lesiones pre-neoplásicas. Este fenómeno es además uno de los más frecuentes (100% de los SCLC, > 90% en NSCLC) e implica a varios genes (Sato y col., 2007).

En cuanto a la inestabilidad de microsatélites, se produce en el tumor un cambio en la secuencia del DNA, de cualquier longitud, por inserción o deleción de las unidades repetitivas de una a cuatro pares de bases de los microsatélites (Adachi y col., 1995). Este fenómeno ocasiona a su vez un fenotipo *mutador*, ya que favorece errores en la replicación del DNA por parte de la polimerasa (Rosell y col., 1997).

Se han encontrado diversas **mutaciones somáticas** en muestras de adenocarcinoma pulmonar. En concreto, hasta 26 genes presentarían una frecuencia de mutación muy significativa y estarían por tanto involucrados en la carcinogénesis (Ding y col., 2008).

Otros mecanismos moleculares que pueden ser responsables de la iniciación y progresión de un cáncer son aquellos que se basan en **modificaciones epigenéticas**, que conducen a la inhibición de la expresión de ciertos genes. Una forma es mediante **metilación del promotor** y la otra mediante **desacetilación de histonas** (Jones y col., 2002). La presencia de estas alteraciones puede ser reversible con el uso de fármacos. La 5-aza-2'-desoxicitidina actúa como un agente desmetilante, mientras que sustancias como la tricostatina funcionan como inhibidores de desacetilasas. Se ha demostrado que la administración simultánea de ambos fármacos inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de pulmón (Chai y col., 2008).

El conjunto de todas las alteraciones descritas puede afectar a distintos genes. Dependiendo de la función que desempeñan en la célula y, por tanto, de las consecuencias que acarrea su modificación, los genes implicados en carcinogénesis suelen clasificarse en dos grupos: proto-oncogenes y genes supresores de tumores.

➤ Los **proto-oncogenes** participan en rutas de señalización estimuladoras del crecimiento. Su alteración o expresión descontrolada (por mutaciones o sobreexpresión) confieren a la célula capacidad para volverse tumorigénica (Lewin, 1994). Las células que sufren estas modificaciones presentan además un estado fisiológico anormal de adicción o dependencia de esta situación para sobrevivir (Weinstein, 2002), por lo que la inhibición de la misma mediante fármacos específicos provoca la muerte

del tumor. Las células normales, no dependientes, son por tanto menos sensibles a la terapia. A continuación se describen algunos de los oncogenes más relevantes en cáncer de pulmón.

La familia de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) incluye proteínas transmembrana que presentan un dominio tirosina-quinasa. Esta familia se compone principalmente de cuatro miembros: HER1 (o EGFR), HER2, HER3 y HER4 (Rowinsky, 2004). **EGFR** y **HER2** están sobre-expresados en un 70 y un 30% de los NSCLC, respectivamente, pero apenas en los SCLC (Franklin, 2002). Para el tratamiento de los tumores que sobre-expresan EGFR o HER2 se usan inhibidores de tirosina-quinasa como gefitinib y erlotinib, así como anticuerpos monoclonales (cetuximab y trastuzumab).

Se han descrito varias mutaciones en el dominio tirosina-quinasa de EGFR (Páez y col., 2004). Estas mutaciones son frecuentes (24%) en NSCLC y pueden ser deleciones, inserciones o mutaciones puntuales sin sentido. Las deleciones en el exón 19 y las mutaciones sin sentido en el exón 21 dan cuenta de más del 80% de todas las alteraciones. Curiosamente, estas alteraciones se presentan más frecuentemente en una sub-población muy concreta: mujeres asiáticas, con adenocarcinoma, que nunca han fumado (Shigematsu y col., 2006). Una de las mutaciones (T790M) parece ser la responsable de la resistencia a los inhibidores de tirosina-quinasa (Bell y col., 2005).

Las mutaciones en HER2 ocurren en el 2% de pacientes con NSCLC (Shigematsu, 2005) y consisten en inserciones en el exón 20, afectando también al dominio tirosina-quinasa. La población afectada es la misma que para el caso de EGFR.

Se han encontrado mutaciones de **HER4** en el 2.3% de tumores NSCLC (escamoso, adenocarcinoma y de células grandes) en pacientes asiáticos, entre los que se incluyen hombres y fumadores, a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones de EGFR (Soung, 2006).

Las mutaciones en la familia EGFR podrían usarse como marcadores de detección precoz de cáncer de pulmón, ya que se han hallado en células bronquiales normales adyacentes a tumores con las mismas alteraciones (Tang y col., 2005).

Entre un 40 y un 70% de los SCLC sobre-expresan el receptor **c-Kit**, así como su ligando, sugiriendo un bucle autocrino o paracrino que induciría el crecimiento de estos tumores (Sekido y col., 1991). El fármaco imatinib bloquea el dominio quinasa de c-Kit, inhibiendo el crecimiento de estas células mediante detención del ciclo celular e

inducción de apoptosis (Wang y col., 2000). Sin embargo, las mutaciones activadoras de c-Kit son muy poco frecuentes en cáncer de pulmón.

La ruta de señalización **RAS/RAF/MEK/ERK** también está implicada en cáncer de pulmón. Se han encontrado mutaciones en la familia de proteínas RAS en un 10-15% de NSCLC, especialmente en adenocarcinomas (20-30%), pero casi nunca en SCLC (Sekido y col., 2003). Estas mutaciones afectan a la actividad GTPasa asociada y activan la señalización celular. En un 90% de los casos, las mutaciones son en **K-RAS**. Se han propuesto inhibidores de la farnesilo-transferasa (tipifarnib y lonafarnib) como terapia para tumores con alteraciones en proteínas de esta familia (Isobe y col., 2005).

BRAF es una serina / treonina-quinasa presente en la ruta de señalización de K-RAS que puede presentar mutaciones activadoras en el 3% de los NSCLC (Davies y col., 2002). Esta proteína fosforila y activa a MEK-1 y MEK-2 y éstas, a su vez, a ERK-1 y ERK-2, que actúan sobre sustratos como c-Jun, implicado en mitosis celular.

En cuanto a la ruta de **fosfatidil-inositol-3-quinasa/AKT/PTEN**, un 3% de NSCLC presentan mutaciones en la subunidad catalítica α de **PI3K** (Samuels y col., 2004). Asimismo, se han descrito mutaciones activadoras en **AKT** en 16 de 17 líneas celulares de NSCLC (Brognard y col., 2001) y pérdida o reducción de la expresión de la proteína **PTEN** (Marsit y col., 2005), que actúa como regulador negativo de AKT.

Las proteínas de la familia **STAT** se activan por fosforilación en tirosinas, formando dímeros que migran al núcleo y regulan la expresión de genes diana. La activación constitutiva de STAT3 y STAT5 estimula la proliferación celular e inhibe la apoptosis mediante regulación al alza de Bcl-xL, ciclina D1 y Myc. En varias líneas celulares de NSCLC se ha observado que STAT3 se une al DNA de forma constitutiva (Song y col., 2003).

La familia **Myc** (Myc, L-Myc, N-Myc) engloba unas fosfoproteínas que forman heterodímeros con Max y actúan como factores de transcripción. Las alteraciones descritas en cáncer de pulmón son amplificaciones y, en conjunto, se dan con una frecuencia del 18-31% en SCLC y del 8-20% de NSCLC (Richardson y col., 1993), si bien para N-Myc y L-Myc aparecen casi exclusivamente en SCLC.

MDM2 es una ubiquitina-ligasa que favorece la degradación de p53 en el proteosoma y, por tanto, la pérdida de su función. Se han descrito amplificaciones de MDM2 en un 6% de NSCLC (Higashiyama y col., 1997), con lo que en este caso MDM2 se comporta como un oncogén al inducir la eliminación del producto de un gen supresor de tumores (p53).

➤ Los **genes supresores de tumores** son genes que habitualmente participan en rutas inhibitoras de crecimiento y que, por tanto, tienden a evitar que la célula se transforme en tumoral. Así pues, el cáncer surgiría por inactivación de estos genes protectores, en un proceso de dos etapas que afectaría a ambos alelos del gen. Según la “teoría de los dos impactos”, se producirían dos eventos moleculares a lo largo del tiempo, como mutaciones puntuales, deleciones cromosómicas o metilación del promotor del gen por mecanismos epigenéticos (Knudson, 1989). Se detallan seguidamente algunos ejemplos de alteraciones de genes supresores de tumores en cáncer de pulmón.

El gen **TP53**, localizado en 17p13.1, codifica para una proteína que es un factor de transcripción. Cuando hay daño en el DNA, se estabiliza la proteína, permitiendo la expresión de genes implicados en la detención del ciclo celular, para favorecer la reparación de DNA, así como mediadores de la apoptosis (Vousden y col., 2002).

TP53 se inactiva por mutación en el 90% de los SCLC y en el 50% de los NSCLC. En la mayoría de los casos (70-80%) son mutaciones puntuales sin sentido, que afectan al dominio de unión al DNA, aunque también se dan deleciones homocigotas (Hainaut y col., 1998).

La proteína **p14^{ARF}** estabiliza y potencia la actividad de p53, por bloqueo de MDM2. Parece que la expresión de p14^{ARF} se pierde en el 40% de los casos de NSCLC y en el 65% de los SCLC (Vonlanthen y col., 1998).

La ruta **p16^{INK4a}/ciclina D1/CDK4/RB** regula el ciclo celular en la transición entre las fases G1 y S. La proteína **RB** hipofosforilada ejerce su función como gen supresor de tumores mediante unión al factor de transcripción E2F, esencial en esa transición, con lo que se detiene el ciclo celular. El complejo ciclina D1-CDK4 fosforila RB y se da la situación contraria. Se ha encontrado que un 90% de SCLC y un 15-30% de NSCLC presentan mutaciones de RB o ausencia de esta proteína (Reissmann y col., 1993).

La proteína **p16^{INK4a}** bloquea la actividad de CDK4, manteniendo a RB en estado hipofosforilado. Frecuentemente (70%) se encuentra inactivada en NSCLC, pero casi no presenta alteraciones en SCLC. Las alteraciones más frecuentes son deleción homocigota, mutaciones en regiones codificantes e hipermetilación del promotor. Por el contrario, es frecuente encontrar sobre-expresión de **CDK4** y de **ciclina D1** en algunos grupos de NSCLC (Betticher y col., 1996; Wikman y col., 2005).

LKB1 funciona como un supresor tumoral que regula la polaridad celular, diferenciación, etc. y responde al estado energético para regular el metabolismo celular (Alessi y col., 2006). Su papel en el desarrollo del cáncer de pulmón ha sido estudiado ampliamente, ya que la función de la proteína se haya inactivada en el 30% de los casos. El principal evento que ocurre es la pérdida de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 19, aunque también se han descrito mutaciones puntuales, formas truncadas y metilación de su promotor (Makowski y col., 2008).

TGF- β es una citoquina cuyo papel en cáncer de pulmón resulta paradójico. En estadios iniciales, inhibe la proliferación celular e induce apoptosis. Sin embargo, en etapas más avanzadas induce angiogénesis y, además, se pierde el efecto de inhibición del crecimiento, mediante el descenso de la expresión del receptor T β RII en SCLC, o por mutaciones en SMAD2 y SMAD4, transductores de su señal, en NSCLC (de Jonge, 1997; Nagatake, 1996).

Como ya se ha comentado anteriormente, 3p21 es una región cromosómica frecuentemente alterada en el cáncer de pulmón y que contiene diversos genes, como RASSF1A, FUS1, SEMA3B o SEMA3F, que pueden actuar como supresores de tumores. La expresión de **RASSF1A** en cáncer de pulmón está disminuida o anulada por metilación del promotor en el 90% de los SCLC y en el 50% de los NSCLC (Burbee y col., 2001). El locus de **FUS1** se sitúa adyacente al de RASSF1A. En cáncer de pulmón, aparece su RNA mensajero, pero se pierde la proteína (que detiene el ciclo celular en G1 e induce apoptosis) por mecanismos aún desconocidos. **SEMA3B** y **SEMA3F** pertenecen a la familia de las semaforinas y son secretadas en forma soluble. Una mutación con cambio de aminoácido es característica de la forma patológica de SEMA3B, la cual perdería así su capacidad de bloquear la actividad autocrina de VEGF y por tanto la supresión tumoral (Castro-Rivera y col., 2004).

En 3p14.2, uno de los sitios más frágiles del genoma, se localiza el locus de **FHIT**. Entre las principales alteraciones moleculares que presenta en cáncer de pulmón, destacan la presencia de transcritos aberrantes (Sozzi y col., 1996) y la delección homocigota, con pérdida de la proteína (Sozzi y col., 1997).

RAR β es el receptor del ácido retinoico. Su gen no presenta mutaciones en cáncer de pulmón, pero se encuentra metilado en un 72% de los SCLC y en 41% de los NSCLC, perdiéndose su expresión (Virmani y col., 2000).

Se han encontrado más de 80 genes supresores de tumores que sufren metilación del promotor en cáncer de pulmón y que por tanto presentan este mecanismo como forma

de inactivar su función. A los ejemplos que ya se han ido mencionando, como p16^{INK4a}, RASSF1A o RAR β , se pueden añadir otros como **MGMT**, **DAPK**, **ECAD**, **GSTP1** o **TIMP3** (Tsou y col., 2002). La detección de secuencias de DNA metiladas en fluidos biológicos, como sangre o esputo, puede ser de utilidad para la detección precoz de cáncer de pulmón, como en el caso concreto de p16^{INK4a} (Palmisano y col., 2000).

Las alteraciones moleculares que se presentan en oncogenes y genes supresores de tumores conllevan trastornos funcionales diversos, como por ejemplo: evasión de la apoptosis, immortalización celular por activación de la telomerasa, angiogénesis mantenida y evasión de la respuesta inmune. A continuación se detallan algunos ejemplos relevantes de estos cambios en cáncer de pulmón.

➤ **Evasión de la apoptosis.** La proteína **Bcl-2** inhibe la apoptosis y se encuentra sobre-expresada tanto en SCLC (75-95%) como en NSCLC (10-35%) (Sekido y col., 2003). Por su parte, **Bax** favorece la apoptosis. Se ha visto una relación inversa en la expresión de Bcl-2 y Bax en SCLC, pero no en carcinoides, sugiriendo una correlación entre la agresividad de algunos tumores neuro-endocrinos y ciertos factores relacionados con apoptosis (Brambilla y col., 1996).

Survivina es un inhibidor de la apoptosis que actúa favoreciendo la supervivencia celular frente a señales pro-apoptóticas (Altieri y col., 2003). Se ha descrito que survivina se encuentra sobre-expresada en diversos tipos de cáncer humanos, incluido el de pulmón (Monzó y col., 1999), por lo que se contempla como un posible marcador de mal pronóstico en pacientes con NSCLC (Fan y col., 2008). Además, los niveles bajos de esta proteína se han asociado a detención del ciclo celular y a apoptosis espontánea, por lo que survivina se ha sugerido como una potencial diana terapéutica (Altieri y col., 2008).

➤ **Immortalización celular y activación de la telomerasa.** La telomerasa evita el acortamiento de los telómeros con cada división celular, mediante un mecanismo de transcripción inversa. La elevación en los niveles de telomerasa contribuye a la immortalización celular ya en estadios tempranos de la tumorigénesis). En cáncer de pulmón, en torno al 80% de los NSCLC y casi el 100% de los SCLC presentan niveles incrementados en la actividad de la telomerasa, especialmente en tumores con alta tasa de proliferación, sugiriéndose además que este evento contribuye a la progresión de la enfermedad en estadios más avanzados (revisado por Fernández-García y col., 2008).

➤ **Angiogénesis mantenida.** Cuando el tumor supera los 2 mm³ de volumen, requiere la generación y mantenimiento de nuevos vasos sanguíneos para su supervivencia. Este mecanismo se correlaciona con mayores tasas de metástasis y peor pronóstico (Macchiarini y col., 1992). **VEGF** es la principal molécula que media esta inducción, ya que es producida frecuentemente por tumores, incluidos los de pulmón, a altas concentraciones (O'Byrne y col., 2000). El anticuerpo monoclonal bevacizumab (que bloquea todas las isoformas de VEGF) se está usando actualmente en combinación con paclitaxel y carboplatino en pacientes con NSCLC avanzados, obteniéndose mayores supervivencias (Socinski, 2008).

➤ **Evasión de la respuesta inmune.** A pesar de haberse demostrado respuesta inmunitaria (rechazo) frente a tumores, éstos desarrollan mecanismos para evadirla. Ejemplos de esta resistencia serían el **descenso en la expresión de las moléculas HLA** de clase I, disminuyéndose así la presentación de antígenos intracelulares (Korkolopoulou y col., 1996), o la expresión del ligando de FAS soluble, que induce apoptosis de linfocitos T, pero no de células de pulmón tumorales (Niehans y col., 1997).

Además, se ha descrito que las células del cáncer de pulmón presentan una mayor **resistencia a la citotoxicidad mediada por complemento** (Niehans y col., 1996). Uno de los mecanismos de resistencia, estudiado en nuestro grupo, es la expresión y unión del **factor H**, que inhibe la acción del complemento, por células de tumores NSCLC. Se ha demostrado que el bloqueo de este factor reduce el depósito de C3b, la liberación de la anafilotoxina C5a y la sensibilidad a la lisis mediada por las vías tanto alternativa como clásica del complemento (Ajona y col., 2004 y 2007).

3. Metabolismo del RNA mensajero

3.1. Expresión del RNA mensajero en eucariotas y su regulación

Durante el proceso de transcripción en células eucariotas, los RNA mensajeros (mRNA) son generados por la RNA-polimerasa II. En su inicio, se requieren una gran cantidad de factores de transcripción, que se unen a secuencias consenso, como la caja TATA del promotor. Otras secuencias, llamadas potenciadoras, aumentan los niveles de transcripción, pues facilitan la unión de distintos factores de transcripción al complejo de iniciación (Hahn, 2004).

En humanos, la expresión génica está regulada por diversos mecanismos. En primer lugar, la generación de una cascada de señalización puede provocar la activación o inhibición de ciertos genes.

El nivel de compactación de la cromatina puede, por sí sola, regular la expresión génica. La heterocromatina, más empaquetada, representa regiones transcripcionalmente inactivas (constitutiva o facultativamente); la eucromatina, menos condensada, se transcribe a RNA o tiene potencial para ello, ya que los factores de transcripción pueden acceder más fácilmente (Fedorova y col., 2008).

Las proteínas que se unen a los promotores para regular la transcripción de genes suelen presentar una serie de estructuras características que les permiten interactuar con los surcos mayor y menor del DNA. Así, los dominios más comunes son hélice-giro-hélice, dedos de zinc, cremalleras de leucina y hélice-bucle-hélice (Pabo y col., 1992).

Las modificaciones epigenéticas pueden inactivar la expresión génica. La acetilación de histonas es un mecanismo que facilita que la cromatina tenga una estructura abierta y, por tanto, más accesible a la maquinaria transcripcional. Esta modificación es reversible y está controlada por acetilasas y desacetilasas de histonas, que actúan como activadores y represores de la transcripción, respectivamente.

Otro mecanismo es la metilación del DNA. Si a nivel del promotor de un gen se produce una metilación de los nucleótidos de citosina situados en el contexto de islas CpG, se imposibilita la transcripción, mediante dos formas. Una, directa, por impedimento estérico, pues los factores de transcripción no pueden acceder al promotor. La otra, indirecta, a través de la unión de proteínas específicas a regiones metiladas, las cuales reclutan desacetilasas de histonas, lo que favorece que la cromatina tenga una estructura cerrada (Vaissière y col., 2008).

Finalmente, es posible una regulación transcripcional mediante el uso de promotores alternativos. Con este mecanismo se consigue una expresión diferencial en distintos tejidos, al obtenerse productos proteicos distintos (Landry y col., 2003).

3.2. Procesamiento del mRNA en eucariotas

A diferencia de lo que ocurre en procariotas, en eucariotas existen diversos sistemas post-transcripcionales que modifican el pre-mRNA sintetizado. Por medio de estos mecanismos, es posible controlar aspectos como la maduración, estabilidad, traducción o localización del mensajero. Los principales mecanismos post-transcripcionales de procesamiento son los siguientes:

➤ **Adición de la caperuza en el extremo 5'.** Tras la transcripción, la primera transformación del pre-mRNA consiste en la adición de un nucleótido de guanina metilado, lo cual ocurre cuando la RNA-polimerasa II ha sintetizado los primeros 25 nucleótidos. Esta caperuza determina el extremo 5' del mRNA y juega un papel importante en su estabilidad, procesamiento, exportación al citoplasma y traducción a proteína (Gu y col., 2005).

➤ **Adición de la cola de poli-A.** El final de un proceso de transcripción a mRNA lo determinan unas señales consenso en el DNA. Cuando la RNA-polimerasa II alcanza ese lugar, se produce la liberación del pre-mRNA y, seguidamente, se añaden en torno a 200 nucleótidos de adenina en su extremo 3'. El hexámero AAUAAA, seguido de regiones ricas en GU ó U, la enzima poli-A polimerasa y varios factores, como CPSF, están implicados en este mecanismo (Lutz, 2008).

Es posible utilizar más de un lugar de poliadenilación, generando así varios mRNA distintos y, por lo tanto, proteínas con diferentes extremos C-terminal. Esta estrategia de **poliadenilación alternativa** la puede emplear la célula eucariota en diferentes tejidos o localizaciones, dependiendo de sus necesidades funcionales en cada momento. La síntesis de inmunoglobulinas secretadas o de membrana se basa en este mecanismo (Peterson, 2007).

➤ **Eliminación de intrones y unión de exones.** Una de las características del mRNA maduro es que sólo consta de exones. Al carecer de intrones, su secuencia es distinta a la del DNA genómico. Durante el mecanismo de **corte y empalme o ajuste** (*splicing*, en inglés) del pre-mRNA, se eliminan los intrones, mientras que los exones se unen entre sí para dar lugar al mRNA maduro.

El proceso está mediado principalmente por el espliceosoma, un complejo formado por varias snRNP (del inglés, ribonucleoproteínas nucleares pequeñas), que a su vez constan de diversas proteínas unidas a distintos snRNA (del inglés, RNA nucleares pequeños). La actividad catalítica recae en los RNA, por lo que éstos tienen propiedades de ribozima. Tanto los exones como los intrones tienen una serie de secuencias consenso donde se unen los componentes del espliceosoma, así como regiones reguladoras (Black, 2003).

El *splicing* puede ser constitutivo o alternativo. Cuando el pre-mRNA sufre corte y empalme constitutivo, siempre es procesado de la misma manera, obteniéndose sólo un tipo de mRNA y, por tanto, una única proteína. Pero si se da **corte y empalme alternativo**, el pre-mRNA puede ser procesado de diferentes formas, generando varios transcritos con distintas secuencias en longitud y/o composición de nucleótidos (Black, 2003). De esta forma, a partir de un mismo gen se obtienen proteínas con propiedades biológicas diferentes (secuencia, localización, estabilidad, etc.), aumentándose la diversidad del mensaje genético. En la **Figura 3** (Pajares y col., 2007) se muestran los principales tipos de *splicing* alternativo.

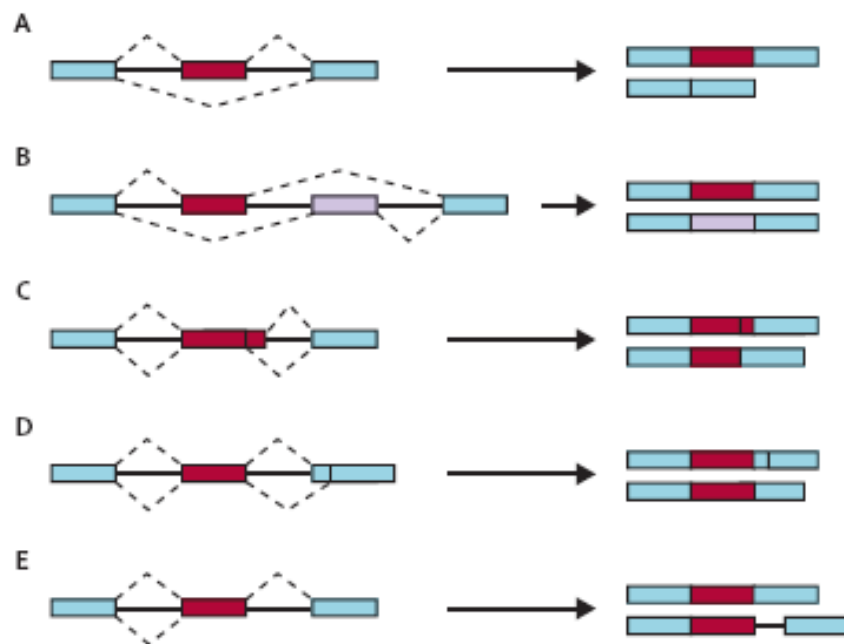


Figura 3. Principales mecanismos de corte y empalme alternativos. A) Inclusión de exones; B) Exones mutuamente excluyentes; C) Sitios 5' alternativos; D) Sitios 3' alternativos; E) Retención de intrones. Fuente: Pajares y col., 2007.

Los procesos de corte y empalme alternativos pueden ser fisiológicos, pero en muchos casos su presencia o modificación son específicas de procesos patológicos. Como se verá en el **apartado 4**, es un evento que ocurre con frecuencia en el cáncer, incluido el de pulmón (**apartado 5**).

➤ **Edición del mRNA.** En ocasiones, se altera la secuencia de nucleótidos de los mRNA después de haber sido transcritos, cambiando el significado del mensaje que codifican. Una posibilidad es hacerlo mediante la adición de nucleótidos *de novo* a lo largo de la secuencia de algunos mRNA (Stuart y col., 2005). Otra opción es la desaminación de ciertas bases nitrogenadas, dando lugar a otras. Por ejemplo, las proteínas de la familia ADAR (*Adenosine Deaminases Acting on RNA*) eliminan el grupo amino de ciertas adenosinas, obteniéndose inosinas. Estas transformaciones pueden generar sustituciones de aminoácidos, afectar a la estabilidad del transcrito, modificar los lugares de *splicing*, etc. (Valente y col., 2005).

3.3. Otras funciones mediadas por proteínas de unión al mRNA

Existe un amplio grupo de proteínas de unión al RNA, denominadas en conjunto hnRNP (del inglés, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas), que pueden unirse al pre-mRNA o al mRNA maduro. La unión comienza co-transcripcionalmente, es muy dinámica y condiciona la función y destino de la molécula diana.

Estas proteínas gobiernan gran cantidad de mecanismos durante el procesamiento de los transcritos. Se encuentran implicadas en acciones como el corte y empalme de los pre-mRNA, la exportación de los mRNA maduros al citoplasma (o su retención nuclear), su localización sub-celular o el inicio de la traducción. Asimismo, son piedra angular en procesos en los que se determina la supervivencia de los transcritos, o bien su degradación (por el mecanismo NMD o *nonsense-mediated decay*), mediante sistemas de detección de mutaciones que generan codones de terminación prematuros (Dreyfuss y col., 2002).

Generalmente, las proteínas de unión a RNA suelen marcar las posiciones donde se han empalmado dos exones y, por tanto, reflejan los procesos madurativos que han tenido lugar.

Un ejemplo dentro de esta familia de proteínas es hnRNP I, también conocida como PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*), implicada en distintos procesos celulares, como la inhibición del *splicing* o la activación de la traducción (revisado por Sawicka y col., 2008).

3.4. Interferencia de RNA

Un mecanismo que emplea con frecuencia la célula eucariota para silenciar la expresión génica es la interferencia de ciertos mRNA diana por parte de otros RNA pequeños, llamados en conjunto RNA de interferencia (RNAi). Habitualmente, se generan una serie de moléculas como siRNA (*short interference RNA*) o miRNA (*microRNA*), que se unen a secuencias específicas, dando lugar al bloqueo funcional del mRNA diana o su eliminación por ruptura enzimática, pudiéndose por tanto regular la traducción a este nivel. Algunas de las moléculas que participan en el procesamiento de los RNAi son *Dicer* y *Drosha* (Naqvi y col., 2009).

El metabolismo de los RNAi puede estar alterado en algunas enfermedades, incluyendo el cáncer. Por ejemplo, se han encontrado mutaciones en TARBP2 (componente del complejo Dicer1), que dan lugar a formas truncadas de la proteína, en distintos tumores humanos (Melo y col., 2009). Asimismo, la reducción en la expresión de Dicer se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón (Karube y col., 2005).

Dada la alta especificidad de secuencia de los RNAi, es posible utilizarlos como agentes con efectos anti-virales y anti-cancerosos.

4. Corte y empalme alternativo en cáncer

Como se ha mencionado anteriormente, el corte y empalme alternativo es un proceso que ocurre fisiológicamente. De hecho, se estima que aparece en el 90% de los genes humanos (Wang y col., 2008).

Sin embargo, muchas enfermedades presentan también alteraciones en el proceso de *splicing*. Mutaciones puntuales o determinados SNPs pueden afectar al corte y empalme del pre-mRNA, mediante la eliminación o creación de nuevos sitios 5', 3' o de ramificación. Así, la fibrosis quística, la hemofilia A o la enfermedad de Sandhoff serían ejemplos de patologías hereditarias causadas por mutaciones exónicas que afectan al *splicing* (Cáceres y col., 2002).

Aún se conoce poco sobre la implicación de la maduración del RNA en la carcinogénesis. No obstante, existen numerosos datos experimentales que sugieren que la alteración en la maquinaria del metabolismo del RNA es muy frecuente en cáncer. En la **Tabla 2** se muestra un listado de genes que presentan *splicing* alterado y que se han asociado a diferentes tipos de cáncer.

Algunas de los genes cuyos pre-mRNA sufren corte y empalme alternativo anormal son factores de transcripción. **NSRF** y **SHBG** presentan formas truncadas en SCLC y tumores uterinos y de ovario, respectivamente (Coulson y col., 2000; Misao y col., 1997). Las isoformas alternativas de **DNMT3b**, que es una DNA-metil-transferasa, darían lugar a hipometilación de la cromatina en tumores hepáticos (Saito y col., 2002).

WT1 codifica un factor de transcripción del tipo dedos de zinc. Además de mutaciones o deleciones homocigotas, se han descrito variantes anormales en tumores de Wilms (Baudry y col., 2000). El **receptor de andrógenos**, **AIB** y **PASG** serían otros ejemplos de factores de transcripción con alteraciones en el *splicing* (Lee y col., 2000; Reiter y col., 2001).

Otros genes afectados dan lugar a proteínas implicadas en la señalización celular. Formas aberrantes de **NF1**, supresor de tumores neurales por inactivación de la cascada de RAS, se asociarían a cánceres neuroectodérmicos y meduloblastomas (Scheurlen y col., 1995). Isoformas anormales de **RAC1**, una GTPasa que participa en la adhesión celular, motilidad y progresión del ciclo celular, serían incapaces de formar lamelipodios y producirían tumores de colon (Fiegen y col., 2004). **CRK** posee dominios SH2 y SH3 y sus variantes alternativas estarían relacionadas con glioblastomas (Takino y col., 2003). La tirosina-quinasa **Syk**, supresora de metástasis *in vitro*, se vería implicada en tumores de mama (Wang y col., 2003).

En cuanto a proteínas transmembrana, el receptor de muerte **FAS** daría lugar a algunas isoformas alternativas, que otorgarían a ciertas líneas celulares de linfoma resistencia a la apoptosis mediada por el ligando de FAS (Cascino y col., 1996). Algunas variantes del **receptor de secretina**, inhibidor del crecimiento acoplado a proteínas G, actuarían como dominantes negativos y estarían imposibilitadas para unir su ligando (Ding y col., 2002). Formas anormales de **FGFR1** se relacionarían con astrocitomas (Yamaguchi y col., 1994).

Mecanismo alterado	Genes	Tejido tumoral
Inclusión / exclusión de exones (manteniendo el marco de lectura)	NF1	Cerebro
	RAC-1	Colon
	APC	
	FHIT	Estómago
	KAI1 / CD82	
	RON (MSTIR)	
	WISP1	
	SVH	Hígado
	BRCA1	Mama
	Receptor de andrógenos	
	Syk	Páncreas
	Receptor de secretina	
	VEGF	Pulmón
	FGFR1	Cerebro, mama
	Receptor de insulina	Colon, tiroides
	CD44	Varios
Fibronectina (FN1)		
TSG101		
Inclusión / exclusión de exones (cambio en el marco de lectura o proteínas truncadas)	APC	Colon
	Integrina β 1C	Endometrio
	DNMT3b4	Hígado
	AIB1	Mama
	C-CAM	Pulmón
	NRSF	
	SHBG	Útero, ovario
Sitios 5' y/o 3' alternativos	CRK	Cerebro
	NF1	
	FHIT	Estómago
	Caspasa 8	Leucemia
	PASG	
	Receptor de estrógenos	Mama
	Bcl-x	Pulmón
	MUC1	Tiroides
	Tenascina C	Varios
	MDM2	
Retención de intrones	HER2 (ERBB2)	Adenocarcinoma
	FAS (TNFRSF6)	Linfoma
	Receptor de gastrina	Páncreas
	TSG101	Varios
Exones mutuamente excluyentes	FYNB	Leucemia
	Actinina 4	Pulmón

Tabla 2. Genes que presentan procesos de corte y empalme aberrantes asociados a cáncer. Se indica el subtipo de *splicing* implicado, los genes que sufren dicha modificación y los principales tumores donde se han descrito. Algunos genes pueden presentar más de un mecanismo de *splicing* alternativo. Adaptado de Venables, 2004; Kalnina y col., 2005.

La molécula **CD44** es una glicoproteína de superficie implicada en adhesión y migración. El gen de CD44 consta de 10 exones variables (v1 a v10) que pueden ser objeto de corte y empalme alternativo, generando varias isoformas (más de 20) diferentes. Algunas de las múltiples isoformas anormales de CD44 se asociarían al desarrollo de tumores de cuello, uroteliales y de colon, con metástasis hepáticas (Miyake y col., 2002; Galiana-Arnoux y col., 2003; Heider y col., 2004).

Otros genes tendrían sus respectivas proteínas transmembrana aberrantes implicadas en distintos cánceres, como **MUC1**, el **receptor de la insulina**, **KAI1/CD82** y la **integrina β 1C** (Weiss y col., 1996; Vella y col., 2002; Lee y col., 2003; Lovecchio y col., 2003).

Respecto a proteínas secretadas, **VEGF-A** generaría hasta 9 isoformas angiogénicas, algunas de las cuales presentarían niveles elevados en muchos tumores sólidos (Cheung y col., 1998), induciendo la proliferación de células endoteliales. Variantes aberrantes de **tenascina-C** se relacionarían con cáncer de mama invasivo y con glioblastoma (Carnemolla y col., 1999), mientras que las de **fibronectina** lo harían con astrocitoma, tumores de colon y de pulmón (Ebbinghaus y col., 2004).

Finalmente, una isoforma alternativa del gen BIRC5, la **survivina 2B**, presentaría descenso de expresión en carcinomas de mama y gástrico (Vegran y col., 2005), con lo cual su actividad pro-apoptótica se vería reducida.

➤ **Cambios en la maquinaria del *splicing***. La presencia de genes que presentan isoformas alternativas sugiere que puede haber defectos en los componentes de la maquinaria del proceso de corte y empalme. Por tanto, las modificaciones en el *splicing* pueden ser en cis, afectando a secuencias consenso (mutaciones heredadas o somáticas en intrones y exones de los genes diana), o en trans, cuando se alteran los factores proteicos que catalizan el *splicing*. Respecto a este último grupo, se han observado incrementos en los niveles de mRNA y de fosforilación de **Tra26**, **YB-1** y en las proteínas SR clásicas, incluyendo **SC35** y **ASF/SF2**, en cáncer de ovario humano y en modelos de cáncer de mama en ratones (Fischer y col., 2004).

Si en cáncer se encuentran alteradas la expresión o actividad de algunas proteínas implicadas en el corte y empalme, cabría esperar que se vieran afectados siempre un conjunto de genes concretos y se podrían clasificar los tumores, en función de estos defectos, asignándoles un fenotipo y pronóstico característicos. Sin embargo, no existe una correlación entre las diversas modificaciones en los factores de *splicing* y los distintos tipos de cáncer, ni con los genes específicos afectados, sino diferentes situaciones en cada caso particular (Kalnina y col., 2005).

5. Corte y empalme alternativo en cáncer de pulmón

En la **Tabla 3** (Pío y Montuenga, 2009) se enumeran los genes que presentan transcritos alternativos asociados a cáncer de pulmón. Uno de los mejor caracterizados es el regulador de apoptosis **Bcl-x**, cuyo primer exón codificante contiene un sitio 5' alternativo. Si durante el proceso de corte y empalme se incluye el exón entero, se genera la variante Bcl-xL, que es anti-apoptótica; si se elimina un fragmento en la región 3' del exón, se obtiene la variante Bcl-xS, con actividad pro-apoptótica (**Figura 4**). Se ha descrito una mayor proporción de la variante Bcl-xL tanto en SCLC como en NSCLC, lo cual desregula el balance entre señales pro y anti-apoptóticas y contribuye a la progresión tumoral (Reeve y col., 1996; Groeger y col., 2004; Karczmarek-Borowska y col., 2006).

En cuanto a **CD44**, ya mencionada antes, el descenso en los niveles de la isoforma más común (CD44s) se relaciona con metástasis en muchos tumores (Naor y col., 2002), mientras que un aumento de CD44 total y de la variante CD44v3 predice una mejor evolución de pacientes con NSCLC (Pirinen y col., 2000). Por el contrario, el aumento de otras isoformas (CD44v6) llevaría a peores tasas de supervivencia (Hirata y col., 1998).

CEACAM-1 es una molécula que participa en la adhesión celular. Se han descrito dos variantes principales. En la variante 1 (o larga), el transcrito consta de los nueve exones, mientras que en la variante 2 (o corta) se pierde el exón 7. En un primer trabajo (Wang y col., 2000) ya se habían descrito diferencias en la expresión de ambas isoformas entre muestras normales y tumorales. Mediante el uso de *arrays* de *splicing*, se han confirmado recientemente estos datos, ya que la variante 1, pero no la 2, se encuentra sobre-expresada en tumores de pulmón (Xi y col., 2008).

Gen	Función	Tipo histológico
Actinina-4	Unión al citoesqueleto	SCLC
Bcl-x	Apoptosis	NSCLC / SCLC
CD44	Receptor multifuncional	NSCLC / SCLC
CEACAM-1	Adhesión	NSCLC
CAIX	Regulación del pH	NSCLC
Ciclina D1	Ciclo celular	NSCLC
FHIT	Metabolismo de nucleótidos	NSCLC
Fibronectina	Adhesión y angiogénesis	NSCLC / SCLC
KLF6	Factor de transcripción	Adenocarcinoma
MDM2	Proliferación	NSCLC
Mesotelina	Adhesión	Mesotelioma
NF2/Merlina	Proteína estabilizadora de membrana	Mesotelioma
NRSF	Factor de transcripción	SCLC
PPARγ	Receptor nuclear de hormona	Carcinoma escamoso
TSG101	Tráfico de receptores	SCLC
VEGF	Angiogénesis	NSCLC
XAGE-1	Desconocida	Adenocarcinoma

Tabla 3. Genes que dan lugar a diferentes variantes, mediante procesos de corte y empalme alternativos, asociados a cáncer de pulmón. Se señala la función principal de la proteína y el tipo histológico del tumor donde se han descrito. SCLC: Carcinoma de pulmón de células pequeñas; NSCLC: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Pío y Montuenga, 2009.

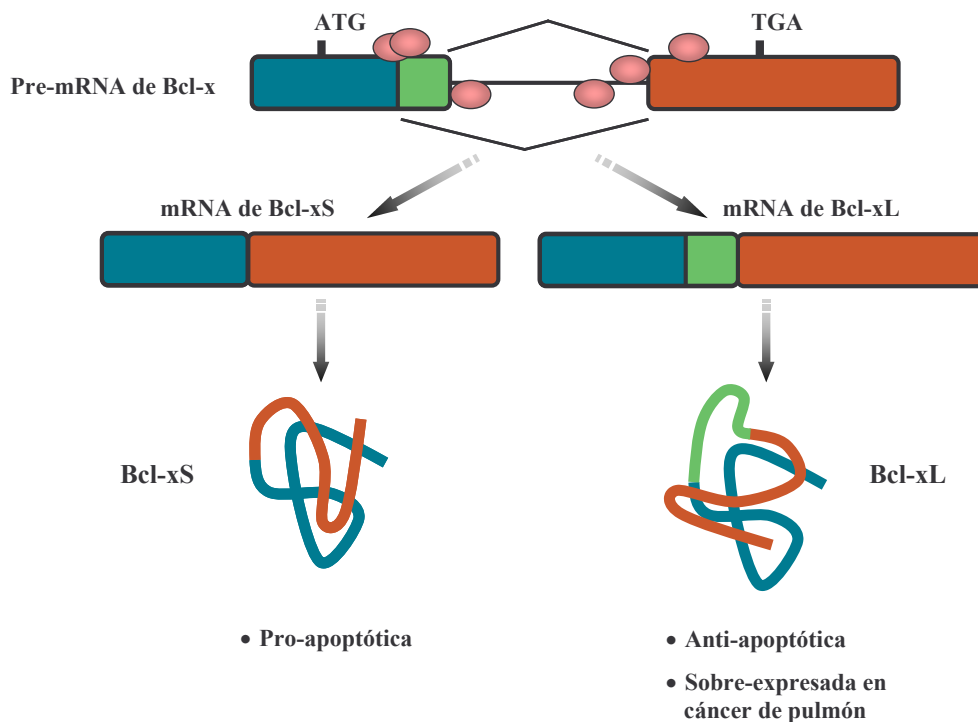


Figura 4. Bcl-x es un regulador de apoptosis que presenta dos isoformas principales: Bcl-xS y Bcl-xL, generadas por elección alternativa del sitio 5' durante el proceso de corte y empalme de su pre-mRNA. Las dos variantes tienen funciones opuestas: Bcl-xS es pro-apoptótica; Bcl-xL, anti-apoptótica. En cáncer de pulmón, predomina de forma anormal la isoforma Bcl-xL, rompiéndose el equilibrio entre señales pro y anti-apoptóticas y favoreciendo la progresión tumoral. Adaptado de Pío y Montuenga, 2009.

En el caso de la **ciclina D1**, que controla la transición G1-S en el ciclo celular, habría una relación entre un polimorfismo genético (G870A) y el *splicing*. Concretamente, la presencia del alelo A870 afectaría al patrón de corte y empalme de su pre-mRNA, dando lugar al transcrito b. La ciclina D1b induciría transformación neoplásica, estando su expresión asociada a peor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón (Lu y col., 2003).

La presencia de isoformas alternativas en cáncer de pulmón ofrece posibilidades terapéuticas. El uso de determinados fármacos puede modificar la actividad de factores implicados en el *splicing* o revertir eventos anormales de corte y empalme, dirigiendo este proceso hacia la producción de la variante fisiológicamente favorable. Este sería el caso de los oligonucleótidos modificados sintéticamente y la proteína Bcl-x. Bloqueando la síntesis de Bcl-xL mediante estas moléculas, se favorece la apoptosis de las células tumorales en cáncer de pulmón (Leech y col., 2000).

La gemcitabina aumenta la síntesis de ceramida en la línea tumoral de pulmón A549, lo cual induce la defosforilación de factores de corte y empalme, elevando los niveles de Bcl-xS y caspasa-9 y descendiendo los de Bcl-xL y caspasa-9S (Chalfant y col., 2002).

El gen supresor de tumores **KLF6** tiene una variante (KLF6-SV1) sobre-expresada en adenocarcinoma, que elimina la acción pro-apoptótica del cisplatino. Sin embargo, la reducción terapéutica de esta isoforma aumenta la apoptosis del tumor y mejora la respuesta al tratamiento (DiFeo y col., 2008).

Finalmente, la proteína **XAGE-1** presenta varias isoformas, siendo la XAGE-1b la más frecuente en pacientes con adenocarcinoma. Se han descrito auto-anticuerpos frente a XAGE-1 en algunos de estos pacientes (Nakagawa y col., 2005). Por lo tanto, la detección de variantes anómalas o de respuesta inmune frente a ellas puede ayudar al diagnóstico precoz de cáncer de pulmón. Asimismo, puede aprovecharse esta inmunogenicidad para generar vacunas específicas.

Muchas de las alteraciones de corte y empalme en cáncer de pulmón se deben a modificaciones en los factores reguladores que actúan en trans. En concreto, parece que la concentración, localización, composición y actividad de las hnRNP serían un punto clave en este proceso.

La expresión anormal de hnRNP en NSCLC sugiere que los tumores desarrollan perfiles de hnRNP que contribuyen a la carcinogénesis pulmonar (Pino y col., 2003; Zerbe y col., 2004; Peebles y col., 2007). De hecho, se ha propuesto la sobre-expresión de **hnRNP A2/B1** como un potencial biomarcador de detección temprana de cáncer de pulmón (Tockman y col., 1997; Sueoka y col., 2005).

Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que se produce un descenso de la expresión de **hnRNP E4** (PCBP4 ó α CP-4) en cáncer de pulmón y que podría funcionar como un gen supresor de tumores (Pío y col., 2004; Castaño y col., 2008).

Es objeto de debate si la sobre-expresión de estas y otras proteínas de unión al RNA son consecuencia de la alteración del metabolismo de los tumores, o bien constituyen *per se* un fenómeno inherente a la transformación neoplásica. Además, cabe preguntarse si las alteraciones en la maquinaria del *splicing* descritas en cáncer de pulmón actúan como verdaderos desencadenantes de la carcinogénesis, o si tan sólo acontecen a la vez que otros eventos moleculares responsables de la enfermedad, sin estar implicadas directamente en ella.

Por lo tanto, para tratar de entender mejor esta situación, en el presente trabajo se ha estudiado la posible implicación que en la carcinogénesis pulmonar puedan tener las moléculas relacionadas con el metabolismo del RNA.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis** del presente trabajo ha sido la siguiente: si el metabolismo del RNA está alterado en cáncer de pulmón y favorece la adquisición del fenotipo tumoral, entonces será posible identificar genes relacionados con este proceso biológico, partiendo de una expresión diferente entre células tumorales y normales de pulmón y se podrá valorar su implicación funcional en la carcinogénesis pulmonar.

Con la finalidad de contrastar esta hipótesis, se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Búsqueda de nuevos genes relacionados con el metabolismo del RNA, cuya expresión esté significativamente cambiada en cáncer de pulmón, mediante análisis bioinformático de bases de datos públicas que contienen experimentos de *microarrays* de expresión en tejidos sanos y tejidos tumorales de pulmón.
2. Validación de los resultados mediante estudios de expresión de RNA de los genes elegidos, tanto en líneas celulares como en muestras clínicas de pacientes con cáncer de pulmón. Selección del gen o genes que presenten los resultados más robustos.
3. Caracterización de las posibles alteraciones genéticas y epigenéticas (mutaciones, pérdidas de heterocigosidad y metilaciones del promotor) del gen o genes candidatos y de sus regiones cromosómicas correspondientes, en las mismas líneas celulares y muestras clínicas.
4. Sobre-expresión e inhibición de la expresión, en líneas celulares de pulmón, de algunos de los genes elegidos.
5. Realización de ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*, que permitan evaluar el papel de los genes estudiados en la carcinogénesis pulmonar.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A) MATERIAL

1. Bases de datos de *microarrays* de expresión en cáncer de pulmón

A lo largo de este trabajo, se han utilizado cuatro bases de datos que recogen experimentos de grupos independientes, realizados con *microarrays* de expresión en pacientes con cáncer de pulmón y en personas sanas.

En estas bases de datos, a las que es posible acceder de forma pública desde la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, aparece la expresión de los genes contenidos en los *microarrays* utilizados en controles sanos y pacientes con distintos tipos histológicos de carcinoma de pulmón (microcítico, adenocarcinoma, escamoso y carcinoide). Las bases de datos empleadas, así como el número de casos recogidos en cada una de ellas, se resumen en la **Tabla 4**.

Base de datos	Normal	Adenocarcinoma	Escamoso	Microcítico	Carcinoide
Harvard (Bhattacharjee y col., 2001)	17	139	21	6	20
Michigan (Beer y col., 2001)	10	86	-	-	-
Tel Aviv (Dehan y col., 2005)	9	7	17	-	-
Hong Kong (Yap y col., 2005)	9	49	-	-	-

Tabla 4. Bases de datos utilizadas en este trabajo y número de casos de cada tipo histológico. Para el caso de Dehan y col., 2005, los datos pertenecen a la serie GSE1987, de la página *web* de GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

2. Líneas celulares tumorales de pulmón humanas

Se utilizó un panel de 28 líneas celulares tumorales humanas (**Tabla 5**), representativas de los tipos histológicos más frecuentes de carcinoma de pulmón (microcítico, adenocarcinoma, escamoso, de células grandes y carcinoide), obtenidas de las casas comerciales *American Type Culture Collection* (ATCC), *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ) y *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). Asimismo, se emplearon dos cultivos primarios de células normales: NHBE (*Normal Human Bronchial Epithelium*) y SAEC (*Small Airway Epithelial Cells*), ambas de crecimiento adherente y obtenidas de la casa comercial Clonetics.

Línea celular	Nombre comercial	Casa comercial	Tipo histológico	Lugar de obtención	Crecimiento
H69	HTB-119	ATCC	SCLC	Pulmón	Suspensión (agregados)
H82	HTB-175	ATCC	SCLC	Pulmón	Suspensión (agregados)
H187	CRL-5804	ATCC	SCLC	Pulmón	Suspensión (agregados)
H209	HTB-172	ATCC	SCLC	Pulmón	Suspensión (agregados)
H345	HTB-180	ATCC	SCLC	Pulmón	Suspensión (agregados)
N417	CRL-5809	ATCC	SCLC	Pulmón	Suspensión (agregados)
H446	HTB-171	ATCC	SCLC	Pulmón	Suspensión y adherentes
H510	HTB-184	ATCC	SCLC	Glándula adrenal	Suspensión y adherentes
H774	CRL-5842	ATCC	SCLC	Tejido blando	Suspensión
H23	CRL-5800	ATCC	AD	Pulmón	Adherentes
H441	HTB-174	ATCC	AD	Pericardio	Adherentes
H1648	CRL-5882	ATCC	AD	Pulmón	Adherentes
H2087	CRL-5922	ATCC	AD	Ganglio linfático	Adherentes
HCC-827	ACC 566	DSMZ	AD	Pulmón	Adherentes
Calu-3	HTB-55	ATCC	AD	Pulmón	Adherentes
A549	CCL-185	ATCC	BA	Pulmón	Adherentes
H322	95111734	ECACC	BA	Pulmón	Adherentes
H358	CRL-5807	ATCC	BA	Pulmón	Adherentes
H157	CRL-5802	ATCC	ES	Pulmón	Adherentes
H226	CRL-5826	ATCC	ES	Pulmón	Adherentes
H1385	CRL-5867	ATCC	ES	Ganglio linfático	Suspensión
SK-MES-1	HTB-58	ATCC	ES	Pulmón	Adherentes
H460	HTB-177	ATCC	CG	Pulmón	Adherentes
H661	HTB-183	ATCC	CG	Ganglio linfático	Adherentes
H1299	CRL-5803	ATCC	CG	Pulmón	Adherentes
H720	CRL-5838	ATCC	CA	Pulmón	Suspensión
H727	CRL-5815	ATCC	CA	Pulmón	Adherentes

Tabla 5. Características de las líneas celulares de pulmón humanas utilizadas. Se indica el nombre de cada línea, el código que utiliza cada casa comercial, el tipo histológico de cada una de ellas, el lugar de obtención y el tipo de crecimiento en cultivo. **SCLC:** Carcinoma de células pequeñas; **AD:** Adenocarcinoma; **BA:** Carcinoma bronquioalveolar; **ES:** Carcinoma escamoso; **CG:** Carcinoma de células grandes; **CA:** Carcinoide.

3. Material clínico: muestras de pacientes con carcinoma de pulmón

En la **Tabla 6** se resumen las características de los tumores primarios utilizados. Para todos los casos, se obtuvo consentimiento informado por escrito de los pacientes. El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité Ético correspondiente de cada centro.

Las biopsias de tejido pulmonar humano (normal y tumoral) fueron cedidas por el Servicio de Anatomía Patológica de la Clínica Universitaria de Navarra, por el Biobanco de la Universidad de Navarra y por el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander. Estas biopsias, una vez talladas por el patólogo, se congelaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Con el fin de asegurar que el RNA y DNA genómico que se iban a extraer provenían principalmente de células tumorales y no de otras células (inflamatorias o fibroblastos) presentes en el tejido conjuntivo que las rodea, se analizó la composición de las muestras congeladas y se evaluó el porcentaje de células tumorales de cada caso. Para ello, se tallaron pequeños fragmentos y se incluyeron en *O.C.T. Compound* (Sakura). Mediante un criostato, se realizaron cortes de $5\ \mu\text{m}$ que se tiñeron con hematoxilina-eosina para su observación al microscopio. Sólo se eligieron aquellos fragmentos en los que las células tumorales suponían más del 60% del total de células.

4. Ratones atímicos

Se utilizaron 30 ratones *nude* hembras de 4-6 semanas de edad (Harlan). Estos roedores portan una mutación homocigota en el locus *nu* del cromosoma 11, que les hace no tener pelo y, lo más importante, carecer de un timo funcional, que permanece rudimentario.

De esta forma, se produce un número reducido o nulo de linfocitos T maduros, por lo que estos ratones, inmunodeficientes, no rechazan tejidos alo y xenotransplantados. Así, aceptan el injerto de células y tejidos humanos, pudiendo muchas de las líneas celulares de pulmón humanas formar tumores en ellos.

El protocolo para la manipulación de estos ratones fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra.

Paciente	Muestra	Tipo histológico	Estadio	Paciente	Muestra	Tipo histológico	Estadio
1	50	Escamoso	IB	33	V118	Escamoso	IA
2	62	Escamoso	IIB	34	V15	Mixto*	IIB
3	67	Escamoso	IB	35	V40	Escamoso	IIB
4	80	Adenocarcinoma	IIIA	36	V56	Escamoso	IB
5	85	Escamoso	IB	37	V57	Escamoso	IB
6	93	Escamoso	IB	38	V61	Escamoso	IB
7	95	Escamoso	IB	39	V71	Adenocarcinoma	IB
8	96	Escamoso	IIIA	40	V72	Adenocarcinoma	IIB
9	97	Escamoso	IIB	41	V78	Adenocarcinoma	IA
10	110	Adenocarcinoma	IA	42	V79	Adenocarcinoma	IB
11	111	Escamoso	IB	43	V82	Adenocarcinoma	IIIA
12	112	Escamoso	IB	44	V83	Adenocarcinoma	IIB
13	113	Mixto*	IB	45	V84	Adenocarcinoma	IIIA
14	114	Escamoso	IIB	46	V92	Adenocarcinoma	IIB
15	115	Adenocarcinoma	IIB	47	V95	Adenocarcinoma	IB
16	117	Adenocarcinoma	IIA	48	V96	Adenocarcinoma	IB
17	118	Adenocarcinoma	IA	49	68	Escamoso	IA
18	120	Escamoso	IB	50	79	Escamoso	IIIB
19	122	Adenocarcinoma	IB	51	86	Adenocarcinoma	IIB
20	126	Células grandes	IIB	52	NM6	Escamoso	IA
21	130	Adenocarcinoma	IIA	53	51	Escamoso	IB
22	133	Escamoso	IB	54	100	Mixto**	IIB
23	NM14	Adenocarcinoma	IIIB	55	103	Escamoso	IA
24	NM2	Escamoso	IB	56	66	Escamoso	IA
25	NM20	Escamoso	IA	57	119	Adenocarcinoma	IIB
26	NM21	Escamoso	IA	58	V58	Escamoso	IB
27	NM4	Adenocarcinoma	IB	59	V60	Escamoso	IA
28	NM8	Adenocarcinoma	IA	60	V66	Adenocarcinoma	IB
29	NM9	Adenocarcinoma	IB	61	V89	Adenocarcinoma	IIIA
30	V103	Escamoso	IIB	62	V107	Escamoso	IIB
31	V109	Escamoso	IIIA	63	V115	Escamoso	IA
32	V113	Escamoso	IIA	64	71	Adenocarcinoma	IB

Tabla 6. Características de los tumores utilizados. Se indica el número de paciente (esta numeración se respeta para las tablas y figuras que aparezcan en adelante), el código de la muestra, el tipo histológico del tumor hallado en cada paciente y el estadio de cada uno de ellos. Las muestras cuyo código es sólo numérico proceden de la Clínica Universitaria; los códigos que comienzan por *NM* se corresponden con muestras del Biobanco de la Universidad de Navarra y las muestras que empiezan por *V* tienen su origen en el Hospital Marqués de Valdecilla. *: Tumores con mezcla de adenocarcinoma y carcinoma escamoso; **: Tumor mezcla de adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

B) METODOLOGÍA

1. Selección de genes mediante análisis bioinformático

1.1. Selección de las categorías relacionadas con el metabolismo del RNA

En primer lugar, se utilizó la página web de búsquedas de *Gene Ontology* (www.godatabase.org). En esta página se encuentran clasificados todos los genes humanos conocidos, según tres bloques: *Proceso biológico*, *Función molecular* y *Componente celular*. Dentro de cada bloque, todos los genes se hayan organizados en diferentes categorías, siguiendo un patrón taxonómico, de forma que cada gen en concreto pertenece a una serie de categorías y sub-categorías específicas, según sus propiedades moleculares, localización y papel que realiza en la célula.

Debido a los objetivos iniciales planteados, se seleccionaron aquellas categorías que presentan vinculación con el metabolismo del RNA y que incluyen a su vez a otras sub-categorías relacionadas.

1.2. Análisis estadístico de las bases de datos

Para llevar a cabo este estudio, se recurrió a la herramienta bioinformática *GARBAN*, desarrollada por el Centro de Estudios e Investigaciones Técnicas (CEIT) de la Universidad de Navarra.

Inicialmente, se utilizaron las tres primeras bases de datos de las contempladas en la **Tabla 4**. Dentro de cada una de ellas y para cada tipo histológico de tumor, se realizó un algoritmo basado en ANOVA, con un nivel de significación del 1 y del 5%, para obtener los genes con expresión normalizada significativamente alterada entre muestras normales y tumorales. Es decir, para cada base de datos se obtuvieron listados de genes con expresión alterada en adenocarcinomas frente a muestras normales, en escamosos frente a normales, etc.

Tras este análisis, se hizo un primer cribado de genes. De entre aquellos que superaron esta prueba, se escogieron los que además pertenecían a las categorías que previamente se habían elegido por su relación con el metabolismo del RNA.

Posteriormente se calculó, dentro también de cada tipo histológico y experimento de partida, el *fold-change* (FC), que refleja la tendencia de cada gen a sobre-expresarse (valores positivos) o a inhibirse (negativos) en el tumor respecto al tejido normal. El valor del FC se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$FC = \log_2 (T/N)$$

(T= Promedio de la expresión sin normalizar en las muestras tumorales;

N= Promedio de la expresión sin normalizar en las muestras normales).

Para obtener la lista de genes candidatos a ser estudiados posteriormente, se eligieron aquellos que cumplieran los tres criterios siguientes:

- Nivel de significación robusto (p -value < 0.01) en las tres bases de datos, para el caso de los adenocarcinomas, o en las dos bases de datos que contienen muestras de carcinoma escamoso.
- *Fold-change* similar, tanto en signo como en valor absoluto, en las tres bases de datos y en todos los tipos histológicos de cáncer de pulmón.
- Para el caso de las muestras de pacientes con tumores carcinoide y microcítico, recogidos únicamente en la base de datos de Harvard, bastó con que los valores de p -value y de FC en esa base de datos fueran los anteriormente descritos.

Más adelante, los genes seleccionados fueron validados *in silico*. Para ello, se empleó la cuarta base de datos independiente que aparece en la **Tabla 4** (Yap y col., 2.005) y que recoge datos sobre 49 casos de adenocarcinoma y 9 controles sanos. Se realizó un análisis estadístico de iguales características al descrito previamente.

2. Cultivo de líneas celulares

La manipulación de todas las células se realizó en campanas de flujo laminar de tipo II (Faster), con el fin de garantizar máximas condiciones de esterilidad.

Para el crecimiento y mantenimiento en general, las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con Glutamax[®], o en medio ACL-4 (Invitrogen) para las H1648. En ambos casos, se añadió un 10% (v/v) de suero sintético *FetalClone III* (Hyclone) y un 1% (v/v) de una mezcla de antibióticos de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), siendo la concentración de trabajo de penicilina de 100 unidades/ml y la de estreptomicina de 100 µg/ml. A este medio de cultivo utilizado se le llamará en adelante *medio de cultivo completo*, para diferenciarlo de otros empleados y que se describen posteriormente.

La temperatura de cultivo fue de 37°C, la concentración de CO₂ del 5% y la humedad relativa del 90%. Se utilizó una estufa de la marca comercial Thermo, modelo 371. Los frascos de poliestireno (Becton Dickinson) en los que se cultivaron las células para su expansión fueron de 25, 75 y 175 cm² de superficie.

2.1. Sub-cultivos

Para el caso de las **células con crecimiento adherente**, cada vez que éstas alcanzaron una confluencia elevada (más del 90%), se eliminó el medio de cultivo. Luego se lavaron las células con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) estéril comercial (Cambrex), desechándose también éste. A continuación, se añadió Tripsina/EDTA (Sigma) a los frascos de cultivo y se incubaron durante 5 minutos a 37°C (la tripsina rompe el enlace peptídico en el lado C-terminal de los aminoácidos lisina y arginina). Una vez despegadas las células de la superficie del frasco, se añadió medio de cultivo completo para neutralizar la acción de la tripsina, se disgregaron bien las células por pipeteo y se centrifugaron en tubos de 15 ml, durante 5 minutos a 1.200 g. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo y parte del mismo se volvió a sembrar en frascos de cultivo con medio completo fresco.

Para el caso de las **células que crecen en suspensión** (formando agregados o no), todo el medio de cultivo, sin necesidad de tripsinizar las células, fue centrifugado de igual forma (en tubos de 15 ó 50 ml), descartando el sobrenadante y re-sembrando parte del sedimento celular en medio de cultivo fresco.

Los sub-cultivos se realizaron cada 3 ó 4 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada célula. La cantidad de sedimento celular a re-sembrar también dependió de la capacidad proliferativa de las células.

2.2. Congelación/descongelación

Durante el proceso de cultivo, una parte de las células de cada tipo fue congelada para obtener una reserva de cada una de ellas. A los sedimentos celulares resultantes de la centrifugación, se les añadió 1 ml de medio de congelación pre-enfriado a 4°C. Este medio está compuesto por un 90% (v/v) de *FetalClone III* y un 10% (v/v) de dimetil-sulfóxido (DMSO) comercial (Sigma). Tras disgregar bien las células por pipeteo en medio de congelación, se pasaron a viales criogénicos (Corning) previamente enfriados y rápidamente se congelaron a -80°C. Al día siguiente, las células se pasaron a congeladores de nitrógeno líquido (-192°C), donde se almacenaron hasta su uso. En cada vial de congelación, se conservaron aproximadamente unos 5×10^6 células.

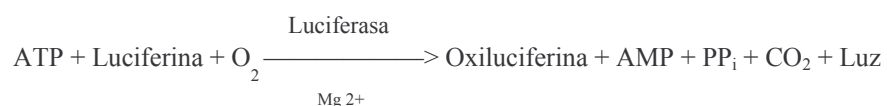
Cuando fue necesario descongelar algún vial de células congeladas en nitrógeno líquido, el proceso consistió en agitar suavemente el vial en un baño con agua a 37°C y, una vez fundido el medio de congelación, pasar rápidamente las células a un frasco de cultivo de 25 cm² con 4-5 ml de medio completo fresco.

2.3. Prueba de *Mycoplasma*

Periódicamente (una vez al mes) y antes de utilizar las células en cultivo con cualquier finalidad, se les realizó una prueba para comprobar que no se encontraban contaminadas por bacterias del género *Mycoplasma*. Estas bacterias dependen de su huésped para conseguir nutrientes, por lo que la contaminación produce un descenso en la proliferación de las células en cultivo y cambios en la respuesta celular, como la expresión génica.

Se empleó el producto comercial *MycoAlert*® *Mycoplasma Detection Kit* (Cambrex) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para que la prueba fuera fiable, las células adherentes no debían estar a una confluencia mayor del 80% y debían haber pasado 2 ó 3 días desde el último pase.

La prueba se basa en la capacidad de las enzimas de *Mycoplasma* (libres tras lisar el reactivo a las bacterias) de transformar el ADP en ATP, en presencia del sustrato comercial, y posteriormente la catalización de éste en AMP y varios productos, entre ellos luz:



(Fuente: Cambrex)

Los pasos realizados fueron:

1. Se recogió 1 ml de medio de cultivo.
2. Se centrifugó 5 minutos a 400 g.
3. A 100 µl de sobrenadante de cada muestra se les añadieron 100 µl de *MycoAlert*® *Reagent* previamente reconstituido, se mezcló por pipeteo y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se incluyó una muestra contaminada con *Mycoplasma* como control positivo.
4. Se leyó la luminiscencia de cada muestra, por cuadruplicado, en un luminómetro de tubo (Berthold, modelo Sirius), empleando el programa *FB12/Sirius PC Software*, versión 1.4, y el ensayo *Single assay protocol*.

5. A cada muestra se le añadieron 100 μ l de *MycoAlert*[®] *Substrate* previamente reconstituido, se mezcló por pipeteo y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Se leyó la luminiscencia de cada muestra por cuadruplicado.
7. Se calculó el cociente entre el promedio de la lectura tras la adición del sustrato y el promedio de la lectura antes de esta adición.
8. Las muestras con cociente claramente mayor que 1 fueron consideradas positivas y las células correspondientes, eliminadas. A las muestras con resultado claramente menor que 1, se les consideró libres de *Mycoplasma* y, por tanto, viables para futuros experimentos. Los cocientes cercanos a 1 fueron clasificados como dudosos y la prueba se repitió tomando de nuevo medio de cultivo al día siguiente.

2.4. Contaje del número de células

En diversos experimentos, fue preciso conocer el número exacto disponible de células en los frascos de cultivo, para calcular los volúmenes a añadir en cada caso.

Una vez obtenidos sedimentos celulares por centrifugación y tras resuspender éstos por pipeteo en medio de cultivo, se realizó una dilución 1:2 de 10 μ l de células con el colorante vital Azul Trypan (Sigma). Tras homogeneizar, 10 μ l de esta mezcla se pusieron en una cámara de Neubauer (Brand), previa colocación de un cubreobjetos.

Se contó al microscopio el número de células viables en cada uno de los 4 cuadrantes de la cámara y se calculó el promedio por cuadrante. La concentración de células disponible se obtuvo mediante la fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células promedio por cuadrante} \times 2 \times 10.000 = \text{N}^\circ \text{ células / ml}$$

Si el sedimento celular era muy abundante, la dilución de trabajo fue de 1:10 en Azul Trypan (10 μ l de células + 90 μ l de colorante) y, por tanto, en la fórmula anterior, se substituyó el factor de dilución 2 por 10.

Multiplicando la concentración de células / ml por el volumen de medio añadido, se obtuvo el número de células totales disponibles.

3. Estudios de expresión de RNA

3.1. Extracción de RNA

Las **líneas celulares con crecimiento adherente** se sembraron en placas de poliestireno de 100 mm de diámetro (Corning), o en placas de poliestireno de 6 pocillos (Corning). Se cultivaron hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80%.

Seguidamente, se extrajo el RNA de estas células, mediante el producto comercial *RNA Ultraspec* (Laboratorios Biotecx). Este producto se basa en la capacidad de las sales de guanidina y de la urea para actuar como agentes desnaturalizantes. Estos agentes, junto con el fenol y otros detergentes, actúan como unos reactivos muy efectivos en el aislamiento de RNA a partir de tejidos y células animales y bacterianas.

El protocolo utilizado para extraer RNA a partir de células adherentes, realizado en frío para preservar el RNA, fue el siguiente:

1. Se aspiró el medio de cultivo mediante bomba de vacío y pipeta.
2. Se añadió 1 ml de *RNA Ultraspec* en cada placa de 100 mm ó 0.5 ml en cada pocillo.
3. Con un rascador celular (Corning), se levantaron las células y se recogieron en un tubo aparte, pre-enfriado en hielo.
4. Se añadieron 200 µl de clorofomo (Sigma) por cada ml de *Ultraspec* añadido antes.
5. Cada tubo se sometió a agitación en vórtex durante 15 segundos y se incubó 5 minutos en hielo.
6. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12.000 g y 4°C. Tras este tiempo, se aprecian tres fases claramente diferenciadas.
7. Se recogió el máximo posible de fase acuosa (superior), procurando no tocar la interfase y se pasó a un tubo nuevo. El resto se descartó.
8. Se añadió un volumen de isopropanol (Panreac) aproximadamente igual al de la fase acuosa recogida (600-700 µl).
9. Se invirtió el tubo varias veces, se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 g y 4°C durante 10 minutos. El RNA precipita en forma de *pellet* blanquecino.
10. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de etanol al 75% (v/v) en agua/DEPC (agua ultrapura con un 0.1% (v/v) de dietilpirocarbonato (Sigma)),

dejada reposar 24 horas y autoclavada). El DEPC es un protector del RNA, ya que inhibe a las RNAsas.

11. Se lavó el *pellet* de RNA mediante agitación suave en vórtex y centrifugación 5 minutos a 7.500 g y 4°C.
12. Se repitieron los pasos 10 y 11.
13. Una vez obtenido el *pellet*, se dejó secar a 50°C con las tapas de los tubos abiertas, para permitir la evaporación, durante 15 minutos.
14. Se resuspendió el RNA en 20 µl de agua/DEPC.
15. Se cerró la tapa del tubo y se incubó 10 minutos a 50°C para que el RNA quedara bien disuelto.

Las **células con crecimiento en suspensión** fueron centrifugadas a 500 g durante 5 minutos y, tras eliminar el sobrenadante, sobre el sedimento celular obtenido se añadió 1 ml de *RNA Ultraspec*, continuando desde este paso con la extracción del RNA según el protocolo que se acaba de describir.

En cuanto a las **muestras clínicas pulmonares**, un trozo de cada una se cortó en frío sobre una placa, se pesaron 10-20 mg de cada muestra y se depositó en el orificio de un mortero de acero inoxidable pre-enfriado en hielo seco. Se añadió N₂ líquido sobre cada muestra hasta que ésta quedó totalmente congelada y el N₂ líquido se hubo evaporado. Con la ayuda de un martillo, las muestras fueron fragmentadas mecánicamente en el mortero y los fragmentos se recogieron en tubos con dos bolitas de cuarzo y una mezcla de 700 µl de tampón de lisis RLT (Qiagen) con β-mercaptoetanol (Sigma) (10 µl por cada 1.000 de RLT). Luego, se disgregaron en el molino mezclador MM 301 (Retsch), llevándose a cabo 3 ciclos de 45 segundos y 30 agitaciones/segundo. A continuación, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se centrifugó 3 minutos a velocidad máxima y temperatura ambiente, se pasó el sobrenadante a otro tubo y se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima.
2. El sobrenadante se pasó a una columna del producto comercial *QIASHREDDER* (Qiagen) y se centrifugó 2 minutos a 15.000 g. y temperatura ambiente. En este paso se consigue homogeneizar la muestra.
3. Sobre el volumen recogido tras su paso por la columna, se añadió un volumen igual de etanol (Oppac) al 70% (v/v) en agua y se mezcló por pipeteo hasta obtener apariencia opaca.

4. Se pasó esta mezcla a una columna de purificación de RNA del producto *RNeasy® Micro* (Qiagen) sobre un tubo de 2 ml y se centrifugó 15 segundos a 9.000 g, desechándose el eluido.
 5. Se añadieron a la columna 350 µl de tampón RW1 y se centrifugó 15 segundos a 9.000 g. Se desechó el eluido.
 6. 80 µl de una mezcla de DNasa (10 µl) en tampón RDD (70 µl) se añadieron sobre la columna, incubándose 15 minutos a temperatura ambiente.
 7. Se repitió el paso 5.
 8. La columna se pasó a un nuevo tubo, se añadieron 500 µl de tampón de lavado RPE y se centrifugó 15 segundos a 9.000 g. Se desechó el eluido.
 9. Se añadieron 500 µl de etanol al 80% (v/v) en agua y se centrifugó 15 segundos a 9.000 g. Se desechó el eluido.
 10. Se colocó la columna en un nuevo tubo, con la tapa abierta para permitir la evaporación del etanol. Se centrifugó 5 minutos a 16.000 g y se eliminó el eluido.
 11. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se añadieron 20 µl de agua libre de RNasas (Qiagen) directamente sobre la membrana, incubándose 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugando 1 minuto a 16.000 g.
 12. El eluido se volvió a pasar por la columna y a centrifugar 1 minuto a 16.000 g.
- Todos los RNA obtenidos se conservaron a -80°C, hasta su uso posterior.

3.2. Cuantificación de RNA

La cantidad de RNA obtenido se determinó mediante la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en el espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Scientific) y su pureza, mediante el ratio A_{260}/A_{280} . Para que las muestras fueran consideradas de calidad suficiente, este cociente debía estar comprendido entre 1.8 y 2. Como blanco, se utilizó el mismo medio en el que se obtuvo el RNA en cada caso. La concentración de los RNA se obtuvo en ng/µl.

3.3. Retro-transcripción (RT)

Este proceso consiste en la obtención de un DNA complementario (cDNA) a partir de un RNA mensajero (mRNA). Es, por tanto, el proceso inverso a la transcripción. Precisa de unas enzimas concretas, las retro-transcriptasas, que son comunes en virus que poseen como genoma RNA de polaridad negativa y que necesitan sintetizar DNA para poder expresar sus proteínas. A lo largo de este trabajo, la retro-transcriptasa

utilizada ha sido una versión sintética de la correspondiente al virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV). El protocolo de la RT empleado fue el siguiente:

1. Para cada muestra, se pusieron en un tubo 2 μg de RNA, 1 μl de mezcla de dNTPs a 10 mM (Bioline), 1 μl de oligo-dTs a 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Amersham Biosciences) y agua/DEPC hasta 11 μl de volumen final.
2. Se incubaron los tubos 5 minutos a 65°C, para romper la estructura secundaria del RNA y luego se pusieron en hielo al menos un minuto.
3. Se añadieron a cada tubo 4 μl de tampón RT 5X (Invitrogen), 1 μl de ditioneitol (DTT) a 0.1 M (Invitrogen), 1 μl (40 unidades) de *RNAasa Out* (Invitrogen) a 40 U/ μl (elimina las RNAasas) y 1 μl (200 unidades) de la retro-transcriptasa *Super Script III* (Invitrogen) a 200 U/ μl .
4. Se incubaron las muestras 50 minutos a 50°C. Durante este paso se lleva a cabo el proceso de retro-transcripción.
5. Para inactivar a la retro-transcriptasa, se incubaron las muestras 15 minutos a 70°C y a continuación se pusieron en hielo.
6. Se añadió 1 μl (2 unidades) de RNasa H (Invitrogen) a 2 U/ μl , para degradar el RNA de cadena sencilla que no había dado lugar a cDNA.
7. Se incubó cada tubo 20 minutos a 37°C y los cDNA se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Dado que al final del proceso de la RT quedan en el mismo tubo tanto los cDNA obtenidos como restos de nucleótidos y oligonucleótidos, no se cuantificaron estos cDNA. Para experimentos de RT-PCR, se asumió que la cantidad de cDNA en cada muestra era la misma, puesto que se había partido de idéntica cantidad de RNA (2 μg).

3.4. Diseño de cebadores

Para cada uno de los genes se diseñaron cebadores específicos mediante el programa informático *Primer3*, disponible a través de la página web del Departamento de Genética de la Universidad de Navarra (<http://www.unav.es/genetica>). Los criterios básicos para el diseño de los cebadores fueron:

- Tamaño del amplicón: Entre 200 y 500 pares de bases (pb) (óptimo: 300).
- Temperatura de hibridación de los cebadores: Entre 52 y 56°C (óptima: 55°C).
- Longitud de los cebadores: Entre 18 y 25 pb (óptima: 23).

En la **Tabla 7** se resumen las características de los cebadores elegidos para estudiar, por RT-PCR convencional, la expresión en líneas celulares de pulmón de los genes obtenidos en el primer análisis bioinformático. Se incluyó GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como gen control de expresión endógena.

Gen	Cebador	Secuencia (5'→3')	Posición	Nº acceso	Nº ciclos
ADARB1	S	CACCTCTCTACACCCTCAACAAG	2245-2267	gi:75709170	30
	AS	CGTAGTAAGTGGGAGGGAACCTT	2457-2479		
ASCC3L1	S	GTGTCTGCTCTGAGAAACAGTGC	4011-4033	gi:40217846	25
	AS	CTGTCAGGAGTACCACCTTCTTG	4292-4314		
GAPDH	S	ACTTTGTCAAGCTCATTTC	1019-1038	gi:83641890	25
	AS	CACAGGGTACTTTATTGATG	1284-1303		
MARS	S	CTCCAGCACTATCACCAGCTACT	2088-2110	gi:14043021	20
	AS	GTGTCCTGCTGGTAAGGTACACA	2380-2402		
MRPL3	S	GCCTATACATCCTTGGAACCAG	419-441	gi:21265090	25
	AS	GTGAGCAGCATAAAGAGGAGTGC	733-755		
PABPC1	S	CAGGCTCACCTCACTAACCAGTA	1627-1649	gi:56676313	20
	AS	GAACCTGTGAAGAAGCTGGTCTC	1902-1924		
RAE1	S	ATGACTGGGAGCTGGGATAAGAC	798-820	gi:62739174	25
	AS	AGCAACTCTCCCCTCGATACTTC	1066-1088		
RNPS1	S	TAGGGCTCCTTCACCTACCAAAC	320-342	gi:18379335	25
	AS	AAGGACTTGGAGAGCCAGAAGAG	608-630		
SNRPB	S	CAGAAAGGGAAGAGAAGCGAGTC	339-361	gi:38150006	20
	AS	GTACCTCTTCCTTGTGGGGTCAT	587-609		
SNRPC	S	CTACTCCATTCTCTGCTCCTCCT	206-228	gi:4507126	25
	AS	CCTCCCCTCTATCCTTATCTGTC	487-509		
SNRPE	S	TAGATCGCGGATTCAGGTG	129-147	gi:61098048	25
	AS	AGCATGATCCGACCCAGTT	266-284		

Tabla 7. Características de los cebadores utilizados en el estudio de expresión, por RT-PCR convencional, de los genes obtenidos tras el primer análisis bioinformático. Se muestran los nombres de los genes (incluyendo el control de GAPDH), la orientación de los cebadores (S: Sentido; A: Antisentido), las secuencias de éstos en sentido 5'→3', la posición relativa de los mismos respecto a la secuencia del gen según el número de acceso utilizado y los ciclos de amplificación utilizados en cada PCR, con los cuales era posible visualizar diferencias en la expresión.

3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional

La PCR es una técnica sencilla que pretende conseguir una amplificación de DNA de forma selectiva, para obtener millones de copias de una secuencia específica. La enzima que cataliza la reacción es una polimerasa de DNA, dependiente de DNA. De esta forma, sintetiza hebras de DNA complementarias a otras ya existentes o moldes, necesitando en la reacción desoxirribonucleótidos, Mg^{2+} y unos fragmentos cortos de DNA (cebadores) que se unan específicamente, uno en cada hebra, a secuencias que flanquean la región de DNA a amplificar.

La PCR es un proceso cíclico en el que se repiten muchas veces 3 pasos básicos, cada uno de ellos a distinta temperatura óptima:

1. Desnaturalización del DNA, para que se separen las dos hebras.
2. Hibridación o *annealing*: unión de los cebadores a sus secuencias específicas, una en cada hebra.
3. Extensión: síntesis de las hebras de DNA, complementarias a los moldes.

Mediante la PCR es posible estudiar los niveles de expresión de un gen (en la RT-PCR, cuanto más RNA haya, más cDNA se obtendrá y la PCR rendirá mayor número de copias), detectar mutaciones en el genoma, realizar recombinaciones, etc., gracias al número de moléculas conseguido.

A lo largo de este trabajo, se han llevado a cabo diferentes modalidades de PCR. En este apartado se describen los reactivos y metodología empleados para la realización del estudio de expresión, en líneas celulares, de los genes obtenidos tras el análisis bioinformático inicial. En otros apartados se indican las características propias de las PCR empleadas en cada caso.

Para este tipo de estudio en concreto cada mezcla de reacción (de distintas muestras) se compuso de:

- 1 μ l de cDNA de líneas celulares de pulmón.
- 5 μ l de tampón 10X (Bioline).
- 1.5 μ l de $MgCl_2$ a 50 mM (Bioline).
- 1 μ l de dNTPs a 10 mM (Bioline).
- 1 μ l de cada cebador (sentido y antisentido) a 10 μ M.
- 0.4 μ l (2 unidades) de Biotaq DNA polimerasa a 5 U / μ l (Bioline).
- Se completó con agua ultrapura hasta un volumen total de reacción de 50 μ l.

En la **Tabla 7** se muestran los cebadores utilizados para cada reacción y el número de ciclos (señalados como “n” a continuación) del programa en el termociclador (PTC-100, MJ Research). Los pasos de que constó la PCR fueron:

- | | | |
|----------------------|---------------------------|---------------------------------|
| • 2 minutos a 94°C | Desnaturalización inicial | } Reacción cíclica (“n” ciclos) |
| • 30 segundos a 94°C | Desnaturalización | |
| • 30 segundos a 55°C | Hibridación | |
| • 30 segundos a 72°C | Extensión | |
| • 10 minutos a 72°C | Extensión final | |

Cuando fue necesario, los productos de PCR se congelaron a -20°C hasta su uso.

Las muestras se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa (Pronadisa) al 1% y *Sybr Safe* (Invitrogen) 1X en tampón Tris/Acético/EDTA (TAE). Se cargaron 10 µl de cada producto de PCR, con 5 µl de tampón de carga (Promega) en cada calle, así como 10 µl de control de peso molecular de 1 Kpb (Invitrogen). La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V durante 30 minutos aproximadamente (fuentes de alimentación y cubetas de BioRad). La visualización de los productos de PCR tuvo lugar en un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad), mediante el empleo del programa *Quantity One*, versión 4.5 (BioRad).

Se comprobó, gracias al control de peso molecular incluido en el gel, que las bandas se correspondían con el tamaño calculado de los productos de amplificación, en función de la posición relativa de los cebadores en la secuencia de cada gen. De esta forma, se aseguró la especificidad de cada PCR.

3.6. RT-PCR a tiempo real

El fundamento de esta técnica es el mismo que en el caso anterior: amplificación cíclica de un fragmento de cDNA específico, si bien presenta algunas diferencias.

- Hay un paso previo a la desnaturalización inicial, de 2 minutos a 50°C.
- Los pasos de hibridación y de extensión ocurren simultáneamente, a la misma temperatura.
- Tras terminar la PCR, el termociclador somete a los productos de amplificación a un gradiente de temperaturas para desnaturalizarlos. Cada amplicón, en función de su secuencia, tiene una temperatura óptima a la cual se desnaturaliza mayoritariamente. Este parámetro se utiliza como marca de especificidad para posteriores PCR con los mismos cebadores.

- Salvo los cebadores y el cDNA, cambian los reactivos, puesto que la polimerasa, los nucleótidos y las sales forman parte de una misma mezcla comercial.
- La mezcla de reacción contiene una sonda fluorescente (*Sybr Green*®) que se intercala entre las hebras del DNA. Cuanto mayor es el número de moléculas de DNA, más moléculas de sonda se intercalan y emiten fluorescencia, de forma proporcional.
- Es posible la detección del producto de amplificación en cada uno de los ciclos de la PCR (a tiempo real). Por tanto, no es preciso llegar a los últimos ciclos ni tener que correr un gel en el que, aun pudiendo haber diferencias de expresión entre muestras, se puede caer en el error de no detectarlas debido a que el número de ciclos ha permitido la saturación del producto de amplificación (efecto *plateau*).

El diseño de cebadores para los nueve genes estudiados fue similar al apartado anterior, con la única diferencia de que la longitud de los amplicones, debido a la técnica empleada, debía ser menor (entre 100 y 150 pb). Los cebadores utilizados para estudiar la expresión de los ocho genes seleccionados inicialmente se resumen en la **Tabla 8**. Como genes control, se incluyeron GAPDH y HPRT-1 (hipoxantina-fosforribosil-transferasa 1).

Además, se llevó a cabo un estudio similar para la expresión de **PTB** en líneas celulares y en pacientes con cáncer de pulmón. Los cebadores empleados fueron:

S: 5' GTGGAGAACCTCTTCTACCCTGT 3' (posición*: 668-690)

AS: 5' GCCTGGAAGTGGTTGTTCTTG 3' (posición*: 757-777)

* El número de acceso que se utilizó, respecto a cuya secuencia están indicadas las posiciones relativas de los cebadores del gen, fue gi: 209870087.

Para cada una de las combinaciones muestra-gen, se hizo la PCR por triplicado. De esta forma, se realizaron 9 PCR por cada muestra: 3 para el gen en estudio, 3 para GAPDH y 3 para HPRT. Se utilizaron placas de 96 pocillos, especiales para PCR a tiempo real, con tapa adhesiva (Applied Biosystems). En cada uno de los pocillos la mezcla de reacción estuvo formada por:

- 1.9 µl de cDNA diluido 1:10 en agua ultrapura.
- 12.5 µl de *Sybr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems).
- 0.75 µl de cada cebador (sentido y antisentido) a 10 µM.
- Se completó con agua ultrapura hasta un volumen total de reacción de 25 µl.

Para todos los casos, el termociclador empleado para la realización de las PCR y detección de fluorescencia fue el *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). El sistema se programó según los siguientes pasos:

- 2 minutos a 50°C
 - 10 minutos a 95°C Desnaturalización inicial
 - 15 segundos a 95°C Desnaturalización
 - 1 minuto a 60°C Hibridación y extensión
 - Gradiente de temperaturas
- } 40 ciclos

La especificidad de los productos de amplificación se verificó comprobando que la T^a de desnaturalización del amplicón coincidía con la obtenida para cada gen en concreto en la puesta a punto (*).

El análisis de los resultados se realizó de forma semicuantitativa. Dentro de cada muestra y para cada gen de estudio, así como para GAPDH y HPRT, se determinó el valor de Ct, entendido como el número de ciclo en el que se alcanzó un determinado nivel en la intensidad de fluorescencia. Este nivel de fluorescencia se fijó teniendo en cuenta que cortara a las curvas de amplificación en su fase exponencial, ya que es en esta etapa de la PCR cuando los resultados pueden ser comparados de manera fiable.

Con estos valores de Ct, junto con los datos derivados de la puesta a punto de los cebadores (*), se calculó la expresión normalizada de cada gen de estudio frente a la expresión de GAPDH y HPRT en todas las muestras.

La interpretación de los resultados se basa en asumir que un gen que se está expresando más en una muestra que en otra dará valores de Ct más bajos. Como también se asume que la expresión de los genes control se mantiene estable entre muestras, la expresión normalizada del gen de interés sube de una muestra a otra.

* La puesta a punto de todos cebadores se había realizado previamente para comprobar que amplificaban de forma específica los fragmentos deseados, así como para calcular su eficacia. De esta forma, para cada gen (incluidos los controles) se llevaron a cabo RT-PCR a tiempo real, en las mismas condiciones descritas anteriormente, utilizando como muestras diluciones dobles sucesivas de cDNA de la línea celular H1299. Así, a medida que el cDNA de partida es menor, se obtienen valores de Ct más altos. Se traza una recta patrón que correlacione ambos valores y se obtiene una pendiente (pte).

La eficacia (E) de los cebadores se calcula como: $E = 10^{(-1/pte)}$ y este valor se interpreta como el cociente entre las moléculas de DNA que hay en la mezcla en cada ciclo y las que hay en el ciclo anterior, siempre que la PCR se encuentre en la fase exponencial.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Posición	Nº acceso
ADARB1	S	GTACCAGCGGATCTCCAACATAG	2213-2235	gi:75709170
	AS	CTACCGTCCAGTTGACACTGAAG	2324-2346	
ASCC3L1	S	CTCATCTCCATCAAGAGGCTGAC	6312-6334	gi:40217846
	AS	CTCCTGGTCACATCCCATGTAAG	6421-6443	
GAPDH	S	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	108-126	gi:83641890
	AS	GAAGATGGTGATGGGATTTC	314-333	
HPRT	S	TGACACTGGCAAAACAATGCA	578-598	gi:164518913
	AS	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	651-671	
MARS	S	TACACAGACCAGTGGGAGAGATG	1617-1639	gi:14043021
	AS	GAGGTGGCTGACCAAGGTATAGT	1744-1766	
MRPL3	S	TGCTGCTCACTTTCGTCCA	746-764	gi:21265090
	AS	TCGTTTGACCATGCGTAGC	849-867	
PABPC1	S	CAACCCTGTAATCAACCCCTACC	1683-1705	gi:56676313
	AS	GCGAGGACTTGGTCTTAGTTGAG	1790-1812	
RAE1	S	CCTCAGCAGTAACCAAGCGATAC	707-729	gi:62739174
	AS	GTCTTATCCCAGCTCCCAGTCAT	798-820	
SNRPB	S	CAGAAAGGGAAGAGAAGCGAGTC	339-361	gi:38150006
	AS	TCCAGCAAGTGGAAGTTCGAGCAA	438-460	
SNRPE	S	TAGATCGCGGATTCAGGTG	129-147	gi:61098048
	AS	AGCATGATCCGACCCAGTT	266-284	

Tabla 8. Características de los cebadores utilizados en el estudio de expresión por RT-PCR a tiempo real de los genes cuya expresión por RT-PCR convencional confirmó el primero de los estudios bioinformáticos. S: Sentido; AS: Antisentido. Se incluyen los genes control GAPDH y HPRT.

Para comprobar que los productos de amplificación eran específicos y se correspondían con los calculados a priori, se corrió una electroforesis en gel de agarosa con el producto de PCR de alguno de los pocillos para cada pareja de cebadores y se verificó, frente al marcador de peso molecular, que las bandas tenían el tamaño adecuado. También se anotó la T^a óptima de desnaturalización.

4. Estudios de expresión de proteínas

4.1. Extractos de líneas celulares de pulmón

4.1.1. Extracción de proteínas totales

Para la realización de este protocolo, se utilizó el tampón de lisis RIPA (pH = 7.4), cuya composición es la siguiente:

- 10 mM Tris (Sigma).
- 150 mM NaCl (Fluka).
- 1% (v/v) Tritón X-100 (Sigma).
- 1% (m/v) Deoxicolato sódico (Sigma).
- 0.1% Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma).
- 5 mM EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) (Sigma).

Por cada 10 ml de tampón RIPA, se añadió 1 pastilla de inhibidores de proteasas *Complete, Mini, EDTA-Free* (Roche). Se disolvió mediante agitación y se conservó a 4°C durante un máximo de una semana. Al PBS utilizado en el protocolo también se le agregó una pastilla de inhibidores de proteasas por cada 10 ml y se conservó a 4°C una semana. El protocolo que se llevó a cabo para la extracción de proteínas totales de líneas celulares fue el siguiente:

1. Se sembraron todas las líneas celulares de pulmón, con medio de cultivo completo, en placas de 100 mm de diámetro.
2. Cuando alcanzaron una confluencia del 80%, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 2 ml de PBS frío.
3. Se levantaron las células con un rascador y se pasaron a un tubo de 15 ml.
4. Se repitieron los pasos 2 y 3, con 3 ml de PBS.
5. Se centrifugaron los tubos 5 minutos a 900 g y 4°C.
6. El sobrenadante fue eliminado.
7. El sedimento celular se resuspendió en 500 µl de PBS con inhibidores de proteasas y se pasó a un tubo limpio.
8. Se centrifugó 5 minutos a 2.400 g y 4°C. Se retiró el sobrenadante
9. Se resuspendió el sedimento celular en 250 µl de tampón RIPA con inhibidores de proteasas y se mezcló bien por pipeteo.
10. Los tubos se incubaron 15 minutos en hielo.
11. Se centrifugó 15 minutos a 15.000 g y 4°C.

12. Las proteínas del sobrenadante se recogieron en tubos limpios y se conservaron a -80°C hasta su uso.

4.1.2. Extracción de proteínas por fraccionamiento sub-celular

Para obtener extractos de proteínas procedentes del núcleo y del citoplasma celular por separado, se empleó un protocolo ligeramente distinto al anterior. La cantidad de proteínas obtenidas a través de este método es menor en términos absolutos, pero la proporción de cada proteína individual por cada microgramo de extracto es mayor, pues están más puras.

Los reactivos utilizados en este protocolo fueron:

- Tampón de lisis, $\text{pH} = 7.4$:
 - 5 mM Tampón fosfato:
 - 1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma).
 - 4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma).
 - 50 mM NaCl (Fluka).
 - 150 mM Sacarosa (Fluka).
 - 5 mM KCl (Sigma).
 - 2 mM Ditioneitol (DTT) (Sigma).
 - 1 mM MgCl_2 (Sigma).
 - 0.5 mM CaCl_2 (Fluka).

Se prepararon 100 ml de tampón. A 50 ml se les añadieron 100 μl del detergente Igepal (Sigma). A 10 ml de cada uno de los tampones de lisis (con y sin Igepal), se le añadió 1 pastilla de inhibidores de proteasas y se conservó a 4°C .

- Colchón de sacarosa ($\text{pH} = 7.4$):
 - 30% (m/v) Sacarosa (Fluka).
 - 2.5 mM Tris (Sigma).
 - 10 mM NaCl (Fluka).
- Solución de tritón ($\text{pH} = 7.5$):
 - 0.5% (v/v) Tritón X-100 (sigma).
 - 50 mM Tris (Sigma).
 - 300 mM NaCl (Fluka).

Los pasos realizados para la obtención de los extractos de proteínas fueron:

1. Se sembraron las líneas celulares en placas de 10 cm de diámetro con medio de cultivo completo y se incubaron hasta una confluencia del 80%.
2. Se eliminó el medio y se lavaron las células con 5 ml de PBS frío.
3. Tras eliminar el PBS, se añadió de nuevo 1 ml de PBS frío.
4. Se levantaron las células con un rascador y se pasaron a tubos limpios.
5. Se centrifugó a 450 g durante 5 minutos y a 4°C. Se descartó el sobrenadante.
6. Se añadieron 50 µl de tampón de lisis con Igepal e inhibidores de proteasas y se resuspendió el sedimento celular por pipeteo.
7. Los tubos se centrifugaron a 4°C y 10.000 g durante 5 minutos.
8. Los sobrenadantes, con las proteínas citoplasmáticas, se recogieron en tubos aparte y se conservaron a 4°C.
9. El *pellet* fue resuspendido por pipeteo en 100 µl de tampón de lisis sin Igepal y con inhibidores de proteasas y a continuación fue depositado lentamente sobre 250 µl de colchón de sacarosa en otros tubos nuevos.
10. Se centrifugó durante 5 minutos a 4°C y 10.000 g. Se desechó el sobrenadante.
11. Sobre el *pellet* de núcleos, se añadieron 50 µl de solución de tritón frío, se resuspendió por pipeteo y se incubó 30 minutos en hielo.
12. Se centrifugó a 15.000 g y 4°C durante 5 minutos.
13. Se recogieron los sobrenadantes, con los extractos de proteínas nucleares, en tubos aparte.
14. Todos los extractos fueron centrifugados a 15.000 g y 4°C durante 3 minutos y se conservaron a -80°C hasta su uso.

4.2. Extractos de proteínas de cerebro de rata

Se utilizó como material de inicio un cerebro diseccionado de rata, proporcionado amablemente por la Dra. Marisol Aymerich, del CIMA.

4.2.1. Extracción de proteínas totales

Se utilizó un tampón de lisis compuesto por los siguientes reactivos:

- 50 mM Tris (Sigma), pH = 7.5.
- 50 mM NaCl (Fluka).
- 5 mM EDTA (Sigma), pH = 8.

- 1 mM EGTA [ácido etilen-glicol-bis(β -aminoetilen)-N, N, N', N'-tetraacético] (Sigma).
- 2 mM Na_3VO_4 (tetra-oxo-vanadato sódico) (Sigma).
- 25 mM NaF (fluoruro sódico) (Sigma).
- 1% (v/v) Tritón X-100 (Sigma).
- 0.1% (m/v) SDS (Sigma).
- 0.5% (m/v) Deoxicolato sódico (Sigma).
- Inhibidores de proteasas (Roche): 1 pastilla por cada 10 ml de tampón.

El protocolo llevado a cabo para obtener las proteínas fue el siguiente:

1. Se pesó un tubo vacío.
2. Se diseccionó un trozo de cerebro, cortándolo en fragmentos pequeños. Se añadieron éstos al tubo y se calculó el peso de la muestra.
3. Por cada miligramo de muestra, se añadieron 10 μl de tampón de lisis.
4. Por medio del homogeneizador Heidolph RZR-1 (Thomas Scientific), se aplicaron 30 pulsos a la muestra, hasta que quedó totalmente homogeneizada.
5. Se centrifugó a 16.000 g y 4°C durante 10 minutos.
6. El *pellet* se eliminó, mientras que el sobrenadante con las proteínas se conservó a -80°C hasta su uso.

4.2.2. Extracción de proteínas por fraccionamiento sub-celular

En esta ocasión, se emplearon cuatro tipos de reactivos:

➤ Tampón A:

- 10 mM HEPES [ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacino-etano-sulfónico] (Sigma), pH = 7.5.
- 25 mM KCl (Sigma).
- 2 mM MgCl_2 (Sigma).
- Inhibidores de proteasas (Roche): 1 pastilla por cada 10 ml de tampón.

➤ Tampón N: 250 mM Sacarosa (Fluka) en tampón A.

➤ Colchón de sacarosa: Sacarosa 1.1 M en tampón A.

➤ Tampón de lisis:

- 50 mM Tris (Sigma), pH = 7.5.
- 300 mM NaCl (Fluka).

- 0.5% (v/v) Tritón X-100 (Sigma).
- Inhibidores de proteasas (Roche): 1 pastilla por cada 10 ml de tampón.

Para obtener los extractos de proteínas nucleares y citoplasmáticas, se realizaron los siguientes pasos:

1. Se pesó un tubo vacío.
2. Se diseccionó un trozo de cerebro, cortándolo en fragmentos pequeños. Se añadieron éstos al tubo y se calculó la masa de la muestra.
3. Se añadió 1 ml de tampón A y se incubó 10 minutos en hielo.
4. Mediante el homogeneizador Heidolph RZR-1 (Thomas Scientific), se aplicaron 15 pulsos a la muestra, hasta que quedó totalmente homogeneizada.
5. La muestra se filtró a través de 4 capas de gasa estéril.
6. Se centrifugó 10 minutos a 1.000 g y 4°C. Se desechó el sobrenadante.
7. Por cada volumen de *pellet* (con los núcleos), se añadieron 1.5 volúmenes de tampón N y se mezcló bien por pipeteo.
8. Se depositó el extracto de núcleos sobre 500 µl de colchón de sacarosa en otro tubo.
9. Se centrifugó 10 minutos a 10.000 g y 4°C. Se descartó el sobrenadante.
10. El *pellet* se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis.
11. Se incubó 30 minutos en hielo y se centrifugó 3 minutos a 15.000 g. Se recogió el sobrenadante.

4.3. Cuantificación de proteínas

Todos los extractos de proteínas (totales, citoplasmáticos y nucleares) fueron cuantificados utilizando el producto comercial *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce). Este método combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por parte de las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret), con la detección colorimétrica de los cationes Cu^+ mediante un reactivo que contiene ácido bicinconínico (BCA). El complejo púrpura que se forma, compuesto por dos moléculas de BCA con un catión Cu^+ , es soluble en agua y presenta una alta absorbancia a 562 nm, siendo ésta directamente proporcional a la concentración de proteínas, en un rango entre 20 y 2.000 µg/ml.

El producto comercial incluye ampollas de seroalbúmina bovina (BSA), a una concentración estándar de 2 mg/ml. Antes de realizar la cuantificación de los extractos,

se llevaron a cabo diluciones dobles seriadas de la BSA en PBS, para obtener muestras a 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g/ml}$.

La cuantificación de todos los extractos se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson), siguiendo estas condiciones:

1. Se realizaron triplicados de todas las muestras.
2. Para las diluciones de BSA, se pusieron 10 μl de cada muestra por pocillo.
3. Para los extractos de proteínas de líneas celulares, se hicieron diluciones 1/4 (2.5 μl de muestra + 7.5 μl de PBS en cada pocillo) y 1/8 (1.25 μl + 8.75 μl , respectivamente).
4. Se pusieron 3 pocillos con 10 μl de PBS, como blanco.
5. Se añadieron 200 μl /pocillo de la mezcla de reactivos, compuesta por 50 partes del Reactivo A y una parte del Reactivo B (v/v).
6. Se incubó la placa a 37°C durante 30 minutos.
7. Se midió la absorbancia de los pocillos a 562 nm (lector de placas Sunrise®, Tecan; programa Magellan®, versión 3.0) y se les restó la absorbancia del blanco de PBS.
8. Con las absorbancias de las diluciones de BSA, se trazó una recta de correlación entre estos datos y las concentraciones de trabajo utilizadas. Se obtuvo la ecuación de dicha recta.
9. Para calcular las concentraciones de los extractos de proteínas, se interpolaron sus datos de absorbancia en la ecuación de la recta de la BSA y se tuvieron en cuenta las diluciones realizadas previamente.
10. Se calculó el promedio entre los triplicados y entre los datos de ambas diluciones para cada muestra.

4.4. Western blot

Esta técnica consiste en la separación electroforética de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la transferencia de éstas a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico. Sobre la membrana se pueden detectar las proteínas, tras la incubación de ésta con anticuerpos específicos y posterior revelado frente a una película fotográfica. La mayor o menor densidad de las bandas existentes nos dice la abundancia relativa de la proteína de interés en las muestras de partida.

Los reactivos utilizados para el *western blot* fueron los siguientes:

- Tampón de carrera: MOPS 20 X (pH = 7.7):
 - 1 M MOPS (ácido morfolino-propano-sulfónico) (Sigma).
 - 1 M Tris (Sigma).
 - 69.3 mM SDS (Sigma).
 - 20.5 mM EDTA (Sigma).

Para preparar el tampón 1X, se diluyeron 25 ml del concentrado a 20 X en 475 ml de agua desionizada.

- Tampón de transferencia:
 - 25 mM Tris (Sigma).
 - 200 mM Glicina (BioRad).
 - 10% (v/v) metanol (Panreac).
- PBS (pH = 7.4):
 - 8 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O (Sigma).
 - 2 mM NaH₂PO₄ · H₂O (Sigma).
 - 150 mM NaCl (Fluka).
- TBS (pH = 7.4):
 - 50 mM Tris (Sigma).
 - 150 mM NaCl (Sigma).

Para preparar el PBS-tween o el TBS-tween, se añadió detergente Tween® 20 (Sigma) hasta una concentración del 0.1% (v/v).

El tampón de bloqueo se preparó añadiendo leche en polvo desnatada (Sveltesse, Nestlé) al PBS-tween o al TBS-tween, hasta una concentración del 5% (m/v).

Tras la debida puesta a punto de la técnica, en la que se decidieron la cantidad de proteína a utilizar, el tipo y dilución de los anticuerpos, etc., los pasos seguidos para la realización del *western blot* fueron los siguientes:

1. Se prepararon las muestras en tubos, de forma que hubiera en ellos 5 µg de proteínas y 10 µl del tampón de carga desnaturizante *4X XT Sample Buffer* (BioRad). Cuando las muestras fueron sometidas a tratamiento reductor, se añadieron además 4 µl de β-mercaptoetanol (Sigma), para romper los puentes disulfuro. Se completó con agua ultrapura hasta un volumen total de 40 µl.
2. Se incubaron las muestras a 95°C durante 5 minutos.
3. Mientras tanto, se prepararon los geles de carrera. Se utilizaron geles de 12 calles, al 10% de Bis-Tris, del sistema *Criterion* (BioRad). Se lavaron con agua

- desionizada y se colocaron en una cubeta de electroforesis vertical (BioRad), sumergidos en tampón MOPS 1X.
4. Las muestras hervidas fueron depositadas en los pocillos del gel. En cada extremo, se cargaron 10 μ l del marcador de peso molecular *Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range* (BioRad).
 5. Se corrió la electroforesis durante 50 minutos aproximadamente, a 180 V.
 6. Unos minutos antes de terminar la electroforesis, se activó la membrana de transferencia. Se utilizó una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno), concretamente la *Immobilon-P Transfer Membrane*, de 0.45 μ m de diámetro de poro (Millipore). La membrana se incubó 15 segundos en metanol absoluto (Panreac), luego 2 minutos en agua ultrapura y finalmente 5 minutos en el tampón de transferencia.
 7. Tras acabar la electroforesis, se extrajo el gel, se recortaron los bordes y se puso en contacto con la membrana de PVDF, en presencia del tampón de transferencia, eliminándose las burbujas. En cada lado, se colocó un trozo de papel de filtro whatman (BioRad) y una esponja. El conjunto fue inmovilizado con un sistema de cierre de BioRad y se introdujo en una cubeta de transferencia (BioRad), cubriéndose completamente con tampón de transferencia. El gel quedó orientado hacia el electrodo positivo y la membrana hacia el negativo.
 8. Se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana, sometiendo la cubeta a un voltaje constante de 30 V, durante 70 minutos.
 9. Para comprobar la presencia de proteínas antes de continuar con el revelado, el gel se tiñó con azul de Coomasie mediante el producto *GelCode® Blue Stain Reagent* (Pierce). Se lavó en agitación tres veces (15 minutos) con agua ultrapura, se incubó 1 hora en agitación con el colorante y se repitieron los lavados con agua. Se observaron las bandas mediante luz blanca en un transiluminador (BioRad), mediante el empleo del programa *Quantity One*, versión 4.5 (BioRad).
 10. La membrana se incubó en tampón de bloqueo durante 30 minutos y agitación para evitar la unión inespecífica de anticuerpos a la membrana.
 11. Se añadió el anticuerpo primario a la dilución de trabajo en medio de bloqueo y la membrana se incubó a 4°C y agitación toda la noche.

12. Se realizaron 3 lavados rápidos de la membrana y 3 de 10 minutos en agitación en PBS-tween o TBS-tween.
13. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa) en medio de bloqueo, durante 30 minutos, a temperatura ambiente y agitación.
14. Se repitió el paso 12.
15. Se preparó la solución de revelado, mezclando los dos reactivos del producto comercial *Lumilight Plus* (Roche) a partes iguales y añadiendo la mezcla sobre la membrana. Se incubó durante 5 minutos, manteniendo la membrana completamente cubierta por la solución de revelado.
16. Se eliminó el exceso de reactivos y la membrana se depositó dentro de un *cassette* de revelado (Amersham Biosciences), envuelta por un plástico fino y transparente, eliminando las burbujas.
17. Ya en la habitación de revelado, bajo luz roja, se recortó un trozo de película para quimioluminiscencia (*Hyperfilm ECL*, Amersham Biosciences) y se expuso a la membrana de PVDF, durante el tiempo necesario para visualizar las bandas correspondientes.
18. El revelado de la película se realizó de forma automática en el aparato *Curix 60* (Agfa), utilizando el fijador y el revelador comerciales (Agfa).
19. La captura final de la imagen se realizó en un transiluminador, mediante el empleo del programa *Quantity One*, versión 4.5 (BioRad).

Este protocolo se realizó primero para ver la expresión de ADARB1 y de PTB. Posteriormente, sobre las membranas ya utilizadas, se realizó un revelado adicional para las proteínas que se consideraron controles endógenos: β -actina para extractos totales, β -tubulina para extractos citoplasmáticos y lamina A/C para extractos nucleares. Las membranas se lavaron varias veces en PBS-tween o TBS-tween y se siguió el protocolo desde el paso 11, usando los anticuerpos correspondientes y sin necesidad de realizar *stripping*, ya que los tamaños de las distintas proteínas en estudio no se solaparon.

En las **Tablas 9** y **10** se resumen las características de todos los anticuerpos (primarios y secundarios) empleados en el estudio de la expresión de ADARB1 y de PTB mediante *western blot*. Todos ellos son de la clase IgG.

Diana	Nombre	Casa comercial	Origen	Clonalidad	Dilución	Epítipo	PM (kDa)
ADARB1	E-20	Santa Cruz Biotechnology	Cabra	Policlonal	1:1000	Región N-terminal	77/81
ADARB1	H-90	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	Policlonal	1:500	Aminoácidos 281-370	77/81
β -actina	A 5441	Sigma	Ratón	Monoclonal (clon AC-15)	1:5000	KGSGNDIV LAAIDDD	42
β -tubulina	H-235	Santa Cruz Biotechnology	Conejo	Policlonal	1:200	Aminoácidos 210-444	55
Lamina A/C	#2032	Cell Signaling	Conejo	Policlonal	1:1000	Aminoácidos alrededor de Asp230	70
PTB	#NA63	Calbiochem	Ratón	Monoclonal (clon SH-54)	1:1000	No facilitado por la casa comercial	57/60

Tabla 9. Características de los anticuerpos primarios utilizados en la técnica de *western blot*. Se indica la proteína diana, el código y la casa comercial correspondiente, el origen animal de todos ellos, su clonalidad, la dilución de trabajo, los epítipos diana y el peso molecular de la proteína detectada. Para el caso de la proteína de ADARB1 se indican los pesos moleculares de las isoformas sin los aminoácidos del exón 6 (77 kDa) y con estos aminoácidos (81kDa). En cuanto a PTB, se indican los pesos moleculares de las isoformas sin y con los aminoácidos del exón 9 (57 y 60 kDa, respectivamente).

Diana	Nombre	Casa comercial	Origen	Dilución
IgG de conejo	NA 934	Amersham Biosciences	Burro	1:10000
IgG de cabra	A 5420	Sigma	Conejo	1:25000
IgG de ratón	NA 931	Amersham Biosciences	Oveja	1:10000

Tabla 10. Características de los anticuerpos secundarios utilizados en la técnica de *western blot*. Se indica el anticuerpo diana, el código y la casa comercial correspondiente, el origen animal de cada uno y la dilución de trabajo. Los tres anticuerpos señalados son policlonales y todos ellos están conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*).

5. Estudio de la expresión de GluR-B en líneas celulares de pulmón

Se realizó un *screening* de la expresión de este gen, cuyo mRNA es diana molecular de la acción de ADARB1, en el mismo panel de líneas celulares de pulmón descrito con anterioridad (**Tabla 5**).

Partiendo de los mismos cDNA obtenidos previamente (**apartado 3.3**), se realizó una RT-PCR convencional de 30 ciclos, con los mismos reactivos y en las mismas condiciones que las descritas en el **apartado 3.5**. La única diferencia estribó en los cebadores empleados para llevar a cabo la amplificación. En concreto, los cebadores (diseñados por medio de *Primer3*) fueron:

S: 5' GGAGGTGTGTGGTGGTTCTT 3' (posición*: 2326-2345)

AS: 5' TTGGACTTCCGCACTCTAGC 3' (posición*: 2593-2612)

* El número de acceso que se utilizó, respecto a cuya secuencia están indicadas las posiciones relativas de los cebadores del gen, fue gi: 134304849.

Tras la realización de la PCR, se corrió un gel y se visualizaron las bandas de igual forma a la descrita en el **apartado 3.5**.

6. Estudio de la expresión de isoformas de ADARB1

6.1. Isoformas con / sin el exón 6

Para el caso de las isoformas con el exón 6 y sin él, se realizó una RT-PCR convencional en líneas celulares de pulmón, que amplificara una región de cDNA donde se encuentra dicho exón.

La metodología seguida, tanto para la PCR como para la visualización de las bandas, fue la misma que en el **apartado 3.5**, si bien el número de ciclos para la PCR fue de 35, la temperatura de hibridación de 56°C y los cebadores utilizados los siguientes:

S: 5' GGTCCTGGGTAAGTTTGGTGAC 3' (posición*: 1403-1424).

AS: 5' GCTTGTGAGGGTGTAGAGAGGT 3' (posición*: 2246-2268).

* El número de acceso utilizado para ADARB1, respecto a cuya secuencia se indican las posiciones relativas de los cebadores, fue gi: 75709170.

6.2. Isoformas con / sin inclusión de un fragmento del intrón 1

En cuanto a las isoformas con inclusión de un fragmento de 47 nt del intrón 1, consecuencia de la auto-edición del mRNA de ADARB1, se realizó una RT-PCR convencional en líneas celulares, de idéntica forma a la descrita en el **apartado 3.5** pero con 40 ciclos. Los cebadores que se emplearon en esta ocasión fueron:

S: 5' AACAGTCTCCGCCAGTCAAG 3' (posición*: 372-391).

AS: 5' AGTCTGGGACAGGAGTGTGTA 3' (posición*: 694-716).

* El número de acceso utilizado para ADARB1, respecto a cuya secuencia se indican las posiciones relativas de los cebadores, fue gi: 75709170.

Para ambas RT-PCR, los cebadores habían sido diseñados también con la ayuda de la aplicación *Primer3* (**apartado 3.4**).

7. Estudio de alteraciones genéticas

7.1. Extracción de DNA genómico (gDNA)

Las **líneas celulares con crecimiento adherente** se sembraron en placas de 10 cm de diámetro. Tanto si habían sido tratadas como si no, fueron incubadas hasta que alcanzaron una confluencia del 80-85%. La extracción de gDNA se realizó a temperatura ambiente siguiendo las indicaciones del producto *QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen):

1. Se desechó el medio de cultivo y se añadieron 5 ml de PBS a cada placa.
2. Tras lavar las células, se eliminó el PBS y se volvió a añadir 1 ml de PBS.
3. Con un rascador, se levantaron las células y se pasaron a un tubo limpio.
4. Las células se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante.
5. El sedimento celular se resuspendió en 200 µl de PBS.
6. Se añadieron 20 µl (12 unidades) de proteinasa K a 600 U/ml (Qiagen) y 200 µl de tampón AL.
7. Se agitó por vórtex durante 15 segundos y se incubó 10 minutos a 56°C.
8. Se añadieron 200 µl de etanol 99% (v/v) y se agitó en vórtex 15 segundos.
9. La mezcla se pasó a una columna de purificación y se centrifugó a 6.000 g durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante.
10. Se añadieron 500 µl de tampón AW1 y se centrifugó la columna 1 minuto a 6.000 g, desechándose el sobrenadante.
11. Se añadieron 500 µl de tampón AW2 y se centrifugó la columna 3 minutos a 15.000 g, desechándose el sobrenadante.
12. Se centrifugó de nuevo la columna a 15.000 g durante 1 minuto, para eliminar restos de impurezas.
13. La columna se puso en un tubo limpio y sobre la membrana se añadieron 200 µl de tampón AE, se incubó 1 minuto y se eluyó el gDNA mediante centrifugación durante 1 minuto a 6.000 g.

Las **células con crecimiento en suspensión** se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar. Sobre el sedimento celular se realizó desde este paso el mismo protocolo que en el caso anterior.

Para las **muestras clínicas pulmonares** se empleó el mismo producto de extracción que en el caso anterior. Los primeros pasos (cortar un trozo de tumor, pesarlo y fragmentarlo), fueron iguales a los descritos para la extracción de RNA a partir de tejido (**apartado 3.1**), sustituyendo el tampón RLT por ATL. Usando el sobrenadante de la centrifugación tras este paso, se continuó con el paso 6 del protocolo de extracción de gDNA para células adherentes, que se acaba de explicar.

Los gDNA resultantes de la purificación se conservaron a -20°C hasta su uso.

7.2. Cuantificación de gDNA

La cantidad de gDNA obtenido se determinó de igual forma a la descrita en el **apartado 3.2** para el RNA. La diferencia radicó en que se utilizó como blanco el tampón AE.

7.3. Búsqueda de mutaciones en el gen de ADARB1

Como material de partida, se tomó gDNA de todas las líneas celulares, obtenido según el protocolo del **apartado 7.1**.

Se realizaron PCR convencionales para amplificar completamente cada uno de los 10 exones del gen de ADARB1. Para el exón 2, debido a su gran longitud, se utilizaron 2 PCR, con parejas de cebadores diferentes. Así, para todos los casos los cebadores empleados fueron de localización intrónica (salvo el antisentido de la primera parte del exón 2 y el sentido de la segunda parte) y sus características se detallan en la **Tabla 11**. Fueron diseñados por medio de *Primer3*, con criterios más flexibles que en casos anteriores, debido a que la localización intrónica de los cebadores reducía el número de parejas con una calidad aceptable.

Se hizo previamente una puesta a punto para elegir la T^a de hibridación idónea para cada una de las parejas de cebadores. En concreto, se utilizó gDNA procedente de linfocitos normales, donados por personas sanas. Para cada una de las parejas de cebadores, se llevaron a cabo 12 reacciones de PCR en el termociclador *DNA Engine Tetrad® 2 Peltier Thermal Cycler* (BioRad), que sometió las muestras a un gradiente de temperaturas de hibridación (48, 48.4, 49.3, 50.5, 52.2, 54.4, 56.9, 59, 60.7, 61.8, 62.7 y 63°C). Tras correr las muestras en geles de agarosa, se eligieron las temperaturas adecuadas para cada pareja de cebadores, en función de la cantidad y nitidez de las bandas que se visualizaron.

Tanto en la puesta a punto como en la realización de las PCR con los gDNA de las líneas, los reactivos, cantidades y programas de amplificación fueron los descritos en el apartado 3.5, con las siguientes diferencias:

- Temperaturas de hibridación de algunas parejas de cebadores: 60 °C.
- Material de partida: 100 ng de gDNA de líneas celulares.
- Ciclos en las PCR: 40.

Exón	Longitud (pb)	Cebadores (secuencia 5'→3')	Th (°C)	Longitud amplicón (pb)
1	28	S: ggaatgtgccaaggaggagta	55	361
		AS: acaatccccacactggctc		
2	935	1/2 S: gttactctttctgggcaccac	60	603
		AS: GCTGGAACTGAAGGAGTCATC		
		2/2 S: AGGTTTTTGAGGGCTCTGGTC	55	761
		AS: caagcagccagactaccagt		
3	115	S: acctgtgtggtctccagatgag	55	351
		AS: taaccatctcccgtcgggtg		
4	169	S: aagtctgttggccctgaa	55	435
		AS: tgggatgcagccttattg		
5	149	S: ccttgaggaaaataactagcctctg	55	553
		AS: tggaggatcacatacacctctg		
6	120	S: ggcaaacaccaagtatcc	55	500
		AS: aagctgagaggctgggtatg		
7	169	S: ccagcctctcagcttcacatac	55	504
		AS: gcacctgtttagaacctcagtcc		
8	182	S: gttgcactccttcgtcagttg	55	472
		AS: gagagcctcagaaacatcacc		
9	179	S: cagatgcacgctcaagtctg	55	511
		AS: ggacgtagccacacttctaagc		
10	180	S: cttcctctggggttgettcc	60	332
		AS: TATAGGAATTGACACCCCCATCATGTCTGCCCG		

Tabla 11. Características de los cebadores utilizados en la búsqueda de mutaciones en el gen de ADARB1. Se indican, para cada uno de los 10 exones, su longitud en pares de bases (pb), las secuencias de los cebadores, las temperaturas de hibridación (Th) óptimas para las PCR y la longitud de los amplicones. Los cebadores en letras minúsculas indican localización intrónica, (intrones -1 y 1 para el exón 1; intrones 2 y 3 para el exón 3; etc.), mientras que las mayúsculas indican localización exónica; el cebador en letras cursivas se posiciona sobre parte del exón 10 que no se traduce. 1/2: Primera parte del exón 2; 2/2: Segunda parte del exón 2.

Una vez realizadas todas las PCR, las muestras se corrieron en geles de agarosa para comprobar que se había producido correctamente la amplificación en cada caso.

Posteriormente, los productos de PCR se llevaron a la Unidad de Secuenciación del CIMA, donde se secuenciaron usando *BigDye® Terminator 3.1* (Applied Biosystems), mediante electroforesis capilar en el aparato *3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). La purificación consistió en un protocolo manual con etanol y acetato sódico 3M. La reacción purificada se resuspendió en formamida desionizada.

Cada producto de amplificación fue secuenciado en los dos sentidos, usando los mismos dos cebadores que en las respectivas PCR. Las secuencias obtenidas se visualizaron mediante el programa *Chromas Lite 2.01* (Technelysium) y se compararon, mediante la aplicación *blast* de la página del *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con las correspondientes de cada exón en la secuencia del número de acceso gi: 75709170.

7.4. Análisis de la pérdida de heterocigosidad

7.4.1. Estudio de microsatélites en la región cromosómica 21q22.3

Los **microsatélites** son regiones de DNA que presentan repeticiones de secuencias cortas (2-4 nucleótidos), un número variable de veces. Cada número distinto de repeticiones se considera un alelo diferente. De esta forma, nos podemos encontrar con gran variedad de alelos para cada microsatélite, de forma que la probabilidad de que una célula sea heterocigota para uno de ellos (distinto número de repeticiones en cada cromosoma) es alta. Esto se aprovecha para realizar estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *loss of heterocosity*), ya que se pueden ver pérdidas de material genético entre muestras en las que se pasa de detectar dos alelos a sólo uno. Se procedió a realizar un estudio de microsatélites en las muestras, tanto en las tumorales como en las normales, con objeto de conocer si se producía LOH en 21q22.3. Para ello, se eligieron 10 microsatélites, cuyas características se resumen en la **Tabla 12**, en esta región. Se escogieron aquellos que poseen los valores más altos de máxima heterocigosidad, para que resultara informativo el mayor número de casos. Se consultaron las páginas *web* www.ensembl.org, www.ncbi.nlm.nih.gov y www.cephb.fr para realizar la selección de estos microsatélites, así como para la elección de las parejas de cebadores.

Microsatélite	Cebadores (secuencia 5'→3')	Tamaño (pb)	Th (°C)	Tipo de repetición	Máxima heterocigosidad
D21S1235	S: ctttcatgtgtgtctacggat	102-134	58	Dinucleótidos	0,78
	AS: ggctactctctgcccagat				
D21S1224	S: gaaggagctatacccggact	140-154	55	Dinucleótidos	0,83
	AS: gctagtagctaccatattgg				
D21S1225	S: agaagtgcctggattcagc	203-225	60	Dinucleótidos	0,69
	AS: aggttttacaataagcaga				
D21S1411	S: atgatgaatgcatagatggat	266-314	58	Tetranucleótidos	0,93
	AS: aatgtgtgtcctccaggc				
D21S1890	S: ggtctgaccacagatttcc	144-172	60	Dinucleótidos	0,88
	AS: aaaaacactctgaacgatta				
D21S1259	S: gggactgtaataaatattctgtt	202-224	53	Dinucleótidos	0,67
	AS: cactggctctctgacc				
D21S1912	S: ccctcatacagatttaaacac	172-202	55	Dinucleótidos	0,80
	AS: gagcccacctggaac				
D21S171	S: taggcctactgcaataatg	106-124	55	Dinucleótidos	0,80
	AS: ctttatcttcacacagcttc				
D21S1574	S: gaagactgcttgagcacagg	168-182	62	Dinucleótidos	0,78
	AS: tgcattctggtgtaaacc				
D21S1446	S: atgtacgatacgttaacttga	203-227	55	Tetranucleótidos	0,78
	AS: gtcccaaaggactgctc				

Tabla 12. Características de los microsatélites analizados en el estudio de la región cromosómica 21q22.3. Se muestran los nombres de los microsatélites (ordenados según su ubicación cromosómica: desde el más centromérico hacia el más telomérico), las secuencias de los cebadores empleados en las PCR, el tamaño de los productos de amplificación en pares de bases (pb), la temperatura de hibridación (Th) utilizada, el tipo de repetición de nucleótidos y la máxima heterocigosidad. S: Cebador sentido; AS: Cebador antisentido.

En primer lugar, se puso a punto la técnica. Por cada pareja de cebadores a probar, se realizaron 12 PCR. En cada uno de los pocillos se probó diferente temperatura de hibridación, en el termociclador *DNA Engine Tetrad® 2 Peltier Thermal Cycler* (BioRad). Es decir, se sometieron las muestras a un gradiente de temperaturas de hibridación, igual que el descrito en el **apartado 7.3**.

Las PCR se llevaron a cabo en placas de poliestireno de 96 pocillos (Becton Dickinson) y los reactivos y cantidades que se añadieron en cada reacción fueron:

- 20 ng de gDNA de linfocitos normales.
- 1 μ l de Tampón 10 X (Bioline).
- 0.3 μ l de $MgCl_2$ a 50 mM (Bioline).
- 0.2 μ l de dNTPs a 10 mM (Bioline).
- 0.2 μ l del cebador sentido (marcado con el fluorocromo 6-FAM (6-carboxi-fluoresceína)) y 0.2 μ l del cebador antisentido (ambos de Sigma y a concentración de 10 μ M).
- 0.5 μ l de DMSO (Sigma).
- 0.08 μ l (0.4 unidades) de Biotaq DNA polimerasa a 5 U / μ l (Bioline).
- Agua ultrapura hasta 8 μ l de volumen final.

En el mismo termociclador, se llevaron a cabo las PCR, mediante el programa:

- | | | |
|-----------------------|---------------------------|-------------|
| • 10 minutos a 95°C | Desnaturalización inicial | } 40 ciclos |
| • 30 segundos a 95°C | Desnaturalización | |
| • 30 segundos a la Th | Hibridación | |
| • 45 segundos a 72°C | Extensión | |
| • 10 minutos a 72°C | Extensión final | |

Se corrieron las muestras en un gel de agarosa y se eligieron las dos ó tres Th más apropiadas, según la especificidad de la PCR y la nitidez de las bandas. Posteriormente, se hizo una dilución 1:10 de las muestras elegidas en agua ultrapura y, a partir de estas diluciones, se tomó 1 μ l y se añadieron 20 μ l de formamida (Applied Biosystems) y 0.2 μ l de marcador de peso molecular *GeneScanTM-500 LIZ[®] Size Standard* (Applied biosystems). Por último, se llevaron a la Unidad de Secuenciación del CIMA, donde se separaron por tamaño los distintos productos de amplificación, mediante electroforesis capilar en el aparato *3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

El análisis de los datos en el programa *Gene Mapper Software 3.7* (Applied Biosystems) sirvió para elegir definitivamente la Th más conveniente a cada pareja de cebadores.

Posteriormente, se realizó el estudio de los microsatélites en todas las muestras de interés. Se llevaron a cabo los mismos pasos que se acaban de describir (idénticos reactivos, cantidades y protocolo), utilizando para cada microsatélite la Th adecuada.

7.4.2. Estudio del polimorfismo rs1051367 (A/G) de ADARB1

Se analizó si se producía LOH de forma más específica en el locus de ADARB1. Para ello, se eligió como objeto de análisis un polimorfismo de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) localizado al final de la secuencia codificante de ADARB1: **rs1051367**. Este SNP puede presentar dos alelos posibles, G y A, con frecuencias poblacionales prácticamente idénticas en raza caucásica y bastante equilibradas en otras razas (**Tabla 13**). De igual forma que antes, se buscó obtener el mayor número de casos informativos.

Se realizó una PCR convencional con el gDNA de líneas celulares y de pacientes (muestras normales y tumorales) y se corrieron los productos de PCR en geles de agarosa para comprobar que se había producido reacción y que el amplicón tenía el tamaño correcto de acuerdo a los cebadores diseñados en *Primer3*. Después se llevó a cabo la secuenciación de las muestras para determinar el nucleótido en la posición de estudio.

Raza	Alelo A	Alelo G
Africanos	0.48	0.52
Caucásicos	0.47	0.53
Chinos	0.53	0.47
Europeos	0.62	0.38
Japoneses	0.50	0.50

Tabla 13. Frecuencias poblacionales de los dos alelos posibles del SNP rs1051367 (A/G) de ADARB1 en distintas razas humanas. Fuente: www.ensembl.org

En cada tubo se realizaron las PCR a partir de 100 ng de gDNA. Los cebadores empleados fueron:

Sentido (intrónico): 5' cttcctctgggttgetttc 3'

Antisentido (exón 10): 5' TCAGGGCGTGAGTGAGAA 3'

El número de ciclos de la PCR fue 30 y el resto de las condiciones de la reacción fueron las mismas que en el **apartado 3.5**.

Todas las muestras fueron secuenciadas en los dos sentidos, empleando los dos cebadores de la PCR y de la misma forma a la descrita en el apartado 7.3, así como el análisis posterior de los datos.

7.4.3. Estudio de otros SNPs que flanquean el locus de ADARB1

Por diferentes motivos que se describen en el apartado correspondiente del bloque de Resultados, se analizó la posible LOH en algunas muestras clínicas, mediante el estudio de otros SNP adicionales (Tabla 14). Estos polimorfismos flanquean el locus de ADARB1 y se sitúan entre el SNP rs1051367 (dentro de la secuencia codificante del gen) y los dos microsatélites más próximos al gen, de entre los estudiados previamente. Mediante la página web www.ncbi.nlm.nih.gov, se buscaron aquellos SNP con una heterocigosidad media lo más alta posible, entre todos los grupos étnicos humanos en su conjunto.

SNP	Alelos y frecuencia poblacional*	Cebadores (5' → 3')	Th (°C)	Longitud amplicón (pb)
rs2072702	C: 0.56	S: gacagaagtcctgtgga	61	407
	T: 0.44	AS: acaaagtgctgagagga		
rs760459	A: 0.26	S: aattctgtctgctgctgctg	61	332
	T: 0.74	AS: gccaacctaaggaagggtct		
rs2838762	A: 0.39	S: tgatgatggccactttcac	57	266
	C: 0.61	AS: gcgctctgctgaatctcc		
rs2838768	G: 0.60	S: caggaagggggttcacagat	61	309
	T: 0.40	AS: aatggcatgacctgtgact		
rs2838821	G: 0.64	S: gagcatgagacgctgtcaaa	61	300
	T: 0.36	AS: atctaacaggggtggggact		
rs914210	A: 0.58	S: caggtgctaagtccacat	61	211
	G: 0.42	AS: ccactcaaatcccatgtcc		
rs9985044	C: 0.31	S: ctggttctctgtgatgctgac	61	365
	T: 0.69	AS: caccctctctctctctct		
rs2297291	A: 0.40	S: tcagaggatcaggactaacc	61	533
	G: 0.60	AS: agagcaggaagtgagagagac		

Tabla 14. Características de los SNP estudiados que flanquean a ADARB1. Para cada uno de ellos (ordenados desde el más centromérico hacia el más telomérico) se muestran sus dos posibles alelos y la frecuencia poblacional de éstos. *Se señalan las frecuencias poblacionales de individuos caucásicos (HapMap-CEU), excepto en el caso del SNP rs2072702, que corresponden a una población japonesa (JBIC-allele). Asimismo, aparecen los cebadores utilizados para realizar las PCR, sus Th y la longitud de los productos de amplificación. S: Cebador sentido; AS: Cebador antisentido.

De idéntica forma a la descrita en otros apartados, se realizó una puesta a punto de los cebadores diseñados en *Primer3*. Para ello, se utilizaron 100 ng de gDNA de la línea celular HTB-58 (heterocigota para casi todos los microsatélites estudiados), con los mismos reactivos, cantidades y condiciones de la PCR que en el **apartado 7.4.2**. Se usó un gradiente de Th en el termociclador *Peltier Thermal Cyclor-200* (MJ Research) para elegir la temperatura más adecuada de cada pareja de cebadores, tras correr geles de agarosa con los productos de amplificación.

Posteriormente, se realizaron las PCR con los gDNA de las muestras de interés, así como la secuenciación posterior de todas las muestras, en las mismas condiciones que las descritas en el **apartado 7.4.2**.

8. Estudio de alteraciones epigenéticas

En primer lugar, el estudio se centró en el gen de ADARB1, para luego extenderlo hacia otros genes en sus inmediaciones (en las regiones 21q22.3 y 21q22.2).

Se analizó el estado epigenético del promotor de estos genes mediante PCR específica de metilación (MSP). Para llevar a cabo esta técnica, se trata previamente el gDNA con bisulfito sódico. Este reactivo transforma los nucleótidos de citosina sin metilar en nucleótidos de timidina, no afectando a los nucleótidos de citosina metilados, normalmente ubicados en el contexto de islas CpG (**Figura 5**).

Si se realiza una MSP utilizando cebadores específicos de secuencias (metiladas o sin metilar) que han sido tratadas con bisulfito, se obtiene un patrón de amplificación que nos dirá si el gDNA está metilado en la región que se está estudiando.

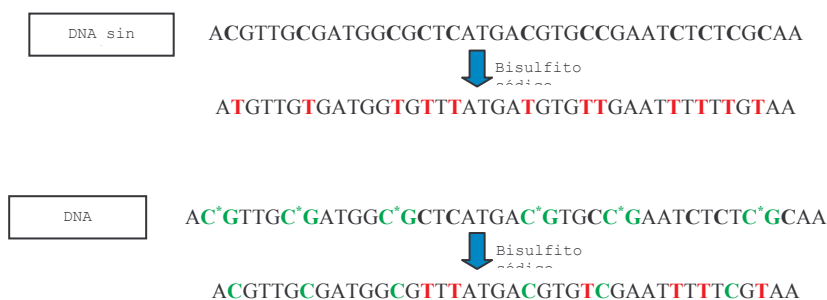


Figura 5. Mecanismo de acción del bisulfito sódico. Este reactivo ataca a los nucleótidos de citosina sin metilar (negrita), dando lugar a nucleótidos de timina (rojo). Por su parte, los nucleótidos de citosina metilados (asterisco), dentro de islas CpG (verde), permanecen sin alterar tras el tratamiento con bisulfito sódico. Diseñando cebadores específicos para cada uno de los dos casos mostrados (DNA sin metilar y DNA metilado, ambos después del tratamiento) se pueden realizar PCR y ver el estado de metilación de la región estudiada.

8.1. Diseño de cebadores

Mediante la aplicación informática *MethPrimer*, disponible en la página web <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>, se diseñaron cebadores específicos para las secuencias metilada y sin metilar (y tratadas con bisulfito sódico) de los promotores de los genes estudiados. Las secuencias utilizadas en la aplicación informática fueron aquellas que se localizan en regiones donde, por su elevada presencia de islas CpG, se esperan encontrar los promotores de cada gen. En el **Anexo III** se resumen las características de todas las regiones utilizadas para el diseño de cebadores en el estudio de estos genes.

Tras marcar las opciones *Pick MSP primers* y *Use CpG Island prediction*, las condiciones que se utilizaron para diseñar los cebadores fueron:

- 60% mínimo de islas CpG.
- Tamaño del amplicón: mínimo, 125 pb; óptimo, 200 pb; máximo, 300 pb.
- Número de islas CpG en los cebadores: 3.
- Máxima diferencia de Tm en los cebadores: 2°C. Si con este criterio no salía ninguna combinación, se puso 5°C.
- Resto de condiciones por defecto.

Las dos parejas de cebadores de cada gen (una, específica de secuencia metilada; la otra, específica de secuencia no metilada) fueron sintetizadas por Sigma y se detallan en la **Tabla 15**.

8.2. Tratamiento del gDNA con bisulfito sódico

Todas las muestras objeto de este estudio fueron sometidas a tratamiento con bisulfito sódico, mediante el producto comercial *CpGenome™ DNA Modification Kit* (Chemicon International). Además de los gDNA de líneas celulares, se incluyeron como muestras dos controles: un control negativo, de gDNA sin metilar, procedente de linfocitos de sangre periférica y un control positivo comercial, *CpGenome™ Universal Methylated DNA* (Chemicon International), de gDNA totalmente metilado.

Gen	Cebadores (secuencia 5' → 3')			Th (°C)	Longitud amplicón (pb)
ERG	Met.	S	atagtcgttttgggagacgac	59	210
		AS	ctccgaaacgatcgtaacg		
	No Met.	S	atagttgttttgggagatgatg	59	210
		AS	ctccaaaacaatcataacaac		
ETS2	Met.	S	cgggtcgttatttgggtatc	59	101
		AS	gaatcgtactactaatcgcgct		
	No Met.	S	aggtgggtgttatttgggtatt	59	107
		AS	cccaaatcataactaatcacact		
ABCG1	Met.	S	tatgtcgtttgcgaggtttc	62	194
		AS	gactaaaatccgactccgac		
	No Met.	S	gttttatgtgtttgtgaggtttt	59	204
		AS	actccaactaaaatccaactcca		
SNF1LK	Met.	S	agtagtcgggtgtagcggtc	59	205
		AS	gaataaaaaataaaaaataaacgcgat		
	No Met.	S	agtagttgggtgtagtggtt	59	205
		AS	aaataaaaaataaaaaataaacacaat		
PDXK	Met.	S	cgcgttagagtttagagtcgtagtc	59	186
		AS	acgtaaccgcgaataacgta		
	No Met.	S	tgtgttagagtttagagttgtagttga	59	191
		AS	taccacataaccacaataacata		
PTTG1IP	Met.	S	agtttcgcggtcgttaaac	59	123
		AS	gaaatcgaatcgaatttcg		
	No Met.	S	ggtagttttgtggttgttaaatgg	59	128
		AS	tcaaatcaaatcaaatccaac		
ITGB2	Met.	S	ttaggcgcggttaggttttc	59	104
		AS	gcctacgccgaataaatagc		
	No Met.	S	ttaggtgtgttaggttttg	59	107
		AS	aatcacctacaccaataatacaaa		
ADARB1	Met.	S	tttcgtaaaacgtaaacgtaatc	59	243
		AS	aaaaaccgcgactaaacgac		
	No Met.	S	gttattttgtaaaatgtaaatgtaattg	55	252
		AS	aactaaaaaaccacaactaaacaac		

Tabla 15. Características de los cebadores utilizados en el estudio del estado de metilación de varios genes en 21q22. Para cada gen, se muestran las secuencias de los cebadores sentido (S) y antisentido (AS), específicos de secuencias metiladas (Met.) y no metiladas (No Met.), sus temperaturas de hibridación (Th) óptimas y las longitudes de los productos de amplificación, en pares de bases (pb). Los genes se encuentran ordenados desde el más centromérico hacia el más telomérico.

Se prepararon los reactivos correspondientes, de manera que estuvieran recién hechos antes de la realización del protocolo.

- Solución 3M NaOH (Sigma).
- Solución de reactivo I. Por cada muestra, se prepararon 0.227 g del reactivo I comercial en 0.571 ml de agua y se ajustó a pH = 5 (con papel indicador), mediante la adición de 20 μ l de solución NaOH 3M.
- Solución 20 mM NaOH/90% EtOH. Por cada ml de añadieron:
 - 900 μ l de etanol absoluto (Oppac).
 - 93.4 μ l de agua.
 - 6.6 μ l de solución NaOH 3M.
- Solución de reactivo II. Por cada muestra, se disolvieron 1.35 g del reactivo II comercial en 750 μ l de agua con β -mercaptoetanol (Sigma) al 0.005% (v/v).
- Etanol 70% (v/v) en agua.
- Etanol 90% (v/v) en agua.

El protocolo de tratamiento con bisulfito sódico consistió en las siguientes etapas:

1. En cada tubo de muestra, se puso 1 μ g de gDNA, 7 μ l de NaOH 3M y agua, hasta un volumen total de 100 μ l. Se mezcló por pipeteo.
2. Se incubó 10 minutos a 50°C (baño seco).
3. Se añadieron 550 μ l de solución de reactivo I a cada muestra y se agitó unos segundos mediante vórtex.
4. Las muestras, protegidas de la luz, se incubaron a 50°C en baño seco durante 17 horas.
5. Al día siguiente, se resuspendió el reactivo III comercial mediante vórtex.
6. Se añadieron 5 μ l de este reactivo a los tubos de muestras y se mezcló por pipeteo.
7. 750 μ l de solución de reactivo II se añadieron a cada muestra y se mezcló por inversión de los tubos.
8. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Se centrifugó 10 segundos a 5.000 g y temperatura ambiente, descartándose el sobrenadante.
10. Se lavó con 1 ml de etanol al 70%, mediante vórtex 15 segundos y centrifugación a 5.000 g y temperatura ambiente por 10 segundos. El sobrenadante se desechó.

11. Se repitió 2 veces más el paso 10.
12. Se centrifugó 2 minutos a 15.000 g y los restos de sobrenadante se eliminaron con la pipeta.
13. El *pellet* se resuspendió añadiendo 50 μ l de solución 20 mM NaOH/90% EtOH y mezclando por pipeteo.
14. Se incubaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente.
15. Se centrifugó 10 segundos a 5.000 g.
16. Se lavaron las muestras mediante adición de 1 ml de EtOH 90%, vórtex 15 segundos y centrifugación 10 segundos a 5.000 g. El sobrenadante se eliminó.
17. Se repitió el paso anterior.
18. Los tubos se centrifugaron 3 minutos a 15.000 g y los restos de sobrenadante se eliminaron con la pipeta.
19. Se añadieron 25 μ l de tampón TE (Marligen Biosciences), se resuspendieron las muestras por pipeteo y se incubaron 15 minutos a 55°C en baño seco.
20. Se centrifugó 3 minutos a 15.000 g y el sobrenadante se recogió en tubos limpios.
21. El gDNA tratado y purificado se conservó a -20°C hasta su uso.

8.3. PCR específica de metilación (MSP)

A diferencia de la PCR clásica, en el primer ciclo de la MSP el cebador sentido diseñado no se empareja con la hebra molde de DNA que le corresponde y no se produce la extensión. Esto se debe a que el cebador sentido es en realidad complementario a la secuencia obtenida de la extensión desde el cebador antisentido a partir de la otra hebra molde.

La consecuencia es que en el primer ciclo sólo hay amplificación a partir de una de las dos hebras moldes del DNA y, por tanto, en ese primer ciclo no se duplican las moléculas de DNA de doble hebra. Después, cuando se genera la secuencia reconocida por el cebador sentido, sí se generan el doble de moléculas en cada ciclo, puesto que las dos hebras nuevas son reconocidas por los cebadores.

En primer lugar, se pusieron a punto los cebadores, para comprobar si funcionaban y para conseguir la T_m idónea. En el termociclador *Peltier Thermal Cycler-200* (MJ Research) se realizaron 12 PCR por cada pareja de cebadores, aplicando un gradiente de T_m idéntico al descrito en apartados anteriores. Para probar los cebadores específicos de secuencias metiladas, se utilizó el gDNA metilado comercial tratado con bisulfito,

mientras que para los cebadores específicos de secuencias sin metilar se usó gDNA de linfocitos de sangre periférica, también tratado con bisulfito. Así, se pusieron 16 tandas de MSP con gradiente de temperatura: 8 para un tipo de cebadores (una por cada gen) y 8 para el otro tipo (una por gen). En cada tubo de reacción, se añadieron:

- 3 μl de gDNA tratado con bisulfito sódico.
- 2.5 μl de tampón 10 X (Applied Biosystems).
- 1.5 μl de MgCl_2 a 25 mM (Applied Biosystems).
- 1 μl de dNTPs a 10 mM (Bioline).
- 1 μl de cada cebador a 50 μM .
- 0.25 μl (1.25 unidades) de *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase* (5 U/ μl) (Applied Biosystems).
- Agua ultrapura, hasta un volumen total de 25 μl .

El programa utilizado para las amplificaciones se resume en los siguientes pasos:

- | | | |
|---------------------|---------------------------|-------------|
| • 10 minutos a 94°C | Desnaturalización inicial | } 40 ciclos |
| • 1 minuto a 94°C | Desnaturalización | |
| • 1 minuto a la Th | Hibridación | |
| • 1 minuto a 72°C | Extensión | |
| • 10 minutos a 72°C | Extensión final | |

Después, los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa y se visualizaron con luz ultravioleta, escogiendo la Th más adecuada para cada cebador, según la especificidad y nitidez de las bandas.

Posteriormente, se realizaron las MSP para todas las líneas celulares de pulmón contempladas en la **Tabla 5**, utilizando las parejas de cebadores para secuencias metiladas correspondientes a los 8 genes estudiados. Los reactivos, cantidades y condiciones de la MSP fueron los mismos que para la puesta a punto, sustituyendo los gDNA por los de las muestras a analizar y empleando la Th óptima seleccionada con anterioridad (**Tabla 15**). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para los genes que presentaron metilación en un elevado porcentaje de líneas celulares, se repitió la MSP utilizando como muestras gDNA procedente de células normales NHBE y SAEC.

Por último, se llevó a cabo MSP para las líneas celulares, NHBE y SAEC, utilizando los cebadores específicos de secuencia no metilada, correspondientes al gen ERG, de igual forma que las demás.

Para todas las MSP realizadas, se interpretaron en los geles de agarosa los patrones de bandas obtenidos en cada caso, para determinar el estado de metilación de los promotores de los genes estudiados en cada una de las muestras.

8.4. Estudio de la expresión de ERG en líneas celulares

Se analizó la expresión basal del gen **ERG** en el panel de líneas celulares de la **Tabla 5**. Los reactivos y cantidades fueron los mismos que los descritos en el **apartado 3.5**, con las siguientes diferencias:

- Cebadores utilizados:
 - Sentido: 5' CCAGCGACTATGGACAGACTT 3' (posición*: 406-426).
 - Antisentido: 5' GGAGAGTTCCTTGAGCCATTC 3' (posición*: 518-538).

* El número de acceso utilizado para ERG, respecto a cuya secuencia se indican las posiciones relativas de los cebadores, fue gi: 209954796.

- Número de ciclos: 35.

8.5. Reversión de la metilación: tratamiento con 5-Aza-2'-desoxicitidina

El tratamiento con 5-Aza-2'-desoxicitidina provoca la desmetilación o hemidesmetilación del DNA. De esta manera, el remodelado de la cromatina permite a los factores de transcripción unirse a las regiones promotoras, facilitando el ensamblaje del complejo transcripcional y, por tanto, la expresión génica, que estaba reprimida con la metilación.

Se preparó una solución de 5-Aza-2'-desoxicitidina (Sigma) a 10 mM en ácido acético 50% (v/v) y se realizó un tratamiento de las líneas celulares A549 y H441 de la siguiente forma:

1. De cada línea, se sembraron las células en 8 placas de 100 mm de diámetro y se incubaron en medio completo hasta una confluencia del 50%.
2. Se eliminó el medio de cultivo y se sustituyó por 10 ml de medio completo fresco.
3. A cuatro de las placas se le añadieron 4 µl de ácido acético 50%, a modo de control negativo. A las otras cuatro placas, se les añadieron 4 µl de la solución de 5-Aza-2'-desoxicitidina a 10 mM, por lo que la concentración del tratamiento en las placas fue de 4 µM.

4. Se incubaron las placas a 37°C, 5% CO₂ y 90% humedad relativa.
5. Al día siguiente del tratamiento, se extrajo RNA (**apartado 3.1**) y gDNA (**apartado 7.1**) en dos de las placas tratadas con ácido acético y en dos de las placas tratadas con 5-Aza-2'-desoxicitidina.
6. A los cuatro días del tratamiento, se repitió el paso 5.
7. Se cuantificaron los RNA y los gDNA, tal y como se describe en los **apartados 3.2** y **7.2**.
8. A partir 2 µg de RNA, se realizó la retro-transcripción de las muestras, de igual forma que en el **apartado 3.3**.
9. Con los cDNA obtenidos, se estudió la expresión del gen ERG en todas las muestras, mediante RT-PCR convencional (**apartado 8.4**).
10. Se trató con bisulfito sódico 1 µg de gDNA de cada muestra (**apartado 8.2**).
11. Con los gDNA tratados, se realizó MSP con cebadores específicos de secuencia metilada y sin metilar de ERG (**apartado 8.3**).
12. Todos los productos de PCR y MSP se sometieron a electroforesis en geles de agarosa, para visualizar tanto los niveles de expresión como el estado de metilación de ERG.

9. Sobre-expresión de ADARB1

Se generaron varias construcciones de DNA, formadas por un vector de expresión comercial y las distintas secuencias completas de cDNA de ADARB1. Posteriormente, se transfectaron algunas líneas celulares de pulmón, para que se produjera en ellas la sobre-expresión de ADARB1 y poder valorar los efectos en algunas funciones celulares.

9.1. Elección de las zonas de policlonaje en el vector pcDNA 3.1 (-)

Como plásmido en el que habría que insertar los cDNA para realizar las construcciones, se eligió el vector comercial pcDNA3.1 (-) (Invitrogen). Este vector presenta una zona de policlonaje en la que aparecen distintas secuencias reconocidas por diferentes enzimas de restricción (**Figuras 6** y **7**). Para saber qué dos zonas de restricción eran las más adecuadas para la inserción, se realizó un pequeño análisis de la secuencia completa del cDNA de ADARB1, incluidas las zonas UTR.

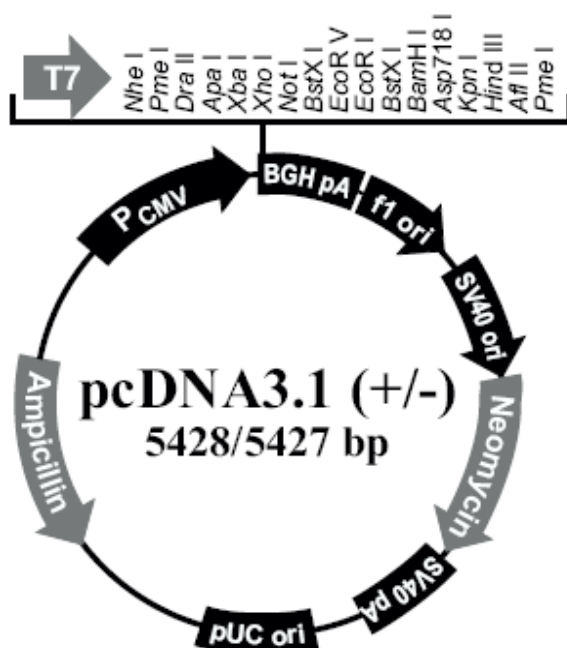


Figura 6. Características del vector pcDNA 3.1 (-) utilizado. Se muestra la zona de policlonaje y los componentes que lo integran, entre los que caben destacar el promotor de citomegalovirus (P_{CMV}) y los genes de resistencia a ampicilina y a neomicina. Fuente: Invitrogen.

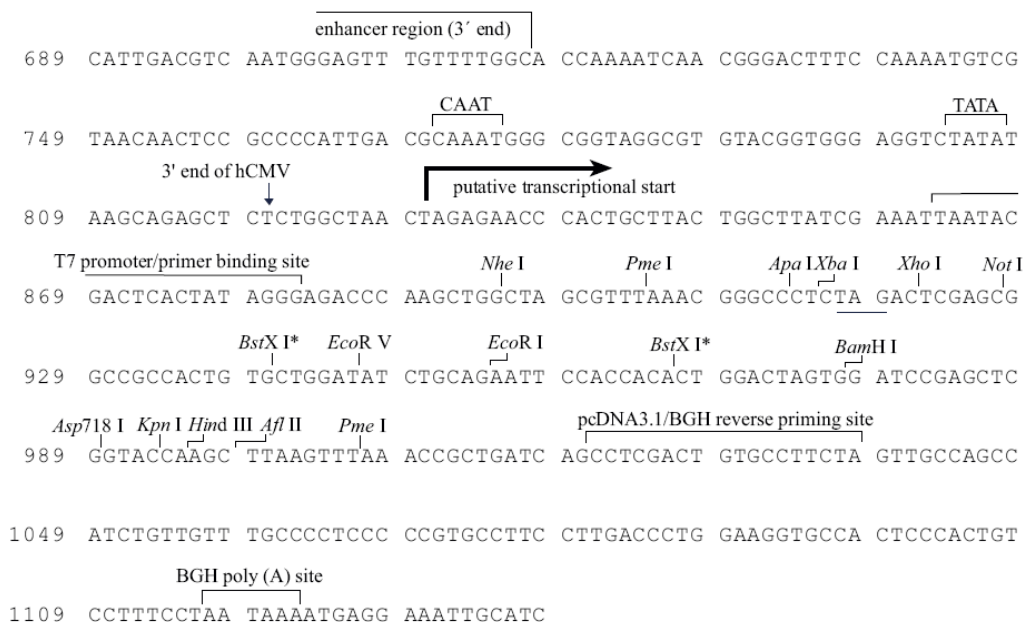


Figura 7. Posición de las secuencias de restricción de la zona del policlonaje en el vector pcDNA 3.1 (-) y de otros componentes del plásmido. Fuente: Invitrogen.

En la página *web* <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>, es posible rastrear qué enzimas de restricción reconocerían alguna zona de la secuencia diana. De esta forma, se descartaron aquellos puntos de policlonaje del vector que coincidían con enzimas que reconocían parte de la secuencia interna del cDNA de ADARB1. De entre todas las enzimas de restricción que no reconocieron ninguna secuencia en el cDNA y que estaban presentes en el sitio de policlonaje, se eligieron las más adecuadas, atendiendo a criterios de compatibilidad.

Así, se tuvo en cuenta que fueran dos enzimas distintas, que generaran extremos cohesivos incompatibles (para que no pudieran ligar entre sí) y cuyos tampones de trabajo fueran compatibles (para poder realizar una digestión doble simultáneamente). Tras realizar este análisis, se decidió utilizar como enzimas de restricción XbaI en el extremo 5' y EcoRI en el extremo 3'.

9.2. Digestión del vector pcDNA3.1 (-) con enzimas de restricción y purificación

Se digirieron 2 µg de vector mediante las enzimas de restricción seleccionadas. Así, en el tubo de reacción, se añadieron:

- 2 µg del vector.
- 20 unidades de enzima XbaI (New England Biolabs.) a 20 U/µl.
- 20 unidades de enzima EcoRI (New England Biolabs.) a 20 U/µl.
- 5 µl del tampón 2 (New England Biolabs.) 10X.
- 0.5 µl de BSA 100X (New England Biolabs.).
- Agua ultrapura, hasta un volumen final de 50 µl.

La muestra se incubó 2 horas, a 37°C en baño seco y posteriormente 20 minutos a 65°C, para inactivar las enzimas.

Los 50 µl de muestra se corrieron en un gel de agarosa al 1%, repartidos en 2 calles, en paralelo a una calle con 2 µg de vector sin digerir, como control. La electroforesis se realizó a 100 V durante 45 minutos. Tras este tiempo, se visualizó a través de luz UV la banda correspondiente al vector digerido y se comparó con la altura de la banda del vector sin digerir, para comprobar que la digestión se había producido (el vector sin digerir, circular, migra de forma más rápida que el vector linearizado tras la digestión).

A temperatura ambiente, se purificó la banda del vector digerido haciendo uso del producto comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen):

1. Se pesó un tubo vacío.
2. Con un bisturí, se cortó el trozo de gel que contenía la banda del vector digerido, gracias al uso del transiluminador TCP-20.M (Vilber Lourmat).
3. Se introdujo el trozo de gel en el tubo y se calculó su peso.
4. Por cada 100 mg de gel, se añadieron 300 μ l de tampón QG y se agitó mediante vórtex.
5. Se incubó 10 minutos a 50°C en baño seco, agitando en vórtex cada 2-3 minutos.
6. Cuando la agarosa estuvo completamente disuelta, se añadieron 100 μ l de isopropanol por cada 100 mg de gel recortado. Se agitó en vórtex.
7. La mezcla se depositó sobre la membrana de una columna de purificación..
8. Se centrifugó 1 minuto a 15.000 g y se eliminó el sobrenadante. Si el volumen de mezcla era mayor de 800 μ l, los pasos 7 y 8 se hicieron en varias tandas.
9. Se añadieron 500 μ l de tampón QG y se centrifugó 1 minuto a 15.000 g, descartándose el sobrenadante.
10. Se añadieron 750 μ l de tampón PE y se centrifugó 1 minuto a 15.000 g, descartándose el sobrenadante.
11. Se repitió la centrifugación del paso anterior.
12. La columna se pasó a un tubo limpio y, sobre la membrana, se añadieron 50 μ l de tampón de elución EB, incubándose 1 minuto.
13. Se centrifugó 1 minuto a 15.000 g.

Finalmente, se cuantificó el vector digerido obtenido, tal y como se describe en el **apartado 7.2** y se conservó a -20°C hasta su uso.

9.3. Clonado de la secuencia completa del cDNA de ADARB1

9.3.1. Diseño de cebadores

En esta ocasión, también se utilizó la aplicación informática *Primer3*. Sin embargo, los cebadores se diseñaron para que se produjera la amplificación de la secuencia completa del cDNA de ADARB1, por lo que éstos debían hibridar, total o parcialmente, con las regiones UTR de los transcritos. Se utilizó como secuencia la correspondiente al número de acceso gi: 75709170 y se mantuvieron para el diseño las mismas condiciones que las descritas en el **apartado 3.4**.

Una vez obtenidas las secuencias de los cebadores, se les añadió, en 5', los nucleótidos reconocidos por la enzima correspondiente, teniendo en cuenta que el

cebador sentido debe tener la secuencia de restricción que se encuentre antes en la secuencia de policlonaje del vector. De esta forma, al cebador sentido se le puso la secuencia reconocida por XbaI y al cebador antisentido, la reconocida por EcoRI. Seguidamente, más hacia 5' de las secuencias de restricción, se agregaron a los cebadores varios nucleótidos al azar, teniendo en cuenta que no originaran ninguna restricción adicional. Esta adición responde a la necesidad de las enzimas de reconocer las secuencias diana rodeadas de algunos nucleótidos inespecíficos para una mejor actividad catalítica.

Tras estos pasos, las secuencias de los cebadores empleados para el clonaje de ADARB1 fueron las siguientes:

Cebador sentido: 5' *ACGTATCTAGATGCCATGGATATAGAAGATGAAG* 3'

Cebador antisentido: 5' *TATAGGAATTTCGCACCCCCCATCATGTCTGCCCG* 3'

En cursiva, se indican los nucleótidos añadidos al azar; en negrita, las secuencias de restricción reconocidas (XbaI, en el cebador sentido; EcoRI, en el antisentido). El resto de nucleótidos hibridan parcial o totalmente con regiones UTR de los transcritos de ADARB1.

9.3.2. PCR convencional y purificado de las muestras

Para clonar las secuencias completas de los cDNA de ADARB1, se utilizó una polimerasa diferente, de alta fidelidad. Esto se debió a dos motivos: en primer lugar, se necesitaba que la secuencia de los millones de copias obtenidas de DNA fueran exactamente iguales a la original, puesto que luego había que realizar experimentos funcionales de sobre-expresión; en segundo lugar, la longitud de los productos de PCR (más de 2 kpb) hizo necesario que la enzima empleada fuera capaz de amplificar sin errores un fragmento relativamente grande de DNA. De esta forma, se utilizó la *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen).

Los cDNA empleados de ADARB1 correspondieron a la línea N417 y a células NHBE. La elección de estas células respondió a dos criterios:

- Ausencia de mutaciones (aspecto estudiado en el **apartado 7.3**) en las secuencias de cDNA, para que las proteínas producto fueran funcionalmente normales.
- Presencia de alelos diferentes en el SNP rs1051367 de ADARB1. NHBE presenta una G en esa posición, mientras que N417 presenta una A. Como se verá más adelante, se estudió si podía haber diferencias entre las

secuencias de DNA con uno u otro alelo. Para el caso de las proteínas, esta diferencia no tiene consecuencias, pues el cambio de nucleótido en esa posición no hace cambiar el aminoácido a incluir durante el proceso de traducción.

Se llevaron a cabo, por tanto, dos PCR distintas. En un tubo se puso cDNA de NHBE y en otro, de N417. Los reactivos y cantidades usados en estas dos PCR fueron:

- 1 μ l de cDNA.
- 0.2 μ l (1 unidad) de *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) a 5 U/ μ l.
- 5 μ l de tampón 10 X (Invitrogen).
- 2 μ l de MgSO₄ a 50 mM (Invitrogen).
- 1 μ l de dNTPs (Bioline) a 10 mM.
- 1 μ l de cada cebador a 10 μ M.
- Agua ultrapura, hasta un volumen total de 50 μ l.

La reacción de PCR realizada se desarrolló en los siguientes pasos:

- | | | |
|----------------------|---------------------------|-------------|
| • 2 minutos a 94°C | Desnaturalización inicial | } 35 ciclos |
| • 30 segundos a 94°C | Desnaturalización | |
| • 30 segundos a 55°C | Hibridación | |
| • 3 minutos a 68°C | Extensión | |
| • 10 minutos a 68°C | Extensión final | |

En un gel de agarosa, se corrieron los productos de amplificación repartidos en dos calles, en paralelo al marcador de alto peso molecular *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Tras comprobar la presencia, aparentemente, de una única banda a la altura correspondiente y, por tanto, la especificidad de la reacción, se dejó correr la electroforesis hasta que la banda de interés alcanzó el final del gel.

Al visualizar el gel a través de luz ultravioleta, se observó que la banda se había desdoblado en dos. Esto se debe a la presencia de las dos isoformas principales de transcritos de ADARB1, con y sin el exón 6 (120 pb), por lo que un producto de amplificación (mayoritario) tenía unos 2.2 Kpb y el otro (minoritario), unos 2.1 Kpb.

Seguidamente, se procedió a purificar del gel, tal y como se ha descrito en el **apartado 9.2**, las bandas de interés. Hubo cuatro situaciones:

- Banda de 2.2 kpb, de N417 (A en el SNP rs1051367).
- Banda de 2.1 kpb, de N417 (A en el SNP rs1051367).
- Banda de 2.2 kpb, de NHBE (G en el SNP rs1051367).
- Banda de 2.1 kpb, de NHBE (G en el SNP rs1051367).

4 μ l de cada producto purificado se corrieron en un gel de agarosa, en paralelo a 4 μ l del marcador de alto peso molecular, en otra calle del mismo gel. Por comparación de intensidades de bandas, se determinó la concentración aproximada de cada una de las secuencias purificadas. Los DNA se conservaron a -20°C hasta su uso.

9.4. Ligación en el vector pCR[®]II

Las secuencias de cDNA purificadas en el apartado anterior, se ligaron en el vector pCR[®]II, mediante el producto comercial *TA Cloning[®] Kit Dual Promoter* (ambos de Invitrogen). El mecanismo de ligación de este vector (**Figura 8**) se basa en el hecho de que la polimerasa responsable de la PCR tiende a dejar un nucleótido adicional de desoxiadenosina en el extremo 3' de cada hebra del producto de la PCR. El vector de este producto comercial se encuentra linearizado y, en el extremo 3' de cada una de las hebras, tiene un desoxinucleótido de timina desapareado, que se empareja con la desoxiadenosina adicional del producto de PCR, facilitando la ligación en el vector de lo que se considerará inserto a partir de ahora.

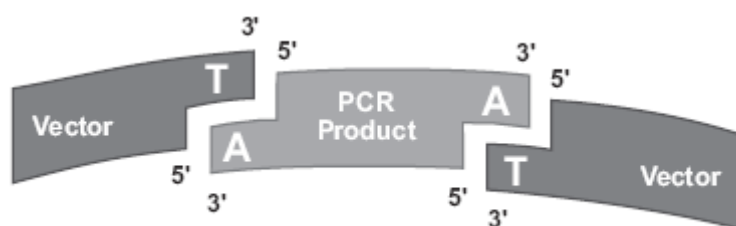


Figura 8. Mecanismo de ligación de los insertos en el vector pCR[®]II mediante el método *TA Cloning[®] Kit Dual Promoter*. Fuente: Invitrogen.

El vector pCR[®]II (**Figura 9**) consta de varios elementos, entre los que caben destacar los genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina, los promotores de Sp6 y de T7, el operón lactosa (*lac*), con el gen de la β -galactosidasa (*lacZa*) y su promotor y una región de policlonaje, situada entre el gen y el promotor.

Para cada una de las secuencias a insertar, se añadieron en los tubos de reacción las siguientes cantidades de reactivos (todas incluidas en el producto comercial del vector, salvo los insertos):

- 2 µl del vector pCR[®]II a 25 ng/µl.
- 25 ng del cDNA a insertar.
- 1 µl de tampón de ligación 10 X.
- 1 µl (1 unidad) de la ligasa *T4 DNA Ligase* a 1 U/ µl.
- Agua estéril, hasta 10 µl de volumen final.

Los tubos se incubaron a 14°C durante toda la noche.

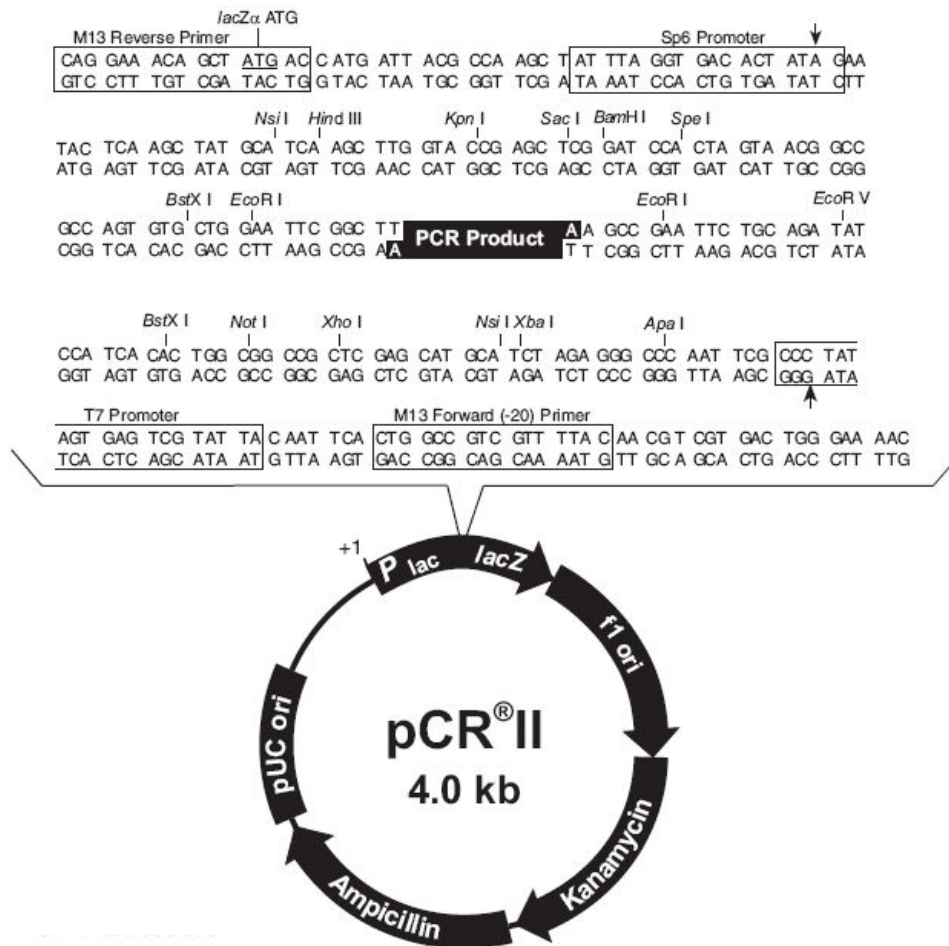


Figura 9. Características del vector comercial pCR[®]II, con los elementos que lo integran. Fuente: Invitrogen.

9.5. Transformación de células competentes

Al día siguiente, se transformaron bacterias competentes con los productos de la ligación, con objeto de conseguir millones de copias de las construcciones, de forma más efectiva y fidedigna que mediante PCR. Se utilizaron las E. coli del producto comercial *One Shot[®] TOP10F' Competent Cells* (Invitrogen).

Estas bacterias expresan de forma constitutiva el represor *lacI^q*, que reprime, en ausencia de otras sustancias, la transcripción del gen *lacZα* a nivel de su promotor. La presencia de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido), análogo de la galactosa pero no hidrolizable por la β-galactosidasa, induce la activación del operón *lac*, mediante unión al represor *lacI^q* y su posterior inactivación.

El X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) es un sustrato cromogénico de la β-galactosidasa que forma un precipitado azul. Cuando las bacterias transformadas incorporan el plásmido pcR[®]II (que les proporciona resistencia al antibiótico de selección) sin el inserto, el operón *lac* está íntegro, por lo que, en presencia de IPTG, se activa y la β-galactosidasa metaboliza el X-GAL, dando lugar a colonias de color azul. Si el vector incorporado lleva en su interior el inserto, éste interrumpe la secuencia del operón *lac*, por lo que no se sintetiza β-galactosidasa, ni siquiera en presencia de IPTG, por lo que no se metaboliza el X-GAL y las colonias que crecen son blancas.

Antes de realizar la transformación de las células, se habían preparado placas de siembra, mediante el siguiente protocolo:

1. Se disolvieron 35 g de medio LB-agar (Pronadisa) en 1 litro de agua ultrapura y se autoclavó el medio de cultivo.
2. Cuando la temperatura del medio fue la apropiada (56°C), se añadió el antibiótico ampicilina (Sigma) a una concentración final de 100 µg/ml, en condiciones de esterilidad.
3. Se repartieron unos 20-25 ml de medio de cultivo en placas de siembra (Soria Genlab) y se esperó a que solidificara y enfriara.
4. A cada placa de cultivo, se les añadieron 40 µl de X-GAL a 40 mg/ml y 40 µl de IPTG a 100 mM, preparados de la siguiente forma:
 - a. X-GAL (Bioline)
 - i. Se disolvió 1 g de producto en 25 ml de N,N-dimetil-formamida (Sigma).

- ii. Se repartió en alícuotas de 1 ml, protegidas de la luz y se conservó a -20°C .
- b. IPTG (Bioline)
 - i. Se disolvió 1 g de producto en 4 ml de agua ultrapura.
 - ii. Se filtró por medio de jeringa y filtros de $0.2\ \mu\text{m}$.
 - iii. Se hicieron alícuotas de 1 ml y se conservaron a -20°C .
5. Con un asa de vidrio acodada, se extendieron el IPTG y el X-GAL por las placas de siembra, se dejaron secar ligeramente y se conservaron a 4°C .

También se había preparado previamente medio de cultivo líquido, mediante la disolución de 20 g de medio LB Broth (Pronadisa) en 1 litro de agua ultrapura y posterior autoclavado. Tras enfriarse el medio, se añadió ampicilina hasta una concentración final de $100\ \mu\text{g/ml}$.

Para cada transformación a realizar (una por cada producto de ligación), se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se descongeló un vial de bacterias y se reservaron en hielo.
2. Se dio un pulso de micro-centrífuga a las ligaciones y se pusieron en hielo.
3. $2\ \mu\text{l}$ de ligación se añadieron a un vial de bacterias y se mezcló moviendo la punta de la pipeta. La ligación sobrante se congeló a -20°C .
4. Se incubaron las bacterias con la ligación, en hielo durante 30 minutos.
5. Mientras tanto, se descongelaron $250\ \mu\text{l}$ de medio SOC (del mismo producto comercial que las bacterias) por cada muestra a transformar.
6. Las bacterias transformadas se sometieron a un choque térmico, de 30 segundos a 42°C , para cerrar los poros.
7. Se añadieron $250\ \mu\text{l}$ de medio SOC a cada vial y se incubó 1 hora a 37°C , en el agitador orbital C24 (New Brunswick), a 225 r.p.m.
8. Unos minutos antes de terminar esta incubación, se sacaron a la estufa 4 placas de siembra de LB con ampicilina, X-GAL e IPTG, para atemperarlas.
9. Con la ayuda de un asa de vidrio acodada, se sembraron $100\ \mu\text{l}$ de bacterias transformadas en una placa de siembra.
10. Las bacterias sobrantes se conservaron a 4°C , mientras que las placas sembradas se incubaron a 37°C hasta el día siguiente.
11. Se observaron las colonias azules y blancas que habían crecido en las placas.
12. De cada placa, se picaron 10 colonias blancas y se sembraron en 3 ml de medio LB líquido con ampicilina.

13. Se incubaron los tubos a 37°C y 225 r.p.m., en agitador orbital, hasta el día siguiente.

9.6. Minipreps

La extracción de las numerosas copias de plásmido procedentes de las bacterias se llevó a cabo mediante el producto comercial *FastPlasmidTM Mini* (Eppendorf), siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1. Se centrifugaron 2 ml de medio de cultivo a 15.000 g durante 1 minuto, conservando a 4°C el medio sobrante.
2. Se eliminó el sobrenadante por decantación.
3. A los sedimentos de bacterias, se les añadieron 400 µl de solución de lisis pre-enfriada a 4°C.
4. Se aplicó vórtex intenso a cada tubo durante 30 segundos y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Los lisados celulares se transfirieron a columnas del producto comercial.
6. Se centrifugaron las columnas 1 minuto a 15.000 g y se decantó el sobrenadante.
7. Se añadieron 400 µl de tampón de lavado y se centrifugó a 15.000 g durante 1 minuto, eliminándose el sobrenadante.
8. Se repitió la misma centrifugación.
9. Las columnas se pasaron a tubos limpios y se añadieron 50 µl de tampón de elución sobre la membrana.
10. Se centrifugó 1 minuto a 15.000 g.
11. Los plásmidos se cuantificaron de la forma descrita en el **apartado 3.2** y se conservaron a -20°C hasta su uso.

9.7. Digestión de los plásmidos, purificación de los insertos y secuenciación

2 µg de cada una de las muestras se digirieron utilizando el mismo protocolo que en el **apartado 9.2**. Posteriormente, se corrió un gel de agarosa y se visualizaron los patrones de bandas. Se conservaron a 4°C los restos de plásmidos de aquellas muestras que presentaron un patrón de restricción igual al esperado: una banda de 4 kpb (el vector linearizado) y otra de 2.1 ó 2.2 kpb (en función de la isoforma), correspondiente al inserto de ADARB1. Se eliminaron las muestras con patrones de restricción diferentes y/o con otras bandas inespecíficas.

Sobre el mismo gel, se procedió a recortar con bisturí las bandas de 2.1 y 2.2 kpb de las muestras con restricción adecuada, para su purificación posterior, tal y como se ha descrito en el **apartado 9.2** y su cuantificación por comparación de intensidad de bandas con el marcador de alto peso molecular.

Seguidamente, se secuenciaron en ambos sentidos (ver **apartado 7.3**) los plásmidos conservados a 4°C, utilizando los cebadores de Sp6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'), T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') y otros cebadores internos, específicos de ADARB1, algunos de ellos utilizados previamente y otros de nuevo diseño (**Tabla 16**).

Tras analizar detenidamente las secuencias de todas las muestras en el programa *Chromas*, sólo se conservaron aquellas que coincidieron exactamente con las cuatro posibles secuencias del cDNA de ADARB1: con y sin el exón 6 y, a su vez, con los dos posibles alelos del SNP rs1051367 (G y A).

Cebadores		
Sentido	Secuencia (5' → 3')	Posición
S	AGGTTTTTGAGGGCTCTGGTC	766-786
S	CTCTCCCTGTCTTACCACCATTC	1075-1097
S	GGTCCTGGGTAAGTTTGGTGAC	1403-1424
S	GGGGTTTAGGCTGAAGGAGAA	1709-1729
S	CGTAAAGCAAGAGGACAGCTACG	1953-1975
S	CCCCCAACTTCAGTGTCAA	2317-2335
AS	GCTTGTTGAGGGTGTAGAGAGGT	2246-2268
AS	CGAGAAGTAAATGGGCTCCAC	2142-2162
AS	CCCCTCGCTCTGATTTCT	1693-1710
AS	CTGAAGACCCTCACTGGGAATAG	1339-1361
AS	GCTGGAACTGAAGGAGTCATC	1002-1022
AS	AGTCTGGGACAGGAGTGTGTACT	694-716

Tabla 16. Cebadores utilizados para secuenciar los plásmidos construidos en el vector pcR®II. Se indica la orientación de los mismos (S: Sentido; AS: Antisentido), sus secuencias y la posición relativa respecto a la secuencia de ADARB1 empleada como referencia (gi:75709170).

9.8. Ligación en el vector pcDNA 3.1 (-)

Se ligaron cada uno de los insertos secuenciados con el vector de expresión pcDNA 3.1 (-), previamente digerido y purificado (**apartado 9.2**). Tanto el vector como los insertos habían sido digeridos con las mismas enzimas de restricción, por lo que la ligación consistió en hibridar los extremos cohesivos presentes en ambas moléculas.

Para cada uno de los cuatro insertos, se realizaron a su vez cuatro ligaciones, probando diferentes ratios de cocientes inserto:vector. Concretamente, se probaron los ratios 0:1 (vector sin inserto), 1:1, 2:1 y 3:1. El cociente para el caso del vector vino prefijado por un valor (3.7) derivado de dividir 20 ng entre 5.4 kpb. Para el ratio 1:1, el cociente del inserto fue también 3.7; para el ratio 2:1, el cociente del inserto fue 7.4 y, para el ratio 3:1, el cociente fue de 11.1.

Con estos cocientes (C) se calcularon los ng de inserto a añadir en cada caso, sabiendo que la longitud de los insertos era de 2.2 ó 2.1 kpb, sustituyendo los valores en la siguiente fórmula:

$$C = \text{ng de inserto} / \text{kpb del inserto}$$

Se incubaron los tubos de ligación a 14°C toda la noche con los siguientes reactivos:

- 20 ng de vector pcDNA 3.1 (-) digerido y purificado.
- Inserto (4 distintos): ng necesarios para los distintos ratios.
- 1 µl (1 unidad) de la ligasa *T4 DNA Ligase* (Invitrogen) a 1 U/ µl.
- 4 µl de tampón de ligasa 5 X (Invitrogen).
- Agua ultrapura, hasta un volumen final de reacción de 20 µl.

9.9. Transformación de bacterias, *minipreps* y digestión de las construcciones en el vector pcDNA 3.1 (-).

Se realizaron los mismos pasos descritos anteriormente para el caso del vector pCR[®] II (**apartado 9.5**), con las siguientes diferencias:

- Se transformaron bacterias con 4 µl de los productos de ligación y también otras con 1 µl de vector pcDNA 3.1 (-) vacío y sin digerir.
- No se añadió IPTG ni X-GAL en las placas de siembra, ya que el vector pcDNA 3.1 (-) no posee el operón *lac* y, por tanto, no es posible diferenciar por color las colonias que tienen el plásmido con el inserto de las que tienen el vector vacío.

- Se comprobó que en las placas sembradas con bacterias transformadas con vector más inserto crecieron más colonias que en las placas de bacterias transformadas con el vector digerido vacío. Esto se debe a que es precisamente el inserto, con sus extremos cohesivos, quien hace de puente para que el vector se circularice de nuevo, sea funcional y le dé a las células la resistencia al antibiótico necesaria para sobrevivir.
- A la hora de picar colonias para sembrar en medio LB líquido, se eligieron las placas donde había un mayor número de éstas, que se correspondían con un determinado ratio. Como no se pueden distinguir las colonias que interesan de las que no, aumentando el número de muestras se incrementa la probabilidad de picar en las colonias adecuadas.
- Se picó también una colonia de bacterias transformadas con el vector vacío sin digerir, como control negativo.
- La digestión final de las muestras y su separación electroforética se realizó con 500 ng de plásmido. En esta ocasión, las bandas que debían aparecer eran de 5.4 kpb (vector linealizado) y de 2.2 ó 2.1 kpb, eliminándose las muestras con patrón de restricción distinto. Para el caso del vector vacío sin digerir, se comprobó que éste migraba a la altura que le correspondía, teniendo en cuenta su estado circular.

9.10. *Maxipreps*

Se seleccionó el medio de cultivo sobrante de una muestra del apartado anterior para cada uno de los cuatro plásmidos construidos y para el plásmido pcDNA 3.1 (-) sin digerir:

- Plásmido V (vacío): No tiene inserto.
- Plásmido LG: El inserto, de ADARB1, tiene el exón 6 (isoforma larga) y una G en el SNP rs1051367.
- Plásmido LA: El inserto tiene el exón 6 (isoforma larga) y una A en el SNP rs1051367.
- Plásmido CG: El inserto no tiene el exón 6 (isoforma corta) y en el SNP rs1051367 hay una G.
- Plásmido CA: El inserto no tiene el exón 6 (isoforma corta) y en el SNP rs1051367 hay una A.

Se sembraron los excedentes de estos cultivos conservados a 4°C en 5 ml de medio LB líquido recién preparado, con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron 8 horas a 37°C, en un agitador orbital, a 225 r.p.m. Tras este tiempo, el medio de cultivo se puso turbio, debido al crecimiento bacteriano.

4 ml de cada cultivo se añadieron a 200 ml de medio LB líquido recién preparado, con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron 16 horas a 37°C, en un agitador orbital, a 225 r.p.m. A las bacterias del volumen sobrante de cada cultivo se les añadió 1 ml de glicerol 30% (v/v) en agua ultrapura y se congelaron a -80°C.

Tras las 16 horas de incubación de los cultivos, se realizó la extracción de los plásmidos, mediante el producto comercial *High Purity Plasmid Maxiprep System* (Marligen). El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se hicieron pasar a través de las columnas 30 ml de tampón equilibrador.
2. Se centrifugaron los cultivos 15 minutos a 6.000 g. y temperatura ambiente, descartando los sobrenadantes por decantación.
3. Los sedimentos celulares se resuspendieron completamente en 10 ml de tampón de suspensión celular (con RNasa A).
4. Se añadieron 10 ml de solución de lisis, se invirtieron los botes 5 veces y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Se añadieron 10 ml de tampón de neutralización y se invirtieron los botes varias veces, hasta que la solución se volvió homogénea.
6. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 15.000 g.
7. El sobrenadante se depositó en la columna y se dejó que fluyera completamente a su través.
8. Se lavaron las columnas con 60 ml de tampón de lavado.
9. Se añadieron 15 ml de tampón EB y se recogió el eluido, con el plásmido, en un tubo aparte.
10. Para precipitar el DNA, se añadieron 10.5 ml de isopropanol pre-enfriado a 4°C, se invirtió el tubo varias veces y se centrifugó a 4°C y 15.000 g durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante.
11. El *pellet* se lavó tras añadir 5 ml de etanol al 70% y centrifugar a 4°C y 15.000 g durante 5 minutos.
12. Se eliminó el sobrenadante, mientras que el *pellet* se dejó secar al aire a temperatura ambiente.
13. El plásmido se resuspendió en 500 µl de tampón TE.

14. Se purificó el DNA mediante precipitación con fenol:cloroformo:isoamílico (**apartado 9.11**).
15. Finalmente, los plásmidos fueron secuenciados nuevamente de igual forma a la descrita en el **apartado 9.7**, sustituyendo el cebador Sp6 por el de BGH (5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3').

9.11. Purificación por precipitación con fenol : cloroformo : isoamílico

Pese a que el producto comercial utilizado en las *maxipreps* elimina los restos de endotoxinas procedentes de la pared bacteriana, se realizó posteriormente una purificación de los plásmidos para tener completa seguridad. Esto se debió a que posteriormente se realizaron transfecciones de estos plásmidos en líneas celulares y éstas son muy sensibles a la presencia de lipopolisacárido (LPS). El protocolo de purificación fue el que se detalla a continuación:

1. Se añadieron 100 µl de solución de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma), pre-enfriado a 4°C, por cada 100 µl de muestra.
2. Se agitó por vórtex varios segundos.
3. Se centrifugó 10 minutos a 4°C y 15.000 g.
4. Se recogió el máximo volumen posible de la fase superior, sin tocar el halo separador de las dos fases y se pasó a un tubo limpio.
5. Se añadió 1/10 de volumen de acetato sódico 3M (Fluka) pre-enfriado a 4°C respecto al volumen recogido en el punto anterior.
6. Se añadieron 2.2 volúmenes de etanol absoluto a 4°C.
7. Se incubó a -80°C toda la noche.
8. Los tubos se centrifugaron a 15.000 g y 4°C, durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante.
9. El *pellet* se lavó dos veces mediante la adición de 200 µl de etanol 70% a 4°C, centrifugando en frío 5 minutos a 15.000 g y eliminando el sobrenadante.
10. El *pellet* se dejó secar unos minutos, dejando abierta la tapa del tubo.
11. Finalmente, se resuspendió en tampón TE y se cuantificó mediante el uso de *Nanodrop*[®].

9.12. Transfección de los plásmidos en líneas celulares con lipofectamina

Como forma de comprobar si los plásmidos construidos eran funcionalmente activos, se transfectaron varias líneas celulares. El método utilizado fue el de la lipofectamina. Esta técnica se basa en la transfección mediante liposomas, de manera que se forman complejos entre lípidos catiónicos y el DNA. Estos complejos tienen afinidad por la membrana plasmática, por lo que el DNA penetra finalmente en el interior celular.

9.12.1. Transfección transitoria

Mediante esta técnica se pretende que las células incorporen una construcción de DNA del exterior y sobre-expresen una proteína cuyo gen está insertado en el plásmido. Con el paso del tiempo (unos pocos días), las células van perdiendo este material y dejan de producir artificialmente la proteína de interés.

Se probó inicialmente en células A549 y con la construcción de plásmido LG de ADARB1. La funcionalidad de este plásmido se comprobó mediante la transfección de las células y la realización posterior de un estudio en el tiempo (5 días) de la sobre-expresión de la proteína de ADARB1.

Se sembraron 6 placas de 10 cm de diámetro (Corning) con la línea celular A549, en medio RPMI, suplementado con un 10% (v/v) de suero sintético *FetalClone III*, pero sin penicilina/estreptomicina. La ausencia de antibióticos se debe a que estos forman complejos con la lipofectamina, que resultan tóxicos para las células en cultivo.

Al día siguiente, una vez que las células se habían adherido a la superficie de la placa, se inició el protocolo de transfección, que consistió en los siguientes pasos:

1. Se eliminó el medio de cultivo y se sustituyó por 10 ml de medio nuevo, con suero y sin antibióticos.
2. Por cada placa, se prepararon 2 tubos aparte, con 1.5 ml de medio *Opti-MEM*[®] I con *Glutamax*[™] I (Invitrogen). En uno de estos tubos, se añadieron 60 μ l de *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen); en el otro, se pusieron 24 μ g de plásmido LG.
3. Cada tubo, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se mezclaron los contenidos de ambos tubos y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, para que se formaran los complejos.
5. Se añadió la mezcla a cada una de las placas, se agitaron y se incubaron 5 horas a 37°C.
6. Se desechó el medio de cultivo y se lavaron las placas con PBS.

7. En cinco de las seis placas, se añadieron 10 ml de medio completo (con antibióticos) y se incubaron a 37°C.
8. En la otra placa, se inició el protocolo de extracción de proteínas por fraccionamiento sub-celular (**apartado 4.1.2**), obteniéndose los extractos a día 0.
9. Para las demás placas, se repitió el paso 8, a días 1-5.
10. Se cuantificaron todos los extractos de proteínas obtenidos mediante el protocolo descrito en el **apartado 4.3**.
11. Se realizó un *western blot* (**apartado 4.4**), utilizando 5 µg de cada extracto nuclear y el anticuerpo anti-ADAR2 obtenido en cabra.

Tras comprobar que esta técnica funcionaba, también se realizaron transfecciones transitorias en las líneas H1299, H23 y H727 con las construcciones V, LG, LA, CG y CA. El protocolo fue similar al descrito anteriormente, pero con algunas diferencias:

- Se utilizaron placas de 6 pocillos.
- Las células se transfectaron con 4 µg de plásmido.
- Los volúmenes del resto de reactivos fueron proporcionales a estas nuevas condiciones de trabajo.
- Al día siguiente de cambiarles el medio de transfección a medio completo, las células fueron tripsinizadas y se realizaron una serie de experimentos (**apartado 10**) para verificar la sobre-expresión de ADARB1.

9.12.2. Transfección estable por selección con geneticina

La geneticina (Gibco) es un antibiótico de la familia de los aminoglicósidos, relacionado con la gentamicina y que resulta tóxico para células procariotas y eucariotas. Sin embargo, aquellas células que posean de forma artificial los genes de resistencia a geneticina podrán crecer en medio de cultivo incluso en presencia de este antibiótico.

Se realizaron transfecciones de las construcciones V, LG, LA, CG y CA en distintas líneas celulares y se seleccionaron con geneticina aquellas que incorporaron el plásmido al interior celular. La principal diferencia con la transfección transitoria es que en ésta no se pueden diferenciar las células realmente transfectadas de las que no. Sin embargo, en la transfección estable, las células que no han incorporado el plásmido mueren al cabo de unos días en presencia del antibiótico. De esta manera, el 100% de

las células supervivientes llevan el gen a sobre-expresar en su interior, lo cual hacen de forma permanente en presencia de geneticina.

Se transfectó una línea celular representativa de cada uno de los tipos histológicos principales de cáncer de pulmón del panel utilizado a lo largo de este trabajo, excepto del microcítico: H23 (adenocarcinoma), A549 (adenocarcinoma bronquioalveolar), H157 (carcinoma escamoso), H1299 (carcinoma de células grandes) y H727 (carcinoide).

Para cada línea celular, se sembraron, en 2 ml de medio con suero y sin antibióticos, los 6 pocillos de una placa, incubándose en la estufa hasta que la confluencia alcanzara el 90-95%. En ese momento, comenzó el protocolo de transfección, igual al descrito en el apartado anterior, con las siguientes diferencias:

- En un pocillo (células parentales), no se añadió plásmido de ningún tipo.
- La cantidad de lipofectamina a añadir en cada pocillo fue de 10 μ l; la de plásmido, 4 μ g.
- Estos reactivos se incubaron con 250 μ l de Opti-MEM[®] en cada tubo.
- El volumen total en los pocillos con las transfecciones fue de 1 ml (500 μ l de medio sin antibiótico).
- Tras las 5 horas en incubación con los complejos, todos los pocillos se lavaron con PBS y se sustituyó el medio por 2 ml de medio completo.
- Al día siguiente, se sustituyó el medio por 2 ml de medio de cultivo completo adicionado con geneticina a concentración de 0.5 mg/ml para todas las líneas celulares, salvo para la H727 (0.4 mg/ml). Cada 3-4 días, se renovó el medio completo con geneticina.
- Se observó cómo, al ir pasando los días, las células sin transfectar (parentales) iban muriendo paulatinamente.
- Cuando no quedaron células parentales vivas, se consideró que la selección había terminado y que todas las células supervivientes en los demás pocillos habían incorporado los plásmidos correspondientes.
- Se tripsinizaron las células y se pasaron a frascos de cultivos de 25 cm² de superficie, en presencia de medio completo con geneticina. Las células se crecieron y mantuvieron en estas condiciones hasta su uso.

10. Comprobación de la sobre-expresión de ADARB1

Con los cinco clones (construcciones V, LG, LA, CG y CA) de las líneas transfectadas (H23, A549, H157, H1299 y H727) de forma estable se realizaron estudios de la expresión de ADARB1, para verificar que se sobre-expresaba en las células con plásmidos que incluyen el inserto. También se realizaron estos experimentos con las tres líneas celulares transfectadas de forma transitoria. Para cada caso, se realizaron las siguientes técnicas (todas ellas ya descritas previamente):

- Extracción de RNA (**apartado 3.1**):
 - Retro-transcripción (**apartado 3.3**).
 - PCR convencional:
 - Expresión de ADARB1 (**apartado 3.5**).
 - Cuantificación de la actividad editasa de ADARB1 (**apartado 6.2**).
 - PCR a tiempo real (**apartado 3.6**): expresión semi-cuantitativa de ADARB1.
- Extracción de proteínas por fraccionamiento sub-celular (**apartado 4.1.2**):
 - Cuantificación de extractos (**apartado 4.3**).
 - *Western blot* (**apartado 4.4**).

Además, se capturó una imagen de cada placa de cultivo, para estudiar si había cambio de morfología en las células transfectadas con las construcciones de DNA, frente a las transfectadas con el vector vacío. Para ello, se utilizó un microscopio con cámara fotográfica y el programa informático *ACT-2U* (Nikon).

11. Inhibición de ADARB1 y de PTB mediante siRNA

Los siRNA (del inglés, *small interfering RNA*) son pequeñas secuencias de RNA que, por su secuencia complementaria, se hibridan con RNA mensajeros específicos, bloqueándolos o induciendo su degradación; por tanto, inhiben la traducción final a proteína y, en conjunto, la expresión del gel correspondiente.

Para el caso de ADARB1, se eligieron las líneas celulares H157, H1299, H23 y H727 como material en el que realizar los estudios de inhibición. La primera, por presentar niveles normales de expresión de RNA mensajero de ADARB1 (en comparación con las células NHBE y SAEC). Las otras, tras analizar los resultados derivados de la sobre-expresión. En cuanto a PTB, el estudio se realizó en H1299, A549, H441, H2087 y

H157. Al igual que para el caso de los plásmidos, se realizaron transfecciones del siRNA mediante lipofectamina.

En primer lugar, se puso a punto la técnica para saber la cantidad adecuada de siRNA a transfectar. El protocolo llevado a cabo fue el siguiente:

1. Se sembraron las células, con 2 ml de medio con suero y sin antibiótico, en 2 placas de 6 pocillos (4 pocillos de células en cada placa) y se incubaron hasta que la confluencia celular alcanzó el 40-60%.
2. Se eliminó el medio de cultivo y se sustituyó por otros 500 μ l de medio sin antibiótico.
3. Por cada placa, se prepararon 8 tubos con 250 μ l de Opti-MEM[®]. En 3 de ellos, se añadieron 5 μ l de *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen) y en otros 4, se pusieron 0.5, 1, 2 y 2 μ l de *Silencer*[®] *FAM*[™]-*Labeled Negative Control #1 siRNA* (Applied Biosystems) a 75 μ M. Este reactivo, marcado con un fluorocromo, nos dice la eficiencia de la transfección. Se incubaron los tubos 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se mezclaron cada uno de los tubos del siRNA con los tubos con lipofectamina, de forma que el tubo sin lipofectamina se mezcló con uno de los dos que tenía 2 μ l de siRNA. Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Se añadieron los complejos a las células de los pocillos y se incubó 5 horas a 37°C.
6. Se aspiró el medio, se lavó con PBS y se añadieron 2 ml de medio completo, incubándose 24 horas (una placa) o 48 (la otra).
7. En la placa incubada 24 horas, se eliminó el medio, se lavaron las células con PBS, se tripsinizaron con 500 μ l de tripsina y se neutralizó con 1 ml de PBS.
8. Se pasaron las células a tubos de citómetro y se centrifugó 7 minutos a 1.100 g, aspirándose el sobrenadante.
9. El sedimento celular se resuspendió en 400 μ l de medio completo.
10. 10.000 células de cada muestra se adquirieron en el citómetro *FACScan* (Becton Dickinson), mediante el programa *Cell Quest*, versión 3.1 (Becton Dickinson).
11. Al día siguiente, se realizaron los pasos 7-10 con la placa incubada 48 horas.
12. El mismo programa *Cell Quest* sirvió para analizar los resultados y determinar con cuánta cantidad de siRNA se transfectaron más células y el tiempo de incubación.

Posteriormente, se llevó a cabo la transfección de células con diversos siRNA comerciales (Dharmacon) específicos de ADARB1 y de PTB, para estudiar los efectos que tendría la inhibición de estos genes a nivel del RNA mensajero. En concreto, se utilizaron cuatro siRNA distintos por separado, específicos de ADARB1 y una mezcla (LQ-003528-00-0005) de varios siRNA específicos de PTB (Tabla 17), así como dos controles negativos (también llamados *scramble* en inglés), que teóricamente no producen efectos específicos de secuencia.

Uno de los controles (llamado en adelante *scramble 1* o *SCR1*), de secuencia no proporcionada por la casa comercial (Dharmacon) fue el *siGENOME Non-Targeting siRNA #1*; el otro (*SCR2*), de secuencia 5'-AUGACGACCUGCGUGUCGUTT-3', fue producido por la empresa Eurogentec.

Gen	siRNA	Secuencia antisentido (5'→3')	Secuencia diana (5'→3')	Posición
ADARB1	J-009263-09	ucguucaagaucaucacgg	ccgugaugaucuugaacga	1120-1138
	J-009263-10	uuaaccguucaguucaugu	acaugaacugaacgguuua	4711-4729
	J-009263-11	augcucgagaaguaaaugg	ccaauuacuucucgagcau	2149-2167
	J-009263-12	aucgcugguacauggccc	gggccauguaccagcggau	2206-2224
PTB	J-003528-06	gaacuugaauccuuugacg	cgucaaaggauucaaguuc	1624-1642
	J-003528-07	uucccgugcagcuugugcc	ggcacaagcugcacgggaa	1371-1389
	J-003528-08	gaauauguucuggaaguuc	gaacuuccagaacauauuc	1516-1534
	J-003528-09	ugcuucgagagcgugaugc	gcaucacgcucucgaagca	1398-1416

Tabla 17. Características de los siRNA utilizados en el estudio de inhibición de ADARB1 y de PTB. Se muestran los nombres comerciales que Dharmacon da a los siRNA, sus secuencias antisentido, las secuencias diana de cada uno y la posición relativa de éstas respecto a las secuencias de referencia (gi:75709170 para ADARB1 y gi: 209870087 para PTB).

La transfección de células con siRNA específicos se realizó de la misma forma que en el caso anterior, pero con las siguientes diferencias:

- Para cada siRNA estudiado (incluidos los controles negativo), se sembraron 9 pocillos de células (una placa y media).
- Las células se transfectaron en un volumen total de 1 ml, por lo que las concentraciones de trabajo de los siRNA en los pocillos fue de 75 nM.
- Tras lavar las células y ponerles medio completo, se incubaron 24 horas a 37°C.

Al día siguiente, ya con las células transfectadas, se procedió a comprobar si había funcionado la inhibición de los RNA mensajeros de ADARB1 y de PTB y si esto tenía efecto en la proliferación celular. Así, se realizó lo siguiente para cada condición:

- Se capturó una imagen de las células, para estudiar si había cambio morfológico entre las células transfectadas con los controles y con los siRNA, utilizando un microscopio con cámara fotográfica y el programa informático ACT-2U (Nikon).
- A partir de las células de 6 de los pocillos, se extrajo RNA (**apartado 3.1**), haciendo una mezcla común:
 - Se retro-transcribieron 2 µg de cada RNA (**apartado 3.3**).
 - Se estudió la expresión de RNA mensajero de ADARB1 y de PTB por:
 - PCR convencional (**apartado 3.5**, aunque para PTB se usaron los mismos cebadores que para la PCR a tiempo real, 60°C de temperatura de hibridación y 25 ciclos totales).
 - PCR a tiempo real (**apartado 3.6**).
- Se tripsinizaron las células de los otros 3 pocillos, se neutralizó con medio completo y se juntaron en un tubo común:
 - Se contó el número de células disponibles (**apartado 2.4**).
 - Se realizaron estudios de proliferación, mediante la técnica del MTT (**apartado 12.2**).
 - Se llevaron a cabo ensayos de capacidad clonogénica en agar blando (**apartado 12.3**).

12. Estudios funcionales *in vitro*

Se realizaron una serie de experimentos para estudiar si la sobre-expresión de ADARB1 y/o la inhibición de ADARB1 y de PTB tenían consecuencias en algunos aspectos funcionales celulares.

12.1. Valoración de la actividad editasa de ADARB1

Se realizó este estudio, cuyos reactivos y protocolo se han descrito previamente (**apartado 6.2**), sólo para los casos de sobre-expresión de ADARB1. Se emplearon para ello los cDNA obtenidos después de transfectar las células de forma estable y transitoria con las construcciones correspondientes.

12.2. Ensayo de proliferación (MTT)

El fundamento de esta técnica se basa en la conversión del MTT soluble, de color amarillo, en unos cristales insolubles de color púrpura, por parte de las deshidrogenasas mitocondriales activas de las células vivas. Los cristales pueden ser posteriormente solubilizados mediante la adición de diferentes reactivos, en este caso SDS y dimetil-formamida. El material disuelto puede ser medido espectrofotométricamente, dando lugar a una absorbancia que es proporcional a la cantidad de MTT catalizado y, por ende, al nivel de actividad de las deshidrogenasas mitocondriales.

Para la realización de este estudio, se emplearon los siguientes reactivos:

- Solución de MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; azul de tiazol) (Sigma). Se preparó una solución de trabajo estéril de MTT a 5 mg/ml en PBS y se conservó a 4°C, protegida de la luz.
- Agente solubilizante. Se disolvieron 10 g de SDS (Sigma) en agua desionizada. Luego se añadieron 50 ml de N, N-dimetil-formamida (Sigma), se ajustó el pH a 4.7 y se añadió agua hasta 100 ml de volumen total. Se conservó a temperatura ambiente.

El protocolo que se siguió para medir la proliferación de las células fue el que se detalla a continuación:

1. Se tripsinizaron las células en cultivo y se neutralizaron con medio completo.
2. Para cada condición, se contó el número de células disponibles y se prepararon tubos con 96.000 células en un volumen de 4.8 ml de medio completo.
3. Se sembraron 2.000 células (100 μ l) por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson). Se utilizaron seis placas (días 0-5), con sextuplicados de pocillos en cada una de ellas.
4. En los pocillos periféricos, se pusieron 200 μ l de PBS, para evitar la evaporación de los pocillos interiores.
5. Cinco de las seis placas se metieron en el incubador.
6. En la otra placa (día 0), se añadieron 10 μ l/pocillo de solución de MTT.
7. Se incubó 4 horas a 37°C.
8. En cada pocillo, se añadieron 100 μ l de agente solubilizante y se dejó la placa de nuevo en el incubador hasta el día siguiente.

9. Se midió la absorbancia de los pocillos, a 540 nm frente a 690 nm, en el lector de placas *Sunrise*TM (Tecan) y con el programa *Magellan*TM, versión 3.0
10. En los días siguientes (1-5) se repitieron los pasos 6-9 con cada una de las demás placas.
11. Se calculó la absorbancia promedio de cada sextuplicado y se elaboraron gráficas de crecimiento, representando la absorbancia frente a los días de incubación, para cada una de las condiciones.
12. Para determinar diferencias estadísticas entre las distintas condiciones, los datos se analizaron con la prueba t de Student para muestras independientes. El resultado se consideró significativo o muy significativo cuando la probabilidad (p) asociada fue menor de 0.05 ó 0.01, respectivamente.

12.3. Ensayo de la capacidad clonogénica en agar blando

Mediante esta técnica, se estudia la capacidad de crecimiento independiente de anclaje de las células en un medio con agar. El material empleado en este protocolo fue:

- *Difco*TM Agar, *Noble* (Becton Dickinson). Se autoclavó el día anterior y se dejó secar completamente.
- RPMI 1640 con GlutamaxTM (Gibco), sin suero y sin antibióticos.
- Suero sintético *FetalClone III* (Hyclone).
- Penicilina/estreptomicina (Invitrogen).
- Solución de MTT (Sigma), a 10 mg/ml en PBS.
- DMSO (Sigma).

En primer lugar, hubo que poner a punto la técnica, para saber el número adecuado de células a sembrar en cada pocillo. Por cada línea celular a probar, se sembraron 2 placas de 6 pocillos. Se probaron 500, 1.000, 2.000 y 5.000 células parentales por pocillo y, de cada condición, se hicieron triplicados de pocillos. El protocolo que se siguió para la puesta a punto fue el siguiente:

1. Se preparó agar al 1% (m/v) en medio de cultivo RPMI, calentando el medio lentamente (sin hervir) en un micro-ondas. Hasta su uso, se mantuvo a 60°C en un baño húmedo.

2. En cada pocillo, se añadieron 2 ml de agar al 0.6%, a modo de capa inferior, tras la mezcla de 1.2 ml de agar al 1% con 0.8 ml de RPMI 2.5 X (25% de suero, 2.5% de penicilina/estreptomicina).
3. Durante una hora, se dejó solidificar la capa inferior a temperatura ambiente, en condiciones de esterilidad, dejando abiertas las tapas de las placas.
4. Se preparó la capa superior, al 0.3% de agar, mezclando, para cada pocillo, 0.3 ml de agar al 1% con 0.7 ml de medio RPMI 1.4 X (14% de suero, 1.4% de antibióticos). En el medio RPMI 1.4 X, se incluyó el número de células a probar, tras tripsinizarlas de sus frascos de cultivo, neutralizarlas con RPMI 1.4 X, disgregarlas con una jeringa y aguja de 0.8 mm de calibre y contarlas. En cada uno de los pocillos se añadió 1 ml de la capa superior sobre la capa inferior ya solidificada.
5. Se dejó secar la capa superior durante 15 minutos, en la campana de flujo laminar.
6. Las placas se incubaron varios días a 37°C.
7. Tras este tiempo, se añadieron 500 µl/pocillo de la solución de MTT y se incubaron 4 horas.
8. Se retiró el exceso de MTT y se añadieron 500 µl de DMSO, incubando las placas hasta el día siguiente.
9. Se escanearon las placas, se imprimieron las imágenes y se contó el número de clones formados por pocillo para cada condición, determinando así el número idóneo de células a sembrar en cada línea.

Posteriormente, se llevaron a cabo los ensayos de clonogenicidad con todas las células transfectadas. Se siguió el mismo protocolo que se acaba de describir, con la única diferencia consistente en el número de células a sembrar por pocillo y los tiempos de incubación (**Tabla 18**), dependiendo del tipo de experimento (sobre-expresión estable, transitoria e inhibición por siRNA) y de la línea celular empleada.

Para determinar diferencias estadísticas entre las distintas condiciones, los datos se analizaron con la prueba t de Student para muestras independientes. El resultado se consideró significativo o muy significativo cuando la probabilidad (p) asociada fue menor de 0.05 ó 0.01, respectivamente.

Línea celular	Sobre-expresión (construcciones)				Inhibición (siRNA)	
	Transfección estable		Transfección transitoria			
	Células / pocillo	Días de incubación	Células / pocillo	Días de incubación	Células / pocillo	Días de incubación
H1299	1000	10	5.000	10	500	10
A549	1000	10	N.R.		1000	10
H23	5.000	14	5.000	10	5.000	10
H157	250	14	N.R.		500	10
H727	2.000	14	2.000	14	2.000	14
H441	N.R.		N.R.		5.000	10
H2087	N.R.		N.R.		2.000	10

Tabla 18. Condiciones utilizadas para el estudio de la capacidad clonogénica en agar blando de las distintas células transfectadas. Para cada línea celular y transfección realizada (sobre-expresión estable, transitoria o inhibición), se muestran las células sembradas por pocillo y los días de incubación antes del revelado. N.R.: Ensayo no realizado.

13. Estudios *in vivo*

Con el fin de conocer el efecto que un aumento de los niveles de la proteína de ADARBI tenía *in vivo*, se inocularon células H1299 con sobre-expresión estable del gen en ratones atímicos hembras de 4-6 semanas de edad. Se compararon los resultados de dos clones estables frente a la construcción del vector vacío.

13.1. Generación de tumores en ratones y estudio de su crecimiento

A lo largo de varios días, se llevó a cabo la medición del tamaño de los tumores que generaban las células inyectadas. Los materiales específicos utilizados fueron los siguientes:

- *MatrigelTM Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced* (Becton Dickinson).
- Mezcla de anestésicos:
 - Imalgene® 500 (Merial), en proporción 9:10.
 - Rompun®, solución inyectable al 2% (Bayer), en proporción 1:10.

El protocolo de trabajo completo fue el que se detalla a continuación:

1. Se cultivaron clones de células H1299, conteniendo las construcciones estables V, LG y CG de ADARB1 en el vector pcDNA 3.1 (-). Las células se crecieron en medio de cultivo completo, con 0.5 mg/ml de geneticina.
2. Cuando hubo un número suficiente de células, se tripsinizaron y se contaron. De cada clon celular se emplearon 100 millones de células, repartidas en 2 tubos con 50 millones de células en cada uno y se añadió PBS hasta un volumen total por tubo de 750 µl.
3. Seguidamente, a las células se les añadió 750 µl por tubo del matrigel pre-enfriado, mezclando bien por pipeteo y se conservaron en hielo hasta el momento de su inoculación. Esta matriz contiene los componentes necesarios para garantizar el crecimiento de células tumorales *in vivo*.
4. Se anestesiaron 30 ratones *nude*, mediante inyección subcutánea de 50 µl de la mezcla de anestésicos.
5. Se inocularon 10 millones de células (300 µl de la mezcla de células y matrigel) por cada ratón, mediante inyección subcutánea en la región de la cadera. A 10 ratones se les introdujo células con el vector vacío (V); a otros 10, con la versión larga del inserto de ADARB1 (LG) y a los últimos 10, con la versión corta (CG).
6. Cada 2 ó 3 días, se midió el tamaño del tumor de cada animal, mediante el uso de un calibre. Se anotaron el diámetro mayor y el perpendicular a éste. El volumen de los tumores se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vol.} = (a \times b^2) / 2$$

(Vol.: Volumen, en mm³; a: Diámetro mayor, en mm; b: Diámetro perpendicular, en mm)

7. Para determinar diferencias estadísticas entre los volúmenes de los tumores que sobre-expresaban ADARB1 frente a los que no, los datos se analizaron con la prueba t de Student para muestras independientes. El resultado se consideró significativo o muy significativo cuando la probabilidad (p) asociada fue menor de 0.05 ó 0.01, respectivamente.

13.2. Procesamiento de los tumores

Los materiales utilizados en este apartado fueron los siguientes:

- Mezcla de anestésicos (ver **apartado 13.1**).
- Formaldehído 4% (Panreac).
- Isopentano (Sigma).
- Nitrógeno líquido.
- Etanol al 70%.

La metodología llevada a cabo se compuso de los siguientes pasos:

1. Cuando los tumores superaron un volumen de 2000 mm³, se procedió a sacrificar a todos los ratones. Para ello, se les inyectó a cada uno 100 µl de la mezcla de anestésicos y, una vez dormidos, fueron sometidos a dislocación cervical.
2. Con ayuda de unas tijeras, se extrajo el tumor de cada ratón, cortando la piel y retirando la grasa y el tejido conjuntivo circundante. Se lavó cada tumor con suero salino fisiológico y se midió el volumen de cada uno de ellos *ex vivo*.
3. Se cortó cada tumor en dos mitades con un bisturí. Un trozo se congeló y el otro se puso en formaldehído:
 - a. Para congelar los tumores, previamente se colocó un vaso de precipitados, con isopentano en su interior, sobre nitrógeno líquido. Cuando parte del isopentano comenzaba a precipitar, se sacó el vaso del nitrógeno líquido y se añadió el trozo de tumor en su interior. Tras unos segundos, el tumor quedó congelado y se conservó a -80°C hasta su procesamiento posterior.
 - b. El otro trozo de tumor se sumergió en formaldehído. Al día siguiente, se eliminó el exceso de formaldehído, se lavaron los tubos con agua del grifo y se pusieron los tumores en etanol al 70%. A las 24 horas, se realizaron cortes de 2-5 mm de grosor con cada trozo de tumor y se incluyeron todos los cortes de cada tumor en *cassettes*, conservando éstos en un frasco con etanol al 70%. Con estas muestras, el Servicio de Morfología del CIMA realizó las inclusiones en parafina, las tinciones con Hematoxilina-Eosina y los cortes necesarios para realizar la técnica de inmunocitoquímica.

4. A partir de algunos tumores congelados (tres de cada grupo V, LG y CG), se extrajo RNA (**apartado 3.1**, de igual forma que para las muestras clínicas pulmonares), se realizó retro-transcripción de las muestras (**apartado 3.3**), estudio de la expresión de ADARB1 por PCR convencional (**apartado 3.5**) y a tiempo real (**apartado 3.6**) y estudio de la actividad editasa (**apartado 6.2**).

13.3. Inmunocitoquímica

Esta técnica permite detectar la expresión de moléculas *in situ*, dada la reacción específica antígeno-anticuerpo. Si la diana se expresa en la muestra de tejido, se une al anticuerpo correspondiente, siempre que las condiciones de trabajo sean óptimas. Posteriormente, se lleva a cabo un sistema de revelado que permite visualizar si estas uniones se han producido y en qué cantidad.

El servicio de Morfología del CIMA proporcionó las muestras adecuadas, a partir de los tumores obtenidos en ratones. Estas muestras consistieron en portaobjetos con cortes de tejido de 3 μm de grosor, incluidos en parafina. Sobre estos cortes se llevó a cabo la inmunocitoquímica, previa puesta a punto de los pretratamientos, lavados, bloqueos, anticuerpos y sus diluciones, así como el sistema de revelado. En nuestro caso, se utilizó el sistema de revelado mediante el uso de complejos ABC (**Figura 10**).

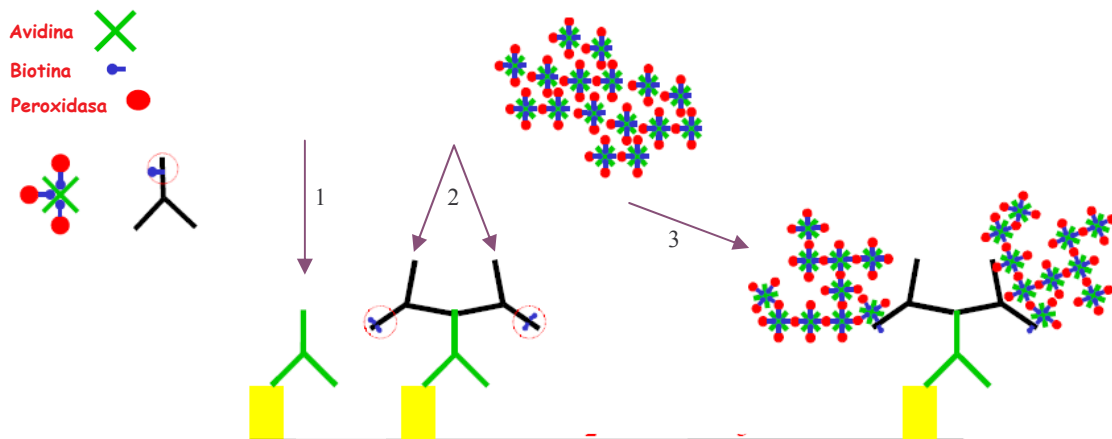


Figura 10. Funcionamiento de la técnica inmunocitoquímica mediante complejos ABC. Tras incubar la muestra con un anticuerpo primario (1), se añade un anticuerpo secundario biotinado (2). Posteriormente, se añaden los complejos de avidina (o estreptavidina) con biotina (3). Esta última lleva peroxidasa conjugada. El revelado se realiza añadiendo H_2O_2 y un cromógeno. La peroxidasa transforma el H_2O_2 en O_2 , el cual oxida al cromógeno y éste precipita, haciéndose visible mediante microscopía óptica.

Los reactivos que se utilizaron fueron los siguientes:

- Tampón citrato (pH = 6): 2.1 g de ácido cítrico (Sigma) en un litro de agua desionizada.
- Agua oxigenada al 3%: 5 ml de agua oxigenada al 33% (Panreac) por cada 45 ml de agua del grifo.
- TBS-tween (pH = 7.4):
 - 50 mM Tris (Sigma).
 - 150 mM NaCl (Sigma).
 - 1% (v/v) Tween® 20 (Sigma).
- Bloqueo: suero completo normal de cerdo *swine* (Dako), diluido 1:20 en TBS.
- Anticuerpo primario: Ac policlonal anti-ADAR2, producido en cabra (E-20, Santa Cruz Biotechnology), diluido 1:250 en TBS.
- Anticuerpo secundario: Ac biotinado policlonal anti-cabra, producido en conejo (Dako), diluido 1:200 en TBS.
- Complejos ABC (Dako). Se prepararon en la proporción 1:1:100, en TBS.
- Solución de revelado (Dako): diaminobencidina, diluida 1:100 en tampón sustrato.
- Hematoxilina de Harris:
 - 3 g de hematoxilina (Merck).
 - 30 ml de etanol absoluto.
 - 60 g de alumbre de potasio (Panreac).
 - 1.5 g de óxido mercurioso (Panreac).
 - 600 ml de agua desionizada.

El protocolo llevado a cabo se describe a continuación:

1. Los cortes de tejido se incubaron en estufa durante 30 minutos a 60°C, hasta que la parafina estuviera líquida.
2. Se pasaron las muestras a una cubeta con xilol (Panreac) y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Se incubaron en una segunda cubeta de xilol, 20 minutos.
4. Tras escurrir, los cortes se pasaron sucesivamente por cubetas con etanol en concentraciones decrecientes (absoluto, 96%, 80% y 70%), incubando unos segundos en cada una de ellas.

5. Se llevaron las muestras a una cubeta con agua y se mantuvieron bajo agua del grifo durante 5 minutos. De esta forma, se terminó de hidratar los cortes.
6. Se llevó a cabo el pre-tratamiento, para desenmascarar el antígeno, sumergiendo las muestras en el tampón citrato y calentando en micro-ondas durante 10 minutos a potencia máxima y otros 10 a media potencia.
7. Se enfrió bajo agua del grifo.
8. Para bloquear la peroxidasa endógena, se incubaron las muestras en agua oxigenada al 3% durante 10 minutos y se aclaró vacías veces con agua del grifo.
9. Se incubaron los cortes en TBS-tween, durante 5 minutos, para permeabilizar las muestras.
10. Con objeto de evitar uniones inespecíficas, se incubaron las muestras en la solución de bloqueo (suero normal de cerdo 1:20 en TBS), durante 30 minutos, en cámara húmeda.
11. Se decantó el suero y se añadió el anticuerpo primario anti-ADAR2, diluido 1:250 en TBS, incubándose en cámara húmeda hasta el día siguiente a 4°C.
12. Las muestras se lavaron 5 minutos en TBS.
13. Se añadió el anticuerpo secundario anti-cabra, diluido 1:200 en TBS y se incubó 30 minutos en cámara húmeda.
14. Las muestras se lavaron 5 minutos en TBS.
15. Se añadieron los complejos ABC y se incubó 30 minutos en cámara húmeda.
16. Se lavo con TBS durante 5 minutos.
17. El revelado se realizó añadiendo a las muestras la mezcla del cromógeno en el tampón sustrato e incubando durante un minuto y medio, observando simultáneamente la aparición del precipitado marrón. Tras este tiempo, los cortes se dejaron en agua.
18. Se contrastaron las muestras, mediante incubación unos segundos con hematoxilina y aclarado con agua del grifo.
19. Se deshidrataron las muestras, por medio de incubaciones sucesivas de 5 minutos en cubetas con concentraciones crecientes de etanol (96%, absoluto), *vitrosec*® (Panreac) y xilol.
20. Se montaron las muestras de forma permanente con un cubreobjetos y pegamento DPX.

21. Se capturaron imágenes de las muestras, utilizando un microscopio con cámara fotográfica y el programa informático ACT-2U (Nikon), tanto de las inmunocitoquímicas como de las tinciones con hematoxilina-eosina.

IV. RESULTADOS

1. Selección inicial de genes mediante análisis bioinformático

El primer objetivo planteado en el presente trabajo fue la búsqueda de genes relacionados con el metabolismo del RNA que presentaran una expresión diferente entre tejido tumoral de pulmón y tejido sano, para valorar posteriormente su posible implicación en la carcinogénesis pulmonar. Con esta finalidad, en primer lugar se estudió la estructura taxonómica en que se organizan los genes humanos en diferentes bloques y niveles en la página de *Gene Ontology* (GO). Las categorías que se eligieron, por estar implicadas en el metabolismo del RNA y por contener otras sub-categorías relacionadas, fueron: *RNA binding*, *RNA splicing* y *spliceosome complex*. En la **Figura 11** se muestra un ejemplo representativo de la organización de las categorías en la página de GO (www.godatabase.org).

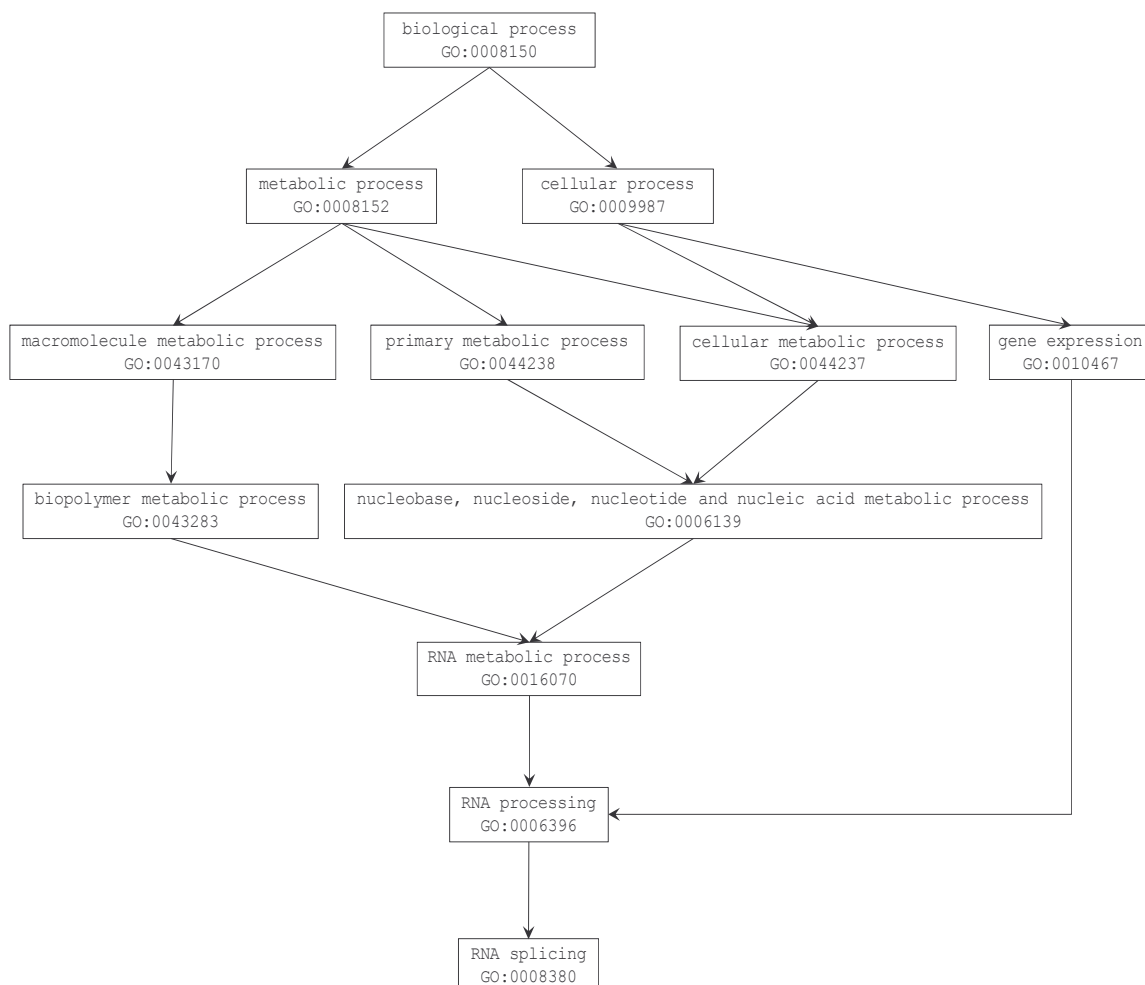


Figura 11. Ejemplo de la organización en árbol de las categorías de *Gene Ontology*. Se muestra la pertenencia de la sub-categoría *RNA splicing* a distintas categorías matrices, englobadas en el bloque *Proceso Biológico*. Modificado de: <http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>.

Seguidamente se recurrió a tres de las bases de datos de la **Tabla 4** (en *Material y Métodos*), en las que se recogen los resultados de *microarrays* de expresión en tejido tumoral de pacientes con distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón y tejido pulmonar de personas sanas. Las bases de datos empleadas fueron las proporcionadas por Bhattacharjee y col., 2001; Beer y col., 2001; Dehan y col., 2005.

Para cada tipo histológico tumoral, y dentro de cada base de datos, se realizó un análisis de la varianza con niveles de significación (p) del 1 y del 5%, que dio como resultado un listado de genes con expresión normalizada significativamente diferente en tumores frente a controles sanos. De estos genes, se seleccionaron aquellos que pertenecían a las categorías anteriormente descritas. En la **Figura 12** se muestra un ejemplo de cómo la aplicación bioinformática utilizada en este trabajo presenta los genes que superan la significación en el análisis estadístico.

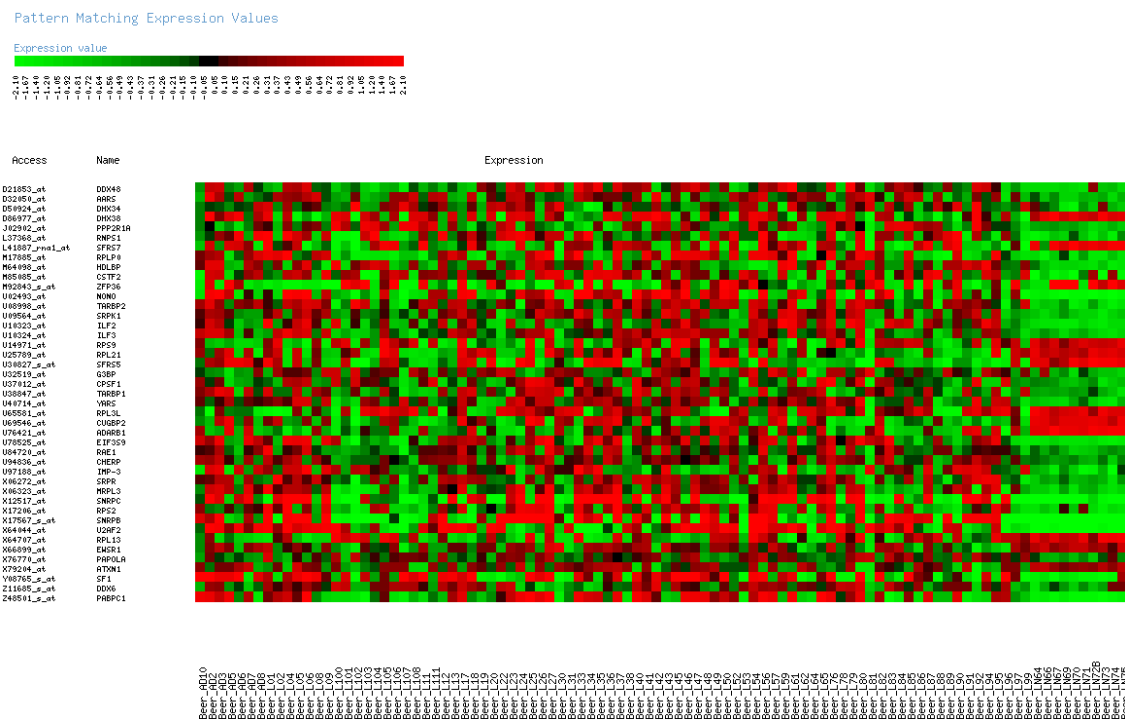


Figura 12. Representación en la aplicación bioinformática GARBAN de las sondas de Affymetrix y los correspondientes genes de las categorías de GO seleccionadas, cuya expresión es significativamente distinta ($p < 0.01$) entre muestras de adenocarcinoma de pulmón y tejido normal (últimas 10 columnas), a partir de los datos de uno de los *microarrays* de partida (Beer y col., 2001). El color rojo indica niveles elevados de expresión y el verde, niveles bajos.

Una vez obtenidas estas listas, se analizaron conjuntamente. Para seleccionar los genes más idóneos, se elaboraron unos diagramas de Venn, en los que las regiones solapantes se corresponden con aquellos genes que presentan una expresión significativamente distinta entre muestras normales y tumorales en más de una de las bases de datos iniciales (**Figura 13**).

En el caso de los adenocarcinomas, diez genes presentaron una *p* menor del 1% en las tres bases de datos. Para los carcinomas escamosos, los genes que integran la región solapante de las dos bases de datos que contienen muestras de este tipo de tumor fueron 21, entre los que se incluyen los diez genes anteriores. Estos diez genes también presentaron una *p* menor del 1% en las muestras de tumores carcinoide y microcítico, con representación solamente en uno de los experimentos de partida. Además, los valores de *fold-change* de todos estos genes resultaron iguales en signo y similares en valor absoluto para todos los tipos histológicos y bases de datos.

Por lo tanto, para estudios posteriores se seleccionaron los diez genes diferencialmente expresados tanto en adenocarcinomas como en carcinomas escamosos. Según los datos obtenidos en el análisis bioinformático, nueve de ellos presentaron tendencia a sobre-expresarse en muestras tumorales y uno a inhibirse (**Tabla 19**). Los genes seleccionados fueron los siguientes:

- **ADARB1**: *Double-stranded RNA-specific editase 1*
- **ASCC3L1 (KIAA0788)**: *U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase*
- **MARS**: *Methionyl-tRNA synthetase*
- **MRPL3**: *39S ribosomal protein L3, mitochondrial*
- **PABPC1**: *Polyadenylate-binding protein 1*
- **RAE1**: *mRNA export factor*
- **RNPS1**: *RNA-binding protein with serine-rich domain 1*
- **SNRPB**: *Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B*
- **SNRPC**: *U1 small nuclear ribonucleoprotein C*
- **SNRPE**: *Small nuclear ribonucleoprotein E*

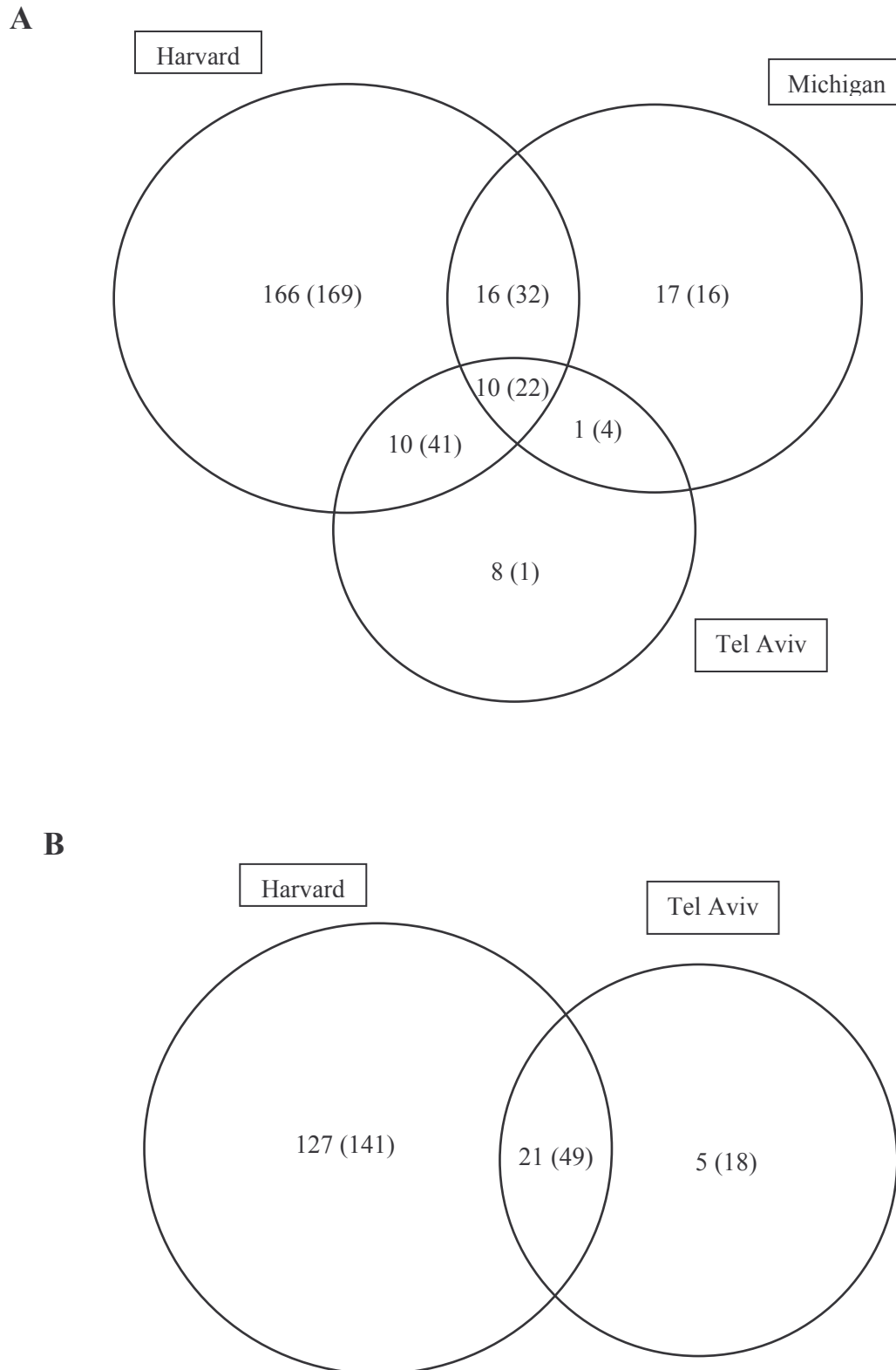


Figura 13. Diagramas de Venn correspondientes a los solapamientos de listas de genes significativamente cambiados entre muestras normales y tumorales. Cada lista se muestra como un conjunto circular acompañado del nombre del experimento de partida. Las regiones solapantes contienen aquellos genes comunes a dos o a tres de los conjuntos. Las cifras representan el número de genes en cada caso, con el nivel de significación del 1% (5%). **A)** Muestras de adenocarcinoma frente a normales. **B)** Muestras de carcinoma escamoso frente a normales.

Gen	Nivel de significación (p)			<i>Fold-change</i>		
	Harvard	Michigan	Tel Aviv	Harvard	Michigan	Tel Aviv
ADARB1	< 0.001	< 0.001	0.004	-2.037	-1.851	-2.054
ASCC3L1	< 0.001	N.R.	0.003	0.526	N.R.	0.955
MARS	< 0.001	0.009	0.009	0.712	0.504	0.384
MRPL3	< 0.001	< 0.001	0.009	1.812	0.826	1.044
PABPC1	< 0.001	< 0.001	0.009	0.551	1.099	0.554
RAE1	< 0.001	0.005	0.005	0.735	0.536	1.155
RNPS1	0.001	0.007	< 0.001	0.365	0.418	0.922
SNRPB	0.007	< 0.001	0.003	0.411	0.757	0.699
SNRPC	0.002	0.004	0.001	N.V.	1.992	1.009
SNRPE	< 0.001	N.R.	0.001	0.815	N.R.	1.272

Tabla 19. Listado de genes obtenidos en el análisis bioinformático. Para todos ellos, se muestra el nivel de significación obtenido en el ANOVA y el *fold-change*, en las tres bases de datos empleadas. Las cifras pertenecen al estudio de las muestras de adenocarcinoma frente a normales. N.R.: Gen no representado en el microarray. N.V.: Resultado no valorable.

2. Expresión de los genes seleccionados en líneas celulares de cáncer de pulmón y en cultivos primarios

Tras obtener los posibles genes de interés en el análisis estadístico, se procedió a verificar los datos mediante estudios de expresión de mRNA. De esta forma, se determinó la expresión de los genes seleccionados, así como del gen control GAPDH, en líneas celulares de pulmón y células NHBE, mediante **RT-PCR convencional**. En la **Figura 14** se muestran los resultados proporcionados por este estudio.

A partir de la información obtenida, se analizó el nivel de expresión de cada gen en cada una de las líneas estudiadas para comprobar si se correlacionaba con los resultados del análisis bioinformático. Según éste, la expresión de nueve de los diez genes debería ser mayor en las líneas tumorales que en las células normales NHBE y sólo para el caso de ADARB1 debería ser al contrario.

La observación de la intensidad de las bandas de amplificación confirmó estos resultados previos en ocho de los diez genes. Sólo se decidió descartar para el siguiente estudio a los genes RNPS1 y SNRPC porque la diferencia visual de la expresión entre las líneas tumorales y las células NHBE no parecía tan evidente como para los demás.

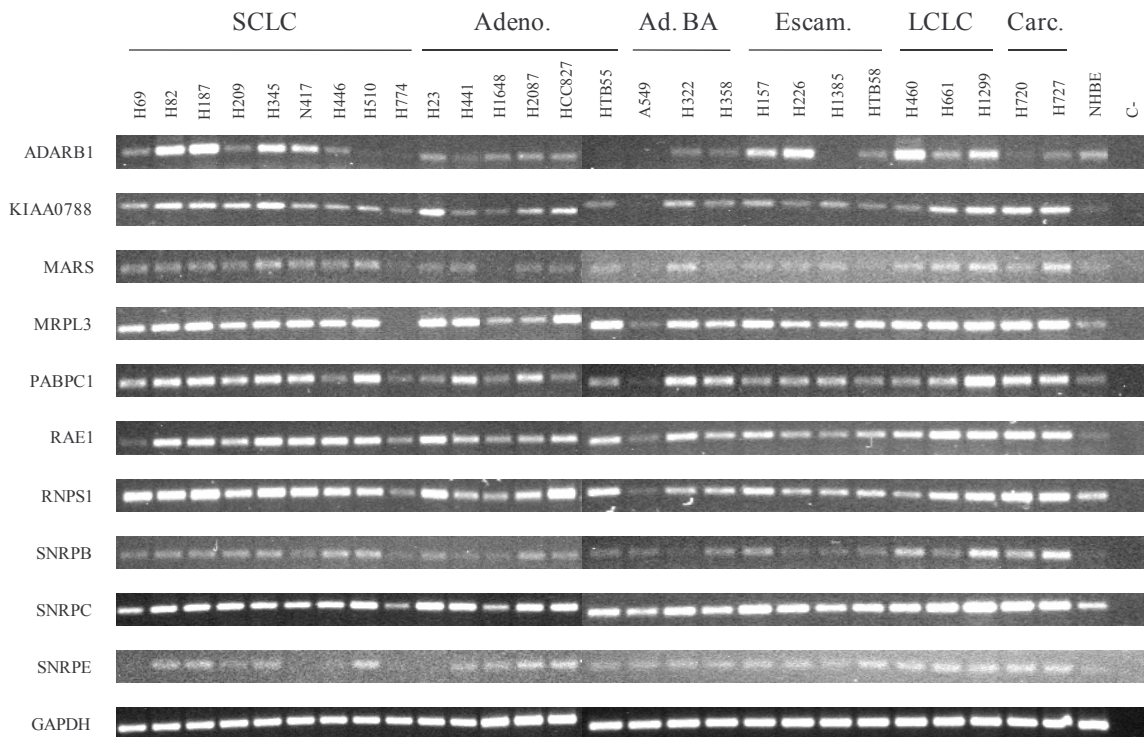


Figura 14. Expresión por RT-PCR convencional de los genes escogidos tras el análisis estadístico en líneas celulares de pulmón. El gen GAPDH se utilizó como control. C-: Control negativo; SCLC: Cáncer de pulmón de células pequeñas; Adeno.: Adenocarcinoma; Ad. BA.: Carcinoma bronquioloalveolar; Escam.: Carcinoma escamoso; LCLC: Carcinoma de células grandes; Carcin.: Carcinoide.

De esta forma, se seleccionaron los ocho genes restantes para continuar con el estudio de su expresión a nivel de mRNA mediante **RT-PCR a tiempo real**, en las mismas líneas tumorales y células normales de pulmón.

Para cada una de las muestras, se calculó la expresión de mRNA de forma semi-cuantitativa. Se comparó la expresión de cada gen de estudio con la de GAPDH y HPRT, es decir, se determinó la expresión normalizada de cada uno frente a los genes control. La forma de decidir si los genes de interés se sobre-expresaban o se inhibían en el material tumoral frente al normal se basó en la realización de un cociente entre la expresión normalizada de cada línea tumoral y la de NHBE o SAEC.

Los resultados obtenidos presentaron una buena correlación con los datos de la RT-PCR convencional y confirmaron los datos de los *microarrays* de expresión. En las **Figuras 15-18** se muestran los resultados de la RT-PCR a tiempo real en las líneas celulares. Se aprecia cómo la expresión de siete de los genes estudiados es mayor en líneas tumorales de pulmón que en células normales, mientras que la expresión de ADARB1 es menor.

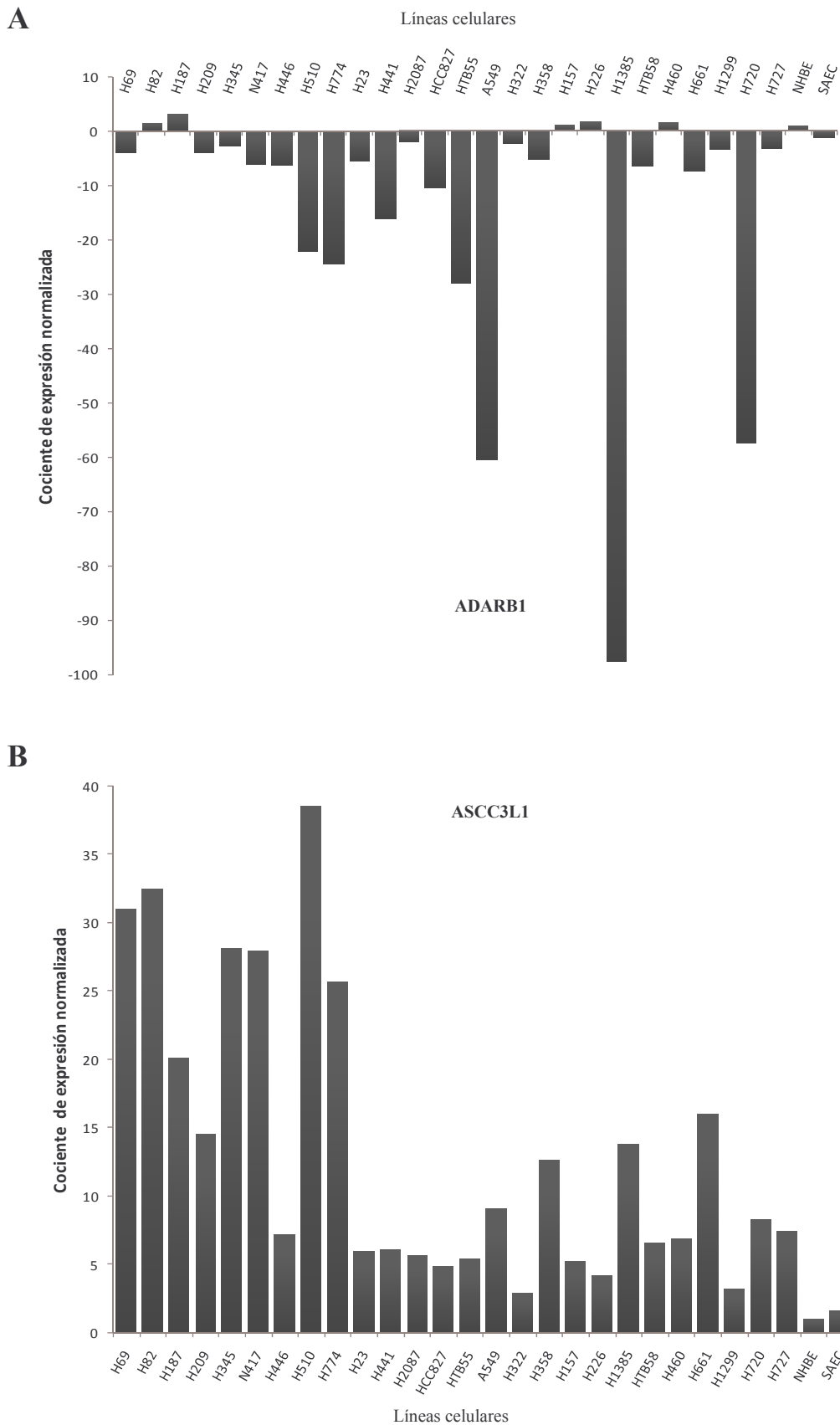


Figura 15. Cociente de expresión normalizada de ADARB1 (A) y ASCC3L1 (B) en líneas celulares de pulmón por RT-PCR a tiempo real. En abscisas se representan las muestras; en ordenadas, los cocientes de las expresiones normalizadas (respecto al gen control HPRT) entre las líneas tumorales y las células normales. Los valores negativos se obtuvieron tras realizar una transformación inversa negativa en los resultados cuyo cociente resultó estar comprendido entre 0 y 1.

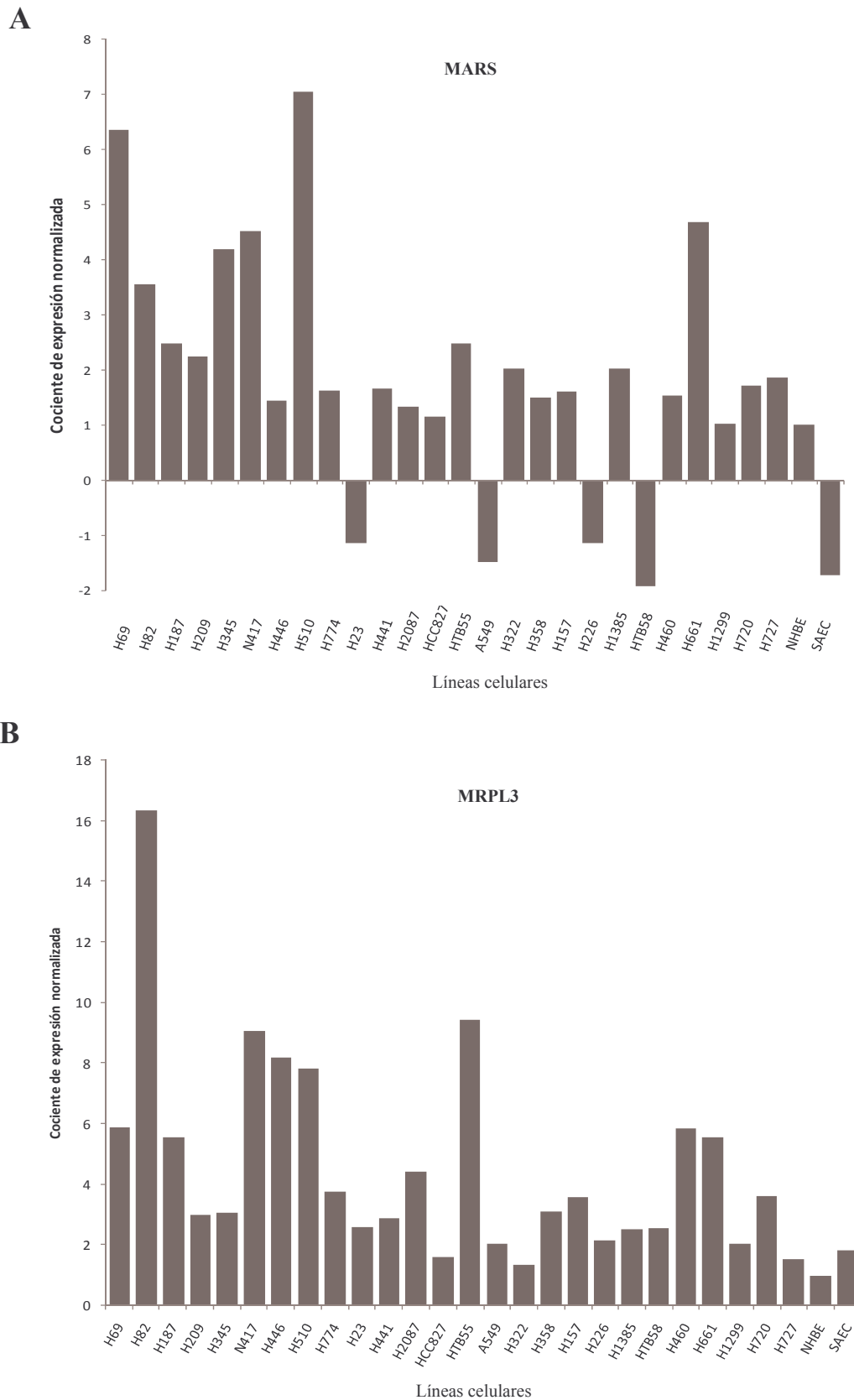


Figura 16. Cociente de expresión normalizada de MARS (A) y MRPL3 (B) en líneas celulares de pulmón por RT-PCR a tiempo real. En abscisas se representan las muestras; en ordenadas, los cocientes de las expresiones normalizadas (respecto al gen control HPRT) entre las líneas tumorales y las células normales. Los valores negativos se obtuvieron tras realizar una transformación inversa negativa en los resultados cuyo cociente resultó estar comprendido entre 0 y 1.

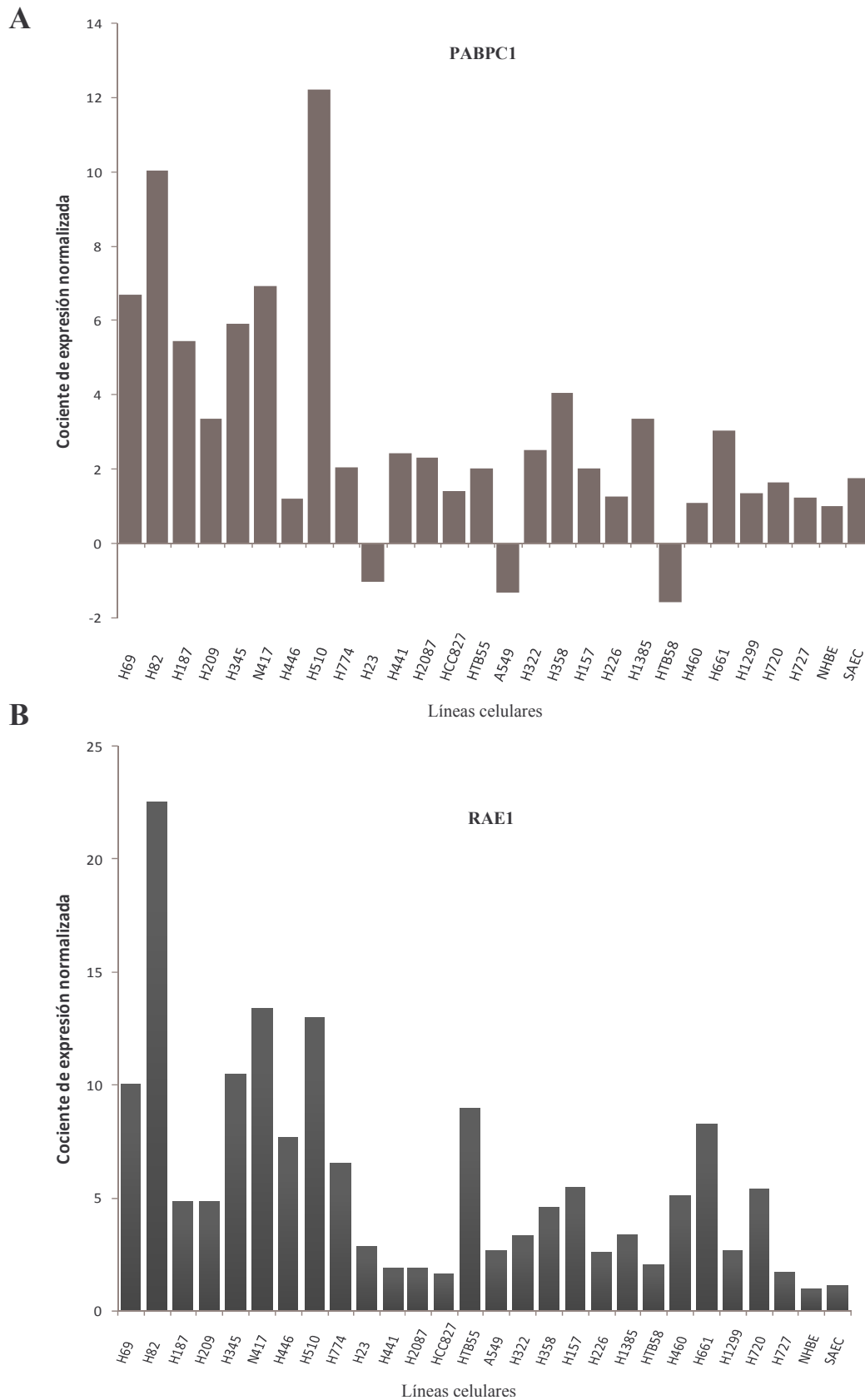


Figura 17. Cociente de expresión normalizada de PABPC1 (A) y RAE1 (B) en líneas celulares de pulmón por RT-PCR a tiempo real. En abscisas se representan las muestras; en ordenadas, los cocientes de las expresiones normalizadas (respecto al gen control HPRT) entre las líneas tumorales y las células normales. Los valores negativos se obtuvieron tras realizar una transformación inversa negativa en los resultados cuyo cociente resultó estar comprendido entre 0 y 1.

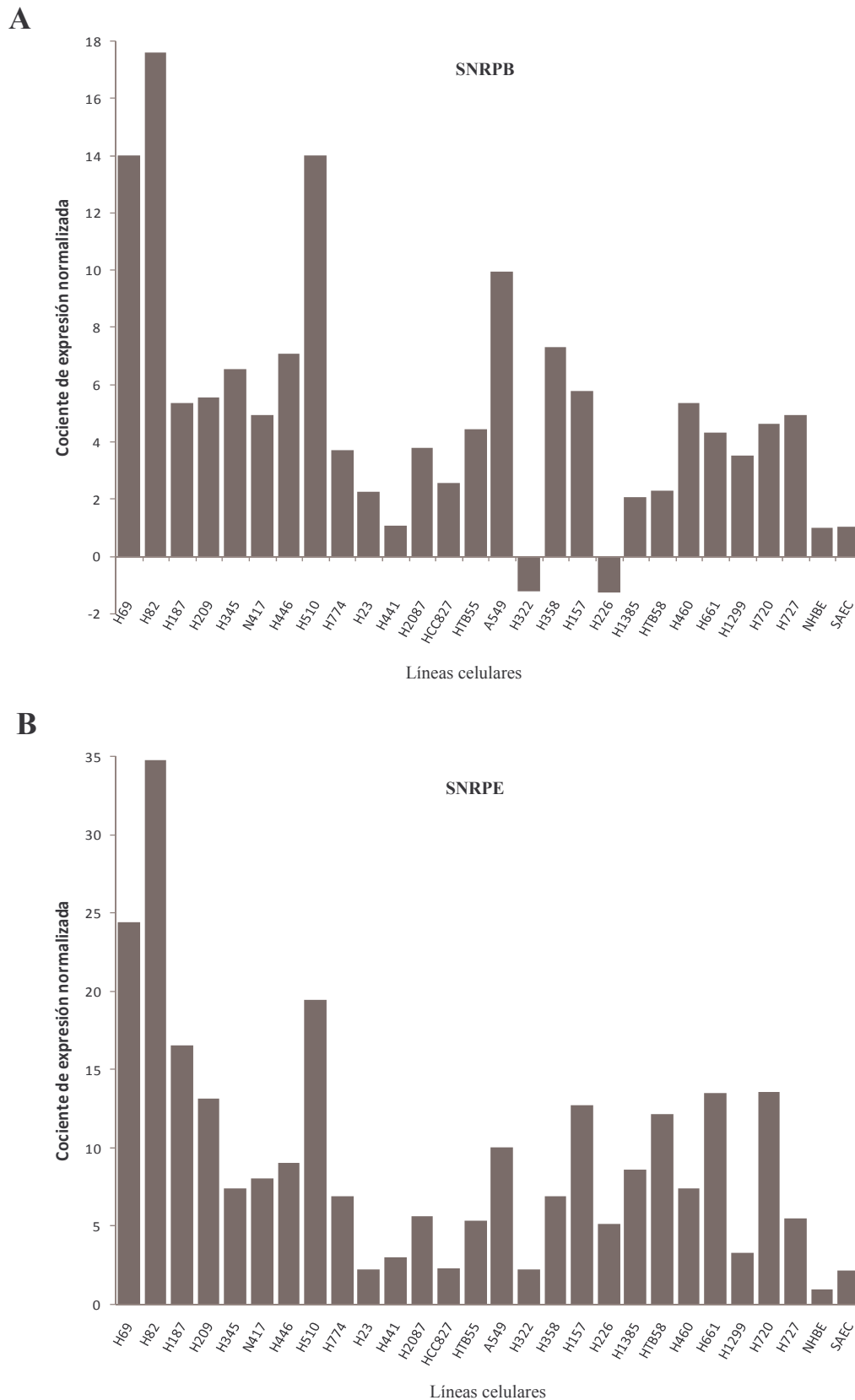


Figura 18. Cociente de expresión normalizada de SNRPB (A) y SNRPE (B) en líneas celulares de pulmón por RT-PCR a tiempo real. En abscisas se representan las muestras; en ordenadas, los cocientes de las expresiones normalizadas (respecto al gen control HPRT) entre las líneas tumorales y las células normales. Los valores negativos se obtuvieron tras realizar una transformación inversa negativa en los resultados cuyo cociente resultó estar comprendido entre 0 y 1.

3. Validación *in silico* de los resultados

Aprovechando la publicación de los resultados de un nuevo análisis de *microarrays* de expresión en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (Yap y col., 2005), se decidió validar también *in silico* los genes seleccionados hasta entonces. Para ello, se realizó un nuevo análisis bioinformático de iguales características al anterior. Los ocho genes previamente estudiados mostraron nuevamente una expresión diferencial entre tejido tumoral y normal de pulmón (**Tabla 20**).

Además, la realización de este segundo estudio estadístico permitió detectar diferencias de expresión, entre las muestras normales y tumorales, en otro gen relacionado con el metabolismo del RNA: **PTB** (*Polypyrimidine tract-binding protein 1*). Los valores promedio de *fold-change* y nivel de significación de los nueve genes en este segundo análisis informático se resumen en la **Tabla 20**. En el caso de PTB, se observa que presenta sobre-expresión en las muestras tumorales de pulmón en comparación con las normales. De hecho, cinco de las seis sondas que representan al gen en el *microarray* mostraron diferencias significativas.

Gen	Nivel de significación (p)	<i>Fold-change</i>
ADARB1	< 0.001	-1.179
ASCC3L1	< 0.001	1.066
MARS	0.006	1.147
MRPL3	< 0.001	1.852
PABPC1	< 0.001	1.455
PTB	0.002	0.866
RAE1	0.002	0.937
SNRPB	0.002	1.269
SNRPE	0.004	1.028

Tabla 20. Validación estadística de los genes seleccionados tras el primer análisis bioinformático y el estudio de expresión basal de mRNA en líneas celulares de pulmón. Se muestran el nivel de significación (p) y el *fold-change* promedio de las sondas que representan a cada gen en el cuarto *microarray* utilizado (Yap y col., 2005). En la tabla se incluye un gen adicional (PTB) que también presentó valores significativos de expresión diferencial en esta validación de los datos.

A continuación, se estudió la expresión de PTB en las tres bases de datos utilizadas inicialmente en este estudio. En el *microarray* utilizado por Beer y col. en 2001, este gen no está representado por ninguna sonda. En la plataforma empleada por Bhattacharjee y col. en 2001 y por Dehan y col. en 2005, tan sólo una sonda permite estudiar la expresión de PTB. En el caso de Bhattacharjee y col., el análisis de la expresión del gen en muestras normales frente al conjunto de las muestras tumorales no fue significativo ($p=0.247$), aunque sí lo fue en el caso de las muestras de tumores escamosos ($p=0.001$). En cuanto a los datos proporcionados por Dehan y col., el análisis estuvo próximo a la significación en la comparación de todas las muestras tumorales con las normales ($p=0.055$) y fue significativo para el caso de los adenocarcinomas ($p=0.029$). Teniendo en cuenta estos resultados y el hecho de que los datos obtenidos con las sondas del análisis de Yap y col. son mucho más robustos, se decidió seleccionar también el gen PTB para nuestro estudio.

Posteriormente, al igual que se hizo anteriormente con los otros ocho genes identificados, se procedió a la caracterización de la expresión del mRNA de PTB mediante RT-PCR a tiempo real, en líneas tumorales y células normales de pulmón (**Figura 19**).

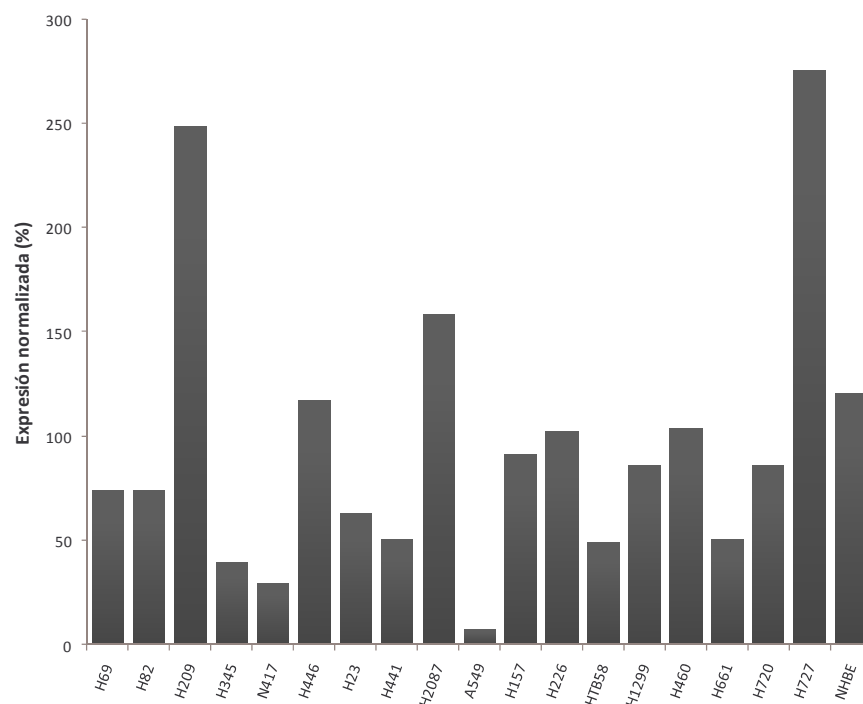


Figura 19. Expresión normalizada de PTB en líneas celulares y células normales de pulmón SAEC, mediante RT-PCR a tiempo real. En abscisas se representan las muestras y en ordenadas la expresión normalizada respecto al gen control HPRT.

Por lo tanto, en esta primera parte del estudio se puede concluir que, mediante análisis informático y validación en líneas tumorales de pulmón, se han identificado nueve genes relacionados con el metabolismo del RNA cuya expresión está alterada en el cáncer de pulmón. Uno de ellos presenta una disminución de su expresión en los tumores, mientras que los otros ocho se sobre-expresan.

A continuación se decidió profundizar en la implicación en cáncer de pulmón de algunos de estos genes. Se seleccionaron para ello los genes ADARB1 y PTB. El gen ADARB1 fue el único identificado cuya expresión está claramente disminuida en el cáncer de pulmón. Por otro lado, PTB, como se comentará en *Discusión*, es un gen cuya expresión está controlada por α CP-4, un posible gen supresor de la carcinogénesis pulmonar con el que nuestro grupo ha trabajado en los últimos años (Pío y col., 2004; Castaño y col., 2008). El resto de genes identificados serán objeto de estudio en futuros trabajos de nuestro grupo.

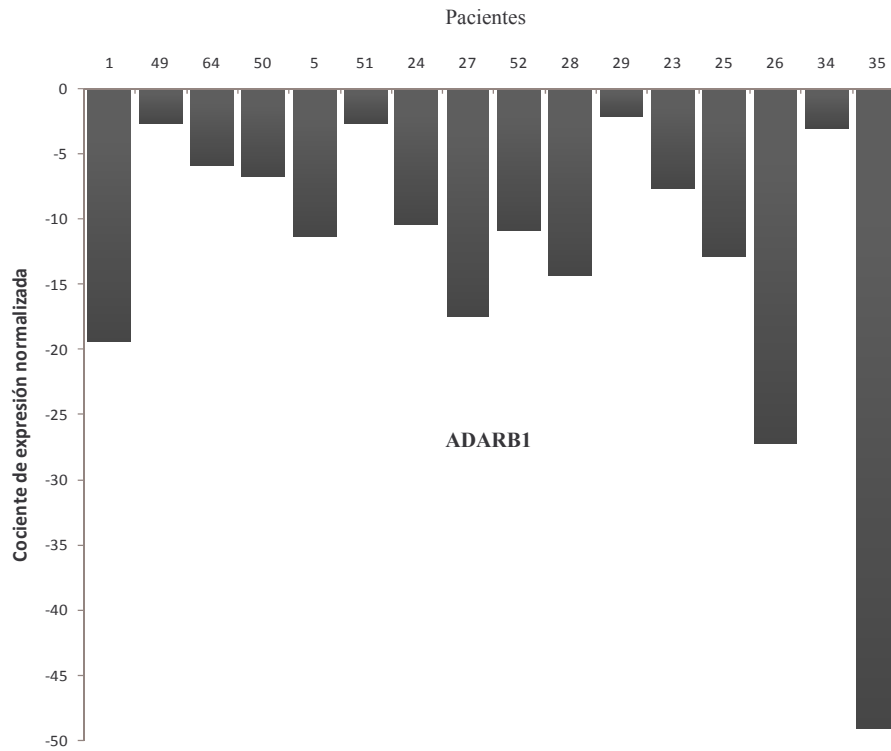
4. Análisis de la expresión del mRNA de ADARB1 y PTB en pacientes con cáncer de pulmón

Mediante RT-PCR a tiempo real, se analizó el nivel de expresión del mRNA de ADARB1 y PTB en muestras clínicas procedentes de pacientes con cáncer de pulmón. Al igual que para las líneas celulares, se determinó si los genes de interés se sobre-expresaban o se inhibían en los tumores, aunque en esta ocasión el cociente utilizado se obtuvo al dividir la expresión normalizada del tejido tumoral por la de su correspondiente pareado normal, obtenido en el mismo paciente.

La expresión de **ADARB1** en pacientes con cáncer de pulmón fue claramente inferior en las muestras tumorales que en las de pulmón normal, confirmando por tanto el descenso observado en los *microarrays* y en las líneas celulares. Los 16 pacientes estudiados presentaron una disminución en la expresión de ADARB1 que osciló entre 2 y 49 veces (**Figura 20A**).

En cuanto a **PTB**, no se vieron grandes diferencias de expresión entre el tejido normal y el tumoral. Algunos pacientes presentaron mayor expresión en el tumor, mientras que otros presentaron una mayor expresión en el tejido normal. En cualquier caso, las diferencias de expresión entre tejidos no fueron tan pronunciadas como en el caso de ADARB1 (**Figura 20B**).

A



B

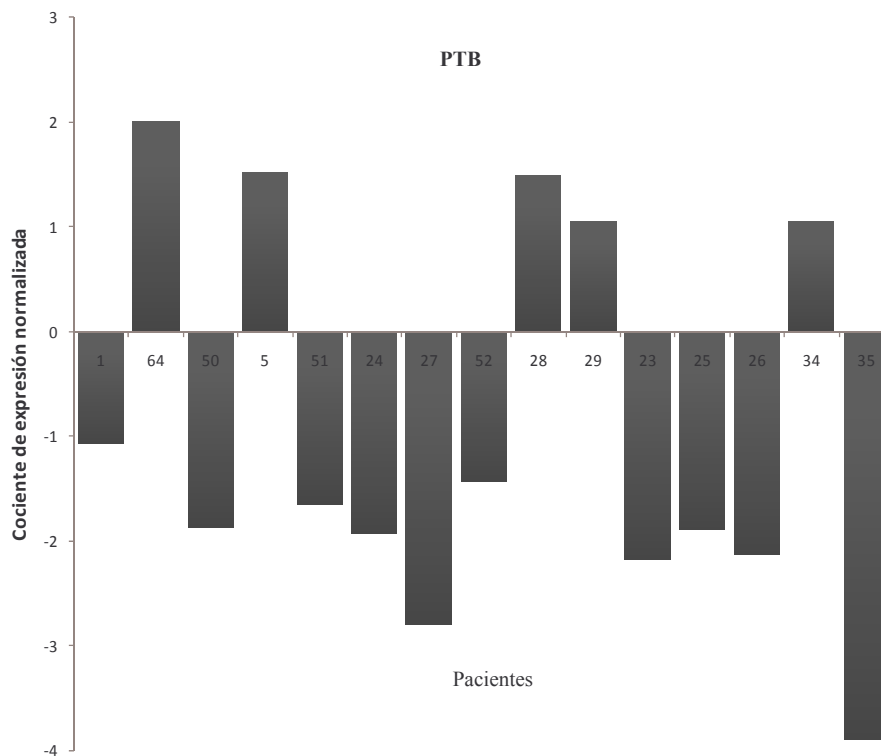


Figura 20. Cociente de expresión normalizada de ADARB1 (A) y de PTB (B) en pacientes con cáncer de pulmón, determinado por RT-PCR a tiempo real. En abscisas se representan los pacientes y en ordenadas los cocientes de las expresiones normalizadas (respecto a HPRT) entre las muestras tumorales y las normales. Los valores negativos se obtuvieron tras realizar una transformación inversa negativa en los resultados cuyo cociente resultó estar comprendido entre 0 y 1.

5. Estudios de expresión basal de las proteínas ADARB1 y PTB

La proteína **ADARB1** se expresa de manera abundante en todo el sistema nervioso central (SNC), sobre todo en cerebro y cerebelo, tanto en humanos como en otras especies, especialmente en roedores (Valente y col., 2005). Además, el grado de homología entre las proteínas ADARB1 humana y de otras especies es, en términos generales, de más del 90%, siendo del 95% en el caso de la rata (Slavov y col., 2002).

Por ello, para poner a punto la técnica de *western blot* para ADARB1, utilizamos inicialmente extractos de proteínas de cerebro de rata. Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo H-90 anti-ADAR2 de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology. Este anticuerpo tiene como diana el epítipo formado por los aminoácidos 281-370 de la proteína humana (gi: 7669477). En estos 90 aminoácidos, las secuencias de las proteínas humana y de rata (gi: 161377407) difieren tan sólo en 6 posiciones (295, 296, 310, 311, 336 y 353) (fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por lo que el anticuerpo es capaz de detectar el epítipo en ambas especies.

En la **Figura 21** se muestra el *western blot* de la muestra de cerebro de rata, realizado en condiciones tanto reductoras como no reductoras. La banda, que se corresponde con la proteína ADARB1 de rata, se localiza a la altura adecuada, pues su tamaño es de unos 78 kDa. Como era de esperar, la proteína presenta sólo localización nuclear. No se observaron diferencias entre el uso o no de tratamiento reductor.

Posteriormente, se procedió a analizar la expresión basal de la proteína ADARB1, para comprobar si existía correlación con los datos de expresión de su mRNA y con los resultados bioinformáticos. En concreto, se quiso confirmar la menor presencia de ADARB1 en líneas celulares respecto a células NHBE y SAEC. Se utilizaron extractos totales, nucleares y citoplasmáticos de todas las células y se llevó a cabo un barrido de la expresión por medio de *western blot*, utilizando el anticuerpo puesto a punto con la muestra de cerebro de rata.

Sin embargo, no fue posible detectar la expresión de la proteína ADARB1 en ninguna muestra. También se intentó llevar a cabo la detección con un anticuerpo generado en cabra por la misma casa comercial, pero tampoco se obtuvieron resultados positivos. Por ello, concluimos que el nivel de expresión de ADARB1 está por debajo del límite de detección de la técnica empleada.

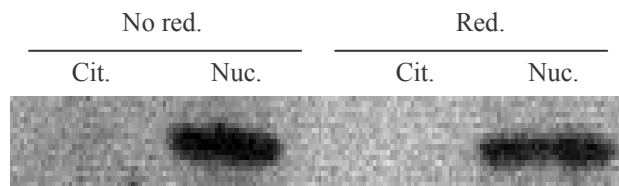


Figura 21. *Western blot* correspondiente a la expresión de ADARB1 en extractos nucleares (Nuc.) y citoplasmáticos (Cit.) de cerebro de rata. La prueba se realizó por duplicado, sometiendo a las muestras a un tratamiento reductor (Red.) o no reductor (No red.). Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo *H-90 anti-ADAR2* de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology.

En cuanto a **PTB**, se realizó un barrido similar de la expresión de su proteína en varias líneas celulares y en células normales SAEC. Con esta finalidad y una vez puesta a punto la técnica, se emplearon extractos nucleares y se sometieron las muestras a tratamiento reductor. En la **Figura 22** se muestran los resultados obtenidos. Se obtuvieron dos bandas específicas, correspondientes a las dos isoformas principales de la proteína PTB (de 57 y 60 kDa), consecuencia de un proceso de *splicing* alternativo (Gil y col., 1991).

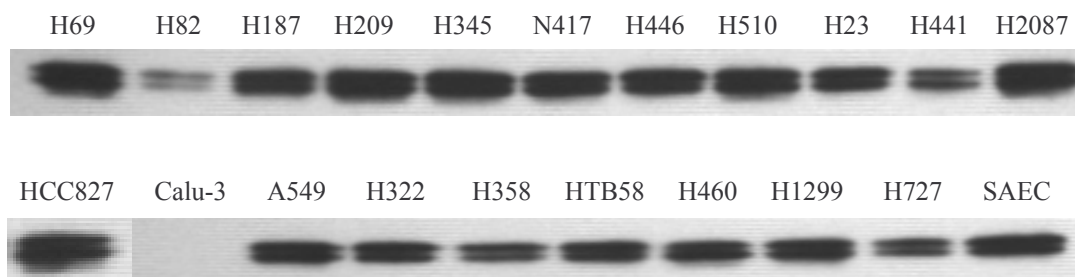


Figura 22. Expresión de la proteína PTB mediante *western blot* en líneas celulares de cáncer de pulmón y en células SAEC. Se emplearon extractos nucleares y se sometieron las muestras a tratamiento reductor. Las bandas se corresponden con las dos isoformas principales de la proteína (57 y 60 kDa). El anticuerpo utilizado fue *Anti-Polypyrimidine Tract Binding Protein (Ab-1) Mouse mAb (SH54)*, de la casa comercial Calbiochem. Los niveles de expresión del control, la proteína nuclear lamina A/C, se mantuvieron estables entre las distintas muestras empleadas.

Los niveles de expresión de la proteína fueron elevados en la mayoría de las líneas celulares, así como en las células SAEC. No se detectaron diferencias significativas globales entre la expresión en estas células normales y en las líneas tumorales de pulmón.

6. Estudio de la expresión de isoformas de ADARB1

Se han descrito diversas variantes, algunas sólo teóricas, para los transcritos de ADARB1 (Kawahara y col., 2005). En este trabajo estudiamos la expresión en cáncer de pulmón de dos de las isoformas mejor caracterizadas.

6.1. Isoformas con / sin el exón 6

Una de las isoformas más estudiadas del mRNA de ADARB1 es la presencia o ausencia del exón 6, que constituye una inserción Alu.

Con objeto de conocer las cantidades relativas aproximadas de transcritos con el exón 6 y sin él en líneas celulares de pulmón y cultivos primarios, se realizó una RT-PCR convencional que amplificara una región de cDNA donde se encuentra el exón 6 (**Figura 23**).

De los resultados obtenidos se concluyó que las isoformas que contienen el exón 6 son mayoritarias en las células de pulmón normal (NHBE y SAEC) y en las líneas tumorales que expresan ADARB1.

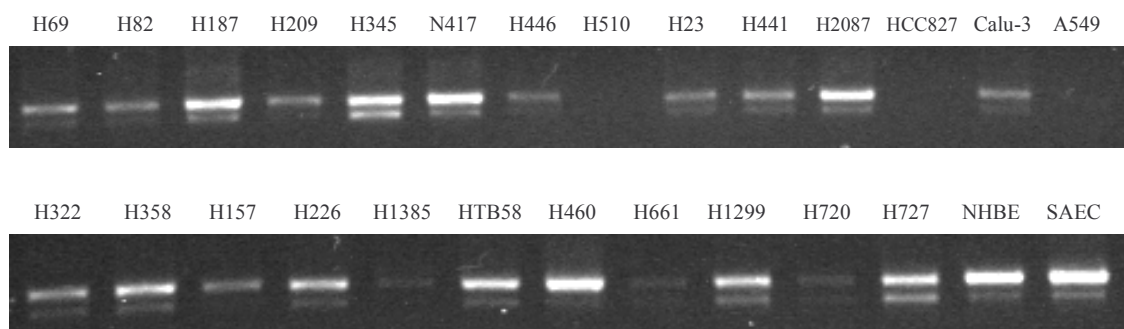


Figura 23. Expresión de las isoformas de ADARB1 con y sin el exón 6 en líneas celulares de pulmón y en células normales NHBE y SAEC. La banda superior (865 pb) corresponde a las isoformas con el exón 6; la banda inferior (745 pb), a las isoformas que no lo contienen.

En la bibliografía se ha descrito que las isoformas con el exón 6 pueden ser hasta un 50% menos activas que las isoformas sin este fragmento (Gerber y col., 1997). Como se verá más adelante, este hecho se tuvo en cuenta a la hora de sobre-expresar la proteína de ADARB1, para valorar posibles diferencias entre isoformas en estudios funcionales.

6.2. Isoformas con / sin un fragmento del intrón 1

Otra de las isoformas descritas en el mRNA de ADARB1 consiste en la inclusión de un fragmento de 47 nucleótidos del intrón 1, tras el primer exón, como consecuencia de un proceso de corte y empalme alternativo. Este fenómeno vendría condicionado por una edición previa, por parte de la proteína ADARB1, de su propio mRNA (auto-edición).

Para conocer el nivel de auto-edición basal en líneas celulares de pulmón y cultivos primarios, se llevó a cabo un barrido mediante RT-PCR convencional (**Figura 24**). A tenor de los resultados obtenidos, puede concluirse que no se da el proceso de auto-edición en ninguna de las muestras estudiadas (ni en las células normales ni en las tumorales), pues sólo se observa una única banda de amplificación.

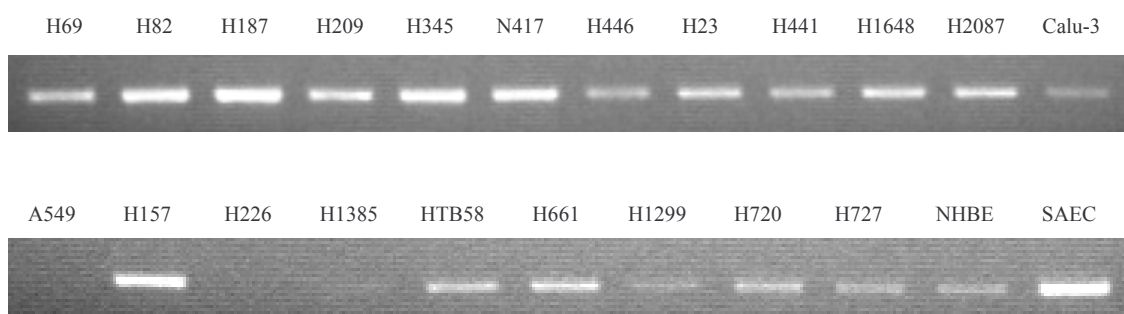


Figura 24. Estudio del nivel basal de auto-edición del mRNA de ADARB1 en líneas celulares de pulmón y en células de pulmón normal NHBE y SAEC.

Como se verá más adelante (**apartado 9.3.2.**), la presencia o ausencia de esta isoforma alternativa puede aprovecharse como forma de medir la actividad funcional de ADARB1, en este caso a través de la auto-edición (Maas y col., 2001).

7. Estudio de alteraciones genéticas en la región cromosómica de ADARB1

7.1. Análisis de la pérdida de heterocigosidad (LOH)

En un estudio previo (Lee y col., 2003) se identificaron regiones de LOH, mediante el análisis de microsatélites, en el brazo largo del cromosoma 21 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Debido a que en nuestro estudio demostramos una significativa disminución de ADARB1 en cáncer de pulmón y ya que este gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 21, se planteó la posibilidad de que este descenso de expresión se debiese a la pérdida de material genético en torno a su locus.

Sin embargo, el estudio de Lee y col. no cubría la región **21q22.3**, donde se ubica ADARB1, por lo que hasta la fecha no existía ninguna información sobre alteraciones genéticas de esta región en cáncer de pulmón.

Con objeto de determinar si en nuestras muestras se producía LOH en 21q22.3, se realizó un estudio de varios microsatélites y un SNP, tanto en líneas celulares como en muestras tumorales y normales de pacientes con cáncer de pulmón.

En el estudio de **microsatélites**, se realizaron PCR para cada muestra y microsatélite y los productos obtenidos se separaron por tamaño mediante electroforesis capilar. El análisis de los resultados consistió en interpretar el patrón electroforético. La presencia de un solo pico principal (un producto de amplificación) en el intervalo de longitudes de amplicón típicas de cada microsatélite reveló muestras homocigotas (no informativas), mientras que las muestras con dos picos principales (dos productos de amplificación de diferente tamaño) se interpretaron como heterocigotas y, por tanto, informativas.

En el caso de las líneas celulares, los estudios de microsatélites sirvieron para describir su condición homocigota o heterocigota, pero no para determinar LOH, al no disponer del material sano del mismo individuo. Por su parte, las muestras correspondientes a pacientes sí pudieron ser objeto de valoración de LOH, siempre y cuando las muestras derivadas de tejido normal fueran heterocigotas. En estos casos, la forma de decidir si para un microsatélite en concreto había LOH en un paciente dado, fue mediante comparación de las áreas de los picos obtenidos, cada uno correspondiente a un alelo, en la muestra normal y en su correspondiente tumoral (**Figura 25**). Se consideró que existía LOH cuando el cociente entre estas áreas fue menor de 0.5 o mayor de 2:

$$0.5 > (N_1/N_2) / (T_1/T_2) \text{ ó}$$

$$(N_1/N_2) / (T_1/T_2) > 2$$

(N₁ y N₂: Áreas de los picos de los alelos en la muestra normal;

T₁ y T₂: Áreas de los picos de los alelos en la muestra tumoral)

Si el cociente estaba comprendido entre 0.5 y 2, se concluyó que en la muestra tumoral había retención de heterocigosidad respecto a la muestra normal.

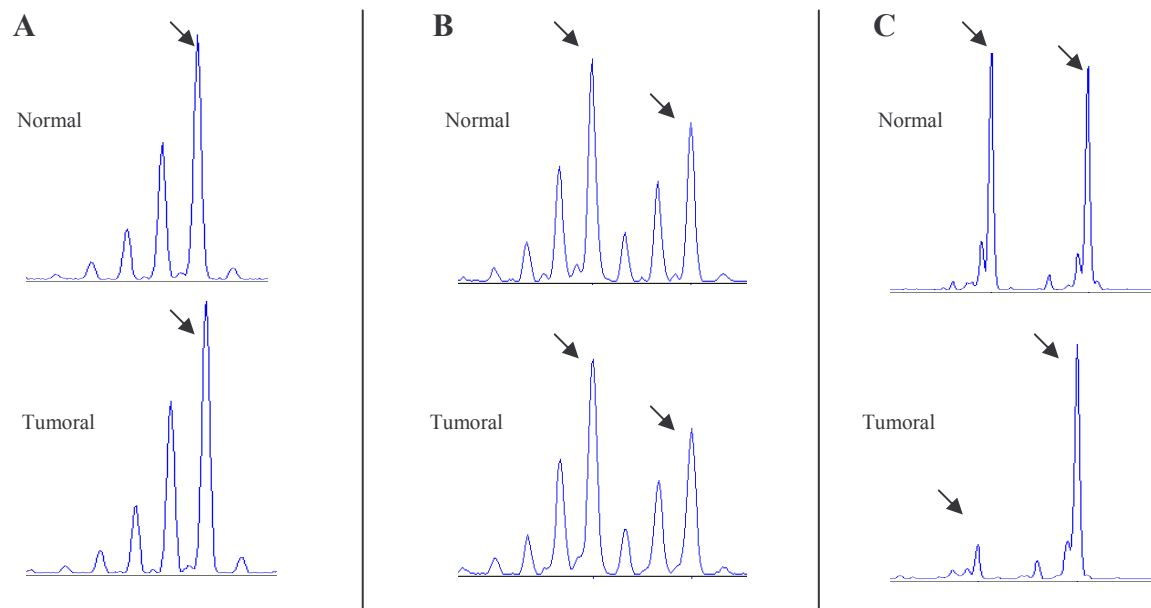


Figura 25. Estudio de microsatélites y LOH en 21q22.3. Se muestran ejemplos representativos de un caso no informativo (A), una retención de heterocigosidad (B) y una LOH (C), de los microsatélites D21S1890, D21S171 y D21S1446, respectivamente. Las flechas indican los picos correspondientes a la amplificación del microsatélite.

Por otro lado, ADARB1 presenta, entre otros, el polimorfismo de nucleótido único (SNP) **rs1051367** (A/G), por lo que también se estudió la posible pérdida de su locus en el cromosoma 21 mediante la caracterización de este SNP. Para ello, se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento de gDNA que contiene el SNP y se secuenció el producto obtenido para determinar el nucleótido presente en cada uno de los alelos. Al igual que en los microsatélites, ni las líneas celulares ni los individuos homocigotos dan información sobre la presencia de LOH.

En la **Figura 26** se muestran los resultados obtenidos en el estudio de 8 microsatélites localizados en 21q22.3 y del SNP rs1051367 de ADARB1 en la batería de líneas celulares de cáncer de pulmón. En el **Anexo IV** se recoge la caracterización de cada una de las líneas celulares para el SNP rs1051367.

Microsatélite /SNP	Línea celular																										
	H69	H62	H187	H209	H345	N417	H446	H774	H23	H441	H1648	H2087	H827	Calu-3	A549	H322	H358	H157	H226	H1385	HTB58	H460	H661	H1299	H720	H727	
D21S1235	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D21S1224	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D21S1411	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D21S1259	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D21S1912	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D21S171	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
SNP rs1051367	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D21S1574	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
D21S1446	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red

Figura 26. Estudio de microsatélites y del SNP rs1051367 de ADARB1 en líneas celulares de pulmón. Se muestran las líneas utilizadas y los microsatélites, ordenados según su localización cromosómica (desde el más centromérico hasta el más telomérico). Rojo: Situación de heterocigosidad; verde: situación de homocigosidad.

Los datos obtenidos mostraron que siete líneas (H774, H23, HCC-827, A549, H322, H1385 y H1299) son homocigotas para todos los microsatélites estudiados y para el SNP rs1051367 de ADARB1. Como se ha comentado anteriormente, no es posible analizar la pérdida de heterocigosidad de los microsatélites en las líneas celulares. Sin embargo, estos datos sugieren de manera muy clara que en estas líneas existe LOH en la región cromosómica 21q22.3, ya que la probabilidad de que haya homocigosidad para todos los microsatélites es extremadamente baja, si se tienen en cuenta las frecuencias poblacionales de sus alelos (hay que recordar que se buscaron microsatélites que tuvieran la máxima heterocigosidad posible; ver **Tabla 12**, en *Material y Métodos*).

Por otra parte, las demás líneas celulares presentan variabilidad en cuanto a su condición homocigota o heterocigota para los microsatélites. Por ejemplo, HTB-58 es heterocigota para todos los microsatélites y para el SNP de ADARB1, por lo que en esta línea hay retención de heterocigosidad en toda la región analizada. Sin embargo, en general predominan los casos de líneas con mayoría de microsatélites con dos tipos de alelos, respecto a las que sólo tienen uno. Además, parecen alternarse regiones homocigotas con otras heterocigotas, sugiriendo áreas discontinuas de pérdida de heterocigosidad, lo cual ocurre, por ejemplo, en las líneas H157, H661 y H345. En estos dos últimos casos se podría sugerir una pérdida específica de material genético en el extremo terminal del cromosoma.

En cuanto a la posible correlación entre la LOH (**Figura 26**) y la expresión relativa de ADARB1 en las líneas celulares (**Figura 15A**), todas las líneas celulares con probable pérdida de heterocigosidad en la región cromosómica de ADARB1 (H774, H23, HCC-827, A549, H322, H1385 y H1299) presentaron niveles más bajos de expresión de la proteína que las células normales NHBE. De hecho, dos de las tres líneas con mayor pérdida de expresión se encuentran en este grupo. Por otro lado, las cinco líneas celulares con una mayor expresión de ADARB1 (H82, H187, H157, H226 y H460) mostraron una retención de heterocigosidad en la región analizada.

Posteriormente se llevó a cabo el estudio de LOH en muestras de 48 pacientes con cáncer de pulmón, utilizando tanto tejido tumoral como tejido normal de cada paciente. Para ello, se analizaron 10 microsatélites. El porcentaje de pacientes que presentó LOH fue muy alto (30-40%) y resultó similar entre los distintos microsatélites estudiados (**Figura 27**).

Asimismo, la secuenciación de las muestras clínicas permitió determinar la homocigosidad o heterocigosidad para el SNP rs1051367. De los 48 pacientes analizados, 20 fueron heterocigotos para el SNP y por lo tanto pudieron ser utilizados para determinar la presencia de LOH en ADARB1 (**Figuras 27 y 28**). Además, el SNP fue estudiado en 11 pacientes más. Los resultados obtenidos en los 59 pacientes se muestran en la **Tabla 21**. De los 25 individuos heterocigotos en total, 17 presentaron homocigosidad en el tumor, lo que demuestra claramente la presencia de LOH. Por tanto, el porcentaje de pacientes con LOH fue del 68%.

Asumiendo que una pérdida de material genético al azar afecta a los alelos de forma indistinta, un dato interesante que se observa en la **Tabla 21** es que en los pacientes con LOH el número de casos en los que se conserva el alelo con el nucleótido G (12) es más del doble que el número de casos para el alelo con el nucleótido A (5). Repasando los datos obtenidos, se comprobó que ocurría lo mismo en líneas celulares, donde se vio también una mayor presencia del alelo G (**Anexo IV**). Este hecho se tuvo en cuenta posteriormente a la hora de estudiar la posible implicación funcional de ADARB1, por lo que se construyeron vectores tanto con el alelo A como con el alelo G.

No se observó ninguna correlación entre los casos de LOH y el tipo histológico o el estadio de los tumores de los pacientes. En cuanto a la posible relación entre la pérdida de heterocigosidad y la pérdida de expresión en los tumores, no fue posible sacar ninguna conclusión. Esto fue debido a que únicamente en 11 pacientes se pudo estudiar tanto la LOH (**Figura 27**) como la expresión de ADARB1 (**Figura 20A**) y únicamente en dos de ellos existía una clara LOH (pacientes 5 y 24). Sí se pudo concluir que la LOH no es imprescindible para que se produzca una reducción en la expresión de ADARB1 respecto a la célula normal, ya que existen casos claros de retención de heterocigosidad con niveles muy bajos de ADARB1 (por ejemplo, el paciente 26). Esto sugiere la existencia de mecanismos alternativos de inhibición de la expresión.

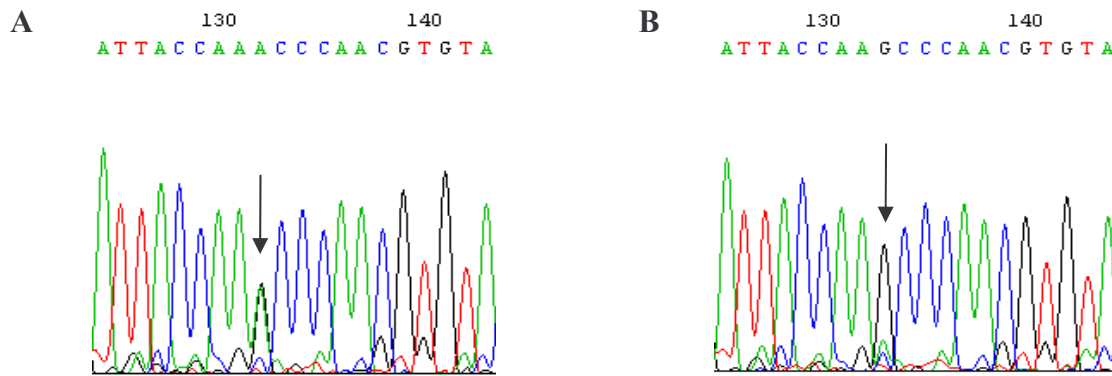


Figura 28. Ejemplo representativo de un caso de LOH en un paciente para el SNP de ADARB1 estudiado (rs1051367). La muestra normal (A) presenta heterocigosidad (AG) en el SNP. En la muestra tumoral del mismo individuo (B) la secuenciación da solamente un pico (G), por lo que se ha producido la pérdida de uno de los alelos.

A		B		
Genotipo normal	Nº casos	Genotipo tumoral	Nº casos	LOH
A	14	A	5	Sí
G	20	G	12	
AG	25	AG	8	No

Tabla 21. Genotipos de las muestras de pacientes para el polimorfismo de ADARB1. A) Muestras normales. B) Muestras tumorales cuyas pareadas normales resultaron heterocigotas (25 casos). Se indica el número de pacientes en los que se produjo LOH.

Por otro lado, aunque se observó una clara correlación entre los datos derivados del estudio de los microsatélites y los del análisis del SNP rs1051367 en los mismos pacientes, en este segundo estudio el porcentaje de casos con LOH fue muy superior (**Figura 27**). Es posible que esta diferencia fuera debida a una mayor sensibilidad de la técnica empleada para el SNP, aunque también se puede plantear la posibilidad de que la pérdida de material genético afecte más específicamente al locus de ADARB1.

Para tratar de averiguar si esta última posibilidad era correcta, se estudiaron en algunos pacientes otros **ocho SNP adicionales** localizados entre el SNP rs1051367 y los dos microsatélites más próximos (cuatro SNP a cada lado). Se incluyeron las muestras de aquellos casos clínicos en los que se había detectado LOH en el SNP rs1051367 y retención de heterocigosidad en los microsatélites D21S171 y D21S1574, o bien retención en uno de los dos, siendo el otro no informativo. Estos requisitos los cumplían los pacientes 13, 20, 28, 29, 37 y 43. Estos pacientes también presentaban retención de heterocigosidad para casi todos los demás microsatélites estudiados, según los datos de la **Figura 27**.

Además, se estudiaron los cuatro polimorfismos contenidos entre el SNP de ADARB1 y el microsatélite D21S171 en los pacientes 35 y 39, en los que todos los microsatélites estudiados habían presentado LOH, salvo D21S171, en el que había retención de heterocigosidad. Se pretendió estudiar si esta retención era fruto del azar o tenía otra explicación, ya que la probabilidad de que toda la región estudiada sufra LOH salvo en ese microsatélite es muy pequeña.

Los pacientes 2, 9, 15, 40 y 41 también presentaron LOH en la mayoría de los microsatélites, pero no se incluyeron en el estudio porque los que tenían retención quedaban más alejados de la región analizada.

Los resultados obtenidos en este último análisis se resumen en la **Figura 29**. Al observar los datos y valorar la posible especificidad en la pérdida de material genético en torno al locus de ADARB1, nos encontramos con dos situaciones: en la primera (pacientes 13, 20 y 28) se alternan regiones de LOH con regiones de retención; en la segunda (pacientes 29, 37 y 43), las regiones de pérdida parecen limitarse al locus de ADARB1 y a sus inmediaciones.

Por su parte, los cuatro SNP analizados en los dos pacientes con LOH en toda la región salvo el microsatélite D21S171, presentaron también LOH, con lo que se confirma que dicho microsatélite representa la única región estudiada en 21q22.3 que tiene retención de heterocigosidad en estas muestras.

Microsatélite / SNP	Pacientes							
	13	20	28	29	37	43	35	39
D21S171	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red
rs2072702	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green
rs760459	Yellow	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green
rs2838762	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Green
rs2838768	Red	Red	Green	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
rs1051367 (ADARB1)	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow
rs2838821	Green	Red	Yellow	Green	Yellow	Red	Grey	Grey
rs914210	Red	Red	Yellow	Green	Yellow	Red	Grey	Grey
rs9985044	Red	Green	Yellow	Red	Yellow	Red	Grey	Grey
rs2297291	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Red	Grey	Grey
D21S1574	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Green	Green

Figura 29. Estudio de SNPs en 21q22.3 en varios pacientes con cáncer de pulmón. Para cada uno de los casos clínicos se muestran los microsatélites y los polimorfismos estudiados, ordenados desde el más centromérico hasta el más telomérico. Amarillo: No informativo; rojo: retención de heterocigosidad; verde: LOH; gris: SNP no estudiado en ese paciente.

7.2. Búsqueda de mutaciones en el gen de ADARB1

Como ya se ha comentado anteriormente, los resultados obtenidos en el estudio de LOH sugerían la existencia de mecanismos alternativos de inhibición de la expresión de ADARB1. Por ello, se estudiaron algunos de estos posibles mecanismos adicionales. En primer lugar, se realizó un rastreo de mutaciones en el gen de ADARB1, en todas las líneas celulares de cáncer de pulmón del panel utilizado. Para ello, se llevaron a cabo diversas PCR que amplificaran los correspondientes exones del DNA genómico de ADARB1, secuenciándose en ambos sentidos los productos resultantes.

La comparación de las secuencias obtenidas con la empleada como referencia (gi: 75709170) permitió detectar algunas alteraciones puntuales (**Figura 30** y **Tabla 22**). Las cuatro mutaciones halladas fueron distintas y se localizaron en posiciones diferentes. Además, todas ellas fueron mutaciones en uno sólo de los alelos.

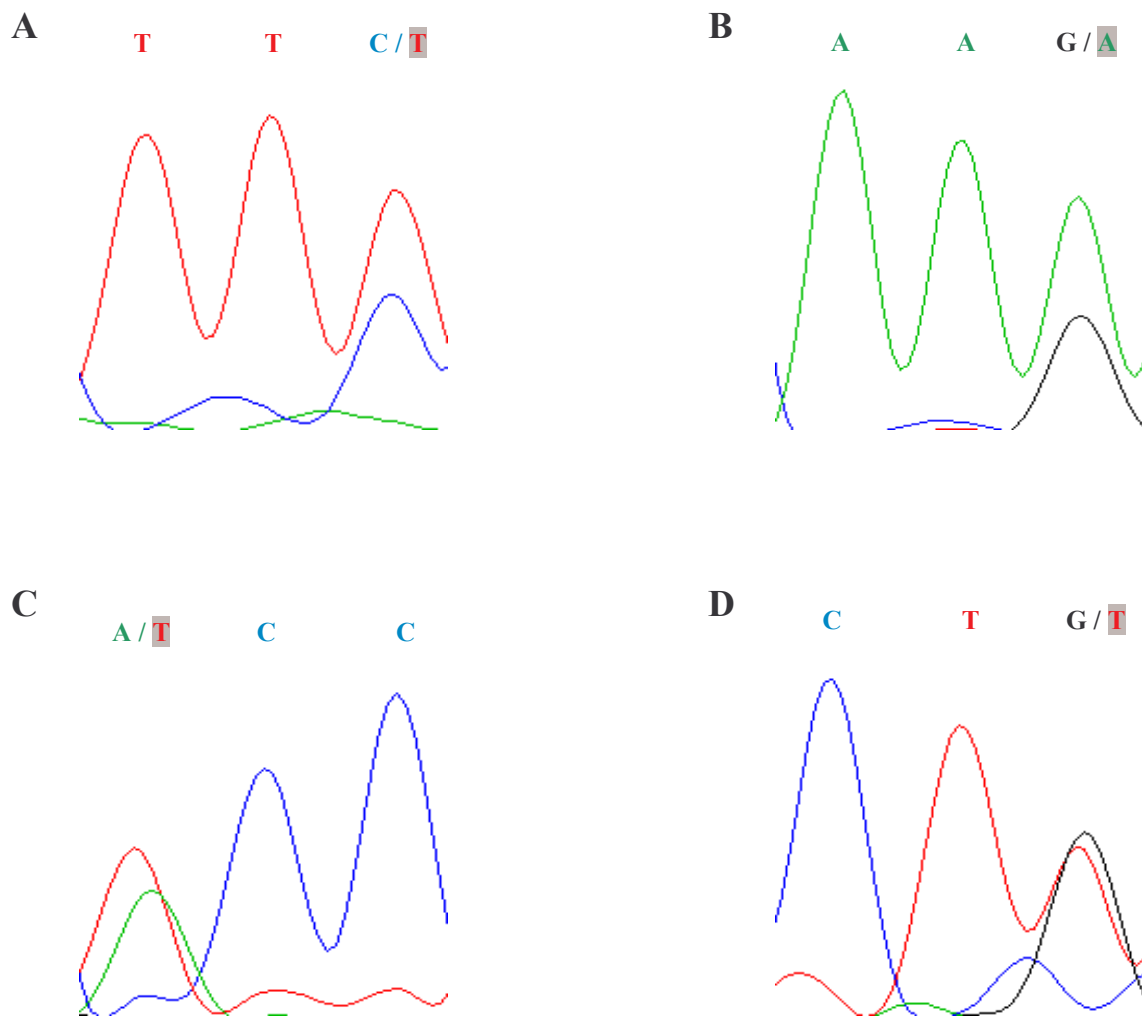


Figura 30. Mutaciones en el gen de ADARB1. Se muestran los cambios puntuales hallados, en el contexto de sus tripletes. El cambio introducido en cada caso aparece con fondo gris.

Mutación	Línea celular	Exón	Posición	Triplete		Aminoácido	
				<i>Wild-type</i>	Cambio	<i>Wild-type</i>	Cambio
A	H1648	2	1166	TTC	TTT	Phe	Phe
B	H358	2	1256	AAG	AAA	Lys	Lys
C	H82	5	1755	ACC	TCC	Thr	Ser
D	H446	9	2414	CTG	CTT	Leu	Leu

Tabla 22. Características de las mutaciones encontradas en el gDNA de ADARB1. Para cada mutación (representadas con las mismas letras A-D en la **Figura 30**), se indican la línea celular y el exón donde se localizaron, la posición del nucleótido afectado (respecto a la secuencia gi: 75709170), así como los tripletes y aminoácidos implicados, tanto en su forma nativa como en la mutación. En negrita aparece señalado el cambio introducido.

8. Estudio de alteraciones epigenéticas

Tras estudiar la LOH de la región 21q22.3 y las mutaciones del locus de ADARB1, el siguiente objetivo fue el análisis de la presencia o ausencia de alteraciones epigenéticas en esta misma localización cromosómica. En primer lugar, el estudio se centró en el gen de ADARB1, para luego extenderlo hacia otros genes en sus inmediaciones, en las regiones 21q22.3 y 21q22.2. Estos genes adicionales se eligieron teniendo en cuenta algunos resultados obtenidos previamente en nuestro grupo, pues se había encontrado un descenso de su expresión en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (datos no mostrados).

Se estudio la posible metilación del promotor de ADARB1 en las islas CpG, como un mecanismo que imposibilitara su transcripción y que explicase el descenso en la expresión de ADARB1 en muestras tumorales (descrito en el **apartado 2**). Para ello, se llevó a cabo una PCR específica de metilación (MSP), usando gDNA, de las líneas celulares de pulmón, tratado con bisulfito sódico. El estudio reveló que el promotor de ADARB1 no se encuentra metilado en ninguna de ellas (**Figura 31**). Por tanto, el mecanismo de inactivación por metilación no parece ser característico de este gen.

Algunos de los genes cercanos presentaron metilación en sus promotores en varias de las líneas celulares. En concreto, entre un 60 y un 100% de las líneas fueron positivas en la MSP para los genes ERG, ETS2, SNF1LK e ITGB2 (**Figura 31**). Para comprobar si la metilación del promotor en estos genes era un fenómeno específico de las células tumorales, se repitió la MSP, utilizando como controles negativos muestras de gDNA de sangre periférica y de las células normales NHBE y SAEC. Los genes ETS2, SNF1LK e ITGB2 presentaron bandas de amplificación en las tres muestras (datos no mostrados), sugiriendo que son genes metilados de manera constitutiva.

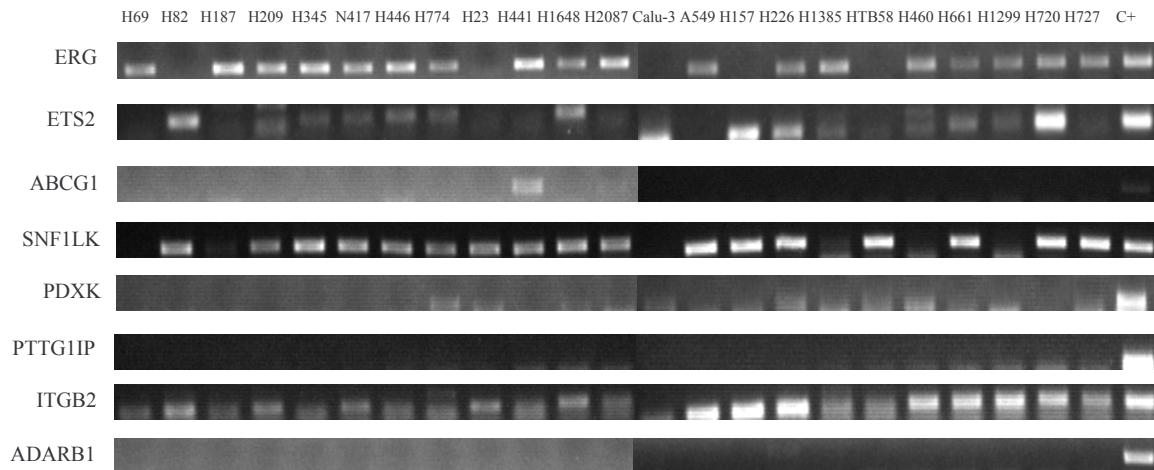


Figura 31. Estudio de metilación del promotor de diversos genes localizados en 21q22.2 y 21q22.3 mediante MSP en líneas celulares de pulmón. Se indica el panel de líneas utilizado y los genes rastreados. C+: Control positivo comercial de DNA totalmente metilado.

En el caso del gen ERG, no existe metilación de su promotor ni en las células normales de pulmón ni en sangre periférica, sugiriendo una metilación específica del tejido tumoral. Se realizó una MSP para este gen, utilizando cebadores específicos de secuencias de gDNA no metiladas, así como un estudio de la expresión basal de ERG en las mismas muestras (**Figura 32**). Los resultados no mostraron ninguna correlación entre la metilación y el descenso en la expresión del gen. El tratamiento con 5-Aza-2'-deoxicitidina de las líneas celulares H441 y A549 tampoco produjo cambios significativos en la expresión del gen (datos no mostrados).

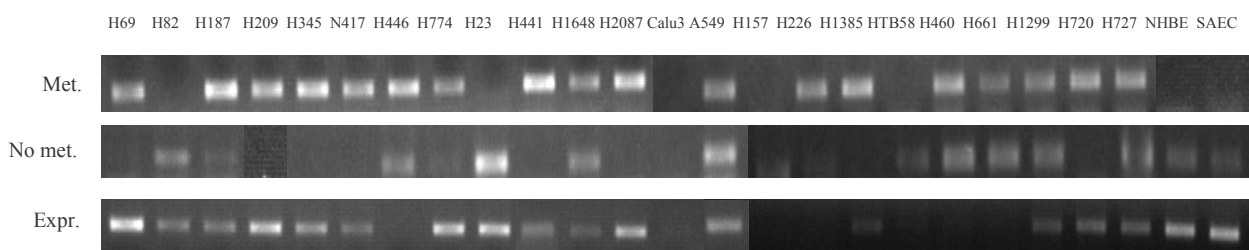


Figura 32. Estudio de metilación del promotor y expresión basal de ERG en líneas celulares de pulmón. Para cada una de las muestras, se indica el patrón de bandas obtenido en la MSP específica de secuencias metiladas (Met.), de secuencias no metiladas (No met.) y la expresión basal por RT-PCR convencional (Expr.).

9. Estudios funcionales de ADARB1 y PTB en cáncer de pulmón

Para estudiar la importancia funcional de ADARB1 y PTB en cáncer de pulmón se generaron líneas celulares con expresión alterada de estas proteínas. El objetivo era determinar si la sobre-expresión o la inhibición de ADARB1 o de PTB afectaba a algunas de las funciones de la célula tumoral. Para ADARB1, se consiguió tanto la sobre-expresión como la inhibición de la proteína. Sin embargo, no se pudo conseguir la sobre-expresión, ni transitoria ni estable, de la proteína PTB, aunque sí su inhibición.

9.1. Sobre-expresión de ADARB1 en líneas celulares

Se generaron cinco construcciones de DNA formadas por el vector de expresión comercial pcDNA3.1 (-). En una, el plásmido se mantuvo vacío (V); en las otras cuatro, se introdujeron distintas secuencias del cDNA de ADARB1. En concreto, los cuatro cDNA distintos se diferenciaron entre sí por la presencia del exón 6 (isoforma larga, o L) o su ausencia (isoforma corta, o C) y por la presencia de un alelo (G) u otro (A) en el SNP rs1051367. De esta forma, las cinco construcciones generadas (y cuya nomenclatura se usará en adelante) fueron V, LG, LA, CG y CA.

En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos para comprobar el correcto funcionamiento de los vectores de expresión. Se realizó una transfección transitoria de la construcción LG en la línea A549, para visualizar por *western blot* la duración de la sobre-expresión de la proteína a lo largo de varios días. Con el paso del tiempo, la cantidad de proteína de ADARB1 se fue reduciendo, hasta volver a niveles casi basales cinco días después de la transfección (**Figura 33**). El funcionamiento de todos los vectores se confirmó posteriormente en la línea celular H1299 (**Figura 34**).

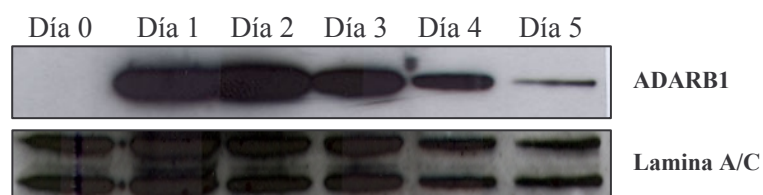


Figura 33. Sobre-expresión transitoria de ADARB1. Se transfectó la línea celular A549 con la construcción LG y se estudió el nivel de proteína producida con el paso del tiempo (días 0-5) mediante *western blot*. Se muestra también la expresión de lamina A/C, utilizada como control de proteína nuclear.

Los experimentos funcionales que se detallan más adelante se llevaron a cabo mediante transfecciones transitorias en tres líneas celulares (H1299, H23 y H727) y mediante la generación de células establemente transfectadas a partir de cinco líneas

(A549, H1299, H23, H157 y H727), representativas de distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón no microcítico. En todos los casos, se comprobó que funcionaba la sobre-expresión de ADARB1, mediante estudios a nivel de RNA y de proteína. En la **Figura 35** se muestra la caracterización de la sobre-expresión estable en H1299.

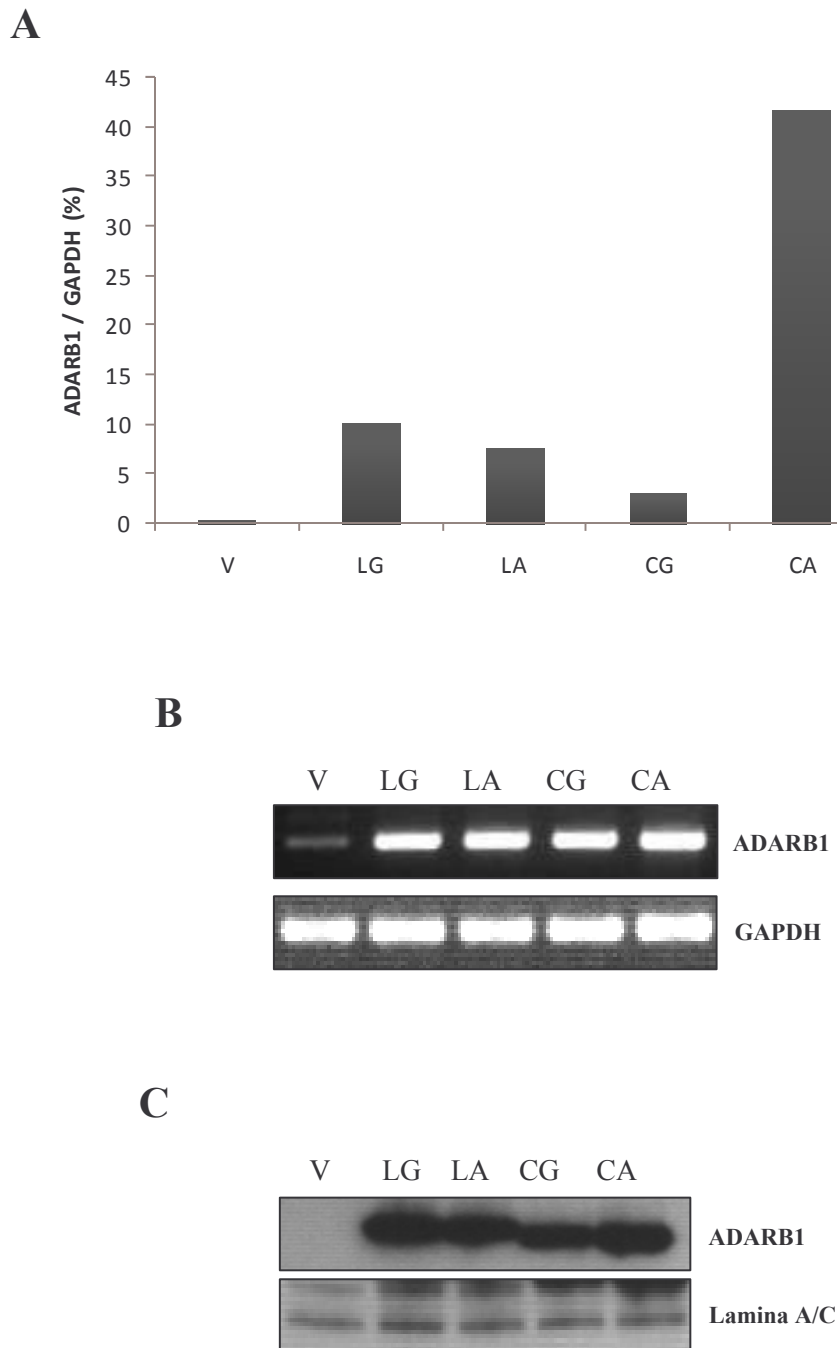


Figura 34. Sobre-expresión transitoria de ADARB1 en células H1299. **A)** RT-PCR a tiempo real, mostrando los niveles de expresión normalizada de ADARB1 frente al gen control GAPDH. **B)** RT-PCR convencional, junto con GAPDH. **C)** *Western blot* (se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra E-20 *anti-ADAR2* de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology), incluyendo el control nuclear lamina A/C. V: Vector vacío; LG: Isoforma larga y G en el SNP; LA: Isoforma larga y A en el SNP; CG: Isoforma corta y G en el SNP; CA: LG: Isoforma corta y A en el SNP.

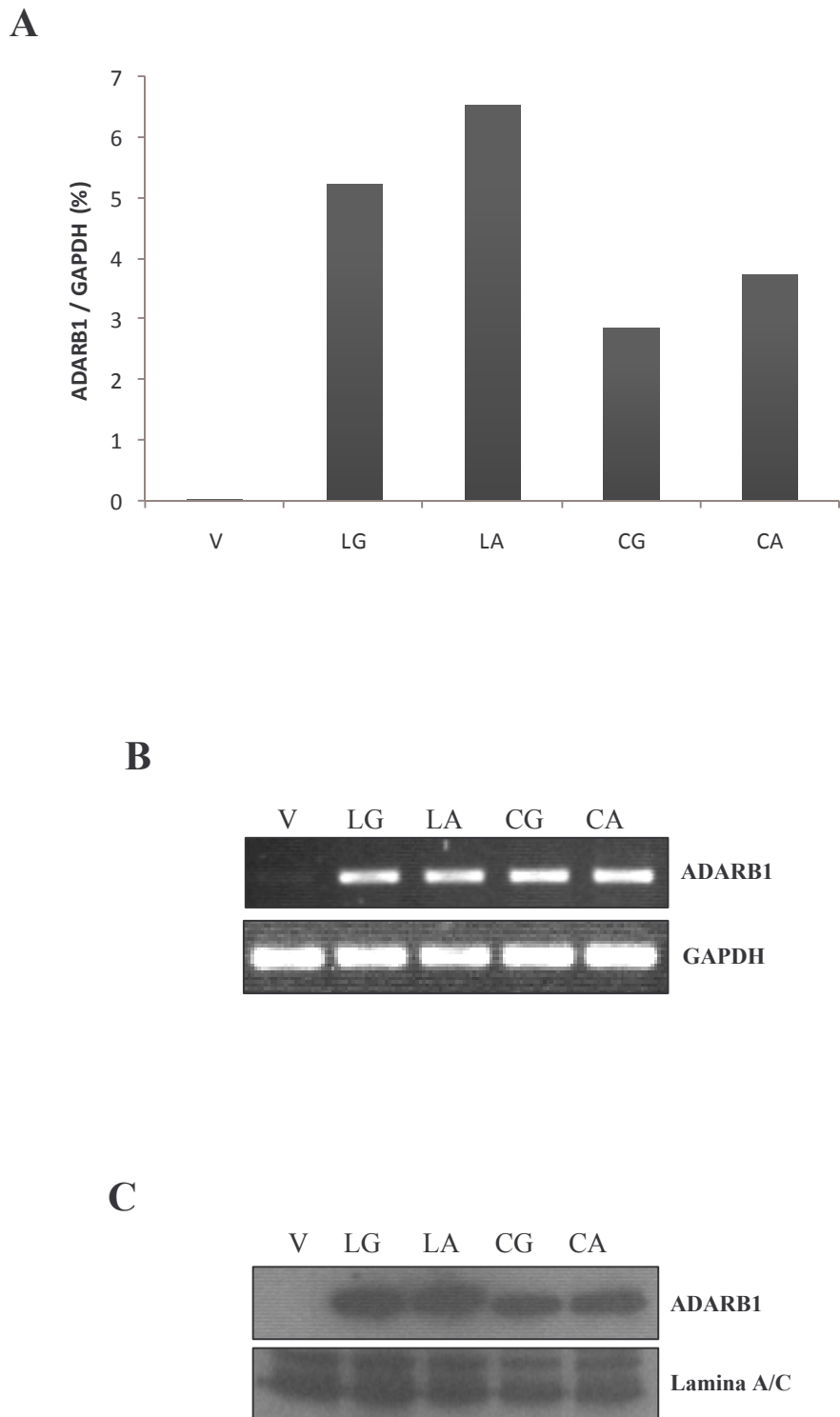


Figura 35. Sobre-expresión estable de ADARB1 en células H1299. **A)** RT-PCR a tiempo real, mostrando los niveles de expresión normalizada de ADARB1 frente al gen control GAPDH. **B)** RT-PCR convencional, junto con GAPDH. **C)** *Western blot* (se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra E-20 *anti-ADAR2* de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology), incluyendo el control nuclear lamina A/C. V: Vector vacío; LG: Isoforma larga y G en el SNP; LA: Isoforma larga y A en el SNP; CG: Isoforma corta y G en el SNP; CA: LG: Isoforma corta y A en el SNP.

9.2. Inhibición de la expresión de ADARB1 y de PTB mediante siRNA

En algunas líneas celulares de cáncer de pulmón, la expresión del mRNA de ADARB1 y de PTB se inhibió mediante la transfección de siRNA específicos para estos genes. Antes de valorar los efectos que esta manipulación podría tener en la funcionalidad celular, se verificó que los siRNA empleados funcionaban correctamente. Para ello, se estudiaron los niveles de los mRNA de los genes mediante RT-PCR convencional y a tiempo real. Con estas técnicas se pudo comprobar la inhibición de la expresión. En la **Figura 36** se muestra un ejemplo del descenso de los niveles del mRNA de ADARB1 en la línea H1299 y, en la **Figura 37**, del mRNA de PTB en la línea A549. La inhibición funcionó también en el resto de líneas celulares que se estudiaron, con valores similares en los descensos de la expresión (datos no mostrados).

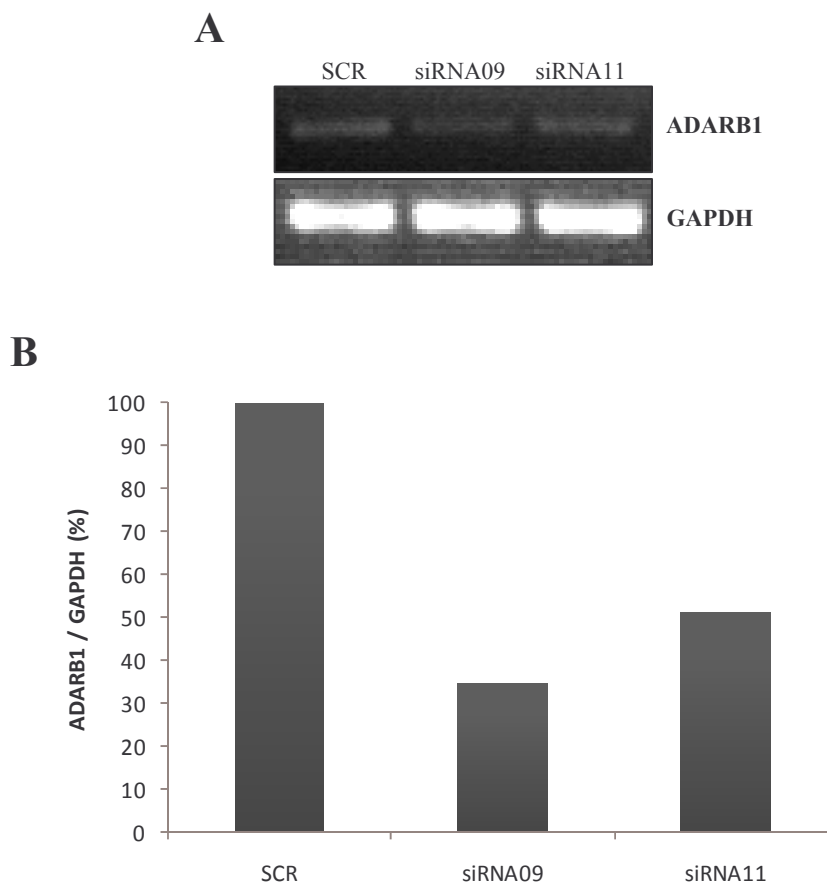


Figura 36. Inhibición transitoria de ADARB1 en células H1299 mediante siRNA. **A)** RT-PCR convencional, con el gen control GAPDH. **B)** RT-PCR a tiempo real; se muestra el porcentaje de expresión respecto a las células control. El gen GAPDH se utilizó para normalizar los niveles de expresión en todos los casos. SCR: *Scramble* o control de siRNA inespecífico; siRNA09 y siRNA11: dos de los siRNA de ADARB1 transfectados.

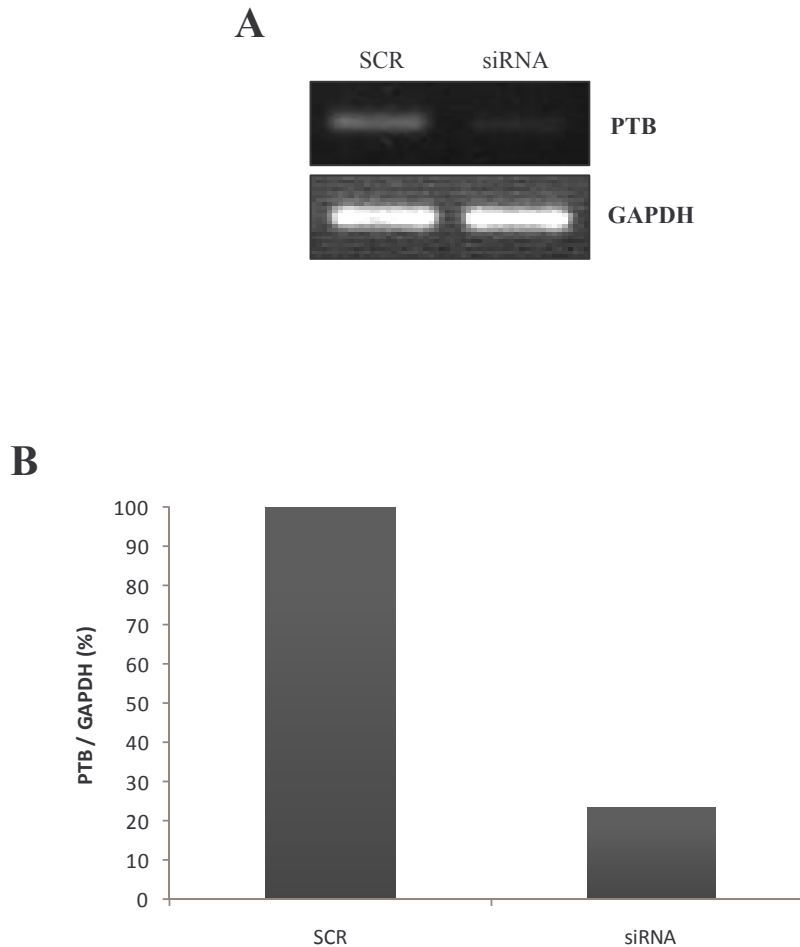


Figura 37. Inhibición transitoria de PTB en células A549 mediante siRNA. **A)** RT-PCR convencional, con el gen control GAPDH. **B)** RT-PCR a tiempo real; se muestra el porcentaje de expresión respecto a las células control. El gen GAPDH se utilizó para normalizar los niveles de expresión en todos los casos. SCR: *Scramble* o control de siRNA inespecífico; siRNA: Mezcla de los cuatro siRNA de PTB transfectados.

9.3. Estudios funcionales *in vitro*

En los experimentos se valoró si había diferencias entre las células con expresión modificada de ADARB1 o de PTB y los controles. En el caso de la sobre-expresión de ADARB1 (transitoria y estable), la comparación se realizó entre las distintas construcciones de plásmidos. En cuanto a la inhibición, las células transfectadas transitoriamente con los siRNA de ADARB1 o de PTB se contrastaron con las que incluyeron controles inespecíficos (*scramble*).

9.3.1. Estudio de la actividad editada de ADARB1

Como ya se ha comentado anteriormente, ADARB1 es capaz de auto-editar su propio mRNA. Se llevó a cabo una RT-PCR convencional utilizando cebadores que amplifican una región que incluye parte del intrón 1 de ADARB1, siempre y cuando se produzca un proceso de auto-edición a ese nivel. De esta forma, es posible determinar la actividad funcional de la proteína en las células que presentan sobre-expresión de la misma, ya que aparece una banda adicional respecto a la situación basal (analizada en el apartado 6.2).

Así pues, se estudió este aspecto funcional en las células transfectadas de forma transitoria y estable con las cinco construcciones del vector vacío y de sobre-expresión de ADARB1. En la **Figura 38** se muestran los resultados obtenidos en la línea H1299. Tanto en los clones estables como en la sobre-expresión transitoria, se observó la presencia de una única banda de amplificación cuando las células contenían el vector vacío. Sin embargo, en las cuatro construcciones con el inserto apareció una banda adicional, con 47 nucleótidos más, que se corresponde con la isoforma producto de la auto-edición de ADARB1. Por lo tanto, se concluyó que la proteína sobre-expresada era funcional.

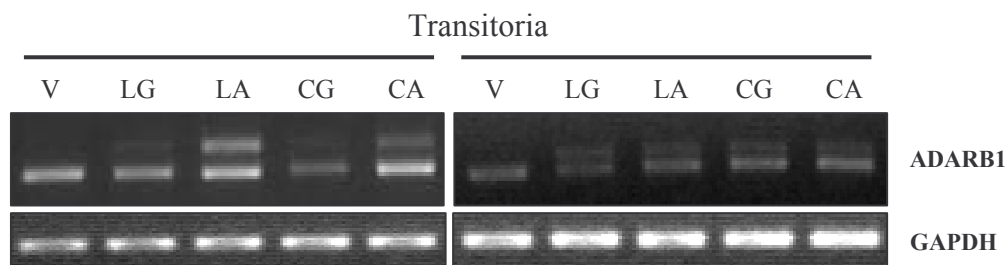


Figura 38. Medida de la auto-edición del mRNA de ADARB1 en células H1299 con sobre-expresión de su proteína. Se muestra el patrón de amplificación para las cinco construcciones tras las transfecciones transitorias y estables. V: Vector vacío; LG: Isoforma larga y G en el SNP; LA: Isoforma larga y A en el SNP; CG: Isoforma corta y G en el SNP; CA: LG: Isoforma corta y A en el SNP.

9.3.2. Estudio de la morfología celular

En cada caso, se capturó una imagen con objeto de valorar el posible cambio morfológico de las células con expresión artificialmente modificada de los genes en estudio. No se detectó ninguna alteración significativa, ni en la sobre-expresión transitoria, ni en la sobre-expresión estable, ni en la inhibición transitoria (datos no mostrados).

9.3.3. Ensayo de proliferación (MTT)

Se llevó a cabo este ensayo para valorar si se modificaba la velocidad de crecimiento *in vitro* de las distintas células en estudio. Se comparó la velocidad de proliferación entre los distintos clones estables con sobre-expresión de ADARB1, entre las células con sobre-expresión transitoria de ADARB1 y entre las células con inhibición de los mRNA de ADARB1 y de PTB. En cada caso se incluyeron los controles correspondientes.

En la **Figura 39** se muestran los resultados obtenidos para ADARB1 en la línea celular H1299. La velocidad de crecimiento de las células con expresión manipulada (aumentada o disminuida) de ADARB1 no se vio modificada. En las demás líneas celulares tampoco se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

Por su parte, la inhibición del mRNA de PTB afectó a la proliferación *in vitro* de las células A549. En la **Figura 40A** se aprecia cómo las células con bloqueo del mRNA de PTB presentan una velocidad de crecimiento significativamente menor que las células control transfectadas con siRNA inespecíficos. El experimento se realizó tres veces de manera independiente, obteniéndose en todos los casos resultados muy similares. La inhibición de PTB no afectó a la velocidad de proliferación de otras líneas celulares estudiadas: H441, H2087, H1299 y H157, tal y como se muestra en la **Figura 40B** y **40C** para algunas de ellas.

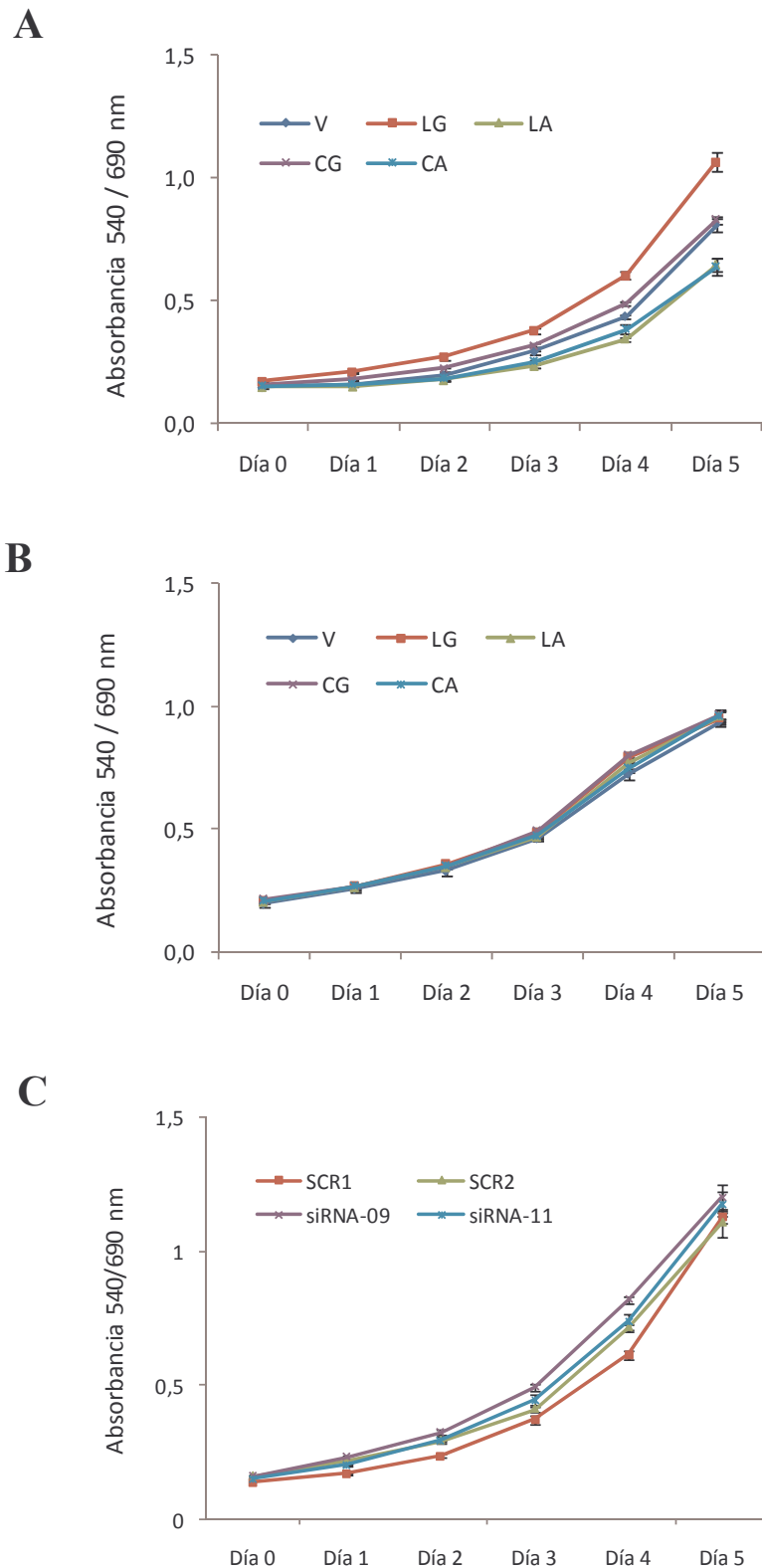


Figura 39. Crecimiento *in vitro* de las células H1299 con sobre-expresión transitoria (A), sobre-expresión estable (B) e inhibición transitoria (C) de ADARB1. Los resultados se normalizaron a día 0 y se obtuvieron durante 5 días consecutivos. Cada determinación se llevó a cabo por sextuplicado, mostrándose el valor medio y la desviación estándar en cada caso. V: Vector vacío; LG: Isoforma larga y G en el SNP; LA: Isoforma larga y A en el SNP; CG: Isoforma corta y G en el SNP; CA: LG: Isoforma corta y A en el SNP. SCR1 y SCR2: Dos siRNA inespecíficos; siRNA-09 y siRNA-11: Dos de los siRNA específicos de ADARB1. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos mostrados.

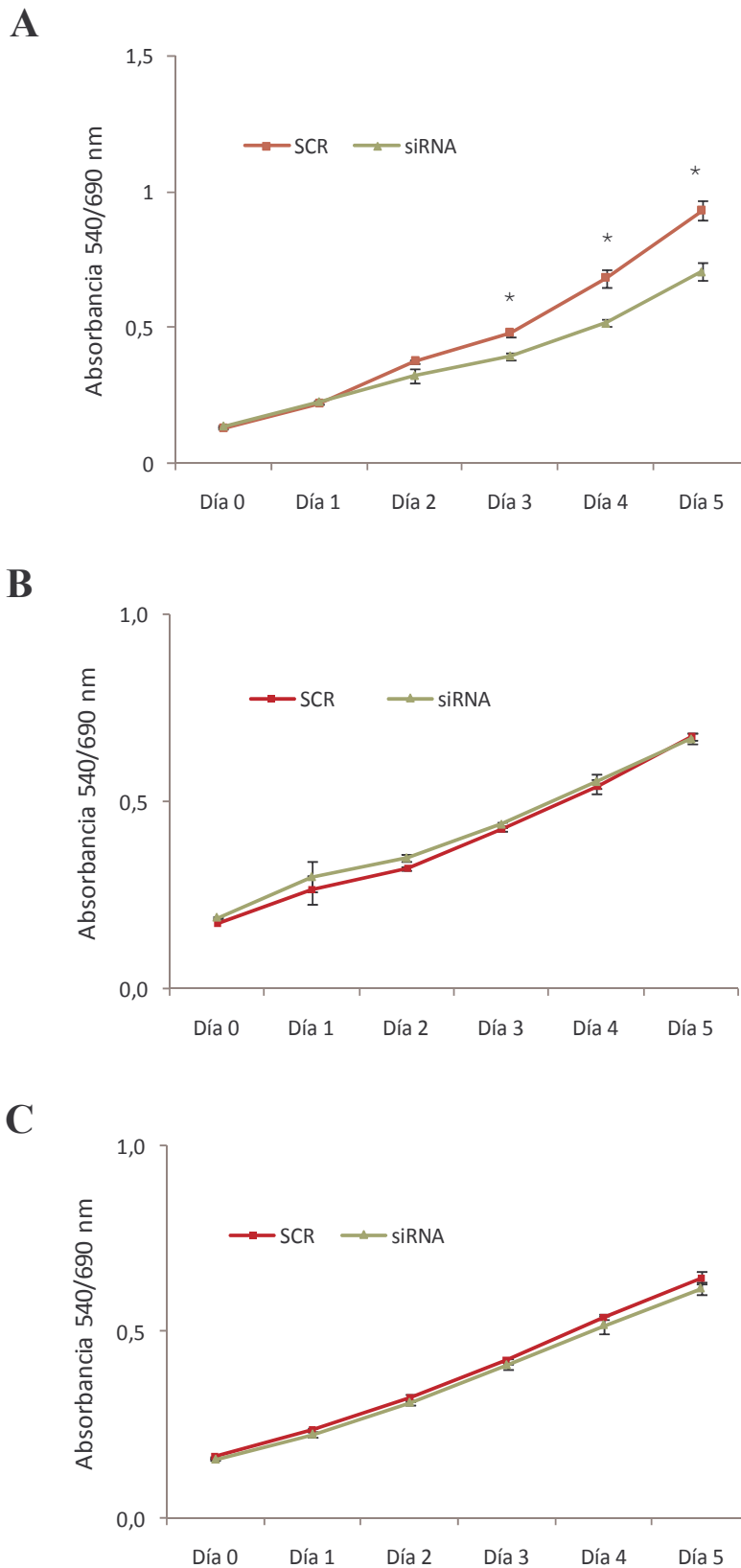


Figura 40. Crecimiento *in vitro* de las células A549 (A), H441 (B) y H2087 (C) con inhibición transitoria de la expresión de PTB. Los resultados se normalizaron a día 0 y se obtuvieron durante 5 días consecutivos. Cada determinación se llevó a cabo por sextuplicado, mostrándose el valor medio y la desviación estándar en cada caso. Los experimentos se realizaron tres veces de manera independiente. SCR: *Scramble*, o siRNA inespecífico; siRNA: Mezcla de cuatro siRNA específicos para PTB. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

9.3.4. Ensayo de la capacidad clonogénica en agar blando

Por medio de este estudio se quiso comprobar si la sobre-expresión de ADARB1 y/o la inhibición de ADARB1 y de PTB con siRNA afectaba a la capacidad de las células tumorales de crecer con independencia de anclaje y de formar clones al ser cultivadas en agar blando. Al igual que en otros ensayos, se compararon las distintas células en cada caso con sus respectivos controles, es decir, frente a células transfectadas con el vector de sobre-expresión vacío o con el *scramble*.

Ni la sobre-expresión (estable o transitoria) ni la inhibición de ADARB1 tuvieron como consecuencia cambios significativos en el número de clones formados por las distintas líneas celulares transfectadas en las que se realizó la técnica. En la **Figura 41** se muestran los resultados obtenidos en la línea celular H1299.

En cuanto a la capacidad clonogénica *in vitro* de las células con inhibición del mRNA de PTB, se observaron diferencias significativas entre las células A549 transfectadas con el *scramble* inespecífico y las células con bloqueo de PTB (**Figura 42**). Las células con expresión disminuida de PTB formaron menor número de clones que las células control. En las demás líneas celulares estudiadas (H1299, H441, H2087 y H157), al igual que lo que ocurría con el ensayo MTT, no se observaron cambios significativos en el número de clones formados en agar blando (datos no mostrados).

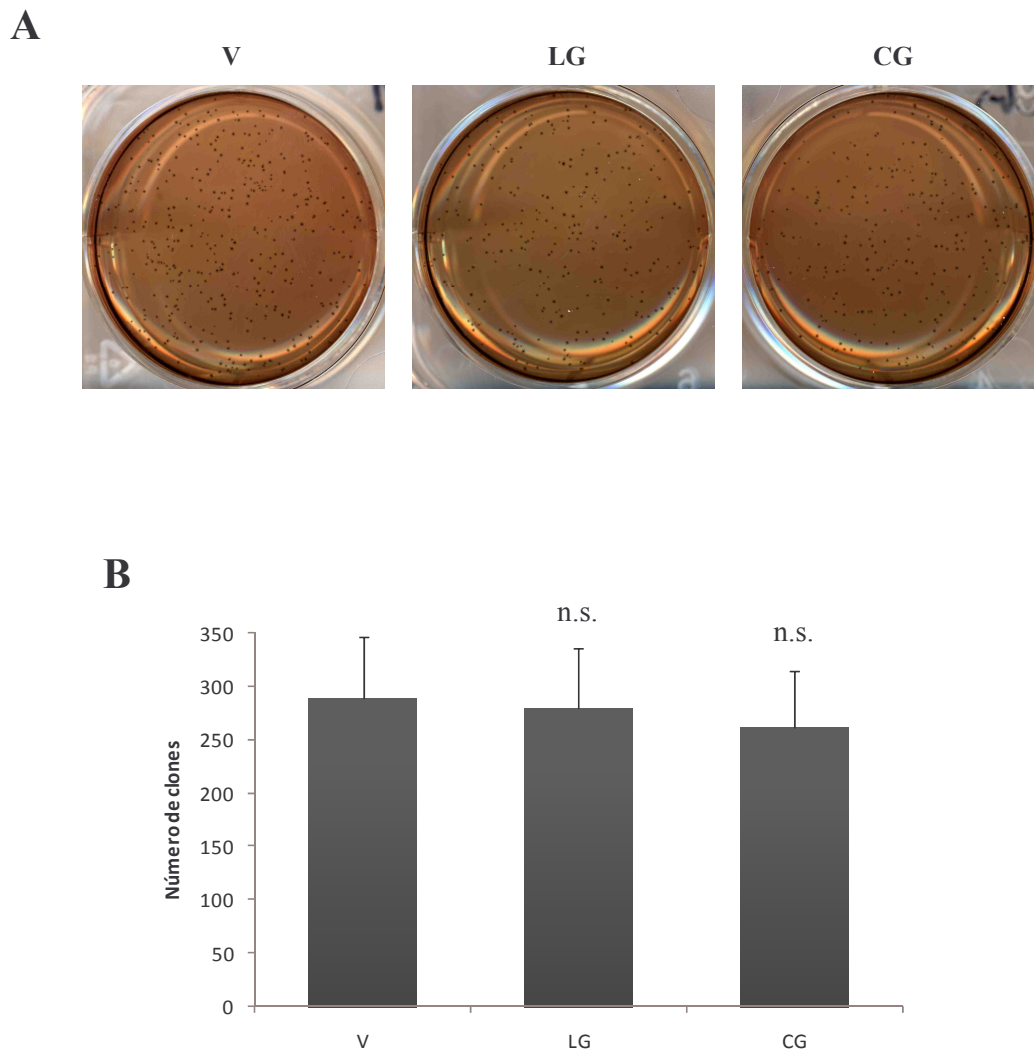


Figura 41. Capacidad clonogénica en agar blando de la línea celular H1299 con sobre-expresión estable de ADARB1. Se muestran fotografías representativas (**A**) y el número medio y desviación estándar de los clones formados por las células con sobre-expresión de dos isoformas de ADARB1 (**B**). Cada condición se realizó por triplicado y el experimento en su conjunto se repitió tres veces. V: Vector vacío; LG: Isoforma larga y G en el SNP; CG: Isoforma corta y G en el SNP; n.s.: No significativo.

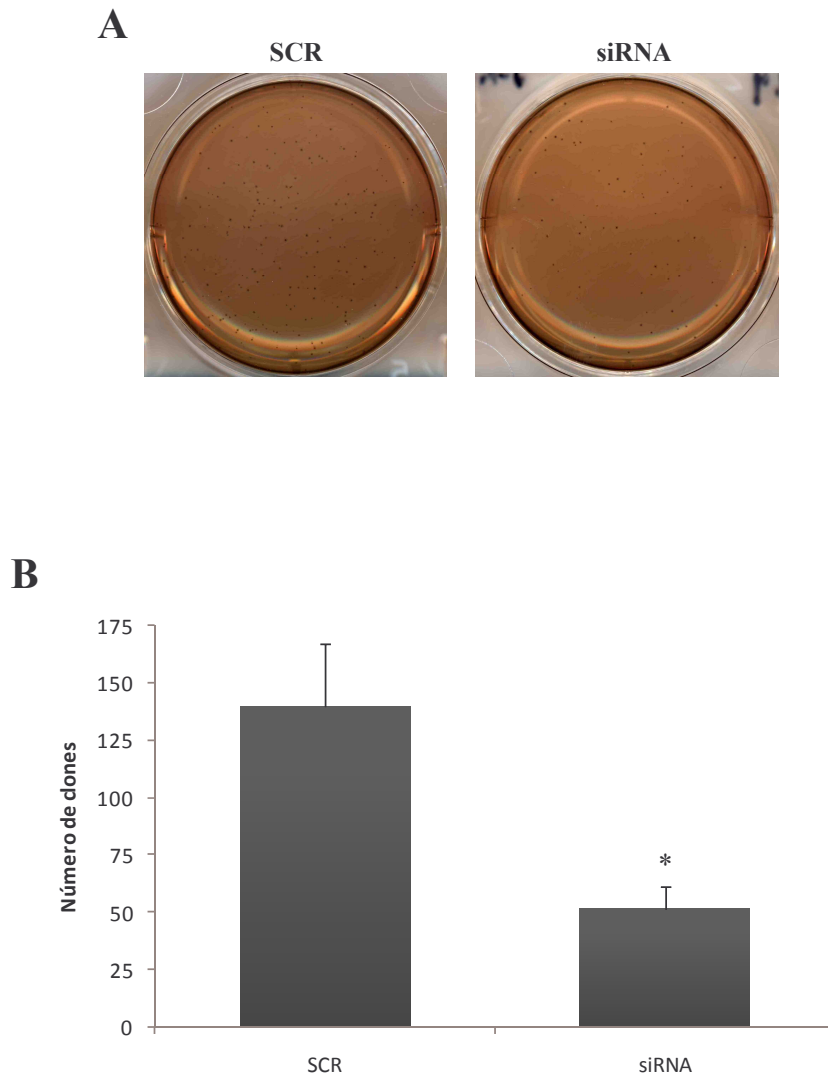


Figura 42. Capacidad clonogénica en agar blando de las células A549 con inhibición de PTB. Se muestran fotografías representativas (**A**) y el número medio y desviación estándar de los clones formados por las células control y por las transfectadas con siRNA de PTB (**B**). Cada condición se realizó por triplicado y el experimento en su conjunto se repitió tres veces. SCR: *Scramble* inespecífico; siRNA: Mezcla de varios siRNA de PTB transfectados. **: $p < 0.01$.

9.4. Crecimiento tumoral *in vivo*

Finalmente, se valoró la capacidad tumorigénica *in vivo* de las células H1299 al sobre-expresar o no ADARB1. A diez ratones atímicos se les inyectaron subcutáneamente células con el vector vacío (V); a otros diez, células con la construcción que contenía el inserto de ADARB1 en su versión larga y una G en el SNP estudiado (LG); y a otros diez, células con el vector que contenía el inserto en la versión corta de ADARB1 y el mismo nucleótido en el SNP (CG). Se midieron los tamaños que los tumores generados en los animales fueron adquiriendo con el paso del tiempo y tras 43 días todos los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos. Antes de procesarlos, los tumores se midieron por última vez, *ex vivo*.

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los tres tipos celulares (datos no mostrados). Para descartar una inhibición *in vivo* de la sobre-expresión, se analizaron tanto el mRNA (por PCR a tiempo real) como la proteína (por inmunocitoquímica) en los tumores extraídos al finalizar el experimento.

El mRNA en los tumores procedentes de las células con la isoforma larga de la proteína (LG) fue 10 veces más elevado que en aquellos procedentes de las células sin sobre-expresión (V). En el caso de la isoforma corta (CG), el incremento relativo fue de 8 veces (datos no mostrados).

Respecto a la proteína, en las muestras procedentes de tumores con células sin sobre-expresión de ADARB1, la proteína basal no se detectó. Por el contrario, muchas de las células de los tumores con sobre-expresión de ADARB1 presentaron positividad (**Figura 43**). También se corroboró que el aumento de ADARB1 *in vivo* provocaba un incremento de la auto-edición de su mRNA (datos no mostrados).

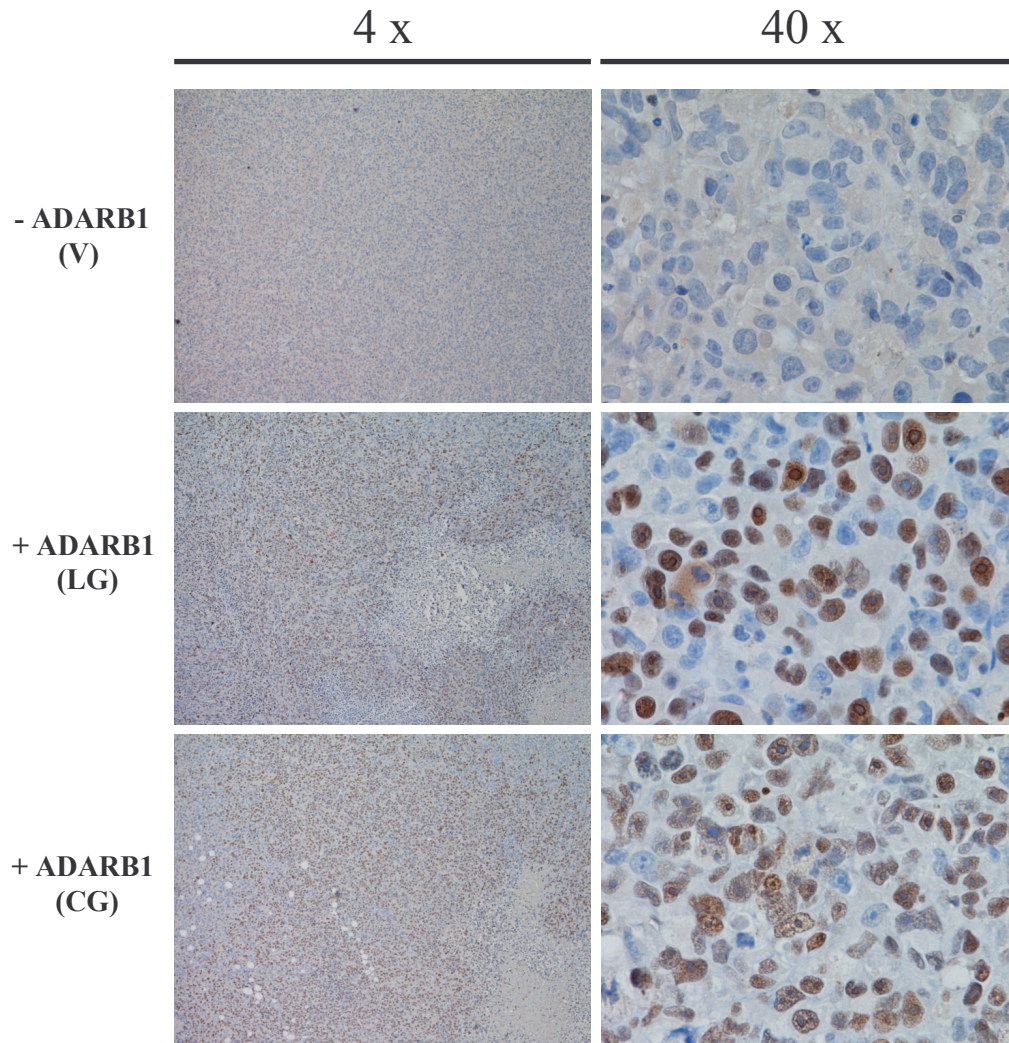


Figura 43. Determinación mediante inmunocitoquímica de la expresión de ADARB1 en *xenografts* de células H1299. Se confirmó la positividad de los tumores que contenían células H1299 transfectadas de forma estable con una construcción para la isoforma larga de ADARB1 (LG) y también para la isoforma corta (CG). Los clones de células sin el inserto específico (V) mostraron negatividad para la proteína. Las imágenes fueron capturadas con objetivos de 4 y 40 aumentos. Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo H-90 *anti-ADAR2* de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han identificado diversos genes relacionados con el metabolismo del RNA y se ha valorado la posible implicación de algunos de ellos en el desarrollo del cáncer de pulmón.

Partiendo de los datos de *microarrays* de expresión publicados por distintos grupos y realizando un estudio estadístico, se seleccionaron varios genes que presentan expresión significativamente distinta entre muestras de pacientes con cáncer de pulmón y muestras de pulmón sano, según los datos de esos *microarrays*.

La validación posterior de los resultados mediante estudios de expresión de RNA condujo a la elección de ADARB1 como un posible candidato a formar parte del grupo de genes que presentan alteraciones en la carcinogénesis pulmonar. Se encontró que la expresión de ADARB1 está disminuida en material tumoral (líneas celulares y muestras clínicas de pacientes) respecto al normal, confirmando los datos *in silico*. No se hallaron cambios en las proporciones de expresión de las principales isoformas de ADARB1.

Un estudio de alteraciones genéticas permitió identificar algunas mutaciones en el gen de ADARB1, aunque probablemente no tienen consecuencias funcionales. Además, se detectó una frecuente pérdida de heterocigosidad en la región cromosómica 21q22.3 y más específicamente en el locus de ADARB1, en pacientes con cáncer de pulmón. Por el contrario, no se encontraron alteraciones epigenéticas en el promotor de ADARB1. Tampoco se observó ninguna modificación morfológica ni funcional tras la manipulación de los niveles de ADARB1 mediante su sobre-expresión e inhibición.

Puesto que PTB podría ser una diana del gen supresor α CP-4, y que en el análisis estadístico los tumores de pulmón presentaron una sobre-expresión de esta proteína respecto a los controles sanos, se estudió este gen en líneas celulares de pulmón y en pacientes con esta neoplasia. También se llevó a cabo la inhibición de la expresión de PTB en diversas líneas celulares. En la línea A549 se encontró que esta modificación disminuía la velocidad de crecimiento *in vitro* y la capacidad de formar clones con independencia de anclaje.

En las siguientes páginas se discuten y comparan nuestros datos con los disponibles en la bibliografía, en el contexto del cáncer en general y del cáncer de pulmón en particular.

1. Identificación de genes relacionados con el metabolismo del RNA que presentan expresión alterada en cáncer de pulmón

Debido a que el cáncer de pulmón cuenta con unas elevadas tasas de prevalencia y mortalidad, durante los últimos años se ha incrementado el interés por identificar nuevos marcadores moleculares que permitan detectar esta neoplasia en estadios precoces y que puedan servir como factores pronósticos de la enfermedad.

Con la llegada de los *microarrays*, se han puesto en marcha y publicado numerosos estudios que han arrojado como resultado los perfiles de expresión génica en cáncer de pulmón y en tejido pulmonar sano. Las recientes y cada vez más avanzadas aplicaciones bioinformáticas están permitiendo interpretar la enorme cantidad de datos generados.

En algunos trabajos, se propone que los perfiles de expresión génica sirvan para establecer subtipos de adenocarcinoma (Bhattacharjee y col., 2001; Hayes y col., 2006) o de carcinoma escamoso (Inamura y col., 2005). En otros, que la información obtenida permita realizar un pronóstico de la evolución de la enfermedad (Lau y col., 2007) o supervivencia de los pacientes (Beer y col., 2002; Lu y col., 2006). La clasificación por estadios, la predicción de metástasis y la posibilidad de nuevos abordajes terapéuticos son otros de los objetivos que se persiguen.

Muchos grupos de investigación están tratando de unificar criterios mediante revisiones en las que se recomiendan unas pautas que se deberían seguir en la aplicación de las nuevas tecnologías, para sacarles el máximo partido. Uno de los aspectos más importantes es la validación posterior de los datos, de forma que aquellos genes que se planteen como candidatos cuenten con una gran robustez y tengan una verdadera utilidad clínica (Granville y col., 2005; Meyerson y col., 2005; Sun y col., 2006; Fishel y col., 2007; Kim y col., 2007).

A partir de la información proporcionada por algunos estudios como los que se acaban de describir, en este trabajo se identificaron inicialmente, mediante un análisis estadístico de los *microarrays* de partida, 10 genes relacionados con el metabolismo del RNA que presentaron niveles de expresión diferentes en pacientes con cáncer de pulmón, respecto a personas sanas. Estos datos fueron contrastados después mediante estudios de expresión en líneas celulares y en pacientes con cáncer de pulmón.

Algunos de estos genes (ASCC3L1, SNRPB, SNRPC y SNRPE) codifican para proteínas que son componentes de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, o snRNP (del inglés, *small nuclear RiboNucleoProteins*). El espliceosoma consta de varias de estas snRNP (U1, U2, U4/U6, U5, etc.), así como de muchos otros factores de *splicing*. Todas estas partículas participan en el procesamiento de corte y empalme de la mayoría de pre-mRNA.

El producto del gen ASCC3L1 es una proteína (Brr2) de 200 kDa que forma parte de la snRNP U5 y su actividad es favorecida cuando la proteína Prp8 está presente. Para que la primera etapa del *splicing* tenga lugar, U4 y U6 se hibridan por apareamiento de bases y forman un complejo, U4/U6. U5 actúa posteriormente desenrollando la doble hebra de RNA formada, por lo que funciona como una helicasa de RNA. Aunque se ha descrito que hay alteraciones en los componentes de U5 que se correlacionan con la retinitis pigmentosa, no hay ninguna referencia actualmente que las vincule con cáncer (Brow, 2009). Por tanto, la sobre-expresión de ASCC3L1 en líneas celulares de pulmón encontrada en este trabajo sería la primera evidencia para ello.

SNRPB, SNRPC y SNRPE dan lugar a proteínas que integran varias de las snRNP, principalmente la U1. Muchos procesos autoinmunes, principalmente el lupus eritematoso sistémico o la enfermedad del tejido conectivo mixto, cursan con presencia de auto-anticuerpos contra algunas de estas proteínas, que tendrían homología molecular con péptidos del virus de Epstein Barr (Migliorini y col., 2005).

Mediante *splicing* alternativo se generan dos proteínas, SmB y SmB', a partir de un mismo pre-mRNA de SNRPB (Chu y col., 1991). El lupus cursa con auto-anticuerpos que reconocerían ambas isoformas de la proteína (Kaufman y col., 2001). No obstante, hasta la fecha no se ha demostrado relación directa de SmB o SmB' con ningún proceso tumoral, de modo que nuestros resultados respecto al aumento de expresión de SNRPB en líneas celulares podrían servir como una primera prueba de que está relacionado con el cáncer de pulmón.

Por su parte, el producto de SNRPC, U1C, interacciona con los componentes Sm y estabiliza el complejo U1 (Muto y col., 2004). Apenas hay citas en la bibliografía que relacionen alguna de estas proteínas con el cáncer. Se ha sugerido que U1C puede reprimir la actividad de la proteína quimérica EWS/FLI en el sarcoma de Ewing, participando así en la regulación transcripcional (Knoop y col., 2000), o que su interacción con la proteína de fusión EWS/NOR1 en el condrosarcoma mixoide extra-esquelético puede afectar al *splicing* (Ohkura y col., 2002), aunque hacen falta más

estudios que puedan confirmar estos datos y los obtenidos en este trabajo en lo relativo al cáncer de pulmón.

En cuanto a la proteína codificada por SNRPE, SmE, parece ser que regula el crecimiento de células neoplásicas. Utilizando la línea H1299 y fibroblastos, ambos de pulmón, así como células de cáncer de colon, se ha demostrado que la expresión de SmE reduce el crecimiento de células cancerosas por disminución de su proliferación, pero no de la apoptosis. Asimismo, induce una disminución de ciclina E, CDK2, CDC25C y CDC2 y un aumento de p27^{Kip}, lo que lleva a una inhibición de la síntesis de DNA y detención del ciclo celular en G₂. La inactivación de SmE, por el contrario, aumenta el porcentaje de células en fase S, disminuyendo el de células en G₂/M. SmE, por tanto, funcionaría como un supresor del crecimiento de células tumorales (Li y col., 2008). Estos datos contrastarían con los obtenidos en el análisis informático y en líneas celulares de pulmón en nuestro estudio, ya que el nivel de expresión de SNRPE resultó aumentado en los tumores y las líneas respecto a células normales.

Otros de los genes obtenidos en el análisis estadístico de los cuales se comparó su expresión entre muestras normales y tumorales fueron MARS, MRPL3, PABPC1, RAE1 o RNPS1.

La metionil-tRNA sintetasa (MetRS o MARS) cataliza la unión del aminoácido metionina a su tRNA correspondiente. Aunque en la actualidad se está planteando como una posible diana terapéutica de antibióticos que venzan resistencias de infecciones por bacterias Gram + y Gram – (Vaughan y col., 2002), en su día ya se describió que esta enzima presentaba unos elevados niveles de actividad en cáncer de colon (Kushner y col., 1976). Recientemente, se ha visto que la estimulación constitutiva de algunas líneas celulares de mama mediante IGF provoca aumentos de expresión de algunos genes como MetRS, por lo que se baraja la posibilidad de que este sea uno de los mecanismos que contribuya al aumento de la síntesis de proteínas observado en los tumores (Pacher y col., 2007). Tal vez nuestros resultados puedan relacionarse con estos datos previos.

MRPL3 (*Mitochondrial Ribosomal Protein L3*) forma parte de la subunidad 39S de los ribosomas mitocondriales. Dado que se trata de una proteína caracterizada hace poco tiempo en mamíferos, la bibliografía existente sobre ella es escasa. En un trabajo se encontró que sus niveles de expresión estaban elevados en hepatocarcinoma, carcinoma de colon y linfoma, así como en hígado fetal. Se concluyó que su sobre-expresión era

característica de células con altas velocidades de división, pero no tenía relación directa con la oncogénesis (Ou y col., 1987).

PABPC1 (*Poly-A Binding Protein, Cytoplasmic 1*) se asocia al extremo 3' de los mRNA de eucariotas, participando en el acortamiento de la cola poli-A y en el inicio de la traducción. Su implicación en el cáncer parece controvertida. En un estudio de pacientes con carcinoma escamoso de esófago se encontró que los niveles más bajos de expresión de PABPC1 se correlacionaban con tumores más avanzados e invasivos y con menores tiempos de supervivencia post-operatoria (Takashima y col., 2006). Sin embargo, en otros trabajos PABPC1 presentó sobre-expresión en líneas celulares y tumores de próstata (van Duin y col., 2005), en carcinoma hepatocelular (Liu y col., 2007) y en varios tipos histológicos de cáncer de pulmón, especialmente en el carcinoma escamoso (Comtesse y col., 2007). Los datos de nuestro estudio, por lo tanto, irían en el mismo sentido que los de estos últimos trabajos, pues encontramos aumentos de la expresión de PABPC1 en líneas celulares de pulmón.

RAE1 es una proteína de exportación nuclear, que transporta distintos mRNA al citoplasma. Además, expresado en células tumorales, actúa como ligando del receptor NKG2D en células NK, favoreciendo la respuesta inmune innata. En contra de lo que nuestros datos bioinformáticos y de expresión en líneas celulares podrían señalar, parece que la bibliografía apunta a que RAE1 tiene un papel protector del desarrollo de cáncer. Se ha descrito que participa en el control de la mitosis, ya que inhibiría en prometafase al complejo encargado de lanzar la transición metafase/anafase, retrasando en el tiempo la división celular. Niveles bajos de RAE1 favorecen la tumorigénesis en ratones cuando además otros genes críticos presentan mutaciones (Jeganathan y col., 2006).

RNPS1 (*RNA-binding protein S1, serine-rich domain*) funciona también como una proteína de exportación nuclear de mRNA y se asocia preferentemente a uniones exón-exón, estando implicada en la supervivencia de los transcritos y en el inicio y terminación de la traducción (Wilkinson, 2005). Se ha encontrado que el tratamiento con estrógenos conlleva un aumento en la expresión de RNPS1 en células inmortalizadas de epitelio normal de ovario, pero un descenso en líneas celulares de cáncer de ovario (Syed y col., 2005).

Parece claro, por tanto, que hay diversos genes relacionados con el metabolismo del RNA que podrían estar relacionados con el cáncer, al menos si se valoran sus niveles de expresión. No obstante, hacen falta más datos que ayuden a contrastar esta posibilidad.

Finalmente, los genes ADARB1 y PTB también mostraron diferencias de expresión entre muestras normales y tumorales en nuestro trabajo. En los siguientes apartados se profundiza más en los estudios realizados sobre ellos y en la bibliografía existente.

2. Valoración de ADARB1 como un posible gen implicado en carcinogénesis pulmonar

Uno de los genes que presentó diferencias de expresión más significativas entre las muestras normales y tumorales al realizar el análisis estadístico de los datos iniciales fue ADARB1. Concretamente, se detectó un descenso de su expresión en las muestras de pacientes con cáncer de pulmón de los *microarrays* de partida.

También mediante el uso de *microarrays*, en un estudio previo se había descrito que la expresión de ADARB1 en carcinoma escamoso de pulmón estaba significativamente disminuida respecto a la del pulmón sano (Inamura y col., 2005). Sin embargo, en otro trabajo encontraron un aumento de la expresión de ADARB1 en células madre adultas mesenquimales transformadas respecto a las no transformadas, así como en fibroblastos transformados y en algunas líneas celulares de mama, leiomioma y osteosarcoma (Flanagan y col., 2009).

En nuestro trabajo, los datos bioinformáticos referidos a ADARB1 fueron validados posteriormente mediante estudios de su expresión en líneas celulares y en muestras clínicas de pacientes con cáncer de pulmón, confirmándose un descenso de los niveles del mRNA de ADARB1 en las muestras tumorales. No se pudieron determinar los niveles de proteína mediante *western blot*, al estar presente en cantidades muy bajas.

2.1. Papel de ADARB1 como editasa de RNA

ADARB1, que también se conoce como ADAR2 (*Adenosine Deaminase Acting on RNA*), es una editasa de RNA de doble hebra (dsRNA, del inglés, *double-stranded RNA*). Concretamente, transforma nucleótidos de adenosina (A) en nucleótidos de inosina (I), los cuales son reconocidos como guanosina (G) por la maquinaria celular. De esta forma, la actividad de ADARB1 constituye un importante mecanismo de modificación post-transcripcional de los mRNA. De hecho, muchos de los sitios de edición conocidos se descubrieron al azar, al encontrar discrepancias de secuencia entre el gDNA y el cDNA (revisado por Valente y col., 2005).

Las deaminasas de adenosina forman parte de un amplio grupo de editasas, entre las que también se incluyen otras como la APOBEC-1, deaminasa que transforma citidinas (C) en uracilos (U) y que es responsable de la existencia de la apolipoproteína B-48 intestinal, de menor longitud que la ApoB-100 hepática, por generación de un codón de parada en el marco de lectura (Chen y col., 1987). Otras editasas conocidas eliminan o insertan *de novo* nucleótidos de U, C o G, o sustituyen unas bases por otras, con diferentes combinaciones (Smith y col., 1997). En cualquier caso, la edición A → I es la más frecuente en eucariotas superiores (Maas y col., 2003).

La familia a la que pertenece ADARB1 incluye a otros miembros como ADAR1 o ADAR3. Todas ellas poseen dos o tres dominios de unión a dsRNA (dos en el caso de ADARB1) y un dominio catalítico, deaminasa. ADAR1, de la que hay dos variantes principales por la presencia de promotores alternativos, consta además de dominios de unión a DNA-Z, mientras ADAR3 los tiene de unión a RNA mono-hebra (**Figura 44**). La presencia de motivos adicionales en estas enzimas les confiere otras propiedades y funciones en la célula. Otra subfamilia es la de ADAT, cuyos miembros catalizan la sustitución de A por I en RNA de transferencia (revisado por Valente y col, 2005). No obstante, ADAR1, ADAR3 y los integrantes de ADAT no se han estudiado en este trabajo.

Para llevar a cabo su acción catalítica, ADARB1 requiere la presencia de regiones de RNA que formen una estructura de doble hebra. Aunque la enzima es muy activa, y puede deaminar más del 50% de las A en moléculas sintéticas de RNA de doble hebra, lo hace de manera indiscriminada. Sin embargo, la selectividad de la enzima aumenta cuando aparecen horquillas y bucles en la diana, de forma que ADARB1 reconoce pequeñas regiones o unidades discretas de dsRNA, separadas por zonas desapareadas (Dawson y col., 2004).

Estos requisitos estructurales aparecen con más frecuencia en secuencias repetitivas e inversas del genoma, como los elementos Alu o LINE1, que favorecen el apareamiento de bases en el mRNA (Morse y col., 2002). De esta forma, las regiones UTR y los intrones son las zonas donde ocurren mayoritariamente los procesos de edición por parte de ADARB1. De hecho, la edición A → I es más frecuente en humanos y primates en general que en otras especies como moscas, roedores o pollos, donde las repeticiones Alu son más escasas (Eisenberg y col., 2005).

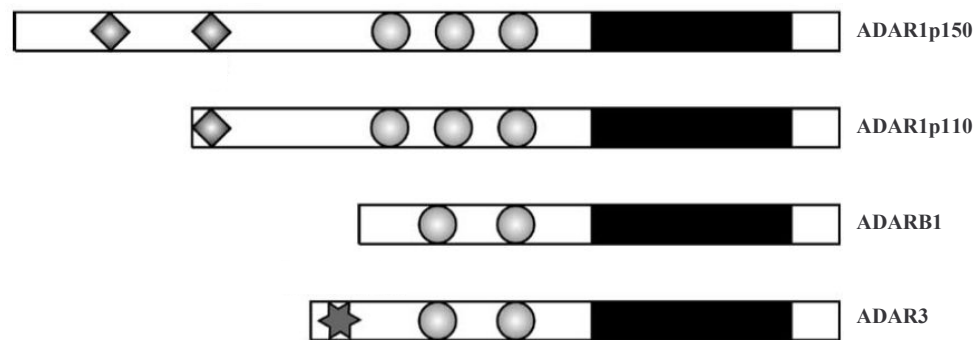


Figura 44. Miembros de la familia ADAR en mamíferos, sin incluir a la sub-familia ADAT. Se muestran los principales dominios presentes en cada caso. Rombos: Dominios de unión a DNA-Z; círculos: dominios de unión a dsRNA; estrella: dominio de unión a RNA mono-hebra; barra negra: dominio con actividad deaminasa. Modificado de Valente y col., 2005.

No obstante, este proceso ocurre también, aunque en raras ocasiones, en regiones codificantes. En estos casos, la doble hebra suele estar formada por un exón y parte de un intrón localizado posteriormente en la secuencia y los productos editados tendrían una ventaja funcional que llevaría a que, por selección positiva, la tasa de edición en estos lugares se mantuviera elevada (Nishikura, 2004).

Además de las características estructurales, que facilitan a ADARB1 la identificación del dsRNA diana, debe existir alguna forma de decidir qué A deben ser editadas. En este sentido, parece que hay una selectividad en función de los nucleótidos cercanos. La eficacia en la edición por ADARB1 depende del nucleótido vecino más próximo en 5' (U = A > C = G) y en 3' (U = G > C = A), por lo que los tripletes que representan lugares de edición óptimos son UAU, AAG, UAG y AAU, pudiendo ADARB1 editar A dentro de los últimos tres nucleótidos de cada extremo del dsRNA (Lehmann y col., 2000).

La consecuencia de la sustitución de A por I es la aparición de regiones con bases desapareadas, por incompatibilidad I:U. Esto hace que descienda el número de zonas de RNA que presentan doble hebra, desestabilizándola, con lo que se limita la actividad de ADARB1 por un mecanismo de retro-alimentación negativa, basada en modificaciones de la estructura secundaria del RNA (Serra y col., 2004).

Como ya se ha dicho, las I introducidas por acción de ADARB1 son reconocidas como G por la célula. Por lo tanto, la sustitución de bases puede tener diversos efectos, teniendo en cuenta además que ADARB1 actúa co-transcripcionalmente (Laurencikiene y col., 2006). Si ocurre en regiones codificantes, puede ocasionar cambios en la traducción (creación o eliminación de tripletes de inicio o de parada, sustituciones de

aminoácidos o proteínas truncadas). En otras regiones de los transcritos, la aparición de I en lugar de A puede alterar los patrones de *splicing*, ocasionando sitios 5' y 3' alternativos, desaparición del punto de ramificación o del sitio 3', etc. (Figura 45). Por tanto, se contribuye a que la diversidad de proteínas se vea incrementada (revisado por Valente y col., 2005). La edición también puede afectar a la estabilidad de los transcritos.

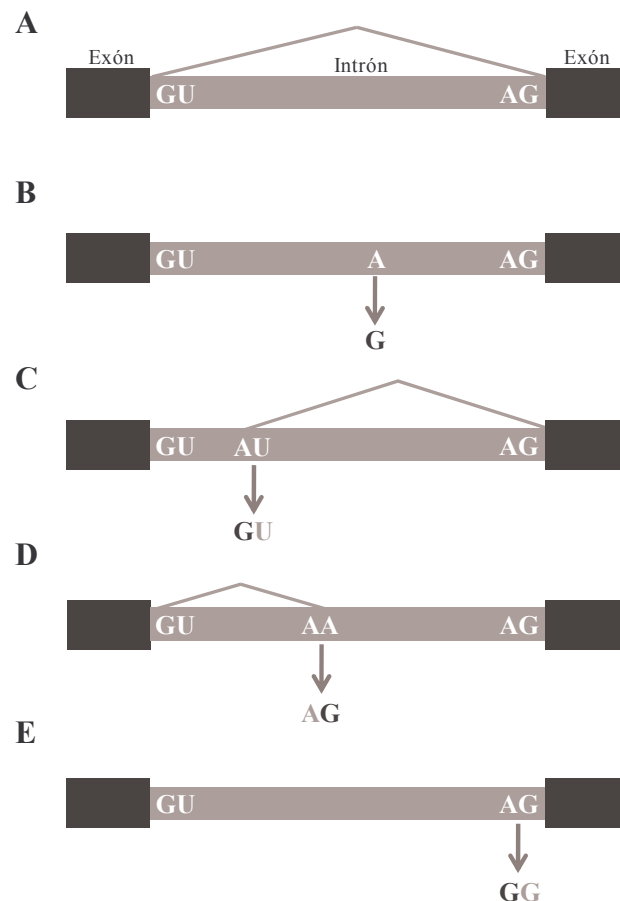


Figura 45. Alteraciones en el *splicing* como consecuencia de la edición en el pre-mRNA. La deaminación de ciertas A claves en el proceso de corte y empalme normal (A), puede eliminar el sitio de ramificación (B), generar sitios 5' (C) o 3' (D) alternativos, o eliminar el sitio 3' original (E), generando mayor diversidad de mRNA. Modificado de Valente y col., 2005.

ADARB1 presenta una elevada homología entre especies, por lo que su secuencia está muy conservada, desde invertebrados como *Drosophila* hasta humanos, pasando por *C. elegans*, pez cebra y roedores (Hough y col., 1999; Slavov y col., 2002). Se expresa en muchos tejidos, pero especialmente en el sistema nervioso central (SNC), lo cual se relaciona con que la mayoría de las dianas de ADARB1 se localicen precisamente en el cerebro y cerebelo (Melcher y col., 1996).

En nuestro trabajo, se comprobó que efectivamente ADARB1 es similar en muchas especies, ya que se detectó su expresión en cerebro de rata mediante *western blot* utilizando un anticuerpo frente a la proteína humana.

A nivel celular, ADARB1 se localiza en el nucleolo. La presencia de sustratos específicos hace que ADARB1 se transloque al nucleoplasma, donde realiza la edición. De esta forma, parece que se da una modulación de la actividad catalítica de la proteína por secuestro transitorio en el nucleolo (Sansam y col., 2003; Desterro y col., 2003).

Hay evidencias que apuntan a que para llevar a cabo la edición, ADARB1 actúa en forma de homo-dímero, tanto en moscas como en mamíferos (Cho y col., 2003; Gallo y col., 2003). ADARB1 existe en una conformación auto-inhibida, hasta que la presencia de un sustrato adecuado hace que se una a éste a través de sus dominios de unión a dsRNA (Macbeth y col., 2004). No obstante, más recientemente se ha publicado que el inositol-hexaquis-fosfato (IP6), mediante su unión al núcleo del enzima, sería también necesario para la actividad catalítica (Macbeth y col., 2005).

2.2. Expresión de isoformas de ADARB1

Se han descrito varias isoformas posibles para los transcritos de ADARB1. En un trabajo anterior (Kawahara y col., 2005) se resumieron todos los eventos, descritos hasta entonces, de *splicing* alternativo que afectan a distintas regiones del pre-mRNA de ADARB1: inicios alternativos en el exón 1, eliminación/retención y auto-edición del exón 2, presencia o ausencia del exón 6 y diferentes sitios de *splicing* que determinan la longitud del extremo C-terminal de la proteína (**Figura 46**). Con esa información y basándose en las posibles combinaciones, se calculó que el número teórico de variantes alternativas de ADARB1 era de 48. Sin embargo, sólo se ha demostrado la existencia de algunas de ellas y las isoformas que tienen más interés se diferencian por la presencia o ausencia del exón 6, o por haber sufrido o no un proceso de auto-edición en el intrón 1.

Respecto al primer grupo, se ha descrito que las isoformas con el exón 6 pueden ser hasta un 50% menos activas que las isoformas sin este fragmento (Gerber y col., 1997). Conociendo esta información, en el presente trabajo se estudió el patrón de expresión de las dos variantes en líneas tumorales y en células de pulmón normal. Se encontró que, en todas las muestras que expresan ADARB1, los transcritos con el exón 6 son mayoritarios frente a los que no lo tienen. Por lo tanto, se pudo deducir que, al menos en términos de expresión de estas isoformas, no había diferencias entre las muestras normales y tumorales de pulmón.

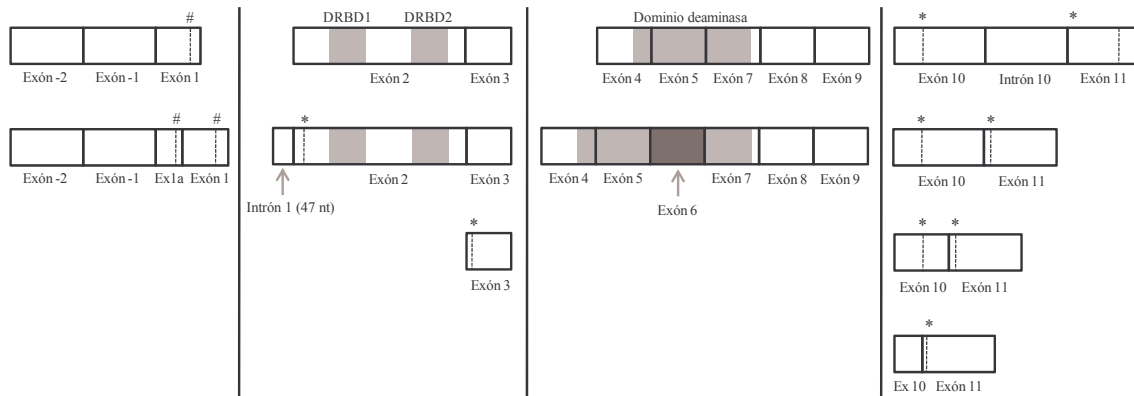


Figura 46. Potenciales isoformas de los transcritos de ADARB1. El pre-mRNA puede dividirse en cuatro regiones, en función de la localización de los distintos eventos de *splicing* que pueden tener lugar. En la primera región, son posibles dos inicios alternativos, en el exón 1 y en 1a. En la segunda, la retención del exón 2 es compatible con un proceso de auto-edición, que conlleva la inclusión de 47 nucleótidos del intrón 1, dando lugar a un codón de parada poco después, mientras que la eliminación completa del exón 2 genera un triplete de terminación en el exón 3; en la tercera región, son posibles dos variantes principales, dependiendo de la presencia o ausencia del exón 6, que interrumpe el dominio catalítico de ADARB1; en el último tramo, donde existen dos codones de parada, es posible encontrar eliminación o retención del intrón 9, eliminación de una parte del exón 10 posterior a la primera secuencia de terminación, o eliminación de un fragmento que incluye este codón. La combinación de estos fragmentos da la cifra teórica de 48 transcritos de ADARB1. #: Codón de inicio; *: Codón de parada; DRBD1 y 2: Dominios 1 y 2 de unión a RNA de doble hebra. Adaptado de Kawahara y col., 2005.

Para comprobar esta suposición, se estudiaron después en las mismas células los niveles de los transcritos de ADARB1 que se diferencian en haber sufrido o no una auto-edición. En este sentido, la mejor evidencia de que la edición de RNA puede afectar al patrón de *splicing* la encontramos en el hecho de que ADARB1 es capaz de editar su propio pre-mRNA (Rueter y col., 1999). Mediante este mecanismo, se genera un sitio 3' alternativo, que conduce a la inclusión de un fragmento de 47 nucleótidos del intrón 1, dando lugar a una proteína no funcional. Se cree que este proceso responde a una retro-alimentación negativa, para controlar los niveles de actividad de ADARB1 cuando estos son elevados. De hecho, en un estudio previo ya se propuso utilizar el nivel de expresión de las isoformas editadas como forma de medir la actividad de ADARB1 (Maas y col., 2001). En nuestro trabajo sólo se detectó la presencia de los transcritos sin editar tanto en células normales como tumorales de pulmón.

Recientemente, se ha descrito una nueva variante posible de ADARB1, cuya expresión parece ser específica de cerebelo, que incluye un exón localizado 18 kpb corriente arriba respecto al que hasta ahora se consideraba el exón 1. Este hallazgo sugiere la presencia de un promotor alternativo (Maas y col., 2009).

2.3. Dianas moleculares de ADARB1

La mayoría de las dianas conocidas de ADARB1 son mRNA que codifican para proteínas importantes en la función del SNC, como canales iónicos o receptores de neurotransmisores. Hay que resaltar que existe un solapamiento parcial con ADAR1, ya que algunos de los lugares de edición de esta proteína son comunes a los de ADARB1.

La subunidad B del receptor del glutamato (GluR-B) es una de las dianas preferidas de la acción de ADARB1. En concreto, hay dos lugares susceptibles de ser editados. En uno de ellos, conocido como sitio Q/R, la edición de A para formar I (G) implica la sustitución del aminoácido glutamina por arginina, disminuyéndose la permeabilidad del canal a los iones de Ca^{2+} (Higuchi y col., 1993). Curiosamente, este sitio está editado casi en el 100% de los casos, lo cual hace pensar que la edición supone una ventaja evolutiva. De hecho, los ratones *knock out* para ADARB1 mueren a los 20 días de su nacimiento tras repetidos ataques epilépticos, revertiéndose la situación si se sustituye la A, no editada en el mRNA, por una G a nivel genómico de GluR-B (Higuchi y col., 2000).

El sitio R/G del mRNA de GluR-B es otro lugar donde la edición es un fenómeno frecuente, modificándose la velocidad de repolarización tras la desensibilización causada por el ligando (Lomeli y col., 1994). Se ha descrito que ciertas deficiencias en la edición del transcrito de GluR-B en el SNC se asocian a esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington (Akbarian y col., 1995), así como a esclerosis lateral amiotrófica (Kwak y col., 2005).

Otra de las dianas principales de la acción de ADARB1 es el mRNA del receptor subtipo 2C de la serotonina (5-HT_{2C}R), que presenta 6 sitios posibles de edición, uno de ellos específico de ADARB1 y otros dos compartidos con ADAR1. Dependiendo de las distintas combinaciones de edición, se pueden generar distintas isoformas de proteínas, por sustitución de aminoácidos y por cambios en la elección de los sitios de *splicing*. En general, las variantes editadas del receptor presentan peor unión a su ligando y una clara reducción en la actividad de proteína G asociada (Wang y col., 2000). Alteraciones en la edición del pre-mRNA de 5-HT_{2C}R se han asociado a pacientes con depresión y a suicidas (Gurevich y col., 2002).

Las subunidades 5 y 6 del receptor del glutamato (GluR-5 y GluR-6) o el canal iónico de potasio Kv1.1 son otros ejemplos de edición por parte de ADARB1 en mamíferos (revisado por Maydanovych y col., 2006).

2.4. ¿Está implicado ADARB1 en el desarrollo del cáncer de pulmón?

La capacidad de convertir nucleótidos por parte de enzimas como las ADAR puede ser peligrosa si su expresión o actividad no están reguladas. La mayoría de los transcritos editados que conllevan cambio de aminoácido se han descrito en el SNC, por lo que cabe preguntarse si la variedad de proteínas generadas responde a que es realmente necesaria para el SNC, o a que es mejor tolerada por ser un lugar de privilegio inmune (Gallo y col., 2008). En cualquier caso, parece que existe una tendencia general a una disminución de los niveles de edición en tumores cerebrales.

Sin embargo, la primera alteración de un evento en la edición se describió en la leucemia mieloide crónica (LMC). La edición de una A en el transcrito de la tirosina fosfatasa (PTPN6) causa la eliminación del sitio de ramificación, reteniéndose un intrón que debía ser eliminado y generando una proteína no funcional. Se propuso que la edición anormal de PTPN6, que parece actuar como un gen supresor de tumores, se debe a fallos en la regulación de la edición, más que a incrementos de la actividad deaminasa. Además, los pacientes con LMC en remisión presentan menores niveles de *splicing* alterado de PTPN6. No obstante, no se identificó si la responsable de la edición era ADAR1 o ADARB1 (Beghini y col., 2000).

Se ha descrito que el sitio Q/R del mRNA de GluR-B está hipo-editado en líneas celulares y pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) respecto a los controles normales (Maas y col., 2001). En ese mismo estudio, también se encontraron alteraciones en la edición y en el *splicing* de los transcritos del receptor 5-HT_{2C}. Además, estos datos se correlacionaron con un descenso en la actividad de ADARB1, medida mediante los niveles de auto-edición de su propio mRNA.

Posteriormente, se ha visto que esta menor edición de GluR-B en pacientes con GBM aumenta la permeabilidad al Ca²⁺, lo cual favorece un mayor crecimiento y agresividad de los tumores, por activación de la vía de Akt (Ishiuchi y col., 2007).

En el GBM pediátrico también se han detectado escasos niveles de actividad de ADARB1, correlacionándose con el grado de malignidad del tumor. Sin embargo, el descenso en la edición del sitio Q/R en niños es menor que en adultos, lo cual parece explicarse por el hecho de que ADAR1 tiene una expresión aumentada en estos pacientes y forma hetero-dímeros con ADARB1 en los astrocitos, interfiriendo en su actividad. Finalmente, revertiendo el estatus de edición se consiguió enlentecer el crecimiento celular, en las fases S-G₂ y la migración celular (Cenci y col., 2008).

Mediante una aproximación bioinformática, se ha demostrado que las secuencias Alu presentan niveles globales de hipo-edición no sólo en tumores cerebrales, sino también en tumores de otros tejidos, como próstata, pulmón, riñón y testículos, existiendo correlación con el grado de malignidad (a menor edición, mayor grado de malignidad). Además, se encontraron menores niveles de mRNA de ADAR1, ADARB1 y ADAR3 en tumores cerebrales (Paz y col., 2007).

En el cáncer se presentan alteraciones en muchos procesos biológicos. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se resuelve una de las incógnitas principales: saber si las alteraciones descritas en la edición del RNA son el causante de la transformación celular y por tanto de la enfermedad, o por el contrario son una consecuencia del tumor en sí mismo.

2.4.1. Pérdida de heterocigosidad en 21q22.3 en pacientes con cáncer de pulmón

Tras comprobar que se producía una disminución en la expresión de ADARB1 en líneas celulares y pacientes con cáncer de pulmón, se barajó la posibilidad de que este descenso pudiera deberse a la pérdida de material genético en las proximidades de su locus en el cromosoma 21. Además, nos hizo pensar que tal vez ADARB1 tuviera alguna función como gen supresor de tumores.

En un estudio previo (Lee y col., 2003) ya se había descrito pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *Loss Of Heterozygosity*) en el brazo largo del cromosoma 21, en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, mediante el análisis de microsatélites. Sin embargo, en ese estudio no se cubrió la región 21q22.3, donde se ubica el locus de ADARB1.

En nuestro trabajo, se estudió la posible LOH en 21q22.3 en pacientes con cáncer de pulmón, por medio del análisis de microsatélites, así como de varios polimorfismos de nucleótido único (SNP), incluyendo uno dentro del gen de ADARB1 (rs1051367). Los resultados nos indicaron que la LOH es un fenómeno frecuente en 21q22.3, ya que entre un 30 y un 40% de los pacientes estudiados presentaron pérdidas de material genético para los microsatélites estudiados, siendo la LOH del 68% para el caso concreto del SNP rs1051367. No hubo diferencias según tipos histológicos de cáncer de pulmón.

Para determinar si estos porcentajes distintos se debían a aspectos técnicos o a que la pérdida de material era más específica del locus de ADARB1, se estudiaron otros microsatélites, que flanquean el gen, en pacientes que presentaron LOH para el SNP rs1051367, pero no para los microsatélites más cercanos a su locus. Los resultados obtenidos sugieren que la pérdida de material genético observada en 21q22.3 es discontinua y variable entre distintos pacientes. Así, a lo largo de esta zona del cromosoma 21 se alternarían regiones que han sufrido pérdida con otras que no (**Figura 47**). De este modo, nos encontraríamos con una región del genoma que presentaría una tendencia o susceptibilidad a perder material genético, si bien estas pérdidas no serían igualmente reproducibles en todos los casos clínicos.

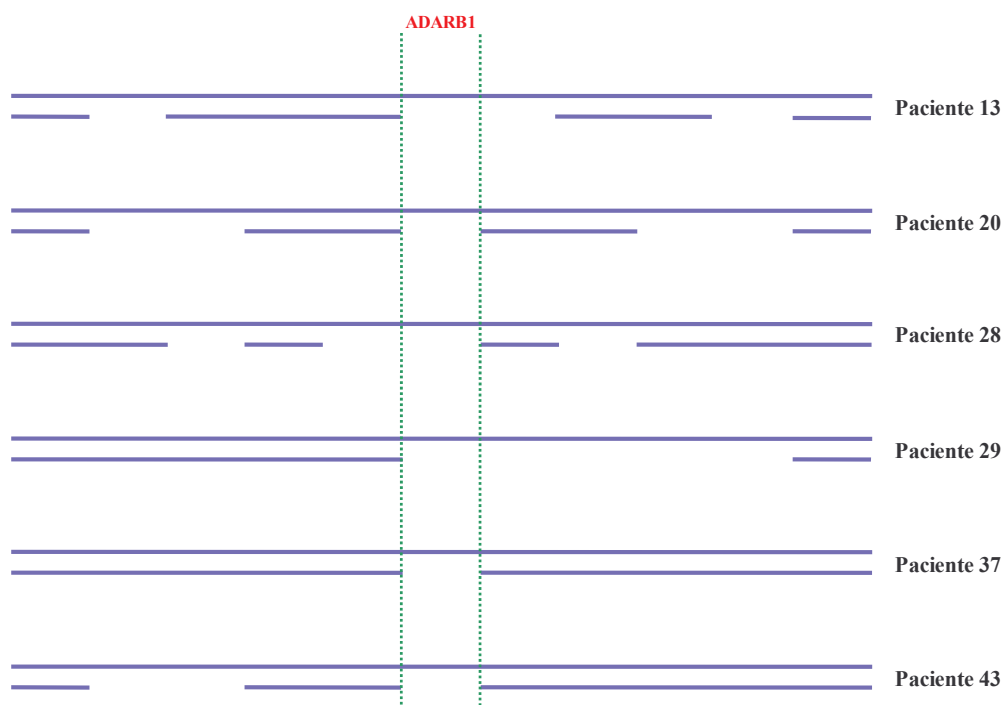


Figura 47. Modelo propuesto para la pérdida de heterocigosidad observada en la región cromosómica 21q22.3 en algunos pacientes con cáncer de pulmón. Se muestra un escenario en el que la pérdida de material genético sería discontinua y afectaría a diversos fragmentos de DNA entre las distintas muestras clínicas. El locus de ADARB1 estaría implicado en la mayoría de los casos, por lo que es posible que su pérdida sea más específica.

El análisis de la homocigosidad o heterocigosidad de los microsatélites en líneas celulares llevó a una conclusión parecida a la sugerida para los casos clínicos. Se encontraron algunas líneas celulares totalmente homocigotas, en las que la LOH parece evidente, dada la baja probabilidad de que todos los microsatélites estén en homocigosidad, pero también se hallaron regiones con alternancia de homocigosidad y heterocigosidad en otras líneas celulares.

En cualquier caso, es evidente que la LOH en 21q22.3 es un fenómeno frecuente en cáncer de pulmón. Aunque hacen falta más estudios que puedan apoyar los resultados obtenidos en este trabajo, se lanza aquí la propuesta de que la región cromosómica 21q22.3 pueda ser crítica en la carcinogénesis pulmonar, de igual forma que lo son otras regiones situadas en el brazo corto del cromosoma 3 (3p), donde la LOH es un evento temprano en el desarrollo de tumores de pulmón, tanto del tipo SCLC como NSCLC (Wistuba y col., 2006).

En 3p, las pérdidas de material genético también parecen ser discontinuas. Estas características, por tanto, se ajustarían a las descritas como frecuentes en lesiones pre-neoplásicas de fumadores con y sin cáncer de pulmón (Zabarovsky y col., 2002) y que implica a genes que pueden ser supresores de tumores. Por lo tanto, se concluye que ADARB1, o algún otro gen situado en sus alrededores, podría tener un papel similar, razón por la cual se llevaron a cabo posteriormente estudios epigenéticos y búsqueda de mutaciones.

2.4.2. Ausencia de mutaciones relevantes y de metilación del promotor del gen de ADARB1 en líneas celulares de cáncer pulmón

La búsqueda de mutaciones en el gen de ADARB1 en pacientes con cáncer de pulmón no arrojó resultados convincentes. Aunque se encontraron cuatro posibles mutaciones, todas ellas fueron distintas y se localizaron en posiciones diferentes. Además, todas fueron mutaciones presentes en uno de los alelos, conservándose una copia del DNA original y sólo una conllevaba cambio de aminoácido. Por tanto, parece que las mutaciones encontradas en el gen de ADARB1 no suponen un evento trascendente en la carcinogénesis pulmonar. En la bibliografía, por otra parte, tampoco se han descrito hasta la fecha mutaciones en el gen de ADARB1, aunque sí en el de ADAR1, en pacientes con discromatosis simétrica hereditaria.

La búsqueda de alteraciones epigenéticas en nuestro estudio se centró primero en un análisis del nivel de metilación del promotor de ADARB1 en líneas celulares de pulmón. Sin embargo, ninguna de las células tumorales presentó metilación del promotor. El estudio se amplió a otros genes en 21q22.3 y 21q22.2, cuya expresión se había encontrado disminuida previamente en pacientes con tumores NSCLC, en trabajos realizados por nuestro grupo.

Cuatro de estos genes (ERG, ETS2, SNF1LK e ITGB2) presentaron positividad para la metilación de sus promotores en varias líneas celulares. No obstante, también estaban metilados en muestras normales de pulmón y sangre periférica (ETS2, SNF1LK e ITGB2). En cambio, no se encontró metilación en el promotor de ERG en muestras normales, por lo que se estudió el nivel de expresión del gen, en un intento por correlacionarlo con el estado epigenético de su promotor. Sin embargo, no se logró encontrar ninguna relación entre los niveles de metilación del promotor de ERG y su expresión en líneas tumorales y células normales de pulmón. La posterior reversión de la metilación con el fármaco 5-Aza-2'-desoxicitidina en algunas de estas líneas descartó que la regulación epigenética de ERG pudiera tener influencia sobre su expresión.

Curiosamente, en varios trabajos se ha descrito que ERG tiene relación con el cáncer, pero en estos casos actuaría como oncogén. Por ejemplo, en el sarcoma de Ewing, una translocación originaría la proteína de fusión EWS-ERG (Maire y col., 2008), mientras que en cáncer de próstata la entidad TMPRSS2-ERG se asociaría a fenotipos más agresivos de la enfermedad (Hofer y col., 2009). En cuanto al cáncer de pulmón, los datos más recientes, obtenidos mediante *arrays* de exones, apuntan a que una de las variantes alternativas de ERG está sobre-expresada en pacientes con NSCLC (Xi y col., 2008).

2.4.3. ADARB1 en la funcionalidad celular

Como se ha comentado antes, a partir de los resultados obtenidos en el estudio de LOH y habiendo revisado la bibliografía existente, nos planteamos la posibilidad de que ADARB1 pudiera ser un potencial gen supresor de tumores. Para comprobarlo, se llevó a cabo la sobre-expresión transitoria y estable de ADARB1, así como su inhibición con siRNA en líneas celulares de pulmón, y se estudiaron las posibles alteraciones funcionales.

En cuanto a la sobre-expresión de ADARB1, se generaron cuatro construcciones distintas en el vector de expresión comercial. Por un lado, se analizó si, tal y como se había descrito previamente (Gerber y col., 1997), había diferencias de actividad entre las isoformas con el exón 6 (variante *larga*) y sin él (variante *corta*). Por otra parte, se sobre-expresó ADARB1 de manera que una isoforma tuviera una A en el SNP rs1051367 y otra una G. Esto se hizo porque en los pacientes que habían presentado LOH, el número de casos en los que se conservó el alelo con el nucleótido G (12) fue más del doble que para el alelo con el nucleótido A (5).

La mayor presencia del alelo con G también se había obtenido en líneas celulares con una frecuencia mayor a la esperada si se asume que la pérdida de material es al azar y que puede afectar por tanto a cualquier alelo de forma indistinta. De esta forma, se valoró la posibilidad de que, pudiendo existir una mayor tendencia a perder el alelo con A y a conservar el que tiene G, hubiera alguna ventaja selectiva.

Los estudios funcionales incluyeron un análisis de la proliferación *in vitro* y de la capacidad de formar clones con independencia de anclaje. Además, se tomaron fotografías de las distintas células para ver si se producía cambio de morfología. Para el caso de la sobre-expresión de ADARB1, se determinó también la capacidad de editar su propio mRNA *in vitro*. Se comprobó inicialmente que la manipulación en los niveles de ADARB1 (aumento por sobre-expresión o descenso por inhibición) funcionaba en todos los casos, así como la funcionalidad de la proteína sobre-expresada en sus cuatro isoformas, tanto de forma estable como transitoria.

Sin embargo, la sobre-expresión de ADARB1 en las diversas líneas celulares de cáncer de pulmón empleadas no afectó a la morfología celular, a su proliferación, ni a la capacidad clonogénica en agar blando. Estos resultados contrastan con los obtenidos en un trabajo del año 2007. En este estudio, la sobre-expresión de ADARB1 en una línea celular de glioblastoma multiforme produjo modificaciones en la morfología celular, alteraciones en los niveles de edición de varios genes y un descenso en la velocidad de proliferación *in vitro* (Paz y col., 2007). Lógicamente, las muestras empleadas (cerebro y pulmón) difieren entre ambos trabajos, pero tras los resultados obtenidos respecto a los niveles de expresión de ADARB1 en líneas y pacientes, así como las frecuentes pérdidas de material genético halladas en 21q22.3, se esperaba que las alteraciones en la edición, si no eran específicas del cáncer de pulmón, al menos fueran características del cáncer en general. Tal vez la alteración del sistema editasa sea más probable cuando las enzimas responsables se expresen por encima de un determinado umbral, como ocurre en el SNC.

La inhibición de ADARB1 mediante siRNA en las mismas líneas celulares de pulmón tampoco afectó a aspectos funcionales. Dado que los niveles de ADARB1 son muy bajos en estas muestras, se podría pensar que era más probable obtener resultados positivos sobre-expresando el gen y no inhibiéndolo. Sin embargo, es interesante señalar que en los últimos años se han publicado varios artículos que apuntan a que ADARB1, debido a que actúa sobre RNA de doble hebra, puede afectar a la ruta de RNA de interferencia (RNAi), contrarrestando sus efectos.

La síntesis de los micro-RNA (miRNA) supone un proceso en el que participan distintas enzimas, como Drosha en el núcleo o Dicer en el citoplasma, durante el cual se generan intermediarios precursores (pri-miRNA) de RNA de doble hebra. Si sobre los pri-miRNA o los miRNA maduros actúa ADAR1, la secuencia de RNA es editada y se introducen desapareamientos I:U. Las consecuencias son diversas, ya que Drosha y Dicer pueden dejar de reconocer a sus dianas, bloqueándose la síntesis de miRNA adecuados (Scadden y col., 2001; Ohman, 2007).

Un ejemplo concreto lo encontramos en la edición del pri-miR-142, precursor del miRNA-142, expresado en tejidos hematopoyéticos. La deaminación que tiene lugar por parte de ADAR1 o ADAR2 impide la activación de Drosha y hace que el enzima citoplasmático Tudor degrade el pri-miR-142. (Yang y col., 2006). En amígdala humana y corteza cerebral de ratón, la edición del pri-miR-151 por parte de ADAR1 impediría su exportación al citoplasma y la acción de Dicer, por lo que esta molécula inmadura se acumularía en la célula (Kawahara y col., 2007).

También puede ocurrir que Tudor degrade inadecuadamente algunos miRNA o que se generen nuevos miRNA, editados, que actúen sobre moléculas de mRNA que antes de la activación de ADAR2 no eran dianas de interferencia por RNA. Así, el miRNA-376a, editado por ADAR2, bloquearía la expresión de PRPS1 (Kawahara y col., 2007).

Por otra parte, algunos miRNA se han asociado a determinados tipos de cáncer. Son los casos de miRNA-376a y el cáncer de páncreas (Lee y col., 2007), o miRNA-142 y la leucemia de células B en ratones (Chen y col., 2004). Asimismo, hay evidencias que apuntan a que let-7 podría actuar como un supresor del crecimiento del cáncer de pulmón, ya que se ha descrito un descenso de su expresión en pacientes con tumores NSCLC, estando además correlacionada esta disminución con un peor pronóstico (Yanaihara y col., 2006; Kumar y col., 2008). En cualquier caso, hacen falta más estudios para saber si alguno de estos miRNA es editado y si esto tiene relación con la carcinogénesis.

Recientemente, en otro trabajo se han tratado de identificar más pri-miRNA como posibles dianas de ADAR1 y ADAR2. Se encontraron 47 pri-miRNA en los que se producía edición en 43 tripletes UAG (que es una de las dianas teóricamente favoritas para la edición) y 43 tripletes no-UAG y se concluyó que el 16% de los pri-miRNA humanos sufren edición A → I en el cerebro (Kawahara y col., 2008).

Teniendo en cuenta toda esta información, la ausencia de cambios funcionales encontrada en nuestro trabajo al sobre-expresar o inhibir el mRNA de ADARB1 se podría deber a varias causas.

En primer lugar, ADARB1 podría no ser relevante para el mantenimiento de la morfología celular, la proliferación o la capacidad clonogénica, aunque no se descarta su participación en otros procesos biológicos clave en la célula normal y/o tumoral.

Es también posible que en el caso de la inhibición, ésta no tenga efectos funcionales, ya que la proteína presenta unos niveles muy bajos de expresión basal.

Se puede también especular que, del mismo modo que ADARB1 edita su propio pre-mRNA, también podría editar las estructuras de doble hebra que se formen entre su mRNA y los siRNA utilizados para bloquearlo, con lo que se alteraría la funcionalidad de los siRNA y esta inhibición sería sólo parcial. De esta forma, seguiría habiendo niveles residuales de ADARB1, los cuales tal vez serían suficientes para mantener las características celulares analizadas.

Finalmente, también se debería considerar la posibilidad de que ADARB1 sea relevante para otros tipos histológicos de cáncer de pulmón. En concreto, en experimentos no mostrados en este trabajo se determinó la expresión del receptor del glutamato (GluR-B), una de las principales dianas moleculares de ADARB1, en el panel de líneas celulares de cáncer de pulmón. Las células que presentaron expresión de este gen fueron aquellas que tienen un origen neuroendocrino, como las derivadas de cáncer de pulmón microcítico y carcinoides. Hasta ahora, debido a la mayor prevalencia de casos de cáncer de pulmón no microcítico los experimentos realizados se han centrado en líneas celulares y pacientes con esta clase de tumores. En el futuro, sería interesante profundizar en el estudio de la edición de GluR-B por parte de ADARB1 en tumores microcíticos y en las consecuencias que esta modificación tiene en la funcionalidad de la célula tumoral.

Resumiendo los resultados obtenidos para ADARB1, en este trabajo se han hallado cambios en la expresión de ADARB1 y frecuentes pérdidas de material genético en su región cromosómica en pacientes con cáncer de pulmón. Este hallazgo podría ayudar a entender mejor las alteraciones producidas durante el proceso de carcinogénesis pulmonar. Por otro lado, la alta frecuencia de pérdidas de material cromosómico en la región 21q22.3 sugiere la existencia de genes importantes, ADARB1 u otros genes todavía no caracterizados, que se podrían asociar al desarrollo del cáncer de pulmón.

3. Valoración de PTB como un posible gen implicado en carcinogénesis pulmonar

La validación bioinformática, mediante una cuarta base de datos independiente, de los resultados obtenidos tras el primer análisis estadístico, permitió identificar otro gen que presentaba expresión significativamente distinta entre las muestras de pulmón sano y las muestras procedentes de pacientes con cáncer de pulmón, incluidos en los *microarrays* de partida: PTB.

El interés en profundizar en PTB se justificó además conociendo los resultados obtenidos en dos estudios previos realizados por nuestro grupo. En el primero de ellos (Castaño y col., 2008), se sugirió que la expresión de α CP-4, una proteína de unión al RNA, inhibe la progresión del ciclo celular y reduce la tumorigenicidad de las células de cáncer de pulmón, por lo que podría tratarse de un gen supresor de tumores. En este trabajo se utilizó la línea celular H1299, con expresión inducible de α CP-4 mediante un vector retroviral regulable por tetraciclina.

El segundo estudio se llevó a cabo durante el transcurso del proyecto Máster de JA Massol. Con los datos proporcionados tras utilizar un *microarray* de expresión, se analizó qué genes presentaban diferencias de expresión en las células H1299 con sobre-expresión inducible de α CP-4, frente a las células control. El gen que presentó resultados más significativos y robustos fue PTB, por lo que se decidió seleccionarlo para posteriores estudios, como una posible diana de la acción de α CP-4.

3.1. Papel de PTB en la célula

PTB (*Polypyrimidine Tract-Binding protein*), también conocido como hnRNP I, es una proteína que consta de cuatro dominios de unión a RNA. En concreto, reconoce y se une a regiones cortas ricas en pirimidinas, especialmente citosinas (Auweter y col., 2007). En solución, se presenta monomérica, aunque puede formar homo-dímeros PTB-PTB o complejos con otros RNA o con proteínas diana (Petoukhov y col., 2006).

Normalmente, PTB se localiza en el núcleo. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés celular (infecciones virales, apoptosis o exposición a sustancias tóxicas) puede translocarse rápidamente al citoplasma (Back y col., 2002; Aizaki y col., 2006; Dobbyn y col., 2008). Por ello, PTB posee señales tanto de exportación como de localización nuclear. La fosforilación de la primera de ellas por la proteína quinasa A conlleva la acumulación de PTB en el citoplasma (Xie y col., 2003).

Existen tres isoformas principales de PTB, resultado de un proceso de *splicing* alternativo. En la variante más corta (PTB1), de 531 aminoácidos, el exón 9 es eliminado. Las otras dos isoformas, PTB2 y PTB4, contienen 19 ó 26 aminoácidos adicionales, respectivamente, ya que el exón 9 posee dos sitios 3' alternativos (Gil y col., 1991).

PTB auto-regula su propia expresión, mediante unión de la proteína a su mRNA, inhibiendo la eliminación del exón 11. Esto causaría la degradación del mRNA, que queda fuera del marco de lectura, por el mecanismo de NMD (del inglés, *nonsense-mediated decay*) (Wollerton y col., 2004).

Dado que suele ser habitual la unión a distintas regiones de la misma molécula de RNA alejadas en la secuencia primaria, PTB genera re-estructuraciones del RNA diana e introducción de bucles. Estos cambios serían los responsables de las funciones atribuidas a PTB en la célula (Mitchell y col., 2003; Petoukhov y col., 2006).

Se ha descrito que PTB participa en la localización sub-celular de ciertos mRNA. Por ejemplo, la fosforilación de la secuencia de exportación nuclear por la proteína quinasa A llevaría a PTB al citoplasma, donde se uniría al mRNA de la α -actina y lo transportaría a las neuritas. Por tanto, PTB sería esencial para el crecimiento neuronal y la motilidad celular (Ma y col., 2007).

La estabilidad de algunos mRNA también se ve influida por PTB. Se ha visto que los niveles mantenidos de glucosa inducen un aumento del mRNA de PTB. La unión de la proteína de PTB a regiones ricas en polipirimidinas del mRNA de la insulina de rata aumentaría la estabilidad y, por tanto, la vida media de su mRNA y de otros relacionados con componentes de gránulos secretores. La hipoxia favorecería la unión de PTB al mRNA de la insulina, mientras que mutaciones en la región rica en polipirimidinas la reducirían (Tillmar y col., 2002). El mRNA de VEGF también vería aumentada su estabilidad al unirse a PTB (Coles y col., 2004).

PTB actúa como un represor de *splicing* para distintos pre-mRNA que pueden sufrir corte y empalme alternativo. En ocasiones, es suficiente una molécula de la proteína de PTB para mediar esta represión, aunque la mayoría de las veces son varias las que están presentes, uniéndose a diferentes sitios del RNA (Izquierdo y col., 2005). El mecanismo molecular de la inhibición del *splicing* por PTB se basaría en la existencia de sitios solapantes con factores de *splicing* como U2AF y el snRNP U2, o con otras secuencias reguladoras (Valcárcel y col., 1997). PTB impediría estéricamente la participación de estos factores y no se produciría el proceso de corte y empalme. Esta sería la forma en

que PTB regularía su propia expresión cuando los niveles de proteína son elevados, o la de otros genes, como en el caso de la IgM en ratones (Shen y col., 2004).

La retención de exones que estaban destinados a ser eliminados puede provocar la aparición de sitios alternativos de poliadenilación y, por tanto, afectar al procesamiento de los transcritos en sus extremos 3' (extremo C-terminal de la correspondiente proteína). Este sería el caso del péptido relacionado con calcitonina (CT/CGRP). La unión de PTB a un pseudo-exón de su pre-mRNA causaría la inclusión de una secuencia que contiene una señal de poliadenilación alternativa (Lou y col., 1999).

PTB también está implicado en el inicio de la traducción por mecanismos independientes de la presencia de caperuza 5' en los transcritos. En muchos virus de la familia *Picornaviridae*, cuyos mRNA no poseen esta caperuza que marque el inicio de la traducción, el reclutamiento de los ribosomas recae en unas secuencias internas llamadas IRES (del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*).

La interacción entre las IRES y los ribosomas puede ocurrir directamente, pero suele estar mediada por proteínas como PTB, que se unirían a secuencias consenso CUUU (Kolupaeva y col., 1996) y estabilizarían a las IRES, favoreciendo la correcta unión de los ribosomas al codón de inicio (Song y col., 2005). Las diferencias de expresión de proteínas de unión a IRES serían las responsables de los niveles de actividad viral y, como consecuencia, de la virulencia de las distintas cepas (Pilipenko y col., 2001).

La traducción mediada por IRES también puede ocurrir en la célula bajo las mismas condiciones que hacen que PTB se localice en el citoplasma (mencionadas previamente) y que inhiben la traducción dependiente de caperuza (Spriggs y col., 2008). En estas situaciones, PTB, en solitario o junto con otras proteínas como PCBP1, se uniría a la secuencia consenso (CCU)_n (Mitchell y col., 2005), remodelando la estructura del mRNA y reclutando ribosomas, con algunas de cuyas proteínas podría además interaccionar, para iniciar la traducción (Spriggs y col., 2005). Este sería el modelo propuesto para la expresión de BAG-1 (Pickering y col., 2004), en el que el tratamiento con la droga vincristina favorecería la localización de PTB en el citoplasma.

Además, el aumento de PTB citoplásmico sería importante en la activación de las IRES durante la apoptosis, puesto que una reducción de la expresión de PTB causaría inhibición de la muerte celular, mientras que el aumento provocaría apoptosis espontánea (Bushell y col., 2006).

Así pues, la función principal de PTB varía según su localización (procesamiento de RNA en el núcleo; traducción en el citoplasma). Por tanto, el control del tránsito de PTB entre el núcleo y el citoplasma determina los niveles de proteína en cada compartimento y, por tanto, qué papel predomina en la célula.

3.2. El compartimento perinucleolar (PNC)

No obstante, PTB es uno de los principales componentes del compartimento perinucleolar (PNC). El PNC es una estructura insoluble localizada en la periferia nucleolar, dinámica y de morfología irregular que aparece frecuentemente en células transformadas, tanto *in vitro* (por ejemplo, en las células HeLa) como *in vivo*, siendo extraña su presencia en células normales. Se detecta a lo largo de la interfase, pierde su ensamblaje al comienzo de la mitosis y se re-organiza en la telofase tardía, cuando se forman los núcleos de las células hijas (revisado por Kopp y col., 2005).

El PNC consta básicamente de dos tipos de componentes: RNA y proteínas de unión a RNA. Los RNA identificados son no codificantes y todos ellos (RNasa P H1, RNasa de MRP, el componente RNA de la partícula SRP, etc.) son transcritos por la RNA polimerasa III, pudiendo interactuar con ribonucleoproteínas Ro, nucleolina o PTB, que forman parte también del PNC. Curiosamente, no todos los RNA transcritos por la polimerasa III se encuentran en el PNC (tRNA, U6, 5S rRNA), como tampoco ninguno de los transcritos por la polimerasa II (revisado por Kopp y col., 2005).

Entre las proteínas de unión a RNA que forman parte del PNC se encuentran, entre otras, Raver1, que se asocia a PTB; KSRP, presente en todos los PNC de células de neuroblastoma y en algunos de células HeLa; ROD1 y nucleolina (revisado por Kopp y col., 2005). Sin embargo, la más destacada es PTB, que fue además la primera en ser identificada (Ghetti y col., 1992), cuya localización en el PNC es sensible al tratamiento con RNasa A (Huang y col., 1998) y que se utiliza habitualmente como marcador de detección de PNC mediante técnicas inmunohistoquímicas.

El mantenimiento de la estructura del PNC recae en la presencia de PTB. Cuando la síntesis de PTB se inhibe en células HeLa mediante el bloqueo con siRNA, se observa un descenso tanto del número de células que contienen PNC como del tamaño de éstos, así como cambios en su morfología, sin afectar a la estructura general del núcleo. Asimismo, la inhibición de la RNA polimerasa III mediante la toxina tagetina provoca el mismo efecto (Wang y col., 2003). Por lo tanto la integridad estructural de los PNC es también dependiente de la presencia de una actividad RNA polimerasa III que aporte

de forma constante ciertos transcritos al compartimento. Ya que en el PNC aparecen transcritos recién sintetizados, se había propuesto que éste fuera el lugar de transcripción de estos RNA. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* de varios de estos genes no proporcionaron esta asociación (Matera y col., 1995).

Se ha propuesto que el PNC, en células transformadas, participaría en el metabolismo de este grupo de transcritos mediante su procesamiento, ensamblaje con otras proteínas formando complejos (como las RNP) y degradación de los mRNA en exceso (Kopp y col., 2005).

Aunque el mantenimiento de la integridad del PNC depende de la presencia de transcritos tipo III, la sobre-expresión de éstos y/o de las otras proteínas que lo integran no es suficiente para inducir la formación de esta estructura. Aunque sí se ha descrito que durante la transformación se incrementa la transcripción por parte de la RNA polimerasa III (White, 2004), harían falta además alteraciones en la expresión o en la funcionalidad de otros factores, aún por identificar, que serían responsables de una *nucleación* de los componentes, formándose la entidad del PNC. De esta forma, la presencia de PNC sería una manifestación de la transformación. Además, el PNC funcionaría manteniendo el fenotipo transformado, ya que aportaría muchos de sus componentes al nucleolo, que sufre diversas alteraciones en las células tumorales (revisado por Kopp y col., 2005).

3.3. PTB, PNC y cáncer

Se ha descrito que los niveles relativos de expresión de las distintas isoformas de PTB podrían estar relacionados con el potencial metastásico de algunas líneas celulares de próstata (Wagner y col., 1999).

Además, la presencia de PNC se asocia con transformación de células en cultivo (Huang y col., 1997). Un estudio evaluó la relación entre el PNC y la malignidad *in vivo*. La prevalencia de PNC se correlacionó con la progresión del cáncer de mama (en función del estadio) y con distintos niveles de afectación. Los tumores primarios mostraron un 23% de prevalencia de PNC, mientras que para las metástasis distales la prevalencia fue casi del 100%. Además, los pacientes en estadios tempranos con carcinomas ductales invasivos y altas prevalencias de PNC mostraron un peor pronóstico. Se propuso, por tanto, la prevalencia de PNC como un marcador pronóstico de cáncer de mama, especialmente para pacientes en estadio I (Kamath y col., 2004).

Un estudio reciente ha confirmado que PTB juega un papel importante en el desarrollo de la carcinogénesis de ovario, pues se ha hallado una relación directa entre PTB y los tumores malignos de ovario de origen epitelial. Mediante técnicas inmunocitoquímicas, se encontró que los niveles de PTB en muestras procedentes de estos tumores eran más elevados que en sus respectivas muestras normales pareadas, donde la concentración de PTB era baja (He y col., 2007).

Además, la inhibición de PTB mediante siRNA en la línea tumoral de ovario A2780 provocó un descenso en la proliferación tumoral, en el crecimiento independiente de anclaje y en la capacidad invasiva *in vitro*. Se propuso, por tanto, que la sobre-expresión de PTB es un componente importante en el proceso de tumorigénesis y que es necesario para el desarrollo y mantenimiento de los tumores de ovario epiteliales.

Estos resultados, por tanto, concuerdan con nuestro estudio. Al inhibir PTB mediante siRNA en la línea celular de pulmón A549 encontramos un descenso en la capacidad de formar clones con independencia de anclaje en agar blando, así como una menor velocidad de proliferación *in vitro*. Por otro lado, los niveles de expresión del mRNA de PTB fueron heterogéneos en líneas celulares de pulmón, comparados con las células normales SAEC y en muestras de pacientes con cáncer de pulmón, respecto a sus pareadas muestras normales. A nivel de proteína, no se observaron diferencias significativas en la expresión de PTB en líneas celulares de pulmón frente a las células SAEC.

Parece ser, por tanto, que los niveles celulares de PTB no se correlacionan de forma significativa con la capacidad oncogénica y que es posible que las distintas propiedades de la célula tumoral, susceptibles de verse afectadas al inhibir PTB, dependan del tipo de muestra.

Las conclusiones aportadas en un estudio previo, en el que se emplearon líneas celulares de múltiples orígenes y tumores de adenocarcinoma endometrial, podrían apoyar esta posibilidad. En primer lugar, encontraron incrementos heterogéneos de las tres isoformas de PTB entre las distintas muestras. En segundo lugar, la inhibición de PTB redujo la proliferación *in vitro* de las células transformadas, pero más aún de las células normales. En tercer lugar, esta inhibición hizo descender la capacidad invasiva de dos líneas celulares, pero la aumentó en otra. Y finalmente, la sobre-expresión de PTB no incrementó la proliferación, el crecimiento independiente de anclaje ni la invasividad de células normales o inmortalizadas (Wang y col., 2008).

Sería interesante profundizar en las causas de la heterogeneidad de respuesta a la inhibición de PTB y su efecto en el crecimiento in vivo. Asimismo, quedaría también pendiente el estudio de las posibles alteraciones funcionales de la sobre-expresión de PTB en líneas celulares de pulmón, tanto in vitro como in vivo.

Así pues, el papel de PTB en la carcinogénesis está todavía por definir. Tanto nuestros resultados, referidos a pulmón, como los publicados por otros grupos para otros tipos de cáncer, ofrecen datos interesantes, aunque heterogéneos. Por lo tanto, parece imprescindible ampliar el número y tipo de muestras en las que profundizar en estos estudios, lo que permitirá poder valorar si PTB tiene una función en la malignidad de la célula tumoral.

VI. CONCLUSIONES

1. Mediante análisis bioinformáticos y validación en líneas celulares de pulmón, se han identificado nueve genes relacionados con el metabolismo del RNA que presentan una expresión significativamente distinta entre tejido pulmonar normal y tejido tumoral de pulmón. Estos son: ADARB1, ASCC3L1, MARS, MRPL3, PABPC1, PTB, RAE1, SNRPB y SNRPE.
2. De entre los genes identificados, destaca la significativa disminución en la expresión de ADARB1 tanto en líneas tumorales como en muestras clínicas de cáncer de pulmón respecto a muestras de pulmón sano.
3. Tanto en células normales de pulmón como en líneas tumorales, las isoformas de los transcritos de ADARB1 que presentan el exón 6 son mayoritarias y no hay auto-edición basal de su mRNA.
4. La pérdida de heterocigosidad en la región cromosómica 21q22.3, y más concretamente en torno al locus de ADARB1, es un evento muy frecuente en cáncer de pulmón. Esta pérdida de material genético sigue un patrón discontinuo en algunos casos y sugiere la presencia de genes supresores en esta región cromosómica.
5. Aunque se han detectado mutaciones en el gen de ADARB1 en algunas líneas celulares de pulmón, éstas no parecen ser relevantes para la funcionalidad de la proteína. Por otro lado, no existen modificaciones en la metilación del promotor de ADARB1.
6. La sobre-expresión o inhibición de ADARB1 en líneas celulares de pulmón aumenta los niveles de actividad editasa, sin que esto afecte a la morfología celular, a la proliferación *in vitro* o a la capacidad de las células de crecer en ausencia de anclaje.
7. En cuanto a PTB, las diferencias de expresión basal entre células normales de pulmón y líneas tumorales, así como entre muestras normales y tumorales de pacientes con cáncer de pulmón son heterogéneas y poco acusadas, tanto a nivel de mRNA como de proteína.

8. La inhibición de la expresión de PTB en la línea celular A549, procedente de un adenocarcinoma bronquioloalveolar, disminuye la velocidad de crecimiento *in vitro* de estas células, así como su capacidad de formar clones con independencia de anclaje, sugiriendo un papel de este gen en el desarrollo de las características malignas de estas células.

9. Los cambios de expresión y las alteraciones moleculares detectadas en este estudio, en determinados genes relacionados con el metabolismo del RNA en cáncer de pulmón, apoyan la hipótesis de que las modificaciones en el procesamiento del RNA forman parte del proceso de carcinogénesis pulmonar y son importantes en el mantenimiento del fenotipo tumoral.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Adachi J, Shiseki M, Okazaki T y col. Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995; 14: 301-6.

Aizaki H, Choi KS, Liu M y col. Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis. *J Biomed Sci*, 2006; 13: 469-80.

Ajona D, Castaño Z, Garayoa M y col. Expression of complement factor H by lung cancer cells: effects on the activation of the alternative pathway of complement. *Cancer Res*, 2004; 64: 6310-8.

Ajona D, Hsu YF, Corrales L y col. Down-regulation of human complement factor H sensitizes non-small cell lung cancer cells to complement attack and reduces in vivo tumor growth. *J Immunol*, 2007; 178: 5991-8.

Akbarian S, Smith MA y Jones EG. Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Res*, 1995; 699: 297-304.

Alessi DR, Sakamoto K y Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem*, 2006; 75: 137-63.

Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res*, 2003; 88: 31-52.

Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*, 2008; 8: 61-70.

Armas OA, White DA, Erlanson RA y col. Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell proliferation presenting as interstitial lung disease. *Am J Surg Pathol*, 1995; 19: 963-70.

Auweter SD, Oberstrass FC y Allain FH. Solving the structure of PTB in complex with pyrimidine tracts: an NMR study of protein-RNA complexes of weak affinities. *J Mol Biol*, 2007; 367: 174-86.

Back SH, Shin S y Jang SK. Polypyrimidine tract-binding proteins are cleaved by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem*, 2002; 277: 27200-9.

Baudry D, Hamelin M, Cabanis MO y col. WT1 splicing alterations in Wilms' tumors. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 3957-65.

Beer DG, Kardia SLR, Huang CC y col. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8: 816-24.

Beghini A, Ripamonti CB, Peterlongo P y col. RNA hyperediting and alternative splicing of hematopoietic cell phosphatase (PTPN6) gene in acute myeloid leukemia. *Hum Mol Genet*, 2000; 9: 2297-304.

Bell DW, Gore I, Okimoto RA y col. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet*, 2005; 37: 1315-6.

Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS y col. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-smallcell lung cancer. *Br J Cancer*, 1996; 73: 294-300.

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J y col. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13790-5.

Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene*, 2004; 23: 6392-403.

Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res*, 2006; 608: 157-62.

Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S y col. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol*, 1996; 149: 1941-52.

Brognard J, Clark AS, Ni Y y col. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*, 2001; 61: 3986-97.

Brow DA. Eye on RNA unwinding. *Nat Struct Mol Biol*, 2009; 16: 7-8.

Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S y col. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*, 2001; 93: 691-9.

Bushell M, Stoneley M, Kong YW y col. Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis. *Mol Cell*, 2006; 23: 401-12.

Cáceres JF y Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*, 2002; 18: 186-93.

Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M y col. Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol*, 1999; 154: 1345-52.

Cascino I, Papoff G, De Maria R y col. Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, 1996; 156: 13-17.

Castaño Z, Vergara-Irigaray N, Pajares MJ y col. Expression of alpha CP-4 inhibits cell cycle progression and suppresses tumorigenicity of lung cancer cells. *Int J Cancer*, 2008; 122: 1512-20.

Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P y col. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 11432-7.

Cenci C, Barzotti R, Galeano F y col. Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation. *J Biol Chem*, 2008; 283: 7251-60.

Chai G, Li L, Zhou W y col. HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells. *PLoS ONE*, 2008; 3: e2445.

Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL y col. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, 2002; 277: 12587-95.

Chen CZ, Li L, Lodish HF y col. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004; 303: 83-6.

Chen SH, Habib G, Yang CY y col. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science*, 1987; 238: 363-6.

Cheung N, Wong MP, Yuen ST y col. Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol*, 1998; 29: 910-4.

Cho DS, Yang W, Lee JT y col. Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA. *J Biol Chem*, 2003; 278: 17093-102.

Chu JL y Elkon KB. The small nuclear ribonucleoproteins, SmB and B', are products of a single gene. *Gene*, 1991; 97: 311-2.

Colby TV, Wistuba II y Gazdar AF. Precursors to pulmonary neoplasia. *Adv Anat Pathol*, 1998; 5: 205-15.

Coles LS, Bartley MA, Bert A y col. A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. *Eur J Biochem*, 2004; 271: 648-60.

Comtesse N, Keller A, Diesinger I y col. Frequent overexpression of the genes FXR1, CLAPM1 and EIF4G located on amplicon 3q26-27 in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Cancer*, 2007; 120: 2538-44.

Coulson JM, Edgson JL, Woll PJ y col. A splice variant of the neuronrestrictive silencer factor repressor is expressed in small cell lung cancer: a potential role in derepression of neuroendocrine genes and a useful clinical marker. *Cancer Res*, 2000; 60: 1840-4.

Davies H, Bignell GR, Cox C y col. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002; 417: 949-54.

Dawson TR, Sansam CL y Emeson RB. Structure and sequence determinants required for the RNA editing of ADAR2 substrates. *J Biol Chem*, 2004; 279: 4941-51.

De Jonge RR, Garrigue-Antar L, Vellucci VF y col. Frequent inactivation of the transforming growth factor beta type II receptor in small-cell lung carcinoma cells. *Oncol Res*, 1997; 9: 89-98.

Dehan E y Kaminski N. Series GSE1987 de la página Web de GEO. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

Desterro JM, Keegan LP, Lafarga M y col. Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. *J Cell Sci*, 2003; 116: 1805-18.

Di Feo A, Feld L, Rodriguez E y col. A functional role for KLF6-SV1 in lung adenocarcinoma prognosis and chemotherapy response. *Cancer Res*, 2008; 68: 965-70.

Ding L, Getz G, Wheeler DA y col. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 2008; 455: 1069-75.

Ding WQ, Cheng ZJ, McElhiney J y col. Silencing of secretin receptor function by dimerization with a misspliced variant secretin receptor in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 2002; 62: 5223-9.

Dobbyn HC, Hill K, Hamilton TL y col. Regulation of BAG-1 IRES-mediated translation following chemotoxic stress. *Oncogene*, 2008; 27: 1167-74.

Dreyfuss G, Kim VN y Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002; 3: 195-205.

Ebbinghaus C, Scheuermann J, Neri D y col. Diagnostic and therapeutic applications of recombinant antibodies: targeting the extra-domain B of fibronectin, a marker of tumor angiogenesis. *Curr Pharm Des*, 2004; 10: 1537-49.

Eisenberg E, Nemzer S, Kinar Y y col. Is abundant A-to-I RNA editing primate-specific? *Trends Genet*, 2005; 21: 77-81.

Fan J, Wang L, Jiang GN y col. The role of survivin on overall survival of non-small cell lung cancer, a meta-analysis of published literatures. *Lung Cancer*, 2008; 61: 91-6.

Fedorova E y Zink D. Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2008; 1783: 2174-84.

Ferlay J, Autier P, Boniol M y col. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, 2007; 18: 581-92.

Fernandez-Garcia I, Ortiz-de-Solorzano C y Montuenga LM. Telomeres and telomerase in lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2008; 3: 1085-8.

Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L y col. Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem*, 2004; 279: 4743-9.

Fischer DC, Noack K, Runnebaum IB y col. Expression of splicing factors in human ovarian cancer. *Oncol Rep*, 2004; 11: 1085-90.

Fishel I, Kaufman A y Ruppin E. Meta-analysis of gene expression data: a predictor-based approach. *Bioinformatics*, 2007; 23: 1599-606.

Flanagan JM, Funes JM, Henderson S y col. Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets. *Mol Cancer Ther*, 2009; 8: 249-60.

Franklin WA, Veve R, Hirsch FR y col. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol*, 2002; 29: 3-14.

Galiana-Arnoux D, Lejeune F, Gesnel MC y col. The CD44 alternative v9 exon contains a splicing enhancer responsive to the SR proteins 9G8, ASF/SF2, and SRp20. *J Biol Chem*, 2003; 278: 32943-53.

Gallo A, Keegan LP, Ring GM y col. An ADAR that edits transcripts encoding ion channel subunits functions as a dimer. *EMBO J*, 2003; 22: 3421-30.

Gallo A y Galardi S. A-to-I RNA editing and cancer: from pathology to basic science. *RNA Biol*, 2008; 5: 135-9.

Gerber A, O'Connell MA y Keller W. Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette. *RNA*, 1997; 3: 453-63.

Ghetti A, Piñol-Roma S, Michael WM y col. hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res*, 1992; 20: 3671-8.

Gil A, Sharp PA, Jamison SF y col. Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. *Genes Dev*, 1991; 5: 1224-36.

Granville CA y Dennis PA. An overview of lung cancer genomics and proteomics. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005; 32: 169-76.

Groeger AM, Esposito V, De Luca A y col. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. *Histopathology*, 2004; 44: 54-63.

Gu M y Lima CD. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Curr Opin Struct Biol*, 2005; 15: 99-106.

Gurevich I, Tamir H, Arango V y col. Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron*, 2002; 34: 349-56.

Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 2004; 11: 394-403.

Hainaut P, Hernandez T, Robinson A y col. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res*, 1998; 26: 205-13.

Hanahan D y Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57-70.

Hayes DN, Monti S, Parmigiani G y col. Gene expression profiling reveals reproducible human lung adenocarcinoma subtypes in multiple independent patient cohorts. *J Clin Oncol*, 2006; 24: 5079-90.

He X, Pool M, Darcy KM y col. Knockdown of polypyrimidine tract-binding protein suppresses ovarian tumor cell growth and invasiveness in vitro. *Oncogene*, 2007; 26: 4961-8.

Heider KH, Kuthan H, Stehle G y col. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2004; 53: 567-79.

Higashiyama M, Doi O, Kodama K y col. MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer*, 1997; 75: 1302-8.

Higuchi M, Single FN, Köhler M y col. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell*, 1993; 75: 1361-70.

Higuchi M, Maas S, Single FN y col. Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature*, 2000; 406: 78-81.

Hirata T, Fukuse T, Naiki H y col. Expression of CD44 variant exon 6 in stage I non-small cell lung carcinoma as a prognostic factor. *Cancer Res*, 1998; 58: 1108-10.

Hofer MD, Kuefer R, Maier C y col. Genome-wide linkage analysis of TMPRSS2-ERG fusion in familial prostate cancer. *Cancer Res*, 2009; 69: 640-6.

Hough RF, Lingam AT y Bass BL. *Caenorhabditis elegans* mRNAs that encode a protein similar to ADARs derive from an operon containing six genes. *Nucleic Acids Res*, 1999; 27: 3424-32.

Huang S, Deerinck TJ, Ellisman MH y col. The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell nucleus. *J Cell Biol*, 1997; 137: 965-74.

Huang S, Deerinck TJ, Ellisman MH y col. The perinucleolar compartment and transcription. *J Cell Biol*, 1998; 143: 35-47.

Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y y col. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene*, 2005; 24: 7105-13.

Ishiuchi S, Yoshida Y, Sugawara K y col. Ca²⁺-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. *J Neurosci*, 2007; 27: 7987-8001.

Isobe T, Herbst RS y Onn A. Current management of advanced non-small cell lung cancer: targeted therapy. *Semin Oncol*, 2005; 32: 315-28.

Izquierdo JM, Majós N, Bonnal S y col. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol Cell*, 2005; 19: 475-84.

Jeganathan KB, Baker DJ y van Deursen JM. Securin associates with APCCdh1 in prometaphase but its destruction is delayed by Rael and Nup98 until the metaphase/anaphase transition. *Cell Cycle*, 2006; 5: 366-70.

Jones PA y Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 2002; 3: 415-28.

Kalnina Z, Zayakin P, Silina K y col. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 42: 342-57.

Kamath RV, Thor AD, Wang C y col. Perinucleolar compartment prevalence has an independent prognostic value for breast cancer. *Cancer Res*, 2005; 65: 246-53.

Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierowski J y col. Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2006; 51: 61-9.

Karube Y, Tanaka H, Osada H y col. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 2005; 96: 111-5.

Kaufman KM, Kirby MY, McClain MT y col. Lupus autoantibodies recognize the product of an alternative open reading frame of SmB/B'. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 285: 1206-12.

Kawahara Y, Ito K, Ito M y col. Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene*, 2005; 363: 193-201.

Kawahara Y, Zinshteyn B, Chendrimada TP y col. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep*, 2007; 8: 763-9.

Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P y col. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science*, 2007; 315: 1137-40.

Kawahara Y, Megraw M, Kreider E y col. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36: 5270-80.

Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol*, 2001; 54: 257-71.

Kim B, Lee HJ, Choi HY y col. Clinical validity of the lung cancer biomarkers identified by bioinformatics analysis of public expression data. *Cancer Res*, 2007; 67: 7431-8.

Knoop LL y Baker SJ. The splicing factor U1C represses EWS/FLI-mediated transactivation. *J Biol Chem*, 2000; 275: 24865-71.

Knudson AG. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. *Cancer*, 1989; 63: 1888-91.

Kolupaeva VG, Hellen CU y Shatsky IN. Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *RNA*, 1996; 2: 1199-212.

Kopp K y Huang S. Perinucleolar compartment and transformation. *J Cell Biochem*, 2005; 95: 217-25.

Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F y col. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer*, 1996; 73: 148-53.

Krinsky NI y Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med*, 2005; 26: 459-516.

Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE y col. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *PNAS USA*, 2008; 105: 3903-8.

Kushner JP, Boll D, Quagliana J y col. Elevated methionine-tRNA synthetase activity in human colon cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1976; 153: 273-6.

Kwak S y Kawahara Y. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Med*, 2005; 83: 110-20.

Landry JR, Mager DL y Wilhelm BT. Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. *Trends Genet*, 2003; 19: 640-8.

Lau SK, Boutros PC, Pintilie M y col. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2007; 25: 5562-9.

Laurencikiene J, Källman AM, Fong N y col. RNA editing and alternative splicing: the importance of co-transcriptional coordination. *EMBO Rep*, 2006; 7: 303-7.

Lee DW, Zhang K, Ning ZQ y col. Proliferation-associated SNF2-like gene (PASG): a SNF2 family member altered in leukemia. *Cancer Res*, 2000; 60: 3612-22.

Lee EB, Park TI, Park SH y col. Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 21 in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 2003; 75: 1597-600.

Lee EJ, Gusev Y, Jiang J y col. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2007; 120: 1046-54.

Lee JH, Seo YW, Park SR y col. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res*, 2003; 63: 7247-55.

Leech SH, Olie RA, Gautschi O y col. Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *Int J Cancer*, 2000; 86: 570-6.

Lehmann KA y Bass BL. Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. *Biochemistry*, 2000; 39: 12875-84.

Lengauer C, Kinzler KW y Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 1998; 396: 643-9.

Lewin B. En: *Genes*. 2ª edición. Editorial Reverté, Barcelona, 1994.

Li Z y Pützer BM. Spliceosomal protein E regulates neoplastic cell growth by modulating expression of cyclin E/CDK2 and G2/M checkpoint proteins. *J Cell Mol Med*, 2008; 12: 2427-38.

Liu Y, Zhu X, Zhu J y col. Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray. *Oncol Rep*, 2007; 18: 943-51.

Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T y col. Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science*, 1994; 266: 1709-13.

Lou H, Helfman DM, Gagel RF y col. Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Biol*, 1999; 19: 78-85.

Lovecchio M, Maiorano E, Vacca RA y col. Beta 1C Integrin expression in human endometrial proliferative diseases. *Am J Pathol*, 2003; 163: 2543-53.

Lu F, Gladden AB y Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res*, 2003; 63: 7056-61.

Lu Y, Lemon W, Liu PY y col. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med*, 2006; 3: e467.

Ma S, Liu G, Sun Y y col. Relocalization of the polypyrimidine tract-binding protein during PKA-induced neurite growth. *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1773: 912-23.

Maas S, Patt S, Schrey M y col. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14687-92.

Maas S, Rich A y Nishikura K. A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J Biol Chem*, 2003; 278: 1391-4.

Maas S y Gommans WM. Novel exon of mammalian ADAR2 extends open reading frame. *PLoS ONE*, 2009; 4: e4225.

Macbeth MR, Lingam AT y Bass BL. Evidence for auto-inhibition by the N terminus of hADAR2 and activation by dsRNA binding. *RNA*, 2004; 10: 1563-71.

Macbeth MR, Schubert HL, Vandemark AP y col. Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science*, 2005; 309: 1534-9.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ y col. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*, 1992; 340: 145-6.

Maire G, Brown CW, Bayani J y col. Complex rearrangement of chromosomes 19, 21, and 22 in Ewing sarcoma involving a novel reciprocal inversion-insertion mechanism of EWS-ERG fusion gene formation: a case analysis and literature review. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008; 181: 81-92.

Makowski L y Hayes DN. Role of LKB1 in lung cancer development. *Br J Cancer*, 2008; 99: 683-8.

Marsit CJ, Zheng S, Aldape K y col. PTEN expression in non-small cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum Pathol*, 2005; 36: 768-76.

Massol JA. Alteraciones en la expresión de genes implicados en el metabolismo del RNA en cáncer de pulmón; Proyecto de Máster; Universidad de Navarra; 2007.

Matera AG, Frey MR, Margelot K y col. A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J Cell Biol*, 1995; 129: 1181-93.

Maydanovych O y Beal PA. Breaking the central dogma by RNA editing. *Chem Rev*, 2006; 106: 3397-411.

Melcher T, Maas S, Herb A y col. A mammalian RNA editing enzyme. *Nature*, 1996; 379: 460-4.

Melo SA, Ropero S, Moutinho C y col. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet*, 2009; 41: 365-70.

Meyerson M y Carbone D. Genomic and proteomic profiling of lung cancers: lung cancer classification in the age of targeted therapy. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 3219-26.

Migliorini P, Baldini C, Rocchi V y col. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity*, 2005; 38: 47-54.

Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J y col. Expression of sex hormone-binding globulin exon VII splicing variant messenger RNA in human uterine endometrial cancers. *Cancer Res*, 1997; 57: 5579-83.

Mitchell SA, Spriggs KA, Coldwell MJ y col. The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol Cell*, 2003; 11: 757-71.

Mitchell SA, Spriggs KA, Bushell M y col. Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry. *Genes Dev*, 2005; 19: 1556-71.

Miyake H, Eto H, Arakawa S y col. Over expression of CD44V8–10 in urinary exfoliated cells as an independent prognostic predictor in patients with urothelial cancer. *J Urol*, 2002; 167: 1282-7.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD y col. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc*, 2008; 83: 584-94.

Montuenga L y Mulshine JL. New molecular strategies for early lung cancer detection. *Cancer Invest*, 2000; 18: 555-63.

Monzó M, Rosell R, Felip E y col. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol*, 1999; 17: 2100-4.

Morse DP, Aruscavage PJ y Bass BL. RNA hairpins in noncoding regions of human brain and *Caenorhabditis elegans* mRNA are edited by adenosine deaminases that act on RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 7906-11.

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*, 1997; 111: 1710-7.

Muto Y, Pomeranz Krummel D, Oubridge C y col. The structure and biochemical properties of the human spliceosomal protein U1C. *J Mol Biol*, 2004; 341: 185-98.

Nagatake M, Takagi Y, Osada H y col. Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res*, 1996; 56: 2718-20.

Nakagawa K, Noguchi Y, Uenaka A y col. XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients. *Clin Cancer Res*, 2005; 11: 5496-503.

Naor D, Nedvetzki S, Golan I y col. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2002; 39: 527-79.

Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR y col. The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci*, 2009; 5: 97-117.

Niehans GA, Cherwitz DL, Staley NA y col. Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am J Pathol*, 1996; 149: 129-42.

Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP y col. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res*, 1997; 57: 1007-12.

Nishikura K. Editing the message from A to I. *Nat Biotechnol*, 2004; 22: 962-3.

O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A y col. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2000; 82: 1427-32.

Ohkura N, Yaguchi H, Tsukada T y col. The EWS/NOR1 fusion gene product gains a novel activity affecting pre-mRNA splicing. *J Biol Chem*, 2002; 277: 535-43.

Ohman M. A-to-I editing challenger or ally to the microRNA process. *Biochimie*, 2007; 89:1171-6.

Ou JH, Yen TS, Wang YF y col. Cloning and characterization of a human ribosomal protein gene with enhanced expression in fetal and neoplastic cells. *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 8919-34.

Pabo CO y Sauer RT. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 1992; 61: 1053-95.

Pacher M, Seewald MJ, Mikula M y col. Impact of constitutive IGF1/IGF2 stimulation on the transcriptional program of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 49-59.

Paez JG, Janne PA, Lee JC y col. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004; 304: 1497-500.

Pajares MJ, Ezponda T, Catena R y col. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol*, 2007; 8: 349-57.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G y col. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res*, 2000; 60: 5954-8.

Paz N, Levanon EY, Amariglio N y col. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome Res*, 2007; 17: 1586-95.

Peebles KA, Dwyer-Nield LD y Malkinson AM. Altered expression of splicing factor, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, in mouse lung neoplasia. *Mol Carcinog*, 2007; 46: 887-900.

Peterson ML. Mechanisms controlling production of membrane and secreted immunoglobulin during B cell development. *Immunol Res*, 2007; 37: 33-46.

Petoukhov MV, Monie TP, Allain FH y col. Conformation of polypyrimidine tract binding protein in solution. *Structure*, 2006; 14: 1021-7.

Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG y col. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol*, 2004; 22: 330-53.

Pickering BM, Mitchell SA, Spriggs KA y col. Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Mol Cell Biol*, 2004; 24: 5595-605.

Pilipenko EV, Viktorova EG, Guest ST y col. Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *EMBO J*, 2001; 20: 6899-908.

Pino I, Pio R, Toledo G y col. Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer*, 2003; 41: 131-43.

Pio R, Zudaire I, Pino I y col. Alpha CP-4, encoded by a putative tumor suppressor gene at 3p21, but not its alternative splice variant alpha CP-4a, is underexpressed in lung cancer. *Cancer Res*, 2004; 64: 4171-9.

Pio R y Montuenga LM. Alternative splicing in lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2009; 4 (en prensa).

Pirinen R, Hirvikoski P, Bohm J y col. Reduced expression of CD44v3 variant isoform is associated with unfavorable outcome in non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol*, 2000; 31: 1088-95.

Reeve JG, Xiong J, Morgan J y col. Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumour cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance. *Br J Cancer*, 1996; 73: 1193-1200.

Reissmann PT, Koga H, Takahashi R y col. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene*, 1993; 8: 1913-9.

Reiter R, Wellstein A y Riegel AT. An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer. *J Biol Chem*, 2001; 276: 39736-41.

Richardson GE y Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol*, 1993; 20: 105-27.

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M y col. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2007.

Rosell R, Pifarre A, Monzo M y col. Reduced survival in patients with stage-I non-small-cell lung cancer associated with DNA-replication errors. *Int J Cancer*, 1997; 74: 330-4.

Rowinsky EK. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med*, 2004; 55: 433-57.

Ruano-Ravina A, Figueiras A, Freire-Garabal M y col. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Curr Pharm Des*, 2006; 12: 599-613.

Rueter SM, Dawson TR y Emeson RB. Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature*, 1999; 399: 75-80.

Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M y col. Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 10060-5.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A y col. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 2004; 304: 554.

Sansam CL, Wells KS y Emeson RB. Modulation of RNA editing by functional nucleolar sequestration of ADAR2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 14018-23.

Sato M, Shames DS, Gazdar AF y col. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2007; 2: 327-43.

Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA y col. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans*, 2008; 36: 641-7.

Scadden AD y Smith CW. RNAi is antagonized by A->I hyper-editing. *EMBO Rep*, 2001; 2: 1107-11.

Scheurlen WG y Senf L. Analysis of the GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene in childhood brain tumors. *Int J Cancer*, 1995; 64: 234-8.

Sekido Y, Obata Y, Ueda R y col. Preferential expression of c-kit protooncogene transcripts in small cell lung cancer. *Cancer Res*, 1991; 51: 2416-9.

Sekido Y, Fong KM y Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med*, 2003; 54: 73-87.

Serra MJ, Smolter PE y Westhof E. Pronounced instability of tandem IU base pairs in RNA. *Nucleic Acids Res*, 2004; 32: 1824-8.

Shen H, Kan JL, Ghigna C y col. A single polypyrimidine tract binding protein (PTB) binding site mediates splicing inhibition at mouse IgM exons M1 and M2. *RNA*, 2004; 10: 787-94.

Sher T, Dy GK y Adjei AA. Small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc*, 2008; 83: 355-367.

Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M y col. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, 2005; 65: 1642-6.

Shigematsu H y Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer*, 2006; 118: 257-62.

Slavov D y Gardiner K. Phylogenetic comparison of the pre-mRNA adenosine deaminase ADAR2 genes and transcripts: conservation and diversity in editing site sequence and alternative splicing patterns. *Gene*, 2002; 299: 83-94.

Smith HC, Gott JM y Hanson MR. A guide to RNA editing. *RNA*, 1997; 3: 1105-23.

Socinski MA. Bevacizumab as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Drugs Today (Barc)*, 2008; 44: 293-301.

Song L, Turkson J, Karras JG y col. Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene*, 2003; 22: 4150-65.

Song Y, Tzima E, Ochs K y col. Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA*, 2005; 11: 1809-24.

Soung YH, Lee JW, Kim SY y col. Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int J Cancer*, 2006; 118: 1426-9.

Sozzi G, Veronese ML, Negrini M y col. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 1996; 85: 17-26.

Sozzi G, Tornielli S, Tagliabue E y col. Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Res*, 1997; 57: 5207-12.

Spriggs KA, Mitchell SA y Willis AE. Investigation of interactions of polypyrimidine tract-binding protein with artificial internal ribosome entry segments. *Biochem Soc Trans*, 2005; 33: 1483-6.

Spriggs KA, Stoneley M, Bushell M y col. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell*, 2008; 100: 27-38.

Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL y col. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci*, 2005; 30: 97-105.

Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K y col. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung Cancer*, 2005; 48: 77-83.

Sun S, Schiller JH y Gazdar AF. Lung cancer in never smokers: a different disease. *Nat Rev Cancer*, 2007; 7: 778-90.

Sun Z y Yang P. Gene expression profiling on lung cancer outcome prediction: present clinical value and future premise. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006; 15: 2063-8.

Syed V, Zhang X, Lau KM y col. Profiling estrogen-regulated gene expression changes in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Oncogene*, 2005; 24: 8128-43.

Takashima N, Ishiguro H, Kuwabara Y y col. Expression and prognostic roles of PABPC1 in esophageal cancer: correlation with tumor progression and postoperative survival. *Oncol Rep*, 2006; 15: 667-71.

Takino T, Nakada M, Miyamori H y col. CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma. *Cancer Res*, 2003; 63: 2335-7.

Tang X, Shigematsu H, Bekele BN y col. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res*, 2005; 65: 7568-72.

Tillmar L y Welsh N. Hypoxia may increase rat insulin mRNA levels by promoting binding of the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) to the pyrimidine-rich insulin mRNA 3'-untranslated region. *Mol Med*, 2002; 8: 263-72.

Tockman MS, Mulshine JL, Piantadosi S y col. Prospective detection of preclinical lung cancer: results from two studies of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression. *Clin Cancer Res*, 1997; 3: 2237-46.

Travis WD, Colby TV, Corrin B y col. En: *Histological typing of lung and pleural tumours*. 3ª edición. Springer-Verlag, Berlín, 1999.

Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK y col. 2004. Tumours of the lung. En: *Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, ed. WD Travis, E Brambilla, HK Muller-Hermelink, CC Harris, pp. 9–124. Lyon: IARC.

Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL y col. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene*, 2002; 21: 5450-61.

Vaissière T, Sawan C y Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res*, 2008; 659: 40-8.

Valcárcel J y Gebauer F. Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol*, 1997; 7: R705-8.

Valente L y Nishikura K. ADAR gene family and A-to-I RNA editing: diverse roles in posttranscriptional gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2005; 79: 299-338.

Van Duin M, van Marion R, Vissers K y col. High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm 8q: evaluation of genetic progression markers for prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 44: 438-49.

Vaughan MD, Sampson PB y Honek JF. Methionine in and out of proteins: targets for drug design. *Curr Med Chem*, 2002; 9: 385-409.

Vegran F, Boidot R, Oudin C y col. Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas. *Int J Oncol*, 2005; 27: 1151-7.

Vella V, Pandini G, Sciacca L y col. A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87: 245-54.

Venables JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*, 2004; 64: 7647-54.

Vineis P y Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 1846-55.

Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S y col. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92: 1303-7.

Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP y col. Expression of p16INK4a / p16alpha and p19ARF/p16beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene*, 1998; 17: 2779-85.

Vousden KH y Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 594-604.

Wagner EJ, Carstens RP y Garcia-Blanco MA. A novel isoform ratio switch of the polypyrimidine tract binding protein. *Electrophoresis*, 1999; 20: 1082-6.

Wang C, Norton JT, Ghosh S y col. Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) differentially affects malignancy in a cell line-dependent manner. *J Biol Chem*, 2008; 283: 20277-87.

Wang C, Politz JC, Pederson T y col. RNA polymerase III transcripts and the PTB protein are essential for the integrity of the perinucleolar compartment. *Mol Biol Cell*, 2003; 14: 2425-35.

Wang ET, Sandberg R, Luo S y col. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008; 456: 470-6.

Wang L, Duke L, Zhang PS y col. Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res*, 2003; 63: 4724-30.

Wang L, Lin SH, Wu WG y col. C-CAM1, a candidate tumor suppressor gene, is abnormally expressed in primary lung cancers. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 2988-93.

Wang Q, O'Brien PJ, Chen CX y col. Altered G protein-coupling functions of RNA editing isoform and splicing variant serotonin_{2C} receptors. *J Neurochem*, 2000; 74: 1290-300.

Wang WL, Healy ME, Sattler M y col. Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571. *Oncogene*, 2000; 19: 3521-8.

Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes-the Achilles heel of cancer. *Science*, 2002; 297: 63-4.

Weir BA, Woo MS, Getz G y col. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*, 2007; 450: 893-8.

Weiss M, Baruch A, Keydar I y col. Preoperative diagnosis of thyroid papillary carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction of the MUC1 gene. *Int J Cancer*, 1996; 66: 55-9.

Westra WH. Early glandular neoplasia of the lung. *Respir Med*, 2000; 1: 163-9.

White RJ. RNA polymerase III transcription and cancer. *Oncogene*, 2004; 23: 3208-16.

Whitrow MJ, Smith BJ, Pilotto LS y col. Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature. *Respirology*, 2003; 8: 513-21.

Wikman H, Nymark P, Vayrynen A y col. CDK4 is a probable target gene in a novel amplicon at 12q13.3-q14.1 in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 42: 193-9.

Wilkinson MF. A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet*, 2005; 21: 143-8.

Wistuba II, Mao L y Gazdar AF. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene*, 2002; 21: 7298-306.

Wistuba II y Gazdar AF. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2006; 1: 331-48.

Wollerton MC, Gooding C, Wagner EJ y col. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell*, 2004; 13: 91-100.

Xi L, Feber A, Gupta V y col. Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. *Nucleic Acids Res*, 2008; 36: 6535-47.

Xie J, Lee JA, Kress TL y col. Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 8776-81.

Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM y col. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91: 484-8.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E y col. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 2006; 9: 189-98.

Yang W, Chendrimada TP, Wang Q y col. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*, 2006; 13: 13-21.

Yap YL, Lam DC, Luc G y col. Conserved transcription factor binding sites of cancer markers derived from primary lung adenocarcinoma microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2005; 33: 409-21.

Yoshimura A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci*, 2006; 97: 439-47.

Zabarovsky ER, Lerman MI y Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*, 2002; 21: 6915-35.

Zakowski MF. Pathology of small cell carcinoma of the lung. *Semin Oncol*, 2003; 30: 3-8.

Zerbe LK, Pino I, Pio R y col. Relative amounts of antagonistic splicing factors, hnRNP A1 and ASF/SF2, change during neoplastic lung growth: implications for pre-mRNA processing. *Mol Carcinog*, 2004; 41: 187-96.

VIII. ANEXOS

**ANEXO I: CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS
TUMORES EPITELIALES MALIGNOS DE PULMÓN¹**

1. Carcinoma de células escamosas
 - 1.1. Papilar
 - 1.2. Células claras
 - 1.3. Células pequeñas
 - 1.4. Basaloide

2. Carcinoma de células pequeñas
 - 2.1. Carcinoma de células pequeñas combinado

3. Adenocarcinoma
 - 3.1. Acilar
 - 3.2. Papilar
 - 3.3. Carcinoma bronquioloalveolar
 - 3.3.1. No mucinoso (Clara / neumocito tipo II)
 - 3.3.2. Mucinoso
 - 3.3.3. Mucinoso mixto y no mucinoso o de tipo celular intermedio
 - 3.4. Adenocarcinoma sólido con mucina
 - 3.5. Adenocarcinoma con subtipos mixtos
 - 3.6. Variantes
 - 3.6.1. Adenocarcinoma fetal bien diferenciado
 - 3.6.2. Adenocarcinoma mucinoso (“coloide”)
 - 3.6.3. Cistoadenocarcinoma mucinoso
 - 3.6.4. Adenocarcinoma en anillo de sello
 - 3.6.5. Adenocarcinoma de células claras

4. Carcinoma de células grandes
 - 4.1. Carcinoma neuroendocrino de células grandes
 - 4.1.1. Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado
 - 4.2. Carcinoma basaloide
 - 4.3. Carcinoma tipo linfoepitelioma
 - 4.4. Carcinoma de células claras
 - 4.5. Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide

- 5. Carcinoma adenoescamoso

 - 6. Carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos
 - 6.1. Carcinomas con células fusiformes y/o gigantes
 - 6.1.1. Carcinoma pleomórfico
 - 6.1.2. Carcinoma de células fusiformes
 - 6.1.3. Carcinoma de células gigantes
 - 6.2. Carcinosarcoma
 - 6.3. Blastoma pulmonar
 - 6.4. Otros

 - 7. Tumor carcinoide
 - 7.1. Carcinoide típico
 - 7.2. Carcinoide atípico

 - 8. Carcinomas de tipo glándula salivar
 - 8.1. Carcinoma mucoepidermoide
 - 8.2. Carcinoma adenoide quístico
 - 8.3. Otros

 - 9. Carcinoma inclasificable
-

¹ Travis y col., 1999.

**ANEXO II: ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER
DE PULMÓN SEGÚN EL SISTEMA TNM²**

Tumor primario	Definición
TX	El tumor primario no puede ser evaluado, o el tumor se ha comprobado por la presencia de células malignas en el esputo o secreciones bronquiales, pero no ha sido visualizado por broncoscopia o imágenes.
T0	No hay prueba de tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	El tumor tiene 3 cm o menos en su mayor dimensión, rodeado por pleura pulmonar o visceral y sin prueba broncoscópica de invasión más proximal que un lóbulo bronquial.
T2	El tumor tiene un tamaño mayor de 3 cm en su dimensión mayor y/o compromete el bronquio principal y está 2 cm o más distal de la carina y/o invade la pleura visceral y/o está relacionado con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero que no compromete todo el pulmón.
T3	Tumor de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica (incluyendo tumores del surco superior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal de menos de 2 cm distal a la carina, pero sin compromiso de la carina; o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva de todo el pulmón.
T4	Un tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes órganos: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; o tumores ganglionares separados en el mismo lóbulo; o tumor con derrame pleural maligno.

Ganglios linfáticos regionales	Definición
NX	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
N0	No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis a los ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales, los ganglios linfáticos hilares ipsilaterales o ambos y los ganglios intrapulmonares, incluyendo el compromiso por extensión directa del tumor primario.
N2	Metástasis al ganglio (o ganglios) linfático mediastínico ipsilateral, subcarinal o ambos.
N3	Metástasis al ganglio (o ganglios) mediastínico contralateral, hiliar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral, o supraclavicular.

Metástasis a distancia	Definición
MX	La presencia de metástasis distante no puede ser evaluada.
M0	No hay metástasis distante.
M1	Hay metástasis distante.

² Mountain, 1997.

**ANEXO III: CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES ANALIZADOS
EN EL ESTUDIO DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS³**

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')				
		ERG (NM_004449)	21q22.2	Posición del gen	Inicio	38.955.488
Fin	38.675.671					
Isla CpG	Inicio			38.955.535		
	Fin			38.954.114		
	CpG			140 (19.7%)		
Cebadores	Met.			S	atagtcgttttgggagacgac	
				AS	ctccgaaacgatcgtaacg	
	No Met.			S	atagttgttttgggatgatg	
				AS	ctccaaaacaatcataacaac	

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')				
		ETS2 (NM_005239)	21q22.2	Posición del gen	Inicio	39.099.719
Fin	39.118.746					
Isla CpG	Inicio			39.098.873		
	Fin			39.100.537		
	CpG			152 (18.3%)		
Cebadores	Met			S	cgggtcgttatttgggtatc	
				AS	gaatcgtaataactaatcgcgct	
	No Met			S	aggtgggtgttatttgggtatt	
				AS	cccaaatcataataactaatcacact	

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')				
		ABCG1 (NM_004915)	21q22.3	Posición del gen	Inicio	42.512.336
Fin	42.590.421					
Isla CpG	Inicio			42.512.018		
	Fin			42.513.201		
	CpG			113 (19.1%)		
Cebadores	Met.			S	tatgtcgtttgcgaggttcc	
				AS	gactaaaatccgactccgac	
	No Met.			S	gtttttatgttttgggtttt	
				AS	actccaactaaaatccaactcca	

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')			
		SNF1LK (NM_173354)	21q22.3	Posición del gen	Inicio
Fin	43.658.829				
Isla CpG	Inicio			43.661.635	
	Fin			43.661.159	
	CpG			40 (16.8%)	
Cebadores	Met.			S	agtagtcgggtgtagcggtc
				AS	gaataaaaaataaaaaataaacgcgat
	No Met.			S	agtagttgggtgtagtggtt
				AS	aaataaaaaataaaaaataaacacaat

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')			
		PDXK (NM_003681)	21q22.3	Posición del gen	Inicio
Fin	44.006.616				
Isla CpG	Inicio			43.962.722	
	Fin			43.964.259	
	CpG			156 (20.3%)	
Cebadores	Met.			S	cgcgtagagtagagtcgtagtc
				AS	acgtaaccgcgaataacgta
	No Met.			S	tgtgtagagtagagttgtagttga
				AS	taccacataaccacaataacata

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')			
		PTTG1IP (NM_004339)	21q22.3	Posición del gen	Inicio
Fin	45.093.941				
Isla CpG	Inicio			45.119.172	
	Fin			45.117.172	
	CpG			202 (20.2%)	
Cebadores	Met.			S	agtttcgcggtcgtaaac
				AS	gaaatcgaaatcgaaatttcg
	No Met.			S	ggtagttttgtggtgtaaatgg
				AS	tcaaatcaaatcaaatcaaac

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')			
		ITGB2 (NM_000211)	21q22.3	Posición del gen	Inicio
Fin	45.130.299				
Isla CpG	Inicio			45.177.339	
	Fin			45.175.757	
	CpG			134 (16.9%)	
Cebadores	Met.			S	ttaggcgcgtaggttttc
				AS	gcctacgccgaataatagc
	No Met.			S	ttaggtgtgtaggttttg
				AS	aatcacctacaccaataatacaaa

Gen (n° de acceso)	Banda cromosómica	Localización del gen, características de la isla CpG y secuencias de los cebadores (5'→3')			
		ADARBI (NM_001033049)	21q22.3	Posición del gen	Inicio
Fin	45.470.903				
Isla CpG	Inicio			45.318.602	
	Fin			45.319.900	
	CpG			142 (21.9%)	
Cebadores	Met.			S	tttcgtaaacgtaaacgtaatc
				AS	aaaaccgcgactaacgac
	No Met.			S	gttattttgtaaatgtaaatgtaattg
				AS	aactaaaaaccacaactaaacaac

³ Para cada uno de los genes, se muestra el número de acceso, la banda cromosómica, su localización en el brazo largo del cromosoma 21, la localización de la isla CpG utilizada para diseñar los cebadores, el número de islas CpG (con el porcentaje respecto al número de nucleótidos totales de la isla) y las secuencias de los cebadores sentido (S) y antisentido (AS) empleados en la MSP específica de regiones metiladas (Met.) y no metiladas (No Met.).

**ANEXO IV: CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES
DE PULMÓN PARA EL SNP rs1051367 DE ADARBI⁴**

Línea celular	Genotipo	Línea celular	Genotipo
H69	A	Calu-3	A
H82	G	A549	G
H187	AG	H322	G
H209	AG	H358	A
H345	A	H157	G
N417	A	H226	G
H446	AG	H1385	A
H510	AG	HTB-58	AG
H774	G	H460	G
H23	A	H661	G
H441	G	H1299	G
H1648	G	H720	AG
H2087	AG	H727	AG
HCC827	G		

Genotipo	Número de casos	Porcentaje (%)
A	7	25.93
G	12	44.44
AG	8	29.63

⁴ Para cada línea celular, en la primera tabla se muestra el genotipo del SNP rs1051367 obtenido en la secuenciación. En la segunda tabla, se resume el número de casos y el porcentaje que éstos suponen respecto al total de muestras.