



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Programa Oficial de Doctorado de Bioquímica y
Biología Molecular

**Análisis de los perfiles de expresión génica en
cáncer de pulmón.
Valor pronóstico en pacientes con cáncer de
pulmón no microcítico sometidos a
toracotomía.**

Laura Boyero Corral

Tesis Doctoral
Granada, 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Laura Boyero Corral

ISBN: 978-84-9163-085-2

URI: <http://hdl.handle.net/10481/44640>

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e
Inmunología
Universidad de Granada



Centro Pfizer - Universidad de Granada -
Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica
(GENyO)



Programa Oficial de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular (PD60)
Norma reguladora RD 1393/2007

**Análisis de los perfiles de expresión génica en cáncer de pulmón.
Valor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico
sometidos a toracotomía.**

Laura Boyero Corral
Granada, 2016

La doctoranda **Laura Boyero Corral** y los directores de la tesis **Esther Fárez Vidal** y **Pedro Medina Vico** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada 6 de Octubre de 2016

Doctorando:



Fdo: Laura Boyero Corral

Directores de la Tesis:



Fdo.: Esther Fárez Vidal



Fdo.: Pedro Medina Vico

Dña. **Esther Fárez Vidal**, Dra. en Microbiología por la Universidad de Granada y Profesora Titular del departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: Análisis de los perfiles de expresión génica en cáncer de pulmón. Valor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico sometidos a toracotomía, ha sido realizado bajo mi dirección por Laura Boyero Corral, para optar al título de Doctor en Biología por la Universidad de Granada.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada a 6 de Octubre de 2016.



Fdo.: Esther Fárez Vidal

Dña. **Pedro Medina Vico**, Investigador Ramón y Cajal en la Universidad de Granada y Profesor Titular del departamento de Bioquímica, Biología Molecular I de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: Análisis de los perfiles de expresión génica en cáncer de pulmón. Valor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico sometidos a toracotomía, ha sido realizado bajo mi dirección por Laura Boyero Corral, para optar al título de Doctor en Biología por la Universidad de Granada.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada a 6 de Octubre de 2016.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pedro Medina Vico', written over a horizontal line.

Fdo.: Pedro Medina Vico

*A mi familia y Álex, especialmente a mis abuelos Juan y Aurora,
quienes a pesar de haberles tocado vivir épocas difíciles
y no haber tenido la oportunidad de estudiar,
supieron apreciar e inculcar en nuestra familia el valor de la
educación, gracias al cual hoy puedo sostener
esta tesis entre mis manos.*

“Siempre se llega a alguna parte si se camina lo bastante”.

Alicia en el país de las maravillas.

Lewis Carroll.

*“We used to think that our fate was in our stars, but now we know that,
in large measure, our fate is in our genes”.*

James Watson.

Agradecimientos

Nunca nada se me presentó con tantas pruebas y obstáculos, con seguridad puedo decir que lo aprendido en este proceso marcará mi camino de hoy en adelante y, por ello, desde estas páginas me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de alguna forma, han formado parte de ello:

A la Dra. Esther Fárez Vidal y el Dr. Pedro Medina Vico, directores de este trabajo, por la oportunidad que me han brindado de unirme a su grupo de investigación y de desarrollar en él esta tesis doctoral.

A mis postdocs favoritos: Eva, Marta, Antonio y Santi, por su cercanía, su buen humor, su interés y cariño. Gracias también por la paciencia de la que han tenido que hacer acopio conmigo y por estar ahí siempre que los he necesitado, aún sin pedírselo. Gracias por ser más que compañeros de laboratorio. Gracias por ser esa agüita de mayo.

Al Joel, el miembro con más “flow” del equipo PKP1. Gracias por ser el mejor compañero, por las risas, por tus ideas, por contagiarme tu optimismo sin límites, por esos “no vengas el finde para eso que yo tengo que venir”. Cuenta siempre conmigo para lo que quieras.

Al resto de compañeros de laboratorio: Isa, Paola, Carlos, Miriam, Carmen, Puri, Laura, Ramón, Agustín, Viky, Álvaro y tantos otros, por compartir mis horas de trabajo haciéndolas más amenas ya fuera con bromas o con peleillas por los buffers. Gracias por pasar de ser aquellos patitos a despejar mis dudas de laboratorio. Gracias por ser la compañía que tanto eché en falta y por hacer que cada día me levantara con ganas de ir a trabajar.

A Patri, cohabitante del lab. No importa lo que los papeles oficiales dijeran: tú y yo éramos del mismo grupo!!

A los responsables de las distintas unidades de apoyo de GENyO, Raquel, Luis Javier, Olivia y Víctor, por su ayuda y su profesionalidad, por desenredarme los enredos y hacer fácil lo difícil.

Al resto de compañeros de GENyO, en especial a Cholo, Santi, Sara, David, Thomas, Marta, Valentín, Mati, Pepe, Helena y otros muchos. Gracias por crear el mejor ambiente de trabajo y estar siempre dispuestos a ayudar. Por discutir ideas y dar otras mejores.

A los viejos amigos: Ana, David, Fedra, Cristina, Bea y Javi. Gracias por ser la mejor vía de escape, por compartir mis buenos y malos momentos y tantas experiencias, por ser un apoyo diario, por sus consejos y sus ánimos en todo momento. Gracias por ser tan geniales y mi punto de referencia.

A toda mi familia, por soportarme cada día, incluso en mis agobios y estreses, por intentar ayudarme siempre, por los cuidados y la educación que me han dado y, porque a ellos debo cuanto tengo y cuanto soy. Sois todo cuanto a mí me gustaría ser un día.

A la familia González-Ruíz, por su apoyo y guisos durante mis años en GENyO.

A Alex, por ser mi pilar, mi apoyo, por transmitirme tu tranquilidad en los momentos difíciles y sacarme las sonrisas, por hacer que me olvide del mundo, por estar siempre cerca aun cuando hay kilómetros de por medio y por tu comprensión infinita. Tú, mejor que nadie, sabes el esfuerzo que todo esto ha supuesto y aun así siempre creíste en mí, pero sin ti no habría sido capaz. Gracias por quererme tanto y demostrármelo cada día.

Índice

1. RESUMEN	25
2. INTRODUCCIÓN	31
2.1. Cáncer.....	33
2.1.1. Clasificación del cáncer	35
2.1.2. Cáncer de pulmón	36
2.1.2.1. Diagnóstico del cáncer de pulmón	38
2.1.2.2. Clasificación del cáncer de pulmón	39
2.1.2.3. Etiología del cáncer de pulmón.....	40
2.1.2.4. Tratamiento del cáncer de pulmón.....	41
2.1.2.5. Marcadores tumorales de cáncer de pulmón	42
2.2. Especializaciones de la membrana plasmática: uniones intercelulares	44
2.1.3. Tipos de uniones intercelulares	45
2.1.3.1. Complejo de unión	45
2.1.3.1.1. Zonula occludens.....	45
2.1.3.1.2. Zonula adherens.....	46
2.1.3.1.3. Desmosoma.....	47
2.1.3.1.1.1. Componentes del desmosoma.....	50
2.1.3.1.1.1.1. Cadherinas.....	50
2.1.3.1.1.1.2. Proteínas de la familia armadillo.....	51
2.1.3.1.1.1.2.1. Placoglobina	53
2.1.3.1.1.1.2.2. Placofilinas	53
2.1.3.1.1.1.2.2.1. Placofilina 1	61
2.1.3.1.1.1.2.2.2. PKP1 en enfermedades hereditarias de la piel	66
2.1.3.1.1.1.2.2.3. Papel de las placofilinas en el cáncer	69
2.1.3.1.1.1.3. Desmoplaquina	72
2.1.3.1.1.1.4. Filamentos Intermedios	73
2.1.3.1.1.1.5. Otras proteínas del desmosoma	76
2.1.3.2. Uniones comunicantes.....	77
2.1.3.3. Hemidesmosoma	78
2.1.3.4. Adhesiones focales.....	78
2.1.4. Uniones intercelulares como supresores tumorales	79
3. ANTECEDENTES	85
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	91

4.1. Hipótesis.....	94
4.2. Objetivos	94
5. MATERIAL Y MÉTODOS	97
5.1. Validación de los datos del microarray por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	99
5.1.1. Muestras, evaluación patológica y datos clinicopatológicos	99
5.1.2. Extracción de ARN, reverso-transcripción y qPCR.....	99
5.1.3. Análisis estadístico	100
5.2. Estudio de supervivencia.....	101
5.2.1. Muestras, evaluación patológica y datos clinicopatológicos	101
5.2.2. Niveles de expresión de los genes <i>Pkp1</i> y <i>Krt15</i>	102
5.2.3. Análisis estadístico	102
5.3. Estudio inmunohistológico.....	102
5.3.1. Muestras tumorales	102
5.3.2. Inmunohistoquímica	103
5.3.3. Análisis estadístico	104
5.4. Ensayos funcionales	104
5.4.1. Cultivo celular: Condiciones generales	104
5.4.1.1. Caracterización de las líneas celulares y búsqueda de las condiciones de cultivo	105
5.4.1.2. Preparación de medios de cultivo.....	106
5.4.1.3. Descongelación de líneas celulares.....	106
5.4.1.4. Mantenimiento en cultivo de líneas celulares	106
5.4.1.4.1. Cambio de medio	106
5.4.1.4.2. Subcultivo (pase celular)	107
5.4.1.5. Obtención del sedimento celular	107
5.4.1.6. Congelación de células.....	108
5.4.2. Búsqueda bioinformática en bases de datos	108
5.4.3. Extracción de ARN total.....	108
5.4.4. Reacción de reverso-transcripción (RT)	109
5.4.5. Reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	109
5.4.5.1. Análisis de datos.....	110
5.4.5.2. Cálculo de errores	111
5.4.6. Electroforesis en gel de agarosa	112
5.4.7. Western blot (WB)	112
5.4.7.1. Lisis celular	112
5.4.7.2. Cuantificación de proteínas	112

5.4.7.3. Preparación de la muestra	114
5.4.7.4. Separación electroforética (SDS-PAGE).....	114
5.4.7.5. Transferencia húmeda	115
5.4.7.6. Bloqueo e inmuno-detección.....	115
5.4.7.7. Cuantificación de bandas	116
5.4.8. Cribado de PKP1 en líneas NSCLC y líneas primarias	116
5.4.8.1. Cultivo celular.....	116
5.4.8.2. Reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	117
5.4.8.3. Western blot (WB)	118
5.4.9. Expresión semicuantitativa de las PKP's y otros genes del desmosoma	118
4.4.9.1. ARN, reverso-transcripción, PCR y electroforesis en gel de agarosa	119
5.4.10. Curva de crecimiento	120
5.4.11. Isoforma de <i>Pkp1</i>	121
5.4.11.1. ARN, reverso-transcripción, PCR y electroforesis en gel de agarosa	121
5.4.12. Secuenciación de <i>Pkp1</i>	122
5.4.12.1. ARN, reverso-transcripción, PCR, electroforesis en gel de agarosa, purificación de bandas y secuenciación.....	123
5.4.12.2. Secuenciación.....	124
5.4.12.3. Análisis de las secuenciaciones	124
5.4.13. Silenciamiento génico de <i>Pkp1</i> (<i>Knockdown</i>).....	125
5.4.13.1. Eficiencia de transfección.....	126
5.4.14. Viabilidad celular (ensayo de MTT)	127
5.4.14.1. Determinación del número de células óptimo	127
5.4.14.2. Cálculo de la absorbancia.....	127
5.4.14.3. Protocolo habitual de MTT.....	128
5.4.14.4. Protocolo de viabilidad celular para células en suspensión (Resazurin).....	128
5.4.14.5. Análisis estadístico	129
5.4.15. Ciclo celular	129
5.4.15.1. Análisis estadístico	130
5.4.16. Apoptosis celular.....	130
5.4.16.1. Análisis estadístico	131
5.4.17. Inmunocitoquímica	132
5.4.18. Ensayo clonogénico.....	134
5.4.19. Sobreexpresión de <i>Pkp1</i>	134
5.4.19.1. Transfección de vectores de ADN	134
5.4.19.1.1. Eficiencia de transfección.....	135

5.4.20. Transducción lentiviral	135
5.4.20.1. Producción de partículas virales	136
5.4.20.2. Transducción viral	136
5.4.21. Ensayo de competencia de crecimiento celular.....	136
5.4.21.1. Separación celular por citometría de flujo (Cell Sorting).....	137
5.4.21.2. Mezcla de poblaciones.....	138
5.4.21.3. Curvas de competencia celular	138
5.4.22. Ensayos celulares de microscopía <i>in vivo</i>	139
5.4.22.1. Ensayos de silenciamiento génico de <i>Pkp1</i>	139
5.4.22.2. Ensayos de viabilidad celular tras silenciamiento génico de <i>Pkp1</i>	139
5.4.22.3. Ensayos de sobreexpresión de PKP1A-Myc-DDK-EGFP.....	139
5.4.23. Clonación de plásmidos.....	140
5.4.23.1. Clonación de shRNA-PKP1 en pLVPT-tTR-KRAB	140
5.4.23.1.1. Clonaje del shRNA-PKP1 en el plásmido pLVTHM	142
5.4.23.1.1.1. Anillamiento y fosforilación de oligos	142
5.4.23.1.1.2. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación del plásmido pLVTHM.....	142
5.4.23.1.1.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano	142
5.4.23.1.1.4. Comprobación del clonaje	143
5.4.23.1.2. Subclonaje de shRNA-PKP1 en el plásmido pLVPT-tTR-KRAB	143
5.4.23.1.2.1. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación de pLVTHM y pLVPT-tTR-KRAB	143
5.4.23.1.2.2. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano	144
5.4.23.1.2.3. Comprobación del clonaje	144
5.4.23.2. Clonación de shRNA-SC y shRNA-PKP1 en pLVX-IRES-tdTomato.....	144
5.4.23.2.1. Amplificación de los insertos por PCR.....	145
5.4.23.2.2. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación de plásmido e insertos.....	146
5.4.23.2.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano	146
5.4.23.2.4. Comprobación del clonaje	146
5.4.23.3. Clonación de PKP1A-Myc-DDK en pLVX-IRES-ZsGreen1	147
5.4.23.3.1. Amplificación del inserto por PCR.....	148
5.4.23.3.2. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación de plásmido e insertos.....	148
5.4.23.3.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano	149
5.4.23.3.4. Comprobación del clonaje	149

5.4.23.4. Clonación de PKP1A-Myc-DDK fusionado a EGFP en pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro	149
5.4.23.4.1. Amplificación del inserto por PCR.....	150
4.4.23.4.2. Digestión enzimática y purificación de plásmido e insertos	153
4.4.23.4.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano	154
4.4.23.4.4. Comprobación del clonaje	154
6. RESULTADOS	157
6.1. Validación de los datos del microarray por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	159
6.2. Estudio de supervivencia.....	163
6.3. Estudio inmunohistológico.....	167
6.4. Ensayos funcionales	172
6.4.1. Búsqueda bioinformática en bases de datos	172
6.4.2. Cribado de PKP1 en líneas NSCLC y líneas primarias	179
6.4.2.1. Reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	179
6.4.2.2. Western blot (WB)	181
6.4.3. Expresión semicuantitativa de las PKP's y otros genes del desmosoma	181
6.4.4. Curva de crecimiento	183
6.4.5. Isoforma de <i>Pkp1</i>	184
6.4.6. Secuenciación de <i>Pkp1</i>	186
6.4.7. Silenciamiento génico de <i>Pkp1</i> (<i>KnockDown</i>)	189
6.4.7.1. Eficiencia de transfección.....	193
6.4.8. Viabilidad celular (ensayo de MTT).....	195
6.4.8.1. Determinación del número de células óptimo	195
6.4.8.2. Ensayo de MTT para silenciamiento génico de <i>Pkp1</i>	196
6.4.9. Ciclo celular	197
6.4.10. Apoptosis celular.....	199
6.4.11. Inmunocitoquímica	201
6.4.12. Ensayo clonogénico.....	218
6.4.13. Sobreexpresión de <i>Pkp1</i>	219
6.4.13.1. Transfección de vectores de ADN	219
6.4.13.1.1. Eficiencia de transfección.....	220
6.4.14. Transducción lentiviral	222
6.4.15. Ensayo de competencia de crecimiento celular.....	228
6.4.15.1. Separación celular por citometría de flujo (Cell Sorting).....	228
6.4.15.2. Mezcla de poblaciones.....	230
6.4.15.3. Curvas de competencia celular	232

6.4.16. Ensayos celulares de microscopía <i>in vivo</i>	235
6.4.16.1. Ensayos de silenciamiento génico de <i>Pkp1</i>	235
6.4.16.2. Ensayos de viabilidad celular tras silenciamiento génico de <i>Pkp1</i>	236
6.4.16.3. Ensayos de sobreexpresión de PKP1A-Myc-DDK-EGFP.....	238
6.4.17. Clonación de plásmidos.....	243
6.4.17.1. Clonación de shRNA-PKP1 en pLVPT-tTR-KRAB	243
6.4.17.1.1. Clonaje del shRNA-PKP1 en el plásmido pLVTHM	243
6.4.17.1.2. Subclonaje de shRNA-PKP1 en el plásmido pLVPT-tTR-KRAB	244
6.4.17.2. Clonación de shRNA-SC y shRNA-PKP1 en pLVX-IRES-tdTomato.....	245
6.4.17.3. Clonación de PKP1A-Myc-DDK en pLVX-IRES-ZsGreen1	247
6.4.17.4. Clonación de PKP1A-Myc-DDK fusionado a EGFP en pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro	249
7. DISCUSIÓN.....	253
7.1. Validación de los datos del microarray por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	255
7.2. Estudio de supervivencia.....	256
7.3. Estudio inmunohistológico.....	259
7.4. Ensayos funcionales	261
8. CONCLUSIONES	279
9. BIBLIOGRAFÍA	283
10. ABREVIATURAS.....	301

1. RESUMEN

El cáncer de pulmón es después de la enfermedad cardiovascular, la primera causa de muerte en la población occidental a pesar de los numerosos avances en la detección temprana y la estandarización del tratamiento. En esta población los tipos de cáncer que más muerte causan son el cáncer de pulmón, el colorrectal, el de mama y el de próstata. De todos ellos el de pulmón causa más muertes que todos los otros juntos. Cada año se diagnostican más de 1,6 millones de casos en todo el mundo, de los cuales, menos del 15% logran sobrevivir cinco años tras el diagnóstico. Esta elevada tasa de mortalidad reside en el avanzado estado en el que el tumor se encuentra en los pacientes diagnosticados, pudiendo llegar a ser de estadio III o metastásico (IV), lo que se correlaciona con una peor pronosis.

De todos estos cánceres de pulmón, el 80% se clasifican como cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), mientras que el 20% restante lo hacen como cáncer de pulmón microcítico (SCLC). Los adenocarcinomas (AC) y carcinomas escamosos o epidermoides (SCC) son los subtipos histológicos más frecuentes del NSCLC, y presentan diferente pronóstico y tratamiento.

Con el objetivo de incrementar nuestro conocimiento de la biología del cáncer y para determinar cualquier correlación entre la heterogeneidad fenotípica y la diversidad genética del cáncer de pulmón, nuestro grupo de investigación llevó a cabo en estudios previos el análisis de los perfiles de expresión génica de un conjunto de 46 muestras de tumores primarios de adenocarcinoma (AC) y carcinoma escamoso o epidermoide (SCC), y 45 muestras pareadas no tumorales (control) con el propósito de determinar secuencias génicas diferencialmente expresadas en base a los distintos estadios de la enfermedad e identificar secuencias con significado biológico en la progresión tumoral.

En dichos estudios se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de expresión de muestras de AC y SCC. El análisis estadístico utilizado para seleccionar las secuencias diferencialmente expresadas también permitió la identificación de perfiles de expresión génica distintos para diferentes estadios de la enfermedad y entre los distintos grados de diferenciación.

La presente Tesis Doctoral pretende estudiar en profundidad estos genes desregulados como consecuencia del proceso tumoral de NSCLC, lo cual permite la identificación y validación de genes con valor pronóstico, así como, nuevas dianas terapéuticas en adenocarcinomas y carcinomas epidermoides pertenecientes al estadio I con distinto grado de diferenciación tumoral. Los resultados, una vez validados por qPCR, permitieron diferenciar los fenotipos tumorales (muestra tumoral de muestra control no tumoral), AC de SCC (incluyendo los estadios I y IB) y grados de diferenciación. Así, estos análisis ofrecen una mejor clasificación molecular del cáncer del pulmón.

De entre los genes diferencialmente expresados, se hallaron resultados interesantes para tres componentes del desmosoma: *Pkp1*, *Dsg3* y *Krt15*. Los genes *Pkp1* y *Krt15* estaban altamente sobreexpresados en los SCC, lo que sugiere que podrían ser marcadores útiles para diferenciar las muestras del subtipo epidermoide. Por otro lado, el gen *Dsg3* mostró una fuerte inhibición en AC de estadio IA frente a AC de estadio IB, lo que indica que podría servir como marcador para distinguir el estadio IA de AC.

Las especializaciones de membrana de células epiteliales, tales como las uniones estrechas (o zonula occludens), uniones adherentes (o zonula adherens) o desmosomas entre otras, son esenciales para la homeostasis en los organismos pluricelulares. Las proteínas transmembrana implicadas en estas uniones, se encuentran unidas a componentes del

citoesqueleto, estableciendo así conexiones con otros sitios de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular. Además, cada vez más moléculas estructurales citoplasmáticas relacionadas con este tipo de uniones, se encuentran involucradas en la regulación de diversos procesos como la transcripción, proliferación celular, polaridad celular y la formación de barreras de difusión regulada.

En el caso concreto de los desmosomas, además de tener una función estructural, un número creciente de estudios muestran que son estructuras dinámicas que participan en procesos celulares más allá de la adhesión, como la morfogénesis y la diferenciación de los tejidos, y actúan como centros de señalización celular compuestos por un amplio abanico de moléculas de membrana específicas de tejido y moléculas de enlace entre membrana y citoesqueleto.

El presente trabajo de investigación ha tratado también de establecer la correlación de los perfiles de expresión hallados con los distintos tipos histológicos tumorales y con la supervivencia, recidiva tumoral e intervalo libre de enfermedad en los pacientes seleccionados. Definir este tipo de correlaciones ayudará a establecer el valor pronóstico de los genes desregulados en pacientes de NSCLC sometidos a toracotomía con objetivos de resección completa, incompleta o diagnóstica.

Los resultados del análisis de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier presentaron un resultado significativo para el uso de terapias adyuvantes en pacientes con afección ganglionar, sugiriendo que la administración de terapia adyuvante no influye en la supervivencia del paciente tras el control de las otras variables y podría estar asociado al estadio TNM según la 7ª edición. Además, el análisis de la supervivencia de los pacientes fue diferente dependiendo de la edición de los criterios de clasificación TNM usada, aunque se encontraron diferencias significativas en función de la recurrencia tumoral y en función del estadio TNM con ambas ediciones TNM (6ª y 7ª edición). Por otro lado, el subtipo histológico del cáncer no influyó en la supervivencia del paciente. Tampoco se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre la media de supervivencia y los niveles de expresión de *Pkp1* o *Krt15*, o entre la media de supervivencia y la expresión simultánea de ambos genes.

El análisis inmunohistológico de las muestras mostró que la expresión de PKP1 y KRT15 generalmente se restringió a carcinomas epidermoides (SCC) y se localizó principalmente en las membranas, aunque también en citoplasma y, en menor medida, en núcleo. La expresión de estas proteínas fue más extensa e intensa en tumores bien-moderadamente diferenciados, especialmente en las membranas. Por otro lado, en nuestro conjunto de muestras no se observó tinción de PKP1 ni KRT15 en el citoplasma o membrana de adenocarcinomas (AC), y sólo una pequeña parte de las muestras presentaron tinción nuclear de estas proteínas. Por otro lado, el patrón de tinción de DSG3 también difirió según el subtipo histológico (AC o SCC), presentando ausencia de tinción en membranas en los casos de AC. Así, teniendo en cuenta los patrones de tinción de las 3 proteínas, la tinción de membrana fue característica de los SCC de pulmón y se pudo observar una relación entre la expresión de estas proteínas en la membrana de SCC y el grado de diferenciación, indicando que podrían ser marcadores de SCC útiles en el diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón.

Esta Tesis también ha tratado de validar mediante una serie de ensayos funcionales el papel en el proceso tumorigénico del gen *Pkp1*. Así, el silenciamiento génico de *Pkp1*, el cual se demostró por diversos métodos, disminuyó significativamente la proliferación celular entre un 15 y un 20%, redujo el número y tamaño de las colonias formadas, produjo parada del ciclo

celular (entre un 11 y un 16%) con alteraciones en los niveles de expresión de *p16* y *p21* e incrementó la apoptosis por la vía de la activación de la caspasa 3 dando lugar a un aumento de la mortalidad 4,5 veces superior. En algunas líneas incluso produjo cambios en la morfología celular. Por el contrario, la sobreexpresión de *Pkp1* mediante transducción vírica de células sin expresión basal del mismo, incrementó significativamente la proliferación de las mismas en un 30%. La inmunocitoquímica mostró patrones de tinción citoplasmática y desmosomales, y una fuerte y heterogénea localización subcelular de PKP1 en núcleo (a excepción de los nucleolos) que mostró ser específica. Además, reveló distintos patrones de fuerte señal que podrían corresponderse con los cuerpos medios (*midbodies*) y con los cinetocoros. Durante la mitosis se produjo un incremento de la señal citoplasmática y periférica de PKP1 debido a la diseminación de la proteína nuclear.

Hasta la fecha, los resultados aquí presentados son, para nuestro conocimiento, los primeros datos que relacionan PKP1 con distintas fases de la mitosis a través de su localización en *midbodies* y cinetocoros.

En resumen, nuestro estudio en conjunto con lo publicado en la bibliografía previa, aporta evidencias del papel oncogénico de *Pkp1* en NSCLC demostrando que existen patrones de expresión específicos que resaltan las diferencias histológicas y comportamientos clínicos de estos tumores. Además, los datos aquí presentados reafirman que *Pkp1* juega un papel directo en el control del crecimiento celular, aportando características agresivas a los NSCLC, y abren la posibilidad de diseñar nuevos biomarcadores de cáncer de pulmón y drogas anti-cáncer específicas basados en la molécula de PKP1.

Sin embargo, existe una hipótesis que plantea un papel dual dependiente de contexto para PKP1 en carcinogénesis. Esta hipótesis de la dualidad de PKP1 en cáncer, propuesta por Wolf *et al.* en 2013, plantea que el papel oncogénico o supresor tumoral que desempeña PKP1 está relacionado con la localización subcelular del mismo, y que dicha localización podría depender de su estado de fosforilación. Así, PKP1 jugaría una función estructural y un papel de protección frente al cáncer en los desmosomas, mientras que en el citoplasma (y posiblemente en el núcleo) estimularía la proliferación como un oncogén a través de la liberación de componentes con potencial oncogénico y de la activación de rutas de señalización implicadas en el desarrollo tumoral. El equilibrio entre las rutas implicadas en tumorigénesis y supresión tumoral, determinaría el papel de PKP1 en cada caso. Las rutas a través de las cuales *Pkp1* podría estar implicada en tumorigenicidad son la vía de señalización de PI3K/AKT2 y la regulación de la traducción dependiente del factor de inicio de la traducción eIF4A1.

La importancia de este estudio reside en que los datos aquí presentados implican un mayor entendimiento acerca de las alteraciones génicas encontradas en NSCLC. Sin embargo, resulta esencial definir completamente las interacciones proteicas y rutas de señalización en las que está implicada PKP1 para arrojar luz sobre la base molecular del cáncer de pulmón y sobre la función tumorigénica de las PKPs, las cuales están atrayendo cada vez más atención de la comunidad científica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Cáncer

Cáncer (del latín *cancer* y del griego *Καρκίνοϛ*, "cangrejo" debido a que la forma de los vasos sanguíneos que rodean el tumor, semejan las patas de dicho crustáceo) es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas y caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Se trata de una enfermedad genética compleja y de difícil tratamiento, pues es un proceso múltiple en el que las diferentes etapas que lo componen reflejan aberraciones genéticas que transforman progresivamente una célula normal en maligna (Hanahan *et al.*, 2011).

Actualmente, nuestra comprensión del proceso tumoral está en continuo desarrollo gracias a investigaciones en diversos campos de la biología, tales como la biología molecular y la genética. Y a pesar de lo que cabría imaginar, muchos de estos avances no vienen de la mano de laboratorios de investigación contra el cáncer, sino del estudio de organismos tan diversos como levaduras, lombrices y moscas, los cuales proporcionan conocimientos básicos extrapolables que impulsan el campo de la investigación del cáncer (Weinberg, 2014).

Al contrario que las células normales, las células cancerosas presentan un crecimiento incontrolado sin necesidad de señales de crecimiento, así como la capacidad de invadir localmente y a distancia (lo que se conoce como metástasis). Esto se debe, entre otras razones, a que las células malignas poseen menor grado de especialización que las células normales. Es por ello que, mientras las células normales maduran y se diferencian en diversos tipos celulares con funciones específicas, las células cancerosas no lo hacen, evitan señales de anti-crecimiento y adquieren un potencial replicativo ilimitado (Hanahan *et al.*, 2011).

Las células cancerosas se caracterizan además, por su capacidad de influir en el microambiente que las rodea, pudiendo promover la angiogénesis y permitiendo así la irrigación del tumor. Son capaces también de evadir el sistema inmunitario o incluso beneficiarse del mismo, y pueden ignorar las señales de apoptosis o muerte celular programada.

A principios de siglo, Theodor Boveri propuso, a la vista de la similitud de los tumores primarios con sus metástasis, que todas las células de un tumor derivan de una sola célula y por tanto, los tumores son monoclonales aunque no genéticamente idénticas, ya que el proceso de carcinogénesis tumoral tiene un carácter microevolutivo que se compone de: a) alteración génica (mutación); b) competición; y, c) selección celular. La carcinogénesis implica necesariamente la acumulación sucesiva de alteraciones en los genes durante el periodo de años de crecimiento, hasta que se hace aparente. Durante este proceso dinámico, aquellas células que van adquiriendo alteraciones en su material genético que les proporcionan una ventaja en cuanto al crecimiento, van siendo seleccionadas y serán mayoritarias en el tumor. Es por ello que el cáncer se inicia por mutación de genes que controlan la proliferación celular (Muñoz, 1997).

Las mutaciones causantes de los procesos que conducen a la aparición de un cáncer tienen lugar en 3 tipos de genes: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN.

La mutación de los proto-oncogenes (a priori genes normales) da lugar a los oncogenes, que originan proteínas con función alterada que estimulan el crecimiento o la invasividad celular. A veces, no es necesaria una alteración de la proteína en sí, sino simplemente una elevada expresión de la proteína normal es capaz de inducir alteraciones en el crecimiento y morfología de la célula, proceso conocido como *transformación celular*.

Los genes supresores son genes cuya función normal es regular el ciclo de división celular, evitar la proliferación excesiva y promover las características que especifican la localización de las células en un lugar determinado. La inactivación de ambos alelos en estos genes, ya sea por mutación, metilación o pérdida de heterocigosidad (modelo de Knudson, 1971), induce la aparición de cánceres, pues dejan de expresarse o producen una proteína no funcional.

Los genes de reparación del ADN son los encargados de enmendar los errores inducidos durante la replicación del ADN en la incorporación de nucleótidos, y de rectificar las alteraciones producidas en este ácido nucleico por radiaciones y/o agentes químicos. Mutaciones producidas en estos grupos de genes durante la replicación del ADN tienen un efecto multiplicativo en el genoma, lo que se conoce como *fenotipo mutado*. Tales mutaciones tendrán efectos cancerígenos cuando involucren a proto-oncogenes o genes supresores de tumores. Algunos autores los consideran un subtipo de genes supresores, dado que, obviamente, su inactivación contribuye a la aparición de cánceres.

Dada su complejidad y su difícil tratamiento, no es de extrañar que el cáncer sea considerado una de las principales causas de muerte. En España, datos de la Sociedad Española de Oncología Médica demuestran que a día de hoy, el cáncer continúa siendo una de las primeras causas de muerte en nuestro país y en los países desarrollados en general. En 2010 concretamente, los tumores fueron la segunda causa de muerte en España (28,1 de cada 100 defunciones), siendo la primera las enfermedades del sistema circulatorio (responsables de 31,2 de cada 100) (Fig. 1), aunque entre los años 2000 y 2010 se ha observado una tendencia ascendente en cuanto a los tumores (un 12,8% más de fallecidos) y descendente en las enfermedades circulatorias (-5,2%) según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE). Del mismo estudio se deriva que los tumores fueron la primera causa de muerte en los varones, mientras que para las mujeres fue la segunda. En la clasificación por edades, para los grupos de edad comprendidos entre 5 y 14 años y entre 40 y 79 años (35,7% y 42,7% del total, respectivamente) el cáncer representa la primera causa de muerte.

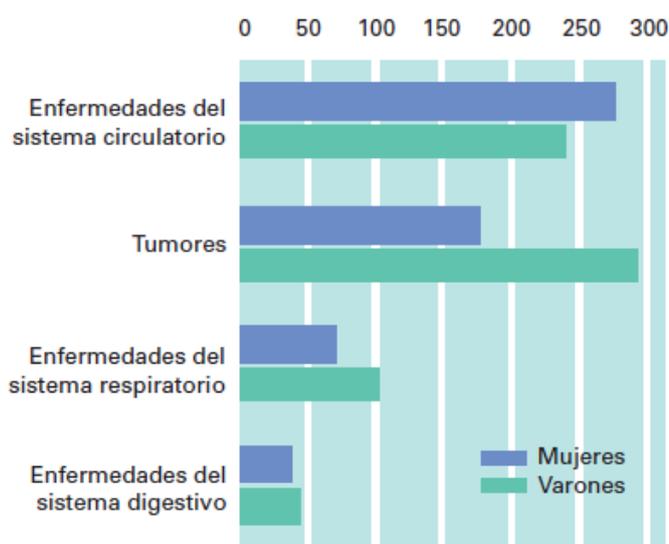


Figura 1. Tasas brutas de mortalidad del 2010 en España. Defunciones por 100.000 habitantes (Instituto Nacional de Estadística).

A nivel mundial, la segunda causa de mortalidad también es el cáncer, siendo 7,6 millones el número de defunciones registradas en el año 2008. Además, la Organización Mundial

de la Salud (OMS) estimó en 2011 que este número se incrementaría un 45% desde el 2007 al 2030, influenciado en parte por el progresivo crecimiento y envejecimiento de la población mundial (Jemal *et al.*, 2011).

2.1.1. Clasificación del cáncer

Los cánceres se clasifican en categorías según el órgano o tejido en el que se originan, con subdivisiones de acuerdo al tipo específico de célula, su localización en el organismo y la estructura del tumor. Los distintos cánceres presentan características y comportamientos específicos, lo cual hace que sean en realidad enfermedades diferentes. Ello se debe no sólo al tipo celular que los origina, sino también a las causas que lo producen, factores al fin y al cabo ligados (Muñoz, 1997).

Aproximadamente el 90% de los tumores tienen un origen epitelial como piel, colon, mama, próstata o pulmón (Ferlay *et al.*, 2010), y se les denomina *carcinomas*. El prefijo *adeno* se refiere a un epitelio secretor, mientras que *escamoso* se reserva para los de recubrimiento. El 10% restante se produce en el resto de células del organismo: células del tejido conectivo/muscular (*sarcoma*), células de la sangre (*leucemias*, *linfomas* y *mielomas*) y células del sistema nervioso (*neuroblastomas* y *gliomas*). Esta mayor incidencia de tumores de origen epitelial es debida a que son las células epiteliales las que mantienen durante más tiempo la capacidad de dividirse a lo largo de la vida del individuo, manteniendo así la maquinaria de proliferación en funcionamiento; y a la localización de las mismas, ya que se encuentran recubriendo las superficies externas e internas del organismo y, por tanto, están más expuestas a la acción de agentes tóxicos de todo tipo que alteran su comportamiento.

Entre los hombres, los cánceres más frecuentes son los de pulmón, bronquios y colorrectales, los cuales sumaron el 52% de todos los nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2010 en el mundo. De todos, el cáncer de pulmón es el más frecuente y es la principal causa de muerte por cáncer en hombres, siendo el 17% de los nuevos casos y el 23% del total de muertes por cáncer (Jemal *et al.*, 2010).

En el caso de las mujeres, el cáncer de pulmón sobrepasó al de mama como principal causa de muerte por cáncer en 1987, llegando a ser el cuarto cáncer más frecuentemente diagnosticado en 2008 y la segunda causa de muerte por cáncer. Se estima que el 26% de todas las muertes por cáncer en mujeres en 2010, se debieron al cáncer de pulmón. Se ha observado una tendencia descendente en la incidencia de los cuatro cánceres más prevalentes en ambos sexos (mama, pulmón y bronquios, y colorrectal) con la excepción del cáncer de pulmón en mujeres, el cual se incrementa aún, aunque en menor medida que en años anteriores. Esta tendencia se debe a que en los últimos veinte años se ha producido un pico en el consumo de cigarrillos entre las mujeres (Jemal *et al.*, 2010).

El Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, prevé que los cánceres más comunes en 2015 habrán sido el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y bronquios, el cáncer de próstata, el cáncer de colon y recto, el cáncer de vejiga, el melanoma de piel, el linfoma no-Hodgkin, el cáncer de tiroides, el cáncer de riñón y pelvis renal, el cáncer de endometrio, la leucemia y el cáncer de páncreas. Se estima que serán diagnosticados 1.658.370 de casos nuevos de cáncer en Estados Unidos y 589.430 personas morirán por la enfermedad el mismo año.

En España, los tumores responsables de una mayor mortalidad fueron el cáncer de pulmón, bronquios y tráquea (con un 1,6% más de defunciones en 2010 respecto a 2009) y el cáncer de colon (con un 3,6% más de fallecidos). Por sexo, el cáncer que más muertes causó entre los españoles fue el de pulmón, bronquios y tráquea. En las españolas fue el de mama (Tabla 1).

Defunciones por principal tipo de tumor 2010			
	Total	Mujeres	Varones
Total	107.220	41.109	66.111
Pulmón	20.755	3.452	17.303
Colon	11.241	4.714	6.527
Mama	6.371	6.295	76
Próstata	5.875	-	5.875
Estómago	5.851	2.250	3.601
Páncreas	5.716	2.716	3.000
Cáncer de piel	1.526	847	679

Tabla 1. Datos del Instituto Nacional de Estadística.

Sin embargo, según datos del Instituto Nacional de Estadística español (INE), la tasa de mortalidad por cáncer en España es de las más bajas de la Unión Europea con 153 defunciones por 100.000 habitantes, por detrás de Chipre, Finlandia y Suecia. Contrastan los valores de Hungría, Polonia y los Estados Bálticos que superan las 190 defunciones por 100.000 habitantes.

2.1.2. Cáncer de pulmón

Uno de los tipos de cáncer que mayor incidencia y letalidad presenta es el cáncer de pulmón (Ferlay *et al.*, 2010). Cada año se diagnostican más de 1,6 millones de casos en todo el mundo (Fig. 2), de los cuales, menos del 15% logran sobrevivir cinco años tras el diagnóstico. Esta elevada tasa de mortalidad reside en el avanzado estado en el que el tumor se encuentra en los pacientes diagnosticados, pudiendo llegar a ser de estadio III o metastásico (IV) (Hensing TA, 2013).

Desafortunadamente, el cáncer de pulmón frecuentemente es detectado demasiado tarde en su historia natural. Un nódulo pulmonar de naturaleza neoplásica puede crecer durante un periodo de tiempo considerable y, potencialmente, producir extensión extrapulmonar metastásica antes de causar síntomas. Por esta razón, estadios tempranos de la enfermedad (estadio I y II) son difíciles de detectar y se considera que sólo el 20% de los casos diagnosticados son candidatos a tratamiento quirúrgico para resección pulmonar (Scagliotti, 2001).

El cáncer de pulmón es un grupo heterogéneo de tumores malignos de estirpe epitelial, originado en el epitelio de revestimiento o glandular del árbol bronquial, con un origen celular y molecular común pero con diferentes mutaciones genéticas acumuladas y distintas conductas clínicas y pronósticas. Esta heterogeneidad entre los pacientes ha conducido a establecer diferentes subgrupos que serán descritos más adelante. Constituye el tipo tumoral más frecuente de entre las neoplasias pulmonares primitivas (más del 90%). Se trata, por tanto, de un problema de salud de primera magnitud, afectando a 82 de cada 100.000 españoles. La tos es su síntoma más común y, debido a que muchas veces tiene su origen en las vías aéreas

principales, se produce neumonitis obstructiva y dilatación de ganglios linfáticos responsables de la tos. La disnea es también secundaria a la obstrucción y al aumento de producción de esputo. Por otro lado, la hemoptisis (expectoración de sangre) es un síntoma frecuente pero raramente severo y la radiografía de tórax es habitualmente anormal en estos pacientes con cáncer de pulmón y hemoptisis, aunque se estima que aproximadamente un 5% de pacientes con hemoptisis pueden tener lesiones no localizables o radiografía normal (Buccheri *et al.*, 2004; Koyi H, 2002).

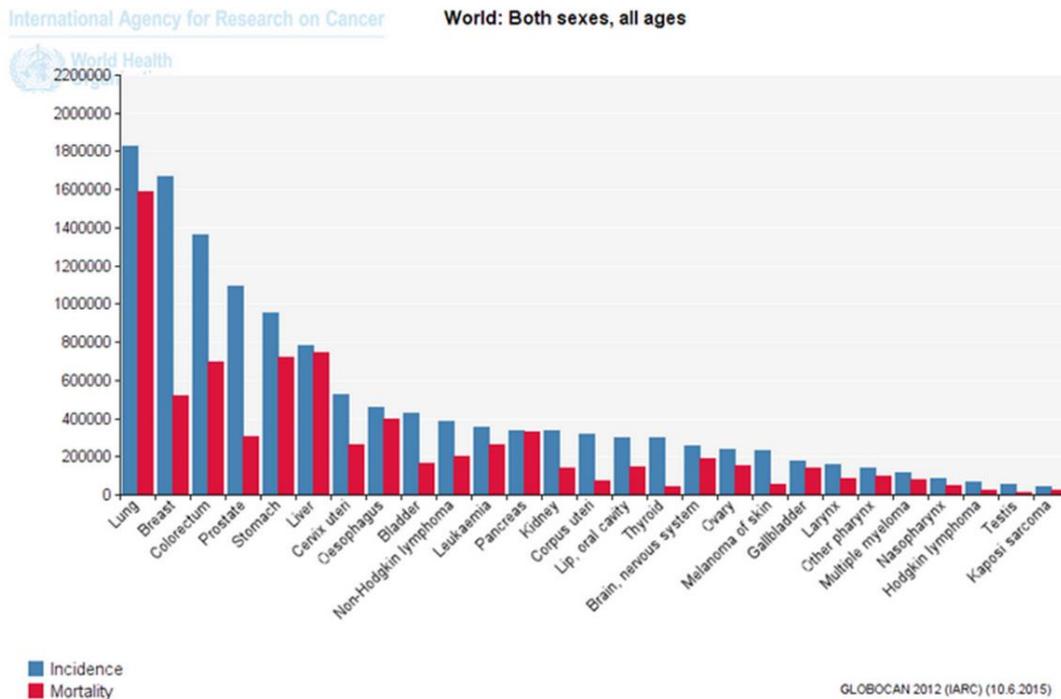


Figura 2. Estimación mundial de la prevalencia (rojo) y la mortalidad (azul) del cáncer en hombres y mujeres de todas las edades en 2008 (Ferlay, 2013).

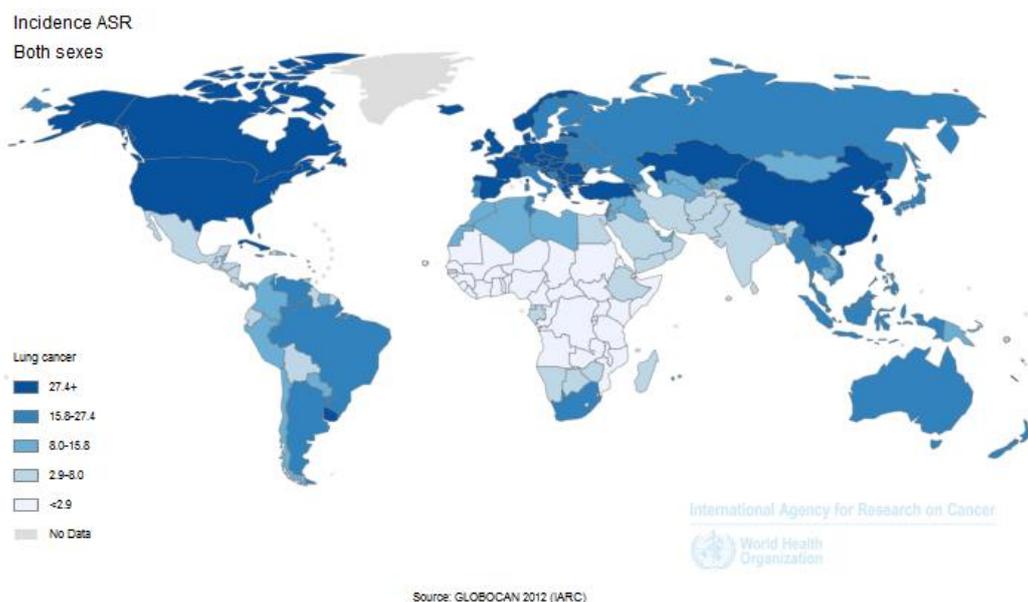


Figura 3. Estimación mundial de la incidencia del cáncer de pulmón (Ferlay, 2013).

A pesar de tratarse de la neoplasia más diagnosticada en todo el mundo, su distribución geográfica presenta muchas variaciones pues tiende a ser más común en países desarrollados (Fig. 3), en especial en EEUU y Europa, y menos frecuente en países menos desarrollados, particularmente África y Sudamérica. Las bajas tasas de incidencia observadas en África son comparables a las observadas en EEUU en 1930, con cifras de menos de 5 casos por 100.000 habitantes en ambos géneros pero, de la misma forma que la epidemia de cáncer de pulmón comenzó en los países desarrollados, actualmente las tasas de incidencia se elevan espectacularmente en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, la ausencia de registros en muchas naciones dificulta un análisis más preciso de este apartado (Ferlay, 2013; Gabrielson, 2006; Stewart *et al.*, 2003).

2.1.2.1. Diagnóstico del cáncer de pulmón

El diagnóstico del cáncer de pulmón se realiza en base a la morfología microscópica celular, pudiéndose clasificar histológicamente en (Vannini *et al.*, 2013):

-Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (siendo más conocido por sus siglas en inglés “SCLC: *Small Cell Lung Cancer*”). Histológicamente deriva de las células neuroendocrinas del epitelio bronquial. Comprende cerca del 20% de los cánceres de pulmón y tiende a diseminarse con rapidez aunque responde mejor a quimioterapia que otros subtipos.

-Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (“NSCLC: *Non-Small Cell Lung Cancer*”). Incluye a la mayoría de los cánceres de pulmón, cerca del 80%. Se disemina con más lentitud que el microcítico. Éste se subdivide, a su vez, en tres tipos:

- **Carcinoma de células escamosas o epidermoide** (“SCC: *Squamous Cell Carcinoma*”): es el tipo más frecuente (25% de los cánceres de pulmón) y el más relacionado con el tabaco y con el género masculino. Tiende a ser central, afectando a los bronquios lobares o segmentarios. Este tipo tumoral presenta un crecimiento lento.

- **Adenocarcinoma** (“AC: *Adenocarcinoma*”): es el tipo epitelial con diferenciación glandular y formación de mucina. Aunque casi todos se desarrollan en fumadores, representa el tipo histológico más frecuente en personas que nunca han fumado, sobre todo mujeres (40% de los casos).

- **Carcinoma de células grandes** (“LCC: *Large Cancer Cells*”): es el menos frecuente (10% de los casos). Constituye un tumor indiferenciado que no cumple los criterios de los anteriores. Casi todos se desarrollan en fumadores y tienen una localización periférica.

Así pues, parece que el cáncer de pulmón se desarrolla a partir de una célula pluripotente que es capaz de expresar una variedad de fenotipos (González Baron, 2006; Jiménez-Massa, 2011). Aunque su origen celular es el mismo, debido a distintos factores estimuladores y diferenciadores celulares, constituyen entidades con distinto comportamiento biológico y diferente manejo terapéutico.

Las mejoras substanciales en las tasas de supervivencia logradas gracias a los avances terapéuticos en diversos tipos de cáncer desde 1975 no han sido observadas en los casos de cáncer de pulmón o páncreas, siendo la tasa media de supervivencia a los 5 años de sólo el 67% de los pacientes en estadio IA de NSCLC y del 57% para el IB de NSCLC (Jemal *et al.*, 2010).

Los marcadores más utilizados para identificar el NSCLC son las citoqueratinas (CKs), la apoproteína A del surfactante (SP-A) y el factor de transcripción del tiroides (TTF-1). La expresión de CKs está presente en la mayoría de los carcinomas, disminuyendo su título en tumores muy indiferenciados. Por otro lado, la proteína SP-A se expresa aproximadamente en la mitad de los adenocarcinomas. Finalmente, el TTF-1 es un marcador muy específico de los NSCLC, adenocarcinomas y muy útil en el reconocimiento de metástasis (González Baron, 2006).

2.1.2.2. Clasificación del cáncer de pulmón

Los intentos para establecer un lenguaje internacional para clasificar el cáncer de acuerdo a su extensión anatómica comenzaron en los inicios del siglo XX, pero no fue hasta 1973 cuando los Dres. Mountain, Carr y Anderson, desarrollaron una clasificación clínica e informe de resultados finales basados en el sistema TNM para la estadificación del cáncer de pulmón, auspiciados por el Comité Unido Americano de Cáncer (*"AJCC: American Joint Committee on Cancer"*). Su estudio se basó en 2.155 casos de cáncer de pulmón, de los cuales 1.712 fueron casos de NSCLC, diagnosticados al menos cuatro años antes del análisis (Mountain CF, 1974).

El sistema TNM para la clasificación anatómica del cáncer de pulmón se fundamenta en tres descriptores:

- Descriptor T: Extensión del tumor primario.
- Descriptor N: La ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos locales y regionales.
- Descriptor M: La ausencia o presencia de metástasis a distancia.

La adición de números a los descriptores indica la extensión de la enfermedad de modo que podemos definir de una forma abreviada lo avanzado del tumor.

Actualmente, otros parámetros de tipo biológico o genético-molecular para la clasificación, factor pronóstico y guía terapéutica, son motivo de intenso estudio pero, hasta ahora, no existe suficiente evidencia como para incorporarlos en una clasificación conjunta con el sistema TNM.

Por ello y en ausencia de otras clasificaciones que definan con más precisión, no sólo la extensión anatómica del tumor sino además, la conducta biológica del tumor y su interacción con el hospedador, el sistema TNM de clasificación de los tumores malignos sigue siendo el lenguaje internacional que dicta las pautas de actuación a nivel clínico.

La vigente clasificación TNM es la séptima edición, la cual fue aprobada en el año 2009. Las reglas para la actual clasificación y los cambios realizados sobre la sexta edición de 1997, fundamentalmente respecto de los descriptores T y M (Mountain CF, 1974), se basan en las recomendaciones de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) que culminó con la edición de un Manual para la Estadificación en Oncológica Torácica publicado en Julio de 2009 con la colaboración de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y la Comité Unido Americano de Cáncer (*"AJCC: American Joint Committee on Cancer"*) (Goldstraw *et al.*, 2009).

La clasificación actual del sistema TNM para el cáncer de pulmón es la siguiente (Sánchez-Palencia Ramos, 2012):

Tumor primario – T

TX. No se puede asegurar la existencia de tumor. Se sospecha por la presencia de células tumorales malignas, muestras de esputo o lavado bronquial, pero no se visualiza en imágenes o en broncoscopia.

T0. Ninguna evidencia de tumor primario.

Tis. Carcinoma “*in situ*”.

T1. Tumor de 3 cm o menos en su dimensión mayor, rodeado de parénquima pulmonar o pleura visceral y sin evidencia en broncoscopia de invasión más proximal a un bronquio lobar (ausencia de afectación de bronquio principal).

T1a. Tumor de 2 cm o menos en su dimensión mayor.

T1b. Tumor mayor de 2 cm pero menor de 3 cm en su dimensión mayor.

T2. Tumor mayor de 3 cm pero inferior a 7 cm en su dimensión mayor o que presente alguna de las siguientes características:

- Infiltra bronquio principal a más de 2 cm de carina traqueal.
- Infiltra pleura visceral.
- Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar pero no afecta al pulmón completo.

T2a. Tumor de más de 3 cm pero menor de 5 cm en su dimensión mayor.

T2b. Tumor mayor de 5 cm pero menor de 7 cm en su dimensión mayor.

T3. Tumor mayor de 7 cm o que invade directamente alguna de las siguientes estructuras: Pared torácica (incluidos tumores del surco superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio; o tumor en bronquio principal a menos de 2 cm de la carina traqueal pero sin afectarla; o asociado a atelectasia o neumonitis distal que afecta a un pulmón completo; o la existencia de un nódulo o nódulos tumorales en el mismo lóbulo donde se origina el tumor primario.

T4. Tumor de cualquier tamaño que invade alguna de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; o nódulo o nódulos tumorales en diferente lóbulo del mismo lado donde asienta el tumor primario (Fig. 4).

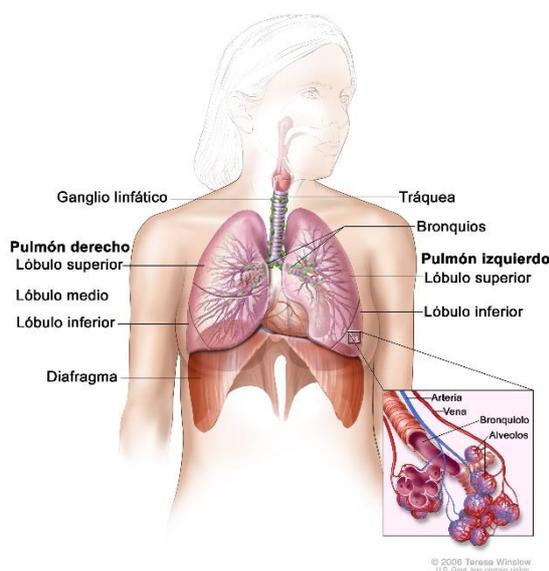


Figura 4. Anatomía del sistema respiratorio, mostrando la tráquea y ambos pulmones, sus lóbulos y las vías respiratorias (ilustración de Terese Winslow, 2006).

2.1.2.3. Etiología del cáncer de pulmón

Las principales causas del cáncer de pulmón son casi exclusivamente ambientales, pero existe sobrada evidencia de que también son causa las variaciones de la susceptibilidad a agentes carcinogénicos respiratorios. El riesgo depende de la interacción entre la exposición al agente etiológico (factores de riesgo) y la susceptibilidad individual a determinado agente, siendo la interacción sinérgica entre diferentes factores de riesgo de vital transcendencia para el riesgo total de padecer cáncer de pulmón.

En las células la mayoría de estos carcinógenos se convierten en compuestos intermediarios por las enzimas del citocromo P450, que catalizan la adición de oxígeno al carcinógeno, incrementando así, su solubilidad en agua. Los metabolitos resultantes son rápidamente convertidos en formas solubles excretables por la glutatión S-transferasa, que provee un eficiente mecanismo de detoxificación. Sin embargo, durante este proceso se forman intermediarios electrofílicos (deficientes en electrones) que son muy reactivos con el ADN, provocando la formación de aductos de ADN (parte de ADN covalente unido a un producto químico cancerígenos).

El balance entre la activación metabólica, detoxificación y reparación de los aductos de ADN varía entre los diferentes individuos debido a polimorfismos entre la población humana, lo cual influye en el riesgo de cáncer (Perera *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2001).

El mayor factor de riesgo relacionado con el cáncer de pulmón es el tabaquismo. Los agentes carcinógenos presentes en el humo del tabaco son los principales causantes del cáncer de pulmón y es la primera causa prevenible. Las personas fumadoras tienen 20 veces más riesgo de padecer cáncer de pulmón que las no fumadoras. Durante un seguimiento de 50 años, el riesgo de padecerlo se incrementó en cuatro veces en exfumadores y en más de 14 veces en fumadores activos (Doll *et al.*, 2004). Aunque se consideró que el adenocarcinoma de pulmón estaba menos asociado al hábito tabáquico y a la mujer que otros subtipos, hoy está demostrada la asociación de ambos tipos histológicos (AC y SCC), así como el microcítico, con el efecto del tabaco. La exposición profesional a algunos compuestos como asbesto, radón, arsénico, cromo, níquel, etc., también se ha asociado a una mayor incidencia cáncer de pulmón.

2.1.2.4. Tratamiento del cáncer de pulmón

Tratar el cáncer de pulmón supone todo un desafío y la terapia estándar incluye resección quirúrgica, quimioterapia basada en platino y radioterapia, por separado o en combinación. En el tratamiento de este tipo de cáncer, el tipo histológico del tumor y la extensión tumoral (estadificación TNM) son factores muy importantes a tener en cuenta, sobretudo en el caso de la clasificación TNM, ya que sigue siendo la referencia que indica las pautas terapéuticas. En casos de intervención quirúrgica, es necesario valorar el riesgo quirúrgico debido a la morbilidad y mortalidad relacionada con la resección pulmonar en base a la función respiratoria y cardíaca o la existencia de comorbilidad asociada. Aun así, la tasa de recurrencia sigue siendo elevada en estadios iniciales de NSCLC y un 30-70% de pacientes con resección completa, desarrollan recidivas que ocurren principalmente a distancia (Lacasse *et al.*, 1999; Loubeyre *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2007).

En el caso de estadios iniciales, la mejor opción terapéutica suele ser la cirugía, pues es capaz de resecar todo el tumor macroscópica y microscópicamente y, en combinación o no con otras modalidades terapéuticas, ofrece más garantías de control o curación de la enfermedad, aunque los resultados varían significativamente tras la resección quirúrgica completa de NSCLC (Li *et al.*, 2009). En estadios intermedios, la cirugía tiene únicamente fines diagnósticos pues aunque sea capaz de resecar todo el tumor macroscópicamente, la afectación mediastínica ganglionar (N2 y N3) o directamente el tumor, hacen muy difícil el control de la enfermedad. En casos muy avanzados, con estadios asociados con metástasis a distancia, la cirugía sólo tiene indicación con efectos paliativos o diagnósticos y se aplica quimioterapia dependiendo del estado de salud general del paciente.

Por otro lado, el tratamiento citotóxico ha demostrado beneficios estadísticamente significativos en términos de supervivencia global, control de los síntomas y calidad de vida. No obstante, la quimioterapia basada en platino obtiene tasas de respuesta a la progresión tumoral de alrededor del 20-35%, y de supervivencia muy variable según los estudios.

Desafortunadamente, el pronóstico de los pacientes de cáncer de pulmón no ha sufrido ningún cambio significativo en los últimos 30 años con las terapias convencionales (la tasa media de supervivencia a los 5 años es de un 15%). A pesar de haber observado modestas mejoras terapéuticas en los ensayos clínicos para el cáncer de pulmón, el descubrimiento del primer inhibidor de moléculas pequeñas en la última década, trajo la esperanza de poder disponer de un cada vez mayor número de fármacos disponibles en un futuro cercano para reducir la mortalidad y paliar los efectos de esta enfermedad. En los últimos 10 años, 4 terapias dirigidas han sido aprobadas para el cáncer de pulmón: gefitinib (Iressa) en 2002, erlotinib (Tarceva) en 2003, bevacizumab (Avastin) en 2006, y crizotinib (Xalkori) en 2011 (Cagle *et al.*, 2012). Estos datos demuestran la necesidad de avanzar en nuevas dianas terapéuticas y desarrollar nuevos fármacos de acción sistémica.

En los últimos años, la investigación ha apostado por la determinación de biomarcadores predictivos para terapias dirigidas, identificación de alteraciones moleculares potencialmente tratables con fármacos, especialmente contra mutaciones conocidas de ganancia de función, inhibición de señales ligadas a receptores de membrana con actividad en el dominio tirosín-quinasa, así como regulación de la neoangiogénesis tumoral.

Ejemplo de esto es la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la cual es esencial para la proliferación celular e invasión tumoral. La familia EGFR está compuesta por cuatro receptores tirosín-quinasa: HER-1 (EGFR), HER-2 (*neu/erbB2*), HER-3 y HER-4, con una estructura de tres dominios con uno extracelular, otro transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosín-quinasa. La sobreexpresión de EGFR en el NSCLC varía entre un 40-80%, y se asocia con un peor pronóstico y resistencia al tratamiento. El bloqueo de esta ruta de señalización, bien por inhibición de la actividad tirosín-quinasa del dominio intracelular o bien mediante el bloqueo de la unión de ligandos al dominio externo de EGFR, ha sido materia de investigación preclínica y de ensayos clínicos en los últimos años y constituye una línea de tratamiento en el momento actual (Sánchez-Palencia Ramos, 2012).

Otro ejemplo es el estudio llevado a cabo por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) en el cual se demostró la correlación entre niveles bajos de ERCC1 (proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1) y una mayor respuesta al tratamiento con quimioterapia, confirmando la hipótesis de que niveles altos de ERCC1 confieren resistencia al platino (Karp *et al.*, 2009).

El estudio de marcadores moleculares constituye en la actualidad una gran esperanza, no sólo para personalizar el tratamiento, sino también para establecer un factor pronóstico que permita evitar tratamientos agresivos tanto médicos como quirúrgicos.

2.1.2.5. Marcadores tumorales de cáncer de pulmón

Los marcadores tumorales son sustancias biológicas o bioquímicas que aparecen como respuesta del organismo ante cierto tipo de tumores, se detectan en el torrente sanguíneo y reflejan su crecimiento y actividad. Constituyen una herramienta útil sobre todo para el seguimiento, evolución y control del tumor, así como para el diagnóstico precoz de sus recidivas. A diferencia de otros tumores epiteliales como el cáncer de mama, donde el uso clínico de marcadores tumorales está extendido (BRCA1 y BRCA2, indicadores de predisposición;

receptores estrogénicos o el HER2/neu, con valor pronóstico y terapéutico), no existe ningún marcador tumoral asociado a cáncer de pulmón con aplicación clínica. Así, aunque en muchos casos se determinan habitualmente diversos marcadores tumorales séricos ante la sospecha de la enfermedad, las publicaciones que tratan sobre normas y recomendaciones relativas al manejo de esta enfermedad o no mencionan los marcadores tumorales o desaconsejan, por su escasa eficacia, su uso sistemático (Sánchez de Cos Escuíñ *et al.*, 2004).

Sin embargo, en el ámbito de la investigación clínica y epidemiológica ha aumentado exponencialmente el número de trabajos sobre la posible utilidad de los marcadores tumorales como: a) marcadores de susceptibilidad, entre los que destaca el análisis de polimorfismos de enzimas relacionadas con la activación o eliminación de carcinógenos; b) diagnóstico temprano, especialmente para la detección sérica que permita la detección antes de que se establezcan metástasis; c) pronóstico y d) predicción de la sensibilidad o resistencia del tumor frente a determinados fármacos.

En cuanto a los marcadores de susceptibilidad, cabe destacar los polimorfismos de las enzimas activadoras de carcinógenos como los genes CYP (citocromo P450) relacionados con la activación de importantes pro-carcinógenos del humo del tabaco, y de las enzimas detoxificantes de cancerígenos como la glutatión S-transferasa (GST) con más de 20 isoenzimas (GSTM1, GSTT1, GSTP1, etc.) y cuya capacidad para inactivar ciertas sustancias, podría reducir la eficacia de algunos quimioterápicos. Algunos estudios, además, han establecido una correlación entre varios genotipos de GST con fenotipos tumorales más agresivos (mutaciones de *p53*, *K-ras*, etc.). Algunos polimorfismos genéticos podrían incrementar, de manera discreta, el riesgo de presentar cáncer de pulmón aunque más investigaciones científicas son necesarias.

En lo referente al diagnóstico temprano, aún no aparecen marcadores tumorales lo suficientemente sensibles y específicos para que se usen como método de diagnóstico temprano en el cáncer de pulmón. Aunque como se ha comentado anteriormente, en la actualidad los marcadores más utilizados en la identificación de NSCLC son las citoqueratinas (CKs), la SP-A y el TTF-1 (González Baron, 2006).

Cabe destacar el anteriormente mencionado oncogén HER2, el cual codifica para un receptor de factor de crecimiento (también llamado HER-2, *c-neu* o *p185neu*) que es similar al receptor *c-erb-1*. Altos niveles de esta proteína en suero han sido asociados también a un mal pronóstico en NSCLC (Sánchez de Cos Escuíñ *et al.*, 2004) debido a que la sobreexpresión de HER2 podría, a su vez, incrementar la expresión del ARNm del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo cual favorece del desarrollo de metástasis a distancia.

Actualmente existe un creciente número de investigaciones que estudian la capacidad pronóstica de diversos marcadores moleculares tales como los genes *K-ras*, *Bcl2*, *Her2/neu*, *Egfr*, *p53*, *Rb*, *p16*, *p27*, ciclinas, catepsina B, inhibidores tisulares de metaloproteinasas, telomerasa, *Vegf*, detección sérica del fragmento 19 de citoqueratina (CYFRA 21-1), enolasa neuronal específica, etc. Sin embargo, se requieren un mayor número de estudios que validen estos prometedores datos (Sánchez de Cos Escuíñ *et al.*, 2004).

2.2. Especializaciones de la membrana plasmática: uniones intercelulares

Los organismos pluricelulares se aíslan del medio externo gracias a una capa de células epiteliales cuya integridad es mantenida a través de regiones especializadas de sus membranas plasmáticas denominadas **complejos de unión intercelulares**, los cuales se componen de uniones estrechas (o *zonula occludens*), uniones adherentes (o *zonula adherens*) y desmosomas. Por otra parte, las uniones comunicantes, o tipo *gap*, son uniones que permiten comunicación intercelular (Fig. 5). Las proteínas transmembrana implicadas en estas uniones, se encuentran unidas a componentes del citoesqueleto, estableciendo así conexiones con otros sitios de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular. Además, cada vez más moléculas estructurales citoplasmáticas relacionadas con este tipo de uniones, se encuentran involucradas en la regulación de diversos procesos como la transcripción, proliferación celular, polaridad celular y la formación de barreras de difusión regulada (Schneeberger *et al.*, 2004).

Las uniones intercelulares se clasifican según su función en (Alberts, 2010; Ross *et al.*, 2007):

- Uniones estrechas u ocluyentes:** sellan las células epiteliales adyacentes de tal manera que evitan el tránsito libre de moléculas pequeñas de una capa epitelial a otra. Además impiden la difusión de lípidos y proteínas especializadas de la membrana entre las superficies apical y lateral. A este grupo pertenece la zonula occludens.

- Uniones adherentes o de anclaje:** anclan mecánicamente a las células y sus citoesqueletos con las células laterales y la matriz extracelular. Interaccionan con la actina y los filamentos intermedios y pueden encontrarse tanto en la superficie lateral como en la región basal de la célula epitelial. En este grupo se incluyen la zonula adherens, desmosomas, hemidesmosomas y adhesiones focales.

- Uniones comunicantes:** permiten el intercambio de señales químicas y eléctricas entre células contiguas mediante la difusión de moléculas pequeñas (< 1200 Da). Permiten la coordinación celular para mantener la homeostasis de los órganos.

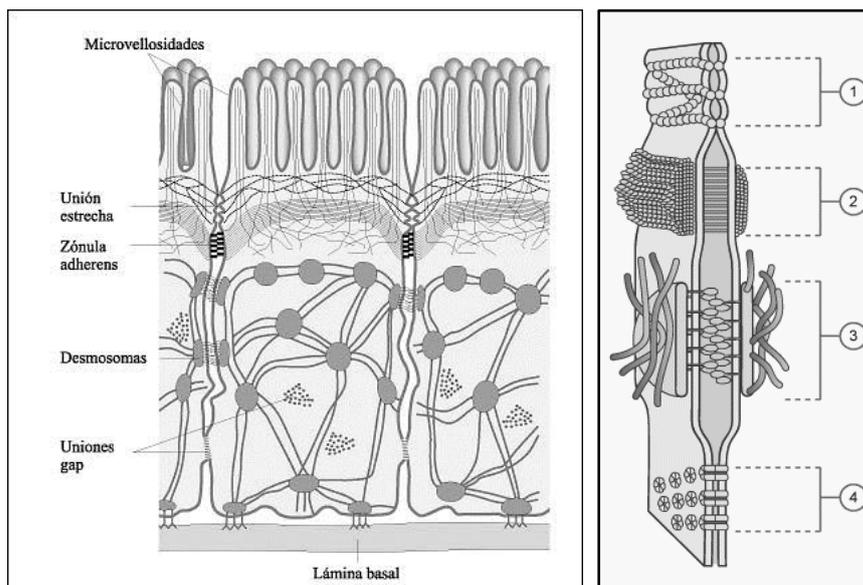


Figura 5. Esquema de las uniones intercelulares: (1) zonula occludens o unión estrecha, (2) zonula adherens, (3) desmosoma y (4) uniones tipo *gap* (Alberts *et al.*, 2004).

2.1.3. Tipos de uniones intercelulares

2.1.3.1. Complejo de unión

El complejo de unión es un sitio especializado de unión entre células epiteliales y tiene a su cargo la unión de las células individuales.

En los epitelios, los cuales actúan como barreras fisiológicas, el complejo de unión es de gran importancia pues crea una barrera que permite a las células establecer compartimentos y restringir el libre paso (difusión) de sustancias. Está presente en muchos epitelios, sobretodo absorbentes y secretores, y está formado por la zonula occludens, la zonula adherens y los desmosomas (Fig. 6), aunque algunos autores incluyen también las uniones comunicantes (Henrikson *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2007).

Aunque es la zonula occludens la que principalmente cumple esta función barrera, son las propiedades adhesivas de la zonula adherens y los desmosomas las que protegen contra la ruptura física de la misma.

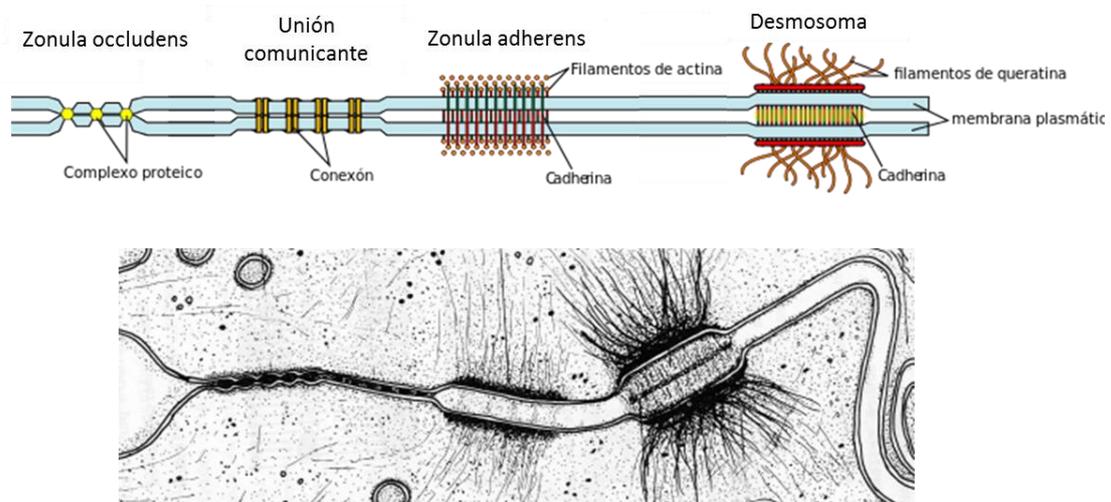
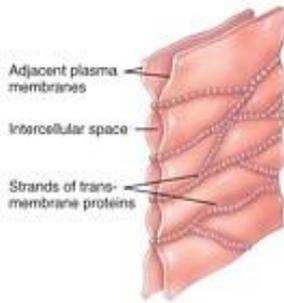


Figura 6. Esquema y microscopía electrónica del complejo de unión (esquema modificado de Mariana Ruíz; imagen de la Universidad de Córdoba (Blanco Rodríguez *et al.*, 2001)).

2.1.3.1.1. Zonula occludens

También llamadas **uniones estrechas** o **herméticas**, son el elemento más apical del complejo de unión entre células epiteliales. Se crea por un íntimo contacto entre las membranas plasmáticas de células contiguas para el sellado del espacio intercelular, lo que la convierte en una barrera primaria que previene la difusión entre las células. No se trata de un sello continuo sino de una serie de fusiones focales formadas por proteínas transmembrana que dan lugar a una serie de estructuras en forma de crestas y surcos complementarios que se organizan, a su vez, en forma de red de hebras de partículas anastomosadas que circunferencia la célula (Fig. 7). Generalmente, sólo aparece una zonula occludens por célula, en contraste con el gran número de desmosomas y uniones *gap* que pueden estar presentes en la misma célula (Henrikson *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2007).

La zonula ocludens es fundamental para mantener la diferencia de concentraciones de pequeñas moléculas hidrófobas a lo largo de las capas del epitelio, para ello, sellan las membranas plasmáticas de las células adyacentes para crear una barrera impermeable o semipermeable entre las capas retardando el flujo de elementos a través de la ruta paracelular,



y por otro lado, funcionan como barrera dentro de la misma bicapa lipídica, restringiendo la libre difusión tanto de lípidos como de proteínas de membrana y manteniendo una distribución asimétrica. Al diferenciar la parte apical de la basal en los componentes de la membrana, la célula epitelial adquiere cierta polaridad.

Figura 7. Esquema de la zonula ocludens (Tortora *et al.*, 2008).

Por otra parte, la zonula ocludens atrae moléculas de señalización celular y las vincula con los filamentos de actina del citoesqueleto.

Existen tres grupos principales de proteínas transmembrana en la zonula ocludens: ocludina, claudinas y molécula adhesiva de unión ("JAM: *Junctional Adhesion Molecule*"). Las regiones extracelulares de estas proteínas transmembrana actúan como una cremallera y sellan el espacio intercelular entre dos células adyacentes, creando una barrera para la difusión paracelular. Las regiones citoplasmáticas de todas estas proteínas contienen una secuencia de aminoácidos exclusiva que interacciona con proteínas reguladoras y de señal llamadas *proteínas con dominio PDZ*, tales como las proteínas ZO (Ross *et al.*, 2007).

Varias proteínas componentes de la zonula ocludens resultan ser dianas o receptores de factores expresados y/o liberados por virus, bacterias y parásitos; y no es de extrañar, pues el epitelio es una de las barreras físicas primarias que protege los organismos de los agentes infecciosos del medio (Schneeberger *et al.*, 2004).

2.1.3.1.2. Zonula adherens

La **zonula adherens** es un tipo de unión adherente que forma parte del complejo de unión y provee adhesión lateral entre células epiteliales. Se presenta en forma de banda continua o cinturón circunferencial (Fig. 8) alrededor de la célula para mantener la estabilidad estructural (Henrikson *et al.*, 1997). Tres familias de proteínas constituyen tradicionalmente estos complejos:

- Cadherinas clásicas incluyendo el prototipo de la familia, E-cadherina, la cual es una glucoproteína transmembrana de adhesión que media las interacciones célula-célula de una manera homofílica y calcio-dependiente a través de sus dominios extracelulares (Dusek *et al.*, 2011).
- Proteínas de la familia armadillo como β -catenina (o su homólogo γ -catenina o placoglobina) y p120-catenina, las cuales se unen a las colas citoplasmáticas de las cadherinas por su región carboxilo-terminal y por su región yuxtamembrana, respectivamente (Hatzfeld *et al.*, 2003).

- Adaptadores del citoesqueleto como la α -catenina, vinculina y α -actinina. El complejo resultante de las cadherinas y las proteínas armadillo, se une a la vinculina y la α -actinina, formando la placa filamentososa que es necesaria para la interacción de las cadherinas con los filamentos de actina del citoesqueleto que también forman un cinturón circunferencial en la cara citoplasmática (Dusek *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2007).

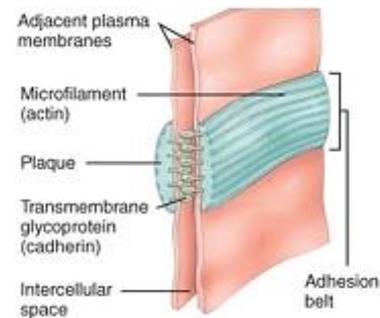


Figura 8. Esquema de la zonula adherens (Tortora *et al.*, 2008).

Los componentes extracelulares de las E-cadherinas de células adyacentes están ligados por iones Ca^{2+} o una proteína vinculante extracelular adicional. Por lo tanto, la integridad morfológica y funcional de la zonula adherens es calcio-dependiente (Ross *et al.*, 2007).

Este tipo de unión ayuda a las superficies epiteliales a resistir la separación durante actividades contráctiles, aunque varios estudios indican que el complejo E-cadherina-catenina no sólo actúa en la regulación de la adhesión celular sino también de la polaridad, diferenciación, migración, proliferación y supervivencia de las células epiteliales.

Cabe destacar que cuando no está unida a las cadherinas, la β -catenina puede migrar al núcleo (gracias a su dominio armadillo) y promover la vía de señalización *Wnt*, mediante la unión a factores de transcripción LEF/TCF (factor potenciador linfoide/factor de células T) y regulación de genes diana dependientes de LEF/TCF (Dusek *et al.*, 2011).

2.1.3.1.3. Desmosoma

Los desmosomas (o *macula adherens*) son estructuras de adhesión célula-célula que proporcionan una adherencia particularmente fuerte, pero puntual y localizada, y forman parte del complejo de unión. Son cruciales en tejidos sometidos a estrés mecánico como miocardio, vejiga, mucosa gastrointestinal y piel (Delva *et al.*, 2009) pero también se encuentran en meninges y células foliculares dendríticas (South, 2004). No se trata de una estructura continua circunferencial como la zonula adherens sino que están localizadas y son focales (Fig. 9), y sus componentes son marcadores de diferenciación celular. Fueron descritos originalmente en la capa espinosa de células epidérmicas por el patólogo italiano Giulio Bizzozero y denominadas *nódulos de Bizzozero*, aunque posteriormente Josef Schaffer acuñó el término *desmosomas* (del griego *desmós*, “unión” o “vínculo” y *sóoma*, “cuerpo”) en 1920. Determinar las relaciones exactas entre los diversos componentes del desmosoma no ha sido fácil dada la insolubilidad del complejo de unión (South, 2004). Históricamente, los desmosomas aislados de epidermis nasal vacuna se sometieron a la técnica SDS-PAGE para separar sus componentes resultando un gran número de bandas, lo cual reflejó un alto nivel de complejidad (South, 2004). Su ensamblaje y adhesión es dependiente de calcio, aunque los mecanismos precisos de adhesión y especificidad de las cadherinas del desmosoma no son completamente conocidos.

Se localizan lateralmente en la célula, en forma de múltiples puntos de soldadura, y median el contacto intercelular directo gracias a que proporcionan sitios de fijación a membrana para los filamentos intermedios de queratina (o desmina, en el caso de las fibras musculares cardíacas), los cuales forman una red continua estructural en el citoplasma que se extiende a todo el tejido, aportando así una cierta rigidez debido a que los filamentos intermedios de células adyacentes quedan indirectamente conectados (Ross *et al.*, 2007).

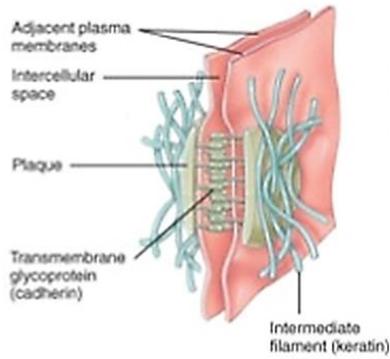


Figura 9. Esquema del desmosoma (Tortora *et al.*, 2008).

Tales filamentos se fijan a la placa de adhesión describiendo asas que se introducen en ella y vuelven a salir al citoplasma, lo cual se cree que disipa el estrés físico desde el desmosoma al resto de la célula.

Los desmosomas presentan una estructura compleja y, al igual que la zonula adherens, contienen una placa discoidal densa en la región citoplasmática llamada **placa de adhesión**, y glucoproteínas transmembrana (desmogleínas y desmocolinas, de la familia de cadherinas Ca^{2+} -dependientes) que proveen el enlace entre las membranas plasmáticas de células adyacentes (Fig. 10). Los dominios de fijación extracelulares de dichas glucoproteínas se unen, en presencia de Ca^{2+} , a dos dominios de moléculas enfrentadas idénticas pertenecientes a células contiguas (unión homotípica u homófila) en una orientación antiparalela, dando lugar a una **cremallera cadherínica** que se visualiza con microscopía electrónica como una banda central densa llamada **línea intermedia** o **desmoglea** en el espacio intercelular del desmosoma, el cual es más ancho (hasta 30nm) que en la zonula adherens (Ross *et al.*, 2007).

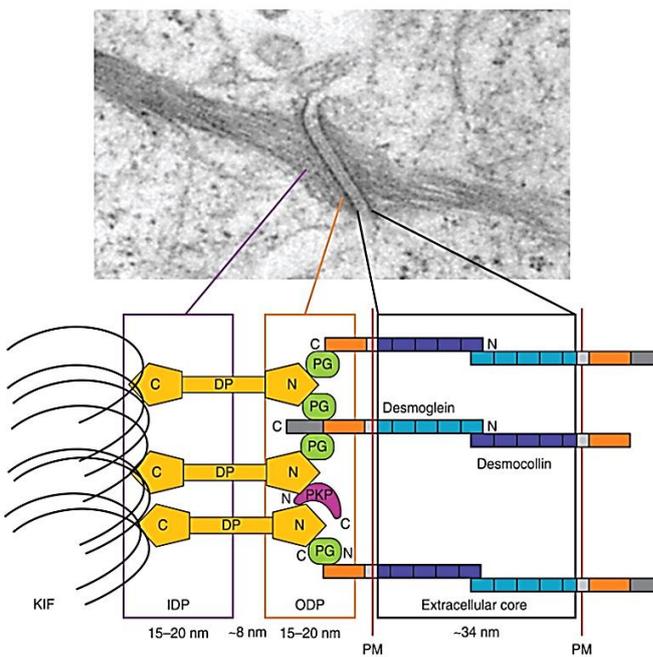


Figura 10. Microscopía electrónica y esquema de la estructura del desmosoma con las distancias relativas a la membrana plasmática (PM). Las cadherinas desmogleína y desmocolina se extienden hacia la matriz extracelular y la placa densa exterior (ODP) para contactar y adherirse a las células adyacentes de una manera calcio-dependiente. Los extremos citoplasmáticos de las cadherinas se asocian con las proteínas conectoras placoglobina (PG), placofilinas (PKP) y desmoplaquina (DP). La desmoplaquina se une a los filamentos intermedios de queratina (KIF) dentro de la placa densa interior (IDP) (Delva *et al.*, 2009).

Los dominios citoplasmáticos de las cadherinas (desmogleínas y desmocollinas) son componentes constitutivos de la placa de adhesión y se asocian con componentes citoplasmáticos del desmosoma, los cuales tienen como función formar un complejo proteico de anclaje que interviene en el ensamblaje del desmosoma y fija los filamentos intermedios. Los componentes de la placa de adhesión que interactúan con las cadherinas incluyen la placoglobina, perteneciente a la familia de proteínas armadillo. La unión al citoesqueleto es mediada por la desmoplaquina, una proteína de unión a filamentos intermedios que se asocia con la placoglobina y las placofilinas, también proteínas de la familia armadillo (Delva *et al.*, 2009). Sin embargo, la composición molecular precisa de los desmosomas puede ser variable y depender de la expresión de determinadas isoformas de proteínas constituyentes específicas de tejido o específicas de diferenciación (Dusek *et al.*, 2011). Un nuevo constituyente del desmosoma, el efector de apoptosis *p53* relacionado a PMP-22 o PERP, se ha encontrado expresado de manera ubicua en tejidos epiteliales y es un constituyente de los desmosomas (y posiblemente de la zonula adherens) caracterizado recientemente.

La existencia de los desmosomas permite, además, que exista cierto movimiento en común entre las células contiguas unidas mediante estas estructuras. Contribuyen a la estabilidad cuando están bajo presión y en la contracción de células y tejidos como la epidermis o células del miocardio. En el sistema inmunitario innato adquieren también cierta relevancia, permitiendo establecer uniones muy resistentes evitando la separación de las células epiteliales por acción mecánica o por presión.

Es por ello que cuando existen disfunciones del desmosoma, se producen enfermedades humanas cutáneas autoinmunes, genéticas e infecciosas típicamente caracterizadas por fragilidad epidérmica, ampollas, engrosamiento de la piel de palmas y plantas (queratoderma palmoplantar) y/o cardiomiopatías. En estas enfermedades los componentes del desmosoma son inactivados por mutación (aunque es algo infrecuente), por autoanticuerpos contra ellos o proteolisados por toxinas bacterianas (Dusek *et al.*, 2011). En el caso de la piel, la cual es una barrera mecánica de protección, la pérdida de este tipo de uniones puede originar cierto tipo de patologías. Un ejemplo es el caso del pénfigo, una enfermedad de naturaleza autoinmune grave y poco frecuente, caracterizada por la aparición de ampollas de pared fina que aparecen en piel o mucosas aparentemente normales. Está originada por la producción de anticuerpos contra las cadherinas, produciendo una pérdida de uniones de adherencia y, por tanto, sintomatología. A pesar de la baja frecuencia, se han descrito mutaciones patogénicas para 10 proteínas del desmosoma: PKP1, PKP2, DSP, PG, DSG1, DSG2, DSG4, DSC2 y 3-corneodemosina (McGrath *et al.*, 2010). Resulta muy interesante que, aunque la pérdida de algunas proteínas del desmosoma en modelos murinos *in vivo* dio lugar a individuos viables que pudieron ser analizados, la pérdida de otras fue incompatible con la vida causando letalidad embrionaria. Tal es el caso de PG, DSP, DSC3 y DSG2 (Dusek *et al.*, 2011; Koster *et al.*, 2014).

Además de tener una función estructural, un número creciente de estudios muestran que los desmosomas son estructuras dinámicas que participan en procesos celulares más allá de la adhesión, como la morfogénesis y la diferenciación de los tejidos, y actúan como centros de señalización celular compuestos por un amplio abanico de moléculas de membrana específicas de tejido y moléculas de enlace entre membrana y citoesqueleto (Koster *et al.*, 2014; South, 2004; Wolf *et al.*, 2013).

Respecto a la función de los desmosomas como centros de señalización celular, cabe destacar *Dsg1*, un componente del desmosoma, que aparece en estudios recientes como regulador de la diferenciación celular, a través de su relación con factores como *Bcr* (regulador de la diferenciación de queratinocitos) y MAL/SRF (factor de transcripción/factor de respuesta sérica). La inhibición de *Bcr* o MAL afecta a la diferenciación y baja los niveles de transcripción de *Dsg1*, ambos fenómenos pueden ser rescatados restaurando la expresión de *Dsg1*. Otros estudios remarcan también el papel de *Dsg1* como regulador de la diferenciación a través de la

interacción de ésta con la erbina, un conocido regulador de la señalización por ERK (del inglés, *extracellular signal-regulated kinase*). Otro ejemplo es *Dsc2*, cuya pérdida de expresión aumenta la proliferación y activa el crecimiento tumoral vía AKT/ β -catenina, lo que sugiere un papel supresor tumoral de *Dsc2*. Sin embargo, la relación entre desmosomas y proliferación es aún más fuerte a través de la interacción entre la ruta AKT y PKP1. De manera similar, se ha identificado a *Dsc3* como supresor tumoral (bajo la regulación de *p53*) inhibiendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o la ruta de señalización ERK en células tumorales de pulmón (Capaldo *et al.*, 2014). DSC3 se convierte así en un potencial marcador diagnóstico para SCC de pulmón que correlaciona con un peor resultado clínico (Cui *et al.*, 2012).

También existen estudios recientes que ponen de manifiesto la comunicación cruzada entre desmosomas y zonula adherens. En situaciones de pérdida de expresión de β -catenina, se induce una mayor expresión de placoglobina, la cual migra a la zonula adherens y sustituye a la β -catenina en sus funciones. En células de tumores de cabeza y cuello carentes de DSG3, la placoglobina migra del desmosoma al núcleo unida al TCF e inhibe la actividad transcripcional de LEF/TCF. Además, se ha encontrado recientemente que la DSG3 es reclutada por PKP1. Por otro lado, las cadherinas del desmosoma pueden ser fragmentadas por proteasas intra- y extracelulares de una manera similar a la E-cadherina de la zonula adherens, y los fragmentos solubles resultantes son capaces de afectar la función epitelial.

Todos estos estudios ponen de manifiesto similitudes funcionales entre desmosomas, zonula adherens y zonula occludens, como mediadores de la señalización del contacto célula-célula (Capaldo *et al.*, 2014).

2.1.3.1.1.1. Componentes del desmosoma

2.1.3.1.1.1.1. Cadherinas

La superfamilia de las cadherinas comprende glucoproteínas transmembrana que muestran una heterogeneidad específica de tejido y contienen múltiples isoformas (South, 2004). Los dos tipos de cadherinas desmosomales son las desmocolinas (*Dscs*) y las desmogleínas (*Dsgs*). En los humanos existen tres isoformas de las primeras (*Dsc* 1-3) y cuatro de las segundas (*Dsg* 1-4). Los tres tipos de *Dsc* sufren procesamientos postranscripcionales de empalme de exones alternativos (*splicing*), lo que da lugar a formas "a" o formas "b" más cortas, que difieren en la longitud de sus respectivos dominios carboxilo-terminales (Fig. 11).

Evolutiva y estructuralmente, la *Dsc* está más estrechamente relacionada con las cadherinas clásicas (E- y N-cadherina) que la *Dsg*. No obstante, ambas contienen cuatro repeticiones extracelulares (EI-EIV) homólogas altamente conservadas, de unos 110 aminoácidos, separados por motivos de unión a calcio que median la adhesión; un quinto dominio más variable llamado *anclaje extracelular* (EA), un dominio transmembrana (TM) y un *anclaje intracelular* (IA) seguido de varios dominios citoplasmáticos adicionales, algunos específicos de cada familia proteica. La unión al citoesqueleto de las DSG y DSC tiene lugar a través de la placa del desmosoma y las proteínas armadillo, principalmente desmoplaquina, placoglobina y placofilinas (South, 2004).

Estas cadherinas muestran complejos patrones de expresión en la diferenciación y el desarrollo, aunque los siete tipos de cadherinas están presentes en la epidermis. Estos distintos patrones de expresión sufren una estricta regulación, sugiriendo que son cruciales para la homeostasis tisular y, además, la existencia de distintos patrones implica que dentro de los

diferentes tejidos, los desmosomas son bioquímicamente, y por tanto cabe presumir que funcionalmente, distintos.

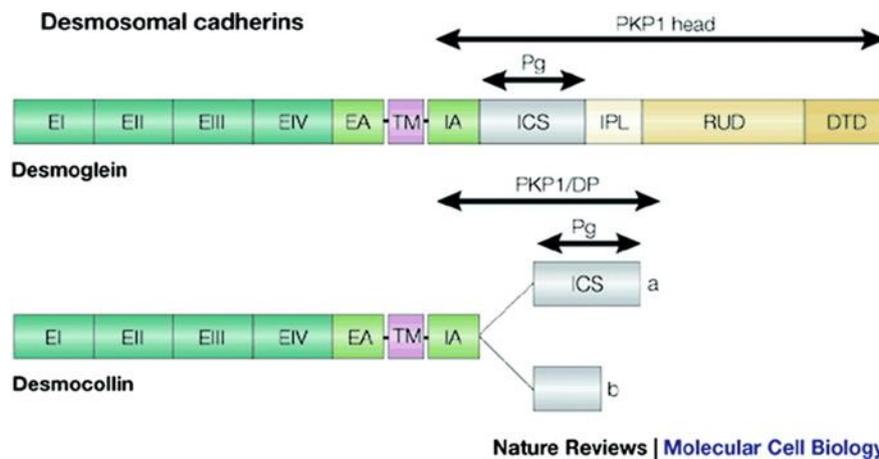


Figura 11. Superfamilia de las cadherinas desmosomales. Como las cadherinas clásicas, las desmosomales son moléculas de membrana de tipo I con sitios de unión dependientes de calcio consenso y extracelulares. Los cuatro miembros de la subfamilia desmogleína (≈ 160 kDa) son los únicos que tienen colas extendidas más allá del dominio ICS (segmento intracelular con sitios de unión a catenina), que puede funcionar como soporte para interacciones proteicas. Los tres miembros de la subfamilia desmocolina (110–115 kDa) presentan dos isoformas. Las isoformas “b” carecen del dominio ICS y son incapaces de unirse a placoglobina (Green *et al.*, 2000).

Existen diversos ejemplos que muestran que la desregulación de estos genes produce patologías e incluso provoca letalidad embrionaria o postnatal en modelos animales como el ratón. Tal es el caso de la *Dsg3*, que da lugar a letalidad postnatal temprana cuando se expresa en las capas superiores de la epidermis debido a la reducción de la función barrera que lleva a una pérdida masiva de agua. Otro ejemplo es la pérdida de expresión de *Dsg2* que resulta en letalidad embrionaria, la cual se atribuye en parte, a menor proliferación de células madre embrionarias, sugiriendo un papel más allá de las funciones de adhesión. La pérdida de expresión completa de *Dsc3* da lugar también a letalidad embrionaria preimplantacional, lo que sugiere que *Dsc3* tiene una función durante el desarrollo (Delva *et al.*, 2009; Koster *et al.*, 2014).

Estos y otros diversos estudios, llevados a cabo en modelos genéticos murinos implican a las cadherinas desmosomales en proliferación y diferenciación epitelial, y en la adhesión intercelular requerida para la integridad tisular. Una serie de enfermedades humanas hereditarias y adquiridas, particularmente desórdenes cardiacos, autoinmunes (como el caso del pénfigo) y cutáneas, incluyendo afectación de los folículos pilosos, queratodermas, etc.; confirman estas conclusiones.

2.1.3.1.1.2. Proteínas de la familia armadillo

La familia de proteínas armadillo se puede subdividir en tres grupos (Fig. 12): a) proteínas clásicas de la familia armadillo las cuales incluyen placoglobina (γ -catenina) y β -catenina; b) subfamilia de proteínas relacionadas con p120-catenina, incluye p120, ARVCF, δ -catenina y PKP4; y c) subfamilia de las placofilinas, que comprende PKP1, PKP2 y PKP3 (Bass-Zubek *et al.*, 2009; Hatzfeld, 1999; Herold *et al.*, 1998; Hirschl *et al.*, 1996; McCrea *et al.*, 1991),

aunque algunos autores consideran la familia de las placofilinas como una subfamilia dentro de las proteínas relacionadas con p120-catenina.

El nombre de la familia de proteínas armadillo deriva del nombre histórico del gen de β -catenina de la mosca *Drosophila*, donde fue originalmente descubierta como reguladora de la polaridad de segmento, y posteriormente se encontró que era la homóloga de las proteínas de unión y señalización β -catenina y placoglobina en vertebrados (Delva *et al.*, 2009). Los miembros de esta familia presentan diversas localizaciones celulares, lo que refleja la diversidad de sus funciones.

La familia armadillo se caracteriza por la presencia de un dominio central que contiene varias series de repetición imperfecta de 42 aminoácidos (*repeticiones armadillo*) en tándem, normalmente entre 7 y 13 repeticiones (Choi *et al.*, 2005). Los miembros de esta familia comparten una organización de los dominios armadillo característica, lo cual sugiere una relación evolutiva ancestral (Hatzfeld, 2007). Cada repetición está compuesta un par de hélices- α que forman una estructura ahorquillada. Estas repeticiones suelen plegarse juntas para formar un único dominio proteico rígido conocido como *dominio armadillo* (ARM). El número de repeticiones puede ser variable, por lo que es un ejemplo de estructuras α -solenoides.

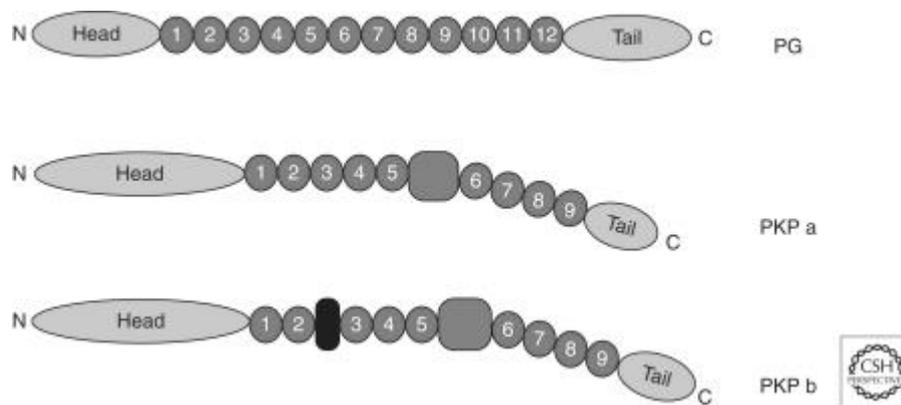


Figura 12. Miembros desmosomales de la familia armadillo. La placoglobina (PG) está más estrechamente relacionada con la β -catenina y contiene 12 repeticiones armadillo que son flanqueadas por distintos extremos amino y carboxilo-terminal. La PG une las colas de las cadherinas desmosomales a la desmoplaquina, pero probablemente también esté involucrada en las interacciones laterales. Mientras, las placofilinas (PKPs) son una subclase más relacionada con p120 y contienen 9 repeticiones armadillo. Presentan dos isoformas, “a” y “b” que difieren por la adición de 21 aminoácidos (PKP1) o de 44 aminoácidos (PKP2). Las proteínas que interactúan con las PKPs se siguen investigando (Delva *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2000).

En el desmosoma, las asociaciones citoplasmáticas con las cadherinas están mediadas por la placoglobina y por las placofilinas. Los miembros de la familia armadillo, incluyendo β -catenina, placoglobina y p120-catenina, tienen diferentes localizaciones subcelulares, lo que refleja las diversas funciones que desempeñan en la célula, como la transducción de señales, la regulación transcripcional, la regulación del ensamblaje de desmosomas, la adhesión celular y el transporte nuclear. Una única proteína puede ejercer diversas funciones gracias a las diversas interacciones proteicas mediadas por sus dominios armadillo (Choi *et al.*, 2005).

Donde mejor se han caracterizado los *dominios armadillo* (ARM) es en la β -catenina, la cual es una proteína involucrada en adhesión celular mediando la unión de las cadherinas al citoesqueleto, pero también se han encontrado en un amplio abanico de proteínas con diversas funciones, como la transducción de señales *Wnt* durante el desarrollo embrionario. La

estructura tridimensional de las 12 repeticiones armadillo de β -catenina es una superhélice de hélices- α , con tres hélices por repetición denominadas H1, H2 y H3. La estructura cilíndrica presenta una hendidura cargada positivamente conservada en p120 y β -catenina (Choi *et al.*, 2005), la cual presumiblemente interactúa con las superficies ácidas de compañeros de interacción de β -catenina conocidos mediante interacciones iónicas (Hatzfeld, 2007; Huber *et al.*).

2.1.3.1.1.2.1. Placoglobina

La placoglobina (también conocida como γ -catenina, JUP y PG) es la proteína armadillo mejor caracterizada en desmosoma. Se localiza en desmosomas y zonula adherens, pero su afinidad por las cadherinas desmosomales es varias veces mayor que para la E-cadherina. Su dominio central armadillo, compuesto por 12 repeticiones, interacciona con la desmoplaquina, la cual ancla los filamentos intermedios a la placa de adhesión. Varios estudios manifiestan que son fundamentales para la asociación con cadherinas tanto el extremo amino-terminal como varias repeticiones armadillo cercanas al extremo carboxilo-terminal, aunque no se conoce exactamente cómo es tal asociación. No obstante, el papel de PG es clave, tal y como demuestran varios modelos murinos y patologías humanas. Concretamente, animales deficientes para PG típicamente morían en la embriogénesis tardía (Dusek *et al.*, 2011), principalmente debido a graves anomalías cardíacas.

Como se ha comentado, una característica importante de la placoglobina es que puede sustituir a β -catenina en zonula adherens, ya que son altamente homólogas, y, al igual que la β -catenina, puede localizarse en núcleo donde puede regular la transcripción de genes diana de LEF/TCF, los cuales pertenecen a la familia de los factores de transcripción y moduladores de la vía de señalización por factores de crecimiento *Wnt* (Delva *et al.*, 2009; Dusek *et al.*, 2011).

2.1.3.1.1.2.2. Placofilinas

En base al número y organización de las repeticiones armadillo del dominio central, las placofilinas (PKPs), con 8-9 repeticiones, se pueden considerar miembros de la subfamilia p120-catenina, la cual se incluye dentro de las proteínas armadillo. Las PKP1-3 comparten un 55% de similaridad en la secuencia de las repeticiones armadillo, y un 50% con el dominio armadillo de la p120-catenina, mientras que PKP4 comparte entre un 65 y un 81.5% de similaridad en la secuencia de las repeticiones armadillo con p120-catenina, ARVCF y δ -catenina. Las PKPs, al igual que p120, presentan un dominio amino-terminal de más longitud que en el caso de PG y β -catenina, con un número de aminoácidos variable entre 246 y 348 residuos. Por otro lado, cabe destacar la escasa longitud del dominio carboxilo-terminal (Bass-Zubek *et al.*, 2009). Aunque el dominio armadillo tiene función estructural y de interacción proteica en el caso de la placoglobina, β -catenina y otros miembros de la familia p120-catenina, todas las interacciones proteicas que se han observado en el caso de las placofilinas tienen lugar en el dominio amino-terminal, por lo que se desconoce el papel del dominio armadillo central.

A pesar del número esperado de repeticiones armadillo por alineamiento de secuencias entre los miembros de la subfamilia p120-catenina, se ha encontrado que las PKPs contienen una o dos repeticiones menos, y en su lugar encontramos un inserto grande (entre la quinta y sexta repetición) que sirve como cuña produciendo un doblez significativo en la estructura general de la proteína. Son además proteínas básicas (Hofmann *et al.*, 2006): una prominente área básica en la superficie de la proteína puede servir como sitio de interacción con otras

proteínas. Sin embargo, hasta la fecha las proteínas capaces de interactuar con las PKPs lo han hecho uniéndose al dominio cabeza amino-terminal, como se ha comentado (Choi *et al.*, 2005; Hatzfeld, 2007).

Aunque el dominio cabeza amino-terminal de las PKPs presenta una relativamente mayor diversidad de secuencia que las repeticiones armadillo, una secuencia consenso altamente conservada de unos 30 aminoácidos, llamada *región homóloga 2* (HR2), es compartida por los dominios cabeza de todas las PKPs y parece ser genuina para esta familia. En la región correspondiente de la subfamilia de proteínas relacionadas a p120-catenina, se ha descrito un motivo similar el cual se cree que forma una hélice superenrollada que podría ser responsable de la dimerización (Schmidt *et al.*, 2005). Se ha postulado que estos dominios HR2 son importantes para ciertas funciones comunes. Por ejemplo, en PKP1 y PKP3 parece que el dominio HR2 está involucrado en la unión a DSP y debido a que representa un motivo conservado de todas las PKPs, sugiere que la capacidad de potenciar el reclutamiento de DSP es una función común de todas las PKPs (Bass-Zubek *et al.*, 2009; Neuber *et al.*, 2010). Sin embargo, existen estudios que sugieren que no es así en todos los casos pues, por ejemplo, el dominio HR2 ha demostrado no ser crítico para la asociación de PKP2a con otros componentes del desmosoma o para su apropiada localización subcelular (Chen *et al.*, 2002).

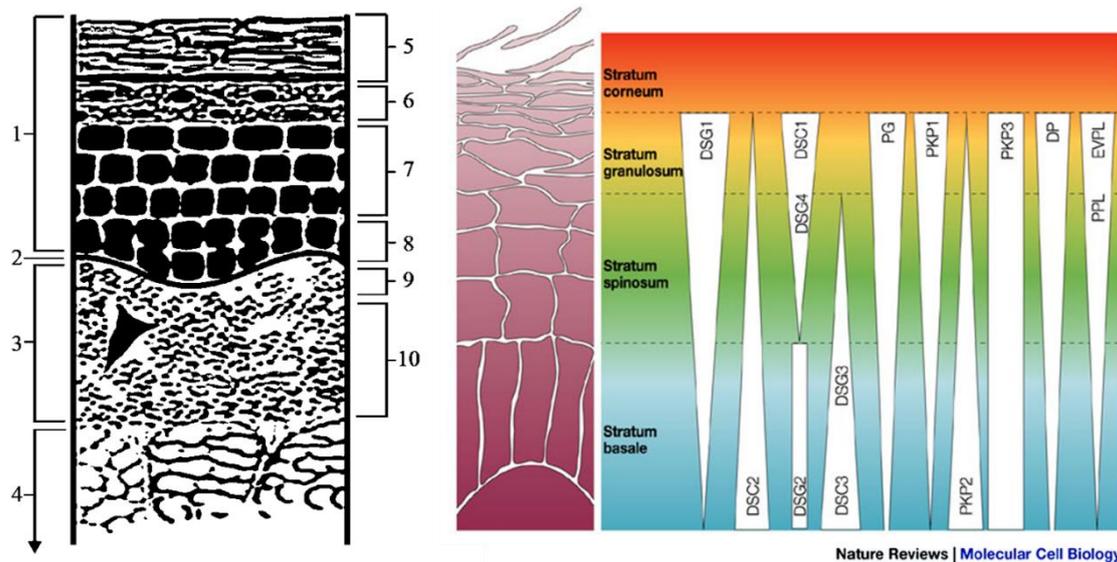


Figura 13. Estructura de la piel (Nilda L. Bello Fernández, 2010) y patrones de expresión de las proteínas desmosomales en la epidermis (Getsios *et al.*, 2004). La piel está constituida por 3 capas superpuestas: epidermis, dermis e hipodermis o tejido graso subcutáneo; se agregan anexos cutáneos como el aparato pilosebáceo, las glándulas sudoríparas eccrinas, las glándulas apocrinas y las uñas (1, epidermis; 2, zona de membrana basal; 3, dermis; 4, tejido subcutáneo; 5, estrato córneo; 6, estrato granuloso; 7, estrato espinoso; 8, estrato basal; 9, estrato papilar; 10, estrato reticular).

Las PKPs presentan patrones de expresión específicos de tejido y diferenciación (Fig. 13). Al contrario que la p120-catenina, las placofilinas se encuentran principalmente en los desmosomas, en lugar de en la zonula adherens, y aunque en principio se vio que PKP1 y PKP2 se localizaban también en el núcleo (South, 2004) finalmente todas las PKPs han sido observadas en esta localización (Choi *et al.*, 2005); sin embargo, mientras el dominio cabeza es el encargado de esta localización en PKP1 y 2, en PKP3 es el dominio armadillo quien dirige la proteína al núcleo (Bonne *et al.*, 2003). Tanto PKP1 como PKP2 presentan a su vez dos isoformas, una forma "a" corta y otra más larga "b", esta última contiene un inserto en la región H3 de las repeticiones armadillo 3 y 4, respectivamente. La diferencia de longitud es de 21 aminoácidos en la tercera

repetición armadillo en el caso de PKP1 (exón 7) y de 44 aminoácidos en la cuarta repetición de PKP2, destruyendo en este caso el motivo altamente conservado LxNLS (Choi *et al.*, 2005; Hatzfeld, 2007). Recientemente, se ha descrito una nueva isoforma para PKP3, denominada “PKP3b” y específica de células de epitelios estratificados, que podría estar sujeta a promotores alternativos. También se ha observado un patrón de expresión heterogéneo de esta isoforma en colon y tumores (Mühmer *et al.*, 2014). La mayoría de las células contienen tanto PKP1a y b como PKP2. En células de epitelio simple o cardiomiocitos, sólo PKP2 es detectada en desmosoma, quedando PKP1a en el núcleo. Por otro lado, se ha encontrado PKP1a en los desmosomas de epitelios estratificados mientras PKP2 se localizaba exclusivamente en el núcleo. En otros tejidos, ambas (PKP1 y 2) coexisten en los mismos desmosomas (Schmidt *et al.*, 1997).

Aunque las secuencias de todas las proteínas de la familia p120-catenina están altamente relacionadas, los genes correspondientes se hayan dispersos a lo largo del genoma humano. Esto lleva a pensar que la expresión de estos genes no parece estar regulada de manera coordinada, tal como se asume para otras proteínas de unión como DSGs y DSCs. La organización de exones está altamente conservada entre los genes relacionados con la p120-catenina, incluyendo las PKPs, pero no entre estos genes y los de la β -catenina o la placoglobina, sugiriendo que han seguido caminos evolutivos diferentes (Hatzfeld, 2007).

- **PKP1:** se localiza en el cromosoma 1 y presenta 9 repeticiones armadillo. En los experimentos iniciales de SDS-PAGE de epidermis nasal vacuna, se resolvió como la sexta banda y por ello es conocida también como *proteína de la banda 6* o *polipéptido D6*, presentando carga positiva. Es la más pequeña de las placofilinas con un peso molecular de 82 KDa. Presenta una mayor expresión en las capas suprabasales de epitelios estratificados, donde los desmosomas son más grandes y más numerosos, y en epitelios complejos aunque también está presente en las capas basales y granulares, y ausente en el estrato córneo (South, 2004). Su dominio amino-terminal, o dominio cabeza, interacciona con DSG1, filamentos intermedios de queratina y, de manera particularmente robusta, con DSP, lo que lleva a reclutar esta proteína a las zonas de unión intercelular. Existen algunos estudios que también la relacionan con PG y DSC1a. Sobre ésta última, se observó que un importe nuclear de DSC coincidía con una localización nuclear de PKP1 recombinante, sugiriendo una asociación entre ambas (South, 2004).

- **PKP2:** se localiza en el cromosoma 12 y presenta 8 repeticiones armadillo con un peso molecular de 97 KDa. Su distribución es más amplia que PKP1 y se encuentra expresada en epitelios simples, complejos y en las capas inferiores de algunos epitelios estratificados (donde puede coexistir con PKP1 y PKP3), en tejidos no epiteliales como músculo cardíaco y nódulos linfáticos, y en desmosomas en los que PKP1 y PKP3 no son detectados. Se concentra en las capas basales de la mayoría de epitelios escamosos estratificados (South, 2004). Es menos eficiente que PKP1 a la hora de reclutar DSP y otras proteínas desmosomales, lo que sugiere diferentes funciones para las diferentes isoformas de PKPs; y no afecta al número o tamaño de los desmosomas, como el caso de PKP1. A través del dominio cabeza amino-terminal, interactúa directamente con un repertorio de componentes del desmosoma mayor que el de PKP1, incluyendo DSP, PG, DSG1 y 2, y DSC 1a y 2a. PKP2 parece también ser esencial para el transporte de DSP a la membrana plasmática. Gracias al hallazgo de que PKP2 es capaz de asociarse a β -catenina (componente universal de la zonula adherens), se ha descubierto que las PKPs pueden asociarse a este tipo de uniones celulares. Sin embargo, esto sólo ocurre en tejidos cardíacos pues, en tejidos epiteliales con desmosomas, PKP2 no colocaliza con la β -catenina en la zonula adherens, aunque compite con las cadherinas clásicas por unirse a β -catenina (Hatzfeld, 2007; South, 2004). PKP2, además, puede trasladarse al núcleo en respuesta a eventos de señalización específica y participar en la transcripción génica mediante la interacción con β -catenina,

potenciando así la actividad de β -catenina/TCF (Bass-Zubek *et al.*, 2009). También es capaz de asociarse con la subunidad mayor de la ARN polimerasa III y el factor de transcripción TFIIB.

- **PKP3:** se localiza en el cromosoma 11 y presenta 8 repeticiones armadillo con un peso molecular de 87 KDa. Se presenta en epitelios simples y estratificados, con una expresión uniforme a lo largo de la epidermis, a excepción de hepatocitos (South, 2004). Como la PKP2, se encuentra en los desmosomas pero su presencia no incrementa el número o tamaño de los mismos. Es la PKP que interactúa con un mayor número de proteínas desmosomales, incluyendo DSP (con al menos dos sitios de interacción en el dominio cabeza, incluyendo HR2, que interactúan con al menos dos sitios de unión de DSP en total), PG, DSG 1-3, DSC 1a, 2a, 3a, 3b y KRT18. La unión de las PKPs a más de una molécula de DSP podría explicar cómo los desmosomas se expanden lateralmente en las capas superiores de los epitelios estratificados (Bonne *et al.*, 2003).

- **PKP4:** también conocida como *p0071*, se localiza en el cromosoma 2 y presenta 9 repeticiones armadillo. Es la mayor de las PKPs con un peso molecular de 131 KDa. Se presenta en células endoteliales y se expresa en tejidos epiteliales como piel, intestino o hígado, pero también en otros no epiteliales como corazón y cerebro (Schmidt *et al.*, 2005). Es un homólogo cercano de p120-catenina y difiere de las otras PKPs en que su localización no se restringe a los desmosomas sino que colocaliza con las cadherinas clásicas en la zonula adherens y se ha demostrado que se asocia con VE-, E-, N- y OB-cadherinas, con la función de reclutarlas y estabilizarlas. Su comportamiento también se distingue del resto de las PKPs, pues mientras éstas favorecen la formación de desmosomas más grandes, la sobreexpresión de PKP4 se ha relacionado con la pérdida de desmosoma y el incremento de zonulas adherens (Bass-Zubek *et al.*, 2009). Mientras el dominio cabeza es responsable de la localización desmosómica, el dominio armadillo se requiere para zonula adherens (Choi *et al.*, 2005) y se cree que podría regular la comunicación entre ambas uniones intercelulares (Hatzfeld *et al.*, 2003). Además, contiene una región homóloga en el extremo amino-terminal que está altamente conservado entre las proteínas de la familia p120-catenina, pero que es distinta de la HR2 de las otras PKPs (Schmidt *et al.*, 2005). También se localiza en el citoplasma donde regula la GTPasa pequeña *RhoA*. Durante la interfase, PKP4 se localiza en las uniones celulares mencionadas y en los centrosomas, sin embargo, durante la mitosis se localiza en los polos del huso mitótico hasta la anafase, centrándose entonces en los cuerpos medios (*midbodies*) durante la citocinesis (Hatzfeld, 2007; Keil *et al.*, 2009; Medvetz *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2006).

Todas las PKPs están asociadas a desmosomas e interactúan con las cadherinas y las proteínas de la placa del desmosoma. Sus numerosas interacciones con la placa sugieren que actúan como proteínas de soporte y son requeridas para el ensamblaje de la estructura (al menos una de las PKPs clásicas es necesaria para la formación de desmosomas funcionales (Neuber *et al.*, 2010)), aunque hasta hace no mucho se les consideraba como proteínas adicionales y no esenciales de la placa del desmosoma. Las PKPs aportan unión vertical entre la membrana plasmática y los filamentos intermedios del citoesqueleto a través de la interacción cadherina-PKP-DSP y, al mismo tiempo, facilitan la interacción proteica lateral (PKP-PG-DSP) para incrementar la densidad de la red estructural cortical (Bass-Zubek *et al.*, 2009). Así pues, las PKPs contribuyen a la estabilización del desmosoma y, además, al tráfico de sus componentes, principalmente cadherinas (Munoz *et al.*, 2014) (algo que ya se ha observado para p120-catenina (Choi *et al.*, 2005)). Sin embargo, parecen jugar papeles distintos en la regulación de la adhesión, lo que hace que las distintas isoformas no se expresen de forma compensatoria ni sustituyan todos los aspectos funcionales de otras isoformas (Neuber *et al.*, 2010). PKP2 y/o PKP3 pueden dar apoyo al ensamblaje del desmosoma en epitelios simples y cardiomiocitos a través de la interacción con DSG2, PG y DSP. PKP1, gracias a su capacidad para estabilizar las

proteínas del desmosoma y para ensamblarlas a la placa, promueve un incremento en el tamaño y número de los desmosomas. De este modo, PKP1 promueve y estabiliza la adhesión celular en las capas suprabasales de epitelios que sufren estrés mecánico (Hatzfeld, 2007). Además, PKP1 afecta a la migración de la monocapa de queratinocitos y a la estabilidad dependiente de calcio de los desmosomas *in vitro* (South, 2004).

En relación a los filamentos intermedios, una asociación directa entre éstos y las PKPs ha sido observada en varios estudios. PKP1 se une a varias queratinas en epitelios simples y estratificados, y las agrupa *in vitro*, aunque *in vivo*, esta asociación sólo se observa cuando existe sobreexpresión de PKP1 y termina por colapsar los filamentos. PKP2 y PKP3 tienen un comportamiento parecido, por lo que la función de las PKPs en la regulación de la organización de los filamentos de queratina parece poco probable. Además, las PKPs se localizan en la placa discoidal interna y densa a los electrones del desmosoma, donde pueden interactuar con las colas citoplasmáticas de la DSG, la PG y el dominio amino-terminal de la DSP, pero no con las queratinas, las cuales interactúan sólo con la placa más externa del desmosoma, siendo el extremo carboxilo-terminal de la DSP el principal componente en el anclaje de las queratinas a la membrana (South, 2004; Wolf *et al.*, 2010a). Existen estudios que sugieren que desmosomas que contienen PKP1 no requieren DSP para ensamblarse, pero la unión con los filamentos intermedios de queratina es dependiente de DSP. La expresión del dominio amino-terminal de la DSP restaura parcialmente la unión a queratinas, aunque esta porción de la DSP no es la que se une a tales moléculas por lo que se especula que la unión del dominio amino-terminal de la DSP a PKP puede inducir la unión a filamentos intermedios (South, 2004).

Las PKPs también pueden unirse a actina, proteínas reguladoras de la actina y microtúbulos, coordinando incluso la remodelación de actina a través de múltiples rutas de señalización, entre las que destaca la vía de *RhoA* (Bass-Zubek *et al.*, 2009). PKP1 en este contexto, estaría involucrado en la comunicación cruzada con otras estructuras del citoesqueleto o en procesos de migración, ya que colocaliza con los filamentos de actina en los bordes celulares de células que no contactan con vecinas; y la sobreexpresión de PKP1 muestra una fuerte colocalización con los filamentos de actina especialmente en células con pocos desmosomas (Hatzfeld, 2007). Así, PKP1 podría estar implicada en la formación de filopodios u otras protrusiones citoplasmáticas largas (Schmidt *et al.*, 2005).

La importancia de las PKPs para la integridad del desmosoma puede constatararse también a través de varias enfermedades y/o defectos de los procesos celulares asociados a mutaciones de las placofilinas y, también, gracias a experimentos con ratones transgénicos *knockout*.

Mutaciones en *Pkp1* producen una enfermedad autosómica recesiva llamada *Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel* (EDSFS, del inglés), lo cual sugiere funciones asociadas a la regulación de la morfogénesis epidérmica (Hatzfeld, 2007). Muy recientemente se han descrito modelos murinos para *Pkp1* (Rietscher *et al.*, 2016). Los animales con mutaciones homocigóticas de *Pkp1* murieron postnatalmente (< 24h, penetrancia del 100%) y presentaron una piel frágil, con lesiones muy similares al fenotipo humano y una reducción del número y tamaño de los desmosomas y afección de la zonula occludens. Sin embargo, algunos pacientes de EDSFS y perros con mutaciones en *Pkp1* sobreviven, quizás debido a que en humanos se produce una cierta compensación llevada a cabo por PKP2 que no se ha observado en ratones (McGrath *et al.*, 2010; McMillan *et al.*, 2003; Olivry *et al.*, 2012). Además, ratones *knockout* de *Pkp1* mostraron un peso corporal un 20% menor en el momento del nacimiento, quizás debido a alteraciones en la señalización adipogénica de la epidermis (a través de la ruta insulina/IGF-PI3K-AKT) que causaría defectos en el desarrollo del tejido adiposo subcutáneo. De manera similar, los pacientes de EDSFS padecen retrasos en el crecimiento y fallo del desarrollo, e incluso se ha detectado que algunos nacieron con bajo peso y tuvieron dificultades para ganar peso. Por

otro lado, los queratinocitos aislados de estos animales proliferaron menos, tuvieron menor cohesión intercelular, resistencia transepitelial y una formación de zonula occludens alterada en comparación con los control. Todo ello apunta a PKP1 como una proteína esencial para el control del crecimiento del organismo, la integridad de la epidermis y la homeostasis tisular (Rietscher *et al.*, 2016).

El hecho de que PKP2 sea expresada sólo en tejidos cardiacos da lugar a que mutaciones en el gen que codifica esta proteína (normalmente en el extremo carboxilo-terminal) causen cardiopatías arritmogénicas ventriculares derechas (conocida por sus siglas en inglés, ARVC) debido a la fragilidad mecánica ocasionada en el miocardio, y letalidad embrionaria en modelos murinos. Con respecto a la afección cardiaca, mutaciones en otros genes del desmosoma como *Pg*, *Dsc2*, *Dsg2* y *Dsp* han sido relacionadas con el mismo tipo de cardiopatías (Koster *et al.*, 2014). Ratones *knockout* para PKP2 confirmaron el papel crucial de esta proteína en adhesión intercelular del sistema cardiaco, aunque la apoptosis parece tener también un papel en la pérdida de células del miocardio (Wolf *et al.*, 2010a). En cuanto a la letalidad embrionaria, estos ratones *Pkp2*^{-/-} mostraron alteraciones letales en la estabilidad y morfogénesis cardiaca durante los estadios medios de la gestación (E10.5-E11). En ausencia de PKP2, la DSP se disocia de las placas de unión y forma agregados granulares citoplasmáticos. Curiosamente, los epitelios embrionarios presentaban uniones normales. Esto es probablemente debido a que los cardiomiocitos expresan PKP2 como único miembro de la familia PKP, mientras que las células epiteliales suelen expresar varias PKPs, las cuales podrían tener funciones parcialmente solapadas. Así, la formación de los desmosomas está fuertemente comprometida en células que dependen únicamente de PKP2, mientras que tipos celulares que expresan varias PKPs son capaces de formar desmosomas tras la supresión de un sólo miembro de la familia (Hatzfeld, 2007).

Por otro lado, no se han observado patologías humanas asociadas a mutaciones en *Pkp3*, aunque estudios en animales muestran alteraciones en desmosomas y zonula adherens en la capa basal de la epidermis. Además, los desmosomas eran prácticamente ausentes en la capa basal de la vaina externa de la raíz de los folículos pilosos y en las células de la matriz (Wolf *et al.*, 2010a). Como resultado, se observaron alteraciones en la morfogénesis de los folículos pilosos que repercutió en anormalidades del pelaje del animal, en la localización de la desmoplaquina y aumento de la proliferación de queratinocitos, una mayor susceptibilidad a dermatitis y alopecia secundaria. El fenotipo encontrado en mutantes de *Pkp3* fue similar a los que producen las mutaciones de *Pkp1*, y aunque los sitios de fosforilación encontrados para PKP1 no se conservan en PKP3, ambas proteínas parecen compartir funciones comunes del metabolismo del ARN (Wolf *et al.*, 2013). Asimismo, PKP3 parece estar involucrada en limitar la respuesta inflamatoria en la piel (Sklyarova *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2010a).

Los diversos fenotipos mutantes, estudios en modelos animales y también la localización subcelular de las PKPs no sólo en los desmosomas, sino también en citoplasma y núcleo, sugieren funciones adicionales y aún desconocidas para las PKPs (Wolf *et al.*, 2010a).

De acuerdo con lo anterior, cabe destacar que, al contrario que en el caso de la β -catenina, el papel de las PKPs en la señalización intracelular es aún algo especulativo pero existen evidencias que las relacionan con la regulación del ARNm, supervivencia tras daño del ADN, la modulación de GTPasas pequeñas durante la división celular y proliferación celular inducida por factores de crecimiento (Munoz *et al.*, 2014). Tales evidencias de funciones adicionales pasan a detallarse en las sucesivas páginas.

Con respecto a la función nuclear de las PKPs, se ha observado que tanto PKP1 endógeno como su sobreexpresión, localizan fuertemente en el núcleo. La isoforma PKP1a parece ser capaz de asociarse tanto con los desmosomas como de localizar en el núcleo, mientras que la isoforma PKP1b se ha descrito en el núcleo exclusivamente, sugiriendo que el procesamiento

postranscripcional de PKP1 está involucrado en regular la localización y función del mismo. A pesar de que poco se sabe aún de la función y de los compañeros de unión nucleares de PKP1, sí se ha descrito que PKP1 interacciona con ADN de cadena sencilla *in vitro* y que puede tener una función de protección celular frente a daño del ADN (Hatzfeld, 2010; Munoz *et al.*, 2014; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010).

Por otro lado, ambas isoformas de PKP2 presentan también una localización dual en el desmosoma y el núcleo celular (Bass-Zubek *et al.*, 2009), aunque esta última es menos prominente que en el caso de PKP1.

Esta localización nuclear de ambas PKPs sugiere que tienen capacidad de afectar la expresión génica (Dusek *et al.*, 2011). De hecho, ensayos de co-inmunoprecipitación revelaron una posible interacción de PKP2 con RPC155, la subunidad mayor de la ARN polimerasa III, y el factor de transcripción TFIIIB (South, 2004). La ARN polimerasa III juega un papel crucial en la regulación de la síntesis de proteínas y el control del crecimiento celular, ya que cataliza la producción de pequeñas moléculas de ARN no codificante, muchas de las cuales están implicadas en metabolismo celular. Sin embargo, poco se sabe del papel que en esto pudiera jugar PKP2, aunque se especula que podría coordinar la adhesión intercelular y el control del crecimiento celular.

Por su parte, PKP3 también ha podido ser detectada en núcleo de células humanas, así como en *Xenopus* y ratón, donde aportó evidencias que sugirieren un posible papel en desarrollo. Recientemente se ha identificado una interacción funcional entre PKP3 y el factor de transcripción ETV1 (miembro de la familia *Ets*, que se une directamente a ADN), el cual tiene un papel fundamental en el desarrollo neuronal y en enfermedades genéticas humanas; y entre PKP3 y ETV5, estrechamente relacionado con ETV1. Incluso existen estudios preliminares que muestran que PKP2 (pero no PKP1) es capaz de potenciar la actividad de ETV1, aunque más ensayos son necesarios para su verificación. ETV1 contribuye a la formación de neuronas dopaminérgicas, a través de la regulación de varios genes de síntesis y transporte de dopamina, así como a la formación de conexiones entre el grupo 1a de neuronas aferentes sensoriales y neuronas motoras. En cuanto a su papel en patologías, ETV1 actúa en el sarcoma de Ewing y promueve la metástasis en el cáncer de próstata.

Estos hallazgos son la primera descripción de la existencia de interacciones entre las PKPs y factores de transcripción de unión a sitios específicos de ADN.

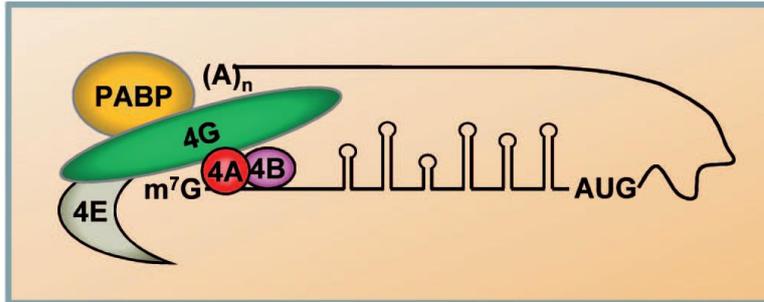
Así pues, el papel nuclear de las PKPs podría ser análogo al de otros miembros de la familia que también se asocian directamente con factores de transcripción (β -catenina interacciona con LEF/TCF; p120 interacciona con *Kaiso*) (Munoz *et al.*, 2014).

Recientemente, se han identificado funciones en la regulación de la síntesis proteica para PKP1 y 3, aunque en menor medida para éste último, mediante el incremento del inicio de la traducción. PKP1 ha sido caracterizada, tanto *in vitro* como *in vivo*, como un componente del complejo eIF4F de inicio de la traducción cap-dependiente (Fig. 14), donde se asocia directamente (a través de su dominio amino-terminal) con el factor de iniciación eIF4A1 el cual posee actividad helicasa ATP-dependiente, estimulando no sólo el reclutamiento de dicho factor (y de eIF4B) sino también dicha actividad helicasa. Esto sugiere un papel de PKP1 en la estimulación de la proliferación ya que facilitaría el proceso de escaneo de las regiones 5'UTR de los ARNm y reconocimiento de los codones de inicio.

PKP1, estimuló *in vitro* tanto la traducción cap-dependiente como la EMCV-IRES-dependiente, la cual requiere de todas las subunidades del complejo eIF4F, excepto eIF4E. Por este motivo, PKP1 no fue capaz de estimular la traducción HCV-IRES-dependiente, ya que requiere del complejo eIF3 exclusivamente. Hay que tener en cuenta que el inicio de la

traducción es el paso limitante del proceso y, de acuerdo a esto, la síntesis proteica es regulada en primer lugar a nivel del paso de iniciación más que en los de elongación o terminación. El inicio de la traducción es regulado por factores de crecimiento y nutrientes a través de la ruta PI3K/AKT/mTOR (Wolf *et al.*, 2010a).

Initiation complex without PKP1



Initiation complex with PKP1

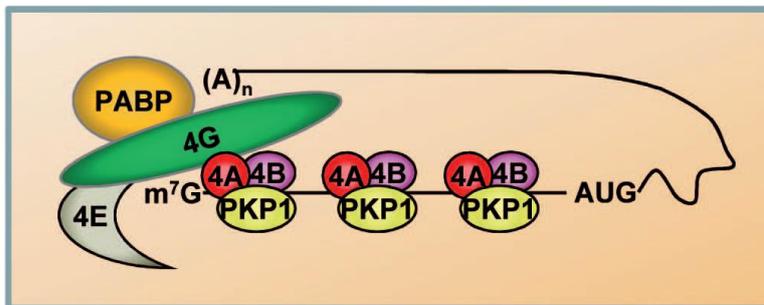


Figura 14. PKP1 en el complejo de inicio de la traducción cap-dependiente. Arriba, modelo del complejo cap en ausencia de PKP1: eIF4E se une a cap y recluta eIF4G, eIF4A y eIF4B al complejo. La asociación de eIF4G con PABP induce la circularización del ARNm. Abajo, modelo del complejo cap en presencia de PKP1: PKP1 recluta más eIF4A y eIF4B al complejo para facilitar el escaneo de la región 5'UTR y el reconocimiento del codón de inicio (Wolf *et al.*, 2010a).

Actualmente, se siguen estudiando las PKPs para intentar descubrir la asociación entre su localización nuclear, su relación con ARN polimerasas, factores de transcripción y proteínas de unión a ARN, y su papel estructural en el desmosoma y la arquitectura tisular (Delva *et al.*, 2009). Las PKPs exhiben un alto número de interacciones proteína-proteína que las capacita para asociarse con varias proteínas desmosomales, otras proteínas armadillo y proteínas de unión a ARN. Ya que todos estos sitios de unión se encuentran en el dominio cabeza amino-terminal como se ha comentado, parece probable que las interacciones con proteínas del desmosoma y con factores de inicio de la traducción sean mutuamente excluyentes (Fig. 15). Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la traducción ocurre en el citoplasma y no en los desmosomas (Wolf *et al.*, 2010a).

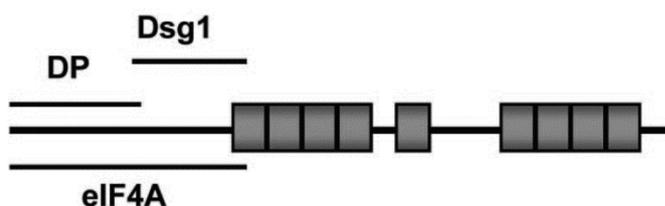


Figura 15. Proteínas conocidas con las que interacciona PKP1 y sus sitios de unión (Wolf *et al.*, 2010a).

Por último, se han detectado también interacciones de PKPs con miembros de la familia Rho de GTPasas, sugiriendo que ostentan una función en la regulación de la vía de señalización Rho.

Concretamente, se ha encontrado interacción entre PKP3 y DNM1L, un miembro de la superfamilia dinamina de GTPasas grandes. Las dinaminas interactúan con una variedad de proteínas celulares, incluyendo la actina cuya reorganización regulan, influyendo así en la forma celular durante procesos como la migración, endocitosis y secreción. Además, participan en el transporte vesicular dentro de las rutas secretoras, mantienen la morfología mitocondrial y modulan protrusiones como los podosomas (fundamentales en adhesión y motilidad) e invadopodios (responsables de la degradación focal de la matriz extracelular) (Furukawa *et al.*, 2005).

Finalmente, en el caso de la PKP más diferente del grupo, PKP4, cabe destacar su localización durante la citocinesis en los *cuerpos medios* (más conocidos por el anglicismo *midbody*), lo cual fue descubierto recientemente (Wolf *et al.*, 2006) y le adjudica un importante y hasta ahora desconocido papel en la división celular. Tanto la sobreexpresión como la inhibición de esta proteína interfirieron la supervivencia y el normal crecimiento celular debido a defectos de la citocinesis, los cuales producían células multinucleadas e inducción a la apoptosis. Tales alteraciones parecen ser debidas a la interacción de PKP4 con *RhoA* y *Ect2*, y junto con *Ect2* estimularía la actividad *RhoA* y promovería la formación del anillo contráctil y su constricción. Más tarde se demostró que la localización de PKP4 en el *midbody* era dependiente de un miembro de la familia de la quinesina-II KIF3b (Keil *et al.*, 2009).

Al igual que p120-catenina puede regular el ensamblaje del citoesqueleto en las uniones intercelulares a través de la interacción con GTPasas de la familia Rho (Choi *et al.*, 2005), estos datos implican que otros miembros de la familia p120-catenina podrían tener también un papel regulador de la actividad Rho-GTPasa, lo que explicaría cómo estas proteínas contribuyen en el equilibrio entre adhesión y motilidad celular. De este modo, las PKPs podrían llevar a cabo una precisa regulación espacio-temporal de Rho-GTPasa asegurando la activación de efectores específicos en el momento y lugar preciso (Hatzfeld, 2007).

Por otro lado, se han descubierto interacciones de PKP4 con proteínas con dominios PDZ (que sirven de sustento estructural a los complejos de señalización) y con la erbina (regulador de la vía de señalización ERK/MAPK, la cual afecta la señalización por factores de crecimiento) (Bass-Zubek *et al.*, 2009). Estos datos atribuyen también a PKP4 un papel en la señalización celular.

2.1.3.1.1.1.2.2.1. Placofilina 1

El gen humano que codifica la proteína PKP1, la cual se cristalizó en 2005 (Choi *et al.*, 2005), abarca 50 kb de ADN genómico, se localiza en el cromosoma 1q32, contiene 15 exones y es la única proteína del desmosoma cargada positivamente (Schmidt *et al.*, 1997). Se cree que esta superficie positiva del dominio armadillo tiene la función de unión a ligandos aún no identificados, por lo que se necesitan más estudios para la caracterización funcional de esta región (Hatzfeld, 2007). El dominio cabeza amino-terminal está compuesto por 273 aminoácidos mientras que el carboxilo-terminal se compone de sólo 34 (Schmidt *et al.*, 2005). Las nueve repeticiones armadillo que lo componen corresponden a los residuos aminoácidos 243–387, 396–480, y 509–700, y dan lugar a una estructura en forma de hoz con una longitud total de 95 Å. Entre la quinta y sexta repetición armadillo se encuentra un inserto largo y flexible (residuos 464–524) que introduce un doblez en la estructura tridimensional de la proteína, en lugar de la décima repetición armadillo como predice el análisis de secuencias (Choi *et al.*, 2005). Además, PKP1 es una proteína prácticamente insoluble y, por tanto, apenas detectable en la fracción soluble (Wolf *et al.*, 2010b).

Como se ha comentado previamente, presenta dos isoformas (“a” y “b”) resultantes de *splicing* alternativo. Ambas isoformas difieren en comportamiento, peso molecular y abundancia, aunque su significado biológico es aún desconocido. Por una parte, PKP1a es más

pequeña (con 726 aminoácidos), ya que PKP1b contiene una secuencia de 21 aminoácidos adicionales codificada por el exón 7 (sumando 747 aminoácidos en total). Esta región específica de PKP1b se localiza en la tercera repetición armadillo. El ARNm de cada isoforma puede presentarse, además, en dos formas alternativas de poliadenilación de la 3'UTR, de 2,7 y 5,3 kb aproximadamente, algo que también ocurre para PKP2 y 4 (Schmidt *et al.*, 1997).

Como se ha comentado, ambas isoformas se encuentran en el nucleoplasma (excluyendo el nucleolo (Schmidt *et al.*, 2005)) tanto de células que forman desmosomas como de células que no lo hacen, probablemente llevando a cabo funciones nucleares aún desconocidas aunque existen datos que sugieren que la función y/o localización nuclear se correlaciona e incluso promueve el crecimiento celular (Hatzfeld, 2010). Sin embargo, mientras PKP1a se localiza en desmosomas y núcleo y es fácilmente extraíble, PKP1b sólo se localiza en núcleo (y es más resistente a la extracción), siendo así la isoforma "a" más abundante que la "b". Se cree que el inserto de 21 aminoácidos presente en la isoforma "b" pueda ser el responsable de la reclusión de esta isoforma en el núcleo y que, en el caso de PKP1a, la localización en el desmosoma en tipos celulares concretos sea secundaria, aunque específica, y juegue un papel adicional en adhesión celular. Esta localización, y no su síntesis, sería la que es regulada en el contexto de ciertos programas de diferenciación (convirtiéndola en un marcador de diferenciación queratinocítica (Neuber *et al.*, 2010)), haciendo que parte de la proteína nuclear sea reclutada en membrana. Esto lleva a considerar la posible existencia de intercambios y traslados regulatorios entre el núcleo y desmosoma en ambas direcciones.

Todos estos datos sugieren que PKP1a y b son proteínas nucleares constitutivas codificadas por el mismo gen aunque, ni el proceso de entrada de PKP1 al núcleo ni su función dentro de éste se han descrito completamente todavía pues, entre otras cosas, no se han encontrado en su secuencia los típicos motivos NLS (del inglés, señales de localización nuclear) (Hatzfeld, 2010); sin embargo, no se descarta que pueda asociarse a otras proteínas que sí contengan NLS formando así un complejo de traslocación al núcleo. Ni siquiera la microscopía inmunoeléctrica ha sido capaz de desentrañar la estructura nuclear específica con la cual PKP1 está asociada (Schmidt *et al.*, 1997). Sí se conoce al menos, que el extremo carboxilo-terminal de PKP1 (especialmente los últimos 40 aminoácidos) (Neuber *et al.*, 2010) es requerido para su localización en la membrana plasmática, mientras que el extremo amino-terminal está involucrado en el reclutamiento de DSP en la membrana, la unión a citoqueratinas y en el ensamblaje del desmosoma (McGrath *et al.*, 2010), así como en el direccionamiento de la proteína al núcleo (Hatzfeld, 2010).

Debido a que, además, no se han podido identificar proteínas que interaccionen con PKP1 en núcleo a pesar de los esfuerzos, se planteó la hipótesis de que el ADN podría ser el responsable de la retención de PKP1 en esta organela. En base a esto, se realizaron una serie de experimentos que demostraron la asociación de PKP1 a ADN de cadena sencilla (*ssDNA*, del inglés), pero no a ADN de doble cadena (*dsDNA*, del inglés), lo que apoya la hipótesis mencionada a pesar de que más análisis deben ser llevados a cabo (Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010). Algo parecido ocurrió años antes en el caso de la vimentina, la cual también se asoció con *ssDNA* pero no a *dsDNA*, aunque nunca se ha comprendido la relevancia funcional de tal interacción (pues se trata de una proteína de los filamentos intermedios) ni se ha podido probar. Una posible explicación a estos hallazgos es que PKP1 presente *in vivo* una mayor afinidad por unirse a ARN en lugar de a *ssDNA*, a la vista del papel de PKP1 y PKP3 en control de la traducción. Sin embargo, la interacción entre PKP1 y los componentes de la maquinaria de traducción fue mediada por interacciones proteína-proteína e independiente de la presencia de ARN *in vitro*, lo cual no excluye esta posible interacción *in vivo*. Quedaría por descubrir si realmente se produce tal interacción y, en caso afirmativo, si es específica de secuencia (Hatzfeld, 2010).

Puesto que sólo se encuentra *ssDNA* en el contexto de reparación del ADN, cabe la posibilidad de que PKP1 estuviera involucrada en la respuesta a daño del ADN. En este sentido se realizaron experimentos de inducción de daño en el ADN con etopósido (el cual forma un complejo con ADN y topoisomerasa II, previniendo así la religación de las hebras del ADN) lo que causó errores en la síntesis de ADN y promovió la apoptosis de células cancerígenas. Es por ello que el etopósido es actualmente utilizado como quimioterapia en tratamiento del cáncer. El etopósido indujo, además, la redistribución de PKP1 al nucleolo, en el cual se localizan las maquinarias de transcripción y procesamiento responsables de la generación de subunidades ribosómicas, por lo que se especula que PKP1 pudiera suprimir la biogénesis del ribosoma en tales condiciones. La función nucleolar parece estar estrechamente correlacionada con la proliferación celular, pues células en proliferación muestran hipertrofia nucleolar y un incremento en la biogénesis ribosómica para satisfacer las altas tasas de traducción y síntesis proteica necesarias.

Por otro lado, las células inhiben rápidamente la síntesis de ARNr en respuesta a estrés celular mediante la fosforilación de TIF-IA vía JNK2, lo que produce una recolocación de TIF-IA del nucleolo al nucleoplasma. Otras proteínas también parecen trasladarse al nucleolo en respuesta a estrés, como el eIF4A3 (un componente del complejo de unión de exones) en plantas. Se conjetura que esto tendría lugar evitando que los ARNm unidos a eIF4A3 sean transportados del núcleo al citoplasma. Teniendo en cuenta la interacción de PKP1 con eIF4A1, el cual está estrechamente relacionado con eIF4A3, es muy tentador especular que PKP1 pudiera modular la respuesta a estrés en células de mamífero a través de la interacción con eIF4A3 (Hatzfeld, 2010).

Además, durante la mitosis, PKP1a y b muestran el comportamiento típico de las proteínas cariofílicas, ya que son liberadas tras la ruptura prometafásica de la envuelta nuclear y dispersadas por el citoplasma, aunque rápidamente se vuelven a acumular durante la telofase en el núcleo hijo en formación. También existe acumulación de PKP1 en pequeñas entidades postmitóticas que representan cromosomas individuales o fragmentos de los mismos, rodeados por una envuelta nuclear especial (Schmidt *et al.*, 1997).

Existen también estudios que prueban el importante papel de PKP1 en la estabilidad dependiente de Ca^{2+} de los desmosomas y en la migración.

En relación a lo primero, se ha observado en cultivo que bajas concentraciones de Ca^{2+} ($< 0,1$ mM) provocan la desorganización de las uniones celulares comunes y evitan la formación de nuevas uniones. En el caso de los desmosomas, también se evita la formación de los mismos, pero la desorganización sólo ocurre si no han logrado un estado de madurez conocido como *independencia del calcio*. Los desmosomas pueden lograr este grado de madurez creciendo en láminas confluentes, donde un cambio a bajas concentraciones de calcio desensambla todas las uniones pero mantiene los desmosomas maduros intactos. Este estado de independencia del Ca^{2+} puede ser revertido alterando la monocapa (*wounding*) y parece existir una relación entre la expresión de la proteína quinasa C alfa (PKC α) y la independencia al Ca^{2+} , de modo que se piensa que PKC α es responsable del cambio entre un estado hiper-adhesivo de los tejidos maduros y un estado más dinámico de los epitelios en proceso de remodelación y cicatrización (Bass-Zubek *et al.*, 2009).

Se cree que las PKPs podrían proporcionar un mecanismo de soporte a PKC α , pues se han demostrado ya interacciones entre tal proteína y PKP2, siendo la primera requerida para la asociación con DSP, aunque son necesarios más estudios en este campo.

Líneas celulares deficientes para PKP1 vieron afectada la capacidad de las células para formar desmosomas independientes de Ca^{2+} , mientras que la re-expresión de PKP1 recombinante aceleró la formación de estas estructuras comparado con los controles. Todos estos datos concluyen una pérdida de desmosomas y, por lo tanto, menos desmosomas maduros en células que no expresan PKP1.

En cuanto a la migración de los queratinocitos, se ha observado que los pacientes con alteraciones de PKP1 tienen problemas de cicatrización. Ensayos con monocapas de queratinocitos con diferentes grados de expresión de esta proteína, resultaron en que aquellas células que eran deficientes para PKP1 presentaban un incremento de la migración y que, en lugar de migrar como células aisladas, migraba la monocapa de manera conjunta. Sin embargo, sería interesante analizar el estado de fosforilación de PKP1 bajo ciertas condiciones y la colocalización de las isoformas de PKC en queratinocitos, ya que podrían revelar mecanismos de migración potenciales (South, 2004; South *et al.*, 2003).

Con respecto a un papel de PKP1 independiente de la adhesión, y aunque ya se han descrito funciones de señalización en varias proteínas armadillo como β -catenina (regulación transcripcional), p120 (regulación transcripcional y vía de señalización de Rho) y PKP4 (vía de señalización de Rho), la función de las PKPs en señalización intracelular ha pasado desapercibida a pesar de su conocida localización en núcleo y citoplasma, y su posible papel dual en adhesión y carcinogénesis. En este sentido, cabe destacar que las PKPs se han asociado recientemente con la maquinaria de traducción celular, sugiriendo que pueden desempeñar un papel de regulación postranscripcional y crecimiento celular.

Por un lado, se ha identificado PKP1 (y PKP3) en gránulos de estrés, y por otro, se ha demostrado una asociación directa de PKP1 con el factor de inicio de la traducción eIF4A1; y aunque ambos hallazgos se han comentado brevemente a lo largo de esta introducción, se describen a continuación en detalle para PKP1.

Los gránulos de estrés son agregados citoplasmáticos de complejos preiniciadores de la traducción latentes que se acumulan junto con proteínas de unión a ARN (RBPs, del inglés) durante estrés celular. En ellos se acumula, por tanto, ARNm de manera estable pero sin traducirse. Cuando la célula entra en una situación de estrés, PKP1 (y PKP3) colocaliza en estos gránulos con RBPs tales como PABPC1 (proteína de unión a Poli-A; clave en la regulación de la traducción y estabilidad del ARNm a través del procesamiento del extremo 3' y el impulso de la traducción cap-dependiente; se une también a factores de liberación para finalizar la traducción), FXR1 (Proteína Relacionada con X-frágil; influye en la traducción y estabilidad de los ARNm a los que se une posiblemente a través de *Ago-2*, es un regulador postranscripcional de la expresión de TNF- α , se asocia con microARNs y regula la estabilidad del ARNm de *p21*), G3BP (proteína de unión a ras-GAP-SH3; crucial para la regulación del ciclo celular, desarrollo de vertebrados/invertebrados y ruta de señalización NF κ B) y UPF1 (factor de cambio de pauta de lectura 1; es el factor más importante del NMD o "degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras" que se produce cuando hay codones de parada prematuros y regula la estabilidad de los transcritos; UPF1 interviene en el ciclo celular, la supervisión del genoma y la replicación y homeostasis de telómeros) (Yang *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que tanto PKP1 como PKP3 ejercen funciones similares en procesos de traducción y metabolismo del ARN y, aunque no se han descubierto motivos de unión a ARN, esta asociación podría darse a través de interacciones electrostáticas directas debido a la alta alcalinidad de las PKPs (Hofmann *et al.*, 2006) y su carga positiva.

Por otro lado, PKP1 está involucrada en la regulación de la traducción dependiente del factor de inicio de la traducción eIF4A1. Esto parece estar correlacionado con una función reguladora del tamaño y proliferación celular debido a que eIF4A1 presenta actividad helicasa dependiente de ATP y se cree que desenrolla la estructura secundaria del ARNm en la región 5'UTR, permitiendo a la subunidad ribosómica 40S unirse al ARNm y escanearlo en busca del codón de inicio. Además de la existencia de una interacción directa entre ambos, PKP1 recluta eIF4A1 al complejo de iniciación y estimula su actividad helicasa de una manera dependiente de concentración, incrementando así la traducción hasta el punto de casi duplicarla (Wolf *et al.*, 2010b).

Curiosamente, en ensayos de estrés celular también se encontró eIF4A1 en gránulos de estrés y, además, colocalizó con PKP1.

La sobreexpresión de algunos factores de inicio de la traducción puede promover la transformación y progresión tumoral. Por ello, es tentador especular que la sobreexpresión de PKP1 podría tener un papel tumorigénico. Esta hipótesis se apoya en múltiples estudios en los que hay una elevada expresión o una síntesis *de novo* en algunos tipos de tumor, como carcinoma de cabeza y cuello o sarcoma de Ewing (Wolf *et al.*, 2010b). Existe pues, un equilibrio entre las funciones desmosomales y las citoplasmáticas de PKP1; y tal equilibrio podría estar regulado de diversas formas, entre ellas, mediante rutas de señalización. Una de las rutas que a menudo se halla desregulada en muchos tumores es la vía de señalización factor de crecimiento/AKT2.

En este contexto y como se ha mencionado, se ha postulado recientemente que PKP1, efectivamente, puede estar regulada por rutas de señalización mediadas por factores de crecimiento. Esto se debe a que las cascadas de señalización iniciadas por factores de crecimiento modulan la actividad de los factores de inicio de la traducción mediante el control de la fosforilación de los mismos. Una de las rutas que regulan a PKP1 (pero no al resto de PKPs) es la vía de PI3K/AKT, donde la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) juega un papel clave en las cascadas reguladas por varios receptores, como el de la insulina o el de factores de crecimiento tipo insulina.

En esta vía de señalización, la estimulación por insulina produce fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) activa que convierte el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Las quinasas dependientes de PIP3, PDK1 y AKT/quinasa B, inducen una cascada de quinasas que acaba en la fosforilación de PKP1 en cuatro motivos dentro del dominio cabeza amino-terminal, a través de AKT2. Esto da lugar a una menor adhesión celular producida por una menor afinidad de PKP1 a DSG1, una acumulación de PKP1 en citoplasma debido a una mayor estabilidad y una mayor vida media de la forma fosforilada, y una mayor actividad de PKP1 al estimular la traducción a través de eIF4A1, lo que lleva a mayores tasas de proliferación y crecimiento independiente de anclaje (Wolf *et al.*, 2013).

Una de las piezas clave de esta ruta, AKT, se presenta en tres isoformas: AKT1 que es la dominante; AKT2, que se expresa sobre todo en tejidos sensibles a insulina; y AKT3, que presenta una alta expresión en cerebro y testículos. Por fosforilación de sus dianas, AKT promueve la supervivencia celular, proliferación y crecimiento celular. Curiosamente, ratones con doble *knockout* de AKT1/AKT2 presentan fenotipos sorprendentemente parecidos al de pacientes con *Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel* (EDSFS, del inglés).

Como puede deducirse de toda esta información, la dualidad funcional de PKP1 está en un equilibrio regulado por la señalización de insulina/IGF1. Cuando la ruta PI3K/AKT se activa, la forma fosforilada de PKP1 se acumula en citoplasma y esta localización se correlaciona con una menor adhesión, aunque aumenta la traducción de ARNm, proliferación, migración y crecimiento independiente de anclaje. Así, PKP1 puede contribuir a la carcinogénesis de una manera dependiente de contexto en la que la localización de PKP1 dentro de la célula sería responsable de su función: en ausencia de factores de crecimiento, la forma no fosforilada de PKP1 interaccionaría con DSP y se localizaría en membrana en desmosomas promoviendo la adhesión (papel supresor tumoral); mientras, la forma fosforilada (consecuencia de la

estimulación por factores de crecimiento) se localizaría en citoplasma e induciría la síntesis proteica y proliferación celular (papel oncogénico), a pesar de que aún pueda unirse a desmosomas, pero con menor estabilidad, favoreciendo la remodelación de los mismos (Fig. 16).

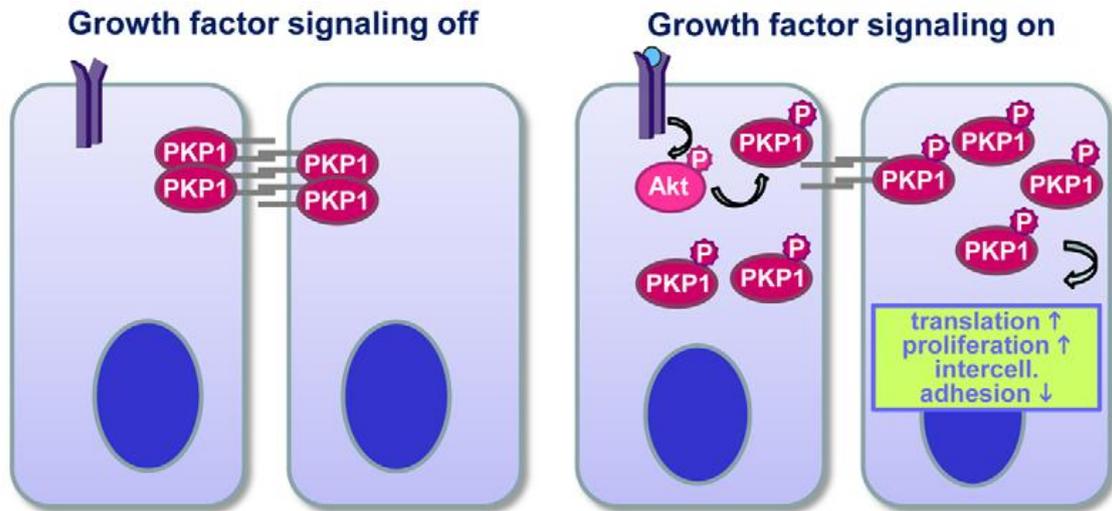


Figura 16. Mecanismo de regulación de la localización subcelular de PKP1. Si la ruta de señalización está inactivada, PKP1 se encuentra desfosforilado ejerciendo su función de adhesión en desmosoma. Si se activa la señal por factores de crecimiento, AKT2 fosforila a PKP1, el cual se desplaza al citoplasma y aumenta la traducción y proliferación celular (Wolf *et al.*, 2013).

Por el contrario, en contextos en los que la ruta PI3K/AKT no está activada, una pérdida de expresión de PKP1 también podría contribuir a disminuir la adhesión celular y, de este modo, induciría la carcinogénesis.

Este escenario es muy parecido al de la regulación de la β -catenina, ya mencionado. Brevemente, la β -catenina apoya el papel supresor tumoral de la E-cadherina, a no ser que se active la ruta de señalización de *Wnt*. En ese caso, la β -catenina se acumula en citoplasma y migra al núcleo, donde estimula junto con LEF/TCF la transcripción de varios genes implicados en control del crecimiento adquiriendo, así, un papel oncogénico (Wolf *et al.*, 2013).

Como también se ha comentado, existen algunas evidencias que sugieren que PKP1 podría, además, ser capaz de modular la organización de la actina, ya que la forma fosforilada de PKP1 da lugar a un fenotipo parecido a aquél producido por la sobreexpresión del dominio armadillo, y que se caracteriza por formar grandes lamelipodios y protrusiones celulares. Esta función reorganizadora de la actina se llevaría a cabo posiblemente a través de la ruta de señalización de Rho (Wolf *et al.*, 2013). El hecho de que PKP1 sea rápidamente degradada por las caspasas durante la apoptosis de queratinocitos apoya también la idea de que PKP1 ejerza tal función remodeladora (Neuber *et al.*, 2010).

2.1.3.1.1.1.2.2.2. PKP1 en enfermedades hereditarias de la piel

En 1997, McGrath describió el primer desorden monogénico hereditario del desmosoma (McGrath *et al.*, 2010) en el que tenía lugar la ablación completa de PKP1 en pacientes con una enfermedad autosómica recesiva rara, el *Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel* (EDSFS, del inglés), (OMIM 604536). Desde entonces, sólo 13 casos en total (Kashyap *et al.*,

2015) han sido descritos hasta la fecha con pérdida total o parcial de PKP1 causadas por mutaciones o *splicing* (procesamientos postranscripcionales de empalme de exones alternativos) aberrante. La mayor proporción de mutaciones (8 de los 13 alelos mutados conocidos) recaen sobre sitios donadores o aceptores de corte y empalme (*splicing*) como el IVS1 (Fig. 17). Debido a los pocos pacientes existentes y la variedad de mutaciones que presentan, la prevalencia de esta enfermedad es desconocida (Abdalla *et al.*, 2014; McGrath *et al.*, 2010; Rietscher *et al.*, 2016; Sprecher *et al.*, 2004).

En general, sólo un 10% de las enfermedades genéticas humanas son causadas por mutaciones en estos sitios. Las consecuencias de este tipo de mutaciones son algo más difíciles de predecir, ya que los sitios donadores o aceptores pueden ser usados en la transcripción de manera que den lugar a la pérdida de exones o a un alargamiento de la lectura (Olivry *et al.*, 2012). Curiosamente, los casos en los que las mutaciones ocurrieron cerca del dominio carboxilo-terminal, dieron lugar a fenotipos más leves lo que sugiere que la proteína truncada es, al menos parcialmente, funcional (Neuber *et al.*, 2010). Sin embargo, individuos con haploinsuficiencia no parecen mostrar ningún desorden clínico, lo cual indica la característica recesiva de la enfermedad.

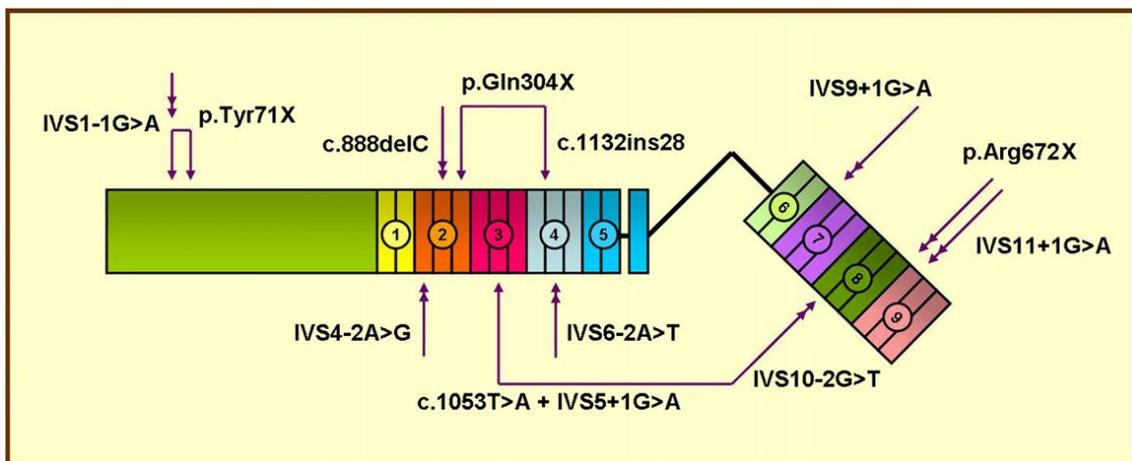


Figura 17. Mutaciones conocidas de PKP1 causantes del *Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel*. Flechas dobles indican mutaciones homocigotas. Flechas unidas muestran mutaciones heterocigotas combinadas. Círculos coloreados y numerados del 1 al 9 hacen referencia a los dominios armadillo de PKP1 (McGrath *et al.*, 2010). La figura no muestra las mutaciones más recientemente descubiertas: c.203-1G>T (Abdalla *et al.*, 2014), c.897del5 (CAACC) (Boyce *et al.*, 2012) y 1233-2A>G (Hernández-Martín *et al.*, 2013).

Los pacientes afectados por esta genodermatosis (Tabla 2), que se ha clasificado como una forma suprabasal de epidermólisis bulbosa simple, presentan fragilidad de la piel con erosiones y ampollas inducidas por traumatismos, especialmente en las plantas de los pies. También es evidente la hiperqueratosis de la piel palmoplantar, esto es, engrosamiento y agrietamiento doloroso de las palmas de las manos y plantas de los pies, lo que en ocasiones les incapacita para andar y necesitan de sillas de ruedas; costras escamosas en tronco y extremidades, quelitis con fisuras periorales, eritema y erosiones perianales, placas escamosas inflamadas en las zonas de flexión y prurito (Fig. 18). La piel afectada muestra alteraciones en la diferenciación normal, aunque no está claro que haya una correlación directa con la pérdida de PKP1. Otros síntomas por los que se caracteriza la enfermedad son hipotricosis o alopecia (incluyendo pestañas y cejas), uñas distróficas y reducción de la sudoración (hipohidrosis). Existen también características no cutáneas entre los pacientes como son: anomalías en el desarrollo ectodérmico produciendo retrasos en el crecimiento y, en algunos casos, infecciones

recurrentes, diarrea crónica, fisuras en la lengua y blefaritis. En todos los casos excepto uno, presentaron síntomas desde el momento del nacimiento, sufriendo eritema generalizado y ampollas por el estrés mecánico sufrido en el parto (Kashyap *et al.*, 2015). Sólo en un caso se observó persistencia del foramen oval (Hatzfeld, 2007; McGrath *et al.*, 2010).

caso	Características clinicopatológicas					mutaciones observadas
	fragilidad de la piel	hiperqueratosis palmoplantar	alopecia	distrofia ungueal	hipohidrosis	
1	si	si	si	si	si	(a) p.Q304X (b) c.1132ins28
2	si	si	si	si	si	(a) p.Y71X (b) IVS1 1G A
3	si	si	si	si	no	IVS6 2A T
4	si	si	si	si	si	IVS11 1G A
5	si	no	si	si	no	IVS4 2A G
6	si	si	si	si	no observado	IVS1 1G A
7	si	si	no	si	no	IVS9 1G A
8	si	si	si	si	no	(a) c.1053T A IVS5 1G A (b) IVS10 2G T
9	si	si	si	si	no	c.888delC
10	si	si	si	si	no observado	p.R672X

Tabla 2. Casos publicados del *Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel* con características clínicas y mutaciones observadas en el gen de PKP1. En los casos de heterocigosidad, las mutaciones de ambos alelos son dados como (a) y (b) (Neuber *et al.*, 2010). La tabla no muestra las mutaciones más recientemente descubiertas: c.203-1G>T (Abdalla *et al.*, 2014), c.897del5 (CAACC) (Boyce *et al.*, 2012) y 1233-2A>G (Hernández-Martín *et al.*, 2013)

Biopsias de la piel muestran acantosis, acantolisis y un menor número de desmosomas pequeños y malformados. Se cree que esta pérdida de expresión de PKP1 podría ser contrarrestada o compensada hasta cierto punto por el resto de las PKPs, aunque ni PKP2, ni PKP3 ni otras proteínas del desmosoma se han visto sobreexpresados como sustitutos de PKP1 en células cultivadas de estos pacientes (Schmidt *et al.*, 2005). Por lo general, la expresión de las otras proteínas del desmosoma fue normal, aunque en algunos casos hubo redistribución en los patrones de tinción. Concretamente, el marcaje de DSP se hizo más citoplasmático y fue menos patente en membrana (McGrath *et al.*, 2010). Además, hubo agregación de los filamentos de queratina, que aparecieron separados de las placas internas de los desmosomas y con una localización más perinuclear (McGrath *et al.*, 2010; Olivry *et al.*, 2012; South, 2004). Existen evidencias que sugieren que es la alteración en la distribución de DSP la que explica la agregación de la queratina, más que la posible pérdida de sitios de unión PKP1-queratina en epidermis que no expresan PKP1 (South, 2004). Se cree que todas estas lesiones pueden ser consecuencia de la pérdida de integridad y debilitamiento de los desmosomas, dando lugar a menor número de sitios de unión para la desmoplaquina y los filamentos intermedios aunque, al contrario que en otros desórdenes hereditarios del desmosoma, no hay patología cardíaca al no expresarse PKP1 en el corazón, como ya se ha explicado (McGrath *et al.*, 2010; South, 2004; Whittock *et al.*, 2000).

Sin embargo, la presencia de epidermis intacta, aunque algo frágil, apoya el concepto de que PKP1 es una proteína accesoria del desmosoma, pues los desmosomas se siguen formando e incluso en algunas regiones parecen inalterados, y la epidermis muestra aún adhesión celular en ausencia de PKP1, aunque obviamente se halla comprometida (South, 2004). En tales tejidos, este hecho sí podría reflejar una compensación llevada a cabo por PKPs adicionales u otros componentes de la placa del desmosoma para limitar la alteración de los desmosomas (Whittock *et al.*, 2000).



Figura 18. Pacientes afectados por el *Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel* (McGrath *et al.*, 2010; South, 2004).

Aún estamos lejos de comprender totalmente el papel de las proteínas del desmosoma en las enfermedades humanas. Aunque es clara que la pérdida completa de estas proteínas da lugar a graves fenotipos, no está claro si más cambios en la expresión génica del desmosoma contribuyen al desarrollo de enfermedad. Por ejemplo, se han observado tanto incrementos como descensos de la expresión de estos genes en cánceres humanos. Desarrollar modelos animales experimentales apropiados será crucial en estos casos para establecer una relación causal entre estos cambios de expresión y el desarrollo y progresión del tumor, pues aunque se ha descrito este síndrome en ganado bovino, en búfalos y en perros de la raza Retriever de Chesapeake, no es suficiente puesto que son modelos espontáneos y muy escasos (Olivry *et al.*, 2012). Cabe destacar por otro lado que anomalías del desmosoma pueden estar presentes en síndromes y afectaciones de la piel debidas a defectos principales en reguladores de los genes del desmosoma. Hasta ahora, pocos de estos reguladores han sido identificados pero será necesaria su futura caracterización para facilitar una mayor comprensión de los distintos desórdenes de fragilidad de la piel (Koster *et al.*, 2014).

El *Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel* no tiene cura y el tratamiento de esta enfermedad se basa en la prevención y tratamiento de los síntomas, tratando de evitar la formación de ampollas, evitando y tratando las infecciones y facilitando la cicatrización. El tratamiento de la hiperqueratosis incluye emolientes, queratolíticos (p. ej., ácido salicílico al 6% en propilenglicol al 70%), retinoides tópicos, pomadas de vitamina D tópica y retinoides sistémicos.

2.1.3.1.1.1.2.3. Papel de las placofilinas en el cáncer

Existe una amplia bibliografía que relaciona alteraciones de p120-catenina con la progresión tumoral, ya sea por la pérdida resultante de E-cadherina o por defectos en la transducción de señales. Aunque en comparación, poco es sabido del papel de las PKPs en cáncer, existen cada vez más evidencias de que cambios de expresión de estas proteínas pueden contribuir a la carcinogénesis pues la pérdida de adhesión celular contribuye a la progresión tumoral y, de acuerdo a esto, se ha encontrado en algunos tumores una pérdida de expresión. Específicamente, un descenso en la expresión de PKP1 y 3 ha sido correlacionado con

inestabilidad del desmosoma, menor adhesión celular, un aumento de la migración y peor pronóstico en los pacientes.

Sin embargo, sorprendentemente se ha detectado una sobreexpresión de PKP1 y 3 en otros tumores como los de cabeza y cuello, AC de pulmón, carcinoma de próstata y sarcoma de Ewing (Wolf *et al.*, 2010a). Concretamente, se ha observado una sobreexpresión de PKP1 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello. En otros estudios, PKP2 se halló expresada en todos los adenocarcinomas testados, aunque presentaba tinciones inmunohistológicas variables y heterogéneas en los carcinomas escamosos. Se cree que altos niveles de expresión de PKP2 median la progresión tumoral en cáncer de próstata, colorrectal, pancreático y orofaríngeo; sin embargo, no se ha observado un efecto supresor tumoral de PKP2 en ningún tipo de célula tumoral (Takahashi *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha observado que PKP3 puede funcionar como oncogén y podría servir como marcador pronóstico y diana terapéutica del cáncer del pulmón (Furukawa *et al.*, 2005). Así pues, se encontraron altos niveles de PKP3 en la mayoría de muestras de NSCLC analizadas sugiriendo que es un hecho relevante en la carcinogénesis pulmonar. Además, estos niveles se correlacionaban con un peor pronóstico, con el estadio de la enfermedad y la afectación ganglionar. La disminución de tales niveles a través de técnicas como el uso de ARNip (ARNs pequeños interferentes, más conocidos por sus siglas en inglés *siRNAs*) suprimió el crecimiento celular, mientras que la sobreexpresión promovió el crecimiento y la motilidad *in vitro*, además de asociarse con una peor supervivencia en pacientes con AC de pulmón.

Estos hallazgos están apoyados por otros estudios en cáncer de mama (Demirag *et al.*, 2012) y varios perfiles de expresión de la base de datos GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) indicando que la sobreexpresión de PKPs en tumores es un evento bastante común, aunque no consistentemente observado (Wolf *et al.*, 2010a).

Recientes observaciones sugieren además que las PKPs pueden estar involucradas en la *transición epitelio-mesénquima* (del inglés, EMT), la cual tiene especial relevancia en la metástasis de células tumorales. Concretamente, la expresión de PKP3 parece ser reprimida por el factor de transcripción ZEB-1 (factor de transcripción de dedos de zinc y unión a cajas-E homeobox-1), un potente represor de la expresión de E-cadherina que está también implicado en EMT al menos en cáncer de mama. Observaciones similares se han encontrado para PKP2 y ZEB-2 en cáncer de colon (Neuber *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2012).

La redistribución de las PKPs del desmosoma al núcleo se cree que también puede contribuir a la carcinogénesis. Esta localización nuclear dependiente de contexto sugiere que las PKPs podrían modular la expresión génica, algo que ya se ha demostrado con PKP2, la cual puede interactuar con β -catenina y puede potenciar la actividad transcripcional endógena de β -catenina-LEF/TCF (Dusek *et al.*, 2011).

Por otro lado, el incremento en la síntesis de proteínas es esencial para el crecimiento y proliferación celular, por lo que alteraciones en este proceso son también un evento frecuente en cáncer y suelen ocurrir por activación mutacional de rutas de señalización claves. En cultivo celular, la activación de la traducción cap-dependiente es suficiente para transformar fibroblastos en células tumorales. Y en el caso de ratones transgénicos, la expresión ectópica de eIF4E aumentó la incidencia de varios tipos de cáncer, incluyendo linfomas, hepatomas, angiosarcomas y AC de pulmón. Algunos estudios hablan de una sobreexpresión de eIF4E en casi el 100% de los tumores de cabeza y cuello y mama, y altos niveles de expresión correlacionan con un peor pronóstico. Esta activación de eIF4E en cáncer puede ser debida a varios mecanismos incluyendo amplificación génica, desregulación transcripcional, alteraciones en la estabilidad del ARNm y liberación del factor eIF4E de sus proteínas de unión (4E-BPs). La

inactivación de las 4E-BPs ocurre como resultado de la activación de la ruta PI3K/AKT/mTOR, la cual está frecuentemente sobreexpresada en diversos cánceres humanos.

Cabe destacar que la sobreexpresión de eIF4E conlleva, además del aumento de la síntesis proteica, cambios en el proteoma; y esto se debe a diferencias en la longitud y estructura de las 5'UTRs (del inglés, regiones 5' no codificantes), lo que da lugar a diferentes eficiencias en la traducción de ARNm. Los ARNm más sensibles a alteraciones en la disponibilidad del factor eIF4E suelen tener regiones 5'UTR largas y muy estructuradas, lo que requiere que sean desenrolladas por el complejo eIF4F. Estos ARNm se traducen poco en condiciones normales, donde eIF4F es limitante. Por otro lado, la mayoría de los ARNm tienen regiones 5'UTR cortas y poco estructuradas y, por lo tanto, se ven poco afectados por alteraciones del complejo. No es de extrañar entonces, que proteínas que son importantes para el crecimiento o supervivencia, que están involucradas en malignidad o son cruciales para el ciclo celular, suelen mostrar ARNm con regiones 5'UTRs altamente estructuradas (p. ej., c-myc, VEGF, survivina, etc...). La traducción de estos ARNm está desproporcionalmente incrementada en presencia de altos niveles de eIF4E. El incremento de eIF4E también promueve el transporte núcleo-citoplasmático de ARNm que codifican potentes proteínas reguladoras del crecimiento, como la ciclina D1 (Wolf *et al.*, 2010a).

Teniendo en cuenta la localización citoplasmática y el papel de PKP1 en el incremento de la proliferación a través de su interacción con eIF4A1 en la traducción dependiente de eIF4F mencionada en secciones anteriores, y dada la importancia de la traducción del ARNm y la síntesis proteica en el desarrollo del cáncer, se especula que la sobreexpresión de PKP1 (y de PKP3, pues también contribuye al crecimiento celular y se localiza en el citoplasma) podría contribuir a la formación del tumor. Este papel oncogénico está apoyado por la redistribución de las PKPs de la membrana al citoplasma durante el desarrollo tumoral (Dusek *et al.*, 2011). De este modo, la función de las PKPs en carcinogénesis tendría lugar por dos vías: mientras un incremento de PKP podría contribuir a la progresión del cáncer mediante el incremento de la traducción y la proliferación, la pérdida de PKP también contribuiría a la carcinogénesis y/o metástasis, pues daría lugar a la pérdida de la inhibición por contacto y a un incremento de la motilidad (Wolf *et al.*, 2010a; Wolf *et al.*, 2013).

Surge así una gran contradicción, pues mientras la pérdida de expresión de PKPs en tumores es consistente con la idea de las PKPs como importantes mediadores de la adhesión celular, la sobreexpresión de las mismas en tumores no es tan fácilmente compatible con esta visión: un incremento en el número y tamaño de los desmosomas incrementaría la adhesión celular, promovería la diferenciación epitelial y prevendría el crecimiento celular independiente de contacto y la metástasis. En este contexto, las PKPs funcionarían como supresores tumorales. Por otro lado, el papel de PKP1 y 3 en el incremento de la traducción y la proliferación explicaría cómo la sobreexpresión de las PKPs contribuye a la carcinogénesis.

Una de las soluciones a esta contradicción es que las PKPs tendrían un papel dual, como se ha comentado, pero dependiendo del contexto. Así, en los desmosomas jugarían una función estructural y un papel de protección frente al cáncer, y en el citoplasma (y posiblemente en el núcleo) estimularían la proliferación como un oncogén: por un lado, liberarían componentes con potencial oncogénico y, por otro, activarían rutas de señalización implicadas en el desarrollo tumoral (Dusek *et al.*, 2011). Este modelo (Fig. 19) predice que la localización de las PKPs es uno de los factores clave que determinan si cumplen una función supresora tumoral u oncogénica (Wolf *et al.*, 2010a), y tal localización podría depender del estado de fosforilación.

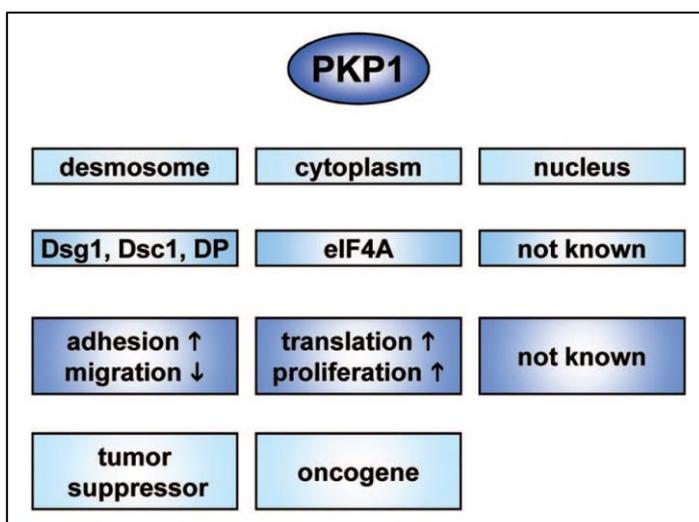


Figura 19. Resumen de la localización, función y proteínas con las que interactúa PKP1 (Wolf *et al.*, 2010a).

Debido a que los niveles de PKP, como ocurre con otras muchas proteínas involucradas en el contacto celular, se encuentran regulados a nivel postranscripcional mediante el control de la estabilidad de proteínas, se explica que en ensayos de expresión génica realizados en células tumorales no se hayan podido detectar cambios a nivel de proteína (Hatzfeld, 2007). Sin embargo, y a pesar de que la fracción citoplasmática soluble puede perderse en la preparación de las muestras, algunos estudios que analizan la localización de las PKPs en tejidos tumorales apoyan la hipótesis de un papel dual de las PKPs dependiendo del contexto (Wolf *et al.*, 2010a).

Así pues, se cree que los mecanismos reguladores que pueden alterar el equilibrio entre el papel estructural en los contactos celulares y las funciones nucleares o citoplasmáticas de las PKPs podría contribuir a la tumorigénesis (Hatzfeld, 2007). No obstante, se necesitan más estudios para elucidar si las PKPs participan también en la transducción de señales, promovidas por estímulos ambientales, a través de la regulación de la transcripción o del metabolismo del ARN, y cómo esto se correlaciona con sus funciones desmosomales. La identificación de nuevas interacciones entre las PKPs y las moléculas de señalización prometen desvelar las redes de señalización asociadas a estas proteínas (Hatzfeld, 2007).

2.1.3.1.1.1.3. Desmoplaquina

Pertenciente a la familia de las *plaquinas* y conocida por su abreviatura DSP, es el componente más abundante del desmosoma y actúa como nexo entre los filamentos intermedios y la membrana plasmática, por medio de la unión a la red citoplasmática y su conexión con los filamentos intermedios, microtúbulos y filamentos de actina. El dominio globular amino-terminal interacciona con placoglobina y placofilinas, y de este modo se ensambla al desmosoma. El extremo carboxilo-terminal, también globular, contiene tres dominios plaquina repetidos, así como otro rico en glicina-serina-arginina, a través de los cuales se asocia con los filamentos intermedios (Fig. 20).

Presenta dos isoformas (I y II) que difieren en la longitud del dominio *Rod* central, siendo en la isoforma II, dos tercios de la longitud de la isoforma I. Las distintas isoformas son consecuencia de procesamientos postranscripcionales de empalme de exones alternativos (*splicing*) y ambas están ampliamente expresadas en diversos tejidos, aunque la desmoplaquina II destaca por su ausencia en tejidos cardiacos y su baja expresión en epitelios simples.

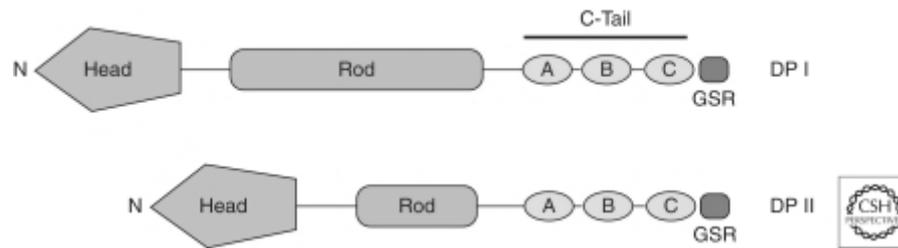


Figura 20. Esquema de la desmoplaquina (DP) que muestra los diferentes dominios que conforman las dos isoformas, DP I y DP II. Ambas difieren en la longitud del dominio central *Rod*. El dominio carboxilo-terminal contiene 3 dominios de repetición plaquina (A, B y C), así como un dominio rico en glicina-serina-arginina (GSR) el cual se piensa que regula la unión de la desmoplaquina a los filamentos intermedios. El dominio cabeza globular amino-terminal (Head) media las interacciones proteína-proteína (Delva *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2000).

La pérdida de DSP resulta en una desorganización de la actina en la periferia celular, lo cual prueba que la desmoplaquina tiene un papel destacado en la intercomunicación entre desmosomas y zonula adherens durante la formación de la capa epitelial (Delva *et al.*, 2009).

La importancia de la DSP en la estructura y función del desmosoma, y en la morfogénesis tisular, se pone de manifiesto gracias al estudio de modelos animales que muestran que su carencia provoca letalidad embrionaria y que es fundamental en el desarrollo de la epidermis y la diferenciación de queratinocitos, neuroepitelio, corazón y vasos sanguíneos (Delva *et al.*, 2009; Koster *et al.*, 2014). También existen una serie de desórdenes genéticos humanos asociados a mutaciones en la desmoplaquina, como el queratoderma palmoplantar estriado, queratoderma severo, fragilidad de la piel, alopecia, epidermólisis acantolítica bullosa, pérdida de uñas, dentición neonatal e incluso, letalidad, según la severidad de las mutaciones.

2.1.3.1.1.4. Filamentos Intermedios

Los filamentos intermedios son componentes fundamentales del citoesqueleto y conforman una red de proteínas auto-ensamblables, versátiles y regulables, que proporcionan gran resistencia a las tensiones mecánicas. Se denominan *intermedios* porque su diámetro es de aproximadamente 8 a 10 nm, lo que se encuentra entre los de los filamentos de actina (7 a 8 nm) y los microtúbulos (25 nm). A diferencia de estos filamentos de actina y microtúbulos, los filamentos intermedios no están directamente involucrados en el movimiento celular, sino que parecen jugar un papel meramente estructural.

Además, están compuestos por una amplia variedad de proteínas que se expresan en distintos tipos de células. Más de 70 proteínas diferentes se han identificado y clasificado en 6 grupos en base a la similitud de sus secuencias de aminoácidos (Cooper, 2000).

Según algunos indicios, muchas de las proteínas estructurales estables de los filamentos intermedios evolucionaron a partir de enzimas muy conservadas, solamente con modificaciones genéticas menores.

Los filamentos intermedios se pueden clasificar de la siguiente forma:

- **Tipo I:** se trata de un grupo de *queratinas* ácidas conformado por unas 15 proteínas diferentes, las cuales se expresan en las células epiteliales.

- **Tipo II:** al igual que el grupo I, se trata de un grupo de *queratinas* (aunque esta vez son neutras o básicas) conformado también por unas 15 proteínas diferentes, las cuales también se expresan en las células epiteliales. Cada tipo de célula epitelial sintetiza al menos una queratina del tipo I y otra del tipo II, las cuales co-polimerizan para formar filamentos. Algunas queratinas del grupo I y II se denominan *duras* y forman parte de estructuras como pelo, uñas y cuernos. Otras queratinas del grupo I y II se denominan *blandas* y son abundantes en el citoplasma de células epiteliales, expresando distintas queratinas según el tipo celular.

- **Tipo III:** este grupo incluye la *vimentina*, la cual se encuentra en diversos tipos celulares como fibroblastos, fibras de músculo liso y linfocitos. También se incluye en este grupo la *desmina*, específica de células musculares donde conecta los discos Z de elementos contráctiles individuales. También forman parte de este grupo el *factor glial fibrilar ácido* cuya expresión se restringe a células de la glia, y una cuarta denominada *periferina* que se haya en las neuronas del sistema nervioso periférico.

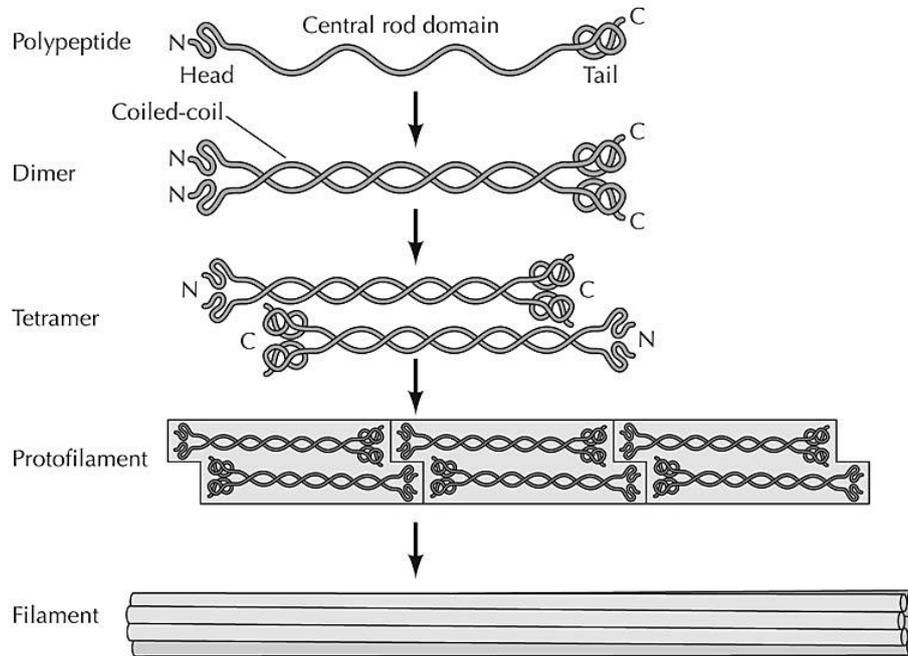
- **Tipo IV:** destacan los *neurofilamentos* que se clasifican por sus siglas en inglés según su peso molecular en H (pesados), M (medios) y L (ligeros). Forman los filamentos intermedios principales de muchos tipos de neuronas maduras. Son particularmente abundantes en los axones de neuronas motoras y se cree que juegan un importante papel de soporte de estas largas y finas estructuras que pueden extenderse en más de un metro de longitud. Otra proteína destacada de este grupo es la *α -internexina*, la cual se expresa en una etapa más temprana del desarrollo neuronal.

- **Tipo V:** lo constituyen las *láminas nucleares*, presentes en la mayoría de las células eucariotas. Más que formar parte del citoesqueleto, son componentes de la envuelta nuclear, formando un soporte filamentoso en forma de red a la capa interna. Son imprescindibles para la reestructuración de la envuelta tras la división celular. Ejercen también influencia sobre la expresión génica a través de su participación en la organización de la cromatina, la regulación de la transcripción de determinados genes y la transmisión de señales reguladoras de los procesos anteriores.

- **Tipo VI:** la única proteína que se incluye en este grupo es la *nestina*, que se expresa en una etapa incluso más temprana aún del desarrollo neuronal que las proteínas del tipo IV, pues se encuentra en las células madres del sistema nervioso central (Cooper, 2000).

A pesar de la amplia diversidad de proteínas que conforman los filamentos intermedios, todas ellas comparten una organización estructural común. Estas proteínas, a diferencia de la actina y tubulina, que son globulares, están conformadas por monómeros fibrosos muy largos, los cuales contienen tres dominios diferentes: un dominio hélice- α central a modo de varilla (o bastoniforme) flanqueado por dominios cabeza (amino-terminal) y cola (carboxilo-terminal) intrínsecamente desorganizados o globulares. Estos dominios flanqueantes globulares difieren en longitud y secuencia de aminoácidos entre los 70 genes diferentes de filamentos intermedios humanos, mostrando una considerable diversidad y especificidad histológica de estas proteínas. Recientes investigaciones han puesto de manifiesto la importancia funcional de tales dominios globulares en las interacciones proteína-proteína, el ensamblaje supramolecular y la organización a escala macroscópica (Kornreich *et al.*, 2015).

Por otro lado, el dominio central se caracteriza por mantener largos tándems repetidos de secuencias de aminoácidos distintas, que reciben el nombre de repeticiones en heptada. Las heptadas están interrumpidas por pequeñas secuencias conectoras (L1, L12 and L2), lo cual da lugar a 4 segmentos en la hélice- α : 1A y 1B que comprenden el “bucle 1”, y 2A y 2B que comprenden el “bucle 2” (Chang *et al.*, 2004). Esta heptada o secuencia de 7 aminoácidos permite la formación de dímeros enroscados entre sí en dos hélices- α paralelas.



THE CELL, Fourth Edition, Figure 12.37 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Figura 21. Esquema del ensamblaje de los filamentos intermedios (Cooper *et al.*, 2007).

En la siguiente etapa del ensamblaje, dos dímeros enrollados interactúan antiparalelamente formando un tetrámero escalonado (Fig. 21). Se encuentran pequeñas cantidades de tetrámeros solubles en las células, lo cual surge de que la subunidad tetramérica constituye la unidad fundamental para el ensamblaje de filamentos intermedios. El tetrámero y por consiguiente, el filamento que forma, es una estructura apolar (a diferencia de los filamentos de actina y los microtúbulos), esto es, es la misma estructura en ambos extremos y simétrica en toda su longitud. Cada tetrámero, como unidad individual, se alinea a lo largo del eje del filamento para formar protofilamentos. Los extremos de los tetrámeros se unen para formar los extremos libres del filamento. El filamento intermedio final contiene aproximadamente ocho protofilamentos enroscados entre ellos formando una estructura similar a una cuerda (Ross *et al.*, 2007).

El ensamblaje de los filamentos requiere interacciones entre tipos de proteínas de filamentos intermedios específicas. Por ejemplo, los filamentos de queratina requieren siempre heterodímeros formados por un polipéptido del tipo I y otro del tipo II. Por otro lado, las proteínas del tipo III pueden formar filamentos con un único tipo de polipéptido (p. ej., vimentina) o con dos proteínas tipo III diferentes (p. ej., vimentina más desmina). Sin embargo, no pueden formar co-polímeros con las queratinas. Con respecto a las proteínas del tipo IV, la α -internexina puede ensamblarse consigo misma, mientras que los tres neurofilamentos co-polymerizan para dar lugar a heterodímeros (Cooper, 2000).

En las células epiteliales, los filamentos intermedios se unen fuertemente a la membrana plasmática en dos áreas de contacto celular especializadas: los desmosomas y los hemidesmosomas. En el caso de los desmosomas, los filamentos de queratina se unen a la

desmoplaquina. En el caso de los hemidesmosomas, se unen a las integrinas a través de miembros de la familia de las plaquinas (Cooper, 2000).

Además, en el citoplasma de la mayoría de las células conforman una elaborada red, que se extiende desde un anillo que circunda el núcleo a la membrana plasmática. Tanto los filamentos de queratina como los de vimentina, se anclan a la envoltura nuclear para posicionar y anclar el núcleo a su localización. También pueden asociarse a otros elementos del citoesqueleto como los filamentos de actina y los microtúbulos sirviendo así de soporte a éstos y estructurando la célula internamente.

Por regla general, los filamentos intermedios son más estables que los filamentos de actina y los microtúbulos, y no muestran el comportamiento dinámico asociado a estos otros componentes del citoesqueleto sino que parecen jugar un papel principalmente estructural. Se ha observado que algunos cultivos celulares no producen proteínas de los filamentos intermedios, indicando que no son necesarias ni para el crecimiento, ni para la migración celular *in vitro*. Se cree que tales filamentos simplemente fortalecen el citoesqueleto en tejidos que están sometidos a estrés mecánico, algo que no ocurre en el controlado ambiente de los platos de cultivo. Pero no fue hasta 1991, cuando Elaine Fuchs obtuvo evidencias experimentales de tal función en ratones transgénicos *in vivo*, los cuales sí desarrollaron graves enfermedades de la piel, caracterizadas por una fragilidad anormal de las células epidérmicas, tras expresar queratinas alteradas. El posterior análisis molecular de enfermedades genéticas humanas verificó dichas conclusiones.

Sin embargo, los filamentos intermedios pueden soportar una fuerte reorganización en el citoplasma durante la mitosis como respuesta a señales extracelulares. Esto es llevado a cabo gracias a la fosforilación, a través de la cual se puede regular el ensamblaje y desorganización intracelular. Un ejemplo de esto es la fosforilación de las láminas nucleares, lo que da lugar a la disgregación de la lámina nuclear y la consiguiente rotura de la envoltura nuclear durante la división celular. También se ha observado que la fosforilación de la vimentina produce una reorganización en las células en división.

La alta heterogeneidad de queratinas resulta clínicamente muy útil para el diagnóstico de los carcinomas, pues sirve para determinar el tejido epitelial original gracias a la expresión específica de las queratinas.

Las queratinas también se relacionan con enfermedades como la demencia senil o el Alzheimer. Ésta última, se caracteriza por cambios patológicos en el tejido cerebral donde se encuentran alterados los neurofilamentos, implicando una degeneración neuronal en los pacientes que podría ser hereditaria. En estos casos, existen datos que sugieren que los factores hereditarios se encuentran en el cromosoma 21.

Por otro lado, alteraciones de los neurofilamentos parecen estar relacionados también con patologías de las neuronas motoras como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Cooper, 2000).

2.1.3.1.1.1.5. Otras proteínas del desmosoma

Una proteína clave del desmosoma, que se ha identificado por el grave fenotipo que causa la pérdida de su función, el cual causa ampollas en epidermis y otros epitelios estratificados en modelos murinos produciendo incluso muerte perinatal, es el efector de apoptosis de *p53* relacionado a PMP-22 (PERP). PERP es una proteína transmembrana multipaso (de cuatro “pasos”) que es transcripcionalmente activada por el supresor tumoral *p53* durante

la apoptosis inducida por daño en el ADN, y por el factor de transcripción relacionado *p63*, durante el desarrollo de epitelios estratificados.

Aunque PERP se ha localizado de manera inequívoca en los desmosomas de epitelios estratificados, siendo crucial para el ensamblaje de tales estructuras, aún se desconocen los compañeros de interacción dentro del desmosoma. La importancia de PERP es que establece una conexión entre la familia *p53* de reguladores transcripcionales y la adhesión célula-célula, lo que es corroborado por la activación que ejerce *p63* sobre varios componentes de adhesión en células de epitelio mamario. De este modo PERP, como diana tanto de *p53*, el cual está inactivado en al menos el 50% de todos los cánceres humanos; como de *p63*, el cual es un importante supresor tumoral en contextos específicos, es potencialmente un mediador clave de la supresión tumoral aguas abajo de estos factores de transcripción (Dusek *et al.*, 2011).

2.1.3.2. Uniones comunicantes

Las **uniones comunicantes**, o tipo *gap*, son canales intercelulares que permiten el transporte de iones y pequeñas moléculas de alrededor de 1000 Da entre capas adyacentes. Se conforma de dos hemicanales (oligómeros de 6 proteínas transmembrana llamadas **conexinas**) que se unen para formar complejos embebidos en la membrana llamados **conexones**, y se insertan en lugares de contigüidad celular, alineándose con precisión con los de la célula adyacente para formar pares de conexones con delicados canales acuosos, los cuales permiten a las células de un tejido comunicarse entre sí (Fig. 22). Este par de conexones es una unidad estructural y funcional, pero una unión comunicante puede estar formada por unos pocos pares de conexones o por miles de ellos, y pueden existir a su vez muchas uniones comunicantes en la superficie de una célula (Henrikson *et al.*, 1997). Este tipo de unión requiere un acercamiento de las membranas contiguas, reduciendo el espacio intercelular a 2 nm, en lugar de los habituales 25 nm, aunque las membranas plasmáticas no llegan a estar fusionadas, sino que se hallan separadas por espacios intermoleculares estrechos.

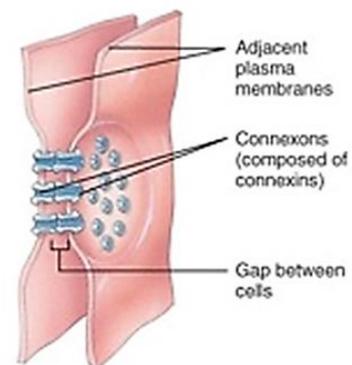


Figura 22. Esquema de las uniones *gap* (Tortora *et al.*, 2008).

Son estructuras dinámicas que se abren y se cierran. La disminución del pH, el aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y algunos estímulos fisiológicos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), cierran la unión de la comunicación.

Cuando el canal se abre, posibilita el intercambio directo de iones y moléculas de un citoplasma a otro, permitiendo un acoplamiento químico y eléctrico entre las células (Ross *et al.*, 2007). Es por ello que las uniones comunicantes son importantes en la coordinación de células que se activan por impulsos eléctricos y en su influencia sobre otras células, facilitando la existencia de sinapsis eléctricas en las que el potencial de acción se transmite directamente, sin necesidad de mensajeros químicos en el espacio sináptico; o en las contracciones sincronizadas del músculo cardíaco, las cuales se consiguen mediante el flujo de iones. Se pueden encontrar también en tejidos avasculares como el cristalino y la córnea del ojo, donde están relacionados con la nutrición de células alejadas de los vasos sanguíneos.

Ensayos funcionales han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre los desmosomas y las uniones *gap*. Esto cobra especial importancia en miocardio, pues sugiere una conexión mecánica entre desmosomas anormales y arritmias. Una de las causas de deficiencias en los desmosomas de los cardiomiocitos son las mutaciones en PKP2. La remodelación de las uniones *gap* en respuesta a una alteración o deficiencia en los desmosomas cardiacos podría jugar un papel esencial en la génesis de dichas arritmias (Wolf *et al.*, 2010a).

2.1.3.3. Hemidesmosoma

Se trata de una variante de unión adherente focal, similar al desmosoma, que se encuentra en ciertos epitelios sometidos a estrés mecánico de cizallamiento y abrasión, que tenderían a separar las células epiteliales del tejido conjuntivo subyacente. Es característico de la córnea, piel y mucosa oral, esofágica y vaginal.

Tienen una localización subcelular basal, otorgando una mayor adhesión a la matriz extracelular que conforma la lámina basal. Está constituido de una **placa de adhesión intracelular** de composición similar a la del desmosoma, con proteínas similares a la desmoplaquina, en la cara citoplasmática de la membrana celular basal (Fig. 23). En este caso también son capaces de fijar los filamentos intermedios del citoesqueleto; sin embargo, las proteínas transmembrana son diferentes a las del desmosoma y pertenecen a la clase de receptores de matriz extracelular llamados *integrinas* (Ross *et al.*, 2007). Dichas integrinas se unen mediante su dominio extracelular a proteínas de la lámina basal y con filamentos intermedios de queratina, con ayuda de su región intracelular.

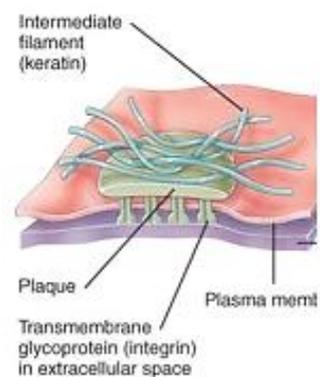


Figura 23. Esquema del Hemidesmosoma (Tortora *et al.*, 2008).

2.1.3.4. Adhesiones focales

Las **adhesiones focales** son un tipo de unión adherente que se caracteriza por ser grandes ensamblajes moleculares capaces de vincular estructuralmente el citoesqueleto de actina y las proteínas de la matriz extracelular que conforma la lámina basal, y son fundamentales en los cambios dinámicos de las células epiteliales tal como la migración celular en los procesos de reparación de heridas, aunque se encuentran también en células no epiteliales. Son capaces también de percibir fuerzas mecánicas y transmitir las como señales regulatorias bioquímicas (lo que se conoce como mecano-sensibilidad) desde la matriz extracelular a la célula interactuante, afectando al comportamiento celular a través de la migración, diferenciación y proliferación (Ross *et al.*, 2007).

Poseen una región citoplasmática a la que se unen filamentos de actina, una región transmembrana de conexión (principalmente integrinas) y una región extracelular que se une a las glucoproteínas de la matriz extracelular (generalmente laminina y fibronectina) (Fig. 24). Sin embargo, están compuestas por más y diversos componentes, incluyendo moléculas estructurales, GTPasas y enzimas como quinasas, fosfatasas, proteasas y lipasas, lo cual sugiere

una amplia diversidad funcional aunque existen diferentes tipos de adhesiones focales según la localización subcelular, tamaño y composición (Wozniak *et al.*, 2004).

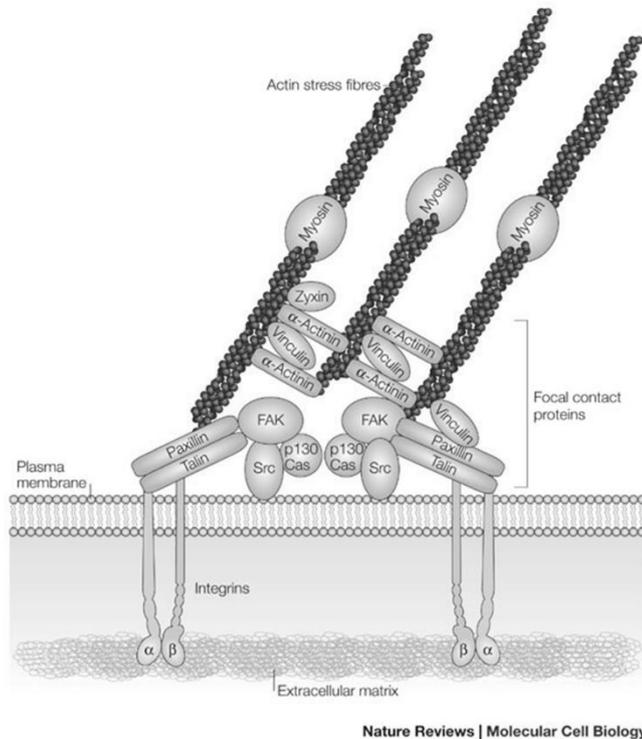


Figura 24. Esquema de adhesión focal (Mitra *et al.*, 2005).

2.1.4. Uniones intercelulares como supresores tumorales

La mayor parte de las moléculas estudiadas en el cáncer de pulmón son resultado de la expresión de determinados oncogenes o genes supresores. El avance de las nuevas tecnologías de biología molecular, particularmente de los *microarrays*, nos da la oportunidad de analizar los perfiles de expresión de gran cantidad de genes a la vez. De este modo, se ha observado la tremenda complejidad que subyace el desarrollo del cáncer, no existiendo un perfil de expresión homogéneo o, lo que es lo mismo, no hay un único gen o combinación de genes que esté inhibido o sobreexpresado en un tipo concreto de cáncer.

No obstante, el análisis de esta gran cantidad de información contribuye a agrupar los distintos cánceres según los patrones de expresión y su correlación con la supervivencia. El avance de ésta y otras técnicas podría servir para establecer clasificaciones nuevas con relevancia terapéutica y pronóstica (Sánchez de Cos Escuín *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que más del 90% de los cánceres humanos son de origen epitelial (Dusek *et al.*, 2011), la formación, maduración y homeostasis del epitelio requiere de programas de proliferación, adhesión, polaridad, migración y diferenciación celular cuidadosamente coreografiados. Las uniones adherentes, tales como zonula adherens y desmosomas, son vitales para la estructura de estos epitelios ya que además de su papel estructural se piensa que cada una regula la estabilidad de la otra y, además, ejercen de reguladores cruciales de procesos como morfogénesis, diferenciación y cicatrización.

Por tanto, aunque experimentos en ratones han subrayado la importancia de la zonula adherens en la homeostasis y función tisular epitelial, es la regulación dinámica de estas

estructuras la que promueve la plasticidad y reorganización tisular durante procesos como la *transición epitelio-mesénquima*, cicatrización, progresión tumoral y metástasis.

Además, está bien establecido que la adhesión intercelular basada en la E-cadherina se pierde durante la progresión tumoral de muchos tipos de cáncer humanos de manera que existe una correlación inversa entre los niveles de E-cadherina y el grado histológico de los tumores y, tanto la inhibición de E-cadherina como de p120, se asocian con un peor pronóstico. Esta pérdida de expresión de E-cadherina viene acompañada de una serie de alteraciones en la fisiología y morfología celular, definidas como *transición epitelio-mesénquima* (del inglés, EMT), que la mayoría de autores consideran necesarias para la adquisición de un fenotipo tumoral. En concordancia con este fenómeno, los ensayos realizados con modelos animales han demostrado un papel causal de la pérdida de E-cadherina en la progresión tumoral. Esta pérdida de expresión puede tener como origen alteraciones genéticas pero normalmente es reprimida a nivel transcripcional, mediante hipermetilación de su promotor o mediante factores de transcripción concretos. Además de su repercusión sobre la adhesión, la pérdida de E-cadherina tiene importantes consecuencias sobre las rutas de señalización, fundamentalmente a través de la ruta de *Wnt*.

Sin embargo, muchos tumores malignos mantienen la expresión de E-cadherina y la adquisición de características mesenquimales por los cánceres de origen epitelial no suele ser completa, por lo que existe controversia sobre la relevancia de este fenómeno en los procesos neoplásicos (Suárez Nieto, 2007).

Considerando todas las evidencias, los datos de experimentos *in vitro*, análisis de tumores humanos y modelos murinos, se deduce una función supresora tumoral de la adhesión mediada por zonula adherens.

Sin embargo, hasta hace poco, sólo la zonula adherens había sido relacionada con la supresión tumoral (debido a una menor expresión de la misma en muchos cánceres, entre otras cosas) de manera que la inactivación de sus componentes se considera que causa degeneración tisular o desarrollo tumoral y metástasis. Así, hasta ahora el papel de los desmosomas en carcinogénesis había quedado en la incertidumbre, a pesar de que la inhibición de éstos es previa a la de la zonula adherens, llevando al desarrollo tumoral y la invasión temprana., lo que sugiere también un papel supresor tumoral para los desmosomas. De este modo, los desmosomas han sido tradicionalmente considerados como complejos proteicos estáticos que refuerzan la adhesión y cuya disfunción resulta sólo en enfermedades degenerativas, sin que se les asociara claramente con una predisposición al cáncer (Dusek *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2010a). Y aunque es cierto que no se ha observado ninguna predisposición clara al cáncer en pacientes con síndromes derivados de alteraciones del desmosoma, esto podría explicarse por la rareza de estas enfermedades y/o porque, a menudo, estos individuos tienen una esperanza de vida más reducida (Dusek *et al.*, 2011).

No obstante, existen evidencias de que ciertos componentes del desmosoma podrían ser potenciales oncogenes. Así, la disfunción del desmosoma podría contribuir a la carcinogénesis bien mediante la liberación de componentes con función oncogénica, bien por activación de vías de señalización que afecten al desarrollo tumoral. Por ejemplo, la activación de p38MAPK es desencadenada por autoanticuerpos contra DSG3 en pénfigo vulgar, y la activación de la ruta ERK1, ERK2 y AKT es inducida por la inhibición de DSP en queratinocitos humanos. Es más, la simple pérdida de adhesión celular mediada por desmosomas, podría contribuir a la progresión del cáncer en ciertos contextos por el simple hecho de debilitar la barrera a la invasión y metástasis, incluso en conjunción con la pérdida de zonula adherens (Dusek *et al.*, 2011).

Actualmente, con el conjunto de datos disponibles se ha postulado un modelo de progresión tumoral en dos pasos, en el que la inhibición de los desmosomas causaría una invasión local de una manera independiente a la EMT, y una subsecuente pérdida de la zonula adherens impulsaría la progresión tumoral completa (Dusek *et al.*, 2011).

El estudio del papel de los desmosomas en cáncer se ha visto dificultado por la ya mencionada letalidad asociada a la delección constitutiva de algunos genes del desmosoma en modelos murinos. Además, la correlación entre los datos existentes de expresión de componentes del desmosoma y la progresión tumoral son contradictorios y confusos, al igual que los ensayos *in vitro*, habiendo casos de sobreexpresión, inhibición e incluso igualdad de expresión.

Por ejemplo, la expresión de proteínas como DSG2, DSG3 y PKP3 se incrementa en cánceres de piel, cabeza y cuello, próstata y pulmón, y esto se asocia con una peor supervivencia. Por otro lado, la expresión de proteínas como DSG1-3, DSC2, DSC3, PG, PKP1-3 y DSP se encuentra reducida en cánceres epiteliales incluyendo piel, cabeza y cuello, gástrico, colorrectal, vejiga, mama, próstata, cervical y endometrial y a menudo se correlacionan con un estado tumoral avanzado, incrementando la metástasis y/o un peor pronóstico. Además, deficiencias en PERP promueven el desarrollo y progresión tumoral por varios mecanismos (p. ej., en casos de inactivación de *p53* o *p63*), apoyando la idea de que los desmosomas pueden funcionar como supresores tumorales.

Toda esta situación de controversia podría estar reflejando diferencias reales dependientes de contexto en la contribución de los desmosomas al cáncer. Aunque por otro lado, podría ser debido a limitaciones en los modelos usados, tales como las condiciones artificiales de cultivo celular, el análisis de células transformadas con gran cantidad de alteraciones genéticas y la incapacidad de recrear fielmente la arquitectura tisular o un sistema inmunitario funcional en xenógrafos murinos.

Con respecto a la posibilidad de reflejar una realidad dependiente de contexto, no hay que olvidar que la progresión tumoral es un proceso de múltiples pasos, y es un evento frecuente en cáncer que estas moléculas de adhesión se encuentren alteradas y que, además, desempeñen un papel dual aunque tradicionalmente se les haya considerado únicamente como supresores tumorales: por una parte, las células neoplásicas necesitan debilitar las uniones que estabilizan su localización normal promoviendo la proliferación descontrolada, la distorsión progresiva de la arquitectura tisular normal y la diseminación tumoral mediante la pérdida de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular; pero al mismo tiempo, necesitan mantener y/o desarrollar mecanismos de adhesión al sustrato necesarios para avanzar a través del tejido circundante y que les proporcionen señales de supervivencia y proliferación. Como consecuencia, las distintas moléculas de adhesión celular pueden actuar como promotores o supresores de la invasividad celular (Moh *et al.*, 2009; Suárez Nieto, 2007).

Cabe destacar que entre las principales familias de moléculas de adhesión se incluyen miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, cadherinas, integrinas, selectinas y CD44; las cuales participan en funciones tan diversas como transducción de señales, crecimiento celular, diferenciación, expresión génica, morfogénesis, embriogénesis, función inmunológica, apoptosis, motilidad celular, cicatrización e inflamación (Moh *et al.*, 2009; Okegawa *et al.*).

Así pues, aunque está generalmente aceptado que las moléculas de adhesión funcionen como supresores tumorales y, además, estén implicadas en restringir la migración celular (tal es el caso de la proteína ZO-1, un componente de la zonula occludens) (Ross *et al.*, 2007). Debido a esta doble función, se han identificado moléculas de adhesión como hepaCAM, de la familia de las inmunoglobulinas, que actúan como supresor tumoral y, paradójicamente, inducen

migración celular. Otro ejemplo paradójico es CEACAM1, la cual presenta un papel supresor tumoral a la vez que promueve la invasividad.

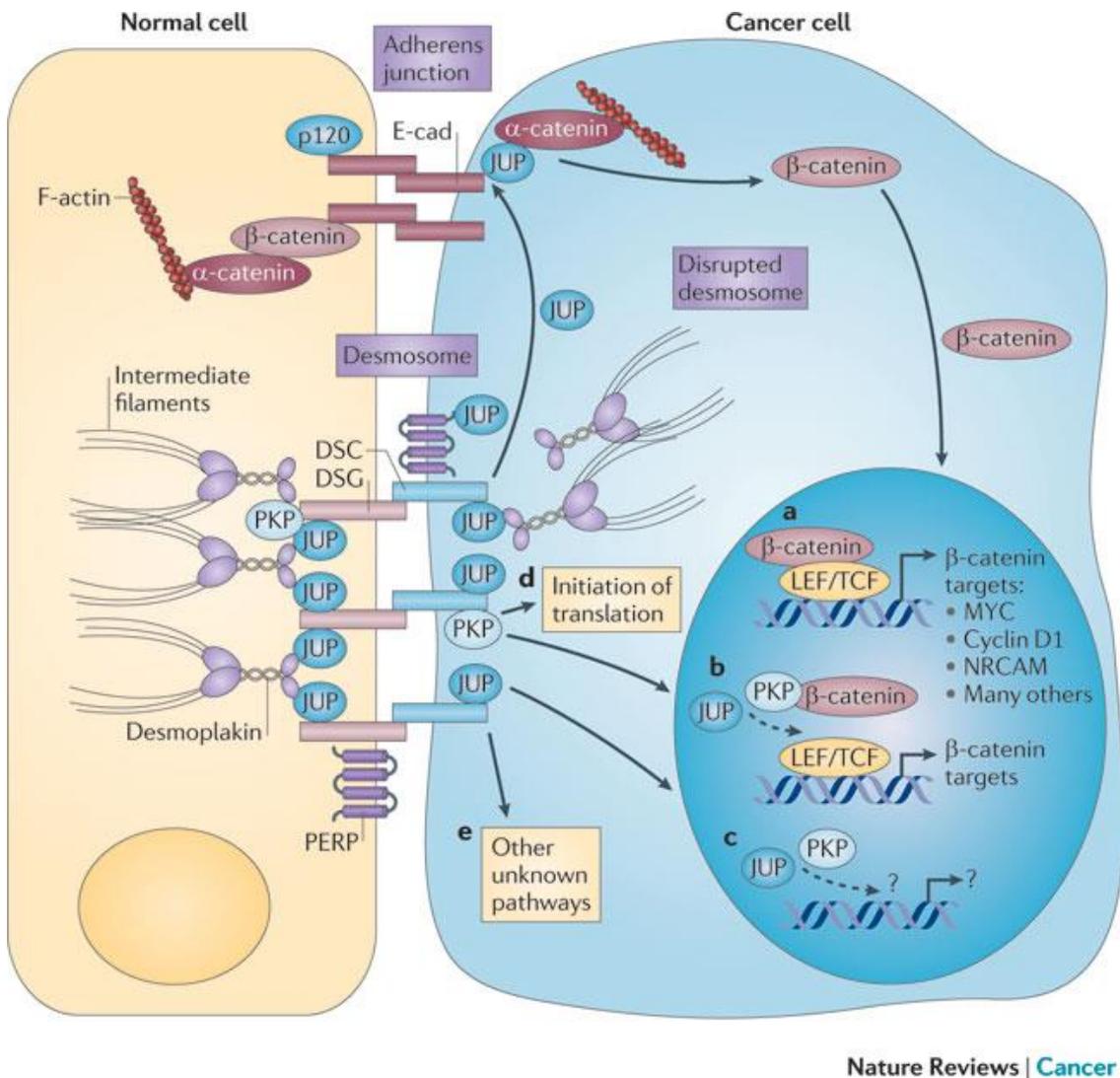


Figura 25. La deficiencia de los desmosomas puede contribuir a la progresión del cáncer de múltiples formas. En la figura se muestran los componentes mejor caracterizados; sin embargo la posición de PERP en el desmosoma es especulativa. A altos niveles, la placoglobina (JUP) puede competir con la β-catenina por la inclusión en la zonula adherens y/o por la interacción con la maquinaria de degradación mediada por APC, la cual regula los niveles de β-catenina (no mostrado). Ambos escenarios resultan en un incremento de la β-catenina en núcleo, lo cual puede estimular genes diana dependientes de LEF/TCF, promoviendo un efecto oncogénico (a). JUP además puede trasladarse entre la zonula adherens y el núcleo, donde puede estimular genes diana de LEF/TCF de manera independiente de β-catenina (b). Las PKPs también pueden trasladarse del desmosoma al núcleo, donde ya se ha demostrado la interacción entre PKP2 y β-catenina potenciando la transactivación mediada por LEF/TCF (b). Las PKPs y JUP también podrían regular genes diana independientes de LEF/TCF (c). Las PKPs pueden asimismo funcionar en el citoplasma estimulando el inicio de la traducción (d). Podrían existir otros mecanismos moleculares tumorigénicos aún desconocidos (e). DSC, desmocolina; DSG, desmogleína; E-cad, E-cadherina; NRCAM, molécula de adhesión celular neuronal; p120, cadherina p120 (Dusek *et al.*, 2011).

El modelo más ampliamente estudiado (Fig. 25) sugiere que la disfunción del desmosoma puede liberar componentes específicos del mismo que pueden mostrar una actividad oncogénica, como es el caso de la placoglobina (PG o JUP), la cual tiene una función de señalización similar a β -catenina, como ya se ha comentado. Existen estudios que sugieren que los efectos de PG en la ruta de señalización WNT- β -catenina son indirectos y se pueden atribuir, probablemente, a la capacidad de PG de promover la localización nuclear y actividad transcripcional de β -catenina. Además, PG es capaz de sustituir a β -catenina en la zonula adherens, liberándola para estimular los genes diana de WNT, los cuales incluyen la ciclina D1 y la molécula de adhesión neuronal NRCAM. Además de estos efectos indirectos en la regulación génica vía β -catenina, la PG puede migrar por sí misma al núcleo activando directamente genes diana de β -catenina-LEF/TCF oncogénicos, o bien, estimulando la expresión de dianas específicas de PG desconocidas para promover la proliferación o transformación.

Para complicar aún más las cosas, existen evidencias de que PG puede inhibir la ruta de WNT- β -catenina. Pero aunque esta vía de señalización pudiera ser importante en ciertos marcos fisiológicos, su relevancia en cáncer no está clara y se necesita más investigación en este campo (Dusek *et al.*, 2011).

A pesar de que la explicación y el mecanismo responsable de este fenómeno no es del todo conocido, la aparición de estas intrigantes moléculas de adhesión con funciones contradictorias puede abrir un nuevo capítulo del significado biológico de las moléculas de adhesión (Moh *et al.*, 2009).

3. ANTECEDENTES

A pesar de los avances en detección temprana y estandarización de los tratamientos, a menudo el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) se diagnostica en estados avanzados y conlleva un peor pronóstico. Por otro lado, cuando se detecta en pacientes con estadios tempranos de NSCLC que son sometidos a resección quirúrgica, el riesgo de desarrollar metástasis continúa siendo muy alto. Además, pacientes de cáncer de pulmón con idéntica histología, grado de diferenciación, localización y estadio pueden diferir mucho en los tiempos de supervivencia o en la respuesta a la terapia debido a causas moleculares subyacentes aún desconocidas. Es por ello que, para tener una relevancia clínica real, los perfiles de expresión génica deben ser reconocibles a pesar de la variabilidad en el procesamiento de muestras entre las distintas instituciones.

Con el objetivo de incrementar nuestro conocimiento de la biología del cáncer y para determinar cualquier correlación entre la heterogeneidad fenotípica y la diversidad genética del cáncer de pulmón, nuestro grupo de investigación llevó a cabo en estudios previos el análisis de los perfiles de expresión génica de un conjunto de 46 muestras de tumores primarios de adenocarcinoma (AC) y carcinoma escamoso o epidermoide (SCC), y 45 muestras pareadas no tumorales (control) con el propósito de determinar secuencias génicas diferencialmente expresadas en base a los distintos estadios de la enfermedad e identificar secuencias con significado biológico en la progresión tumoral (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011).

Las muestras tumorales fueron obtenidas de pacientes de NSCLC cuyo tratamiento postoperativo iba a ser basado en los resultados de la biopsia, y fueron sometidas a una rigurosa clasificación histológica y clínica.

De las 46 muestras tumorales analizadas, 14 fueron AC y 32 fueron SCC; y 45 de estas muestras fueron pareadas con su correspondiente muestra no tumoral. Atendiendo al estadio de la enfermedad, 38 pacientes fueron diagnosticados en estadio I, 4 en estadio II, 3 en estadio III y 1 en estadio IV. Las muestras de AC se catalogaron como pobremente diferenciadas en 5 casos, moderadamente diferenciadas en 8 y bien diferenciadas en 1; mientras que las SCC fueron pobremente diferenciadas en 15 casos, moderadamente diferenciadas en otros 15 y bien diferenciadas en 2 casos.

Las 91 muestras de tejido pulmonar humano (46 tumorales + 45 control) se analizaron usando el microarray *Human Genome U133 Plus 2.0* de *Affimetrix*. Como resultado del análisis se encontraron secuencias diferencialmente expresadas para las distintas comparaciones, tanto en el análisis de muestras pareadas como no pareadas (Tablas 3 y 4, respectivamente) (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011).

Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de expresión de muestras de AC y SCC. El análisis estadístico utilizado para seleccionar las secuencias diferencialmente expresadas también permitió la identificación de perfiles de expresión génica distintos para diferentes estadios de la enfermedad y entre los distintos grados de diferenciación.

Comparison*	# Samples	# Probe sets	
		FDR	Bonferroni
Squamous vs. control	32 vs. 45	3271	538
Adenocarcinoma vs. control	14 vs. 45	1718	184
I Squamous vs. control	26 vs. 26	757	22
I Adenocarcinoma vs. control	10 vs. 10	68	3
I Well/moderate vs. control	20 vs. 20	201	4
I Poor vs. control	16 vs. 16	255	3

Tabla 3. Número de sondas que muestran genes diferencialmente expresados en el array de muestras pareadas (FDR*, $p \leq 0,05$; Bonferroni*, $p \leq 0,05$).

Comparison*	# Samples	# Probe sets	
		FDR	Bonferroni
Tumour vs. control	46 vs. 45	2285	233
Adenocarcinoma vs. squamous	14 vs. 32	4615	1139
Well/moderate vs. poor	26 vs. 20	59	7
Stage I B adenocarcinoma vs. squamous	9 vs. 23	2091	106
I Adenocarcinoma vs. squamous	12 vs. 26	891	23
Adenocarcinoma vs. control	32 vs. 45	3271	538
Squamous vs. control	14 vs. 45	1718	184

Tabla 4. Número de sondas que muestran genes diferencialmente expresados en el array de muestras no pareadas (FDR*, $p \leq 0,05$; Bonferroni*, $p \leq 0,05$).

*FDR, test estadístico *False Discovery Rate*; Bonferroni, test estadístico Bonferroni; *Squamous*, carcinoma epidermoide (SCC); *well/moderate*, bien/moderadamente diferenciado; *poor*, pobremente diferenciado (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011).

El análisis de componentes principales (PCA, del inglés) y el *clustering* jerárquico no supervisado, clasificaron las muestras perfectamente atendiendo tanto al carácter tumoral o control de las mismas, como al subtipo histológico (control, AC o SCC). También se analizaron las curvas de supervivencia de Kaplan Meier de los pacientes analizados por microarray, las cuales mostraron tiempos de supervivencia significativamente cortos ($p < 0,001$) para aquellos pacientes que mostraban recurrencia tumoral.

El sistema de clasificación DAVID es una poderosa herramienta bioinformática para clasificar genes de acuerdo a su función, identificando familias génicas que pueden jugar un papel significativo en rutas específicas, procesos biológicos y funciones moleculares. Esta herramienta fue usada para clasificar las secuencias diferencialmente expresadas en la comparación de condiciones tras la aplicación del test de Bonferroni.

El fin último de tal estudio era descubrir nuevos marcadores terapéuticos que ayuden a personalizar las terapias de acuerdo a la composición génica tumoral individual.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El cáncer de pulmón continúa siendo una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial, siendo en España y muchos otros países occidentales el tumor que produce mayor mortalidad. A pesar de que se han asociado muchas alteraciones genéticas con el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón, aún no se han descifrado completamente los mecanismos moleculares subyacentes (Carbone, 1992; Furukawa et al., 2005; Wigle et al., 2002).

Los avances conseguidos recientemente en la comprensión y tratamiento del cáncer de pulmón son bastante limitados, lo cual no ha mejorado la supervivencia a 5 años, que sigue siendo entorno al 15-20%, tras el diagnóstico. Sin embargo, existe una esperanza real en que los avances recientes y continuos en genómica, proteómica, biología molecular y oncofarmacología se trasladarán hacia una mejora en la supervivencia de las personas afectadas por cáncer de pulmón. Actualmente se están buscando nuevas estrategias terapéuticas dirigidas que han mostrado eficacia para el tratamiento de otros tumores (Furukawa et al., 2005).

Debido a que el desarrollo de estas terapias dirigidas crea la necesidad de discriminar con exactitud los tumores en base a sus características histológicas y genéticas, un mayor conocimiento del proceso de carcinogénesis junto con los perfiles de expresión génica, facilitaría la comprensión de la biología del cáncer de pulmón a nivel molecular, dando lugar a un mejor entendimiento de la fisiopatología y permitiendo una mayor estadificación, pronóstico y el desarrollo de tratamientos individualizados en base a la identificación de marcadores génicos predictivos.

Como se recoge en múltiples investigaciones, diversas alteraciones genéticas han sido identificadas como responsables del proceso de carcinogénesis y de la resistencia a quimioterapia y a terapia dirigida frente a distintas moléculas diana. Estos hechos hacen aún más evidente la necesidad actual de incrementar el conocimiento de las alteraciones genéticas relacionadas con el cáncer de pulmón (Bhattacharjee et al., 2001; Garber et al., 2001; Golub, 2001; Petty et al., 2004; Whitsett et al., 2004).

En este sentido, pretendemos aportar información sobre los perfiles de expresión génica en cáncer de pulmón, validando y cuantificando la alteración en la expresión de distintos genes mediante ensayos funcionales; y relacionarlo con las características histológicas del tumor correspondiente y con el factor pronóstico y supervivencia del individuo.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en este trabajo de investigación se ha pretendido estudiar en profundidad los genes desregulados como consecuencia del proceso tumoral de NSCLC, lo cual permite la identificación y validación de genes con valor pronóstico, así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas en adenocarcinomas y carcinomas epidermoides pertenecientes al estadio I con distinto grado de diferenciación tumoral.

Asimismo, establecer la correlación con los distintos tipos histológicos tumorales y con la supervivencia, recidiva tumoral e intervalo libre de enfermedad en los pacientes seleccionados ayudará a establecer el valor pronóstico de los genes desregulados en pacientes de NSCLC sometidos a toracotomía con objetivos de resección completa, incompleta o diagnóstica.

En el presente trabajo de investigación, pretendemos también realizar un estudio inmunohistoquímico de expresión de las proteínas correspondientes en los tumores obtenidos, así como análisis de silenciamiento de genes validados.

4.1. Hipótesis

La hipótesis de éste proyecto considera que existe una correlación entre la heterogeneidad fenotípica y la diversidad genética del cáncer de pulmón, de manera que la clasificación morfológica de este tipo de cáncer está determinada por importantes diferencias genotípicas, lo cual conduce a patrones globales de expresión génica distintos según los diferentes tipos histológicos definidos. Muchos genes son desregulados a nivel transcripcional en células tumorales, y algunos de ellos son susceptibles de ser utilizados con valor pronóstico, así como, blanco de acción de nuevas estrategias terapéuticas.

4.2. Objetivos

Por todo ello, los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Validación de los datos del microarray por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) en un conjunto independiente de muestras.
2. Estudio de supervivencia. Análisis estadístico de correlación de perfiles de expresión génica con los distintos fenotipos tumorales y con la supervivencia, recidiva tumoral e intervalo libre de enfermedad (recurrencia tumoral).
3. Estudios de inmunohistoquímica. Análisis y comparación de la variación de la expresión de mRNA de distintos genes obtenidos en el estudio de validación, con el correspondiente cambio de las proteínas correspondientes en los tumores obtenidos, según la disponibilidad de anticuerpos.
4. Estudio de genómica funcional. Análisis de silenciamiento de distintos genes y estudio de sobreexpresión de las proteínas correspondientes a genes de interés obtenidos en el estudio de validación y que muestren una variación importante en su nivel de expresión como consecuencia del proceso tumoral mediante ensayos funcionales.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Validación de los datos del microarray por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

5.1.1. Muestras, evaluación patológica y datos clinicopatológicos

Una vez obtenidos y analizados los datos de microarrays en tumores primarios no tratados como se ha descrito en el apartado “Antecedentes” (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011), se seleccionaron 92 genes para la evaluación de sus niveles de expresión por qPCR. La validación se llevó a cabo en un conjunto independiente de 70 muestras elegidas siguiendo los mismos criterios citados en “Antecedentes” y no analizadas previamente por microarray. De estas 70 muestras, 48 fueron tumorales (27 AC y 21 SCC) y 22 no tumorales (control).

En cuanto al estadio de la enfermedad, 31 de los pacientes fueron diagnosticados en estadio I, 5 en estadio II, 11 en estadio III y 1 en estadio IV.

5.1.2. Extracción de ARN, reverso-transcripción y qPCR

El ARN total de las muestras fue extraído usando el kit *RNeasy Mini* (Qiagen) y, posteriormente, fue reverso-transcrito a ADNc usando 10 ng de ARN por muestra y el kit *High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés) se realizaron mediante el método de sondas *TaqMan* usando la *Master Mix TaqMan Universal PCR* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando tarjetas microfluídicas personalizadas 7900 (Applied Biosystems) y el equipo *ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection Systems*.

La estrategia *TaqMan* para cada uno de los 92 genes fue desarrollada por Applied Biosystems como *Assay-on-Demand*, utilizándose las sondas recogidas en la Tabla 5. Como control, se incluyeron los genes endógenos *Gadph* y *18S*; y los genes *Actb* y *Rpl10* en base a criterios de ausencia de cambios entre condiciones en los experimentos de microarray (Tabla 6). Tras calcular el factor de normalización con el software *GeNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), *Rpl10* finalmente fue descartado como control por mostrar un comportamiento diferente al resto de controles endógenos.

El software *GeNorm* permitió determinar los genes control óptimos de entre una larga lista de posibles genes control que presentan las mínimas variaciones entre condiciones. *GeNorm* se utilizó para obtener el factor de normalización, y los valores fueron transformados mediante el uso de \log^2 para el análisis estadístico.

Los valores absolutos del ciclo umbral (Ct, del inglés *threshold cycle*) fueron determinados mediante el software *SDS* (Applied Biosystems). Los datos de qPCR fueron evaluados siguiendo las recomendaciones de Yuan *et al.* (Yuan *et al.*, 2006), y los valores de ΔCt fueron usados como variables dependientes en el análisis estadístico.

Para detectar cambios de expresión diferenciales entre grupos se utilizó un modelo de regresión lineal.

Gen	Sonda	Gen	Sonda	Gen	Sonda
ACSL5	Hs01061754_m1	GJB5	Hs00383058_m1	RHOBTB2	Hs01598085_m1
AGER	Hs00153957_m1	GJB6	Hs00917676_m1	S100A2	Hs00195582_m1
ARNTL2	Hs00368068_m1	GKN2	Hs00699389_m1	S100A7	Hs00161488_m1
ATHL1	Hs00228253_m1	GPR116	Hs00391810_m1	SERPINB5	Hs00985285_m1
ATP11A	Hs00259950_m1	GPR87	Hs00225057_m1	SFTPC	Hs00161628_m1
BNC1	Hs00231074_m1	GREM1	Hs00171951_m1	SLC16A1	Hs00161826_m1
C11orf9	Hs00203205_m1	HMG A2	Hs00971725_m1	SLC2A1	Hs00892681_m1
MRAP2	Hs00536621_m1	IGF2BP2	Hs01118009_m1	SLC6A8	Hs00940515_m1
CACNA2D2	Hs01021049_m1	IRF6	Hs00196213_m1	SNAI2	Hs00950344_m1
CDH3	Hs00169968_m1	IVL	Hs00846307_s1	SPOCK1	Hs00270274_m1
CLCA2	Hs00998916_m1	KRT14	Hs00265033_m1	SPRR1A	Hs00954595_s1
CLDN18	Hs00212584_m1	KRT15	Hs00267035_m1	SPRR1B	Hs00234164_m1
CLDN3	Hs00265816_s1	KRT17	Hs00356958_m1	SPRR3	Hs00271304_m1
CLEC3B	Hs00162844_m1	KRT5	Hs00361185_m1	ST3GAL5	Hs00187405_m1
COL10A1	Hs00166657_m1	KRT6B	Hs00745492_s1	STEAP1	Hs00185180_m1
COL11A1	Hs00266273_m1	LIMD1	Hs00170931_m1	SULF1	Hs00290918_m1
COL12A1	Hs00189184_m1	GPX8	Hs00380670_m1	SULT1A1,SULT1A4, SULT1A3,SULT1A2	Hs00236900_m1
COL1A1	Hs01076777_m1	LRRC15	Hs00370056_s1	SULT1A2	Hs02340929_g1
COL4A3	Hs01022542_m1	LYPD3	Hs01012111_m1	TFAP2A	Hs01029413_m1
CPB2	Hs00266390_m1	MARK1	Hs00179703_m1	TFRC	Hs00174609_m1
CTHRC1	Hs00298917_m1	MMP10	Hs00233987_m1	THBS2	Hs01568063_m1
CYP4B1	Hs00167970_m1	MMP12	Hs00899668_m1	TMC5	Hs00418688_m1
DSC3	Hs00170032_m1	MMP1	Hs00899658_m1	TMEM117	Hs00260170_m1
DSG3	Hs00951899_m1	NKX2-1	Hs00163037_m1	TMEM125	Hs00332778_m1
FAM107A	Hs00200376_m1	NRN1	Hs00213192_m1	TP63	Hs00978338_m1
FAT2	Hs00155038_m1	NTRK2	Hs01093110_m1	TPBG	Hs00907219_m1
FNDC1	Hs00287359_m1	PEBP4	Hs00376440_m1	TRIM29	Hs00232590_m1
FOXD1	Hs00270117_s1	PIGX	Hs00379251_m1	ULBP2	Hs00607609_mH
GATA2	Hs00231119_m1	PKP1	Hs00913276_m1	VSNL1	Hs00374305_m1
GJB2	Hs00955889_m1	PLAU	Hs00170182_m1	WDR72	Hs00419054_m1
GJB3	Hs02378125_s1	RHCG	Hs00170975_m1		

Tabla 5. Relación de sondas *TaqMan* de Applied Biosystems utilizadas en la validación por qPCR de los 92 genes seleccionados por microarray.

Gen	Sonda
RPL10	Hs00749196_s1
GAPDH	Hs99999905_m1
ACTB	Hs99999903_m1
18S	Hs99999901_s1

Tabla 6. Relación de sondas *TaqMan* de Applied Biosystems de los controles endógenos utilizados en la validación por qPCR.

5.1.3. Análisis estadístico

Para corregir los test múltiples, se estimaron la Tasa de Falsos Descubrimientos (más conocida por sus siglas en inglés, FDR de *False Discovery Rate*) y el test de Bonferroni (Benjamini *et al.*, 1995), considerando que eran significativos con valores de $p \leq 0,05$.

Los valores de nivel de cambio (*Fold-change*, FC) se calcularon para todas las comparaciones y, como herramientas de clasificación, se utilizaron el análisis de componentes

principales (PCA, del inglés) y el *clustering* jerárquico. Para éste último se utilizó el software *Partek Genomics Suite v7.3.1*. La distancia euclídea se utilizó para mediciones de similitud y el agrupamiento de enlace promedio se seleccionó como método de asociación.

Para analizar la concordancia entre los resultados del microarray del estudio previo con los resultados de FC de la validación por qPCR, se calculó el Coeficiente de Correlación de Concordancia (CCC) (Carrasco *et al.*, 2003) para cada condición. El valor de CCC varía entre 0 (independencia) y 1 (total concordancia).

5.2. Estudio de supervivencia

5.2.1. Muestras, evaluación patológica y datos clinicopatológicos

Se tomaron muestras de 100 mg o más de tumores primarios de pulmón de 62 pacientes de NSCLC entre 2004 y 2009 en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada. Tras la toracotomía y resección pulmonar, las muestras tumorales fueron procesadas como se describe en Sánchez-Palencia *et al.* (Sánchez-Palencia *et al.*, 2011) y sometidas a un microarray de expresión y qPCR, como se describe anteriormente. Se obtuvo el consentimiento informado para todos los pacientes del estudio, lo cual fue aprobado por el Comité Ético de la institución.

Tras el alta médica, todos los pacientes fueron sometidos a un seguimiento de un mes, trascurrido éste, se realizó el seguimiento cada tres meses por un periodo total de un año en el que se incluyó radiografía posteroanterior de tórax y análisis de sangre (bioquímica básica y hemograma). Al cabo del año se repitieron los análisis sanguíneos y se realizó TAC (tomografía axial computerizada) de tórax y abdomen superior. Posteriormente los pacientes fueron seguidos cada 6 meses durante los 5 primeros años, y entonces, anualmente durante un mínimo de 10 años tras la cirugía.

Aquellos pacientes que perdieron alguna de las sesiones de seguimiento fueron contactados telefónicamente para determinar su estado de salud y, en caso de fallecimiento, la causa de éste. Se definió el índice T y el estadio TNM de acuerdo a los criterios tanto de la 6ª como 7ª edición de la clasificación TNM.

Cuando los resultados clínicos, analíticos o radiográficos hicieron sospechar de recurrencia tumoral, se realizaron biopsias para su confirmación o descarte. El tiempo de supervivencia fue calculado en meses para cada paciente desde la fecha de la resección quirúrgica hasta el fallecimiento del paciente o hasta Junio de 2010 en caso de supervivencia. Se excluyeron del estudio las muestras de pacientes fallecidos durante el periodo postoperatorio (< 1 mes tras la cirugía).

Pacientes con afección ganglionar (N1 o N2) recibieron tratamiento adyuvante postquirúrgico consistente en quimioterapia basada en dobles de platino (cisplatino y vinorelbina) y radioterapia regional.

En cuanto a los casos de recurrencia tumoral, se definió como recurrencia local la recaída tumoral en el mismo pulmón o tronco bronquial. Cuando la reaparición del tumor tuvo lugar en los nódulos linfáticos del mediastino, a pesar de su disección durante la cirugía primaria, o dio

lugar a metástasis en nódulos linfáticos mediastínicos contralaterales y/o región supraclavicular, se consideró recurrencia regional. Se consideraron como metástasis distantes los casos con lesiones tumorales en órganos distintos al pulmón o en nódulos linfáticos remotos.

5.2.2. Niveles de expresión de los genes *Pkp1* y *Krt15*

Los datos de expresión fueron obtenidos de los análisis de microarray y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) descritos anteriormente (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011).

Para el estudio de expresión se utilizaron 40 muestras analizadas por microarray (12 AC y 28 SCC) y 21 muestras independientes analizadas por qPCR (12 AC y 9 SCC). Los valores de nivel de cambio (*Fold-Change*, FC) se calcularon en base a 38 muestras control no tumorales. Se consideró que había sobreexpresión de los genes *Pkp1* y *Krt15* cuando los valores de FC fueron ≥ 2 veces la media de FC de las muestras control. Se consideró que había inhibición de la expresión cuando los valores de FC fueron $\leq 50\%$ de la media de FC de las muestras control.

5.2.3. Análisis estadístico

Para el análisis de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier del módulo de supervivencia del programa estadístico SPSS v15.0 con el objeto de examinar la relación entre la supervivencia de los pacientes y el índice T, la recurrencia tumoral y el estadio TNM, así como con la sobreexpresión de *Pkp1* y/o *Krt15* (separada o conjuntamente).

La clasificación de acuerdo al índice T tanto de la 6ª como la 7ª edición del sistema de clasificación TNM y los niveles de expresión de *Pkp1* y *Krt15* fueron comparados mediante los test de Breslow (Wilcoxon generalizado), Tarone-Ware y Log-Rank (Mantel-Cox) y mediante la construcción de curvas de supervivencia en función del índice T, la recurrencia tumoral y el estadio TNM y la edición del sistema de clasificación TNM. El modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales (método escalonado) se aplicó para seleccionar las variables que influyeron significativamente en el tiempo de supervivencia. Se consideró significación estadística para valores de $p \leq 0,05$.

5.3. Estudio inmunohistológico

5.3.1. Muestras tumorales

El estudio incluyó 75 muestras de tumores primarios malignos de pulmón (AC y SCC) obtenidas por biopsia incisional de $\leq 0,4$ cm durante la cirugía tumoral. Las muestras se dividieron en dos: una mitad se utilizó para la extracción de ARN que se utilizó en el análisis de expresión por microarray y qPCR previo (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011); la otra mitad fue fijada en formalina y embebida en bloques de parafina de los que se cortaron secciones de 3-4 μm de grosor para una tinción de hematoxilina-eosina convencional. Las muestras se clasificaron

siguiendo las directrices de 2004 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Travis *et al.*, 2004), catalogando como SCC aquellas muestras que presentaban queratinización y/o puentes intercelulares, y como AC aquellas con diferenciación glandular y/o producción de mucina, incluyendo patrones de crecimiento acinar, papilar, broncoalveolar o sólido.

Los tumores pobremente diferenciados o que presentaban un patrón de crecimiento sólido fueron examinados con un panel inmunohistoquímico que se usa rutinariamente en laboratorio para tales casos y ha probado su utilidad para la subclasificación de NSCLC (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). El panel incluye anticuerpos contra TTF-1, napsina A, p63, CK5/6, CK7 y CK20; y su aplicación permitió la clasificación de 7 casos (5 AC y 2 SCC). Además, los casos de SCC fueron clasificados como bien diferenciados si se observó queratinización y/o puentes intercelulares en más del 75% de la muestra tumoral, moderadamente diferenciados si se observó en el 25-75% y pobremente diferenciados si se observó en menos del 25% de la muestra. Análogamente, los casos de AC fueron clasificados como bien diferenciados si se formaron glándulas en más del 75% de la muestra tumoral, moderadamente diferenciados si se formaron en el 25-75% y pobremente diferenciados si se formaron en menos del 25% de la muestra.

El diagnóstico de las biopsias fue comparado con el diagnóstico definitivo del espécimen quirúrgico. Se encontraron discrepancias sólo en 3 casos de carcinoma en los cuales la biopsia fue tomada de áreas escamosas pobremente diferenciadas.

Antes del estudio, todas las historias médicas y secciones tumorales fueron revisadas por un oncólogo y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes. El protocolo de estudio cumplió con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983, y fue aprobado por el Comité Ético correspondiente.

La evaluación patológica de los especímenes resecados se llevó cabo de acuerdo a la revisión de 1997 del Sistema Internacional de Estadificación del Cáncer de Pulmón (Mountain, 1997), y revisada siguiendo las directrices de la edición más reciente (7ª Edición) del sistema de clasificación TNM del *International Union Against Cancer* (UICC). Todos los especímenes fueron tumores primarios que no estuvieron bajo ningún tratamiento que pudiera afectar a los resultados inmunohistoquímicos.

5.3.2. Inmunohistoquímica

Se cortaron secciones de 4 µm de grosor de los bloques de parafina y se montaron en porta-objetos pretratados. Como control positivo se utilizó tejido de piel humana normal. Posteriormente se llevaron a cabo tinciones para PKP1 (anticuerpo policlonal producido en conejo, HPA027221; Sigma, St Louis, MO, USA), KRT15 (anticuerpo policlonal producido en conejo, HPA024554; Sigma) y DSG3 (anticuerpo monoclonal producido en ratón, NB100-1643; Abcam, Cambridge, UK). Tras probar varias diluciones, finalmente se utilizaron los anticuerpos de PKP1 y DSG3 a dilución 1:200, y KRT15 a 1:500. La tinción inmunohistoquímica se realizó con el sistema de detección inmunohistoquímica *UltraVision Quanto* (peroxidasa) (Master Diagnóstica SL, Granada) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones fueron desparafinadas y la actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con una solución de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. Para el desenmascaramiento de antígenos, las

secciones se trataron con un tampón de citrato sódico (pH 6,0) tras lo cual se incubaron con el anticuerpo primario durante 16 h a 4° C, se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS) durante 5 minutos y se incubaron de nuevo 10 minutos con el anticuerpo primario *Amplifier Quanto* (UltraVision Quanto). Nuevamente se lavaron y se incubaron 10 minutos con *Polymer Quanto* (UltraVision Quanto). Como cromógeno se utilizó diaminobenzidina (DAB) y como tinción de contraste hematoxilina. Cuando se utilizó PBS o sueros no inmunes en lugar de anticuerpos primarios, no se obtuvo tinción.

La tinción inmunohistoquímica fue evaluada independientemente por 2 patólogos, quienes asignaron una puntuación en base a la extensión e intensidad de la inmunorreacción. La concordancia entre los patólogos fue > 90% y cualquier diferencia en la interpretación de los resultados se resolvió por consenso. La extensión de la tinción se evaluó de manera semicuantitativa en núcleo, citoplasma y membrana como negativa (0, < 5% de células teñidas), positiva 1+ (6–25% de células teñidas), positiva 2+ (26–50% de células teñidas) o positiva 3+ (> 50% de células teñidas). De forma parecida, la intensidad de la tinción se puntuó de manera semicuantitativa de 0 a 3 en las mismas localizaciones. El resultado final de la inmunotinción fue tomado como la suma de la extensión e intensidad de la inmunorreacción, considerando puntuaciones ≥ 3 como positivas y puntuaciones < 3 como negativas.

5.3.3. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS v20. En primer lugar se realizó un estudio descriptivo de las características clinicopatológicas obteniendo frecuencias y porcentajes con intervalos de confianza del 95% para la muestra completa y por tipo histológico. La relación entre las características clinicopatológicas y la expresión proteica fue evaluada usando la χ^2 o test exacto de Fisher, calculando índices de probabilidades en casos de significación. El test de Cochran fue usado para evaluar diferencias en la positividad de PKP1, KRT15 y DSG3 entre núcleo, citoplasma y membrana en cada tipo histológico. Se consideró significación estadística para valores de $p \leq 0,05$.

5.4. Ensayos funcionales

5.4.1. Cultivo celular: Condiciones generales

Para los ensayos funcionales se emplearon un total de 37 líneas celulares humanas. De ellas, 3 líneas celulares fueron líneas primarias de NSCLC (2 SCC y 1 AC), 27 fueron líneas tumorales de NSCLC (9 SCC, 15 AC y 3 LCC), 1 línea fue SCLC (Tabla 7) y 6 líneas fueron de tejidos diferentes a pulmón (Tabla 8).

Para trabajar con líneas celulares, en primer lugar se procedió a su descongelación y crecimiento hasta obtener un número suficiente de células que permitiese la congelación de 10 criotubos con aproximadamente un millón de células cada uno. Del total de criotubos, uno se utilizó siempre para determinar el éxito de la congelación.

	Cáncer de pulmón			
	NSCLC			SCLC
	AC	SCC	LCC	
DMEM	A549, H1793, H23, H441, H522	EBC-1, H2170b, PC-14, SK-MES-1	H1299, H460	H446
RPMI-1640	A427, H1435, H1568, H1693, H1703, H1975, H838, Hs618.T, SK-LU-1, LC-319	H2170v, H520, PC-10, LC1/sq	H661	-
RPMI-1641+20%SBF	-	EPLC-272H	-	-
DMEM/F12 suplementado*	70110063	70110062, 70110072	-	-

Tabla 7. Líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas en los ensayos funcionales. Se especifica medio de cultivo y subtipo histológico para cada una de ellas.

(*) Medio DMEM/F12 suplementado con plasmocín, EGF, FGF, hidrocortisona, triiodo-L-tironina y glucagón, para el cultivo de líneas primarias.

Línea celular	Origen	Tipo Histológico	Medio
HeLa	cérvix	AC	DMEM
FaDu	faringe	SCC	DMEM
HaCaT	piel	SCC	DMEM
A431	piel	SCC	DMEM
SSC13	piel de cara	SCC	DMEM
HEK 293T	riñón	SCC	DMEM

Tabla 8. Líneas celulares no pulmonares utilizadas en los ensayos funcionales. Se especifica el tejido de origen, medio de cultivo y subtipo histológico para cada una de ellas.

5.4.1.1. Caracterización de las líneas celulares y búsqueda de las condiciones de cultivo

Antes de trabajar con las células, se realizó una búsqueda pormenorizada de las líneas celulares en base de datos *American Type Culture Collection* (ATCC) (www.atcc.org) para identificar sus características principales (tejido, diagnóstico, etc.) y condiciones óptimas de cultivo (condiciones de cultivo, medio de cultivo, pases recomendados, etc.).

5.4.1.2. Preparación de medios de cultivo

Todos los medios utilizados tuvieron una concentración de glucosa de 4,5 g·L⁻¹. Independientemente del tipo de medio, a éste siempre se le añadió L-glutamina, suero bovino fetal (FBS) al 10% y los antibióticos penicilina/estreptomicina (5.000 U y 5 mg/mL respectivamente) y el antifúngico anfotericina B (25 µg/mL) como prevención de contaminaciones. En todos los casos, el medio se almacenó en frigorífico a 4° C y se utilizó previamente atemperado a 37° C.

5.4.1.3. Descongelación de líneas celulares

Para la descongelación se procedió a la eliminación del dimetilsulfóxido (DMSO), un agente crioprotector que evita la formación de cristales de hielo que dañan las estructuras celulares. La descongelación se realizó de forma muy rápida, minimizando el tiempo de exposición de las células con el DMSO a temperatura ambiente, ya que resulta tóxico. El proceso seguido fue el siguiente:

1. Extraer el criotubo de células del tanque de nitrógeno líquido con las medidas de protección adecuadas transportándolo en hielo el mínimo tiempo posible.
2. Preparar y rotular adecuadamente un frasco de 75 cm³ (T-75) con el doble del volumen normal del medio de cultivo correspondiente, es decir, 20 mL.
3. Descongelar rápidamente el criotubo agitándolo en un baño de agua termostatzado a 37° C.
4. Añadir la suspensión celular al frasco ya preparado, consiguiendo diluir el DMSO tóxico al utilizar el doble de volumen de medio.
5. Incubar las células a 37° C en presencia de CO₂ durante 24 h.
6. Retirar el medio que contenía DMSO diluido y añadir un volumen normal de medio fresco (10 mL).
7. Incubar las células a 37° C en presencia de CO₂ y proceder al mantenimiento del cultivo.

5.4.1.4. Mantenimiento en cultivo de líneas celulares

5.4.1.4.1. Cambio de medio

El cambio de medio se lleva a cabo cuando, aún a pesar de que el cultivo no ha logrado alcanzar un grado de confluencia que permita el pase del mismo, los nutrientes se hayan agotado o se hayan alterado las condiciones del medio de cultivo (pH, concentración de sales, etc.) no garantizando el crecimiento óptimo de las células. Para ello:

1. Aspirar el medio envejecido y lavar el cultivo con 5 mL de PBS estéril con el objetivo de eliminar restos celulares y desechos del metabolismo celular.
2. Añadir 10 mL de medio fresco al T-75.
3. Incubar las células a 37° C en presencia de CO₂.

5.4.1.4.2. Subcultivo (pase celular)

Cuando los cultivos alcanzan un alto grado de confluencia se produce la inhibición del crecimiento por contacto. Por ello, cuando se alcanza una confluencia del 80% aproximadamente, es necesario transferir parte del cultivo celular a un nuevo frasco manteniendo una adecuada proporción células:superficie para mantener el crecimiento en un rango exponencial. Esta operación se denomina subcultivo o pase. La metodología para realizarla varía en función de si las células son adherentes o crecen en suspensión. En este caso, todas las líneas celulares utilizadas fueron adherentes, por lo que se siguieron los pasos que se detallan a continuación:

1. Aspirar el medio envejecido. Por su crecimiento adherente, las células quedan adheridas a la pared del frasco.
2. Lavar con 5 mL de PBS estéril con el objetivo de eliminar los restos celulares y desechos del metabolismo celular.
3. Añadir 2 mL de tripsina (previamente atemperada a 37° C). Esta proteasa degrada las proteínas que median las uniones intercelulares así como las adherencias célula-frasco. Incubar aproximadamente 5 minutos a la temperatura adecuada para la acción de la tripsina (37° C). Transcurrido este tiempo, si las células no quedan en suspensión, se procede a dar un golpe seco al frasco en posición horizontal para facilitar que las células se despeguen.
4. Añadir 10 mL de medio fresco (previamente atemperado a 37° C) con objeto de inactivar la tripsina, y resuspensión por medio de pipeteo.
5. Una vez inactivada la tripsina, tomar una parte de la suspensión y llevarla a un frasco nuevo con 10 mL de medio fresco (previamente atemperado a 37° C). El volumen de suspensión celular adecuado y la dilución óptima variará en función de las líneas celulares y su ritmo de crecimiento.
6. Incubar a 37° C en presencia de CO₂. El tiempo de incubación variará en función de las líneas celulares y su ritmo de crecimiento.

5.4.1.5. *Obtención del sedimento celular*

Proceder de igual forma que durante el subcultivo hasta el paso nº 3 (inclusive). A continuación:

1. Añadir 5 mL de medio fresco (previamente atemperado a 37° C) con objeto de inactivar la tripsina, y resuspender por medio de pipeteo.
2. Centrifugar 5 minutos a 1200 rpm y descartar el sobrenadante.
3. Lavar el sedimento celular mediante adición de 1 mL de PBS estéril, resuspensión por medio de pipeteo y centrifugación de 5 minutos a 1200 rpm. Descartar el sobrenadante.
4. Congelar el sedimento celular a -80°C hasta su uso.

5.4.1.6. Congelación de células

Al contrario que la descongelación, la congelación debe realizarse muy lentamente para evitar cambios bruscos de temperatura y la formación de cristales de hielo que podrían dañar y disminuir la viabilidad de las células. Idealmente, se debe tratar que las líneas posean el menor número de pases posible y así, el mínimo de alteraciones. Proceder de igual forma que durante la obtención del sedimento celular hasta el paso nº 3 (inclusive). A continuación:

1. Resuspender mediante pipeteo el sedimento celular en el medio de cultivo apropiado para la línea celular con un 5% de DMSO, el cual impide la formación de cristales. Debe tenerse en cuenta el total de criotubos a preparar, cada uno de los cuales albergará 1 mL de la suspensión final; y la concentración de células de partida, pues cada criotubo debe tener $1 \cdot 10^6$ células aproximadamente. En nuestro caso, al sedimento obtenido a partir de un T-175 se añadieron 15 mL de medio para preparar 15 criotubos.
2. Repartir 1 mL de la suspensión celular en criotubos previamente rotulados.
3. Dejar los criotubos en una cubeta con isopropanol y dejarla a -80°C durante 24 horas para que el cambio de temperatura sea gradual.
4. Transferir los criotubos al tanque de nitrógeno líquido para su conservación.
5. Al cabo de unas 48 h, descongelar un criotubo para comprobar la viabilidad celular.

5.4.2. Búsqueda bioinformática en bases de datos

Con el objetivo de confirmar y apoyar los resultados obtenidos del análisis de expresión de muestras tumorales de NSCLC mediante microarray y su posterior validación por qPCR, se consultaron distintas bases de datos de perfiles de expresión tales como *ONCOMINE* (Rhodes et al., 2004), *GEO Database* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Barrett et al., 2013; Edgar et al., 2002), *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) del *Broad Institute* (Barretina et al., 2012) y *Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal* del *National Institutes of Health* (NIH) (Lonsdale et al., 2013).

También se reanalizaron los datos de perfiles de expresión obtenidos por microarray en estudios independientes de colaboradores realizados en tumores primarios (código de acceso GEO, GSE8569) (Angulo et al., 2008) y líneas celulares de cáncer de pulmón (código de acceso GEO, GSE14079) (Medina et al., 2009).

5.4.3. Extracción de ARN total

Para todos los experimentos de ensayos funcionales, el ARN total se extrajo mediante el reactivo *Trizol Reagent* (Gibco) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Todo el proceso se realizó en frío para evitar la degradación del ARN. La concentración y pureza del ARN de cada muestra se midió mediante técnicas espectrofotométricas utilizando un *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific), el cual calcula los ratios 260/280 y 260/230. Una vez extraídos los ARN se almacenaron a -80°C .

5.4.4. Reacción de reverso-transcripción (RT)

La conversión de ARN a ADNc (ADN complementario), el cual es mucho más estable, se llevó a cabo mediante una reacción de reverso-transcripción (RT) con oligos *random* y 1 µg de ARN total, usando el kit *iScript* (BioRad) y siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 9 y 10). Los ADNc extraídos se almacenaron a -20° C.

Mezcla de reacción	
Master mix 5X (iScript)	4 µL
Reverso-transcriptasa	1 µL
Oligos <i>random</i>	2 µL
ARN total (1 µg)	variable
H ₂ O	variable
Volumen total	20 µL

Tabla 9. Mezcla de reacción de la reverso-transcripción.

Condiciones RT	
5 min	25° C
30 min	42° C
5 min	85° C
almacenar	4° C

Tabla 10. Programa de temperaturas de la reacción de reverso-transcripción.

5.4.5. Reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Tras la obtención del ADNc se realizaron PCRs cuantitativas a tiempo real (qPCRs). La qPCR consiste en una reacción en cadena de la polimerasa que se realiza en un termociclador con capacidad de detectar, en cada muestra, la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Con las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos se detecta la generación exponencial de ADN de doble cadena empleando un fluorocromo, usualmente *SYBR Green* (excitación a λ máx. = 488 nm, y emisión a λ máx. = 522 nm), el cual es capaz de unirse a todas las dobles cadenas formadas durante la PCR. El empleo de *SYBR Green*, permite también evaluar el tamaño de los fragmentos amplificados de ADN a partir de la temperatura de fusión (T_m , *melting temperatura*), mediante el análisis de las curvas de disociación.

Habitualmente, la qPCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL utilizando 10-100 ng de ADNc de cada muestra, una concentración final de 0,5 µM de cada oligo y el kit *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 11, 12 y 13). La reacción se llevó a cabo por triplicado para todas las muestras en placas de 96 pocillos y utilizando oligos para la amplificación del gen diana y del control endógeno. El termociclador usado fue el sistema *ABI 7500* (Applied Biosystems).

Mezcla de reacción	
Supermix 2X (iTaQ)	5 μ L
Oligo sentido (10 μ M)	0,5 μ L
Oligo anti-sentido (10 μ M)	0,5 μ L
ADNc (20 ng)	variable
Volumen total	10 μ L

Tabla 11. Mezcla de reacción de la qPCR.

Condiciones qPCR		
pre-incubación	2 min	50° C
	30 s	95° C
40 ciclos	15 s	95° C
	60 s	60° C
curva de disociación	15 s	95° C
	60 s	60° C
	30 s	95° C
	15 s	60° C

Tabla 12. Programa de temperaturas de la reacción de qPCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
TBP-Fw	sentido (<i>forward</i>)	CACGCCAGCTTCGGAGAGT
TBP-Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GGCACGAAGTGCAATGGTCC
GADPHq-HF	sentido (<i>forward</i>)	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GADPHq-HR	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GAAGATGGTGATGGGATTC

Tabla 13. Secuencias de los oligos utilizados para la amplificación de *Tbp* y *Gadph* (controles endógenos usados en la reacciones de qPCR).

5.4.5.1. Análisis de datos

Una vez realizada la qPCR, se procedió a analizar los datos obteniendo finalmente el nivel de expresión relativa \pm la desviación estándar (Fig. 26).

El análisis de expresión génica relativa utilizado fue el método comparativo de Ct o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, el cual muestra los datos del gen de interés relativos a un gen calibrador o control interno (control endógeno) (Schmittgen *et al.*, 2008).

En primer lugar, se calcularon los valores de Ct de los triplicados de cada muestra y se realizaron las medias aritméticas de los mismos. Posteriormente, el nivel de expresión del gen diana objeto de estudio en cada muestra problema se normalizó usando el nivel de expresión del control endógeno de la misma muestra. Una vez hecho esto, los datos se calibraron utilizando para ello los resultados obtenidos de una muestra o línea celular control. Puesto que el valor de Ct es una medida proporcional al logaritmo negativo de la concentración de la

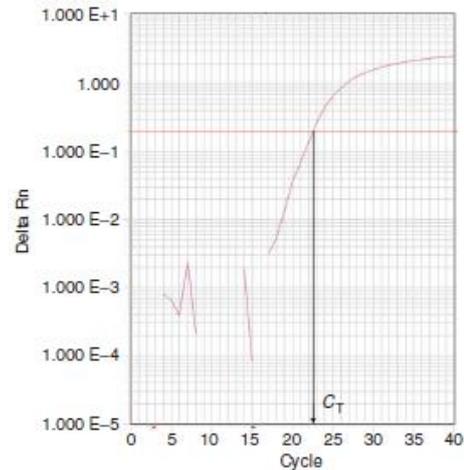
secuencia diana, para conseguir los datos de nivel de cambio (FC, *fold change*) de cada muestra fue necesario transformar dichos datos.

Así, la ecuación final utilizada fue:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$= 2^{-[(Ct_{gen\ diana}) - (Ct_{gen\ end\ ógeno})_{muestra\ problema}] - [(Ct_{gen\ diana}) - (Ct_{gen\ end\ ógeno})_{muestra\ control}]}$$

Figura 26. Ejemplo de resultado de qPCR típico en una PCR de 40 ciclos y cálculo del Ct. El punto de intersección entre la curva de amplificación y el umbral (más conocido por el anglicismo *threshold* y representado por una línea horizontal roja) es el Ct. En el ejemplo, el Ct es 22,5 (Schmittgen *et al.*, 2008).



5.4.5.2. Cálculo de errores

Al trabajar experimentalmente, las medidas siempre conllevan un error por la limitada precisión de los instrumentos. Este error se puede expresar como $(x \pm \Delta x)$. Cuando se trabaja matemáticamente con datos que tienen una incertidumbre (error), los errores de medida se transforman en función de la operación que se les aplica. Esto se denomina *propagación de errores*.

Para el cálculo de errores del análisis de datos de qPCR se trabajó con las desviaciones estándar (SD, del inglés) y se aplicaron las reglas de propagación de errores apropiadas para cada una de las siguientes operaciones llevadas a cabo para calcular el FC mediante la aplicación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En primer lugar, se calculó la SD de los valores de Ct para cada conjunto de triplicados (tanto del gen diana como del gen control endógeno) de todas las muestras. A continuación, se procedió de forma análoga a la del cálculo de FC con los valores de Ct, normalizando el error de cada gen diana con el del gen endógeno de la misma muestra y, posteriormente, calibrando los errores obtenidos de cada muestra con el de la muestra control. Finalmente se transformaron los datos.

Las fórmulas de propagación de errores aplicadas fueron:

$$f = (x \pm \Delta x) - (y \pm \Delta y) = (x - y) \pm \sqrt{(\Delta x)^2 + (\Delta y)^2}$$

$$f = a^{(x \pm \Delta x)} = a^x \pm a^x \Delta x \ln a$$

5.4.6. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de diferente tamaño. El ADN puede localizarse en el gel con bromuro de etidio, el cual es un agente intercalante fluorescente que se utiliza para poder visualizar el ADN sobre un transiluminador de radiación ultravioleta.

Habitualmente, las reacciones de PCR y las digestiones enzimáticas de ADN fueron sometidas a electroforesis en gel con bromuro de etidio y un porcentaje de agarosa variable y relacionado al tamaño de los fragmentos de ADN a separar. El voltaje y tiempo de duración de la corriente eléctrica aplicada también fue variable atendiendo al tamaño de los fragmentos; sin embargo, normalmente se utilizó una corriente eléctrica de 100 V durante 45 minutos a través de un tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato pH 8 y 1 mM EDTA). Se usaron, además, 5 μ L de un marcador de peso molecular de 100 pb (*INTRON PCR 100 bp Ladder Molecular Weight DNA Marker*) o 1 Kb (*INTRON PCR 1 Kp Ladder Molecular Weight DNA Marker*).

5.4.7. Western blot (WB)

El Western Blot (WB) o inmunoblot es una técnica de análisis utilizada para la detección y cuantificación de proteínas específicas en una muestra que, por regla general, contiene gran cantidad de proteínas mezcladas. Las proteínas de la muestra se separan mediante electroforesis en gel de acrilamida en función de su peso molecular. A continuación, se utiliza un anticuerpo específico para detectar la proteína de interés por reacción enzimática o fluorescencia. El resultado aporta información sobre el peso molecular de la proteína y su cantidad relativa en la muestra.

5.4.7.1. Lisis celular

Para la extracción de proteínas celulares, una vez obtenido el sedimento celular como se ha descrito, se resuspendió éste en 30-50 μ L de tampón RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% *desoxicolato sódico*, 0,1% SDS y 50 mM Tris-HCl pH 7,5) al que se le habían añadido en el momento de uso inhibidores de proteasas (PMSF, C^F =[0,2 mM]; OV4, C^F =[7 mM] y *cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante). Se incubó 15 min en hielo y se centrifugó 10 min a 14.000 rpm y 4° C. Una vez centrifugado, los restos de membranas y organelas celulares habían sedimentado, quedando un sobrenadante que contenía las proteínas celulares. Este sobrenadante se guardó a -20° C.

5.4.7.2. Cuantificación de proteínas

Se cuantificaron entonces la cantidad de proteínas totales mediante el método Bradford, el cual se basa en la unión de un colorante hidrofóbico, *Comassie Blue G-250* (también

Serva Blue), a las proteínas, concretamente a aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Así, en solución ácida presenta un color pardo; sin embargo, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Las proteínas se unen así al colorante para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible, simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.

Para la cuantificación se utilizó una placa de 96 pocillos con un volumen final de 10 μL /pocillo en la cual se preparó una curva patrón con 6 puntos haciendo diluciones seriadas 1:2 de albúmina de suero bovino (BSA) [2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] en NaCl [150 mM] empezando con 10 μg . Así, los puntos de la curva fueron 10 μg , 5 μg , 2,5 μg , 1,25 μg , 0,265 μg y 0,3125 μg . También se preparó un blanco con 10 μL de NaCl [150 mM]. Las muestras se prepararon por triplicado utilizando para cada réplica 1 μL de muestra (sobrenadante) diluido en 9 μL de NaCl [150 mM].

A continuación, se añadieron 200 μL de reactivo *Bradford* (Amresco) a cada pocillo, incluyendo la curva patrón, el blanco y cada réplica de las muestras; y se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm en el sistema de multi-detección *GloMax* (Promega).

A los datos de absorbancia obtenidos en la curva patrón y las muestras, se les sustrajo la absorbancia obtenida en el pocillo blanco y se calculó la media aritmética de los triplicados de cada muestra problema. Se procedió entonces a calcular la ecuación de la recta ($y = ax \pm b$) (Fig. 27) que resulta al enfrentar las concentraciones de BSA conocidas de cada punto de la curva patrón (10 μg , 5 μg , 2,5 μg , 1,25 μg , 0,265 μg y 0,3125 μg) con los datos de absorbancia correspondientes.

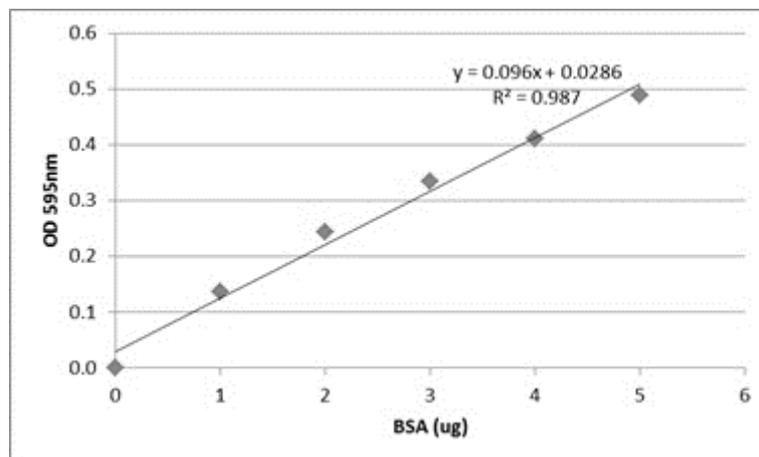


Figura 27. Ejemplo de la curva patrón obtenida al enfrentar las concentraciones de BSA con los datos de absorbancia correspondientes (imagen de Abcam, ab102535).

Se procedió entonces a extrapolar los datos de absorbancia media de las muestras problema aplicando la ecuación de la recta obtenida, siendo x la concentración de proteínas en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e y la absorbancia a 595 nm.

5.4.7.3. Preparación de la muestra

Conociendo la concentración de la muestra, se tomó entonces el volumen correspondiente a 25 µg de proteína total y se añadió la cantidad proporcional de tampón de carga 4X (8% SDS, 0,4% azul de bromofenol, 40% glicerol, 200 mM Tris-HCl pH 6,8 y 400 mM DTT o β-mercaptoetanol), se agitó por vórtex, se centrifugó brevemente y se desnaturalizó la muestra calentándola 5 min a 95° C.

5.4.7.4. Separación electroforética (SDS-PAGE)

Para la separación electroforética (SDS-PAGE) de las proteínas de la muestra se utilizó un sistema *Mini-PROTEAN Tetra Vertical* (Fig. 28) para geles de 1,5 mm (BioRad) en el que se prepararon geles del 10% de poliacrilamida. Para la preparación de estos geles se procedió primero a elaborar 7 mL del gel separador partiendo de una solución de acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) al 40% (10% acrilamida-bis, 0,1% SDS y 246 mM Tris-HCl pH 8,8) que polimeriza gracias a la adición de un volumen del 0,05% del volumen final del gel separador de TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) que actúa como iniciador y de un volumen del 1% del volumen final del gel separador de persulfato amónico (APS) al 10% que actúa como catalizador. Se dejó polimerizar en anoxia con 1 mL de isopropanol.

Posteriormente, se retiró el isopropanol, se lavó con agua bidestilada, se secó y se prepararon 4 mL del gel concentrador (6% acrilamida-bis, 0,1% SDS y 150 mM Tris-HCl pH 6,8) que polimeriza gracias a la adición de un volumen del 0,1% del volumen final del gel concentrador de TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y de un volumen del 1% del volumen final del gel concentrador de persulfato amónico (APS) al 10%.



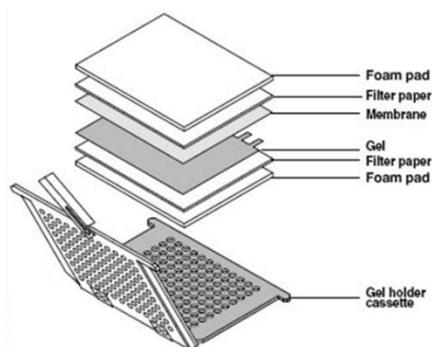
Figura 28. Sistema *Mini-PROTEAN Tetra Vertical* (BioRad) para geles de 1,5 mm (imagen de BioRad).

Una vez polimerizado el gel, se introdujo éste en un tampón de migración (190 mM glicina, 0,1% SDS y 25 mM Tris), se cargaron las muestras en cada calle del gel (25 µg de proteína con tampón de carga por calle) y 5 µL de un marcador de pesos moleculares en una calle a parte (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, BioRad). Se conectó entonces la cubeta a la fuente de alimentación y se dejó correr a 60 V hasta que el frente de migración atravesó el gel concentrador (30-45 min). Se subió entonces el voltaje a 120 V hasta que el frente de migración llegó al final del gel separador (1-1,5 h).

Al hacer esto, se aplica un campo eléctrico que provoca el movimiento de las proteínas hacia el polo positivo. Al haberse tratado las proteínas con SDS, éstas se desnaturalizan perdiendo su estructura secundaria y terciaria y, además, adquieren cargas negativas en proporción a su masa. El resultado es que las proteínas se separan en función de su peso molecular, migrando más rápidamente las proteínas más pequeñas por quedar menos retenidas en la matriz del gel.

5.4.7.5. Transferencia húmeda

Una vez realizada la electroforesis es necesario marcar la proteína para su visualización; sin embargo, el gel de poliacrilamida no es una superficie adecuada para ello ya que es frágil, difícil de manipular y los anticuerpos no son retenidos en él. Por todo ello, es necesario transferir las proteínas a otro soporte de fluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés). El principio de la



transferencia es muy similar al del SDS-PAGE, ya que las proteínas cargadas negativamente migran hacia el polo positivo bajo el efecto de un campo eléctrico. Sin embargo, en este caso, se intercala una membrana de PVDF entre el gel y el electrodo positivo de manera que las proteínas quedan adheridas a la membrana en la misma disposición en la que estaban en el gel.

Figura 29. Esquema del orden de los componentes de la transferencia húmeda (imagen de BioRad).

Para la transferencia se necesitó entonces pretratar la membrana de PVDF con metanol debido a su alta hidrofobicidad y la ausencia de surfactantes, lo que evita su completa interacción con los tampones acuosos del proceso. Una vez activada la membrana, se pusieron en contacto directo el gel de poliacrilamida y la membrana, los cuales se colocaron entre varias hojas de papel *WhatMan* y 2 esponjas húmedas (Fig. 29), y se sumergieron en tampón de transferencia (25 mM Tris, 190 mM glicina y 20% de metanol). Se conectó entonces la cubeta a la fuente de alimentación y se dejó correr a 110 V durante 1 h.

5.4.7.6. Bloqueo e inmuno-detección

Finalizada la transferencia, se extrajo la membrana y se bloqueó durante 20 min con una solución de leche en polvo desnatada al 3% en T-PBS (0,1% de Tween en PBS) en agitación. A continuación se sumergió en una dilución apropiada del anticuerpo primario en solución de bloqueo (Tabla 14) y se incubó a 4° C durante unas 16 h en agitación. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 min en T-PBS en agitación y se sumergió de nuevo la membrana en una dilución apropiada del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) en solución de bloqueo (Tabla 15) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en agitación. Nuevamente se hicieron 3 lavados de 5 min en T-PBS en agitación y se procedió a revelar la membrana por quimioluminiscencia, según el sistema que se detalla en la Tabla 16 (Harlow *et al.*, 1999) y utilizando el sistema de detección *IQ Las 4000* (GE Healthcare).

anticuerpo primario	dilución	referencia
PKP1	1:250	Sigma, HPA027221
β -Actina	1:5000	Sigma, A5441
p21	1:1000	Cell Signaling, 2947
p16	1:1000	Bethyl, A301-267A
Caspasa 3	1:1000	Cell Signaling, 9662
c-Myc	1:1000	Cell Signaling, 5605
DDK	1:1000	Origene, ta50011-30

Tabla 14. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot y diluciones correspondientes.

anticuerpo secundario	dilución	referencia
anti-rabbit HRP	1:2000	Dako, P0448
anti-mouse HRP	1:1000	Dako, P0447

Tabla 15. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot y diluciones correspondientes.

	Solución A	Solución B
Preparación	50 mg de luminol en 200 mL de Tris-HCl 0,1M pH 8,6. Conservar protegido de la luz a 4º C.	11 mg de ác. p-cumárico en 11 mL de DMSO. Conservar protegido de la luz temperatura ambiente.

Tabla 16. Protocolo de preparación de la disolución para la detección por quimioluminiscencia. Al utilizar, mezclar 3 mL de la solución A con 30 µL de la solución B y 0,9 µL de H₂O₂ al 30% para cada membrana a revelar.

5.4.7.7. Cuantificación de bandas

Para la cuantificación de las bandas de las imágenes obtenidas el sistema de detección *IQ Las 4000* (GE Healthcare) se utilizó la herramienta *Plot Lanes* del software gratuito *ImageJ* v1.49c (Rasband, W.S., 1997-2015, <http://imagej.nih.gov/ij>) (Schneider *et al.*, 2012) para calcular el área de cada pico proporcional a la intensidad de cada banda.

Una vez obtenida el área de cada banda, se normalizaron los datos de cada muestra dividiendo el área de la banda de la proteína problema entre el área de la banda de la proteína usada como control endógeno. Después, los datos se calibraron utilizando para ello los resultados obtenidos de una muestra o línea celular control. Los datos se presentaron como porcentajes relativos, siendo la expresión de la muestra control el 100%.

$$\% \text{ expresión relativa} = \frac{(\text{área banda problema}/\text{área banda problema})_{\text{muestra problema}}}{(\text{área banda problema}/\text{área banda problema})_{\text{muestra control}}}$$

5.4.8. Cribado de PKP1 en líneas NSCLC y líneas primarias

5.4.8.1. Cultivo celular

Para el cribado de líneas con expresión de PKP1 se emplearon un total de 30 líneas celulares humanas. De ellas, 3 líneas celulares fueron líneas primarias de NSCLC (2 SCC y 1 AC), 24 líneas celulares fueron líneas tumorales de NSCLC (8 SCC, 13 AC y 3 LCC), 1 línea fue SCLC (Tabla 17) y 5 líneas fueron de tejidos diferentes a pulmón (Tabla 18). Las líneas fueron descongeladas y cultivadas como se ha descrito y se obtuvo un sedimento celular para cada una de ellas.

	Cáncer de pulmón			
	NSCLC			SCLC
	AC	SCC	LCC	
DMEM	H1793, H23, H441	EBC-1, H2170b, PC-14, SK-MES-1	H1299, H460	H446
RPMI-1640	A427, H1435, H1568, H1693, H1703, H1975, H838, Hs618.T, SK-LU-1, LC319	H2170v, PC-10, LC1/sq	H661	-
RPMI-1640 + 20% SBF	-	EPLC-272H	-	-
DMEM/F12 suplementado*	70110063	70110062, 70110072	-	-

Tabla 17. Líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas en los ensayos funcionales. Se especifica medio de cultivo y subtipo histológico para cada una de ellas.

(*) Medio DMEM/F12 suplementado con plasmocín, EGF, FGF, hidrocortisona, triiodo-L-tironina y glucagón, para el cultivo de líneas primarias.

Línea celular	Origen	Tipo Histológico	Medio
HeLa	cérvix	AC	DMEM
FaDu	faringe	SCC	DMEM
HaCaT	piel	SCC	DMEM
A431	piel	SCC	DMEM
SSC13	piel de cara	SCC	DMEM

Tabla 18. Líneas celulares no pulmonares utilizadas en los ensayos funcionales. Se especifica el tejido de origen, subtipo histológico y medio de cultivo para cada una de ellas.

5.4.8.2. Reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Una vez obtenido el sedimento celular de las líneas anteriormente descritas, se extrajo ARN y se llevó a cabo la reacción de RT como se ha detallado anteriormente. Tras la obtención del ADNc se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) usando el termociclador *ABI 7500* (Applied Biosystems).

En este caso, la qPCR se llevó a cabo utilizando 100 ng de ADNc de cada muestra, una concentración final de 0,9 μ M de cada oligo y el kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 19 y 20). La reacción se llevó a cabo por triplicado para todas las muestras en placas de 96 pocillos y utilizando oligos para la amplificación de *Pkp1* y *Gadph* como control endógeno (Tabla 21). Posteriormente, los datos se analizaron con el método comparativo de Ct o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como se ha descrito.

Mezcla de reacción	
Master mix 2X (LightCycler)	10 μ L
Oligo sentido (10 μ M)	2 μ L
Oligo anti-sentido (10 μ M)	2 μ L
ADNc (100 ng)	10 μ L
Volumen total	22 μ L

Tabla 19. Mezcla de reacción de la qPCR.

Condiciones qPCR		
pre-incubación	2 min	50° C
	5 min	95° C
40 ciclos	10 s	95° C
	15 s	60° C
	30 s	72° C
curva de disociación	15 s	95° C
	60 s	60° C
	30 s	95° C
	15 s	60° C

Tabla 20. Programa de temperaturas de la reacción de qPCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
FW-PKP1-4	sentido (<i>forward</i>)	TCAGCAACAAGAGCGACAAG
RV-PKP1-4	anti-sentido (<i>reverse</i>)	TCAGGTAGGTGCGGATGG
GADPHq-HF	sentido (<i>forward</i>)	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GADPHq-HR	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GAAGATGGTGATGGGATTC

Tabla 21. Secuencias de los oligos utilizados para la amplificación de *Pkp1* y *Gadph* (control endógeno).

5.4.8.3. Western blot (WB)

Tras los resultados de expresión génica obtenidos por qPCR para el cribado de PKP1, se llevaron a cabo análisis de la expresión proteica mediante WB, como se ha descrito. En este caso concretamente, se utilizaron como anticuerpos primarios anti-PKP1 (anticuerpo policlonal producido en conejo, HPA027221; Sigma, St Louis, MO, USA) a una dilución de 1:250 y anti- β -actina (anticuerpo monoclonal producido en ratón, A5441; Sigma, St Louis, MO, USA) a 1:5.000. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpo anti-rabbit (anticuerpo policlonal producido en cabra, P 0448 Dako) a una dilución 1:2.000 y anti-mouse (anticuerpo policlonal producido en cabra, P 0447 Dako) a 1:1.000.

5.4.9. Expresión semicuantitativa de las PKP's y otros genes del desmosoma

Para determinar los niveles de expresión de los principales genes del desmosoma, tales como *Pkp1*, *Pkp2*, *Pkp3*, *Pkp4*, *Dsg1* y *Dsp*, se realizaron una serie de PCRs semicuantitativas en varias líneas de NSCLC utilizando como control β -actina (ACTB). Las líneas celulares SCC testadas fueron SK-MES-1, EPLC-272H, H2170 y H520. Además, se testó la línea H1703 (AC).

4.4.9.1. ARN, reverso-transcripción, PCR y electroforesis en gel de agarosa

La extracción de ARN para las líneas celulares se realizó según la metodología detallada anteriormente. Todas las muestras se sometieron a una reacción de reverso-transcripción (RT) siguiendo el protocolo descrito previamente.

A continuación se realizaron 2 reacciones de PCR semicuantitativa diferentes:

1. La primera PCR se diseñó para la cuantificación relativa de *Pkp2*, *Pkp3*, *Pkp4*, *Dsg1*, *Dsp* y β -actina. Esta PCR se llevó a cabo utilizando 25 ng de ADNc de cada muestra, una concentración final de 1 μ M de cada oligo y el kit *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 22 y 23). Así, los amplicones presentan un tamaño de 120 pb para *Pkp2*, 223 pb para *Pkp3*, 142 pb para *Pkp4*, 217 pb para *Dsg1*, 311 pb para *Dsp* y 452 pb para ACTB. La secuencia de los oligos utilizados se recoge en la Tabla 24.

Mezcla de reacción	
Master mix 2X (LightCycler)	5 μ L
Oligo sentido (10 μ M)	1 μ L
Oligo anti-sentido (10 μ M)	1 μ L
ADNc (25 ng)	0,5 μ L
Volumen total	10 μ L

Tabla 22. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Condiciones PCR		
pre-incubación	30 s	98° C
28 ciclos	30 s	98° C
	30 s	60° C
	30 s	72° C
elongación final	10 min	72° C
	5 min	4° C

Tabla 23. Mezcla de reacción de la PCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
PKP2 Fw	sentido (<i>forward</i>)	GCTGCTCCGTCCTTCTGTA
PKP2 Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GGAGTGGTAGGCTTTGGCA
PKP3 Fw	sentido (<i>forward</i>)	TGATGAGCTTCGCAAAAATG
PKP3 Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CTGAGAGGCTGAGCTGAGGT
PKP4 Fw	sentido (<i>forward</i>)	ACCTTCACTGCAAAGGACTG
PKP4 Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CCCAAGCTGACTATGCTGAC
DSG1 Fw	sentido (<i>forward</i>)	TCCATAGTTGATCGAGAGGTCAC
DSG1 Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CTGCGTCAGTAGCATTGAGTATC
DSP Fw	sentido (<i>forward</i>)	GCCCTGAGGCGGCAGTTACTC
DSP Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	AGTTCCAGGGTCCGGTTGTTGC
ACTB Fw	sentido (<i>forward</i>)	CGTACCACTGGCATCGTGAT
ACTB Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG

Tabla 24. Secuencias de los oligos utilizados para la amplificación de genes del desmosoma.

2. La segunda PCR se diseñó para la cuantificación relativa de *Pkp1*, debido al bajo nivel de expresión de este gen. Esta PCR se llevó a cabo utilizando 100 ng de ADNc de cada muestra, una concentración final de 0,5 μ M de cada oligo y el kit *iTaq Universal*

SYBR Green Supermix (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 25 y 26). Así, los amplicones presentan un tamaño de 120 pb para *Pkp1*. La secuencia de los oligos utilizados se recoge en la Tabla 27.

Mezcla de reacción	
Master mix 2X (LightCycler)	5 μ L
Oligo sentido (10 μ M)	1 μ L
Oligo anti-sentido (10 μ M)	1 μ L
ADNc (100 ng)	2 μ L
Volumen total	10 μ L

Tabla 25. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Condiciones PCR		
pre-incubación	30 s	98° C
30 ciclos	30 s	98° C
	30 s	60° C
	30 s	72° C
	10 min	72° C
elongación final	10 min	4° C

Tabla 26. Mezcla de reacción de la PCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
FW-PKP1-4	sentido (<i>forward</i>)	TCAGCAACAAGAGCGACAAG
RV-PKP1-4	anti-sentido (<i>reverse</i>)	TCAGGTAGGTGCGGATGG

Tabla 27. Secuencias de los oligos utilizados para la amplificación de *Pkp1*.

Finalmente, las reacciones de PCR fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio, utilizando una corriente eléctrica de 100 V durante 45 minutos a través de un tampón TAE 1X siguiendo el protocolo descrito. Se usaron, además, 5 μ L de un marcador de peso molecular de 100 pb (*INTRON PCR 100 bp Ladder Molecular Weight DNA Marker*).

5.4.10. Curva de crecimiento

Con el objetivo de caracterizar el tiempo de duplicación de la línea celular SK-MES-1, dato que no está disponible en la ATCC para esta línea, se decidió hacer el cálculo manual mediante una curva de crecimiento. Para ello, se realizaron 2 curvas paralelas por investigadores independientes para minimizar el error de conteo. Cada curva se hizo por duplicado y presentó 7 puntos (correspondientes a 7 días). Así pues, se sembraron simultáneamente, y para cada curva, 14 placas de 100 mm de diámetro (56 cm²) con $2 \cdot 10^5$ células. A las 24 h de la siembra, se colectaron las células de las placas del primer punto de la curva y se contaron manualmente al microscopio con la ayuda de una cámara de Neubauer. Cada 24 h se repitió la operación hasta terminar las curvas a los 7 días.

Los datos obtenidos se utilizaron para el cálculo del tiempo de duplicación utilizando el algoritmo del software online *Doubling Time* (Roth V, 2006, http://www.doubling-time.com/compute_more.php), el cual utiliza el modelo de regresión exponencial de mínimos cuadrados de Eric W. Weisstein (Mathworld- A Wolfram Web Resource, <http://mathworld.wolfram.com/LeastSquaresFittingExponential.html>).

5.4.11. Isoforma de *Pkp1*

Debido a la existencia de dos isoformas de *Pkp1* (a y b) se llevaron a cabo reacciones de PCR específicas con el fin de determinar qué isoformas de *Pkp1* se expresaban en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H, utilizando como control 3 muestras de tejido pulmonar sano (S-32, S-37 y S-68) utilizadas en los ensayos de expresión por microarray y su posterior validación por qPCR (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011).

5.4.11.1. ARN, reverso-transcripción, PCR y electroforesis en gel de agarosa

La extracción de ARN para las líneas celulares se realizó según la metodología detallada anteriormente. Por otro lado, las muestras de tejido sano se procesaron según lo descrito en el apartado de validación de los datos del microarray por qPCR. Todas las muestras se sometieron a una reacción de reverso-transcripción (RT) siguiendo el protocolo descrito previamente.

A continuación se realizaron 2 reacciones de PCR diferentes:

1. La primera PCR es capaz de discriminar la isoforma de *Pkp1* que se expresa atendiendo al tamaño del amplicón. Esta PCR se llevó a cabo utilizando 20 ng de ADNc de cada muestra, una concentración final de 0,5 μ M de cada oligo y la ADN polimerasa y Master Mix de Biotools, siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 28 y 29). Así, isoformas de *Pkp1a* presentan un amplicón de 161 pb, mientras que la isoforma *Pkp1b* amplifica un tamaño de 224 pb. La secuencia de los oligos utilizados se recoge en la Tabla 30.

Mezcla de reacción		Condiciones PCR		
Master Mix 10X (Biotools)	2 μ L	pre-incubación	5 min	94° C
Taq Polimerasa (Biotools)	0,5 μ L	35 ciclos	30 s	94° C
Oligo sentido (10 μ M)	1 μ L		30 s	55° C
Oligo anti-sentido (10 μ M)	1 μ L		30 s	72° C
dNTPs (10 mM)	0,4 μ L	elongación final	10 min	72° C
DMSO	1 μ L		10 min	4° C
ADNc (20 ng totales)	2 μ L			
H ₂ O	12,1 μ L			
Volumen total	20 μ L			

Tabla 29. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Tabla 28. Mezcla de reacción de la PCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
Fw-PKP1-isoforms	sentido (<i>forward</i>)	GCTGGTGCGATGGCAATAGC
Rv-PKP1-isoforms	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CTGGACATAGGCCATGAGGG

Tabla 30. Secuencias de los oligos utilizados para la amplificación de *Pkp1*.

2. La segunda PCR es específica de la isoforma de *Pkp1b*, ya que uno de los oligos anilla justamente en el inserto característico de dicha isoforma. Esta PCR se llevó a cabo utilizando 20 ng de ADNc de cada muestra, una concentración final de 0,5 μ M de cada oligo y la ADN polimerasa y Master Mix de Sigma, siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 31 y 32). Así, isoformas de *Pkp1a* no presentan amplificación alguna, mientras que la isoforma *Pkp1b* amplifica un tamaño de 384 pb. La secuencia de oligos utilizados se recoge en la Tabla 33.

Para esta PCR se incluyó un control positivo consistente en células de la línea SK-MES-1 transfectadas durante 72 h con 1 μ g de ADN de un plásmido comercial, el cual contiene la secuencia de *Pkp1b* (pCMV6-Entry-PKP1b [NM_000299], OriGene) y 5 μ L de *Lipofectamina 2000*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez finalizada la transfección, se procedió a la obtención del sedimento celular, a partir del cual se extrajo ARN y se realizó la reacción de RT como se ha descrito.

Mezcla de reacción	
Master Mix 10X (Sigma)	2 μ L
Taq Polimerasa (Sigma)	0,2 μ L
MgCl ₂	2 μ L
Oligo sentido (10 μ M)	1 μ L
Oligo anti-sentido (10 μ M)	1 μ L
dNTPs (10 mM)	0,4 μ L
DMSO	1,5 μ L
ADNc (20 ng totales)	2 μ L
H ₂ O	9,9 μ L
Volumen total	20 μ L

Tabla 31. Mezcla de reacción de la PCR.

Condiciones PCR		
pre-incubación	5 min	94° C
35 ciclos	30 s	94° C
	30 s	55° C
	30 s	72° C
elongación final	10 min	72° C
	10 min	4° C

Tabla 32. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
Fw-PKP1-1b	sentido (<i>forward</i>)	AAAGGGCCACTAGTAGCAGGGTGA
Rv-PKP1-4	anti-sentido (<i>reverse</i>)	TCAGGTAGGTGCGGATGG

Tabla 33. Secuencias de los oligos utilizados para la amplificación de *Pkp1b*.

Finalmente, las reacciones de PCR fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio, utilizando una corriente eléctrica de 100 V durante 30 minutos a través de un tampón TAE 1X siguiendo el protocolo descrito. Se usaron, además, 5 μ L de un marcador de peso molecular de 100 pb (*INTRON PCR 100 bp Ladder Molecular Weight DNA Marker*).

5.4.12. Secuenciación de *Pkp1*

Con el fin de determinar posibles alteraciones en la secuencia de *Pkp1* en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H, se diseñaron reacciones de PCR específicas para la secuencia de ADNc, cuyos amplicones solapaban y abarcaban la secuencia codificante (del inglés, CDS)

completa de *Pkp1*. Como control, se utilizó 1 muestra de tejido pulmonar sano (S-32) utilizada en los ensayos de expresión por microarray y su posterior validación por qPCR (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011).

5.4.12.1. ARN, reverso-transcripción, PCR, electroforesis en gel de agarosa, purificación de bandas y secuenciación

La extracción de ARN para las líneas celulares se realizó según la metodología detallada anteriormente. Por otro lado, la muestra de tejido sano se procesó según lo descrito en el apartado de validación de los datos del microarray por qPCR. Todas las muestras se sometieron a una reacción de reverso-transcripción (RT) siguiendo el protocolo descrito previamente.

A continuación se realizaron una serie de reacciones de PCR diferentes y solapantes hasta abarcar la secuencia codificante de *Pkp1* completa (Fig. 30):

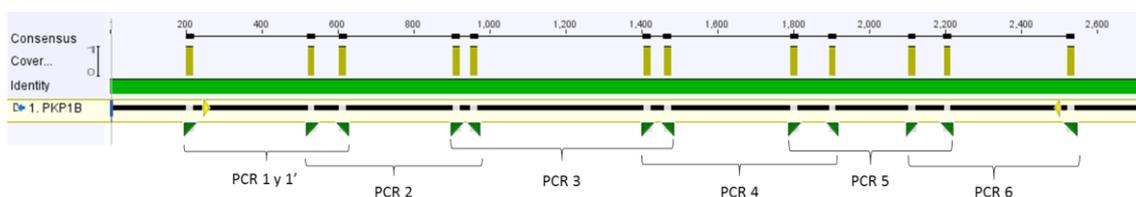


Figura 30. Esquema del diseño de las PCRs solapantes. La línea negra representa la secuencia de ADNc de *Pkp1b* (por ser la isoforma más larga). Los triángulos amarillos representan la región CDS de *Pkp1*, mientras que las parejas de oligos se representan con triángulos verdes conectados por corchetes que indican la nomenclatura de cada PCR.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 20 ng de ADNc para EPLC-272H y 50 ng de ADNc para SK-MES-1 y S-32, una concentración final de 0,5 μ M de cada oligo y la ADN polimerasa y Master Mix de Sigma, siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 34 y 35).

Las parejas de oligos utilizadas, sus secuencias y los tamaños de amplicón obtenidos se muestran en la Tabla 36.

Mezcla de reacción	
Master Mix 10X (Sigma)	2 μ L
Taq Polimerasa (Sigma)	0,2 μ L
MgCl ₂	2 μ L
Oligo sentido (10 μ M)	1 μ L
Oligo anti-sentido (10 μ M)	1 μ L
dNTPs (10 mM)	0,4 μ L
DMSO	1,5 μ L
ADNc (20-50 ng totales)	2 μ L
H ₂ O	9,9 μ L
Volumen total	20 μ L

Tabla 34. Mezcla de reacción de la PCR.

Condiciones PCR		
pre-incubación	5 min	94° C
35 ciclos	30 s	94° C
	30 s	55° C
	30 s	72° C
elongación final	10 min	72° C
	10 min	4° C

Tabla 35. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Identificación	Nombre del oligo	Orientación	Secuencia	Tamaño amplicón	Primer secuenciación
PCR 1	PKP1 seq 5UTR FW	sentido (<i>forward</i>)	GCCTCTGCTCTCCTAGGC	423 pb	RV-PKP1-1
	RV-PKP1-1	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CTCCATCTGGCTGTAGGAGC		
PCR 1'	EcoRI-PKP1-Fw	sentido (<i>forward</i>)	TATAGAATTCATGAACCACTCGCCGCT CAAGACCGCCTTGGCG	382 pb	RV-PKP1-1
	RV-PKP1-1	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CTCCATCTGGCTGTAGGAGC		
PCR 2	FW-PKP1-1	sentido (<i>forward</i>)	AAGTTCACAGGCAGGGAATG	447 pb	FW-PKP1-1 y PKP1 seq 1 RV
	PKP1 seq 1 RV	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GTCCTCACTGCAGATCTTGG		
PCR 3	PKP1 seq 1 Fw	sentido (<i>forward</i>)	CATCTCCTGCAACAAGGACC	577 pb	PKP1 seq 1 Fw
	PKP1 seq 3 RV	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GCAGCCTGTGGCATTGAAGA		
PCR 4	Fw-PKP1-isoforms	sentido (<i>forward</i>)	GCTGGTGCGATGGCAATAGC	507 pb	Fw-PKP1-isoforms y FW-PKP1-4
	RV-PKP1-4	anti-sentido (<i>reverse</i>)	TCAGTATGGTGGCGATGG		
PCR 5	FW-PKP1-4	sentido (<i>forward</i>)	TCAGCAACAAGAGCGACAAG	423 pb	PKP1 seq 4 FW y PKP1 seq 5 FW
	PKP1 seq 2 RV	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CGAGATTGCTGGTATTGCCA		
PCR 6	PKP1 seq 2 FW	sentido (<i>forward</i>)	CCTCCTGAGCAACATGTCC	438 pb	PKP1 seq 2 FW
	PKP1 seq 3UTR RV	anti-sentido (<i>reverse</i>)	GGTCATATCTTCTGCAAGCC		
Oligos de secuenciación	PKP1 seq 4 FW	sentido (<i>forward</i>)	CCTGCCTGAGGAAGAGACC		
	PKP1 seq 5 FW	sentido (<i>forward</i>)	CCTGAGGAAGAGACCAACC		

Tabla 36. Esquema de las parejas de oligos utilizadas, sus secuencias, tamaños de amplicón obtenidos y oligos utilizados para la secuenciación del CDS de *Pkp1*.

Las reacciones de PCR fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, utilizando una corriente eléctrica de 100 V durante 45 minutos a través de un tampón TAE 1X siguiendo el protocolo descrito. Se usaron, además, 5 μ L de un marcador de peso molecular de 100 pb (*INTRON PCR 100 bp Ladder Molecular Weight DNA Marker*).

Una vez resueltos los geles y comprobados los tamaños de banda obtenidos en el transiluminador con ayuda del marcador de pesos moleculares, se procedió a escindir las bandas correctas con ayuda de una hoja de bisturí.

Las bandas fueron purificadas con el kit *GenElute Gel Extraction* (Sigma, NA1111) siguiendo las instrucciones del fabricante. El eluido final (50 μ L) se concentró evaporándolo a 65° C hasta alcanzar un volumen de 25 μ L. Seguidamente, la concentración y pureza del producto de PCR purificado de cada reacción se midió mediante técnicas espectrofotométricas utilizando un *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific), el cual calcula los ratios 260/280 y 260/230.

5.4.12.2. Secuenciación

20 ng totales de los productos de PCR purificados fueron analizados por secuenciación Sanger usando el kit *Big Dye Terminator v3-1 cycle sequencing* (Life Technologies) y el secuenciador *3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizó el polímero *POP-7* (Life Technologies), un capilar de 50 cm y una concentración final de oligo de 0,231 μ M.

5.4.12.3. Análisis de las secuenciaciones

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software on-line *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) y el software *Geneious v4.8.5* (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), utilizando como referencia las secuencias

obtenidas de la base de datos *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent *et al.*, 2002).

Los polimorfismos obtenidos fueron contrastados con la base de datos *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>) (Herrero *et al.*, 2016; Yates *et al.*, 2016).

5.4.13. Silenciamiento génico de *Pkp1* (*Knockdown*)

El silenciamiento génico de *Pkp1* se llevó a cabo en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H mediante transfección de ARNs pequeños interferentes (más conocidos por sus siglas en inglés *siRNAs*). Sin embargo, el sistema se optimizó primero en la línea celular HaCaT (SCC de piel), la cual se usó como control positivo.

Los *siRNAs* son moléculas de ARN de doble cadena no codificante de 20-21 nucleótidos, las cuales se originan a partir de un ARN largo de doble cadena (del inglés, *dsRNA*).

Los *dsRNAs* pueden ser de origen endógeno o de origen exógeno. La enzima responsable del procesamiento de este *dsRNA* en moléculas de *siRNAs* es *Dicer*, la cual corta el *dsARN* y genera *siRNAs* o *miRNAs*. Con la ayuda de *Dicer*, la hebra antisentido del *siRNA* se incorpora en el complejo *RISC* (del inglés, *RNA-induced silencing complex*) dirigiéndolo de manera específica contra el ARNm complementario, el cual es cortado en dos partes que son posteriormente degradadas por la maquinaria celular, suprimiendo así la expresión de los genes diana a nivel post-transcripcional.

Los resultados de este tipo de supresión son similares, y a veces idénticos, a los fenotipos de los mutantes nulos: la supresión puede producir una reducción significativa (*knockdown*) o completa (*knockout*) de los niveles de la proteína diana. La supresión génica (también llamada silenciamiento) realizada por los *siRNAs* es extremadamente específica y sólo afecta al ARNm homólogo (aunque con *siRNAs* sintéticos pueden producirse efectos inespecíficos, denominados efectos *off-target*) al que se unen con una complementariedad perfecta.

Así pues, se sembraron 24 h antes de la transfección en placas de 6 pocillos entre $2 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/pocillo para las líneas HaCaT y SK-MES-1, y $5 \cdot 10^5$ células/pocillo en el caso de EPLC-272H. Transcurridas las 24 h, se transfectó cada pocillo con 3,125 pmol [1,25 nM], 6,25 pmol [2,5 nM], 9,375 pmol [3,75 nM], 12,5 pmol [5 nM] o 18,75 pmol [7,5 nM] de diferentes *Silencer select siRNA* (Ambion, 4392420) diseñados contra la secuencia de *Pkp1* (Tabla 37, Fig. 31) combinados o no, y 5 μ L/pocillo de *Lipofectamina RNAiMAX* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo se utilizó un *Silencer select siRNA* (Ambion, 43920843) cuya secuencia ha sido diseñada para que no sea específica de ningún producto génico. Este control negativo recibe como nombre el anglicismo *Scramble* (SC). Las transfecciones se dejaron incubar 24, 48, 72 o 96 h, tras lo cual se recogió el sedimento celular como se ha descrito.

siRNA	Gen diana	ID	Secuencia sentido	Secuencia anti-sentido
siRNA-PKP1-1	<i>Pkp1</i> (exón 2)	s10580	GGCUGACAAUUACAACUAUtt	AUAGUUGUAAUUGUCAGCCaa
siRNA-PKP1-2	<i>Pkp1</i> (exón 1)	s10582	GCUUUGCCGUCGGACCAAAtt	UUUGGUCCGACGGCAAAGCca
Scramble (SC)	-	4390843	UAACGACGCGACGACGUAAtt	UUACGUCGUCGCGUCGUUAtt

Tabla 37. Secuencias de los siRNAs utilizados para el silenciamiento de *Pkp1*.

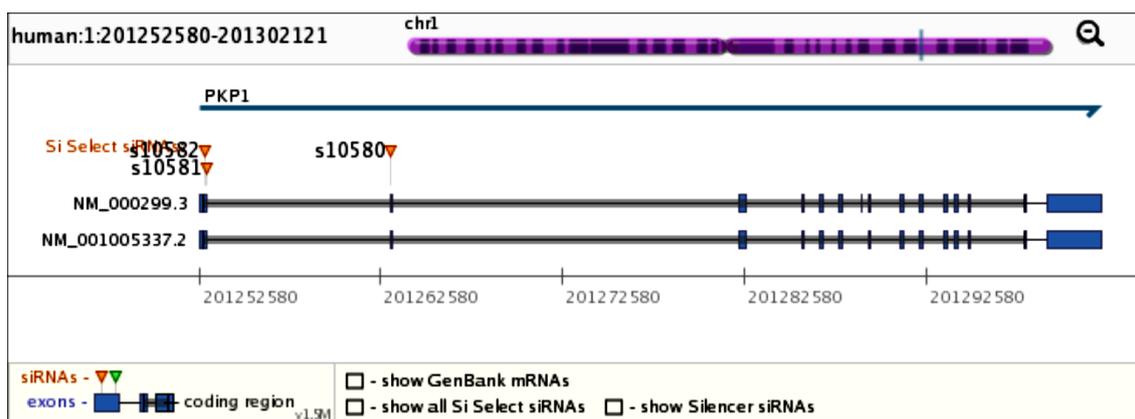


Figura 31. Mapa genómico de *Pkp1* con la localización de las secuencias dianas de los siRNAs utilizados (imagen de Thermo Fisher).

Habitualmente, la línea SK-MES-1 se transfectó en placas de 6 pocillos con 6,25 pmol/pocillo [2,5 nM] de un combinado de siRNA-1 y siRNA-2 de *Pkp1* (o siRNA SC) y 5 μ L/pocillo de *Lipofectamina RNAiMAX* durante 72 h; mientras que la línea EPLC-272H se transfectó en placas de 6 pocillos con 18,75 pmol/pocillo [7,5 nM] de un combinado de siRNA-1 y siRNA-2 de *Pkp1* (o siRNA SC) y 5 μ L/pocillo de *Lipofectamina RNAiMAX* durante 72 h.

En el caso de silenciamiento génico en formatos de placas de 96 pocillos, 24 h antes de la transfección se sembraron $5 \cdot 10^3$ células/pocillo para la línea SK-MES-1 y $5,5 \cdot 10^3$ células/pocillo en el caso de EPLC-272H. Transcurridas las 24 h, se transfectó la línea SK-MES-1 con 0,25 pmol/pocillo [2,5 nM] de un combinado de siRNA-1 y siRNA-2 de *Pkp1* (o siRNA SC); mientras que la línea EPLC-272H se transfectó con 0,75 pmol/pocillo [7,5 nM] de un combinado de siRNA-1 y siRNA-2 de *Pkp1* (o siRNA SC). En ambos casos, se utilizó 0,2 μ L/pocillo de *Lipofectamina RNAiMAX* y la transfección se llevó a cabo durante 72 h.

5.4.13.1. Eficiencia de transfección

Con el objetivo de determinar la eficiencia de transfección se sembraron en placas de 6 pocillos $3 \cdot 10^5$ células/pocillo de la línea SK-MES-1. Transcurridas las 24 h, se transfectaron con 37,5 pmol/pocillo [15 nM] con un siRNA fluorescente conjugado con Cy3 cuya secuencia era idéntica al siRNA-1 (Sigma, diseño *custom*) (Tabla 38) y 5 μ L/pocillo de *Lipofectamina RNAiMAX*. A las 24 h de transfección se recogió el sedimento celular de cada muestra, se resuspendió en 200 μ L de PBS y se realizó un marcaje de viabilidad celular con 20 μ L de 7-Amino-Actinomicina (7-AAD).

Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo *BD FACSCanto II*, el cual dispone de un láser azul *Coherent Sapphire* de estado sólido refrigerado por aire (488 nm y 20 mW de potencia) y un láser rojo *JDS Uniphase HeNe* (633 nm y 17 mW). Se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos de cada muestra en velocidad media-alta.

siRNA	Gen diana	Secuencia sentido	Secuencia anti-sentido
siRNA PKP1-Cy3-1	Pkp1 (exón 2)	[Cy3]GGCUGACAAUACAACUAUtt	AUAGUUGUAAUUGUCAGCctt

Tabla 38. Secuencia del siRNA fluorescente utilizado para el cálculo de eficiencia de transfección.

5.4.14. Viabilidad celular (ensayo de MTT)

El ensayo de viabilidad con metil-tiazol-difeniltetrazolium (MTT) es un método colorimétrico sensible descrito por Mosmann en 1983 (Mosmann, 1983). El MTT es una sal de tetrazolium de color blanco-amarillento que es transformada en las mitocondrias de las células metabólicamente viables a cristales de formazán (Berridge *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997; Vistica *et al.*, 1991), compuesto azul oscuro con un máximo de absorbancia a 570 nm. Esta reacción tiene lugar cuando el MTT acepta electrones de un agente reductor o de determinadas coenzimas (tales como NADH y NADPH). La producción de formazán, la cual puede ser cuantificada por colorimetría tras su solubilización, es proporcional al número de células viables en el cultivo. Es por ello que el ensayo MTT puede usarse como método indirecto de determinación de la proliferación celular.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con al menos 3 réplicas por condición. A su vez, cada experimento se realizó independientemente por triplicado.

5.4.14.1. Determinación del número de células óptimo

En primer lugar, se realizó una curva patrón en la cual se sembraron distinto número de células, las cuales se dejaron crecer durante 120 h (5 días) para simular el tiempo transcurrido desde la siembra a la transfección y 72 h de incubación post-transfección.

La curva para la línea celular SK-MES-1 se llevó a cabo con 10 puntos entre $1 \cdot 10^3$ y $1 \cdot 10^4$ células/pocillo, con incrementos de $1 \cdot 10^3$ células/punto. En el caso de la línea EPLC-272H la curva se llevó a cabo con 19 puntos entre $1 \cdot 10^3$ y $2 \cdot 10^4$ células/pocillo: $1 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^3$, $2,5 \cdot 10^3$, $3 \cdot 10^3$, $4 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $6,25 \cdot 10^3$, $7,5 \cdot 10^3$, $8 \cdot 10^3$, $9 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $1,1 \cdot 10^4$, $1,2 \cdot 10^4$, $1,25 \cdot 10^4$, $1,3 \cdot 10^4$, $1,4 \cdot 10^4$, $1,5 \cdot 10^4$, $1,6 \cdot 10^4$, $1,875 \cdot 10^4$ y $2 \cdot 10^4$ células/pocillo. En todos los casos, el volumen final de medio de cultivo en cada pocillo fue de 100 μ L y se incluyó un pocillo blanco el cual contenía 100 μ L de medio de cultivo sin células.

Transcurridas 120 h se añadieron 10 μ L/pocillo de una solución de MTT [5 mg/mL] (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, Sigma M5655-1G) quedando a una concentración final de 0,5 mg/mL en cada pocillo (incluido el pocillo blanco). Se incubó durante 4 h en condiciones de esterilidad y oscuridad en un incubador humidificado y bajo una atmósfera al 5% en CO₂ y 37° C. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio por aspiración y se solubilizó el formazán incorporado por las células añadiendo a cada pocillo 100 μ L de DMSO. Nuevamente se incubó protegido de la luz durante 15 minutos a 37° C y se dejó 5 minutos en agitación para facilitar la disolución de los cristales. Finalmente, se midió la absorbancia a 560 nm y 750 nm en el sistema de multi-detección *GloMax* (Promega).

5.4.14.2. Cálculo de la absorbancia

La medida de la absorbancia neta de cada muestra fue calculada como la diferencia entre la señal obtenida a 560 nm y 750 nm ($OD_{560} - OD_{750}$). Se procedió de igual modo con el pocillo blanco. La sustracción de este espectro de referencia contribuye a reducir el ruido de fondo producido por restos celulares, huellas dactilares y otras absorbancias inespecíficas.

Al valor de la absorbancia neta de cada pocillo se sustrajo, además, el valor de la absorbancia neta del pocillo blanco. En este caso, la sustracción contribuye a reducir el ruido de fondo producido por la interferencia química de ciertos compuestos, valores elevados de pH, exposición lumínica, tipos de medios de cultivo y sueros con la reacción de reducción del tetrazolium.

Una vez obtenidos los valores de señal real, se procedió a calcular la mediana y desviación estándar (SD) a partir del valor de todas las réplicas.

El número de células óptimo fue aquel cuyo valor de absorbancia real era $0,75 < x < 1,25$. Este cálculo fue orientativo. Una vez estimado el número de células óptimo para cada línea celular, los datos de experimentos posteriores habitualmente se presentaron normalizados \pm SD, utilizando para ello los resultados obtenidos de una muestra o línea celular control, y en tanto por uno.

5.4.14.3. Protocolo habitual de MTT

Habitualmente los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con al menos 3 réplicas por condición. A su vez, cada experimento se realizó también por triplicado. Para cada experimento se sembraron $5 \cdot 10^3$ células/pocillo de la línea SK-MES-1; $5,5 \cdot 10^3$ células/pocillo en el caso de EPLC-272H y $6 \cdot 10^3$ células/pocillo de H2170. Transcurridas 24 h de la siembra y según el protocolo descrito se llevaron a cabo transfecciones para silenciamiento génico o sobreexpresión, las cuales se dejaron incubar por 72 h, computando un total de 120 h (5 días) desde la siembra.

En el caso de transducciones virales, a las 96 h de la siembra (72 h tras el primer ciclo de transducción) se sembraron 2 placas gemelas con al menos 3 réplicas por condición en cada una. La densidad celular fue $5 \cdot 10^3$ células/pocillo para la línea SK-MES-1; $5,5 \cdot 10^3$ células/pocillo en el caso de EPLC-272H o $6 \cdot 10^3$ células/pocillo para H2170. Una de las placas se reveló a $t = 0$ h y la otra se reveló a $t = 48$ h (120 h tras el primer ciclo de transducción).

La placa $t = 48$ h se reveló con MTT según el protocolo descrito. Sin embargo, los datos fueron normalizados para corregir diferencias de densidad celular en el momento de la siembra con los datos de la placa gemela correspondiente a $t = 0$ h, la cual se reveló con resazurin debido a que las células en el momento de la siembra ($t = 0$ h) se encuentran en suspensión y el protocolo de MTT requiere aspiración del medio previa a la adición del disolvente DMSO.

5.4.14.4. Protocolo de viabilidad celular para células en suspensión (Resazurin)

El fundamento del ensayo de resazurin es muy similar al de MTT. Este ensayo utiliza un colorante indicador, el resazurin, el cual es de color azul, no fluorescente, soluble en agua y muy permeable a las células. Las células metabólicamente activas son capaces de convertir el resazurin en su forma reducida de color rojo fluorescente, resorufin. La producción de este compuesto fluorescente es proporcional a la actividad metabólica de la célula y puede medirse

con un fluorómetro entre 570 nm y 600 nm (de Fries *et al.*, 1995; Nociari *et al.*, 1998; Shahan *et al.*, 1994).

Para el ensayo de resazurin, una vez sembradas las células y transducidas según el procedimiento descrito, se reveló la placa correspondiente a $t = 0$ h (96 h de la siembra y 72 h tras el primer ciclo de transducción). Para ello se añadieron 20 μL /pocillo (incluido el pocillo blanco) de una solución de resazurin [1 mM] (*Resazurin Sodium Salt Powder*, Sigma R7017-1G) quedando a una concentración final de 0,2 mM en cada pocillo. Se incubó durante 4 h en condiciones de esterilidad y oscuridad en un incubador humidificado y bajo una atmósfera al 5% en CO_2 y 37° C. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 30 μL /pocillo de una solución de SDS al 3%. Finalmente, se midió la fluorescencia entre 570 nm y 600 nm (filtro verde) en el sistema de multi-detección *GloMax* (Promega).

Los datos obtenidos se trataron del mismo modo que el descrito para absorbancia (MTT).

5.4.14.5. Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron normalizados \pm SD, utilizando para ello los resultados obtenidos de una muestra o línea celular control, y en tanto por uno.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la comparación por pares de los resultados realizando una T de Student (prueba de dos colas) usando el software on-line *GraphPad QuickCalcs* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Se consideró significación estadística para valores de $p \leq 0,05$.

5.4.15. Ciclo celular

El ciclo celular se compone generalmente de cuatro fases: G1 (etapa previa a la replicación), S o fase de síntesis de DNA, G2 (etapa posterior a la replicación) y M, donde se lleva a cabo la mitosis y la citocinesis, y que culmina con la división de la célula. A lo largo de estas etapas existen numerosos puntos de control para asegurar que el ciclo sólo se completa en las condiciones adecuadas.

El análisis del ciclo celular por cuantificación del contenido de ADN fue una de las primeras aplicaciones de la citometría de flujo. Existe una amplia variedad de sustancias tales como yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés), 7-aminoactinomicina-D (7-AAD), Hoechst 33342, 33258 y S769121, TO-PRO-3, 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), DRAQ5 y DRAQ7, capaces de teñir el ADN de manera estequiométrica; es decir, se unen de manera proporcional a la cantidad de ADN presente en la célula. Así, las células en fase S que contienen más ADN que las que están en fase G1, tomarán proporcionalmente más fluorocromo, el cual fluorecerá de manera más intensa hasta que el contenido de ADN se haya doblado. De esta manera, las células en fase G2 serán aproximadamente 2 veces más brillantes que las que están en fase G1.

Normalmente las células deben ser fijadas o permeabilizadas para permitir la entrada de estas sustancias. La fijación suele llevarse a cabo mediante un tratamiento con alcohol o aldehído. El alcohol es un fijador que actúa por deshidratación y, además, permeabiliza las

membranas haciendo el ADN accesible al ioduro de propidio (PI), el cual es un fluorocromo intercalante.

Los ensayos de ciclo celular se llevaron a cabo al menos por duplicado. Para ello se procedió a obtener el sedimento celular de placas de 6 pocillos en tubos de citometría. A continuación se utilizó el siguiente protocolo:

1. Lavar el sedimento celular mediante adición de 1 mL de PBS, resuspensión por medio de pipeteo y centrifugación de 5 minutos a 1200 rpm. Descartar el sobrenadante.
2. Fijar con 1 mL de etanol frío al 70%. Para evitar la agregación, dejar caer el etanol gota a gota mientras se agita el botón celular en un vórtex.
3. Incubar 24-48 h a -20° C.
4. Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm a 4° C y descartar el sobrenadante.
5. Lavar el sedimento celular mediante adición de 1mL de PBS, resuspensión por medio de pipeteo y centrifugación de 10 minutos a 2500 rpm a 4° C. Descartar el sobrenadante.
6. Tratar las células con ARNasa para evitar la tinción de ARN de doble cadena mediante la adición de 50 μ L de ARNasa [100 μ g/mL] a cada sedimento celular.
7. Añadir 200 μ L de PI [5 μ g/mL] resuspendido en PBS.
8. Adquirir en el citómetro de flujo *BD FACSCanto II*, el cual dispone de un láser azul *Coherent Sapphire* de estado sólido refrigerado por aire (488 nm y 20 mW de potencia) y un láser rojo *JDS Uniphase HeNe* (633 nm y 17 mW). Adquirir un mínimo de 10.000 eventos de cada muestra en velocidad baja.

5.4.15.1. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados con el software *ModFit LT v3.0* (Verity Software House). Posteriormente se calculó el promedio \pm SD de los resultados, los cuales se presentaron como porcentaje de la población celular en cada fase del ciclo celular.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la comparación por pares de los resultados realizando una T de Student (prueba de dos colas) usando el software on-line *GraphPad QuickCalcs* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Se consideró significación estadística para valores de $p \leq 0,05$.

5.4.16. Apoptosis celular

La apoptosis es un proceso fisiológico normal que ocurre durante el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de la homeostasis tisular, y se distingue por una serie de características morfológicas como la pérdida de asimetría de la membrana plasmática y adherencia, condensación de citoplasma y núcleo, y rotura del ADN.

La pérdida de la membrana es uno de los eventos más tempranos de la apoptosis. En células apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina (del inglés, PS) se transloca de

la capa interna a la externa de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, quedando así expuesta al medio extracelular.

La anexina V es una proteína de 35-36 kDa de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} que tiene una alta afinidad por la PS y se une a ella cuando está expuesta al medio extracelular. La anexina V puede ser conjugada con fluorocromos tales como FITC o ficoeritrina (del inglés, PE) sin que esto interfiera en su alta afinidad por la PS y sirviendo como una sonda sensible para el análisis por citometría de flujo de células apoptóticas. Debido a que la externalización de la PS tiene lugar en los estadios más tempranos de la apoptosis, la tinción de la anexina V puede identificar la apoptosis en estadios más tempranos que los ensayos basados en cambios nucleares tales como fragmentación del ADN. La tinción de la anexina V es previa a la pérdida de integridad de la membrana, la cual tiene lugar en los estadios tardíos de la muerte celular resultante de procesos apoptóticos o necróticos. Es por ello que la tinción de anexina V suele acompañarse con un marcaje de viabilidad celular con yoduro de propidio (PI) o 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) para permitir la identificación de células en apoptosis temprana. Esto se debe a que células con membranas intactas son impermeables al PI y 7-AAD, mientras que células con membranas dañadas son permeables a estos compuestos.

Así pues, la combinación de estos marcadores nos permite diferenciar entre células viables (PI/7-AAD negativas, FITC/PE Anexina V negativas), células en apoptosis temprana (PI/7-AAD negativas, FITC/PE Anexina V positivas) y células en apoptosis tardía (PI/7-AAD positivas, FITC/PE Anexina V positivas).

Los ensayos de apoptosis celular se llevaron a cabo al menos por triplicado. Para ello se procedió a obtener el sedimento celular de placas de 6 pocillos en tubos de citometría y, a continuación, se utilizó el kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD, 556547) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo *BD FACSCanto II*, el cual dispone de un láser azul *Coherent Sapphire* de estado sólido refrigerado por aire (488 nm y 20 mW de potencia) y un láser rojo *JDS Uniphase HeNe* (633 nm y 17 mW). Se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos de cada muestra en velocidad media-alta.

5.4.16.1. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados con el software *FACSDiva* (BD). Posteriormente se calculó el promedio \pm SD de los resultados, los cuales se presentaron como porcentaje de la población celular en cada etapa de apoptosis celular.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la comparación por pares de los resultados realizando una T de Student (prueba de dos colas) usando el software on-line *GraphPad QuickCalcs* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Se consideró significación estadística para valores de $p \leq 0,05$.

5.4.17. Inmunocitoquímica

Las técnicas inmunocitoquímicas se utilizan a menudo para la localización subcelular de moléculas mediante el uso de anticuerpos, basándose en la alta especificidad y afinidad de éstos para reconocer moléculas y unirse a ellas. Sin embargo, usualmente se requiere de un proceso de fijación para la preservación del determinante antigénico y su reconocimiento por parte del anticuerpo.

Además, la conjugación de los anticuerpos con diferentes fluorocromos permite detectar cantidades ínfimas de moléculas. Gracias a la gran variedad de fluorocromos existente se pueden localizar diferentes moléculas diana simultáneamente.

Los ensayos de inmunocitoquímica se llevaron a cabo según el siguiente protocolo:

1. Cultivar $5 \cdot 10^4$ células/pocillo sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro colocados en una placa de 24 pocillos previamente esterilizados con luz UV durante 10 minutos.
2. Transcurridas 24 h de la siembra, lavar con 250 μ L de PBS y fijar las células con 250 μ L de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 7 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar 3 veces durante 5 minutos con 250 μ L de PBS a temperatura ambiente.
4. Permeabilizar las células con 250 μ L de 0,5% Tritón X-100 en PBS, durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Bloquear los sitios de unión inespecífica con 250 μ L de una solución de 3% BSA en PBS e incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
6. Incubar las células en cámara húmeda con 40-50 μ L del anticuerpo primario en solución de bloqueo a 4° C durante unas 16 h (Tabla 39).
7. Lavar las células con 250 μ L de 0,5% Tritón X-100 en PBS, durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Incubar las células en cámara húmeda y oscuridad con 40-50 μ L del anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo correspondiente en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1-2 h (Tabla 40).
9. Lavar las células con 250 μ L de 0,5% Tritón X-100 en PBS, durante 5 minutos a temperatura ambiente.
10. En el caso de marcajes múltiples, repetir los pasos 6-9 haciendo todas las incubaciones en oscuridad para preservar la fluorescencia de los anticuerpos secundarios utilizados previamente.
11. Incubar las células en cámara húmeda y oscuridad con 40-50 μ L una solución DAPI diluida entre 1:1.000 y 1:10.000 (a partir de un stock a 1 μ g/ μ L) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
12. Lavar las células mediante inmersión del cubreobjetos en un vaso de precipitados con dH₂O durante unos segundos.
13. Colocar los cubreobjetos sobre 5 μ L de medio de montaje Mowiol (conteniendo 2,5% del *anti-fade* DABCO) localizados en portaobjetos, evitando la formación de burbujas.

14. Dejar secar las preparaciones a temperatura ambiente y guardar en oscuridad a 4° C para su posterior visualización por microscopía.

Anticuerpo primario	Dilución	Referencia
PKP1	1:150	Sigma, HPA027221
α -Tubulina	1:100	Santa Cruz, sc-23948
GFP	1:200	Abcam, ab290
DSG3	1:50	Novus, NB100-1643
E-cadherina	1:50	Santa Cruz, sc-8426

Tabla 39. Anticuerpos primarios utilizados en inmunocitoquímica y diluciones correspondientes.

Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
anti-rabbit ALEXA 488	1:500	Fisher, A-21206
anti-mouse ALEXA 555	1:500	Fisher, A-31570
anti-rabbit ALEXA 555	1:500	Fisher, A-21428
anti-mouse ALEXA 647	1:500	Fisher, A-21239

Tabla 40. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunocitoquímica y diluciones correspondientes.

Las imágenes fueron adquiridas con microscopio directo de epifluorescencia o bien con microscopio invertido láser confocal. Concretamente, los equipos utilizados fueron *Microscopio Zeiss Axio Imager A.1* y *Microscopio Láser Confocal Zeiss LSM 710*, respectivamente. Habitualmente las imágenes se adquirieron a un aumento de 20x con un objetivo EC Plan-NEOFLUAR 20x NA 0,5 Ph2 en epifluorescencia. Por otro lado, las imágenes de microscopía confocal se adquirieron a 63x con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 apertura numérica DIC M27 de inmersión en aceite utilizando una línea de láser Diodo 405 nm (30.0 mW) para excitar DAPI, una línea de láser de Argón 488 nm (25.0 mW) para EGFP/ZsGreen1/Alexa Fluor 488, una línea de láser HeNe 543 nm (1.2 mW) para Alexa Fluor 555 y una línea de láser HeNe 633 nm (5.0 mW) para Alexa Fluor 633/Alexa Fluor 647. En algunos casos se aplicó un factor zoom de 0,6; 1,5; 2 o 2,5.

Para el análisis de imágenes se utilizaron los softwares *AxioVision* (Zeiss) para el caso de epifluorescencia y *ZEN* (Zeiss) para el caso de microscopía confocal.

Para la superposición de imágenes previamente adquiridas, cálculos de área y análisis de partículas se utilizó el software gratuito *ImageJ* v1.49c (Rasband, W.S., 1997-2015, <http://imagej.nih.gov/ij>) (Schneider *et al.*, 2012).

El análisis por conteo manual de cuerpos medios y cinetocoros se llevó a cabo en 50 campos de células SK-MES-1 a las que previamente se les había sometido a un silenciamiento génico de *Pkp1* mediante siRNA (KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*) y 50 campos de células SK-MES-1 transfectadas con un siRNA control (SC, control *Scramble*). Para ello se utilizó microscopía confocal y un objetivo 63x sin aplicar ningún factor de zoom. El número de estructuras obtenidas fue normalizado con el número de células totales en los 50 campos de cada condición, utilizando para ello la tinción nuclear (DAPI) y la herramienta de análisis de

partículas del software *ImageJ* v1.49c, obteniendo de este modo un ratio de nº estructuras/100 células.

5.4.18. Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico o de formación de colonias es un ensayo celular *in vitro* que se basa en la capacidad de una célula aislada de crecer formando una colonia, entendiéndose como tal un grupo de al menos 50 células. Este test básicamente determina la capacidad de cada célula de la población para producir progenie mediante divisiones “ilimitadas”, lo que se conoce como *viabilidad reproductiva*. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1956 (Franken *et al.*, 2006; Puck *et al.*, 1956).

Los ensayos de colonias se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos con al menos 3 réplicas por condición. A su vez, cada experimento se realizó independientemente por duplicado. Para ello, se sembraron 500 células/pocillo de la línea SK-MES-1 y se dejaron crecer durante 21 días renovando el medio de cultivo periódicamente.

Transcurridos los 21 días, se procedió a hacer una tinción de cristal violeta de las colonias obtenidas. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Aspirar el medio de cultivo y fijar las células con 1 mL de solución fijadora (100 mL de PBS, 54 mL de formaldehído 37%, 8 mL de glutaraldehído 25% y 838 mL de dH₂O) durante 1 h a temperatura ambiente.
2. Retirar la solución fijadora y lavar con agua corriente.
3. Teñir con 1 mL de una solución de cristal violeta al 0,1% m/v durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar la solución de cristal violeta y lavar con agua corriente 2 veces.
5. Dejar secar 24 h a temperatura ambiente.

Finalmente, las placas fueron escaneadas en un escáner estándar para obtener imágenes de las mismas.

5.4.19. Sobreexpresión de *Pkp1*

5.4.19.1. Transfección de vectores de ADN

La sobreexpresión génica se llevó a cabo en las líneas celulares con niveles endógenos de *Pkp1* considerables, tales como SK-MES-1 y EPLC-272H, así como en líneas que no expresan niveles endógenos detectables de *Pkp1* como A549, mediante transfección de plásmidos comerciales que contienen las distintas isoformas del gen *Pkp1* marcadas en su extremo carboxilo-terminal con las etiquetas Myc y DDK. Los plásmidos utilizados fueron pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK (Origene, RC216972) para la sobreexpresión de PKP1A y pCMV6-Entry-PKP1B-Myc-DDK (Origene, RC217943) para la sobreexpresión de PKP1B. Como control se utilizó el plásmido vacío (EV, del inglés *Empty Vector*) pCMV6-AC-3DDK (Origene, PS100057) (Fig. 32).

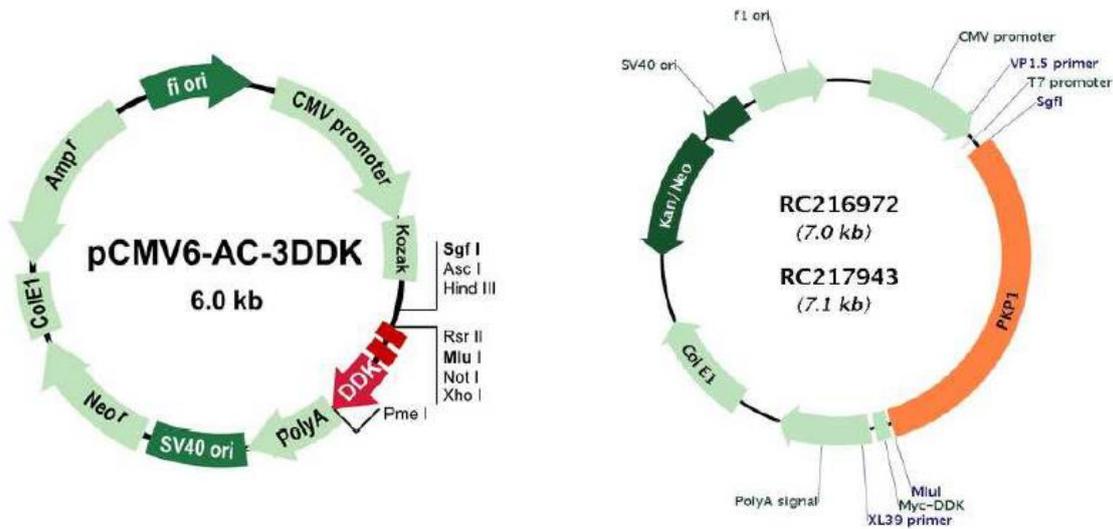


Figura 32. Esquema de los plásmidos pCMV6-AC-3DDK (Origene, PS100057) y pCMV6-Entry-PKP1-Myc-DDK (Origene; isoforma a RC216972, isoforma b RC217943) (imágenes de Origene).

Así pues, se sembraron 24 h antes de la transfección en placas de 6 pocillos entre $2 \cdot 10^5$ y $3 \cdot 10^5$ células/pocillo para la línea SK-MES-1, $5 \cdot 10^5$ células/pocillo en el caso de EPLC-272H y $2 \cdot 10^5$ células/pocillo de A549. Transcurridas las 24 h, se transfectó cada pocillo con $1 \mu\text{g}$ de ADN y $5 \mu\text{L}$ de *Lipofectamina 2000* siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.4.19.1.1. Eficiencia de transfección

Con el objetivo de determinar la eficiencia de transfección se sembraron 24 h antes de la transfección en placas de 24 pocillos $10,5 \cdot 10^4$ células/pocillo de la línea EPLC-272H y $46,2 \cdot 10^3$ células/pocillo de la línea SK-MES-1 y HEK 293T. Ésta última se utilizó como línea celular control por su facilidad de transfección.

Transcurridas las 24 h, se transfectó cada pocillo con $0,8 \mu\text{g}$ de ADN y $2 \mu\text{L}$ de *Lipofectamina 2000* siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos utilizados fueron pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK (Origene, RC216972) para la sobreexpresión de PKP1A. Como control se utilizaron los plásmidos vacíos (EV, del inglés *Empty Vector*) pCMV6-AC-3DDK (Origene, PS100057) y msCMV-PURO-IRES-GFP, el cual contiene el gen reportero EGFP.

Las células transfectadas con el plásmido msCMV-PURO-IRES-GFP fueron fotografiadas a las 48 h de transfección con el objetivo 5x y contraste de fases o filtro de GFP de un microscopio de fluorescencia invertido y de contraste de fases con sistema de captación de imágenes de alta calidad, modelo *Axiocvert 40CFL* (Zeiss) y el software *AxiVision* (Zeiss). A las 72 h de transfección se procedió a recoger el sedimento celular para su posterior análisis por qPCR, siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

5.4.20. Transducción lentiviral

Los vectores lentivirales son sistemas capaces de introducir genes o ARNs interferentes en líneas celulares primarias o establecidas con hasta casi un 100% de eficiencia. Los vectores lentivirales se unen a las células diana a través de proteínas de la envuelta que permiten la

liberación del ARN que contiene el gen de interés dentro de la célula. El ARN es entonces reverso-transcrito a ADN mediante una reverso-transcriptasa. El complejo de pre-integración del ADN entra entonces en el núcleo e integra el gen de interés en el ADN cromosómico de la célula diana, lo que hace que esta integración sea estable y pase a las células hijas cada vez que haya una división celular.

Una de las características más importantes de los vectores lentivirales es su capacidad de integrarse en células que no están en fase de división.

5.4.20.1. Producción de partículas virales

Para la producción de partículas lentivirales de segunda generación se utilizó la línea celular HEK 293T, la cual se sembró 24 h antes de la transfección en placas de 10 cm de diámetro (56 cm²) a una confluencia cercana al 100%. Transcurridas 24 h se transfectó cada placa con 15 µg de una mezcla de ADN de tres plásmidos distintos y 45 µL de *LipoD293* (SignaGen, SL100668) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos y ratios utilizados fueron VSV.G como plásmido de envuelta (2,5 µg/placa), pPAX.2 como plásmido de empaquetamiento (5 µg/placa) y como plásmido vector se utilizaron pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC, pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-PKP1, pLVX-IRES-ZsGreen1 EV, pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A, pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC, pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1, pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro EV o pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro (7,5 µg/placa).

Se realizó una primera recogida de partículas virales a las 48 h de la transfección y una segunda a las 72 h. Ambas recogidas se filtraron para eliminar restos celulares con un filtro de jeringa de 45 µm y se hicieron alícuotas de 4 mL cada una que se congelaron a -80° C.

5.4.20.2. Transducción viral

La transducción lentiviral se llevó a cabo sobre las líneas SK-MES-1, EPLC-272H y H2170, las cuales se sembraron 24 h antes en placas de 6 pocillos (3·10⁵ células/pocillo para la línea SK-MES-1 y H2170, y 4·10⁵ células/pocillo en el caso de EPLC-272H). Transcurridas las 24 h, se realizaron 3 ciclos de transducción en cada pocillo. Así pues, el 1° ciclo tuvo lugar a las 24 h de la siembra, el 2° a las 32 h y el 3° a las 48 h. En cada uno de los ciclos se añadieron 2 mL de medio conteniendo las partículas virales y 2 µL de polibrene [8 mg/mL]. A las 56 h se retiró el medio con partículas virales y se renovó el medio de cultivo con antibiótico de selección según el caso y se incubaron las células hasta transcurrir 72 h del 1° ciclo de transducción. Posteriormente, se recogió el sedimento celular para su análisis o se resembraron las células para diferentes ensayos siguiendo los protocolos descritos.

5.4.21. Ensayo de competencia de crecimiento celular

Los ensayos de competencia de crecimiento celular pretenden detectar pequeños cambios en la tasa de proliferación de células transducidas con vectores lentivirales con la ayuda de genes reporteros fluorescentes. Este método se basa en monitorizar las diferencias en las

tasas de proliferación entre células transducidas y no transducidas en un mismo cultivo y es capaz de detectar tanto incrementos como disminuciones del porcentaje de células positivamente transducidas a lo largo del tiempo, lo cual es indicativo de un aumento o disminución en la tasa de proliferación celular respectivamente. El ratio de células positiva/negativamente transducidas puede ser evaluado fácilmente por citometría de flujo a lo largo del tiempo, lo cual permite la detección de alteraciones sutiles en el crecimiento celular.

El ensayo de competencia es extremadamente sensible y puede realizarse directamente sobre la población mixta de transducción, sin requerir pasos adicionales de selección y expansión de las células transducidas.

Una disminución a lo largo del tiempo del porcentaje de células positivamente transducidas es una medida directa de defectos en la proliferación de las mismas frente a las no transducidas. Por otro lado, un aumento de este porcentaje puede ser observado cuando el transgen o shRNA confiere una ventaja selectiva a las células bajo las condiciones de cultivo aplicadas (Eekels *et al.*, 2012).

Para comprobar si las células en las que *Pkp1* ha sido silenciado presentan una menor o mayor proliferación que aquellas que sobreexpresan el mismo gen, se realizó un ensayo de competencia celular entre las mismas en una proporción 1:1.

Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 10 cm de diámetro (56 cm²) sembradas 24 h antes con la línea celular SK-MES-1 a una confluencia cercana al 100%. Transcurridas 24 h, las células fueron transducidas con un único ciclo con partículas lentivirales producidas según el protocolo descrito y los plásmidos pLVX-IRES-ZsGreen1 EV, pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A, pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC y pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1.

5.4.21.1. Separación celular por citometría de flujo (Cell Sorting)

Transcurridos 5 días de la transducción se recogieron los sedimentos celulares, se resuspendieron en 200 µL de tampón de *sorting* (PBS, 10% SBF, 5mM EDTA) con doble dosis de antibióticos (10.000 U penicilina, 10 mg/mL estreptomycin y 50 µg/mL anfotericina B), se filtraron para eliminar agregados celulares con un filtro de 40 µm y se realizó un marcaje de viabilidad celular con 20 µL de 7-Amino-Actinomicina (7-AAD).

Se procedió entonces a separar las poblaciones ZsGreen1 y tdTomato positivas utilizando para ello el equipo *BD FACSAria* que dispone de la línea láser de diodo *Coherent Sapphire* de estado sólido azul (488 nm y 20 mW de potencia); la línea láser rojo *JDS Uniphase HeNe* refrigerado por aire (633 nm y 17 mW) y la línea láser violeta en estado sólido (407 nm y 10 mW) utilizando el software *FACSDiva* (BD) para adquisición y análisis de los datos.

Tanto el fluorocromo tdTomato como ZsGreen1 fueron excitados con la línea láser de diodo *Coherent Sapphire* de estado sólido azul para emitir a 488 nm a 20 mW de potencia. Los filtros usados fueron 576/26 para tdTomato y 530/30 para ZsGreen1.

El equipo fue configurado para realizar la separación celular a alta velocidad con una configuración óptima de presión del fluido de arrastre de 70 psi y una frecuencia de gota de 90 KHz utilizando un tamaño de boquilla de 70 µm, y siendo el caudal de muestra de 20 µL/min. Además, se utilizaron condiciones de alta pureza (modo *single cell*).

Se calculó la eficiencia de transducción adquiriendo para ello un total de 10.000 eventos a una velocidad de 3.000 eventos/segundo (para tdTomato) o de 2.300 eventos/segundo (para ZsGreen1). Las poblaciones aisladas fueron resembradas entonces en placas de 6 pocillos en medio con doble dosis de antibióticos para su expansión.

5.4.21.2. Mezcla de poblaciones

Una vez expandidas suficientemente las poblaciones, se recogió el sedimento celular para su análisis por qPCR y para calcular el porcentaje de células positivas en las poblaciones aisladas. Posteriormente se procedió a mezclar células ZsGreen1 y tdTomato positivas en una proporción 1:1, utilizando para este cálculo el factor de corrección relativo al porcentaje de células positivas de cada población aislada previamente obtenido, y se resembraron en frascos T-25. Una vez realizadas las mezclas se recalculó el porcentaje de células ZsGreen1 y tdTomato positivas para su comprobación.

Las cuatro mezclas poblacionales utilizadas se describen en la Tabla 41. En la mezcla 1 se ensayaron células que sobreexpresan *Pkp1a* (verdes) junto con células que sufren un silenciamiento génico del mismo gen (rojas). En las mezclas 2 y 3 se analizaron células que sobreexpresan *Pkp1a* (verdes) y células silenciadas para *Pkp1* (rojas) con los controles del color contrario. Finalmente, en la mezcla 4 se testaron las células control de cada color.

	mezcla 1	mezcla 2	mezcla 3	mezcla 4
ZsGreen1 EV			x	x
ZsGreen1 PKP1A	x	x		
tdTomato shSC		x		x
tdTomato shPKP1	x		x	

Tabla 41. Mezclas poblacionales utilizadas en el ensayo de competencia celular.

5.4.21.3. Curvas de competencia celular

Una vez obtenidas y comprobadas las mezclas, éstas fueron analizadas durante un periodo total de 34 días. Durante este tiempo, las células fueron subcultivadas en frascos T-25 dos veces por semana en un ratio 1:5.

Una vez por semana las mezclas fueron fotografiadas con el objetivo 5x y contraste de fases o filtro de GFP y Rho de un microscopio de fluorescencia invertido y de contraste de fases con sistema de captación de imágenes de alta calidad, modelo *Axiovert 40CFL* (Zeiss) y el software *AxioVision* (Zeiss).

También una vez por semana se procedió a recoger el sedimento celular para su posterior análisis por qPCR, WB y citometría de flujo para el cálculo de los porcentajes de células ZsGreen1 y tdTomato positivas, siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

5.4.22. Ensayos celulares de microscopía *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo con la línea celular SK-MES-1. Las imágenes fueron adquiridas con el *Microscopio Láser Confocal Zeiss LSM 710* invertido utilizando una línea de láser de Argón 488 nm (25.0 mW) para EGFP y una línea de láser HeNe 543 nm (1.2 mW) para yoduro de propidio (IP) y la técnica de luz transmitida DIC. Se utilizó, además, un sistema de incubación con control de CO₂ y temperatura en todos los casos.

El análisis de imágenes se llevó a cabo utilizando el software *ZEN* (Zeiss).

5.4.22.1. Ensayos de silenciamiento génico de Pkp1

Los ensayos de microscopía *in vivo* de células SK-MES-1 silenciadas genéticamente para *Pkp1* con la metodología *siRNA*, se llevaron a cabo por triplicado sobre portaobjetos de 8 pocillos recubiertos con poli-L-lisina (IBIDI, 80824). Las imágenes de luz transmitida (DIC) se adquirieron cada 30 minutos durante un periodo total de 12-16 h a 10x con un objetivo EC Plan-Neofluar 10x/0.30 apertura numérica M27 y aplicando un factor zoom de 0,6.

5.4.22.2. Ensayos de viabilidad celular tras silenciamiento génico de Pkp1

Para valorar la viabilidad *in vivo* de células SK-MES-1 silenciadas genéticamente para *Pkp1* con la metodología *siRNA*, se hicieron experimentos por triplicado y se sembraron sobre portaobjetos de 8 pocillos recubiertos con poli-L-lisina (IBIDI, 80824). Transcurridas 48 h de la siembra se añadieron 2 µL de PI 5 µg/µL a cada pocillo.

Se tomaron imágenes con la línea de láser HeNe 543 nm (1.2 mW) para yoduro de propidio (IP) y luz transmitida (DIC) a 10x con un objetivo EC Plan-Neofluar 10x/0.30 apertura numérica M27 y aplicando un factor zoom de 0,6. También se realizaron *Z-stacks* a 63x con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 apertura numérica DIC M27 de inmersión en aceite y aplicando un factor zoom de 0,6.

5.4.22.3. Ensayos de sobreexpresión de PKP1A-Myc-DDK-EGFP

Se realizaron ensayos de microscopía *in vivo* en placas de 35 mm con fondo de cristal (IBIDI, 81158) con células SK-MES-1 transducidas lentiviralmente con el plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro que contiene la secuencia codificante de PKP1A-Myc-DDK-EGFP. Las células fueron seleccionadas durante 4 días con puromicina a una concentración final de 2 µg/mL.

Se tomaron imágenes con la línea de láser HeNe 543 nm (1.2 mW) para luz transmitida (DIC) y con la línea de láser de Argón 488 nm (25.0 mW) para EGFP cada 5-20 minutos durante

un periodo total de 1-6 h a 63x con un objetivo i LCI Plan-Neofluar 63x/1.3 Imm Korr apertura numérica DIC M27 de inmersión en glicerol y aplicando un factor zoom de 0,6.

También se realizaron *Z-stacks* e imágenes con el mismo aumento y objetivo aplicando un factor zoom de 1,5.

5.4.23. Clonación de plásmidos

5.4.23.1. Clonación de *shRNA-PKP1* en *pLVPT-tTR-KRAB*

El plásmido *pLVPT-tTR-KRAB* (Addgene, plásmido 11642) es un vector lentiviral inducible de segunda generación con un sistema de vector único Tet-on que se activa mediante la adición de doxiciclina (Fig. 33 y 34). Contiene el promotor hPGK, resistencia a ampicilina y el gen reportero EGFP (Szulc *et al.*, 2006).

Para la clonación de los shRNAs en el plásmido *pLVPT-tTR-KRAB* se clonaron primero en el plásmido intermediario *pLVTHM* (Addgene, plásmido 12247) (Wiznerowicz *et al.*, 2003), el cual contiene el promotor H1 de la polimerasa III que es esencial para la transcripción de los shRNAs (Fig. 33).

El plásmido *pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC* fue amablemente cedido por el Dr. José Luis García Pérez del Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO) de Granada.

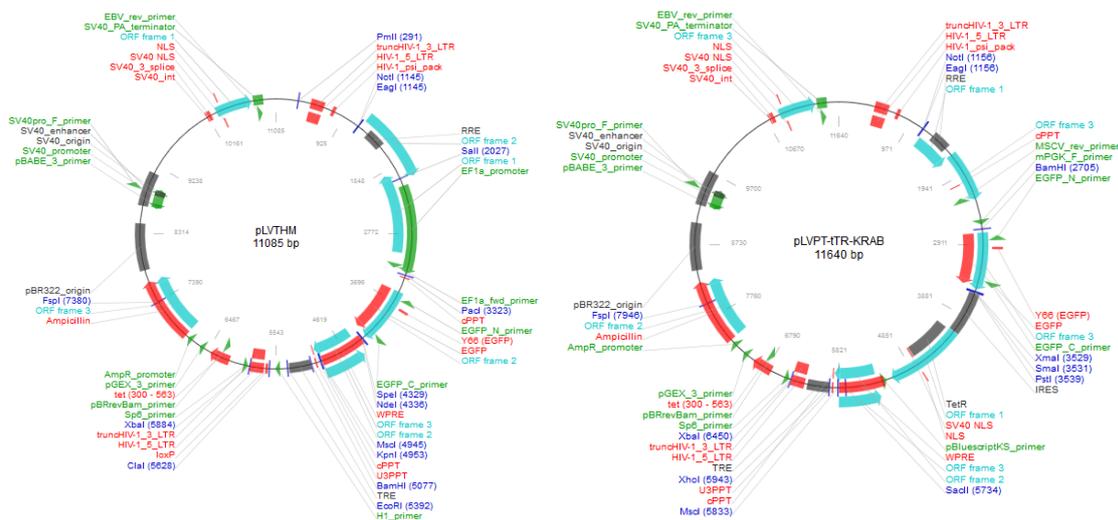


Figura 33. Esquema de los plásmidos *pLVTHM* del investigador Didier Trono (Addgene, plásmido 12247)(Wiznerowicz *et al.*, 2003) y *pLVPT-tTR-KRAB* de los investigadores Patrick Aebischer y Didier Trono (Addgene, plásmido 11642) (Szulc *et al.*, 2006) (imágenes de Addgene).

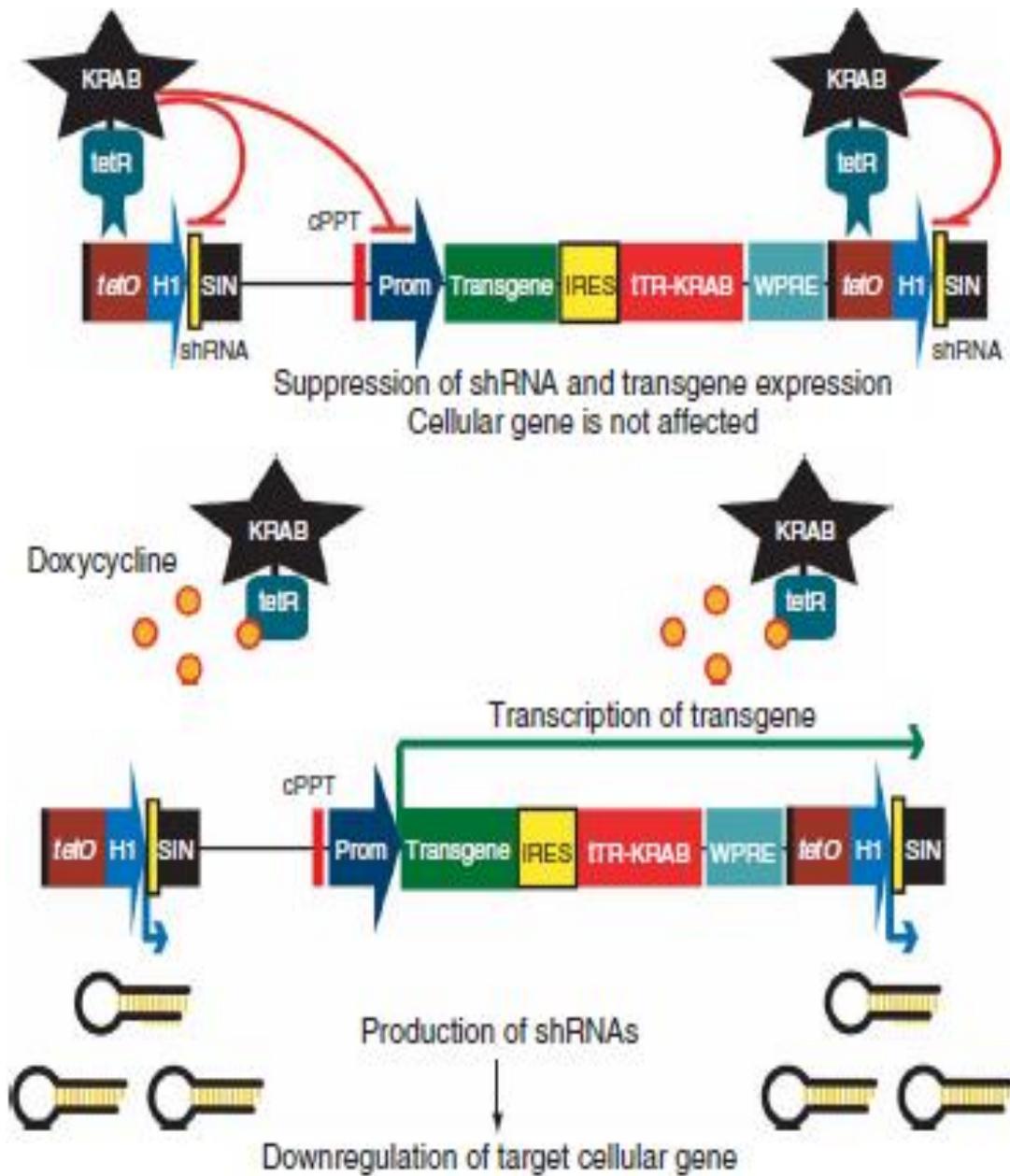


Figura 34. Representación esquemática y modo de actuación del sistema de vector lentiviral único Tet-on inducible por doxiciclina. Transgenes como EGFP pueden expresarse con cualquier promotor de la ARN polimerasa II como parte de una unidad bicistónica que contiene un represor basado en KRAB que se une a las secuencias tetO en ausencia de doxiciclina. La inserción de un *cassette* promotor de ARN polimerasa III-shRNA permite la interferencia de ARN inducible. En ausencia de doxiciclina, tTRKRAB se une a tetO y suprime la expresión del transgén así como su propio bucle de auto-regulación, y previene la producción de shRNAs. La represión simultánea tanto del promotor de la ARN polimerasa II como III se logra a través del dominio KRAB el cual induce un silenciamiento epigenético sobre una región de 2-3 kb. En presencia de doxiciclina tTRKRAB no se une a tetO, permitiendo así la expresión del transgén y la inhibición del gen diana por ARNi (Szulc *et al.*, 2006).

5.4.23.1.1. Clonaje del shRNA-PKP1 en el plásmido pLVTHM

5.4.23.1.1.1. Anillamiento y fosforilación de oligos

En primer lugar se diseñaron oligos purificados por HPLC con la secuencia del siRNA-PKP1-1 (en rojo) y extremos compatibles con los que dejan las enzimas MluI y ClaI (en azul) (Tabla 42) de manera que sean complementarios entre sí pudiendo hibridar entre ellos, y palindrómicos de modo que a su vez pueda ahorquillarse dejando un bucle en un extremo (en negro) y extremos libres al otro lado (en verde):

5'CGCGTCCGGCTGACAATTACAACATTTTCAAGAGAATAGTTGTAATTGTCAGCCTTTTGGAAAAT 3'
3' AGGCCGACTGTTAATGTTGATAAAGTTCTCTTATCAACATTAACAGTCGGAAAAACCTTTTAGC5'

Extremo MluI

Extremo ClaI

siRNA	Gen diana	Secuencia
shRNA-PKP1-1 Fw	pkp1	CGCGTCCGGCTGACAATTACAACATTTTCAAGAGAATAGTTGTAATTGTCAGCCTTTTGGAAAAT
shRNA-PKP1-1 Rv	(exón 2)	CGATTTTCAAAAAGGCTGACAATTACAACATTTCTTGAATAGTTGTAATTGTCAGCCGGA

Tabla 42. Secuencias de los oligos utilizados para la generación del shRNA-PKP1.

Para el anillamiento de los oligos se mezclaron 10 µL del oligo shRNA-PKP1-1 Fw [100 µM] con 10 µL del oligo shRNA-PKP1-1 Rv [100 µM] y 2,2 µL de buffer de anillamiento (1 M NaCl, 0,7 M Tris pH 7,5). La mezcla se calentó durante 5 minutos a 94° C en un termobloque y se dejó enfriar lentamente en un baño de agua hasta temperatura ambiente para que anillaran los oligos por complementariedad. Posteriormente se fosforiló utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK, Fisher, 10120670) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.4.23.1.1.2. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación del plásmido pLVTHM

Por otro lado se digirió 1 µg de ADN del plásmido pLVTHM con las enzimas ClaI y MluI (New England Biolabs) y se desfosforiló con una fosfatasa alcalina (CIP, New England Biolabs) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El plásmido digerido y desfosforilado fue purificado mediante una electroforesis en gel de 0,8% de agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. Se procedió a escindir la banda de 11,063 kb y se purificó con el kit *GenElute Gel Extraction* (Sigma, NA1111) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.4.23.1.1.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano

La reacción de ligación se llevó a cabo durante 16 h a 16° C en un volumen de 10 µL utilizando una T4 ligasa de ADN (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante y una proporción 3:1 de inserto (previamente diluido 1:100) y plásmido.

Tras el proceso de ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes y se sembraron en placas con medio selectivo LB agar con ampicilina durante 16 h a 37° C. El ADN de las colonias crecidas se purificó mediante mini-prep y se midió la concentración y pureza del ADN mediante técnicas espectrofotométricas utilizando un *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific).

5.4.23.1.1.4. Comprobación del clonaje

Se comprobó el éxito de la ligación mediante secuenciación Sanger usando 6 μ L del ADN a una concentración de unos 100 ng/ μ L y el kit *Big Dye Terminator v3-1 cycle sequencing* (Life Technologies) y el secuenciador *3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizó el polímero *POP-7* (Life Technologies), un capilar de 50 cm y una concentración final de oligo H1-promoter-Fw (5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAA-3') de 0,231 μ M.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software on-line *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) y el software *Geneious* v4.8.5 (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), utilizando como referencia las secuencias obtenidas de la base de datos *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent *et al.*, 2002).

5.4.23.1.2. Subclonaje de shRNA-PKP1 en el plásmido pLVPT-tTR-KRAB

5.4.23.1.2.1. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación de pLVTHM y pLVPT-tTR-KRAB

Una vez obtenido con éxito el clonaje del shRNA-PKP1 en el plásmido pLVTHM se procedió a subclonarlo junto con el promotor H1 en el plásmido pLVPT-tTR-KRAB. Para ello se digirió 1 μ g de ADN de cada plásmido con las enzimas *MscI* y *FspI* (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente el plásmido pLVPT-tTR-KRAB digerido se desfosforiló con una fosfatasa alcalina (*rAPid*, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ambas digestiones fueron purificadas mediante una electroforesis en gel de 0,7% de agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. Se procedió a escindir la banda de 9,5 kb de pLVPT-tTR-KRAB y la banda de 2,5 kb de pLVTHM, las cuales se purificaron con el kit *GenElute Gel Extraction* (Sigma, NA1111) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.4.23.1.2.2. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano

La reacción de ligación se llevó a cabo durante 16 h a 25° C en un volumen de 20 µL utilizando una T4 ligasa de ADN (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante y una proporción 14:1 de inserto y plásmido.

Tras el proceso de ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5α quimiocompetentes y se sembraron en placas con medio selectivo LB agar con ampicilina durante 16 h a 37° C. El ADN de las colonias crecidas se purificó mediante mini-prep y se midió la concentración y pureza del ADN mediante técnicas espectrofotométricas utilizando un *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific).

5.4.23.1.2.3. Comprobación del clonaje

Se comprobó el éxito de la ligación mediante secuenciación Sanger usando 6 µL del ADN a una concentración de unos 100 ng/µL y el kit *Big Dye Terminator v3-1 cycle sequencing* (Life Technologies) y el secuenciador *3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizó el polímero *POP-7* (Life Technologies), un capilar de 50 cm y una concentración final de oligo H1-promoter-Fw (5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAA-3') de 0,231 µM.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software on-line *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) y el software *Geneious* v4.8.5 (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), utilizando como referencia las secuencias obtenidas de la base de datos *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent *et al.*, 2002).

5.4.23.2. Clonación de *shRNA-SC* y *shRNA-PKP1* en *pLVX-IRES-tdTomato*

El plásmido *pLVX-IRES-tdTomato* (Clontech, plásmido 631238) es un vector lentiviral de expresión de segunda generación que permite la expresión simultánea del gen de interés y del gen reportero *tdTomato* en cualquier tipo de célula mamífera, incluyendo células primarias. *tdTomato* es un miembro de la familia de proteínas fluorescentes derivada de la proteína fluorescente roja de *Discosoma sp.*, *DsRed* (Shaner *et al.*, 2004). Este vector expresa las dos proteínas a partir de un ARNm bicistrónico, haciendo que *tdTomato* pueda ser usado como un indicador de la eficiencia de transducción y una marcador de selección para citometría de flujo. Contiene un promotor $P_{CMV\ IE}$ (del inglés, *human Cytomegalovirus Immediate Early promoter*) constitutivamente activo localizado justo antes del MCS (del inglés, *Multiple Cloning Site*) (Fig. 35). Un Sitio Interno de entrada al Ribosoma (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*) del virus de encefalomiocarditis (EMCV), posicionado entre el MCS y *tdTomato*, facilita la traducción cap-independiente de *tdTomato* desde un sitio de inicio interno en la unión IRES/*tdTomato* (Shaner *et al.*, 2004). Contiene además resistencia a ampicilina.

Para la clonación de los shRNAs en el plásmido pLVX-IRES-tdTomato se procedió a subclonarlos de los plásmidos pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC y pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-PKP1 previamente clonados, los cuales contienen el promotor H1 de la polimerasa III que es esencial para la transcripción de los shRNAs.

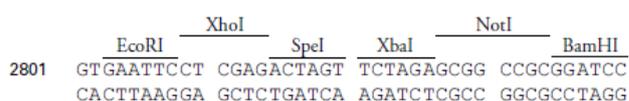
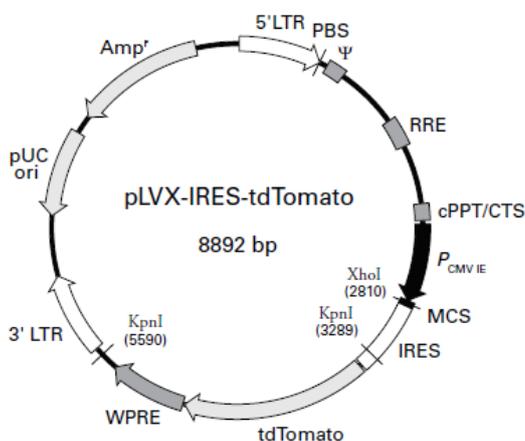


Figura 35. Esquema del plásmido pLVX-IRES-tdTomato y su MCS (Clontech, plásmido 631238) (imagen de Clontech).

5.4.23.2.1. Amplificación de los insertos por PCR

En primer lugar se amplificó por PCR el inserto consistente en el promotor H1 de la polimerasa III y el shRNA-SC o el shRNA-PKP1, utilizando para ello la ADN polimerasa de alta fidelidad (HF) *Phusion* (Fisher, 10024537) y siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 43 y 44). La PCR fue diseñada de manera que, además, adicionara sitios de restricción para *Clal* en los extremos 5' y 3' del amplicón (Tabla 45).

Como molde se utilizaron 5 ng de ADN del plásmido pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC y pLVTHM-shRNA-PKP1. Así, ambos shRNAs presentarán un amplicón de aproximadamente 290 pb.

Mezcla de reacción		Condiciones PCR		
Buffer HF 5X (Phusion)	4 μ L	pre-incubación	30 s	98° C
Polimerasa (Phusion)	0,2 μ L	35 ciclos	10 s	98° C
Oligo sentido (10 μ M)	1 μ L		30 s	72° C
Oligo anti-sentido (10 μ M)	1 μ L	elongación final	10 min	72° C
dNTPs (10 mM)	0,4 μ L		10 min	4° C
DMSO	0,6 μ L			
ADN (5 ng totales)	2 μ L			
H ₂ O	10,8 μ L			
Volumen total	20 μ L			

Tabla 43. Mezcla de reacción de la PCR.

Tabla 44. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
Clal-H1-Fw	sentido (<i>forward</i>)	TATAATCGATCGAACGCTGACGTCATCAAC
shRNA-SC-Clal-Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	ATATATCGATGGTGCCGTTTAGTAGTACATCTC
shRNA-PKP1-Clal-Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	ATATATCGATTTTCCAAAAAGGCTGACAATTAC

Tabla 45. Secuencias de los oligos utilizados para el subclonaje de los shRNAs en pLVX-IRES-tdTomato.

5.4.23.2.2. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación de plásmido e insertos

Por un lado se digirió 1 µg de ADN del plásmido pLVX-IRES-tdTomato y 20 µL del producto de PCR con la enzima Clal (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido digerido fue purificado con el kit *GenElute PCR Extraction* (Sigma, NA1021) y se desfosforiló con una fosfatasa alcalina (rAPid, Roche) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Los productos de PCR digeridos y el plásmido digerido y desfosforilado fueron purificados mediante una electroforesis en gel de 1% de agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. Se procedió a escindir las bandas de 290 pb de los productos de PCR y la banda de 8,9 kb del plásmido y se purificaron con el kit *GenElute Gel Extraction* (Sigma, NA1111) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.4.23.2.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano

La reacción de ligación se llevó a cabo durante 16 h a 16° C en un volumen de 20 µL utilizando una T4 ligasa de ADN (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante y una proporción 6:1 de inserto y plásmido en el caso del clonaje del shRNA-SC y 3:1 en el caso del clonaje del shRNA-PKP1.

Tras el proceso de ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5α quimiocompetentes y se sembraron en placas con medio selectivo LB agar con ampicilina durante 16 h a 37° C. El ADN de las colonias crecidas se purificó mediante mini-prep y se midió la concentración y pureza del ADN mediante técnicas espectrofotométricas utilizando un *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific).

5.4.23.2.4. Comprobación del clonaje

Se comprobó el éxito de las ligaciones mediante ensayos de restricción con la enzima PvuI (Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente se analizaron mediante una electroforesis en gel de 1% de agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. El patrón de bandas esperado para las colonias positivas fue de dos bandas con tamaños de 6,1 y 3 kb respectivamente, mientras que para las colonias negativas fue de una banda de 8,9 kb.

Las colonias positivas se analizaron finalmente mediante secuenciación Sanger usando 6 μL del ADN a una concentración de unos 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y el kit *Big Dye Terminator v3-1 cycle sequencing* (Life Technologies) y el secuenciador *3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizó el polímero *POP-7* (Life Technologies), un capilar de 50 cm y una concentración final de oligo H1-promoter-Fw (5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAA-3'), CMV-Rv (5'-CACGCCTACCGCCATTGCG-3') o IRES-Rv (5'-CCTCACATTGCCAAAAGACG-3') de 0,231 μM .

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software on-line *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) y el software *Geneious v4.8.5* (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), utilizando como referencia las secuencias obtenidas de la base de datos *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent *et al.*, 2002).

5.4.23.3. Clonación de PKP1A-Myc-DDK en pLVX-IRES-ZsGreen1

El plásmido pLVX-IRES-ZsGreen1 (Clontech, plásmido 632187) es un vector lentiviral de expresión de segunda generación que permite la expresión simultánea del gen de interés y del gen reportero ZsGreen1 en cualquier tipo de célula mamífera, incluyendo células primarias. ZsGreen1 es una variante humana de codones optimizados de la proteína fluorescente verde del coral *Zoanthus sp.* Este vector expresa las dos proteínas a partir de un ARNm bicistrónico, haciendo que ZsGreen1 pueda ser usado como un indicador de la eficiencia de transducción y una marcador de selección para citometría de flujo. Contiene un promotor $P_{\text{CMV IE}}$ (del inglés, *human Cytomegalovirus Immediate Early promoter*) constitutivamente activo localizado justo antes del MCS (del inglés, *Multiple Cloning Site*) (Fig. 36). Un Sitio Interno de entrada al Ribosoma (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*) del virus de encefalomiocarditis (EMCV), posicionado entre el MCS y ZsGreen1, facilita la traducción cap-independiente de ZsGreen1 desde un sitio de inicio interno en la unión IRES/ZsGreen1 (Jang *et al.*, 1988). Contiene además resistencia a ampicilina.

Para la clonación del gen *Pkp1a* en el plásmido pLVX-IRES-ZsGreen1 se procedió a subclonarlo del plásmido comercial pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK (Origene, RC216972) de

modo que el plásmido pLVX-IRES-ZsGreen1 resultante contiene la secuencia de *Pkp1a* marcada en su extremo carboxilo-terminal con las etiquetas Myc y DDK.

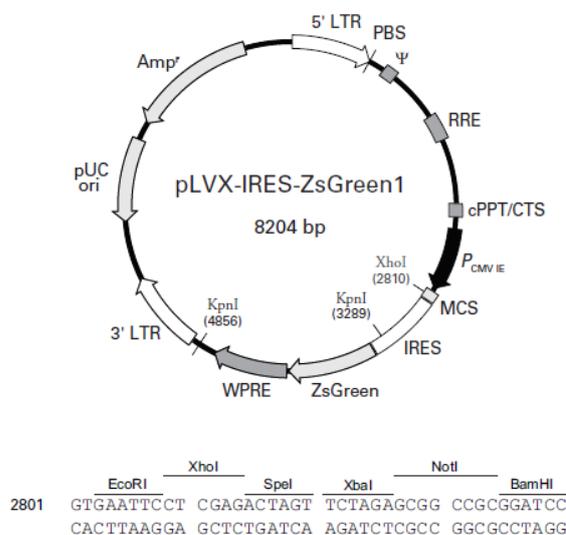


Figura 36. Esquema del plásmido pLVX-IRES-ZsGreen1 y su MCS (Clontech, plásmido 632187) (imagen de Clontech).

5.4.23.3.1. Amplificación del inserto por PCR

En primer lugar se amplificó por PCR el inserto consistente en la secuencia del gen *Pkp1a*-Myc-DDK utilizando para ello la ADN polimerasa de alta fidelidad (HF) *Phusion* (Fisher, 10024537), siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 46 y 47). La PCR fue diseñada de manera que además adicionara sitios de restricción para EcoRI en el extremo 5' y XbaI en el extremo 3' del amplicón (Tabla 48).

Como molde se utilizaron 5 ng de ADN del plásmido pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK (Origene, RC216972). Así, el producto de PCR presentará un amplicón de aproximadamente 2,7 kb.

Mezcla de reacción		Condiciones PCR		
Buffer HF 5X (Phusion)	4 µL	pre-incubación	30 s	98° C
Polimerasa (Phusion)	0,2 µL	35 ciclos	10 s	98° C
Oligo sentido (10 µM)	1 µL		1 min 30 s	72° C
Oligo anti-sentido (10 µM)	1 µL	elongación final	10 min	72° C
dNTPs (10 mM)	0,4 µL		10 min	4° C
DMSO	0,6 µL			
ADN (5 ng totales)	2 µL			
H ₂ O	10,8 µL			
Volumen total	20 µL			

Tabla 47. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Tabla 46. Mezcla de reacción de la PCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
EcoRI-PKP1-Fw	sentido (forward)	TATAGAATTCATGAACCACTCGCCGCTCAAGACCGCCTTGGCG
PKP1-XbaI-Rv	anti-sentido (reverse)	ATATTCTAGATCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCCAGGATATCATTTGCTGCC AGATCCTCTTCTGAGATGAG

Tabla 48. Secuencias de los oligos utilizados para el subclonaje de *Pkp1a* en pLVX-IRES-ZsGreen1.

5.4.23.3.2. Digestión enzimática, desfosforilación y purificación de plásmido e insertos

Por un lado se digirió 1 µg de ADN del plásmido pLVX-IRES-ZsGreen1 y 19 µL del producto de PCR con las enzimas EcoRI y XbaI (Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto el plásmido como el producto de PCR digeridos fueron purificados con el kit *GenElute PCR Extraction* (Sigma, NA1021) siguiendo las instrucciones del fabricante. El eluido final (50 µL) se concentró evaporándolo a 65° C hasta alcanzar un volumen de 20 µL.

Para comprobar el tamaño de las digestiones tanto del producto de PCR como del plásmido, 4 µL de cada uno fueron analizados mediante una electroforesis en gel de 1% de

agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. Se comprobó que el tamaño del producto de PCR fuera de 2,7 kb y el del plásmido digerido de 8,2 kb.

5.4.23.3.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano

La reacción de ligación se llevó a cabo durante 16 h a 16° C en un volumen de 20 µL utilizando una T4 ligasa de ADN (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante y una proporción 6:1 de inserto y plásmido.

Tras el proceso de ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5α quimiocompetentes y se sembraron en placas con medio selectivo LB agar con ampicilina durante 16 h a 37° C. El ADN de las colonias crecidas se purificó mediante mini-prep y se midió la concentración y pureza del ADN mediante técnicas espectrofotométricas utilizando un *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific).

5.4.23.3.4. Comprobación del clonaje

Se comprobó el éxito de la ligación mediante ensayos de restricción con la enzima BamHI (Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente fueron analizados mediante una electroforesis en gel de 1% de agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. El patrón de bandas esperado para las colonias positivas fue de dos bandas con tamaños de 9,2 y 1,3 kb respectivamente, mientras que para las colonias negativas fue de una banda de 8,2 kb.

Las colonias positivas se analizaron finalmente mediante secuenciación Sanger usando 6 µL del ADN a una concentración de unos 100 ng/µL y el kit *Big Dye Terminator v3-1 cycle sequencing* (Life Technologies) y el secuenciador *3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizó el polímero *POP-7* (Life Technologies), un capilar de 50 cm y una concentración final de oligo Fw-PKP1-isoforms (5'-GCTGGTGCATGGCAATAGC-3'), PKP1-seq-1-FW (5'-CATCTCCTGCAACAAGGACC-3'), CMV-FD (5'-CGCAAATGGCGGTAGGCGTG-3') o FW-PKP1-1 (5'-AAGTTCCAGGCAGGGAATG -3') de 0,231 µM.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software on-line *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) y el software *Geneious* v4.8.5 (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), utilizando como referencia las secuencias obtenidas de la base de datos *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent *et al.*, 2002).

5.4.23.4. Clonación de PKP1A-Myc-DDK fusionado a EGFP en pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro

El plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro (Clontech, plásmido 632154) es un vector lentiviral de expresión de segunda generación que permite la expresión simultánea del gen de interés fusionado al gen reportero AcGFP1 en cualquier tipo de célula mamífera, incluyendo células primarias. AcGFP1 es una proteína fluorescente verde derivada de *Aequorea*

coerulescens. Los genes clonados en el MCS (del inglés, *Multiple Cloning Site*) localizado justo antes de la secuencia codificante de AcGFP1 son expresados como una proteína fusionada a AcGFP1 por el extremo amino-terminal de la proteína reportera (Fig. 37). Contiene un promotor P_{CMVIE} (del inglés, *human Cytomegalovirus Immediate Early promoter*) constitutivamente activo localizado justo antes del MCS. Contiene, además, resistencia a puromicina bajo el control del promotor PGK para la selección de transductantes estables y resistencia a ampicilina. El vector no modificado expresa AcGFP1 y puede ser usado para producir partículas virales marcadoras para optimizar los protocolos de transducción.

Para la clonación del gen *Pkp1a* en el plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro se procedió a sustituir la secuencia codificante de AcGFP1 por la secuencia de *Pkp1a* marcada en su extremo carboxilo-terminal con las etiquetas Myc y DDK, y fusionada a EGFP por el extremo carboxilo-terminal de DDK. La construcción de PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP fue obtenida mediante el método descrito por Higuchi (Higuchi *et al.*, 1988).

Así, el plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro resultante contiene la secuencia de PKP1A-Myc-DDK-EGFP en lugar de AcGFP1.

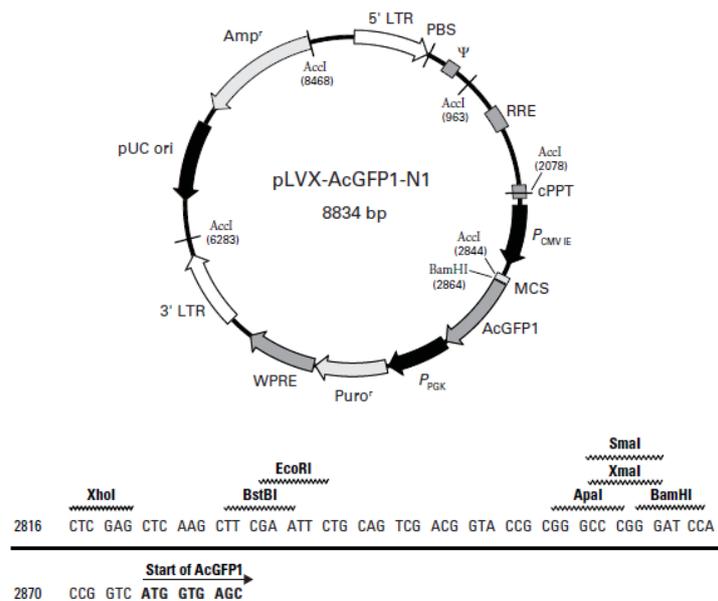


Figura 37. Esquema del plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro y su MCS (Clontech, plásmido 632154) (imagen de Clontech).

5.4.23.4.1. Amplificación del inserto por PCR

El método descrito por Higuchi (Higuchi *et al.*, 1988) que se utilizó para la construcción del inserto *Pkp1a*-Myc-DDK-EGFP consistió en un sistema de dos PCRs parciales diseñadas con regiones solapantes, utilizando para ello la ADN polimerasa de alta fidelidad (HF) *Phusion* (Fisher, 10024537) y siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 49 y 50).

Mezcla de reacción		Condiciones PCR		
Buffer HF 5X (Phusion)	4 µL	pre-incubación	30 s	98° C
Polimerasa (Phusion)	0,2 µL	35 ciclos	10 s	98° C
Oligo sentido (10 µM)	1 µL		*	72° C
Oligo anti-sentido (10 µM)	1 µL	elongación final	10 min	72° C
dNTPs (10 mM)	0,4 µL		10 min	4° C
DMSO	0,6 µL			
ADN (5 ng totales)	2 µL			
H ₂ O	10,8 µL			
Volumen total	20 µL			

Tabla 49. Mezcla de reacción de la PCR.

Tabla 50. Programa de temperaturas de la reacción de PCR. (*) 1 min 30 s para la primera PCR parcial y 30 s para la segunda PCR parcial.

1. La primera PCR parcial se diseñó para amplificar la secuencia codificante de *Pkp1α*-Myc-DDK de manera que, además, adicionara un sitio de restricción para EcoRI en el extremo 5' del amplicón, mientras que en el extremo 3' eliminara el codón de parada (TGA) y adicionara los 15 primeros nucleótidos de la secuencia de EGFP (Tabla 51). Como molde se utilizaron 5 ng de ADN del plásmido pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK (Origene, RC216972) y el amplicón resultante presentará un tamaño esperado de 2,3 kb (Fig. 38).

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
EcoRI-PKP1-Fw	sentido (<i>forward</i>)	TATAGAATTCATGAACCACTCGCCGCTCAAGACCGCCTTGCGG
PKP1-EGFP-Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	CTGCCCTTGCTCACCTTATCGTCGTCATCC

Tabla 51. Secuencias de los oligos utilizados en la primera PCR parcial para la amplificación de la secuencia codificante de *Pkp1α*-Myc-DDK.

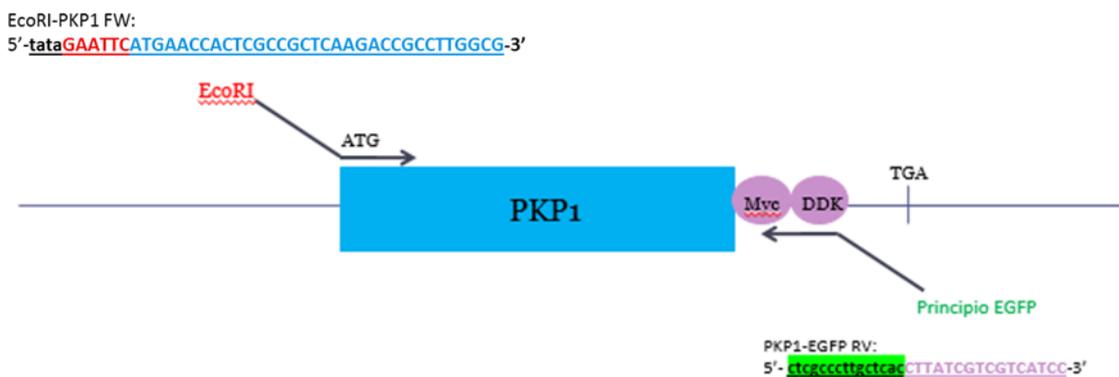


Figura 38. Esquema del diseño de la primera PCR parcial para la amplificación de la secuencia codificante de *Pkp1α*-Myc-DDK.

2. La segunda PCR parcial se diseñó para amplificar la secuencia codificante de EGFP de manera que, además, adicionara un sitio de restricción XbaI en el extremo 3' del amplicón, mientras que en el extremo 5' adicionara los 15 últimos nucleótidos de la secuencia de *Pkp1α*-Myc-DDK y eliminara el codón de inicio (ATG) (Tabla 52). Como molde se utilizaron 5 ng de ADN del plásmido pLVPT-tTR-KRAB (Addgene, plásmido 11642) y el amplicón resultante presentará un tamaño esperado de 700 pb (Fig. 39).

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
PKP1-EGFP-Fw	sentido (<i>forward</i>)	GATGACGACGATAAGGTGAGCAAGGGCGAGG
EGFP-XbaI-Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	ATATTCTAGATCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGAT CCCGGCG

Tabla 52. Secuencias de los oligos utilizados en la segunda PCR parcial para la amplificación de la secuencia codificante de EGFP.

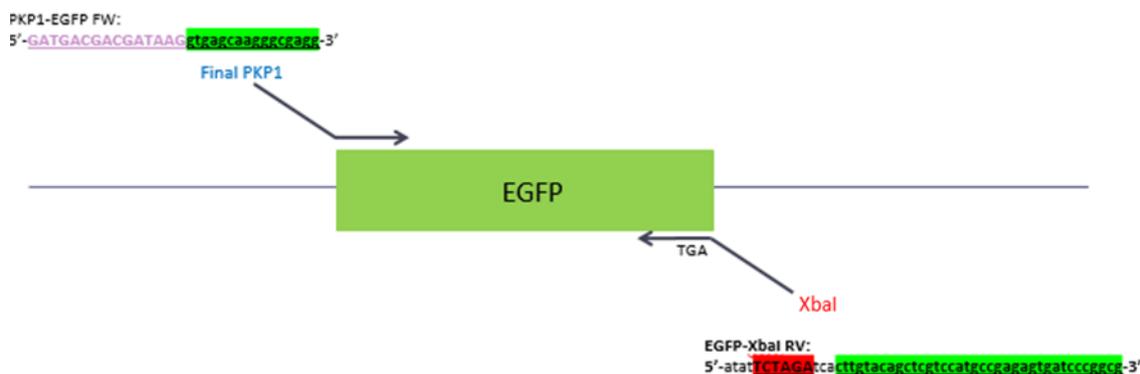


Figura 39. Esquema del diseño de la segunda PCR parcial para la amplificación de la secuencia codificante de EGFP.

Posteriormente, los productos de ambas PCRs parciales se usaron como molde en una PCR mayor capaz de amplificar los productos de ambas PCRs parciales fusionados entre sí gracias a las regiones solapantes. Esta PCR total se realizó utilizando de nuevo la ADN polimerasa de alta fidelidad (HF) *Phusion* (Fisher, 10024537) (Tabla 53 y 54) y los oligos sentido (*forward*) de la primera PCR parcial y anti-sentido (*reverse*) de la segunda PCR parcial (Tabla 55). El producto de PCR presentará un amplicón de aproximadamente 3 kb (Fig. 40).

Mezcla de reacción	
Buffer HF 5X (Phusion)	4 µL
Polimerasa (Phusion)	0,2 µL
Oligo sentido (10 µM)	1 µL
Oligo anti-sentido (10 µM)	1 µL
dNTPs (10 mM)	0,4 µL
DMSO	0,6 µL
ADN (producto 1ª PCR parcial)	1 µL
ADN (producto 2ª PCR parcial)	1 µL
H ₂ O	10,8 µL
Volumen total	20 µL

Tabla 53. Mezcla de reacción de la PCR.

Condiciones PCR		
pre-incubación	30 s	98° C
35 ciclos	10 s	98° C
	2 min 15 s	72° C
elongación final	10 min	72° C
	10 min	4° C

Tabla 54. Programa de temperaturas de la reacción de PCR.

Nombre del oligo	Orientación	Secuencia
EcoRI-PKP1-Fw	sentido (<i>forward</i>)	TATAGAATTCATGAACCACTCGCCGCTCAAGACCGCCTTGCGC
EGFP-XbaI-Rv	anti-sentido (<i>reverse</i>)	ATATTCTAGATCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGAT CCCGGCG

Tabla 55. Secuencias de los oligos utilizados en la PCR total para la construcción del inserto *Pkp1a*-Myc-DDK-EGFP.

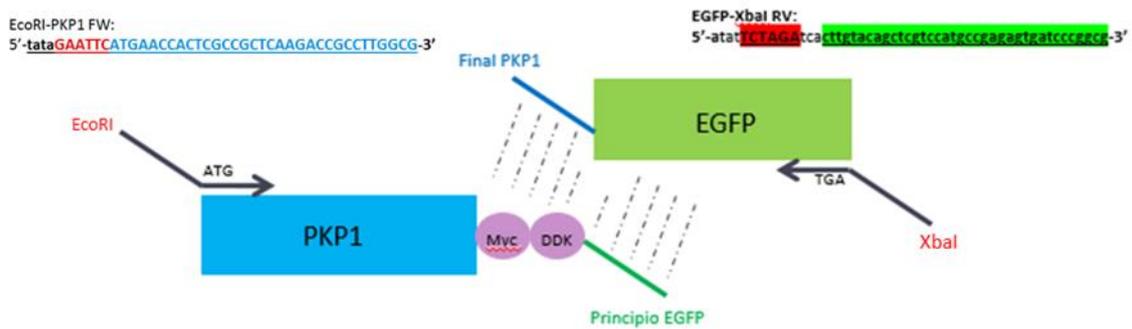


Figura 40. Esquema del diseño de la PCR total para la construcción del inserto *Pkp1a*-Myc-DDK-EGFP.

Como resultado final se obtuvo un producto de PCR consistente en la secuencia codificante de PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP y flanqueado por los sitios de restricción de EcoRI en el extremo 5' y XbaI en el extremo 3' del amplicón. El inserto contó además con un codón de inicio único al comienzo de la secuencia de *Pkp1a* y un codón de parada único al final de la secuencia de EGFP (Fig. 41).

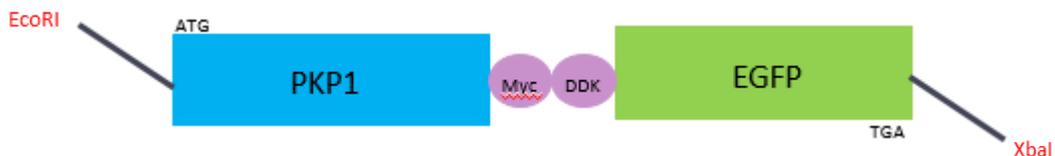


Figura 41. Esquema del inserto final consistente en la secuencia codificante de *Pkp1a*-Myc-DDK fusionada a EGFP.

5.4.23.4.2. Digestión enzimática y purificación de plásmido e insertos

Antes de la digestión enzimática, el producto de PCR fue purificado con el kit *GenElute PCR Extraction* (Sigma, NA1021) siguiendo las instrucciones del fabricante. El eluido final (50 µL) se concentró evaporándolo a 65° C hasta alcanzar un volumen de 20 µL.

Posteriormente se procedió a la digestión. Por un lado se digirió 1 µg de ADN del plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro y 15 µL del producto de PCR con las enzimas EcoRI y XbaI (Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto de PCR y el plásmido digeridos fueron purificados mediante una electroforesis en gel de 1,2% de agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. Se procedió a escindir las bandas de 3 kb del producto de PCR y la banda de 8 kb del plásmido y se purificaron con el kit *GenElute Gel Extraction* (Sigma, NA1111) siguiendo las instrucciones del fabricante. El eluido final (50 μ L) se concentró evaporándolo a 65° C hasta alcanzar un volumen de 20 μ L.

5.4.23.4.3. Reacción de ligación y amplificación del ADN bacteriano

La reacción de ligación se llevó a cabo durante 16 h a 16° C en un volumen de 10 μ L utilizando una T4 ligasa de ADN (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante y una proporción 3:1 de inserto y plásmido. La enzima T4 ligasa fue inactivada transcurridas 16 h incubando la muestra 10 minutos a 65° C.

Tras el proceso de ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes y se sembraron en placas con medio selectivo LB agar con ampicilina durante 16 h a 37° C. El ADN de las colonias crecidas se purificó mediante mini-prep y se midió la concentración y pureza del ADN mediante técnicas espectrofotométricas utilizando un *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific).

5.4.23.4.4. Comprobación del clonaje

Se comprobó el éxito de la ligación mediante ensayos de restricción con la enzima XhoI (Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante y, posteriormente, fueron analizados mediante una electroforesis en gel de 0,8% de agarosa siguiendo el protocolo previamente descrito. El patrón de bandas esperado para las colonias positivas fue de dos bandas con tamaños de 8,1 y 2,2 kb respectivamente, mientras que para las colonias negativas fue de una banda de 8,8 kb.

Las colonias positivas se analizaron finalmente mediante secuenciación Sanger usando 6 μ L del ADN a una concentración de unos 100 ng/ μ L y el kit *Big Dye Terminator v3-1 cycle sequencing* (Life Technologies) y el secuenciador *3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizó el polímero *POP-7* (Life Technologies), un capilar de 50 cm y una concentración final de oligo CMV-FD (5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'), Fw-PKP1-isoforms (5'-GCTGGTGCGATGGCAATAGC-3'), PKP1-seq-2-FW (5'-CCTCCTGAGCAACATGTCC-3'), PKP1-seq-3-Rv (5'-GCAGCCTGTGGCATTGAAGA-3') o EGFPseq-Rv (5'-GGACACGCTGAACTTGTGGC-3') de 0,231 μ M.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software on-line *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) y el software *Geneious* v4.8.5 (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), utilizando como referencia las secuencias obtenidas de la base de datos *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) (Kent *et al.*, 2002).

6. RESULTADOS

6.1. Validación de los datos del microarray por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Los resultados del microarray de expresión fueron validados mediante el análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) de 95 genes, incluyendo los genes control endógenos. Los genes analizados fueron seleccionados de acuerdo al p -valor y los valores de nivel de cambio (*Fold-change*, FC) de las secuencias diferencialmente expresadas obtenidas en las comparaciones de muestras no pareadas (tras las correcciones del test Bonferroni).

Los genes control endógenos fueron *Gadph*, *ARN 18S* y *Actb*.

La lista de secuencias validadas para cada comparación puede verse en la Tabla 56, donde se indica el p -valor, FDR y número de muestras comparadas. Se especifica, además, los genes que están sobreexpresados (UpR, *Upregulated*) y los que están inhibidos (DownR, *Downregulated*) para cada comparación (FDR y Bonferroni < 0,05).

Comparación	Nº muestras	Nº genes		Nº genes	
		FDR ($p \leq 0,05$)		Bonferroni ($p \leq 0,05$)	
		UpR	DownR	UpR	DownR
Tumoral vs. Control	48 vs. 22	16	7	7	0
Adenocarcinoma vs. Escamoso	27 vs. 21	15	39	9	18
IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	13 vs. 11	12	31	6	12
I Adenocarcinoma vs. Escamoso	16 vs. 15	15	40	10	18
IA Adenocarcinoma vs. IB Adenocarcinoma	3 vs. 13	0	1	0	1
Adenocarcinoma vs. Control	27 vs. 22	14	5	7	0
Escamoso vs. Control	21 vs. 22	37	20	13	7
I Adenocarcinoma vs. Control	16 vs. 22	14	6	6	1
I Escamoso vs. Control	15 vs. 22	33	21	13	9
I Moderadamente vs. Control	15 vs. 22	12	9	7	0
I Pobremente vs. Control	10 vs. 22	12	8	6	1

Tabla 56. Número de secuencias validadas por análisis de qPCR para cada comparación (FDR, $p \leq 0,05$; test Bonferroni, $p \leq 0,05$). UpR, *Upregulated*; DownR, *Downregulated*.

La lista de genes diferencialmente regulados en función del tipo de tumor, estadio y grado de diferenciación puede observarse en la Tabla 57.

Genes (Test Bonferroni)	Comparación	Regulación
CTHRC1-Hs00298917_m1	Tumoral vs. Control	UpR
GREM1-Hs00171951_m1	Tumoral vs. Control	UpR
COL10A1-Hs00166657_m1	Tumoral vs. Control	UpR
THBS2-Hs01568063_m1	Tumoral vs. Control	UpR
COL1A1-Hs01076777_m1	Tumoral vs. Control	UpR
SULF1-Hs00290918_m1	Tumoral vs. Control	UpR
SLC2A1-Hs00892681_m1	Tumoral vs. Control	UpR
TRIM29-Hs00232590_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
KRT15-Hs00267035_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
PKP1-Hs00913276_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
RHOBTB2-Hs01598085_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR

Genes (Test Bonferroni)	Comparación	Regulación
DSC3-Hs00170032_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
ACSL5-Hs01061754_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
SLC2A1-Hs00892681_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TMEM125-Hs00332778_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
VSNL1-Hs00374305_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
ST3GAL5-Hs00187405_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
CLDN3-Hs00265816_s1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
IRF6-Hs00196213_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
ULBP2-Hs00607609_mH	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
NKX2-1-Hs00163037_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
SLC6A8-Hs00940515_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
KRT5-Hs00361185_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
KRT17-Hs00356958_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
NTRK2-Hs01093110_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TP63-Hs00978338_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
SPRR1B-Hs00234164_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
LYPD3-Hs01012111_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TMC5-Hs00418688_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
LIMD1-Hs00170931_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
GPR116-Hs00391810_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
TFRC-Hs00174609_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
GJB6-Hs00917676_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
SLC16A1-Hs00161826_m1	Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
PKP1-Hs00913276_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TRIM29-Hs00232590_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
NKX2-1-Hs00163037_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
ACSL5-Hs01061754_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
TMEM125-Hs00332778_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
KRT15-Hs00267035_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
SLC2A1-Hs00892681_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
RHOBTB2-Hs01598085_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
DSC3-Hs00170032_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
SLC6A8-Hs00940515_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TFRC-Hs00174609_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
ULBP2-Hs00607609_mH	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
KRT17-Hs00356958_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
SPRR1B-Hs00234164_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
VSNL1-Hs00374305_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
IRF6-Hs00196213_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TMC5-Hs00418688_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
ST3GAL5-Hs00187405_m1	IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
ACSL5-Hs01061754_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
TRIM29-Hs00232590_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
NKX2-1-Hs00163037_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
TMEM125-Hs00332778_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR

Genes (Test Bonferroni)	Comparación	Regulación
KRT15-Hs00267035_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
PKP1-Hs00913276_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
RHOBTB2-Hs01598085_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
DSC3-Hs00170032_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
ULBP2-Hs00607609_mH	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
SLC2A1-Hs00892681_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
VSNL1-Hs00374305_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
KRT17-Hs00356958_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
CACNA2D2-Hs01021049_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
ST3GAL5-Hs00187405_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
SLC6A8-Hs00940515_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
KRT5-Hs00361185_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TP63-Hs00978338_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
CLDN3-Hs00265816_s1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
IRF6-Hs00196213_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
GJB6-Hs00917676_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
GJB2-Hs00955889_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
LYPD3-Hs01012111_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TFRC-Hs00174609_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
TMC5-Hs00418688_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
GPR116-Hs00391810_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
LIMD1-Hs00170931_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	UpR
NTRK2-Hs01093110_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
IGF2BP2-Hs01118009_m1	I Adenocarcinoma vs. Escamoso	DownR
DSG3-Hs00951899_m1	IA Adenocarcinoma vs. IB Escamoso	DownR
CTHRC1-Hs00298917_m1	Adenocarcinoma vs. Control	UpR
GREM1-Hs00171951_m1	Adenocarcinoma vs. Control	UpR
COL10A1-Hs00166657_m1	Adenocarcinoma vs. Control	UpR
THBS2-Hs01568063_m1	Adenocarcinoma vs. Control	UpR
SULF1-Hs00290918_m1	Adenocarcinoma vs. Control	UpR
COL1A1-Hs01076777_m1	Adenocarcinoma vs. Control	UpR
SLC2A1-Hs00892681_m1	Adenocarcinoma vs. Control	UpR
SLC2A1-Hs00892681_m1	Escamoso vs. Control	UpR
CTHRC1-Hs00298917_m1	Escamoso vs. Control	UpR
KRT15-Hs00267035_m1	Escamoso vs. Control	UpR
GPR116-Hs00391810_m1	Escamoso vs. Control	DownR
SLC6A8-Hs00940515_m1	Escamoso vs. Control	UpR
KRT17-Hs00356958_m1	Escamoso vs. Control	UpR
CLEC3B-Hs00162844_m1	Escamoso vs. Control	DownR
GREM1-Hs00171951_m1	Escamoso vs. Control	UpR
TFAP2A-Hs01029413_m1	Escamoso vs. Control	UpR
COL10A1-Hs00166657_m1	Escamoso vs. Control	UpR
AGER-Hs00153957_m1	Escamoso vs. Control	DownR
GATA2-Hs00231119_m1	Escamoso vs. Control	DownR
GJB2-Hs00955889_m1	Escamoso vs. Control	UpR

Genes (Test Bonferroni)	Comparación	Regulación
PKP1-Hs00913276_m1	Escamoso vs. Control	UpR
NKX2-1-Hs00163037_m1	Escamoso vs. Control	DownR
COL1A1-Hs01076777_m1	Escamoso vs. Control	UpR
CACNA2D2-Hs01021049_m1	Escamoso vs. Control	DownR
THBS2-Hs01568063_m1	Escamoso vs. Control	UpR
RHOBTB2-Hs01598085_m1	Escamoso vs. Control	DownR
SULF1-Hs00290918_m1	Escamoso vs. Control	UpR
CTHRC1-Hs00298917_m1	I Adenocarcinoma vs. Control	UpR
COL10A1-Hs00166657_m1	I Adenocarcinoma vs. Control	UpR
THBS2-Hs01568063_m1	I Adenocarcinoma vs. Control	UpR
GREM1-Hs00171951_m1	I Adenocarcinoma vs. Control	UpR
SULF1-Hs00290918_m1	I Adenocarcinoma vs. Control	UpR
COL1A1-Hs01076777_m1	I Adenocarcinoma vs. Control	UpR
GATA2-Hs00231119_m1	I Adenocarcinoma vs. Control	DownR
SLC2A1-Hs00892681_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
GPR116-Hs00391810_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
AGER-Hs00153957_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
CTHRC1-Hs00298917_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
NKX2-1-Hs00163037_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
CACNA2D2-Hs01021049_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
SLC6A8-Hs00940515_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
KRT17-Hs00356958_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
GREM1-Hs00171951_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
COL10A1-Hs00166657_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
KRT15-Hs00267035_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
CLEC3B-Hs00162844_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
GATA2-Hs00231119_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
GJB2-Hs00955889_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
SULF1-Hs00290918_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
THBS2-Hs01568063_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
RHOBTB2-Hs01598085_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
COL1A1-Hs01076777_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
TFAP2A-Hs01029413_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
ST3GAL5-Hs00187405_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
COL4A3-Hs01022542_m1	I Escamoso vs. Control	DownR
PKP1-Hs00913276_m1	I Escamoso vs. Control	UpR
CTHRC1-Hs00298917_m1	I Moderadamente vs. Control	UpR
COL10A1-Hs00166657_m1	I Moderadamente vs. Control	UpR
SULF1-Hs00290918_m1	I Moderadamente vs. Control	UpR
THBS2-Hs01568063_m1	I Moderadamente vs. Control	UpR
GREM1-Hs00171951_m1	I Moderadamente vs. Control	UpR
COL1A1-Hs01076777_m1	I Moderadamente vs. Control	UpR
FNDC1-Hs00287359_m1	I Moderadamente vs. Control	UpR
CTHRC1-Hs00298917_m1	I Pobrementemente vs. Control	UpR
THBS2-Hs01568063_m1	I Pobrementemente vs. Control	UpR

Genes (Test Bonferroni)	Comparación	Regulación
COL10A1-Hs00166657_m1	I Pobrementemente vs. Control	UpR
GREM1-Hs00171951_m1	I Pobrementemente vs. Control	UpR
GKN2-Hs00699389_m1	I Pobrementemente vs. Control	DownR
SULF1-Hs00290918_m1	I Pobrementemente vs. Control	UpR
COL1A1-Hs01076777_m1	I Pobrementemente vs. Control	UpR

Tabla 57. Genes diferencialmente regulados en función del tipo de tumor, estadio y grado de diferenciación. UpR, *Upregulated*; DownR, *Downregulated*.

Los resultados de FC del microarray del estudio previo para las muestras de estadio IB de adenocarcinoma y carcinoma escamoso mostraron una excelente concordancia con los resultados de FC de qPCR, con un Coeficiente de Correlación de Concordancia (CCC) de 0,72 (IC 95% = 0,54-0,91). Se obtuvo una concordancia aceptable (valores de CCC \approx 0,5) entre los resultados de FC del microarray y de qPCR para 4 de las 6 comparaciones realizadas (Tabla 58).

Comparación	N° genes implicados	CCC	CCC 95% IC
Adenocarcinoma vs. Escamoso	20	0,19	-0,239-0,611
IB Adenocarcinoma vs. Escamoso	26	0,72	0,54-0,91
I Adenocarcinoma vs. Escamoso	7	0,49	-0,05-1,04
Adenocarcinoma vs. Control	23	0,49	0,19-0,78
Escamoso vs. Control	43	0,44	0,20-0,68
I Escamoso vs. Control	12	0,27	0,30-0,83

Tabla 58. Coeficientes de Correlación de Concordancia (CCC) entre los resultados de FC del microarray y de qPCR para cada comparación. IC, Intervalo de Confianza.

6.2. Estudio de supervivencia

Para el análisis de supervivencia se utilizaron datos de un total de 73 pacientes; sin embargo, de la serie original de 73 pacientes operados de NSCLC, 9 fallecieron en el periodo post-operatorio (< 1 mes) y 2 se perdieron durante el seguimiento periódico. Los resultados histológicos mostraron que, de la muestra final de 62 pacientes, 37 (59,7%) sufrían SCC y 25 (40,3%) AC (Tabla 59).

La edad media de la muestra final fue 68,34 años con un rango comprendido entre 33-83 años y, en cuanto al género de los pacientes, 6 fueron mujeres (9,7%) y 56 hombres (90,3%). De acuerdo a los criterios de clasificación TNM de la 7ª edición, 14 pacientes (22,6%) se hallaban en el estadio patológico IA, 22 en el estadio IB (35,5%), 10 en el IIA (16,1%), 12 en el IIB (19,4%) y 4 en el IIIA (6,4%). Sin embargo, de acuerdo a los criterios de la 6ª edición, 51 de estos mismos pacientes se clasificaron el estadio patológico I (82,3%), 5 en el estadio II (8,1%), 5 en el III (8,1%) y 1 en el IV (1,5%). Por otro lado, el diámetro tumoral en la muestra final fue \leq 2 cm en 5 pacientes, > 2 y hasta 3 cm en 12 pacientes, > 3 y hasta 5 cm en 24 pacientes, > 5 y hasta 7 cm en 11 pacientes y > 7 cm en 10 pacientes. Todos los pacientes fueron sometidos a un

seguimiento durante 6 años o hasta su fallecimiento, si éste tiene lugar antes, y se calculó una supervivencia media para los 62 pacientes de 55,2 meses (hasta Junio de 2010).

Características		Número (n)	%
Población inicial		73	100
Perdidos en seguimiento		2	2,7
Fallecidos en post-operatorio		9	12,3
Pacientes estudiados		62	84,9
Género			
Hombres		56	90,3*
Mujeres		6	9,7*
Histología			
SCC		37	59,7*
AC		25	40,3*
Edad (años)			
Media (rango)		68,34	
Rango		33-83	
Estadio TNM			
7ª edición	IA	14	22,6*
	IB	22	35,5*
	IIA	10	16,1*
	IIB	12	19,4*
	IIIA	4	6,4*
6ª edición	I	51	82,3*
	II	5	8,1*
	III	5	8,1*
	IV	1	1,5*
Supervivencia media (meses)			
Media para todos los pacientes			55,2
Media para los pacientes de SCC		33,8	
Media para los pacientes de AC		25,1	

Tabla 59. Características, estadio TNM (6ª y 7ª edición) y supervivencia media de los pacientes. (*) % de la muestra estudio final de 62 pacientes.

En el modelo de regresión de Cox se introdujeron las siguientes variables: recurrencia tumoral, estadio TNM según la 7ª edición, tratamiento adyuvante, tipo de cáncer (AC o SCC) y la expresión génica de PKP1 y KRT15. Finalmente, las únicas variables seleccionadas fueron el estadio TNM según la 7ª edición en el primer paso y la recurrencia tumoral en el segundo paso.

El análisis de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier presentó un resultado significativo ($p = 0,008$) para el uso de terapias adyuvantes en pacientes con afección ganglionar, lo cual indica que esta variable influye en la supervivencia del paciente de un modo individual e independiente de otras variables. Sin embargo, cuando todas las variables fueron introducidas en el modelo de regresión de Cox, la variable de terapia adyuvante fue excluida mientras que el estadio TNM según la 7ª edición fue incluida, lo que puede indicar que la administración de terapia adyuvante no influye en la supervivencia del paciente tras el control de las otras variables y podría estar asociado al estadio TNM según la 7ª edición. Una vez observado que no había

diferencias significativas en la supervivencia entre pacientes con y sin tratamiento adyuvante, el resto de análisis estadísticos se realizaron sin distinguir entre ambos grupos de pacientes.

Cuando los criterios de clasificación TNM de la 7ª edición fueron aplicados al análisis de la supervivencia, no se encontraron diferencias significativas en función del índice T ($p = 0,385$) o del índice T en relación a la recurrencia tumoral ($p = 0,508$ [con recurrencia] y $p = 0,931$ [sin recurrencia]) (Tabla 60), indicando que la supervivencia no está influenciada por el tamaño del tumor, ni individualmente ni en asociación con la recurrencia tumoral.

Edición de la clasificación TNM	Variable*	p-valor**	
6ª	T	0,006	
	RT	0,000	
	E ^{TNM}	0,000	
	T+RT	c/RT	0,474
		s/RT	0,003
	T+E ^{TNM}	I	0,550
		II	0,292
		III	0,100
IV		-	
7ª	T	0,385	
	RT	0,000	
	E ^{TNM}	0,000	
	T+RT	c/RT	0,508
		s/RT	0,931
	T+E ^{TNM}	IA	0,039
		IB	-
		IIA	0,510
		IIB	0,557
IIIA		0,218	

Tabla 60. Diferencias en la supervivencia en función de la edición de la clasificación TNM. (*) E^{TNM} = Estadio TNM; T = índice T; RT = Recurrencia Tumoral; c/RT = con Recurrencia Tumoral; s/RT = sin Recurrencia Tumoral. (**) Los p-valores fueron calculados usando el test Log-Rank.

Sin embargo, cuando se aplicaron los criterios de la 6ª edición, las tasas de supervivencia sí fueron significativamente diferentes en función del índice T ($p = 0,006$) y, cuando el índice T fue analizado en relación a la recurrencia tumoral, se encontraron diferencias significativas entre los casos sin recurrencia ($p = 0,003$) pero no entre aquellos con recurrencia ($p = 0,474$).

Cuando se consideraron los criterios de la 7ª edición, la supervivencia difirió significativamente en función del índice T en pacientes en estadio patológico IA ($p = 0,039$) pero no para pacientes en otros estadios ($p > 0,05$). Además, tales diferencias no fueron observadas bajo los criterios de la 6ª edición de clasificación TNM ($p > 0,05$).

Las tasas de supervivencia entre pacientes con y sin recurrencia tumoral fueron significativamente diferentes con ambas ediciones de clasificación TNM ($p < 0,001$), indicando una mayor supervivencia en aquellos pacientes que no presentan recurrencia tumoral. La supervivencia también difirió significativamente en función del estadio TNM definido tanto por los criterios de la 6ª como la 7ª edición ($p < 0,001$). La media de supervivencia fue de 33,8 meses para los 37 pacientes de SCC y de 25,1 meses para los 25 de AC, aunque esta diferencia no fue significativa (Kaplan-Meier, $p = 0,162$), lo cual es indicativo de que el subtipo histológico del cáncer no influye en la supervivencia del paciente.

En el estudio de expresión génica por qPCR, los niveles de *Pkp1* no pudieron ser obtenidos en 2 pacientes y los niveles de *Krt15* tampoco pudieron obtener en otros 2 pacientes. De entre los pacientes con resultados de microarray o qPCR, *Pkp1* se encontró sobreexpresado en 43/59 pacientes (72,9%), *Krt15* en 51/59 (86,4%), y ambos genes en 39/58 (67,2%). Atendiendo al tipo histológico, *Pkp1* se halló sobreexpresado en el 25% de los casos de AC y en el 96% de los casos de SCC según los datos de microarray y en el 50% de AC y 78% de SCC según los datos de qPCR. Entre los 43 pacientes con sobreexpresión de *Pkp1*, la tasa de supervivencia media fue de 16,3 meses para los 10 casos de AC y 34,6 meses para los 33 casos de SCC.

Hubo sobreexpresión de *Krt15* en el 58,3% (7/12) de los casos de AC y en el 100% (28/28) de los casos de SCC según los resultados de microarray, y en el 66,7% (8/12) de AC y 88,9% (8/9) de SCC según el análisis por qPCR. Entre los 51 pacientes con alta expresión de *Krt15*, la tasa de supervivencia media fue de 24,1 meses para los 16 casos de AC y 34,1 meses para los 36 casos de SCC.

Por otro lado, entre los 39 pacientes con una elevada expresión de ambos genes, la tasa de supervivencia media fue de 13,5 meses para los 6 casos de AC y 34,6 meses para los 33 casos de SCC. Sin embargo, no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre la media de supervivencia y los niveles de expresión de *Pkp1* o *Krt15* ($p = 0,221$ y $p = 0,610$, respectivamente) o en función del subtipo histológico (AC o SCC) ($p > 0,05$) (Tabla 61), o entre la media de supervivencia y la expresión simultánea de ambos genes ($p = 0,888$).

En el análisis por regresión de Cox para determinar las variables con un efecto independiente y significativo en la supervivencia de los pacientes, se incluyeron el estadio TNM según la 7ª edición de clasificación en un primer paso y la recurrencia tumoral en un segundo paso. Se encontró una diferencia significativa entre los estadios IIB y IA ($p = 0,004$) y rozando la significancia entre el IB y IA ($p = 0,090$) según los criterios de la 7ª edición. La probabilidad de fallecer fue entre 1,115 y 7,395 veces mayor en pacientes con recurrencia tumoral frente a aquellos sin recurrencia. El modelo excluyó las variables índice T (según los criterios de la 7ª edición del sistema de clasificación TNM), tipo de cáncer y expresión génica de *Pkp1* y *Krt15* ($p > 0,05$).

La aplicación del test de Fisher reveló que las expresiones génicas de *Pkp1* y *Krt15* fueron independientes de la variable recurrencia tumoral ($p = 1,000$ para *Pkp1* y $p = 0,305$ para *Krt15*).

Nivel de Expresión		Datos	n	n Total*	%	MS (meses)	% supervivientes	p-valor**	p-valor***	
Pkp1	Mayor expresión	Microarray	30	43	72,9	30,4	74,4	0,221	AC	0,121
		qPCR	13							
	Sin cambios	Microarray	10	12	20,3	36,5	75			
		qPCR	2							
	Menor expresión	Microarray	0	4	6,8	16,75	50			
		qPCR	4							
Krt15	Mayor expresión	Microarray	35	51	86,4	30,9	72,5	0,61	AC	0,512
		qPCR	16							
	Sin cambios	Microarray	4	6	10,1	25,6	66,7			
		qPCR	2							
	Menor expresión	Microarray	1	2	3,4	37	100			
		qPCR	1							
								SCC	-	

Tabla 61. Análisis de los niveles de expresión de los genes *Pkp1* y *Krt15*. (*) n = número de muestras; % = % del grupo muestral de 59 pacientes; MS = Media de Supervivencia. (**) p-valores para la relación entre niveles de expresión y supervivencia, calculados usando el test Log-Rank. (***) p-valores para la relación entre niveles de expresión en función del tipo de carcinoma y supervivencia, calculados usando el test Log-Rank.

6.3. Estudio inmunohistológico

Para el estudio histológico se analizaron 75 tumores NSCLC, 47 de los cuales fueron SCC y 28 AC. En cuanto al grado de diferenciación de las muestras SCC, 26 casos fueron clasificados como bien-moderadamente diferenciados y 21 como pobremente diferenciados. Por otro lado, los AC se clasificaron como bien-moderadamente diferenciados en 17 ocasiones y pobremente diferenciados en 11.

Tipo de tumor (N)	Núcleo PKP1		Citoplasma PKP1		Membrana PKP1	
	+ (N)	- (N)	+ (N)	- (N)	+ (N)	- (N)
AC (28)	3,6% (1)	96,4% (27)	14,3% (4)	85,7% (24)	0% (0)	100% (28)
	(Cochran $p=0,039$)		(Cochran $p=0,039$)		(Cochran $p=0,039$)	
SCC (47)	36,1% (17)	63,8% (30)	59,6% (28)	40,4% (19)	57,4% (27)	42,5% (20)
	(Cochran $p=0,001$)		(Cochran $p=0,001$)		(Cochran $p=0,001$)	
SCC: Bien-Moderadamente (26)	38,5% (10)	61,5% (16)	65,4% (17)	34,6% (9)	69,2% (18)	30,8% (8)
SCC: Pobremente (21)	35% (7)	65% (13)	55% (11)	45% (9)	45% (9)	55% (11)
	$(\chi^2 p=1,000)$		$(\chi^2 p=0,681)$		$(\chi^2 p=0,176; Fisher p=0,135)$	
AC: Bien-Moderadamente (17)	5,9% (1)	94,1% (16)	11,8% (2)	88,2% (15)	0% (0)	100% (17)
AC: Pobremente (11)	0% (0)	100% (11)	18,2% (2)	81,8% (9)	0% (0)	100% (11)
	(Fisher $p=1,000$)		(Fisher $p=1,000$)			

Tabla 62. Análisis de la localización subcelular de PKP1. (N, número de casos).

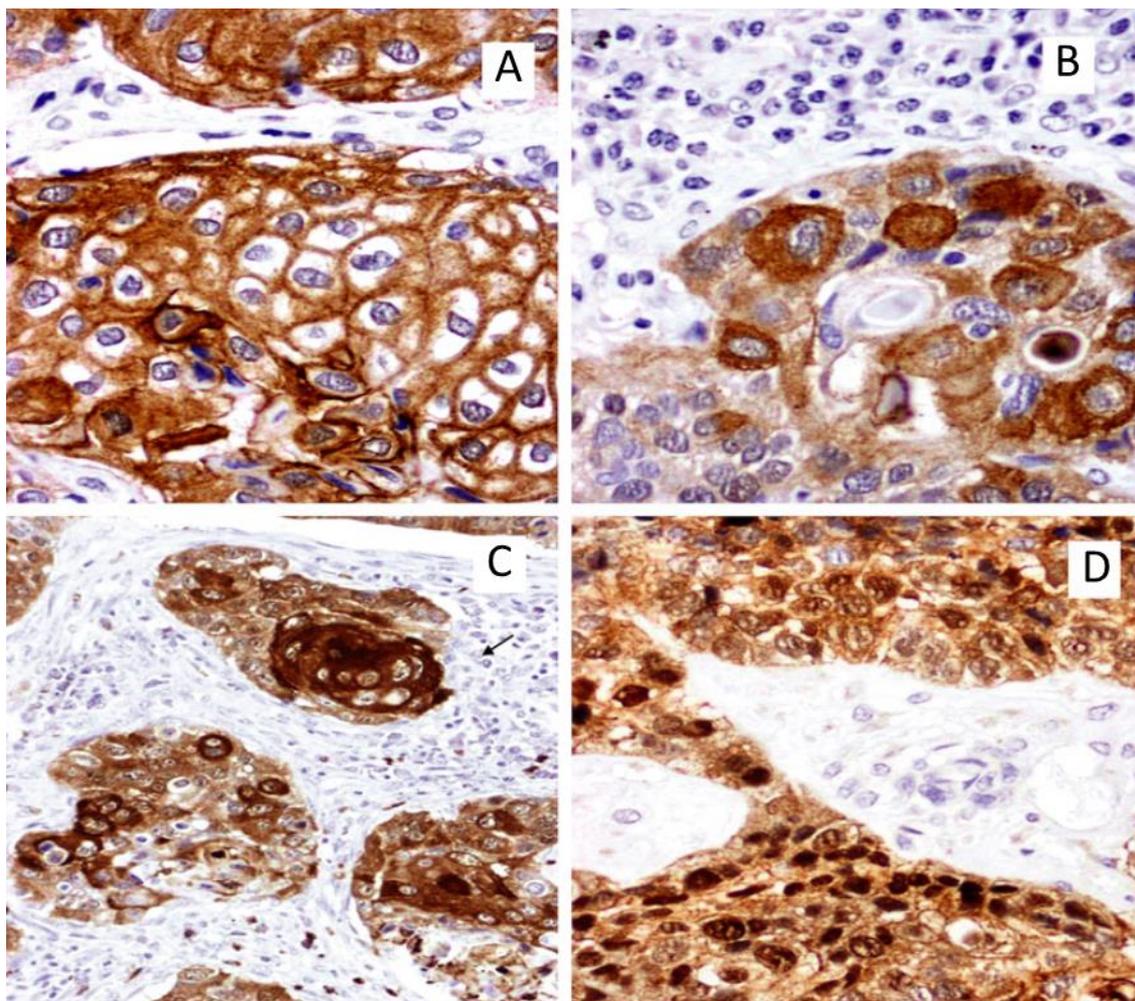


Figura 42. Localización inmunohistológica de PKP1 en carcinoma de células escamosas de pulmón. A) Tinción de membrana. B) Tinción de citoplasma. C) Tinción de citoplasma con fuerte marcaje de las perlas córneas (flecha). D) Intensa tinción nuclear en células con apariencia más inmadura

Los resultados inmunohistoquímicos para PKP1 se presentan en la Tabla 62. La localización inmunohistoquímica de PKP1 se restringió principalmente a los carcinomas de células escamosas (SCC), con una distribución e intensidad de tinción heterogénea entre los diferentes carcinomas y las diferentes áreas de los carcinomas. En las muestras SCC, la expresión de PKP1 se localizó principalmente en citoplasma y membrana (test de Cochran, $p = 0,001$), marcando las uniones intercelulares (Fig. 42). La expresión de PKP1 en membrana fue observada sobre todo en muestras de SCC bien-moderadamente diferenciadas (χ^2 , $p = 0,176$; test de Fisher, $p = 0,135$) y se halló predominantemente en áreas bien diferenciadas de los carcinomas. La tinción nuclear de PKP1 se observó en células con una apariencia más inmadura (Fig. 42D). En el caso de los adenocarcinomas, el marcaje de PKP1 generalmente fue focal y de intensidad variable en núcleo y citoplasma, y nunca fue observado en la membrana celular (test de Cochran, $p = 0,039$) (Fig. 43).

Los resultados inmunohistoquímicos de KRT15 se muestran en la Tabla 63. La localización inmunohistoquímica de KRT15 se limitó sobre todo a los carcinomas de células escamosas (SCC), con una distribución e intensidad de tinción heterogénea entre los diferentes

carcinomas y las diferentes áreas de los carcinomas. La tinción de KRT15 fue evidente en citoplasma y principalmente en la membrana plasmática (test de Cochran, $p = 0,000$), marcando las uniones intercelulares (Fig. 44). En las muestras SCC tanto bien-moderadamente como pobremente diferenciadas mostraron marcaje de KRT15 en membrana (χ^2 , $p = 1,000$), siendo la tinción positiva principalmente observada en áreas bien diferenciadas de los tumores.

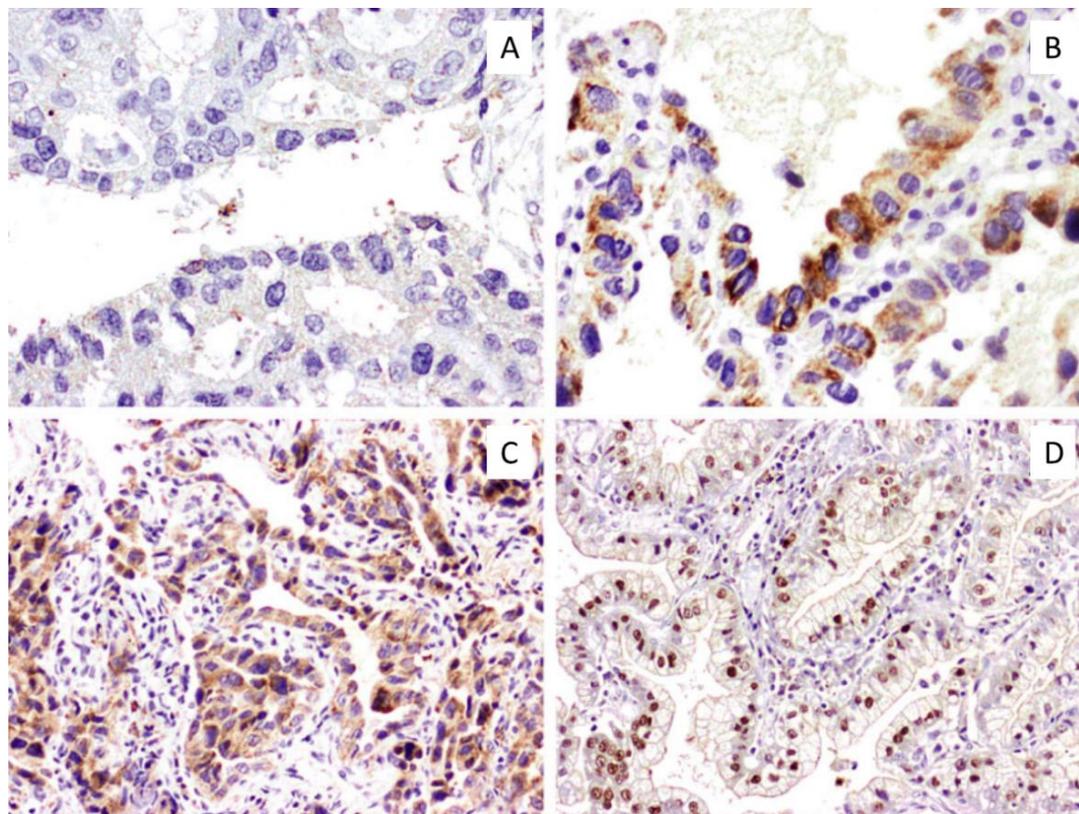


Figura 43. Localización inmunohistológica de PKP1 en adenocarcinoma de pulmón. A) tinción negativa. B y C) Tinción de citoplasma. D) Tinción nuclear.

Tipo de tumor (N)	Núcleo KRT15		Citoplasma KRT15		Membrana KRT15	
	+(N)	-(N)	+(N)	-(N)	+(N)	-(N)
AC (26)	26,9% (7)	73,1% (19)	3,8% (1)	96,2% (25)	0% (0)	100% (26)
	(Cochran $p=0,005$)		(Cochran $p=0,005$)		(Cochran $p=0,005$)	
SCC (47)	0% (0)	100% (47)	46,8% (22)	53,2% (25)	70,2%(33)	29,8% (14)
	(Cochran $p=0,000$)		(Cochran $p=0,000$)		(Cochran $p=0,000$)	
SCC: Bien-Moderadamente (26)	0% (0)	100% (26)	46,2% (12)	53,8% (14)	73,1% (19)	26,9% (7)
SCC: Pobremente (21)	0% (0)	100% (21)	41,7% (10)	50% (11)	70% (15)	30% (6)
			$(\chi^2 p=1,000)$		$(\chi^2 p=1,000)$	
AC: Bien-Moderadamente (16)	25% (4)	75% (12)	0% (0)	100% (16)	0% (0)	100% (16)
AC: Pobremente (10)	30% (3)	70% (7)	10% (1)	90% (9)	0% (0)	100% (10)
	$(Fisher p=1,000)$		$(Fisher p=0,385)$			

Tabla 63. Análisis de la localización subcelular de KRT15. (N, número de casos).

Generalmente, en las muestras de adenocarcinoma no se observó marcaje de KRT15 en membrana (test de Cochran, $p = 0,005$), siendo la tinción de KRT15 focal y de intensidad variable en núcleo y citoplasma, y nunca fue observado en membrana. La tinción nuclear de KRT15 se observó en células con una apariencia más inmadura.

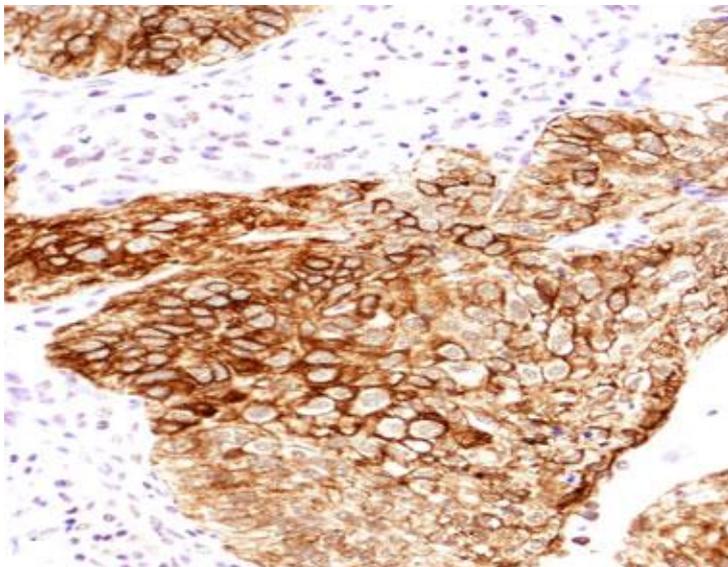


Figura 44. Localización inmunohistológica de KRT15 en membrana de carcinoma escamoso de pulmón.

Los resultados inmunohistoquímicos de DSG3 se resumen en la Tabla 64. Apenas se observó tinción inmunohistoquímica de DSG3 en las muestras de adenocarcinoma pero hubo resultados positivos en el marcaje de membrana en carcinomas escamosos (test de Cochran, $p = 0,000$). La expresión de DSG3 fue observada principalmente en casos de SCC bien-moderadamente diferenciados (χ^2 , $p = 0,792$). Casi todas las muestras de AC fueron negativas en el marcaje tanto de núcleo como citoplasma y/o membrana (test de Cochran, $p = 0,223$) y tampoco se observó tinción en la gran mayoría de AC bien-moderadamente o pobremente diferenciados (test exacto de Fisher, $p = 1,000$).

Tipo de tumor (N)	Núcleo DSG3		Citoplasma DSG3		Membrana DSG3	
	+(N)	-(N)	+(N)	-(N)	+(N)	-(N)
AC (28)	7,1% (2)	92,9% (26)	3,6% (1)	96,4% (27)	0% (0)	100% (28)
	(Cochran $p=0,223$)		(Cochran $p=0,223$)		(Cochran $p=0,223$)	
SCC (45)	2,2% (1)	97,8% (44)	15,6% (7)	84,4% (38)	53,3%(24)	46,7% (21)
	(Cochran $p=0,000$)		(Cochran $p=0,000$)		(Cochran $p=0,000$)	
SCC: Bien-Moderadamente (25)	0% (0)	100% (25)	16% (4)	84% (21)	56% (14)	44% (11)
SCC: Pobremente (20)	5,3% (1)	94,7% (19)	15,8% (3)	84,2% (17)	47,4% (9)	52,6% (11)
	(Fisher $p=0,432$)		(Fisher $p=1,000$)		$(\chi^2 p=0,792)$	
AC: Bien-Moderadamente (17)	5,9% (1)	94,1% (16)	5,9% (1)	94,1% (16)	0% (0)	100% (17)
AC: Pobremente (11)	9,1% (1)	90,9% (10)	0% (0)	100% (11)	0% (0)	100% (11)
	(Fisher $p=1,000$)		(Fisher $p=1,000$)			

Tabla 64. Análisis de la localización subcelular de DSG3. (N, número de casos).

La Tabla 65 resume los resultados obtenidos en tumores pobremente diferenciados, mostrando que la tinción fue ampliamente negativa en adenocarcinomas y, aunque sólo fue positiva en un bajo porcentaje de los casos de carcinoma escamoso, se puede considerar una característica distintiva de éste último.

Tipo de tumor (Localización)	PKP1		KRT15		DSG3	
	+ (N)	- (N)	+ (N)	- (N)	+ (N)	- (N)
AC (Núcleo)	0% (0)	100% (11)	30% (3)	70% (7)	9,1% (1)	90,9% (10)
	(Fisher $p=1,000$)		(Fisher $p=1,000$)		(Fisher $p=1,000$)	
AC (Citoplasma)	18,2% (2)	81,8% (9)	10% (1)	90% (9)	0% (0)	100% (11)
	(Fisher $p=1,000$)		(Fisher $p=0,385$)		(Fisher $p=1,000$)	
AC (Membrana)	0% (0)	100% (11)	0% (0)	100% (10)	0% (0)	100% (11)
SCC (Núcleo)	35% (7)	65% (13)	0% (0)	100% (21)	5,3% (1)	94,7% (19)
	$(\chi^2 p=1,000)$		(Fisher $p=0,432$)			
SCC (Citoplasma)	55% (11)	45% (9)	41,7% (10)	50% (11)	15,8% (3)	84,2% (17)
	$(\chi^2 p=0,681)$		$(\chi^2 p=1,000)$		(Fisher $p=1,000$)	
SCC (Membrana)	45% (9)	55% (11)	70% (15)	30% (6)	47,4% (9)	52,6% (11)
	$(\chi^2 p=0,176$; Fisher $p=0,135$)		$(\chi^2 p=1,000)$		$(\chi^2 p=0,792)$	

Tabla 65. Características de la tinción de los tumores pobremente diferenciados.
(N, número de casos).

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficacia (%)
DSG3 nuclear	1/45 (2)	26/28 (93)	1/3 (33)	26/70 (37)	27/73 (37)
DSG3 citoplasmático	7/45 (16)	27/28 (96)	7/8 (87)	27/65 (42)	34/73 (47)
DSG3 de membrana	24/45 (53)	28/28 (100)	24/24 (100)	28/49 (57)	58/73 (79)
KRT15 nuclear	0/47 (0)	19/26 (73)	0/7 (0)	19/66 (29)	19/73 (26)
KRT15 citoplasmático	22/23 (96)	25/26 (96)	22/47 (47)	25/26 (96)	47/73 (64)
KRT15 de membrana	33/33 (100)	26/40 (65)	33/47 (70)	26/26 (100)	59/73 (81)
PKP1 nuclear	17/47 (36)	27/28 (96)	17/28 (61)	27/57 (47)	44/75 (59)
PKP1 citoplasmático	28/29 (97)	24/28 (86)	28/32 (87)	24/32 (75)	52/75 (69)
PKP1 de membrana	27/47 (57)	28/28 (100)	27/27 (100)	28/48 (58)	55/75 (73)

Tabla 66. Sensibilidad y especificidad de la tinción inmunohistoquímica de DSG3, KRT15 y PKP1 para carcinoma escamoso. Sensibilidad, VP/VP+FN; Especificidad, VN/VN+FP; VPP, VP/VP+FP; VPN, VN/VN+FN; Eficacia, VP+VN/VP+FP+FN+VN. (VPP, Valor Predictivo Positivo; VPN, Valor Predictivo Negativo; VP, Verdaderos Positivos; VN, Verdaderos Negativos; FP, Falsos Positivos; FN, Falsos Negativos).

La Tabla 66 muestra la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y eficacia de las tinciones de PKP1, KRT15 y DSG3 para el diagnóstico de carcinoma de células escamosas de acuerdo a si la tinción es nuclear, citoplasmática o de membrana. La eficacia más alta se obtuvo para la tinción de membrana de estos anticuerpos (79% para DSG3,

81% para KRT15 y 73% para PKP1). Por otro lado, la máxima sensibilidad (100%) se logró para la tinción de membrana con KRT15 y la mayor especificidad se alcanzó en la tinción de membrana con DSG3 y PKP1.

6.4. Ensayos funcionales

6.4.1. Búsqueda bioinformática en bases de datos

Una vez realizados los análisis de expresión de muestras tumorales de NSCLC mediante microarray, posteriormente validados por qPCR, y los ensayos inmunohistoquímicos, se consultaron distintas bases de datos de perfiles de expresión con el fin de confirmar y apoyar los resultados obtenidos mediante datos de estudios independientes.

En la base de datos de perfiles de expresión *ONCOMINE* se hallaron tres estudios diferentes realizados en muestras primarias de cáncer de pulmón en los que estas muestras se enfrentaban a muestras de tejido pulmonar sano.

Uno de los estudios fue realizado por Hou J. *et al.* en 2010 (Hou *et al.*, 2010) en 156 muestras compuestas por 91 muestras tumorales y 65 de tejido pulmonar normal adyacente (código de acceso GEO, GSE19188).

Otro estudio fue realizado por Bhattacharjee A. *et al.* en 2001 (Bhattacharjee *et al.*, 2001) en 203 muestras compuestas por 186 muestras tumorales y 17 de tejido pulmonar normal (código de acceso GEO, GSE3526).

El tercer estudio fue realizado por Wachi S. *et al.* en 2005 (Wachi *et al.*, 2005) en 10 muestras compuestas por 5 muestras de SCC de pulmón y 5 de tejido pulmonar normal (código de acceso GEO, GSE3268).

Los resultados del estudio de Hou J. *et al.* (2010) mostraron una mayor expresión del gen *Pkp1* en las muestras correspondientes a SCC de pulmón ($n = 27$) comparado con las muestras sanas ($n = 65$), las de AC ($n = 45$) y las LCC de pulmón ($n = 19$) (Fig. 45).

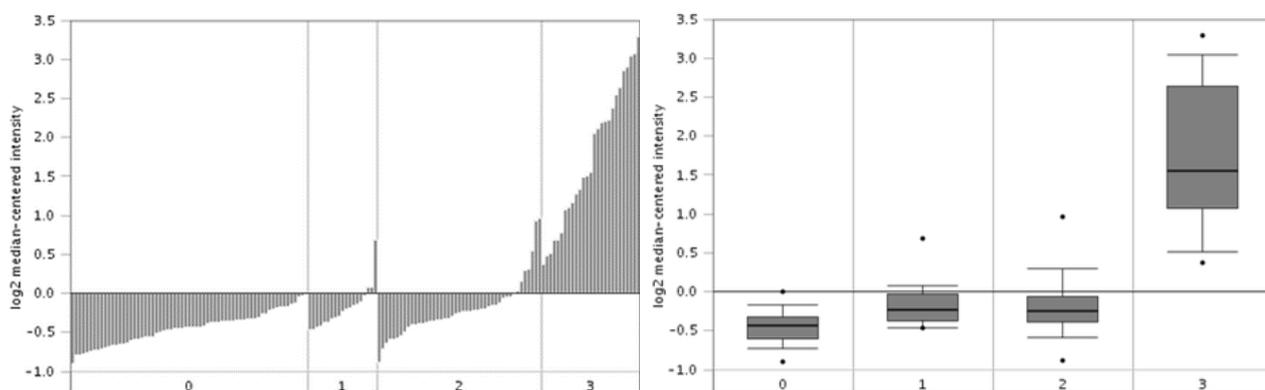


Figura 45. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (0) Muestras de tejido pulmonar normal adyacente; (1) Muestras de LCC de pulmón; (2) Muestras de AC de pulmón; (3) Muestras de SCC de pulmón. (Gráficas de *ONCOMINE* (Hou *et al.*, 2010)).

Cuando se compararon los niveles de expresión de *Pkp1* de las muestras SCC de pulmón ($n = 27$) con las muestras de tejido sano adyacente ($n = 65$), se observó una sobreexpresión de este gen en las muestras de SCC con un nivel de FC de 45,9 ($p = 7,43E-24$) (Fig. 46).

Sin embargo, los niveles de FC fueron de 28,557 ($p = 2,99E-31$) (Fig. 47) al comparar las mismas muestras de SCC ($n = 27$) con el resto de muestras de NSCLC ($n = 64$), las cuales incluyen AC y LCC.

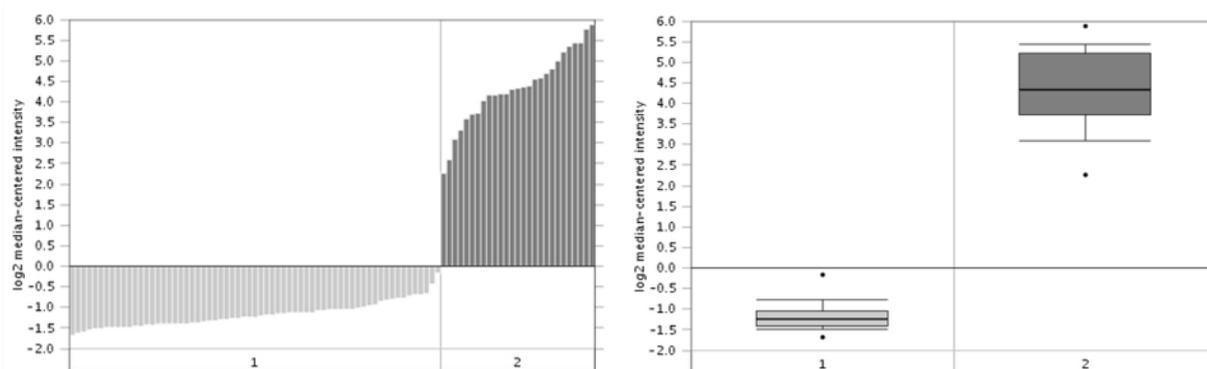


Figura 46. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (1) Muestras de tejido pulmonar normal adyacente; (2) Muestras de SCC de pulmón. (Gráficas de *ONCOMINE* (Hou *et al.*, 2010)).

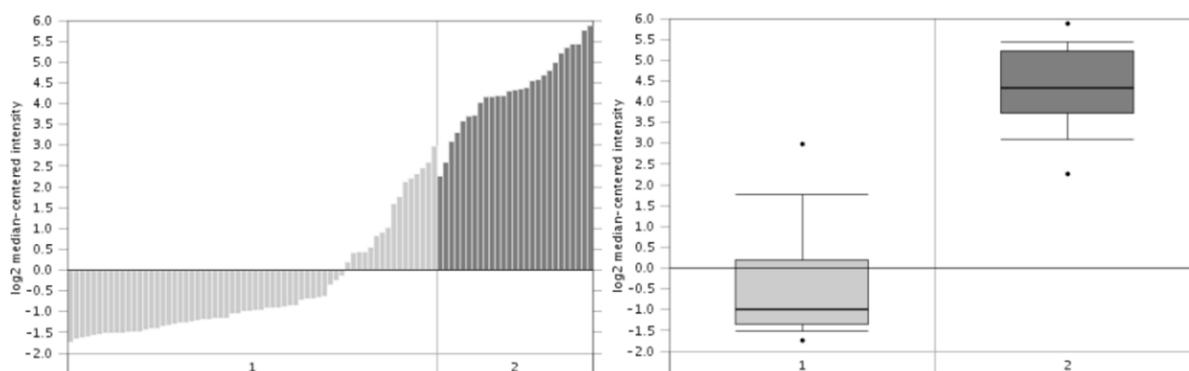


Figura 47. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (1) Muestras tumorales de NSCLC (LCC y AC); (2) Muestras de SCC de pulmón. (Gráficas de *ONCOMINE* (Hou *et al.*, 2010)).

De forma análoga, el estudio realizado por Bhattacharjee A. *et al.* (2001) arrojó resultados similares mostrando una sobreexpresión de *Pkp1* en las muestras de SCC ($n = 21$) con respecto al resto de muestras, tanto de tejido normal ($n = 17$) como de tejido tumoral de diferentes subtipos ($n = 165$) (Fig. 48).

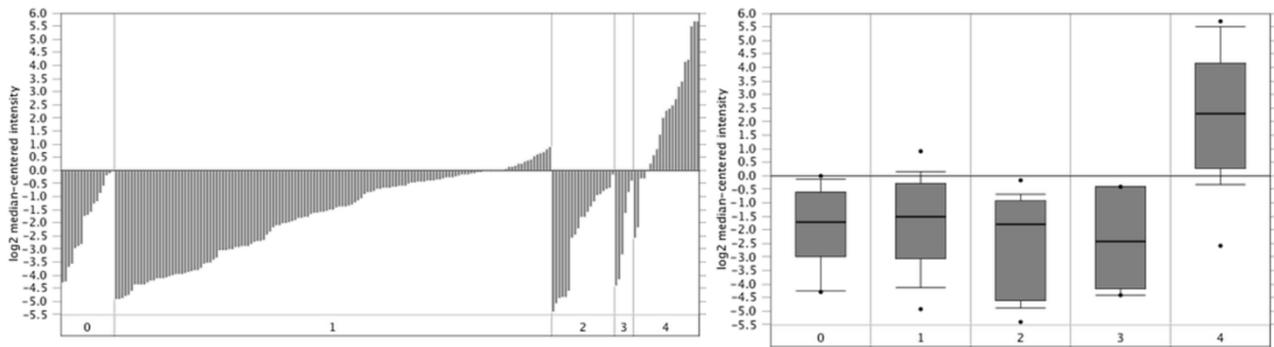


Figura 48. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (0) Muestras de tejido pulmonar normal; (1) Muestras de AC de pulmón; (2) Muestras tumorales de Carcinoide de pulmón; (3) Muestras de SCLC de pulmón; (4) Muestras de SCC de pulmón. (Gráficas de ONCOMINE (Bhattacharjee *et al.*, 2001)).

Cuando se compararon los niveles de expresión de *Pkp1* de las muestras SCC de pulmón ($n = 21$) con las muestras de tejido sano ($n = 17$), se observó una sobreexpresión de *Pkp1* en las muestras de SCC con un nivel de FC de 15,633 ($p = 1,73E-7$) (Fig. 49).

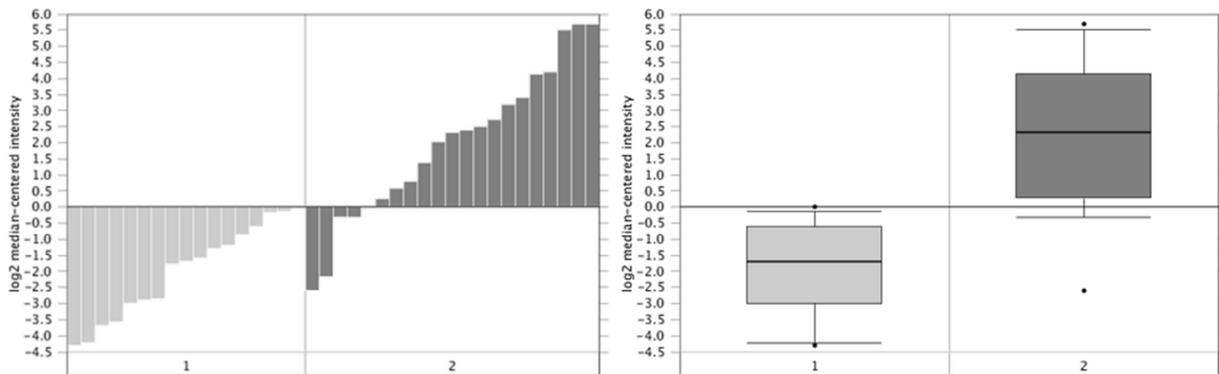


Figura 49. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (1) Muestras de tejido pulmonar normal; (2) Muestras de SCC de pulmón. (Gráficas de ONCOMINE (Bhattacharjee *et al.*, 2001)).

Sin embargo, los niveles de FC fueron de 14,064 ($p = 1,62E-7$) (Fig. 50) al comparar las mismas muestras de SCC ($n = 21$) con el resto de muestras de NSCLC ($n = 132$) y SCLC ($n = 6$).

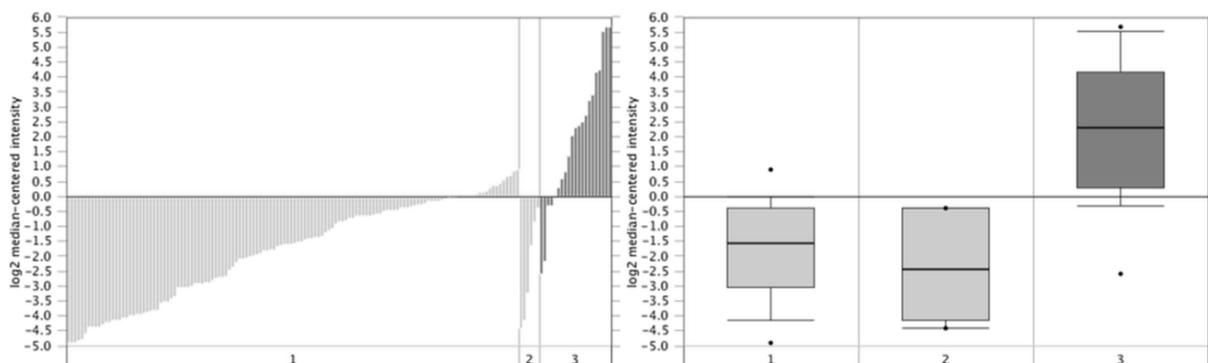


Figura 50. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (1) Muestras tumorales de NSCLC (LCC y AC); (2) Muestras de SCLC de pulmón; (3) Muestras de SCC de pulmón. (Gráficas de ONCOMINE (Bhattacharjee *et al.*, 2001)).

Finalmente, también en el estudio de Wachi A. *et al.* (2005) se observó sobreexpresión de *Pkp1* en las muestras de SCC (n = 5) con respecto a las muestras de tejido normal (n = 5), con un FC de 18,615 ($p = 1,01E-4$) (Fig. 51).

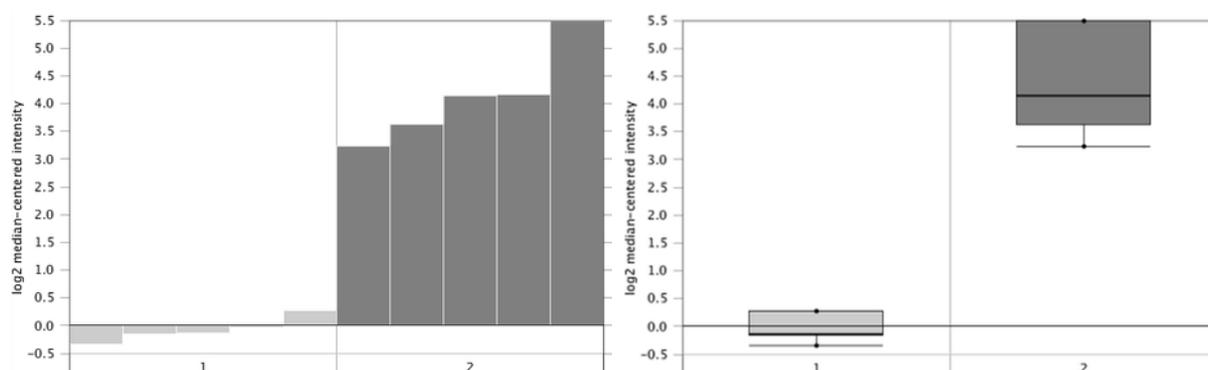


Figura 51. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (1) Muestras de tejido pulmonar normal; (2) Muestras de SCC de pulmón. (Gráficas de *ONCOMINE* (Wachi *et al.*, 2005)).

Con la utilización de la base de datos *GEO Database* del NCBI, se hallaron nuevos estudios en los que también se observaron sobreexpresiones de *Pkp1* en muestras tumores primarios de SCC de pulmón en comparación con otros tipos tumorales y en muestras de líneas celulares tumorales.

Uno de estos estudios fue realizado por Kuner R. *et al.* en 2009 (Kuner *et al.*, 2009) en 58 muestras de NSCLC (código de acceso GEO, GSE10245) (Fig. 52).

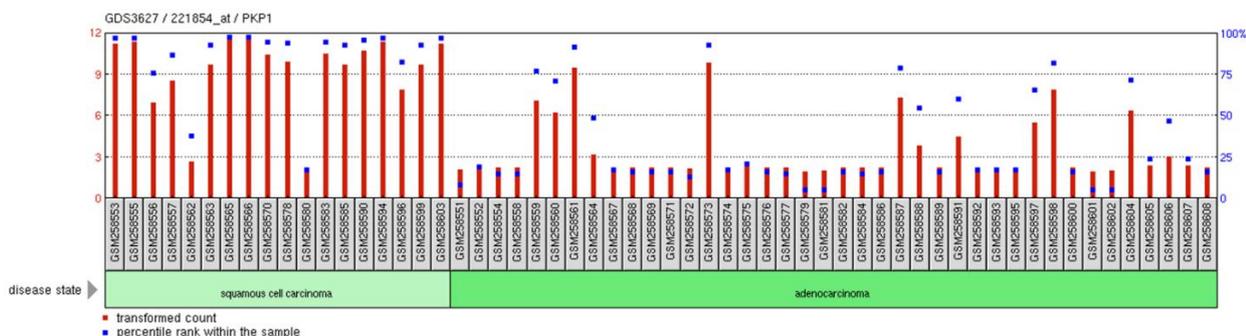


Figura 52. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras de NSCLC. (Gráfica de *GEO Database* (Kuner *et al.*, 2009)).

Otro de los estudios fue realizado con un panel de 29 líneas celulares de cáncer de pulmón (código de acceso GEO, GSE4127) (Gemma *et al.*, 2006; Miyanaga *et al.*, 2008). En este estudio se observa que las líneas celulares de AC y SCLC presentan niveles de expresión de *Pkp1* muy bajo o inexistentes, y que sólo algunas líneas de SCC de pulmón sobreexpresan *Pkp1* (líneas PC-10 [muestra GSM94319], LC1/sq [muestra GSM94326] y LC-1F [muestra GSM94327]) (Fig. 53).

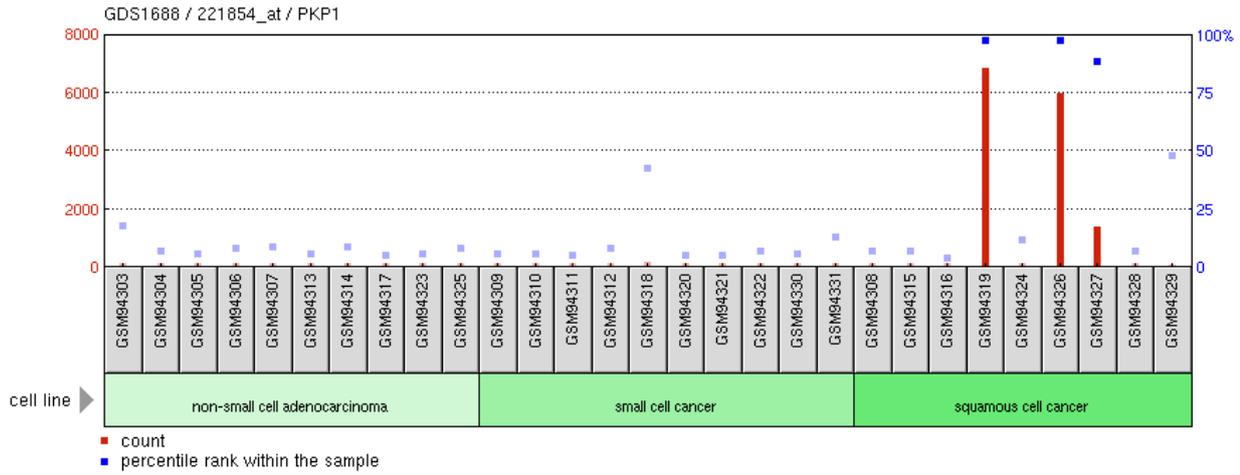


Figura 53. Niveles de expresión de *Pkp1* en líneas celulares de cáncer de pulmón. (Gráfica de *GEO Database (Gemma et al., 2006; Miyanaga et al., 2008)*).

Con el fin de realizar un cribado bioinformático de las líneas celulares de cáncer de pulmón con alta expresión de *Pkp1*, el cual permitiera elegir modelos adecuados para los posteriores ensayos funcionales, se consultó la base de datos *Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)* del *Broad Institute*. Esta base de datos cuenta con información de expresión génica de 131 líneas de NSCLC y, la media de expresión de *Pkp1* de estas 131 líneas se situó en el n° 16 del *ranking* aunque este dato no hace distinción entre los distintos subgrupos histológicos de NSCLC (Fig. 54).

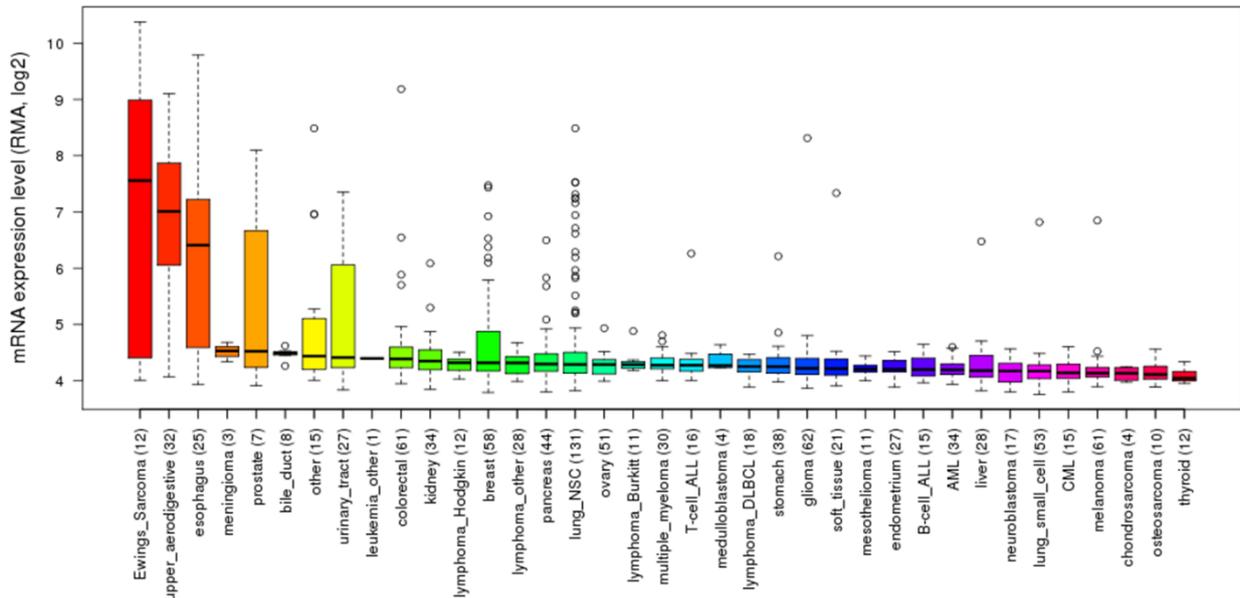


Figura 54. Niveles de expresión de *Pkp1* en líneas celulares de NSCLC. (Gráfica de *CCLE*).

Para tener un dato más exacto de la expresión génica de *Pkp1* en las líneas SCC en concreto, se exportaron de la *CCLE* los datos de expresión de ARNm de *Pkp1* (RMA, log₂) y se ordenaron de mayor a menor (Fig. 55).

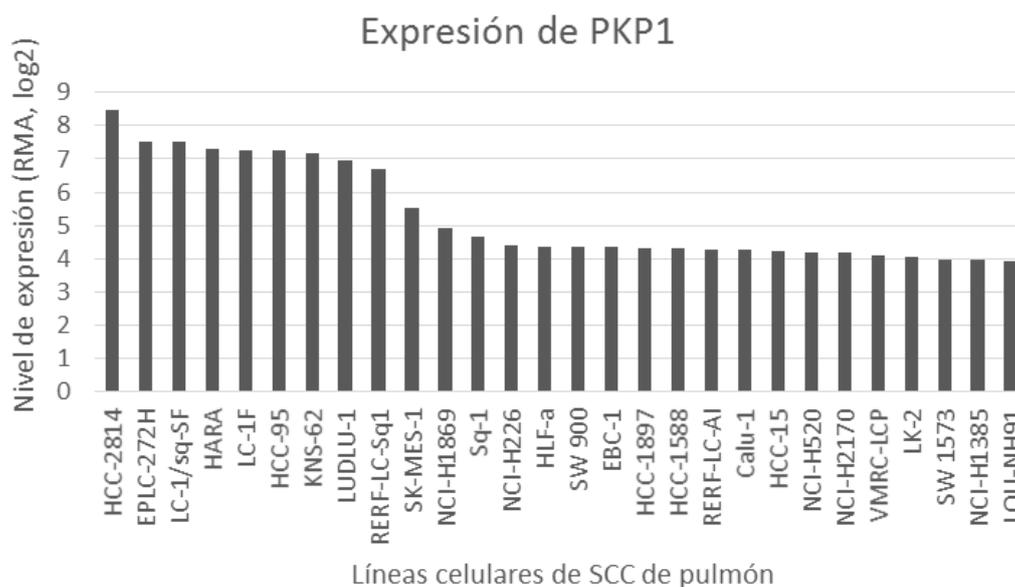


Figura 55. Niveles de expresión de ARNm de *Pkp1* (RMA, \log_2) en líneas celulares de SCC de acuerdo a los datos de la CCLE.

La base de datos *Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal* del NIH proporcionó, además, datos sobre el nivel de expresión de *Pkp1* en diversos tejidos normales. La base de datos *GTEx* cuenta con información de expresión génica de 320 muestras de tejido pulmonar dando una media de expresión de *Pkp1* de 0,312 RPKM (del inglés, *Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*), lo que sitúa al tejido pulmonar en la posición nº 11 del ranking (Fig. 56).

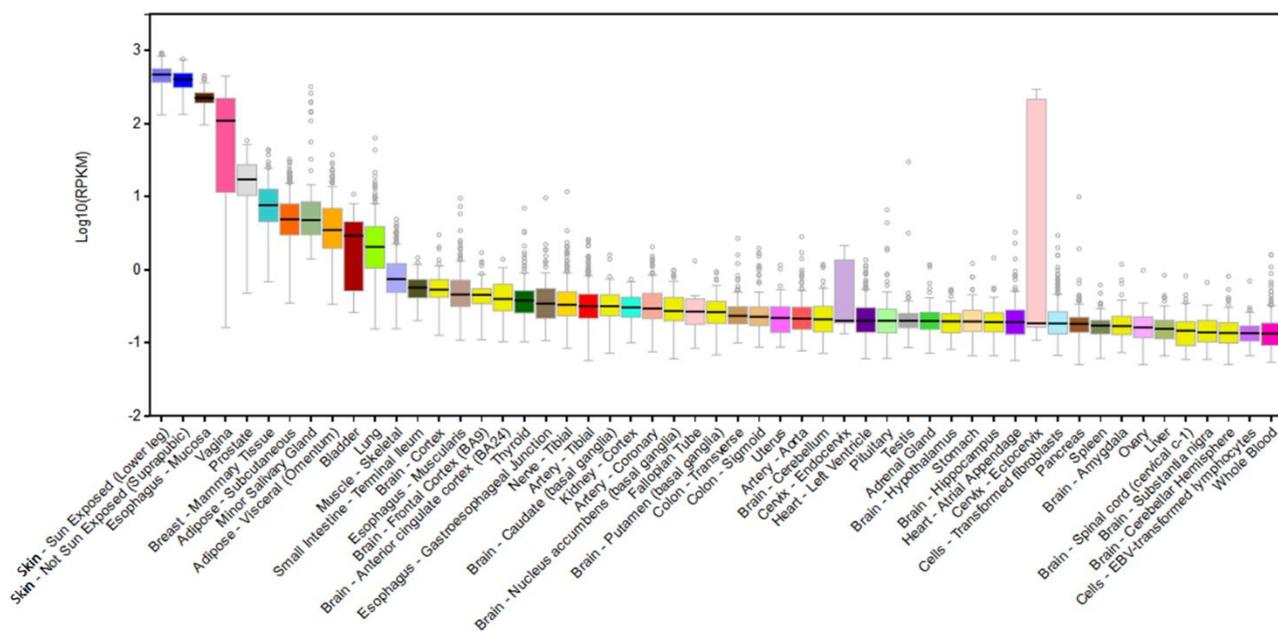


Figura 56. Niveles de expresión de *Pkp1* en diversos tejidos normales. (Gráfica de *GTEx*).

También se reanalizaron los datos de perfiles de expresión obtenidos por microarray en estudios independientes llevados a cabo por investigadores colaboradores. Estos arrays fueron realizados en tumores primarios (código de acceso GEO, GSE8569) (Angulo *et al.*, 2008) y líneas celulares de cáncer de pulmón (código de acceso GEO, GSE14079) (Medina *et al.*, 2009).

Gene name	Gene Bank accession No	Description	N	SCC	AC	n-fold change
PKP1	AI081358	Plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	1.2	27	1	27
DSC3	R32665	Desmocollin 3	1	26	1.3	20
TP73L/P63	AA455929	Tumour protein p73-like	1.3	37	2	18
KRT17	H44051	Keratin 17	0.66	26	2	13
ALDH3A1	AI652557	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	1.4	15	1.3	11
KRT5	AA160507	Keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	1.3	20	1.8	11
CSTA	W72207	Cystatin A (stefin A)	8.3	37	3.3	11
TRIM29	AA055486	Tripartite motif-containing 29	0.7	9.2	0.9	10
NTRK2	N63949	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	2.5	16	1.6	10
SPRR1B	AA447835	Small proline-rich protein 1B (cornifin)	1	17	1.9	9
SPRR2C	AA399674	Small proline-rich protein 2C	1.2	14	1.7	8
PTPRZ1	AA476460	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	0.4	3.2	0.4	8
FGFBP1	BE563742	Fibroblast growth factor binding protein 1	2.2	26	3.7	7
UGT1A6	T70999	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	1	19	3.5	5.4
BMP7	W73473	Bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	0.6	2.3	0.5	5
FABP5	N47717	Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	6.1	9.8	2	5
GPX2	AA135289	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	0.6	8.1	1.7	5
PTH1H	AA845432	Parathyroid hormone-like hormone	0.8	6.4	1.3	5
JAG1	R70685	Jagged 1 (Alagille syndrome)	1.4	4.1	0.9	4.5
SH3GLP2	AA417252	SH3-domain GRB2-like pseudo-gene 2	ND	4.7	1.1	4.3
DMRT2	W93861	Doublesex and mab-3 related transcription factor 2	ND	5.3	1.4	4
GJB2	AA490688	Gap junction protein, beta 2, 26 kD (connexin 26)	0.7	7.6	2	4
SLC2A1	H58873	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	0.1	2.8	0.7	4
CRYM	R67147	Crystallin mu	3.4	1.9	7.4	0.25
SPDEF	AI745526	SAM pointed domain containing ets transcription factor	0.5	0.7	2.6	0.25
FOLR1	BE900714	Folate receptor 1 (adult)	4.5	0.5	2	0.25
ERBB2	AA443351	V-erbB2 erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homologue (avian)	1.5	1.1	4.6	0.24
HPN	H62162	Hepsin (transmembrane protease, serine 1)	1.6	0.6	2.6	0.23

ND = no data.

Tabla 67. Lista de genes diferencialmente expresados que permiten la distinción entre los SCC y los AC. (N, valor medio de la expresión génica en tejido pulmonar normal; Fold-change, tasa de expresión de SCC con respecto a AC) (Angulo *et al.*, 2008).

En el estudio de Angulo B. *et al.* (2008) se analizaron por microarray de ADNc 6 muestras de tejido pulmonar normal y 69 muestras de NSCLC. Los autores obtuvieron como resultado una lista de 28 genes que mostraban una expresión homogénea en AC y SCC pero que diferían en su expresión según el subtipo histológico (AC o SCC). De estos genes, 23 se encontraron consistentemente sobreexpresados en las muestras de SCC comparados con las muestras de AC, entre ellos los genes *Dsc3* (FC = 20) y *Pkp1* (FC = 27), que codifican componentes del desmosoma, siendo el gen de *Pkp1* el que mayor FC mostró de todos (Tabla 67).

Los datos de este estudio fueron reanalizados para *Pkp1*, del cual se tenían datos correspondientes a 2 sondas diferentes (hAE0064 y hAE9095), mostrando el nivel de expresión de cada muestra tumoral según el subtipo histológico (AC o SCC) al que pertenece (Fig. 57). Como resultado se comprobó que la sobreexpresión de *Pkp1* es característica de las muestras SCC.

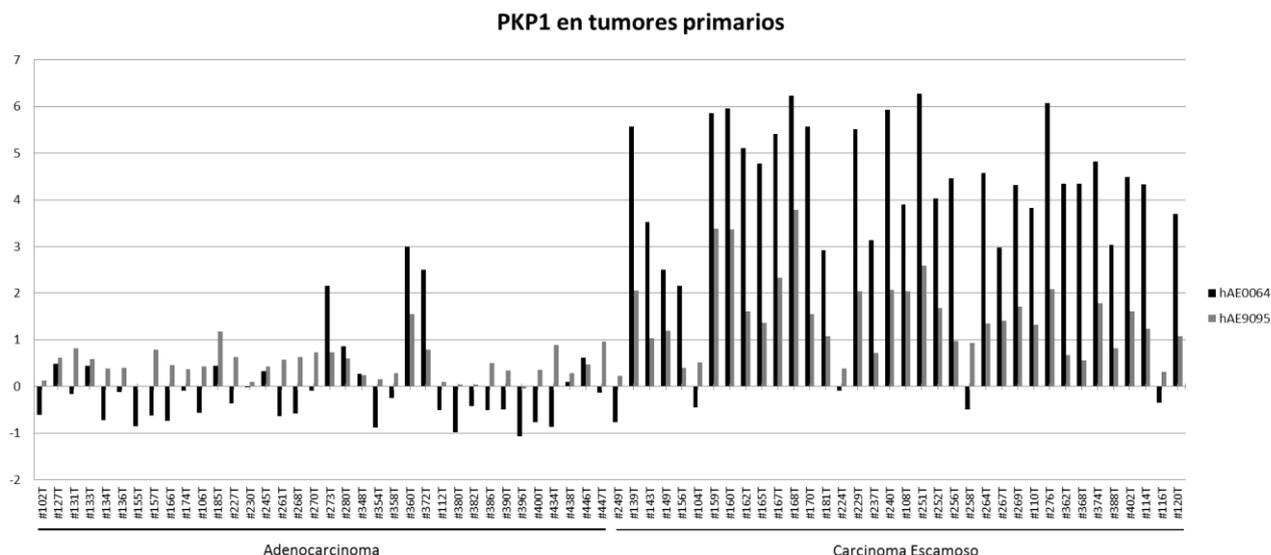


Figura 57. Niveles de expresión de *Pkp1* en muestras primarias de NSCLC (reanálisis de los datos de Angulo B. *et al.* de 2008).

En el estudio de Medina P. *et al.* (2009) se analizaron los niveles de expresión de 8 líneas celulares (A427, A549, Calu-3, NCI-H23, NCI-H441, NCI-H522, NCI-H1299 y NCI-H2126). Para ello se utilizaron microarrays de CGH basados en ADNc para perfilar el número de copias de ADN, y microarrays de ADNc para testar la expresión génica global. Al reanalizar los datos de *Pkp1* específicamente, se observó que ninguna de las líneas sobreexpresaba *Pkp1* aunque hay que destacar que todas las líneas pertenecían al subtipo histológico AC, a excepción de NCI-H1299 (LCC) (Tabla 68).

Gen	Tipo Array	Calu3	H23	A427	H441	H522	A549	H1299	H2126
PKP1	CGH	-0,009	-0,167	0,028	0,109	0,176	-0,008	-0,207	-0,101
	cDNA	-0,127	-0,439	-0,803	-0,693	-0,071	-0,233	0,353	0,173

Tabla 68. Niveles de expresión de *Pkp1* en los arrays de líneas celulares (reanálisis de los datos de Medina P. *et al.* de 2009).

6.4.2. Cribado de PKP1 en líneas NSCLC y líneas primarias

6.4.2.1. Reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

El cribado de expresión de *Pkp1* mediante qPCR se llevó a cabo en un total de 24 líneas celulares humanas, de las cuales, 19 fueron líneas tumorales de NSCLC (7 SCC, 9 AC y 3 LCC), 1 línea fue SCLC y 4 fueron líneas de tejidos diferentes a pulmón que se utilizaron como controles.

Los datos de nivel de cambio (FC, *fold change*) de cada línea celular fueron calculados con el método comparativo de Ct o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como calibrador el gen *Gadph* y normalizando los datos con los niveles de expresión de *Pkp1* de la línea H441 (AC). Previamente se había calculado que la eficiencia de los oligos de *Pkp1* y *Gadph* era similar y no difería en más

de un 15%, pudiendo aplicar el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Eficiencia oligos PKP1-4 = 96,893%; Eficiencia oligos GADPHq = 96,103%).

Los datos resultantes se muestran en la Figura 58 clasificados por subtipo histológico (LCC, SCC y AC) y, dentro de cada subtipo, ordenados de mayor a menor expresión.

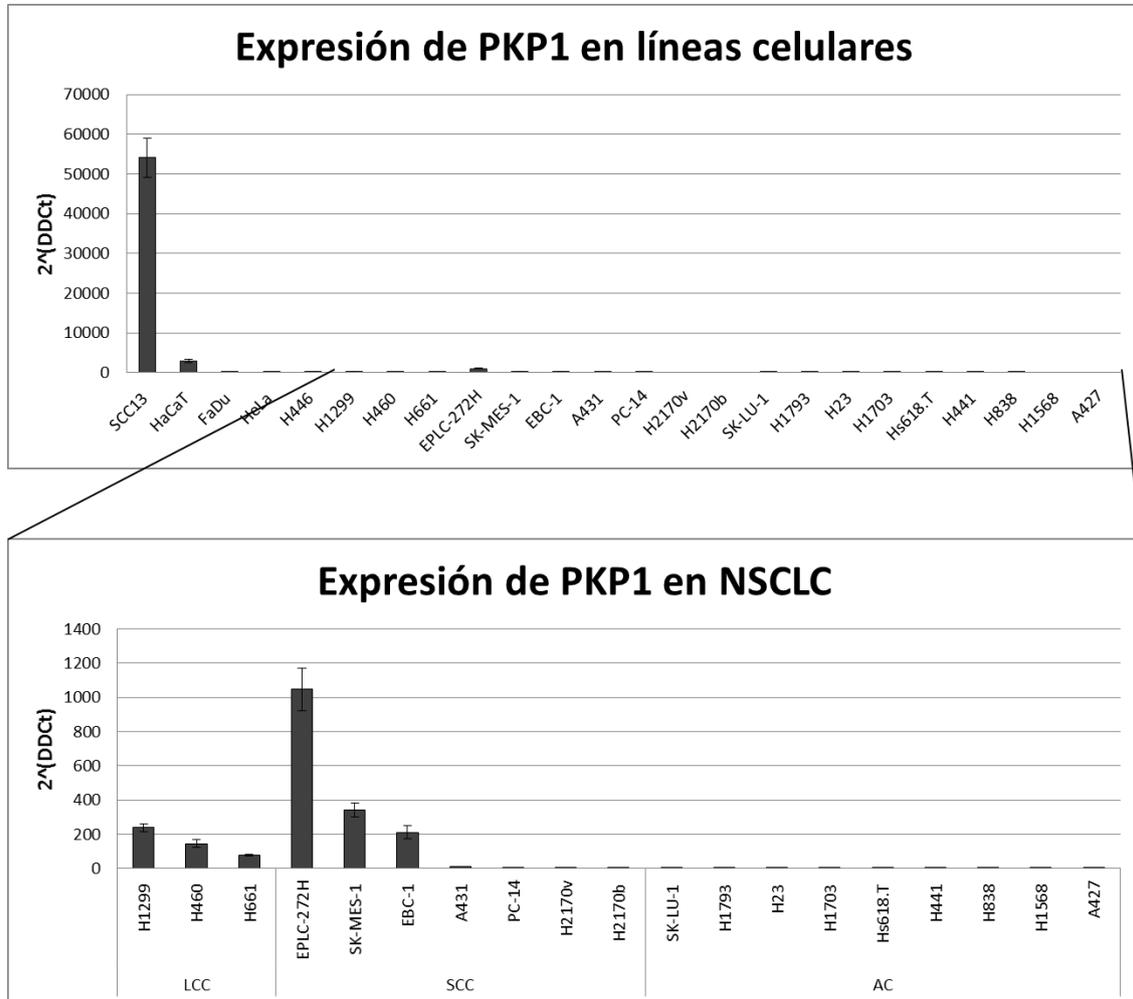


Figura 58. Niveles de expresión relativa de *Pkp1* (FC calculado con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) en líneas celulares. Arriba, datos de 24 líneas celulares humanas incluyendo 19 líneas NSCLC, 1 línea SCLC y 4 líneas control de tejidos diferentes a pulmón; abajo, ampliación de la gráfica superior mostrando sólo los datos de las 19 líneas NSCLC.

La mayor expresión relativa de *Pkp1* se encontró en 2 líneas control, tal y como se esperaba. Estas líneas fueron SCC13 (SCC de epitelio facial) y HaCaT (SCC de epitelio). Las siguientes líneas con mayor expresión de *Pkp1* fueron, en orden, EPLC-272H y SK-MES-1 (ambas SCC de pulmón). Sin embargo, gran parte de las líneas SCC y todas las líneas de AC presentaron expresiones relativas muy bajas del ARNm de *Pkp1*. Las líneas pertenecientes al subtipo histológico LCC mostraron una expresión media.

6.4.2.2. Western blot (WB)

Tras los resultados de expresión génica obtenidos por qPCR para el cribado de PKP1, se llevaron a cabo análisis de la expresión proteica de PKP1 mediante WB en un total de 14 líneas celulares humanas seleccionadas, de las cuales, 3 fueron líneas tumorales primarias: 70110063 (AC), 70110062 (SCC) y 70110072 (SCC). El resto de líneas testadas fueron 11 líneas celulares de NSCLC (7 SCC y 4 AC).

Los resultados expresión proteica de PKP1 obtenidos para cada línea testada se muestran en la Figura 59 junto con la expresión relativa del control endógeno β -actina. Los pesos moleculares aproximados de las bandas de cada proteína fueron de 82 KDa para PKP1 y 42 KDa para β -actina.

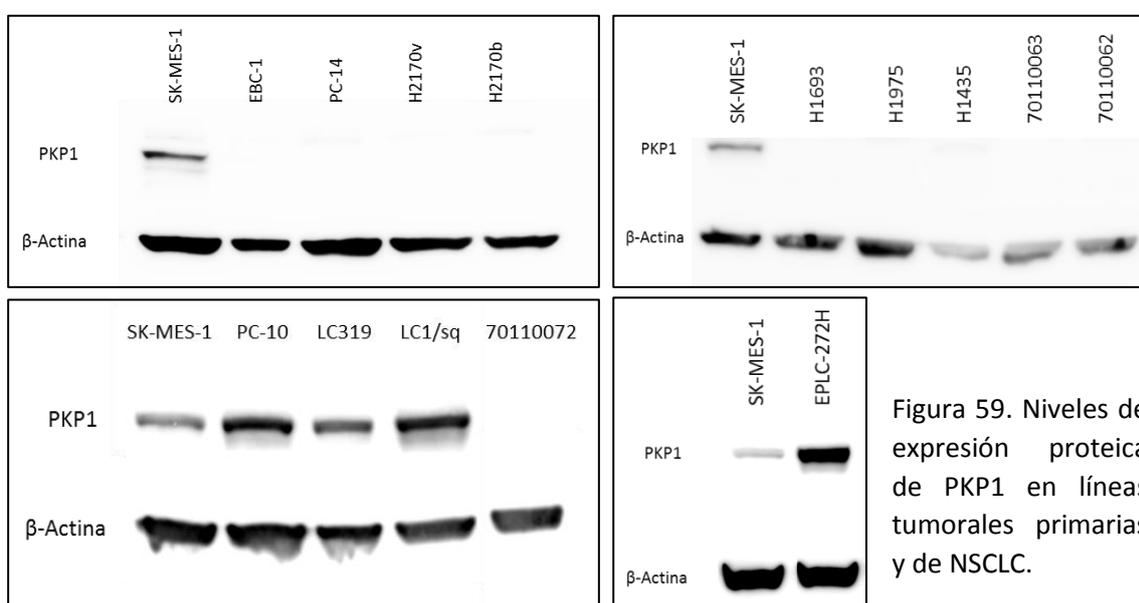


Figura 59. Niveles de expresión proteica de PKP1 en líneas tumorales primarias y de NSCLC.

Ninguna línea tumoral primaria mostró expresión de PKP1. Tampoco mostraron expresión las líneas del subtipo AC (a excepción de LC319). En cuanto a las 7 líneas SCC, sólo 4 mostraron un alto contenido de la proteína PKP1, siendo EPLC-272H la que presentaba mayor expresión y SK-MES-1 la que menor. Finalmente, estas dos líneas SCC (EPLC-272H y SK-MES-1) fueron seleccionadas como modelo para posteriores ensayos funcionales.

6.4.3. Expresión semicuantitativa de las PKP's y otros genes del desmosoma

Para determinar los niveles de expresión de los principales genes del desmosoma, tales como *Pkp1*, *Pkp2*, *Pkp3*, *Pkp4*, *Dsg1* y *Dsp*, se realizaron una serie de PCRs semicuantitativas en varias líneas de NSCLC utilizando como control β -actina.

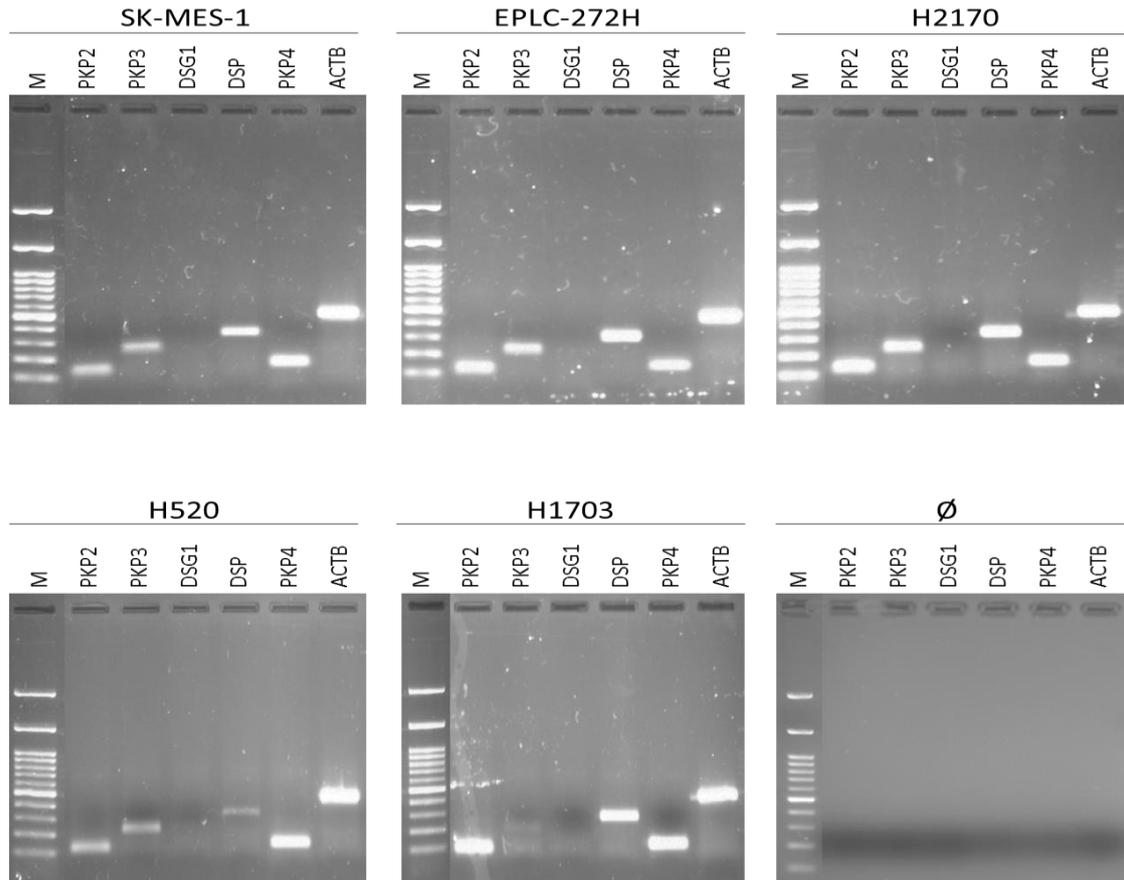


Figura 60. Electroforesis de la PCR semicuantitativa de *Pkp2*, *Pkp3*, *Pkp4*, *Dsg1*, *Dsp* y β -actina (ACTB) en las líneas celulares SCC SK-MES-1, EPLC-272H, H2170 y H520, y la línea de AC H1703. (M, marcador de pesos moleculares de 100 pb; Ø, control negativo de PCR).

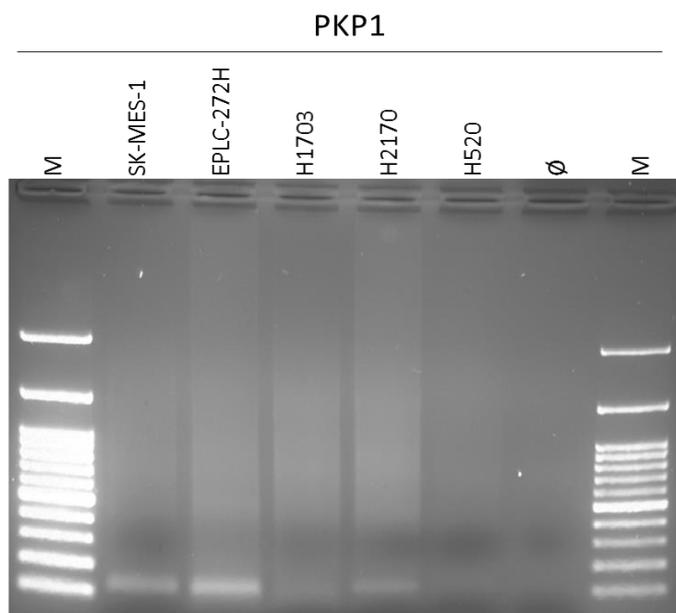


Figura 61. Electroforesis de la PCR semicuantitativa de *Pkp1* en las líneas celulares SCC SK-MES-1, EPLC-272H, H2170 y H520, y la línea de AC H1703. (M, marcador de pesos moleculares de 100 pb; Ø, control negativo de PCR).

Las PCRs semicuantitativas (Fig. 60 y 61) mostraron que ninguna línea celular testada expresó *Dsg1*. Por otro lado, todas las líneas testadas expresaron *Pkp2*, *Dsp* y *Pkp4*, aunque a diferentes niveles. Donde menor expresión de *Pkp2* hubo fue en las líneas SK-MES-1 y H520, mientras que *Dsp* se expresó a niveles bastante altos en todas las líneas excepto en H520 y *Pkp4* estuvo presente en todas las líneas a niveles altos. *Pkp3* presentó expresión en todas las líneas con diferentes niveles, estando prácticamente ausente en la línea H1703.

Finalmente, *Pkp1* sólo se expresó moderadamente en las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H, y muy levemente en la línea H2170.

6.4.4. Curva de crecimiento

Se decidió caracterizar el tiempo de duplicación de la línea celular SK-MES-1 de manera manual por no estar este dato disponible en el catálogo de la ATCC y ser necesario para posteriores ensayos funcionales.

Dos investigadores independientes realizaron sendas curvas paralelas, cada una de las cuales contó con 2 réplicas en cada punto. Los resultados del promedio de los contajes manuales de ambas réplicas de cada curva se muestran en la Figura 62.

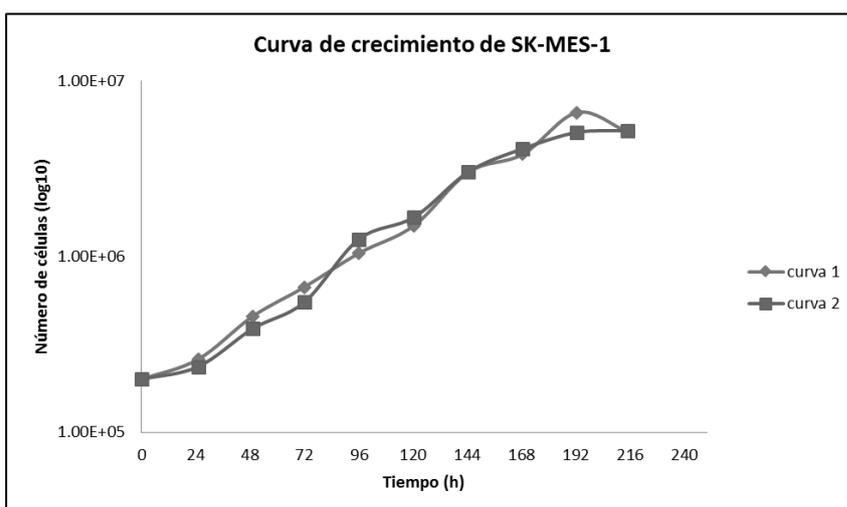


Figura 62. Promedios del número de células resultado del contaje manual en cada punto de la curva. Los datos se representan transformados mediante \log_{10} .

Para testar la concordancia entre ambas curvas se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson, el cual tuvo un valor $r = 0,977$. Esto fue indicativo de una correlación casi perfecta y directa entre ambas curvas.

Con el objetivo de detectar posibles discordancias entre el contaje de ambos investigadores debido a errores humanos, se compararon las curvas obtenidas por cada investigador independiente al representar los promedios de todas las réplicas (Fig. 63).

De nuevo se calculó el Coeficiente de Correlación de Pearson que en este caso tuvo un valor $r = 0,999$, indicando una correlación casi perfecta y una mínima diferencia entre ambas curvas.

Los datos promedio de las curvas paralelas se utilizaron para el cálculo del tiempo de duplicación de la línea SK-MES-1 utilizando el algoritmo del software online *Doubling Time*, el cual dio como resultado un tiempo de duplicación de 38,56 h, siendo la tasa de crecimiento 0,018. La ecuación del crecimiento celular de SK-MES-1 fue:

$$n^{\circ} \text{ células} = 0,1924 \cdot e^{0,018 \cdot \text{tiempo}}$$

El tiempo de duplicación de la línea EPLC-272H fue obtenido del catálogo del DSMZ y fue de 60 h, lo que supone una tasa de crecimiento de 1,6 veces la de SK-MES-1.

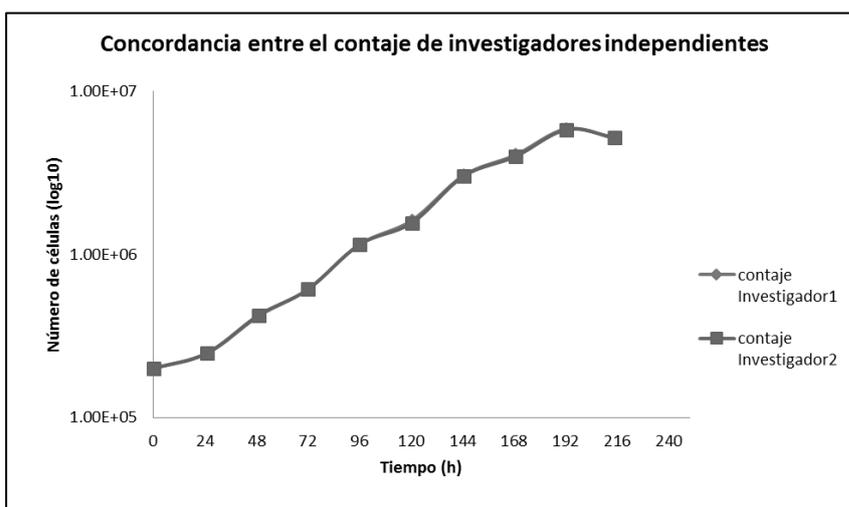


Figura 63. Promedios del número de células resultado de los contajes manuales de cada investigador independiente. Los datos se representan transformados mediante log₁₀.

6.4.5. Isoforma de *Pkp1*

Para determinar qué isoformas de *Pkp1* se expresaban en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H y 3 muestras control de tejido pulmonar sano (S-32, S-37 y S-68) se llevaron a cabo 2 reacciones de PCR específicas debido a la incapacidad de las curvas de disociación de qPCR para discriminar entre ambas isoformas (Fig. 64).

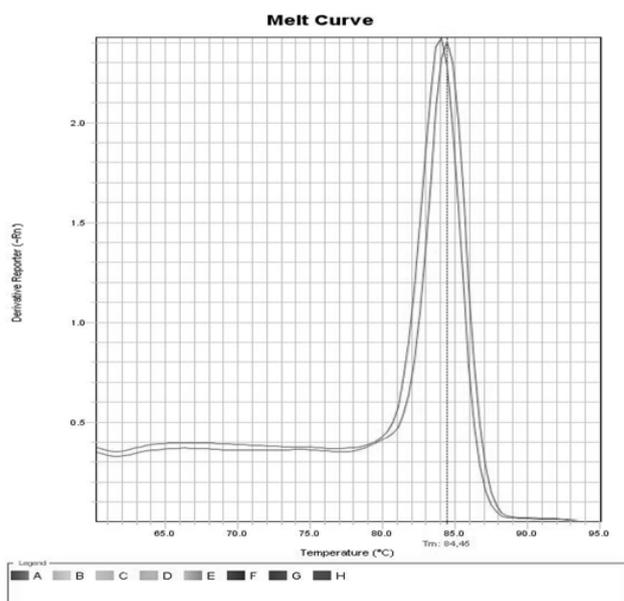


Figura 64. Gráfica de la curva de disociación (*Melt Curve*) de los productos de qPCR correspondientes a las isoformas de *Pkp1a* y *Pkp1b*. La diferencia de tamaño entre ambas isoformas es tan sólo de 63 pb. Esto hace que las temperaturas de disociación sean tan próximas que entren dentro de los errores de pipeteo entre réplicas y se haga muy difícil discernir si la variación de temperatura es resultado de la expresión de diferentes isoformas o del error propio de la técnica.

Por esta razón, la primera PCR se diseñó para ser capaz de discriminar la isoforma de *Pkp1* que se expresa atendiendo al tamaño del amplicón. Así, isoformas de *Pkp1a* deberían presentar un amplicón de 161 pb, mientras que la isoforma *Pkp1b* amplificaría un tamaño de 224 pb (Fig. 65).

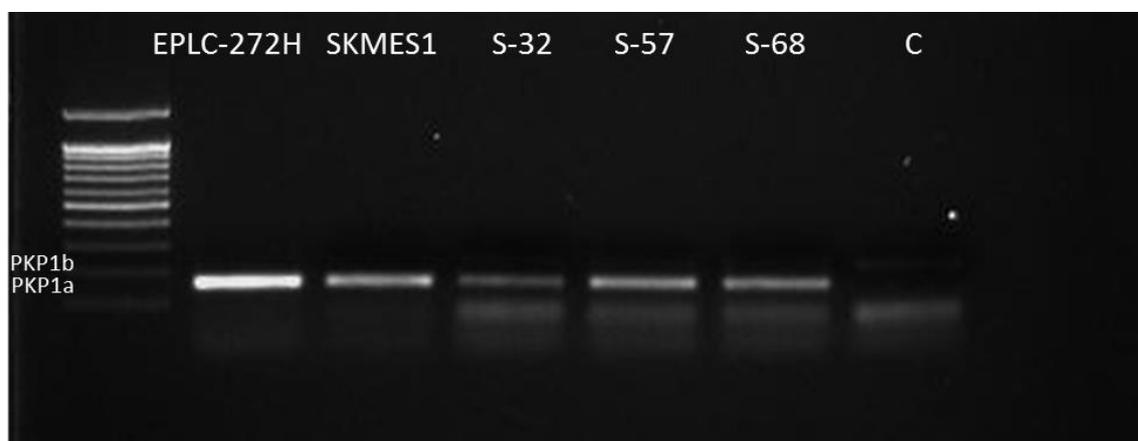


Figura 65. Electroforesis de la PCR discriminatoria de la isoforma de *Pkp1* en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H, y 3 muestras control (S-32, S-37 y S-68). (A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 100 pb; C, control negativo de PCR).

Todas las muestras mostraron amplificación de una banda de 161 pb, lo cual fue indicativo de que todas ellas expresaban la isoforma *Pkp1a*. La línea EPLC-272H mostró una mayor intensidad de banda que el resto de las muestras, confirmando una mayor expresión de *Pkp1a* ya que las condiciones de la PCR fueron no saturantes (teniendo en cuenta el número de ciclos y el bajo nivel de expresión del ARNm de *Pkp1*). Al contrario, la muestra S-32 fue la que menor expresión mostró.

En el caso de las muestras control de tejido pulmonar sano también parecieron mostrar una banda próxima a 224 pb aunque era muy difusa y tenue. Para confirmar si estas muestras control expresaban también la isoforma *Pkp1b* a niveles muy bajos o si dicha banda correspondía a algún tipo de inespecificidad o contaminación, se diseñó una segunda PCR la cual era específica de la isoforma *Pkp1b* debido a que uno de los oligos anilla justamente en el inserto característico de dicha isoforma (Fig. 66). Así, isoformas de *Pkp1a* no deberían presentar amplificación alguna, mientras que la isoforma *Pkp1b* amplificaría un tamaño de 384 pb. Se incluyó un control positivo para cerciorarnos de los resultados obtenidos (Fig. 67).

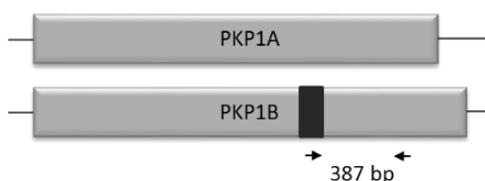


Figura 66. Esquema del diseño de la segunda PCR, la cual es específica de la isoforma *Pkp1b*. En ella, uno de los oligos anilla en el inserto característico de la isoforma b.

Ninguna muestra mostró amplificación de una banda de 387 pb a excepción del control positivo PKP1B, lo cual fue indicativo de que todas ellas expresaban la isoforma *Pkp1a* y no la *Pkp1b*. En el caso de las muestras control de tejido pulmonar sano en las que había aparecido una banda tenue y confusa, no apareció tampoco ninguna banda de 387 pb, confirmando que sólo expresaban la isoforma *Pkp1a*.

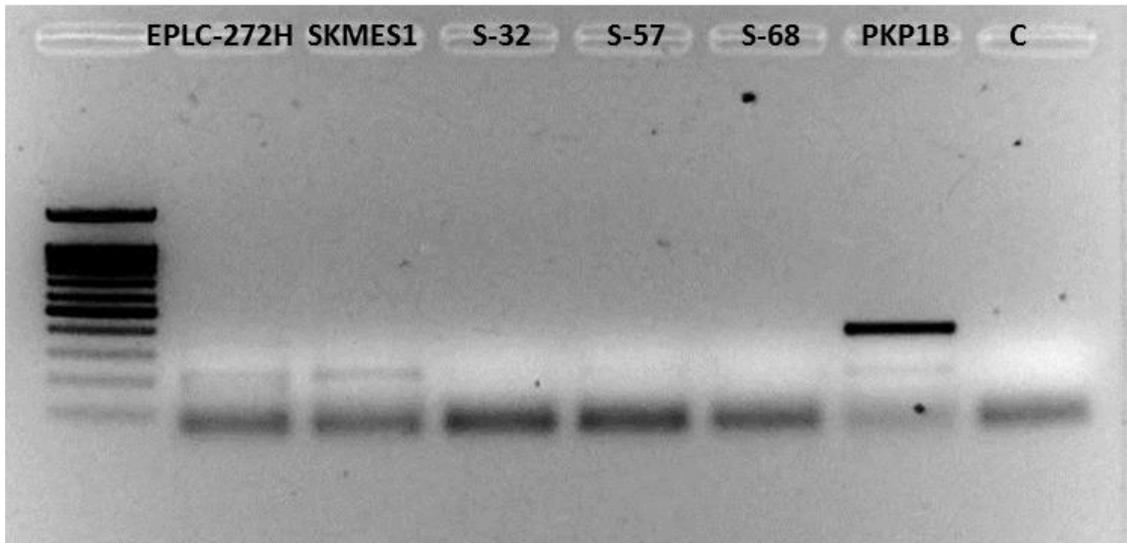


Figura 67. Electroforesis de la PCR específica de la isoforma *Pkp1b* en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H, y 3 muestras control (S-32, S-37 y S-68). Se incluyó un control positivo (PKP1B) consistente en células de la línea SK-MES-1 transfectadas con un plásmido comercial, el cual contenía la secuencia de *Pkp1b*. (A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 100 pb; C, control negativo de PCR).

6.4.6. Secuenciación de *Pkp1*

Se analizó la secuencia codificante completa de *Pkp1* en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H mediante secuenciación con el objetivo de caracterizar dichas líneas y detectar posibles alteraciones en la secuencia que pudieran dar lugar a una proteína no funcional. Para ello se llevaron a cabo una serie PCR específicas y solapantes (Fig. 68).

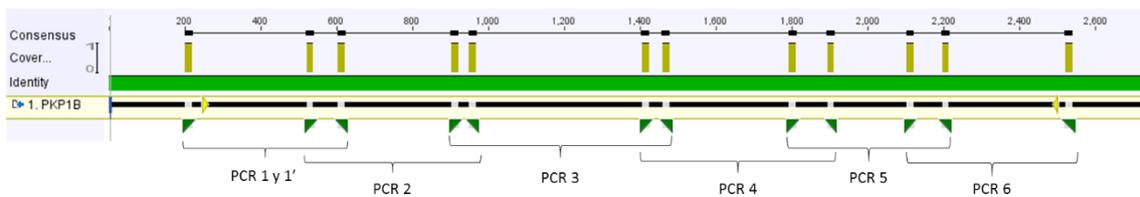


Figura 68. Esquema del diseño de las PCRs solapantes. La línea negra representa la secuencia de ADNc de *Pkp1b* (por ser la isoforma más larga). Los triángulos amarillos representan la región CDS de *Pkp1*, mientras que las parejas de oligos se representan con triángulos verdes conectados por corchetes que indican la nomenclatura de cada PCR.

Dichas PCRs se llevaron a cabo con distinta cantidad de ADNc según la línea celular testada debido a que la expresión de *Pkp1* es mayor en EPLC-272H que en SK-MES-1. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis y se procedió a comprobar el tamaño de los amplicones obtenidos (Fig. 69).

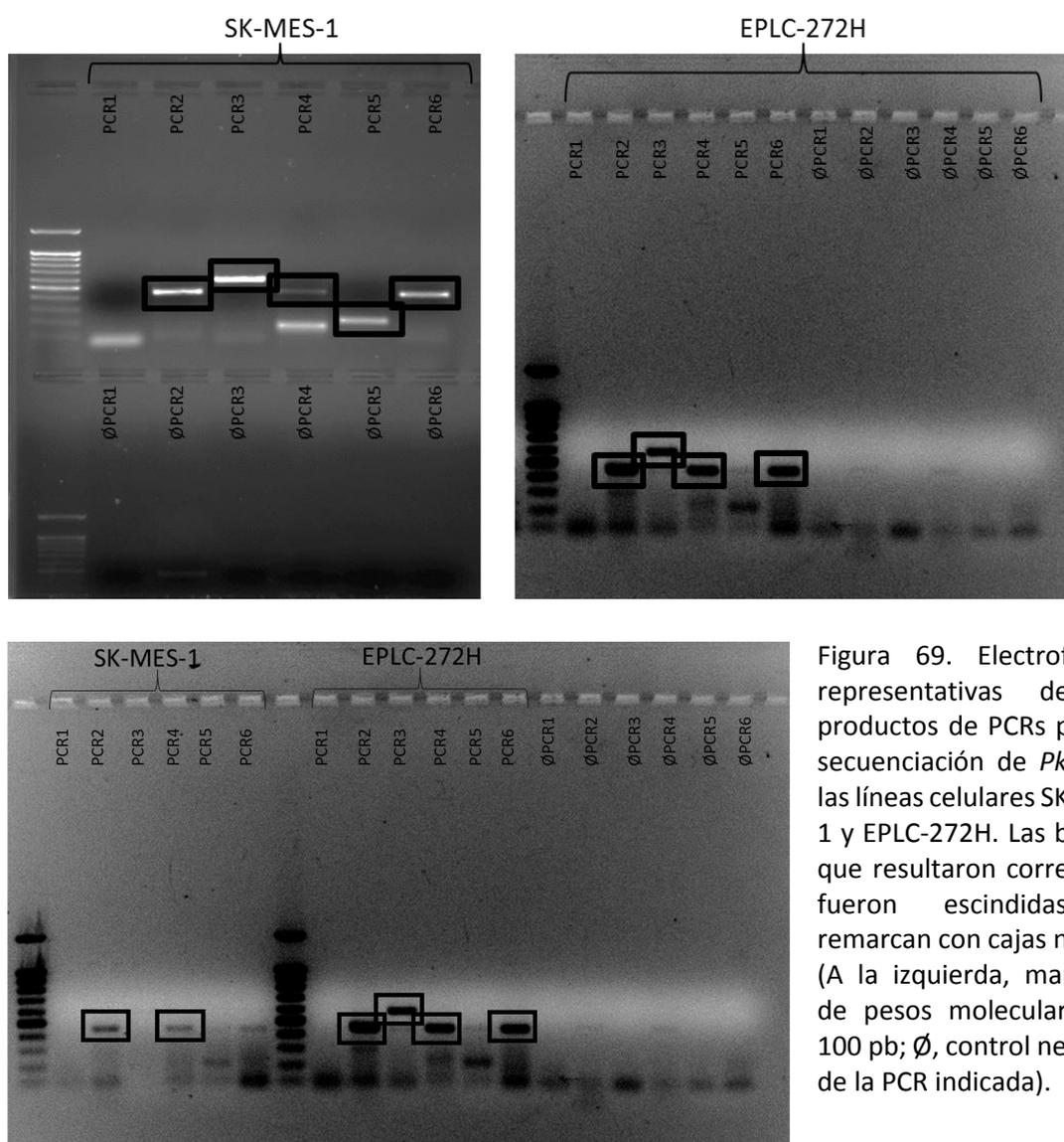


Figura 69. Electroforesis representativas de los productos de PCRs para la secuenciación de *Pkp1* en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H. Las bandas que resultaron correctas y fueron escindidas se remarcan con cajas negras. (A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 100 pb; Ø, control negativo de la PCR indicada).

Una vez comprobados los tamaños de los amplicones obtenidos, aquellas bandas que resultaron correctas fueron escindidas, purificadas y secuenciadas. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software *Geneious* v4.8.5 y alineadas con la secuencia de *Pkp1b* como referencia (NM_000299), la cual fue obtenida de la base de datos *UCSC Genome Browser*.

En el caso de la línea celular SK-MES-1, la secuencia de *Pkp1* obtenida mostró un alineamiento perfecto con la secuencia de referencia a excepción del nucleótido en posición 36 del CDS (Fig. 70). El proceso se repitió varias veces para verificar que no eran errores de secuenciación.

En la posición 36 del CDS de *Pkp1* de la línea SK-MES-1 apareció un polimorfismo de sólo nucleótido (del inglés, *SNP*) heterocigoto C/T.

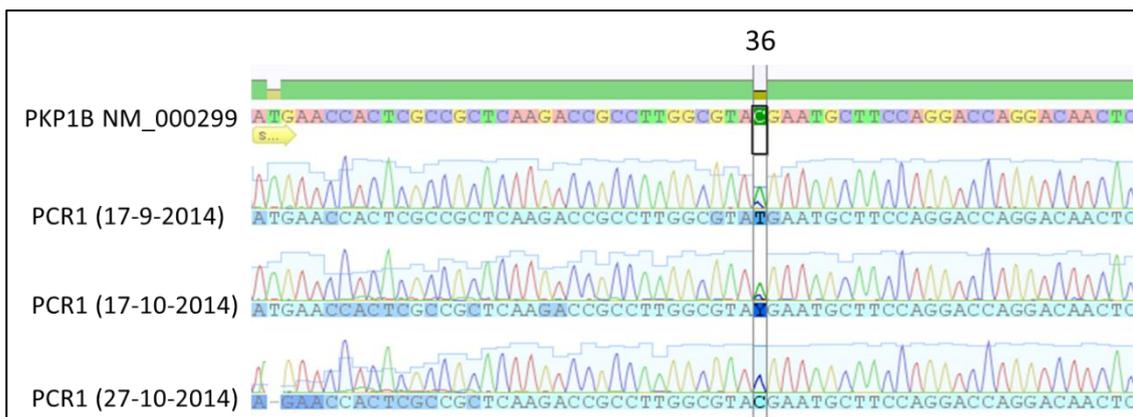


Figura 70. Alineamiento de los resultados de las diversas secuenciaciones de *Pkp1* con la secuencia de referencia (PKP1B, NM_000299) en SK-MES-1.

Por otro lado, en el caso de la línea celular EPLC-272H, la secuencia de *Pkp1* obtenida también mostró un alineamiento perfecto con la secuencia de referencia a excepción del nucleótido en posición 918 del CDS (Fig. 71).

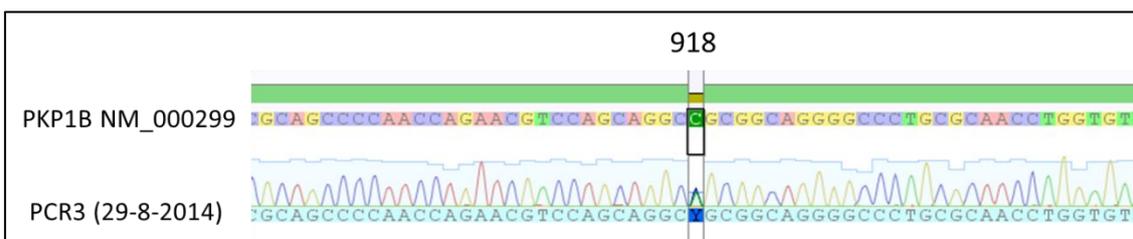


Figura 71. Alineamiento del resultado de la secuenciación de *Pkp1* con la secuencia de referencia (PKP1B, NM_000299) en EPLC-272H.

En la posición 918 del CDS de *Pkp1* de la línea EPLC-272H apareció un polimorfismo de un sólo nucleótido (del inglés, *SNP*) heterocigoto C/T.

Los dos polimorfismos fueron analizados traduciendo las secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos y comparadas con la secuencia de referencia con ayuda del software on-line *MultAlin*. En ambos los casos, el polimorfismo fue sinónimo o silencioso. Esto significa que, a pesar de variar en un nucleótido, las secuencias daban lugar al mismo aminoácido y, en consecuencia, la proteína no se vio alterada (Fig. 72).

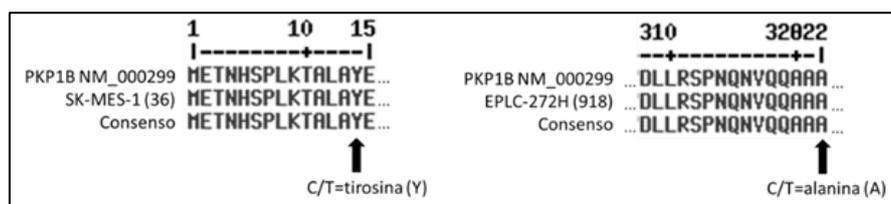


Figura 72. Alineamiento de cada una de las secuencias de aminoácidos polimórficas con la secuencia de referencia (PKP1B, NM_000299). La flecha muestra el aminoácido codificado por el codón de nucleótidos afectado por el polimorfismo. Como puede verse, en todos los casos el polimorfismo dio lugar a la misma secuencia aminoácídica que la secuencia de referencia.

El polimorfismo C/T de la posición 36 de la línea SK-MES-1 en ambos casos da lugar al aminoácido tirosina (Y). En el caso de la línea EPLC-272H, el polimorfismo C/T de la posición 918 también en ambos casos da lugar al aminoácido alanina (A).

Los polimorfismos encontrados fueron contrastados con la base de datos *Ensembl*. Esta base de datos corroboró el carácter sinónimo de ambos polimorfismos. Estos transcritos tienen como identificadores de variante los códigos rs2268147 para el polimorfismo C/T de la posición 36 de la línea SK-MES-1, con una frecuencia del alelo menos común o MAF (del inglés, *Minor Allele Frequency*) de 0,18 (T) y la localización cromosoma 1:201283738 (hebra sentido); y el código rs1722779 para el polimorfismo C/A/T de la posición 918 de la línea EPLC-272H con una frecuencia MAF de 0,17 (T) y la localización cromosoma 1:201317643 (hebra sentido).

Como control se utilizó una muestra de tejido pulmonar sano (S-32) la cual se analizó parcialmente mediante secuenciación con el objetivo de comprobar si los polimorfismos encontrados en las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H se encuentran también presentes en tejido pulmonar sano. La muestra S-32 se sometió al mismo procedimiento que las demás y aunque en el caso del polimorfismo C/T (rs2268147) no se detectó ninguna variación, en el caso del polimorfismo C/A/T (rs1722779) no fue posible discernir la presencia o no de variantes debido a la mezcla de secuencias en los resultados (Fig. 73).

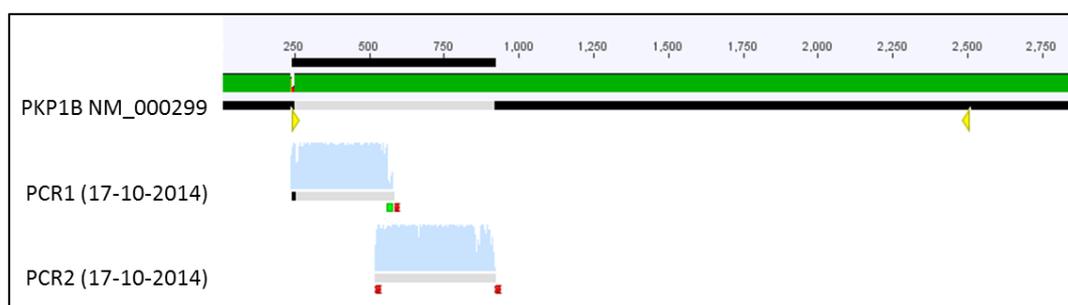


Figura 73. Alineamiento de los resultados de las diversas secuenciaciones de *Pkp1* con la secuencia de referencia (PKP1B, NM_000299) en la muestra de tejido pulmonar sano S-32.

6.4.7. Silenciamiento génico de *Pkp1* (*KnockDown*)

El silenciamiento génico de *Pkp1* se optimizó primero en una línea control positivo, que en este caso fue la línea celular HaCaT (SCC de piel). Esta línea se transfectó con 12,5 pmol [5 nM] de dos siRNAs diseñados contra la secuencia de *Pkp1* por separado y combinados. Las transfecciones se dejaron incubar 48, 72 o 96 h, tras lo cual se analizaron los niveles de expresión por WB y qPCR (Fig. 74). Previamente se había calculado que la eficiencia de los oligos de *Pkp1* y *Tbp* era similar y no difería en más de un 15%, pudiendo aplicar el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Eficiencia oligos PKP1-4 = 96,893%; Eficiencia oligos TBP = 110,301%).

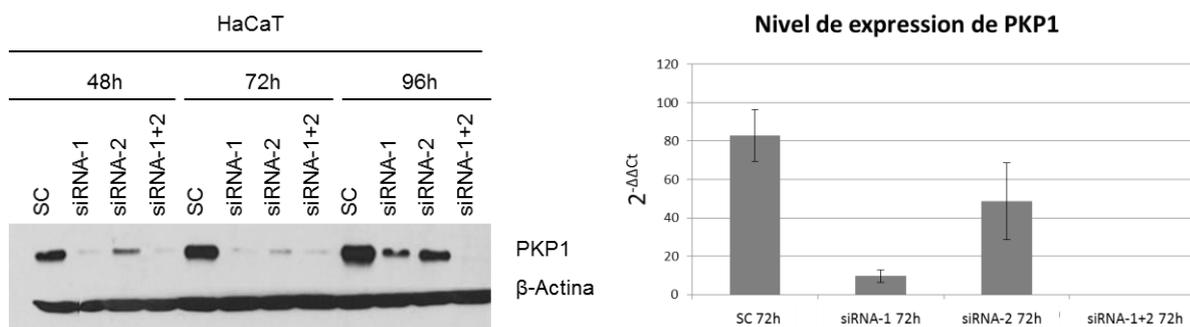


Figura 74. WB (izquierda) y qPCR (derecha) de la optimización del silenciamiento génico de *Pkp1* en la línea celular HaCaT. (SC, control *Scramble*).

Los resultados de estos experimentos mostraron que, en todos los tiempos de incubación, el siRNA-PKP1-1 producía un mayor silenciamiento de *Pkp1* que el siRNA-PKP1-2. Sin embargo, la mayor inhibición se produjo al combinar ambos siRNAs. Los niveles de expresión comenzaron a recuperarse a las 96 h de transfección excepto en el caso del combinado de siRNAs. Durante estos ensayos, se observó un cambio morfológico en las células HaCaT silenciadas (Fig. 75) el cual consistió en un aumento de tamaño de las mismas; sin embargo, este fenotipo no se ha observado en el resto de las líneas celulares testadas.

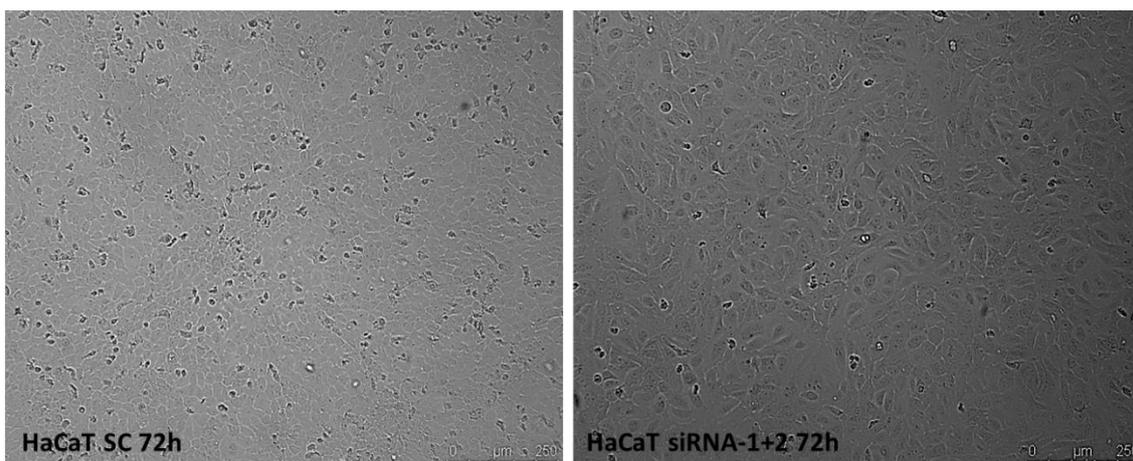


Figura 75. Cambio morfológico sufrido en la línea celular HaCaT tras el silenciamiento génico de *Pkp1* observado mediante microscopía de contraste de fases con un objetivo 5x. (SC, control *Scramble*).

Una vez optimizados los tiempos de transfección y testadas las secuencias de siRNA-PKP1, se procedió a optimizar la cantidad de siRNA mínima necesaria para silenciar *Pkp1* produciendo el menor efecto citotóxico, el cual se observó durante las optimizaciones anteriores.

La línea HaCaT se transfectó por duplicado con 3,125 pmol [1,25 nM], 6,25 pmol [2,5 nM], 9,375 pmol [3,75 nM] o 12,5 pmol [5 nM] de la combinación de ambos siRNAs contra *Pkp1*. Las transfecciones se dejaron incubar 72 h, tras lo cual se realizó el conteo manual de las células de cada condición y se analizaron los niveles de expresión por WB (Fig. 76). Como control se utilizaron células sin transfectar (0 pmol de siRNA).

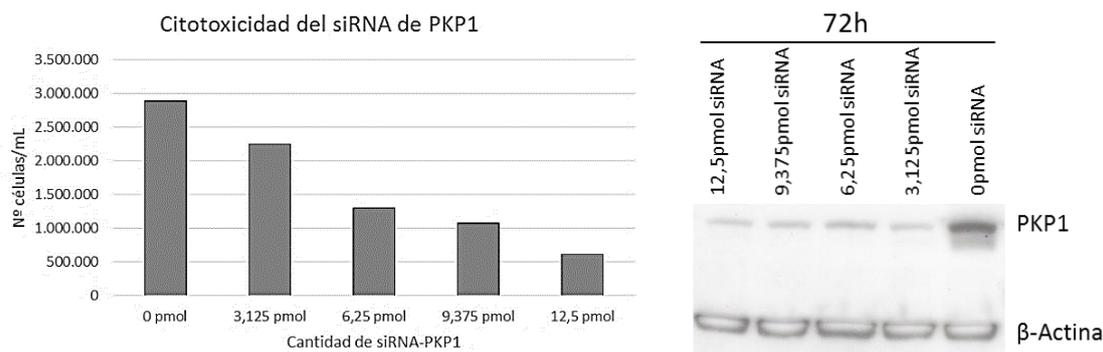


Figura 76. Ensayo de citotoxicidad de los siRNAs de PKP1 (izquierda) y WB de la expresión proteica correspondiente (derecha) en la línea celular HaCaT.

Los resultados del ensayo de citotoxicidad mostraron que existe una correlación inversa (Pearson, $r = -0,979$) entre la cantidad de siRNA transfecteda y el número de células, indicando que a mayor transfección de siRNA se producía una mayor mortalidad. Sin embargo, el WB mostró que el nivel de expresión de PKP1 fue muy similar en todos los casos, incluso a bajas cantidades de siRNA. Esto significó que bajas concentraciones de siRNA eran funcionales en cuanto a silenciamiento génico de *Pkp1*, produciendo una buena inhibición de éste, y resultaban menos citotóxicas.

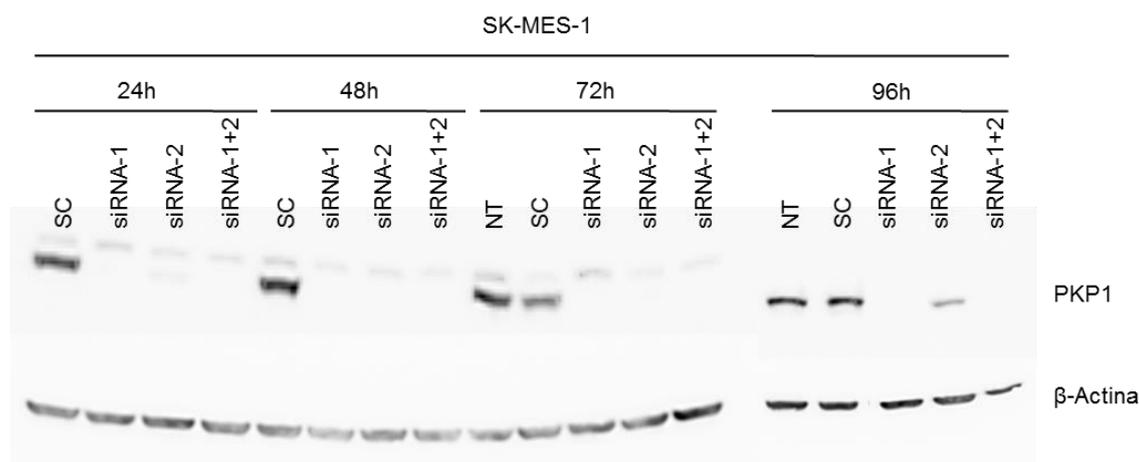


Figura 77. WB (arriba) y qPCR (izquierda) de la optimización del silenciamiento génico de *Pkp1* en la línea celular SK-MES-1. (NT, control No Transfectado; SC, control Scramble).

Posteriormente se testó el silenciamiento génico de *Pkp1* en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H. La línea SK-MES-1 se transfectó con 6,25 pmol/pocillo [2,5 nM] del combinado de siRNAs durante 24, 48, 72 o 96 h (Fig. 77). Sin embargo, puesto que la línea EPLC-272H presenta un nivel de expresión basal de PKP1 mayor que SK-MES-1, las transfecciones se realizaron con 18,75 pmol/pocillo [7,5 nM] del combinado de siRNAs (Fig. 78).

Los resultados tanto de los experimentos de WB como de qPCR en SK-MES-1 transfectadas con 6,25 pmol/pocillo [2,5 nM] de siRNA mostraron que, en todos los tiempos de incubación testados, la mayor inhibición se produjo al combinar ambos siRNAs (90% aproximadamente, según datos de qPCR). A las 96 h de transfección empezó a recuperarse la expresión en las muestras transfectadas con el siRNA-PKP1-2.

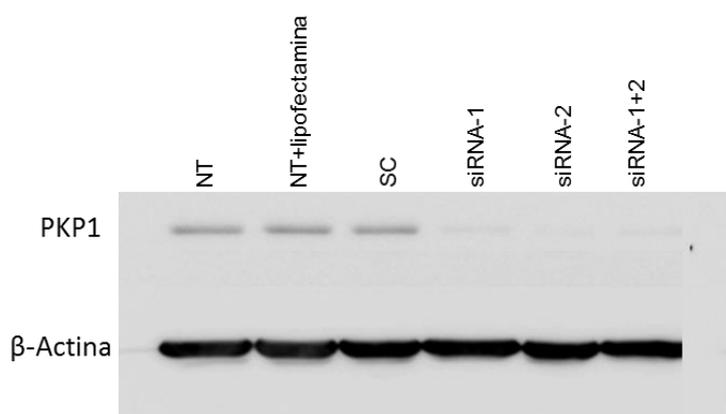


Figura 78. WB de la optimización del silenciamiento génico de *Pkp1* en la línea celular EPLC-272H a 72 h de incubación. (NT, control No Transfectado; NT+lipolectamina, control No Transfectado al que se añadió *Lipolectamina RNiMAX* para testar el efecto citotóxico del reactivo de transfección; SC, control *Scramble*).

Los experimentos de WB de la línea celular EPLC-272H transfectadas con 18,75 pmol/pocillo [7,5 nM] mostraron que a 72 h de incubación se obtenía una inhibición de aproximadamente el 90% de la expresión basal de *Pkp1*.

Finalmente, las condiciones de silenciamiento génico seleccionadas para los ensayos funcionales fueron transfecciones durante 72 h en placas de 6 pocillos con 6,25 pmol/pocillo [2,5 nM] de un combinado de siRNA-1 y siRNA-2 de *Pkp1* (o siRNA SC) para la línea SK-MES-1 y con 18,75 pmol/pocillo [7,5 nM] de un combinado de siRNA-1 y siRNA-2 de *Pkp1* (o siRNA SC) para la línea EPLC-272H (Fig. 79).

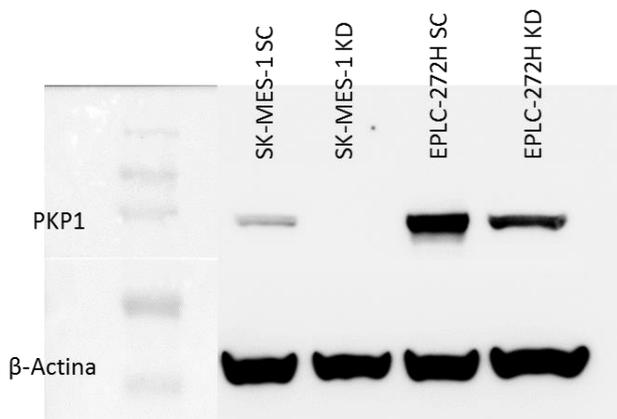


Figura 79. WB de las condiciones de silenciamiento génico seleccionadas para los ensayos funcionales en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

6.4.7.1. Eficiencia de transfección

Con el objetivo de determinar la eficiencia de transfección del siRNA, la línea SK-MES-1 fue transfectada con 37,5 pmol/pocillo [15 nM] con un siRNA fluorescente conjugado con Cy3 cuya secuencia era idéntica al siRNA-1 (Sigma, diseño *custom*). La eficiencia de transfección fue analizada por citometría de flujo (Fig. 80) utilizando un marcaje de viabilidad celular con 20 μ L de 7-Amino-Actinomicina (7-AAD).

Los resultados de citometría de flujo mostraron una eficiencia de transfección de aproximadamente el 67%. Sin embargo, debido a que el equipo *BD FACSCanto II* carecía de un láser verde, el cual es más adecuado para la excitación del fluorocromo Cy3, la señal pudo ser más débil dando un porcentaje eficiencia menor del real. Por ello, se testó a su vez por microscopía y WB.

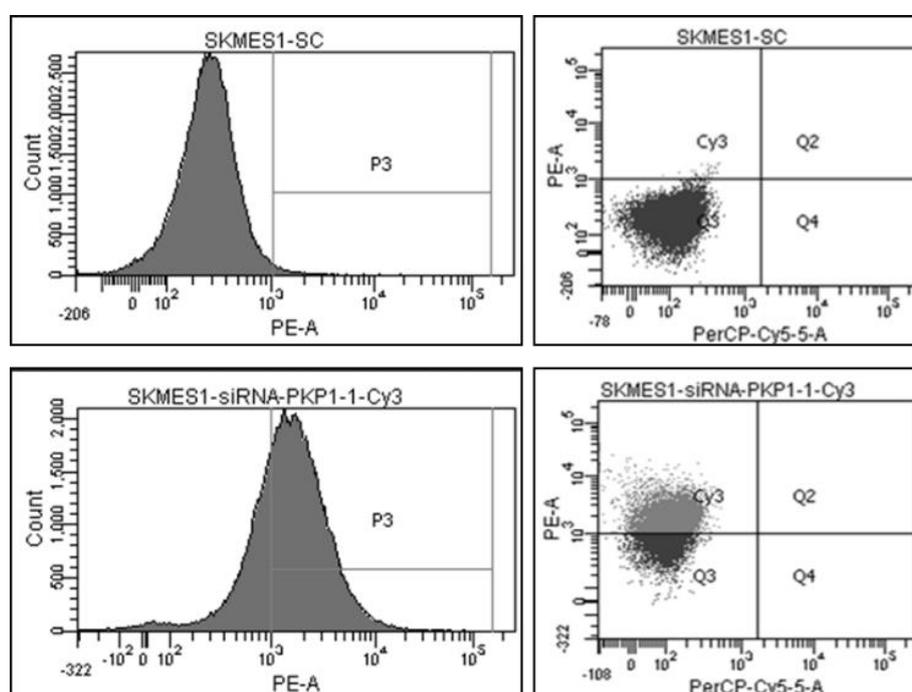


Figura 80. Resultados de la eficiencia de transfección de un siRNA conjugado con Cy3 en la línea SK-MES-1 por citometría de flujo. (SC, control *Scramble*).

Para los ensayos de microscopía se transfectaron con 37,5 pmol/pocillo [15 nM] de siRNA-PKP1-1-Cy3 tanto células HeLa (Fig. 81) como SK-MES-1 (Fig. 82). Se tomaron imágenes tanto *in vivo* con un microscopio de fluorescencia invertido (5x) como fijadas con un microscopio directo de epifluorescencia (20x).

En el caso de la línea celular HeLa, la cual se utilizó como control, el nivel de eficiencia de transfección fue muy alto, llegando casi al 100% de eficiencia.

En el caso concreto de la línea SK-MES-1, además de tomar imágenes *in vivo* a las 24h de transfección, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos utilizando una tinción de PKP1 para comprobar la menor expresión de PKP1 como resultado de la transfección con siRNA (Fig. 82).

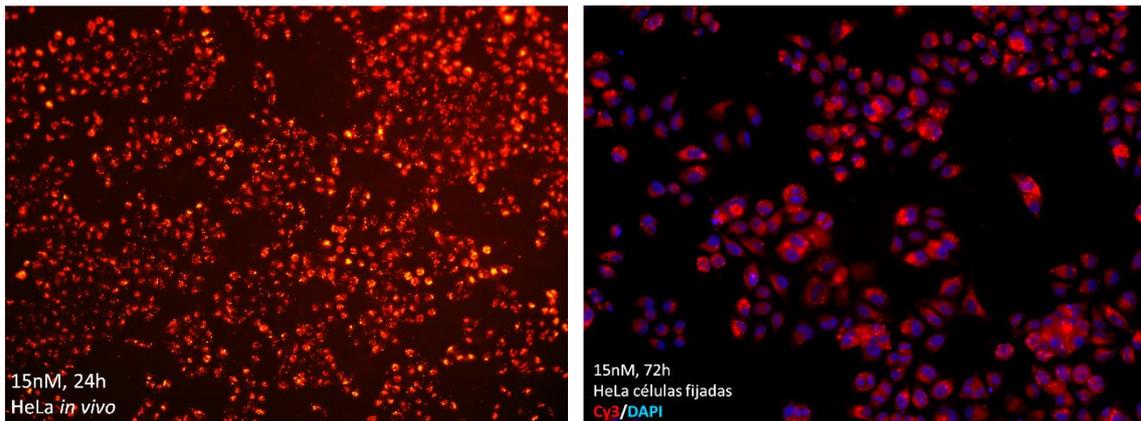


Figura 81. Imágenes de microscopía de células HeLa *in vivo* (izquierda) y fijadas (derecha) transfectadas con siRNA-PKP1-1-Cy3. (siRNA en rojo; núcleos en azul con DAPI).

El nivel de eficiencia de transfección en la línea SK-MES-1 fue cercano al 100% y muy similar al obtenido en células HeLa, como puede observarse por las imágenes de la transfección *in vivo*. Además, las imágenes de inmunocitoquímica muestran una menor expresión de PKP1, lo que prueba la efectividad y eficiencia de la metodología siRNA.

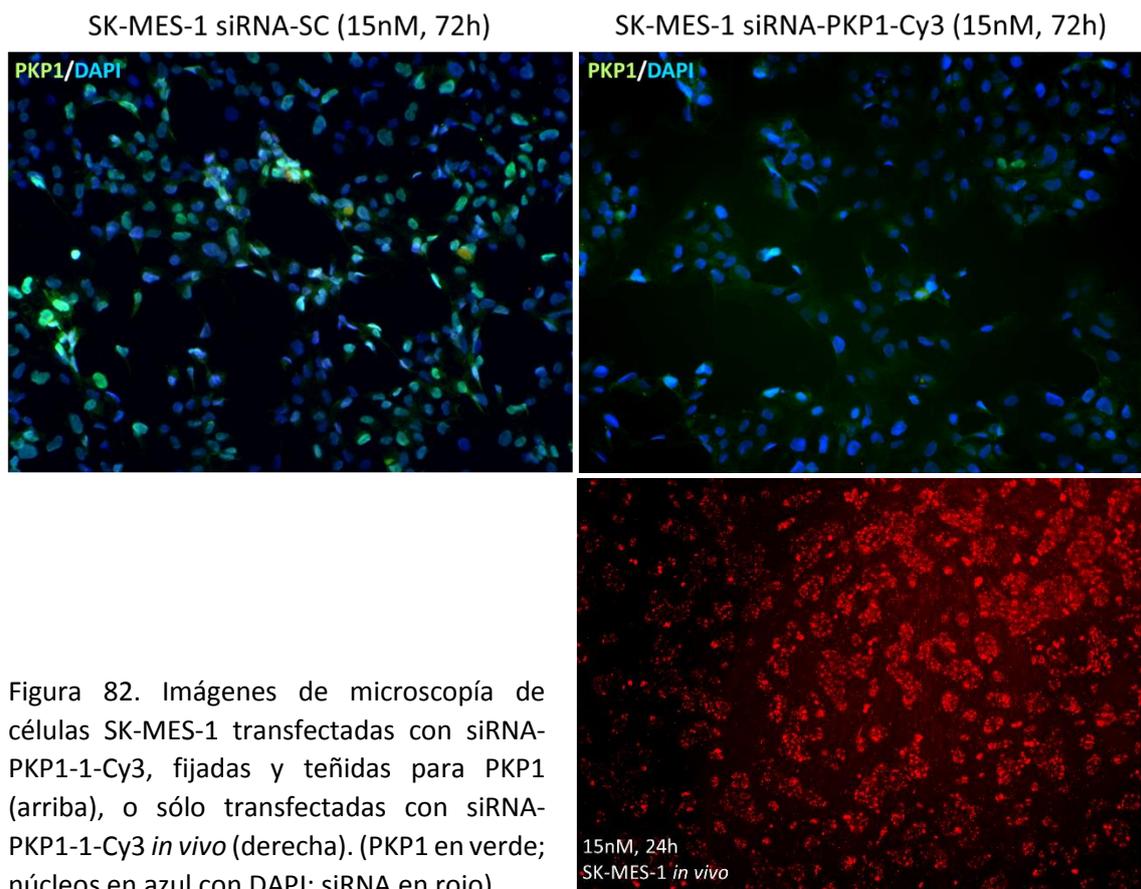


Figura 82. Imágenes de microscopía de células SK-MES-1 transfectadas con siRNA-PKP1-1-Cy3, fijadas y teñidas para PKP1 (arriba), o sólo transfectadas con siRNA-PKP1-1-Cy3 *in vivo* (derecha). (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI; siRNA en rojo).

Finalmente, para constatar el efecto del siRNA-PKP1-1-Cy3 sobre la expresión de PKP1 y cerciorar que la conjugación del fluorocromo Cy3 no afecta a la funcionalidad del siRNA, se llevó a cabo un WB de las células SK-MES-1 transfectadas con 6,25 pmol [2,5 nM] de siRNA-PKP1-1-Cy3 durante 72 h (Fig. 83). El WB demostró una inhibición de la expresión proteica de PKP1 del 100%.

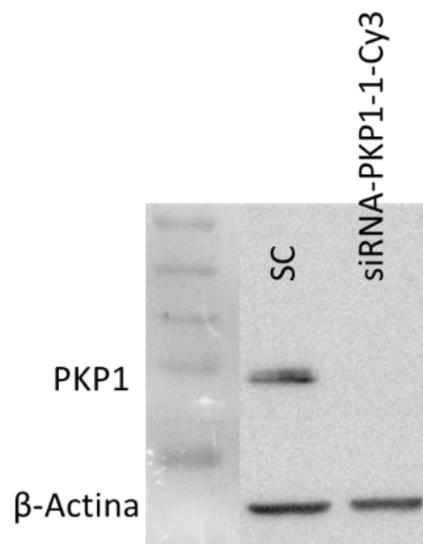


Figura 83. WB de la eficiencia de transfección del siRNA-PKP1-1-Cy3 en células SK-MES-1 transfectadas durante 72 h. (SC, control *Scramble*).

6.4.8. Viabilidad celular (ensayo de MTT)

Una vez comprobado que obteníamos un silenciamiento génico de *Pkp1* del 90-100% con la metodología de siRNAs y con el objetivo de testar posibles efectos de dicho silenciamiento en la proliferación celular, se realizaron ensayos de MTT en las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H transfectadas con siRNA-PKP1.

6.4.8.1. Determinación del número de células óptimo

En primer lugar, se determinó el número de células óptimo para cada línea celular testada mediante la realización de curvas patrón (Fig. 84), según los protocolos descritos.

Los resultados de las curvas patrón fueron orientativos y mostraron que para la línea SK-MES-1, el número de células cuyo valor de absorbancia real se encontraba entre $0,75 < x < 1,25$ fue $5 \cdot 10^3$ células/pocillo. Para la línea EPLC-272H el número de células óptimo osciló entre $2,5 \cdot 10^3$ y $6 \cdot 10^3$ células/pocillo aproximadamente.

Finalmente, el número de células óptimo seleccionado para posteriores ensayos fue $5 \cdot 10^3$ células/pocillo para la línea SK-MES-1 y $5,5 \cdot 10^3$ células/pocillo para EPLC-272H.

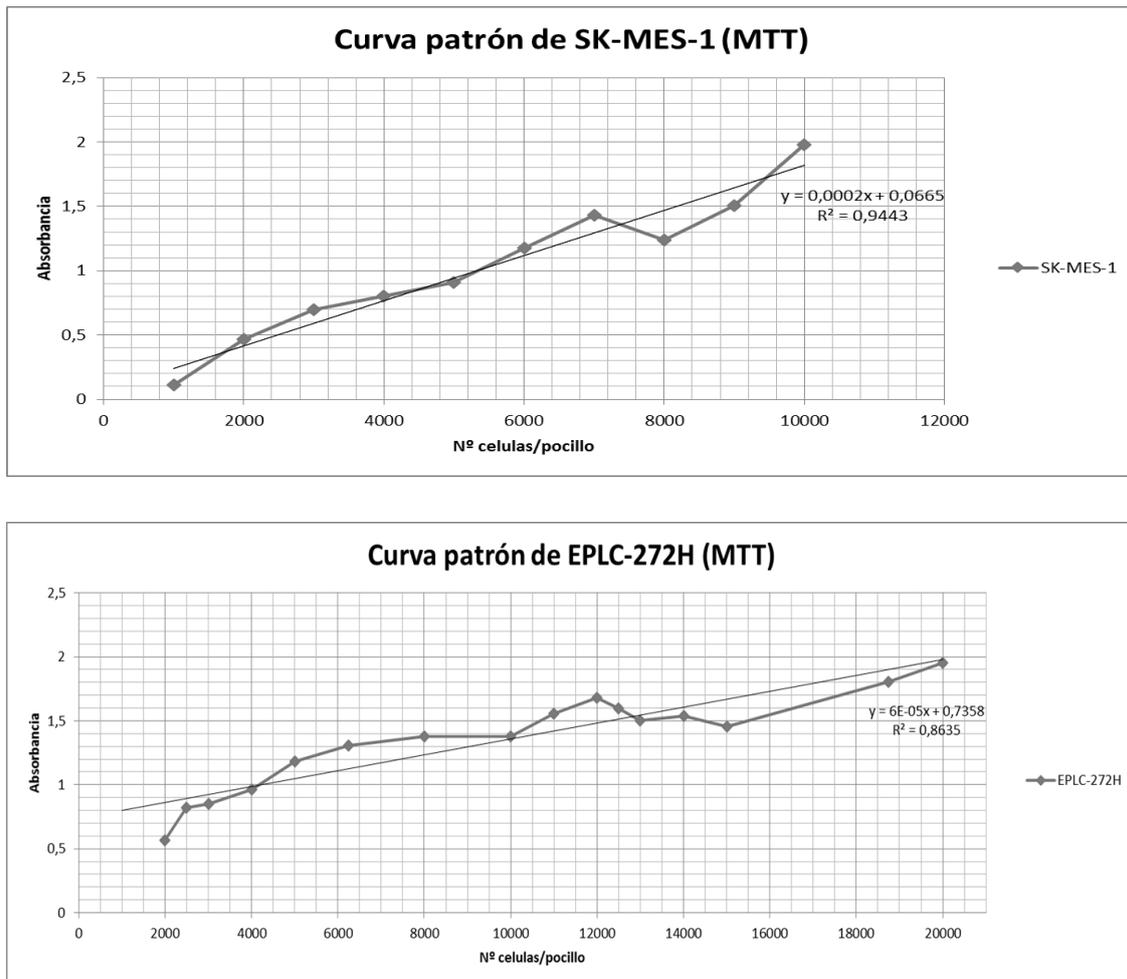


Figura 84. Curvas patrón donde se representa la media de absorbancia de cada punto de la curva de SK-MES-1 (arriba) y EPLC-272H (abajo) para la optimización de los ensayos de MTT.

6.4.8.2. Ensayo de MTT para silenciamiento génico de *Pkp1*

Una vez optimizado el número de células para cada línea, se llevaron a cabo los ensayos por triplicado para cada tipo celular, SK-MES-1 y EPLC-272H, transfectadas con un combinado de siRNAs de PKP1 durante 72 h (Fig. 85).

El silenciamiento génico de *Pkp1* produjo una disminución media del 15,1% de proliferación celular en la línea SK-MES-1 (T de Student, $p = 0,01$) y del 21,7% en EPLC-272H (T de Student, $p = 0,039$).

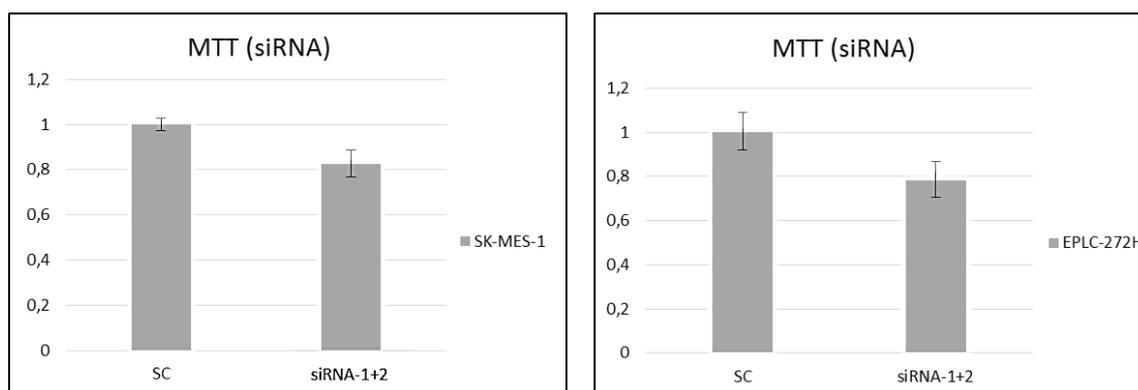


Figura 85. Ensayos de viabilidad celular mediante MTT en líneas SK-MES-1 (izquierda) y EPLC-272H (derecha) silenciadas para *Pkp1*. Todos los datos de absorbancia se han representado normalizados en tanto por uno \pm SD con respecto al control. (SC, control *Scramble*).

6.4.9. Ciclo celular

Para determinar si la disminución de la proliferación celular observada era debida a alteraciones en el ciclo celular, se llevaron a cabo análisis del ciclo celular de las líneas SK-MES-1 (Fig. 86) y EPLC-272H (Fig. 87) a las que previamente se les había sometido a un silenciamiento génico de *Pkp1* de manera similar a los ensayos de viabilidad.

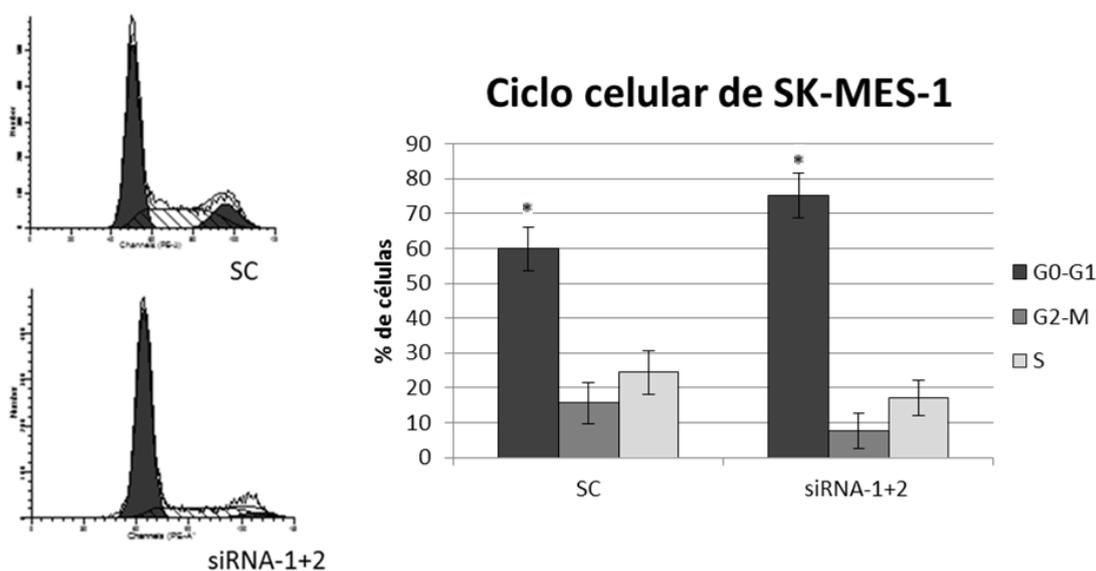


Figura 86. Análisis del ciclo celular de la línea SK-MES-1 tras el silenciamiento génico de *Pkp1*. Los histogramas producidos por el software *ModFit LT* (izquierda) muestran el número de eventos según la intensidad de señal del PI. La gráfica de barras (derecha) representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. (SC, control *Scramble*; * $p \leq 0,05$).

Los resultados de ciclo celular en células SK-MES-1 transfectadas con siRNA contra *Pkp1* muestran una parada del ciclo caracterizada por un incremento medio del 16,48% en la fase G0-G1. Este arresto celular fue estadísticamente significativo (T de Student, $p = 0,0326$).

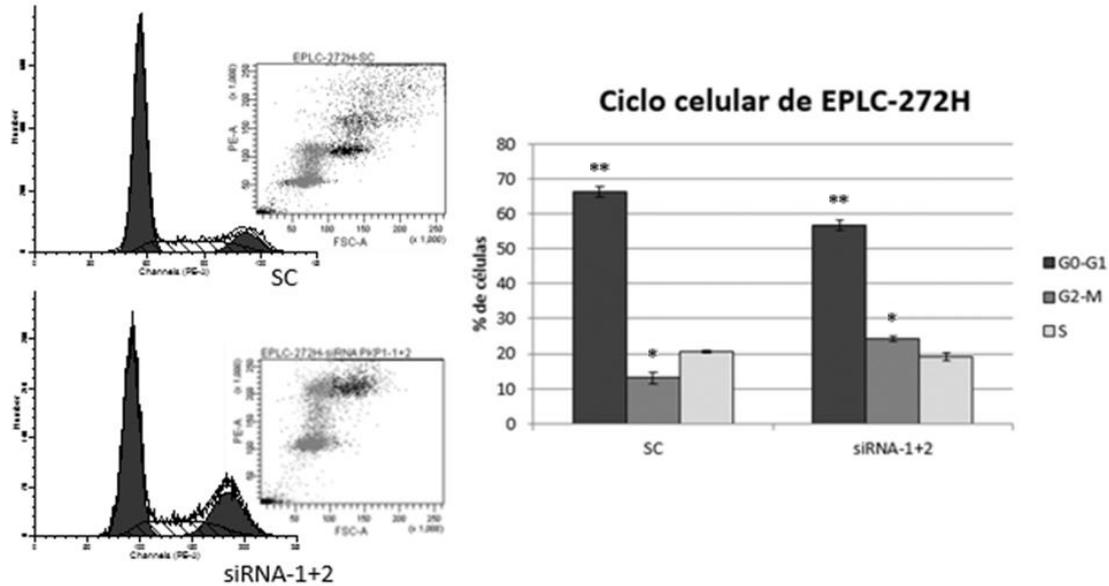


Figura 87. Análisis del ciclo celular de la línea EPLC-272H tras el silenciamiento génico de *Pkp1*. Los histogramas producidos por el software *ModFit LT* (izquierda) muestran el número de eventos según la intensidad de señal del PI. La gráfica de barras (derecha) representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. (SC, control *Scramble*; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,0001$).

Por otro lado, los datos de la línea EPLC-272H silenciada no mostraron un arresto en fase G0-G1 sino que la parada del ciclo celular se dio en la fase G2-M, produciéndose un incremento medio del 11,09% en la fase G2-M (T de Student, $p = 0,0018$) y una disminución media del 9,69% en G0-G1 (T de Student, $p = 0,0001$). Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas. Además, hubo un incremento de la intensidad de señal del PI, tal y como puede observarse por el desplazamiento de los eventos en las gráficas de nubes de puntos de la Figura 87.

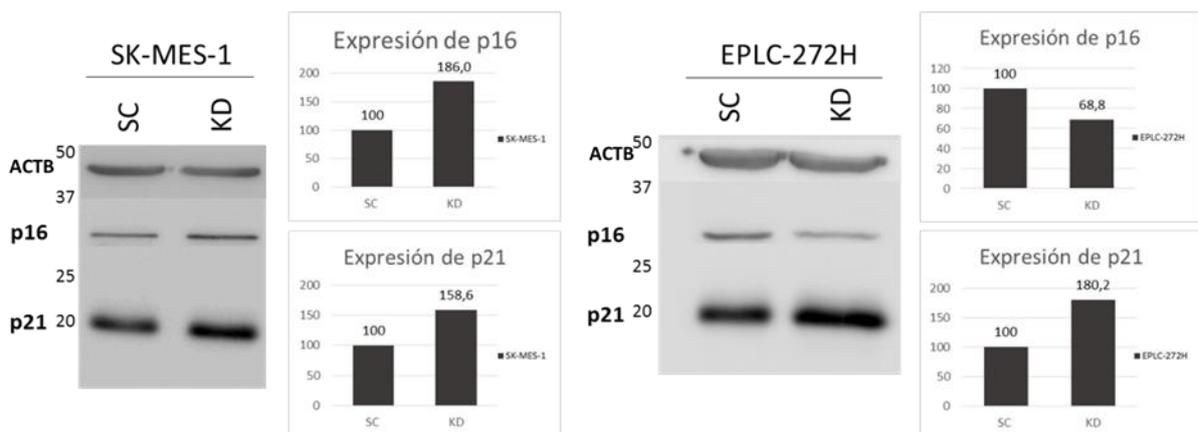


Figura 88. Análisis de la expresión proteica de p16 y p21 en las líneas celulares SK-MES-1 (izquierda) y EPLC-272H (derecha) tras el silenciamiento génico de *Pkp1*. La figura muestra WB de p16 y p21, y cuantificación relativa de las bandas correspondientes normalizadas de acuerdo a los controles y la expresión de β -Actina (ACTB). (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

Para analizar más en profundidad el efecto que la inhibición de PKP1 puede tener sobre el ciclo celular, se testaron las expresiones proteicas de p16 y p21 los cuales son importantes reguladores del ciclo celular (Fig. 88).

Los resultados de la expresión proteica de p16 fueron diferentes para cada línea celular tras el silenciamiento génico de *Pkp1*. Mientras que en SK-MES-1 se produjo un incremento del 86% de p16, en EPLC-272H ésta disminuyó un 31,2%. Por otro lado, la expresión de p21 aumentó en ambos casos (58,6% en SK-MES-1 y 80,2% en EPLC-272H).

6.4.10. Apoptosis celular

Debido a que otra posible explicación de la disminución de la proliferación celular observada tras el silenciamiento génico de *Pkp1* es que tal silenciamiento afecte a los procesos de muerte celular programada, se procedió a cuantificar el porcentaje de células tumorales que sufrieron apoptosis las líneas SK-MES-1 (Fig. 89) y EPLC-272H (Fig. 90).

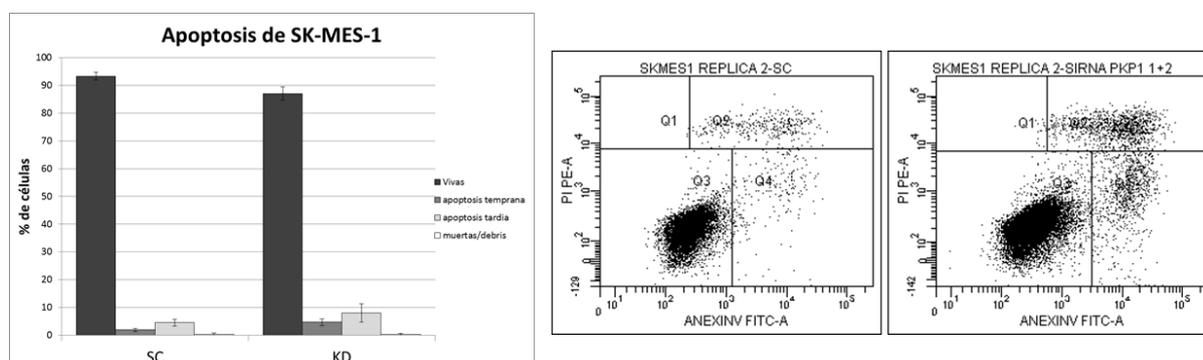


Figura 89. Análisis de apoptosis tras el silenciamiento génico de *Pkp1* en la línea SK-MES-1. La gráfica de barras (izquierda) representa el porcentaje de células en cada fase de apoptosis. Las gráficas de nubes de puntos producidas por el software *FACSDiva* (derecha) son representativas y muestran el número de eventos según la intensidad de señal del PI y AnexinaV-FitC. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

Los resultados de apoptosis en células SK-MES-1 transfectadas con siRNA contra *Pkp1* muestran un incremento de aproximadamente 2,5 veces del porcentaje de células en apoptosis temprana. Este incremento fue estadísticamente significativo (T de Student, $p = 0,0075$). Además, el porcentaje de células en apoptosis tardía se duplicó.

Como contrapartida, el porcentaje de células no apoptóticas se redujo de manera significativa (T de Student, $p = 0,0042$).

La línea EPLC-272H silenciada para *Pkp1* también mostró un incremento de aproximadamente 2,5 veces del porcentaje de células en apoptosis temprana. Además, el porcentaje de células en apoptosis tardía aumentó un 60%. Sin embargo, ninguno de estos incrementos fueron estadísticamente significativos (T de Student, $p > 0,05$).

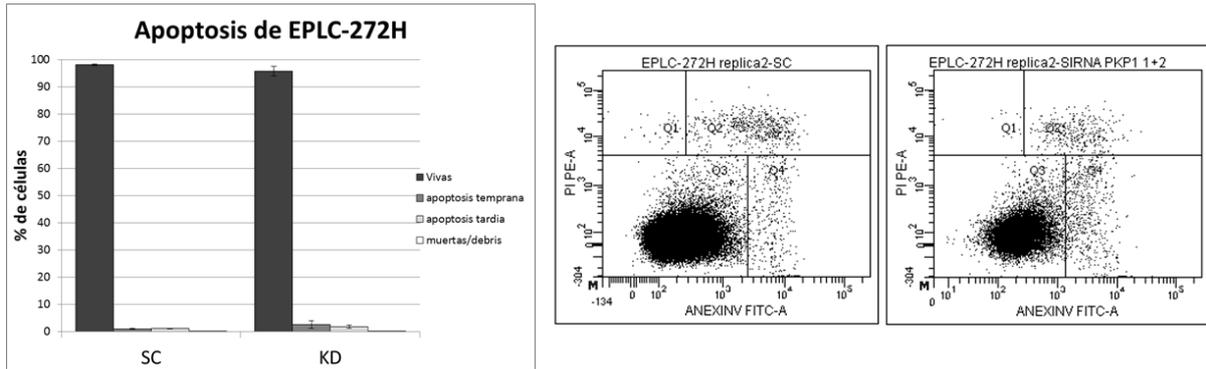


Figura 90. Análisis de apoptosis tras el silenciamiento génico de *Pkp1* en la línea EPLC-272H. La gráfica de barras (izquierda) representa el porcentaje de células en cada fase de apoptosis. Las gráficas de nubes de puntos producidas por el software *FACSDiva* (derecha) son representativas y muestran el número de eventos según la intensidad de señal del PI y AnexinaV-FitC. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

Con el objetivo de confirmar los posibles efectos del silenciamiento génico de *Pkp1* sobre la apoptosis celular a pesar de no haber obtenido significación estadística en todos los casos, se realizó un WB para analizar la activación de la caspasa 3 (Fig. 91).

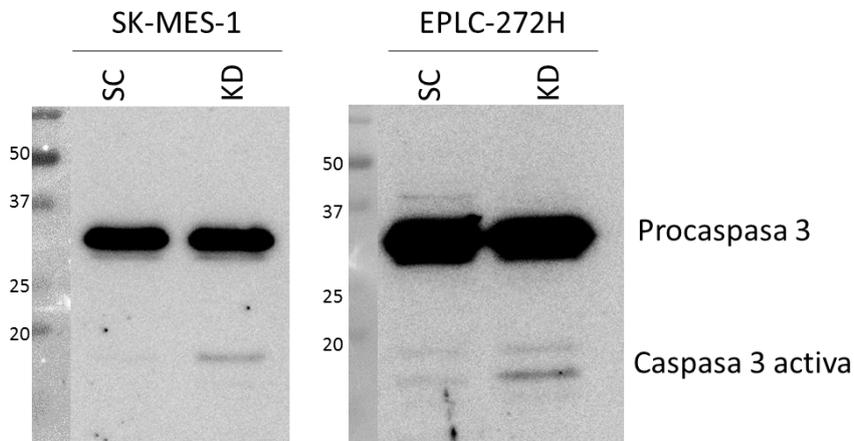


Figura 91. Análisis de la expresión proteica de la caspasa 3 en las líneas celulares SK-MES-1 (izquierda) y EPLC-272H (derecha) tras el silenciamiento génico de *Pkp1*. La figura muestra WB de la procaspasa 3 y la banda de la caspasa 3 activa. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

En ambas líneas celulares se produjo una activación de la caspasa 3 tras haber sufrido un silenciamiento génico de *Pkp1*. Debido a que la caspasa 3 está íntimamente relacionada con los procesos de muerte celular programada, estos resultados confirman que la inhibición de *Pkp1* produce apoptosis tanto en la línea SK-MES-1 como en la línea EPLC-272H, a pesar de no haber obtenido resultados estadísticamente significativos en los análisis de anexina V.

6.4.11. Inmunocitoquímica

Se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas para estudiar la localización subcelular de PKP1 y otras proteínas en las líneas celulares SK-MES-1 y EPLC-272H.

Las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas revelaron en ambas líneas celulares una fuerte localización nuclear de PKP1, una señal citoplasmática de patrón difuso y la intensa presencia de esta proteína en determinadas zonas intercelulares de la membrana plasmática que pueden corresponderse con los desmosomas formados entre células adyacentes (Fig. 92 y 93).

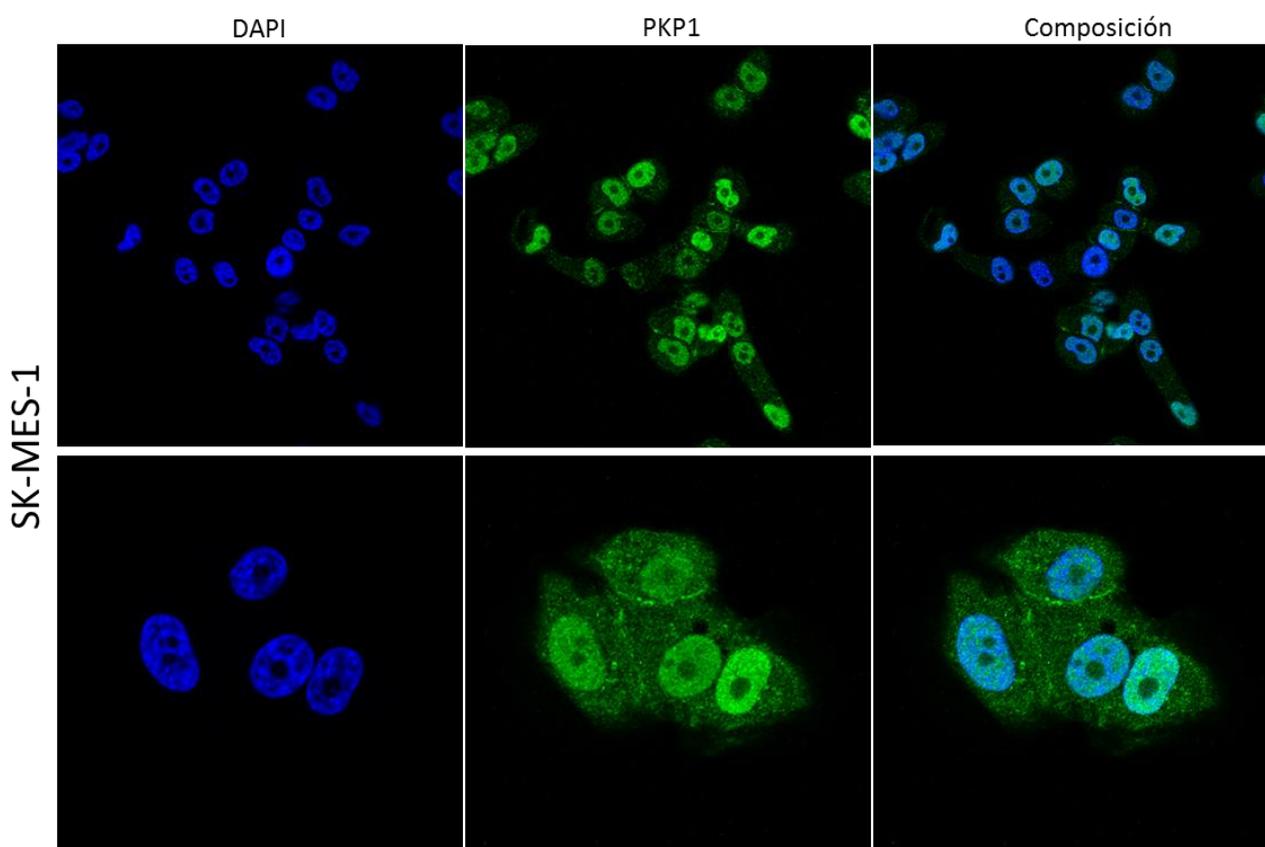


Figura 92. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 sin tratar, fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (izquierda) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6 en las imágenes superiores y de 1,3 en las inferiores. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

En cuanto a la tinción nuclear, cabe destacar que PKP1 no estuvo presente en los nucléolos en ningún caso y, además, hubo variaciones en la intensidad de señal de unos núcleos a otros, lo que resultó en una tinción nuclear heterogénea.

La presencia de PKP1 en las uniones intercelulares fue más evidente en la línea EPLC-272H (Fig. 93), quizás debido a que esta línea presenta un nivel basal de expresión de PKP1 mayor que SK-MES-1. Además, los desmosomas fueron visibles en distintos planos de las

muestras, lo que impedía en muchas ocasiones captar en la imagen de un solo plano todas las estructuras existentes en la muestra.

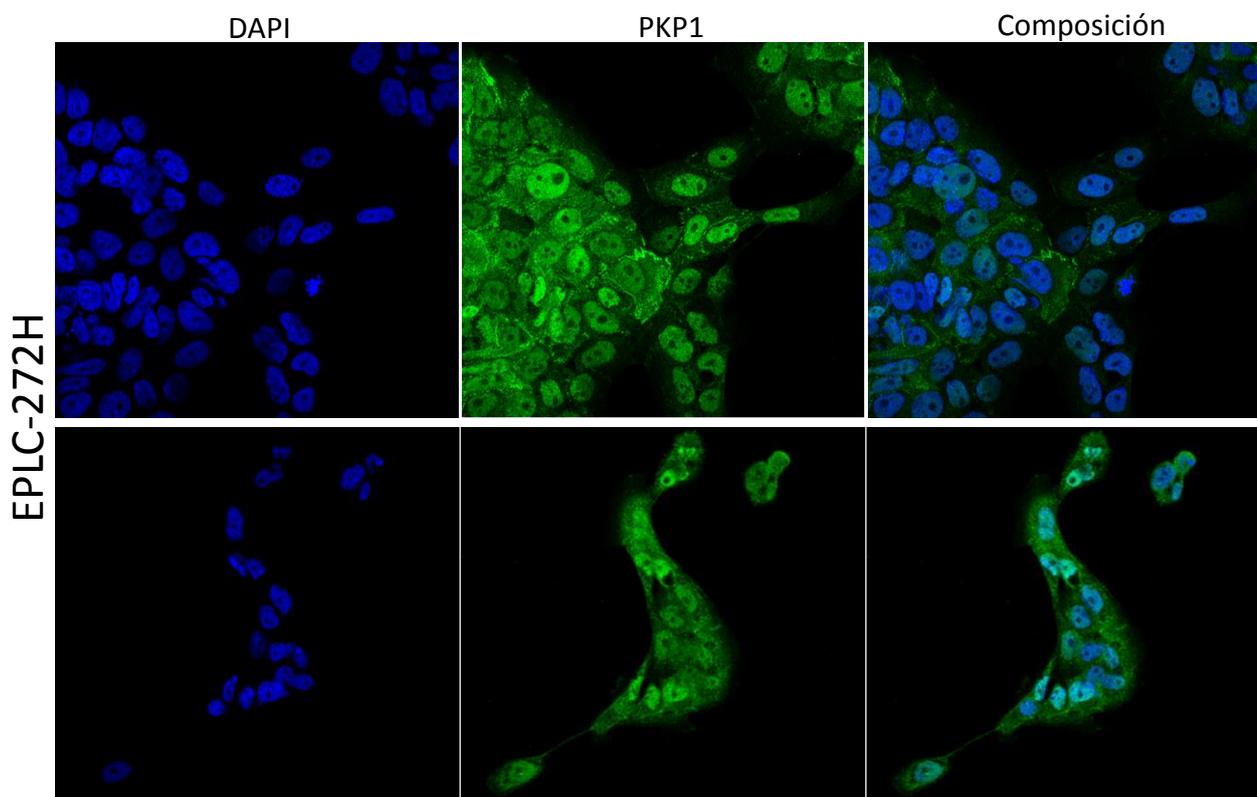


Figura 93. Imágenes de microscopía confocal de células EPLC-272H sin tratar, fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (izquierda) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

Por otro lado, se realizaron también inmunocitoquímicas para DSG3, el cual es un componente fundamental de los desmosomas; y E-cadherina, la cual está involucrada en la *transición epitelio-mesénquima* (del inglés, EMT). Las inmunofluorescencias de DSG3 y E-cadherina (Fig. 94) revelaron diferencias entre ambas líneas de SCC de pulmón, ya que en la línea SK-MES-1 estas tinciones resultaron negativas para ambas proteínas, indicando una expresión muy baja o nula las mismas. Por el contrario, en células de EPLC-272H sí se halló expresión tanto de DSG3 como E-cadherina mediante inmunofluorescencia.

Como control positivo del anticuerpo contra DSG3, se utilizó la línea celular tumoral HaCaT mientras que la línea celular tumoral MCF7 (AC de mama) se utilizó como control positivo de E-cadherina.

Con el objetivo de determinar la especificidad de la intensa señal nuclear de PKP1 y detectar posibles cambios de localización subcelular, se repitieron los ensayos inmunocitoquímicos en las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H a las que previamente se les había sometido a un silenciamiento génico de *Pkp1* mediante siRNA (Fig. 95, 96, 97 y 98).

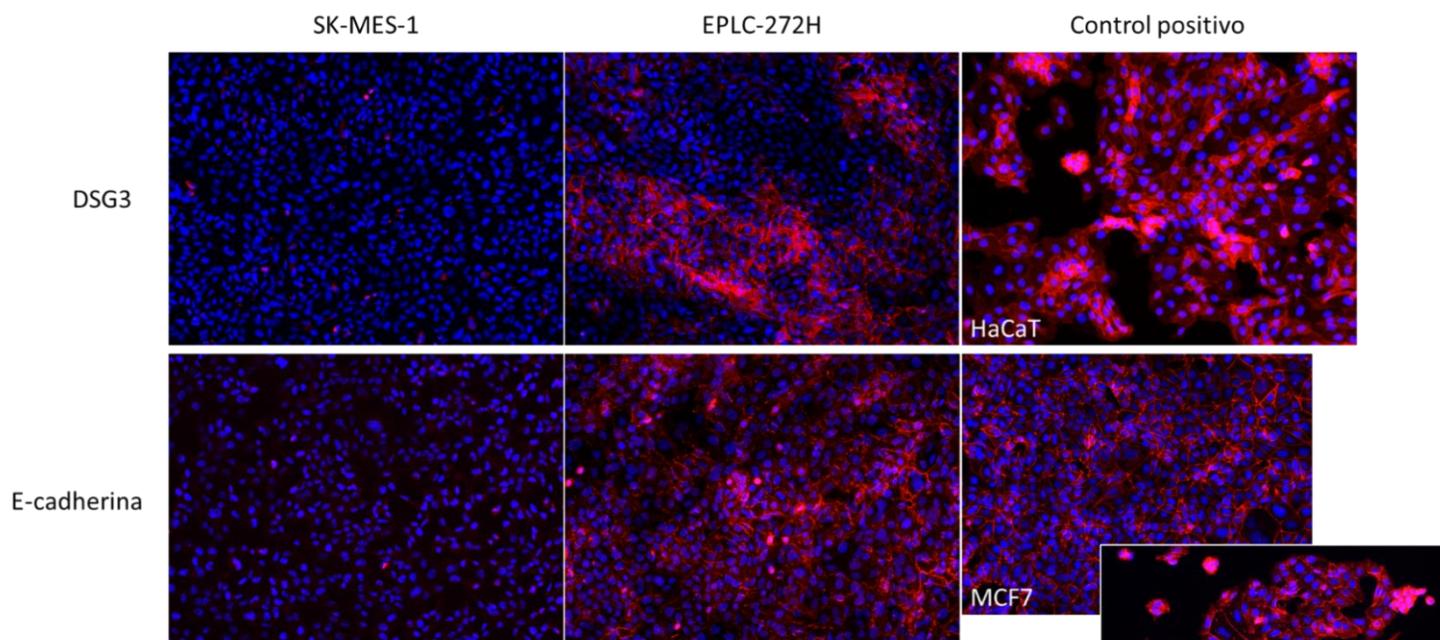


Figura 94. Imágenes superpuestas de microscopía de epifluorescencia de células sin tratar, fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y DSG3 o E-cadherina con anti-mouse ALEXA 555. Las imágenes fueron adquiridas a 20x. (DSG3 y E-cadherina en rojo; núcleos en azul con DAPI).

Tras el silenciamiento se produjo una disminución general de la señal de PKP1 en ambas líneas celulares (Fig. 96 y 98). Además, la señal nuclear desapareció casi por completo, sobretodo en la línea SK-MES-1, posiblemente debido a un menor nivel basal de expresión de PKP1 en esta línea en comparación con EPLC-272H y una mayor facilidad de transfección de SK-MES-1. Dicha desaparición de la señal nuclear tras el silenciamiento es indicativa de la especificidad de la localización nuclear de PKP1, descartando la posibilidad de artefactos ocasionados por inespecificidades de los anticuerpos utilizados.

En cuanto a la tinción de las uniones intercelulares, ésta no desapareció en ninguna línea tras el silenciamiento, haciéndose incluso más evidente en ocasiones, debido a la disminución del resto de la señal celular.

Cabe destacar que la señal citoplasmática y periférica de PKP1 se incrementó en células en división (Fig. 99A), quizás debido al reparto de la proteína contenida en el núcleo durante la desorganización de la envoltura nuclear que tiene lugar en la profase tardía de la mitosis.

Sin embargo, en células previamente silenciadas para PKP1 mediante siRNA no se produjeron tales incrementos de las señales citoplasmática y periférica (Fig. 99B). Una posible explicación es que, en estas células silenciadas, la expresión de PKP1 nuclear desaparece casi por completo, lo que imposibilita el esparcimiento de dicha proteína por el citoplasma y membrana plasmática durante la desaparición mitótica de la envoltura nuclear.

SK-MES-1

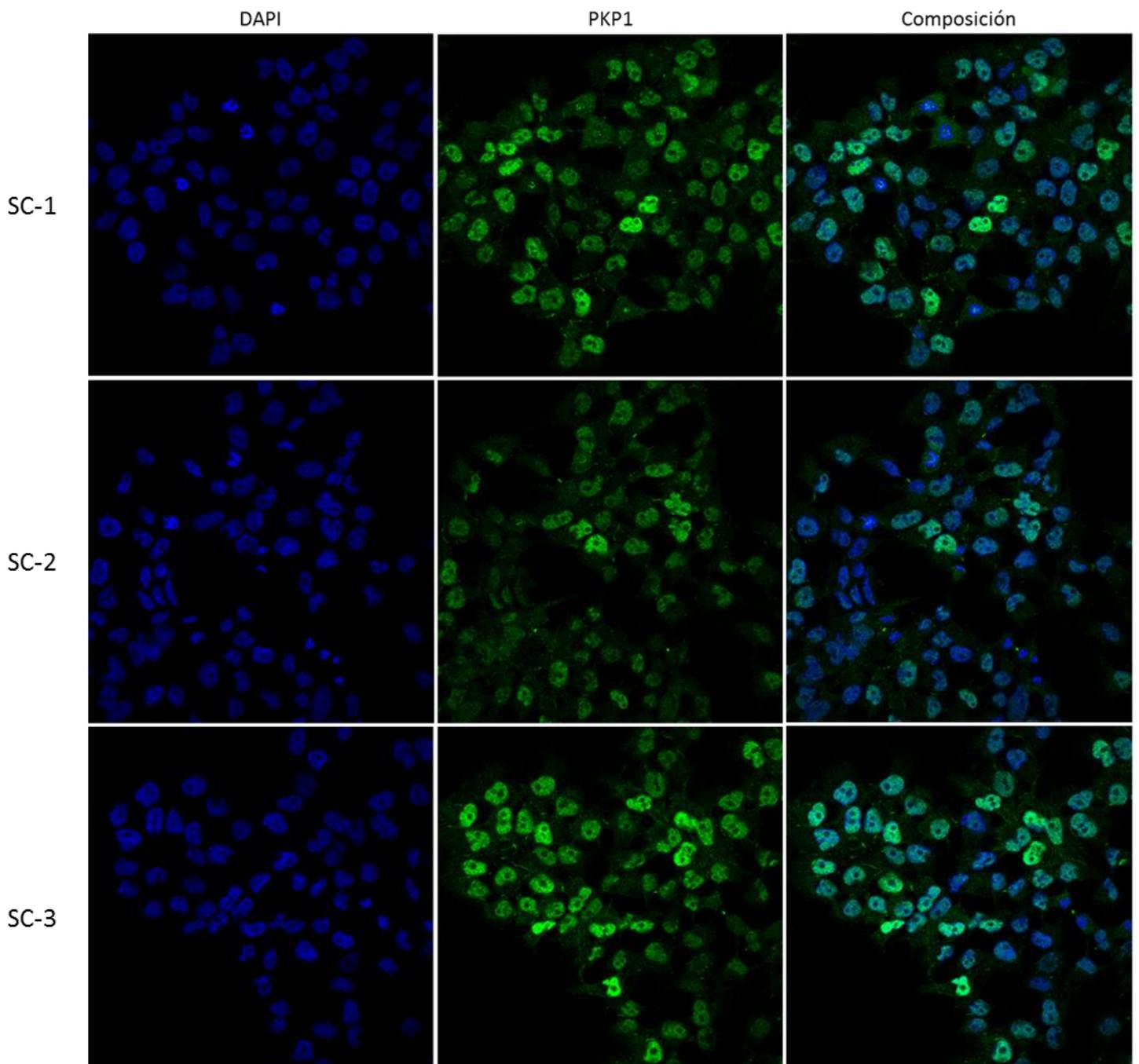


Figura 95. Imágenes de microscopía confocal de 3 muestras control de células SK-MES-1 tras transfección con siRNA control (SC, control *Scramble*). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (izquierda) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

SK-MES-1

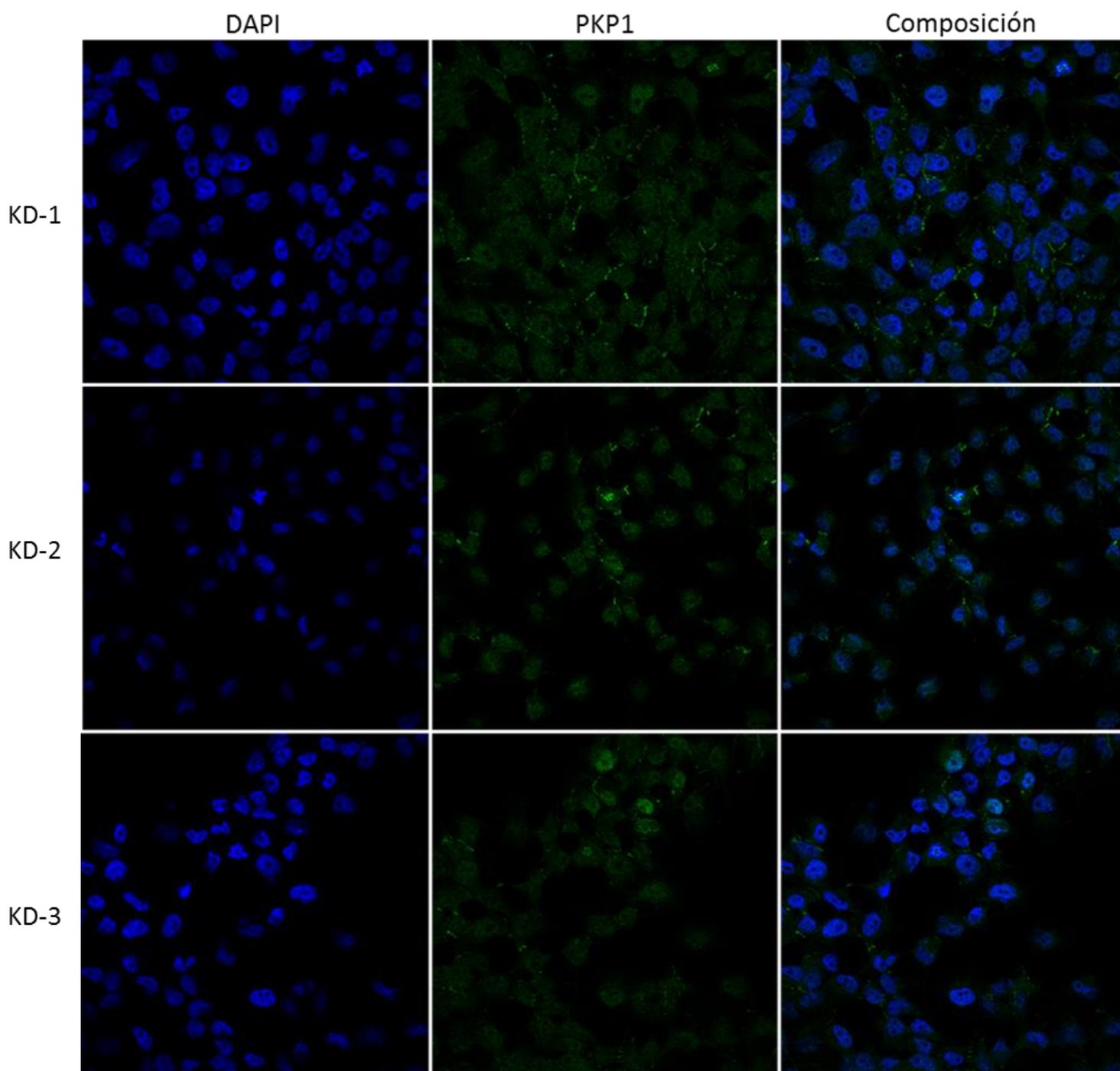


Figura 96. Imágenes de microscopía confocal de 3 muestras de células SK-MES-1 silenciadas tras transfección con siRNAs contra *Pkp1* (KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (izquierda) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

EPLC-272H

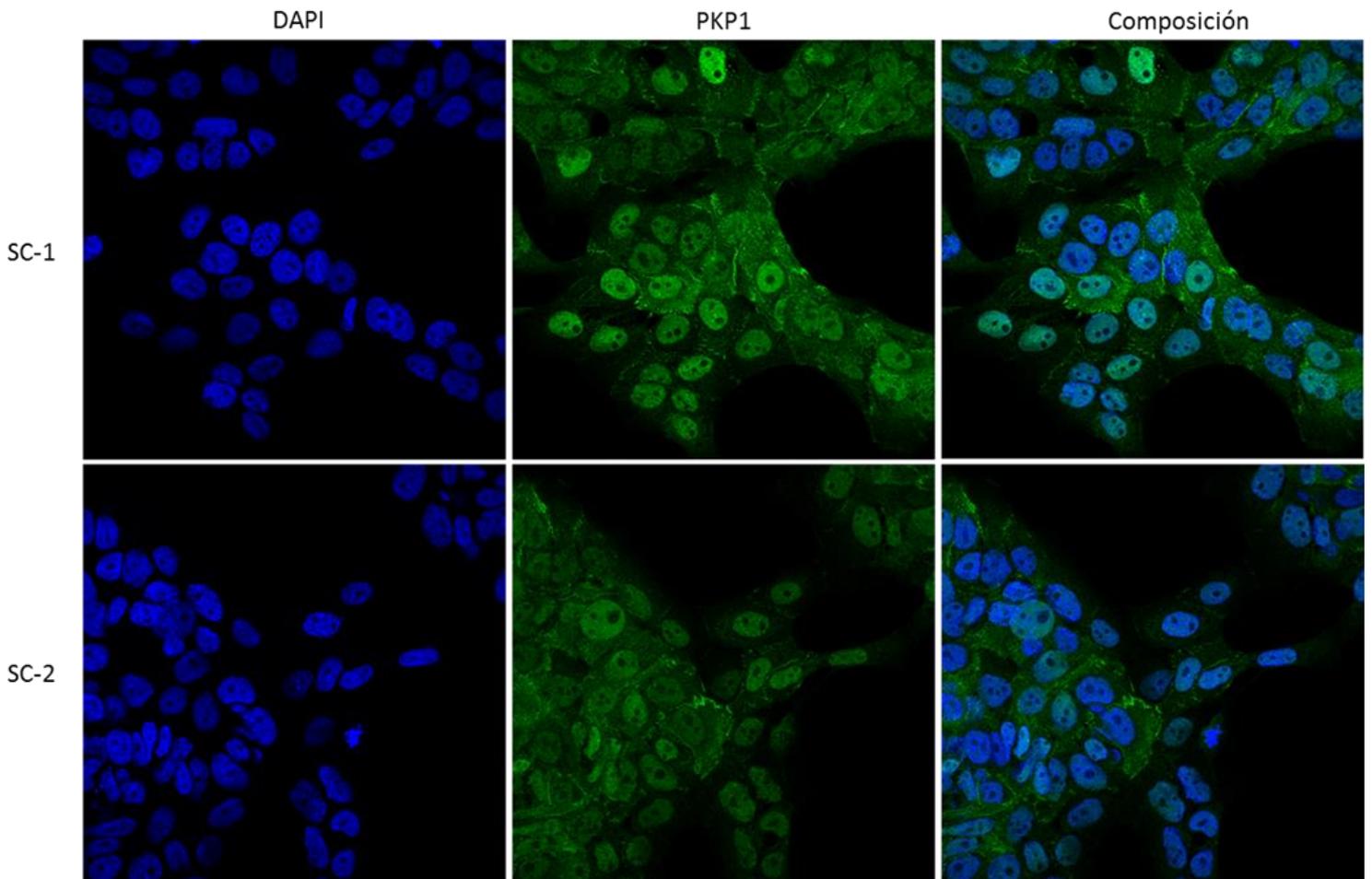


Figura 97. Imágenes de microscopía confocal de 2 muestras control de células EPLC-272H tras transfección con siRNA control (SC, control *Scramble*). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (izquierda) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

Las muestras de inmunofluorescencia revelaron, además de la tinción nuclear, citoplasmática y del desmosoma, una serie de estructuras muy interesantes con una intensidad de señal muy superior a la de los núcleos más intensos de la muestra. Estas estructuras se hallaron sólo en determinadas fases del ciclo celular y fueron más evidentes en la línea SK-MES-1, posiblemente debido a un menor nivel basal de expresión de PKP1 en esta línea en comparación con EPLC-272H (Fig. 100).

EPLC-272H

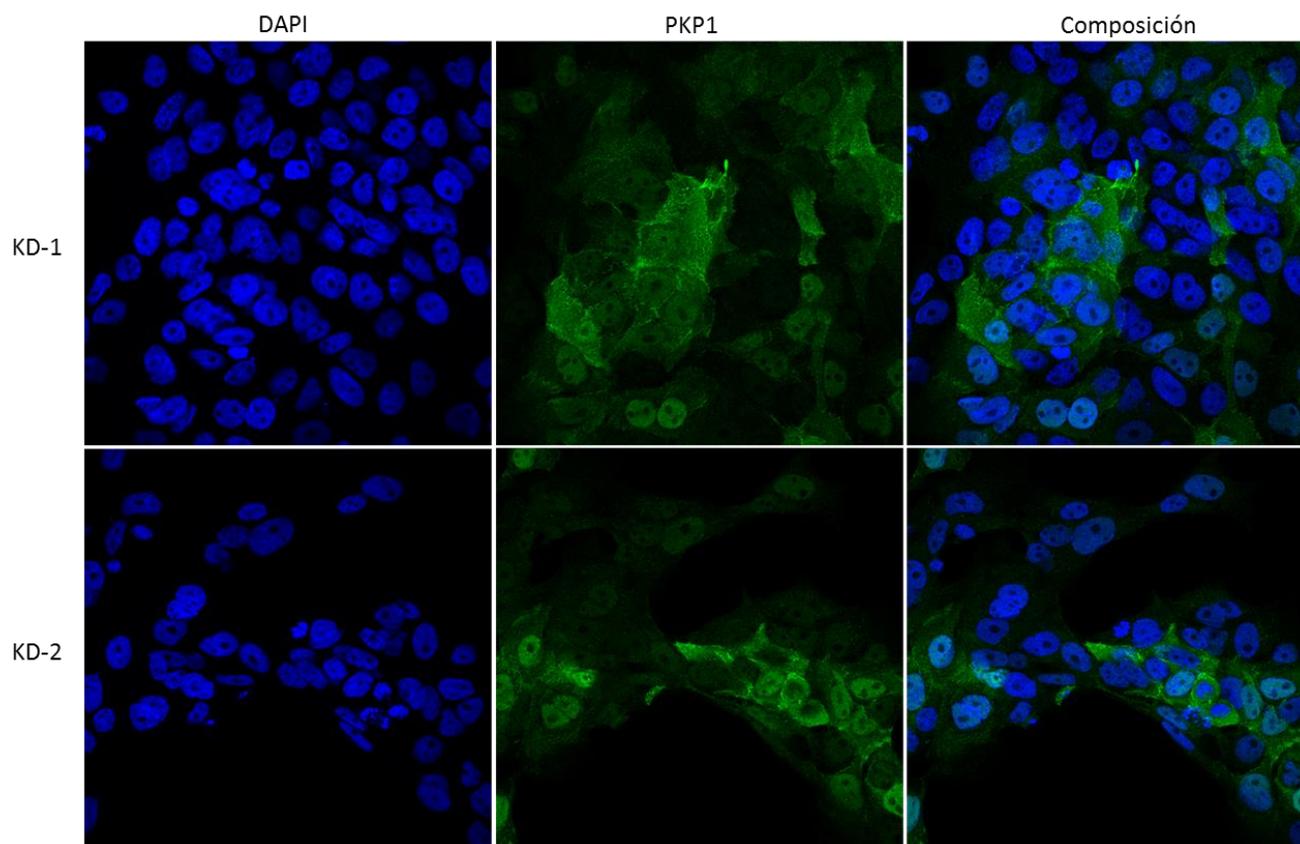


Figura 98. Imágenes de microscopía confocal de 2 muestras de células EPLC-272H silenciadas tras transfección con siRNAs contra *Pkp1* (KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (izquierda) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

Concretamente, las estructuras observadas se correspondieron con los cuerpos de Fleming o cuerpos medios (más conocidos por el término inglés, *midbodies*) los cuales están presentes al final de la citocinesis (fase final de la telofase) localizando el sitio de escisión entre las dos células hijas (Fig. 101). Estas estructuras eran visibles incluso utilizando únicamente técnicas de luz transmitida, como DIC (del inglés, Contraste de Interferencia Diferencial), sin necesidad de fluorescencia (Fig. 102).

También fue observado un patrón punteado intenso durante la profase y metafase, desapareciendo en el resto de fases mitóticas como anafase y telofase, y que era muy similar al patrón de tinción de los cinetocoros, pudiendo corresponderse con dichas estructuras (Fig. 103). En estas células en división, en las cuales eran patentes los patrones cinetocóricos, también fue evidente el incremento de la señal citoplasmática y periférica de PKP1 debida a la diseminación de la proteína nuclear comentada anteriormente (Fig. 104).

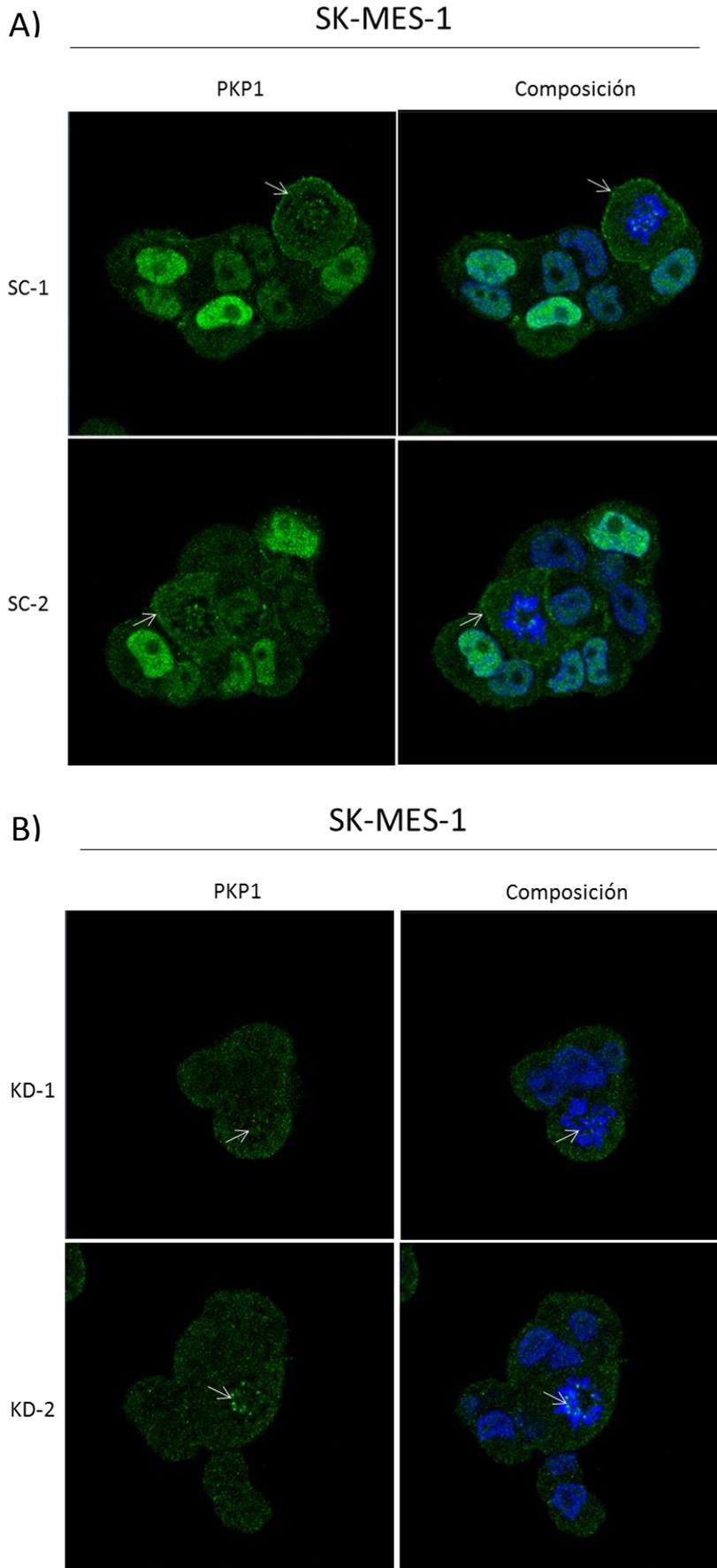


Figura 99. Imágenes de microscopía confocal de 2 muestras de células SK-MES-1 control (A) y 2 silenciadas (B) tras transfección con siRNA control o siRNAs contra *Pkp1* en las que claramente desaparece la señal nuclear. También puede observarse la reorganización de PKP1 en células control en división (flechas). Esta reorganización no ocurre en células silenciadas en división (flechas). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción de PKP1 marcado con anti-rabbit ALEXA 488 (izquierda) y una tinción nuclear con DAPI (superposición de ambas imágenes a la derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 1,5. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI; SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

Aunque estas estructuras fueron más evidentes en la línea SK-MES-1, como se ha mencionado, también fueron observadas en células EPLC-272H tanto salvajes (Fig. 105), como transducidas lentiviralmente con el plásmido vector pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A mediante un único ciclo de transducción y aisladas por citometría de flujo (*Cell Sorting*), lo que produjo una sobreexpresión de PKP1A que fue corroborada mediante WB (Fig. 106).

Con el fin de confirmar que las estructuras observadas se correspondían con los cuerpos medios (*midbodies*) y los cinetocoros, se llevó a cabo una tinción doble con anticuerpos contra PKP1 y α -tubulina. La α -tubulina es uno de los principales componentes de los cuerpos medios y su tinción a menudo se utiliza como control y para la localización de estas estructuras (Fig. 107). Las muestras de inmunocitoquímica marcadas con α -tubulina corroboraron que la señal de PKP1 observada se encontraba en los *midbodies*, aunque no hubo colocalización entre las señales de α -tubulina y PKP1 (Fig. 108).

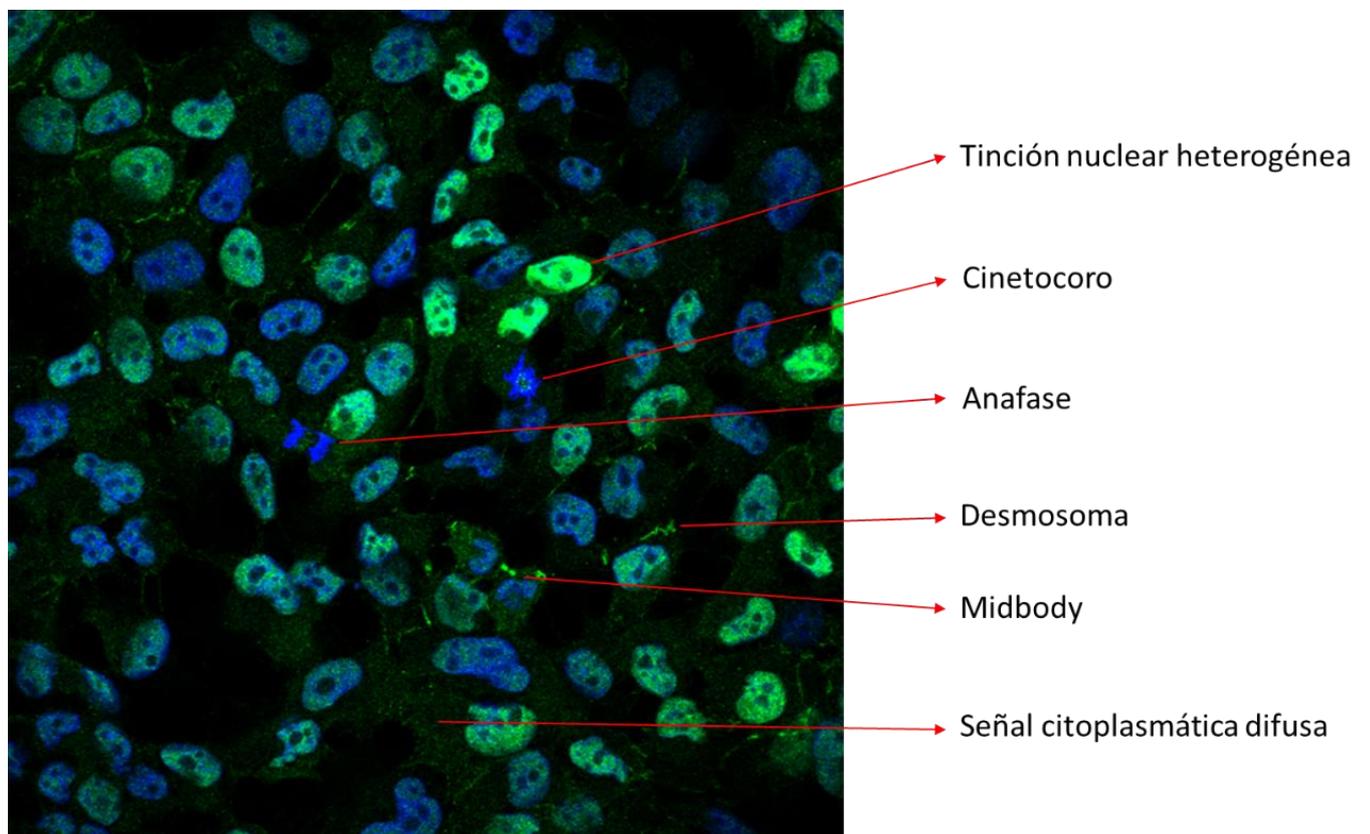


Figura 100. Imagen de microscopía confocal de células SK-MES-1 en la que se aprecian las diferentes estructuras en las que existe señal de PKP1. Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

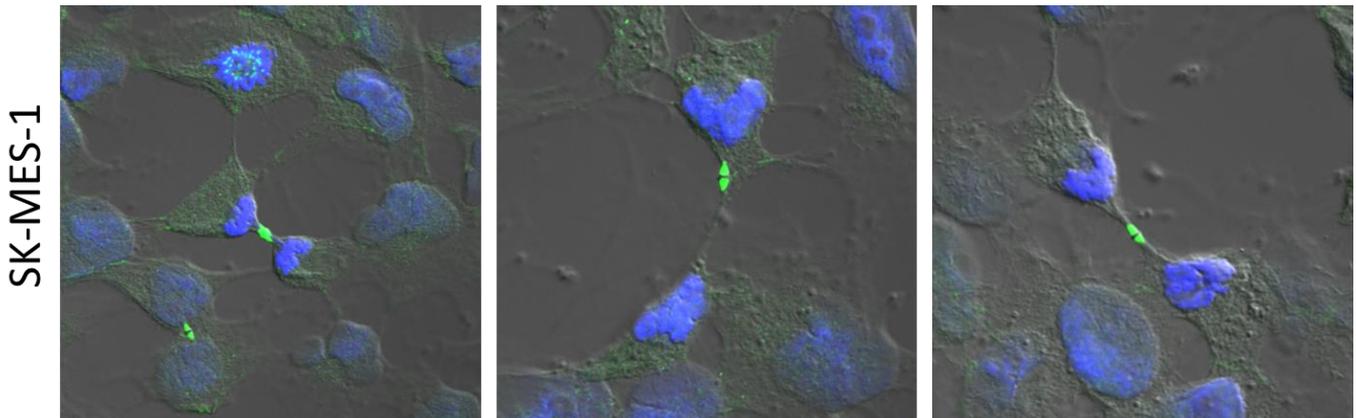


Figura 101. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 en las que se aprecia la intensa señal de PKP1 en los cuerpos medios o *midbodies* de células sufriendo citocinesis (fase final de la telofase). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 2,5. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

SK-MES-1

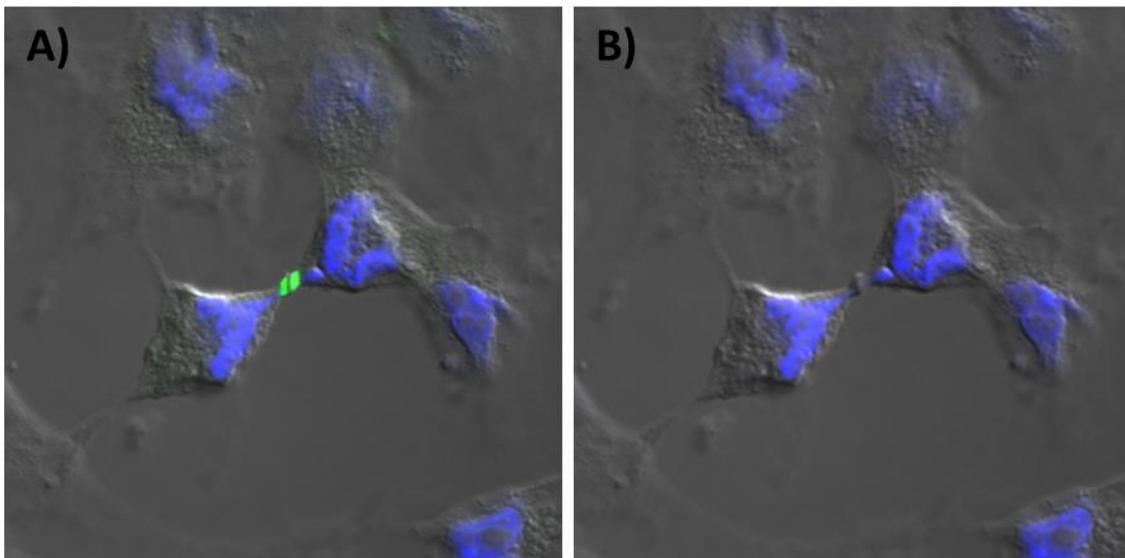


Figura 102. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 en las que se aprecia la intensa señal de PKP1 en los cuerpos medios o *midbodies* (A). Los *midbodies* fueron estructuras visibles mediante técnicas de luz transmitida sin necesidad de fluorescencia de PKP1 (B). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 2,5. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

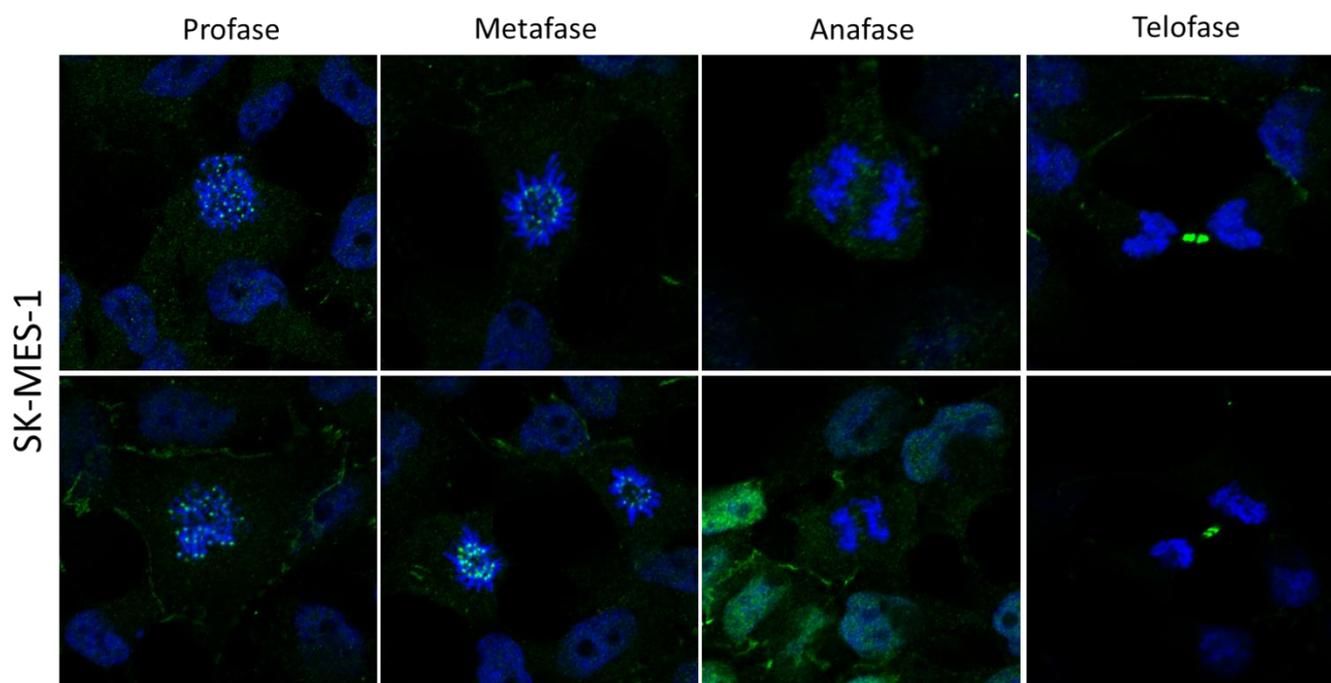


Figura 103. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 en las que se aprecian las diferentes estructuras en las que existe señal de PKP1 de acuerdo a las distintas fases mitóticas. Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de entre 2 y 3. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

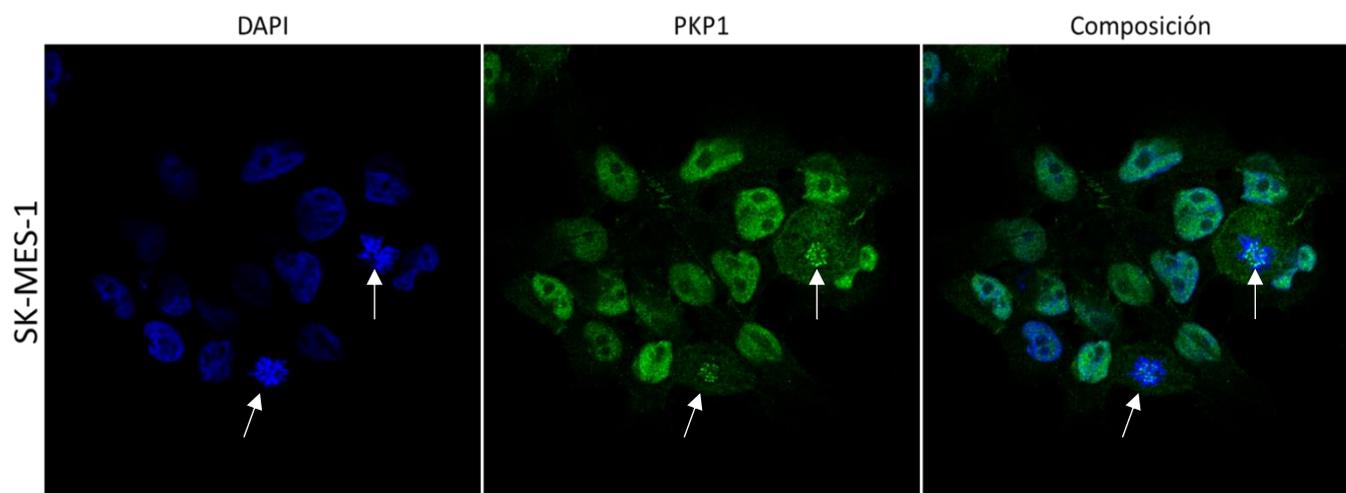


Figura 104. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 en las que se aprecian los cinetocoros y la reorganización de PKP1 en células en metafase. Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (izquierda) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 1,1. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

Sin embargo y al contrario de lo esperado, tras el silenciamiento génico de *Pkp1* no se produjo una desaparición total ni de los cuerpos medios (*midbodies*) ni de los cinetocoros en las muestras de inmunocitoquímica, lo que podría suponer que la aparición de estas estructuras fuera resultado de artefactos debidos a inespecificidades del anticuerpo contra PKP1.

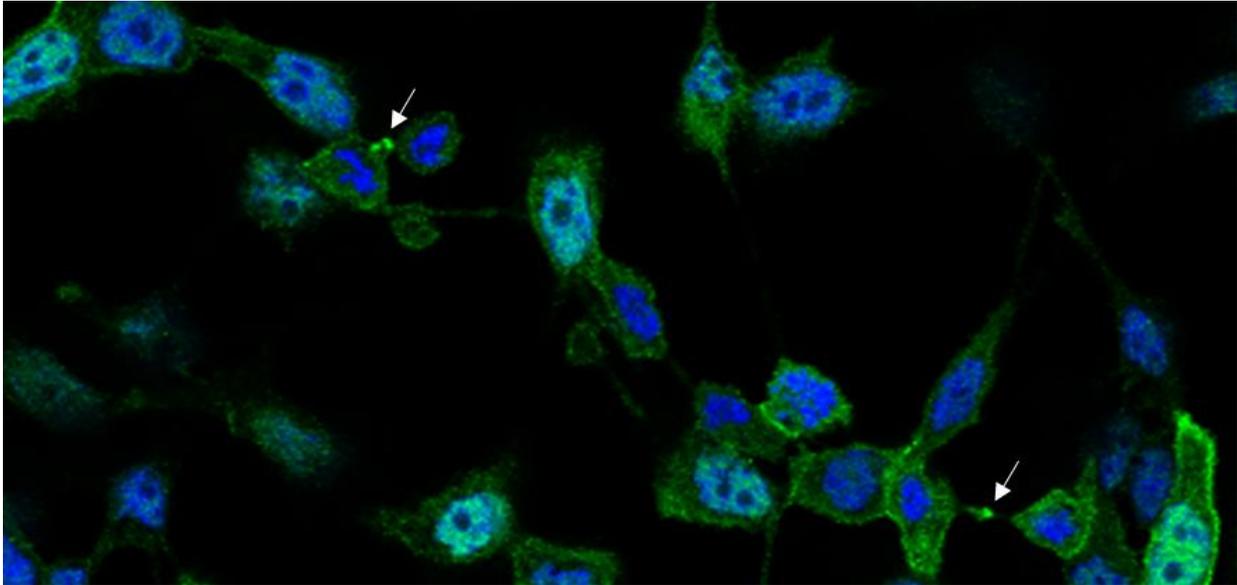


Figura 105. Imagen de microscopía confocal de células EPLC-272H salvajes en las que se aprecia la señal de PKP1 en los *midbodies* de células sufriendo citocinesis (flechas). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

Para resolver la cuestión de posibles artefactos se llevó a cabo, por un lado, el conteo manual de cuerpos medios y cinetocoros en 50 campos de células SK-MES-1 a las que previamente se les había sometido a un silenciamiento génico de *Pkp1* mediante siRNA (KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*) y 50 campos de células SK-MES-1 transfectadas con un siRNA control (SC, control *Scramble*). Para ello se utilizó microscopía confocal y un objetivo 63x sin aplicar ningún factor de zoom. El número de estructuras obtenidas fue normalizado con el número de células totales en los 50 campos de cada condición, utilizando para ello la tinción nuclear (DAPI) y la herramienta de análisis de partículas del software *ImageJ* v1.49c, obteniendo de este modo un ratio de nº estructuras/100 células.

Tras el silenciamiento de *Pkp1*, el resultado fue una disminución del 23% en el número de cinetocoros ($p = 0,784$) y del 56,3% en el número de cuerpos medios ($p = 0,0001$). Teniendo en cuenta el número de estructuras mitóticas total, sin distinción entre cinetocoros y cuerpos medios, la disminución fue del 47,3% ($p = 0,0001$) tras el silenciamiento génico (Fig. 109).

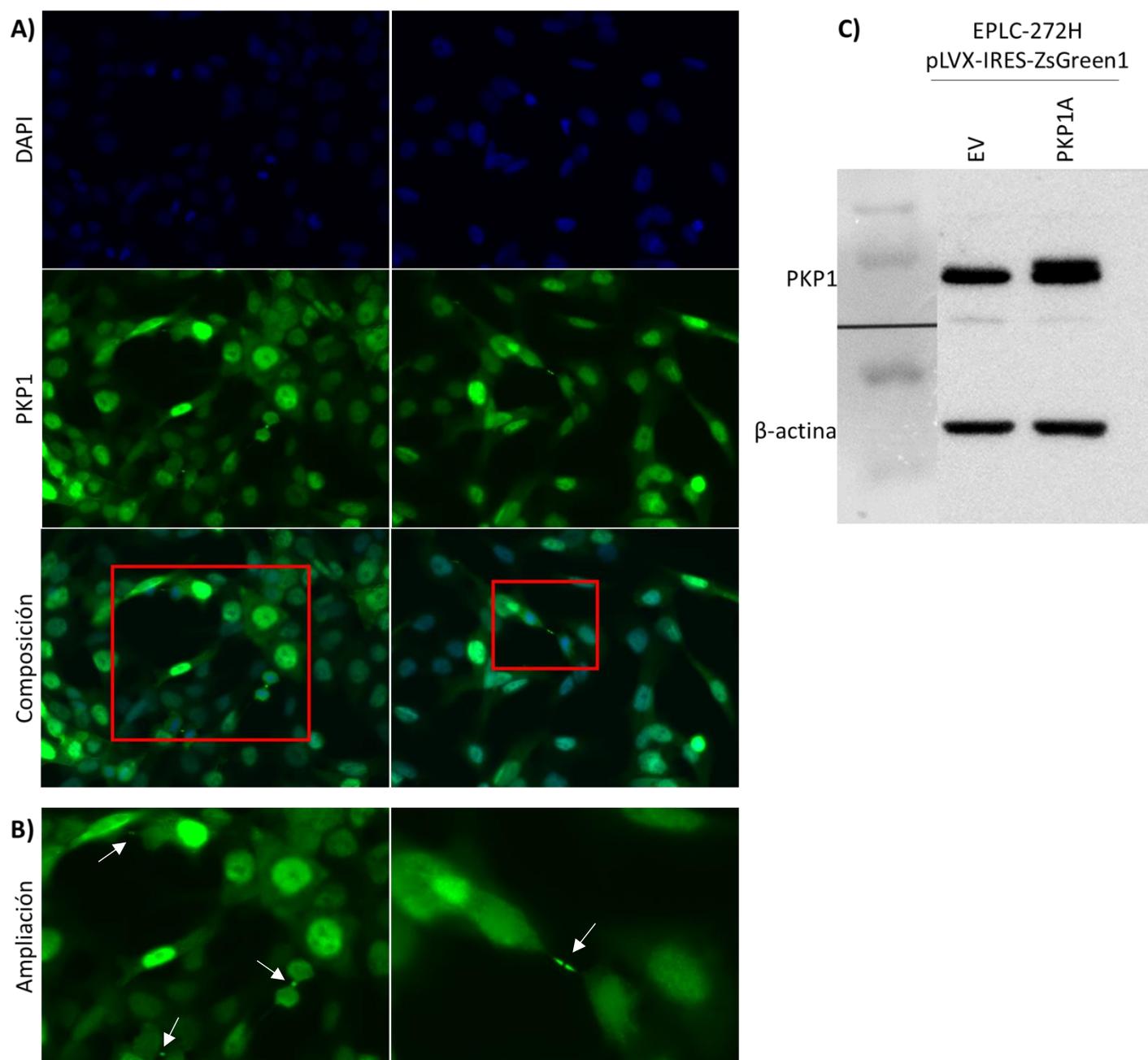


Figura 106. A) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células EPLC-272H transducidas lentiviralmente con el plásmido vector pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A y aisladas por citometría de flujo para sobreexpresar PKP1A en las que se aprecian *midbodies*. B) Ampliación de las áreas remarcadas en rojo (las flechas muestran los *midbodies*). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI (arriba) y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488 (centro). También se muestra la superposición de ambas imágenes (abajo). Las imágenes fueron adquiridas a 63x (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI). C) WB de comprobación de la sobreexpresión de PKP1.

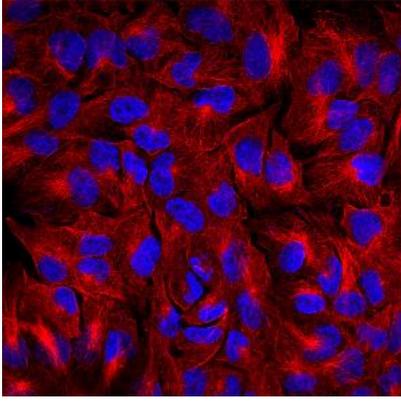


Figura 107. Imagen de microscopía confocal de células SK-MES-1 sin tratar, fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y α -tubulina con anti-mouse ALEXA 555. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (α -Tubulina en rojo; núcleos en azul con DAPI).

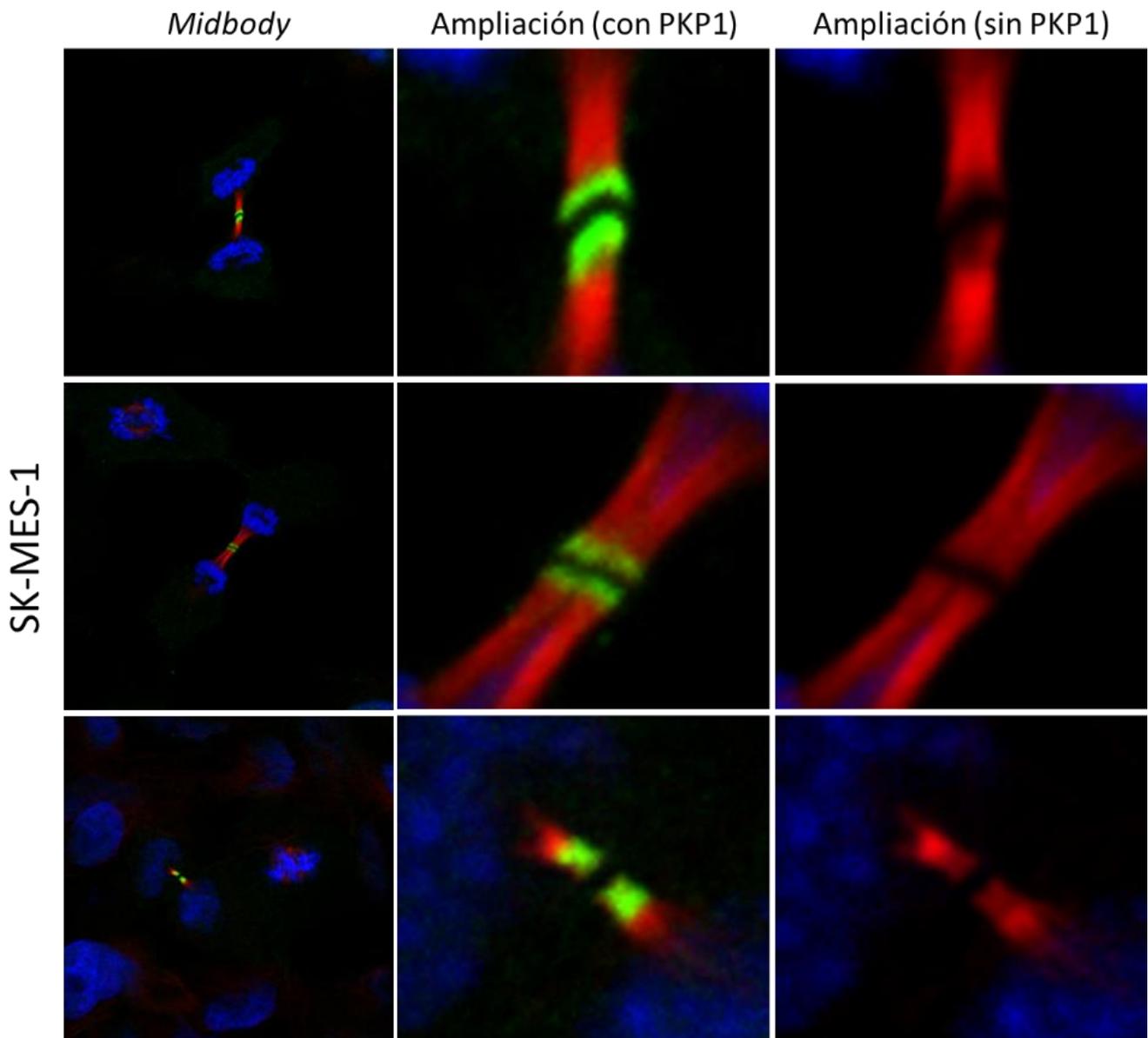


Figura 108. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 sin tratar, fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI, α -tubulina con anti-mouse ALEXA 555 y PKP1 con anti-rabbit ALEXA 488. Se aprecian los *midbodies* y la localización de PKP1 en los mismos (ver ampliaciones). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 2. (PKP1 en verde; α -tubulina en rojo; núcleos en azul con DAPI).

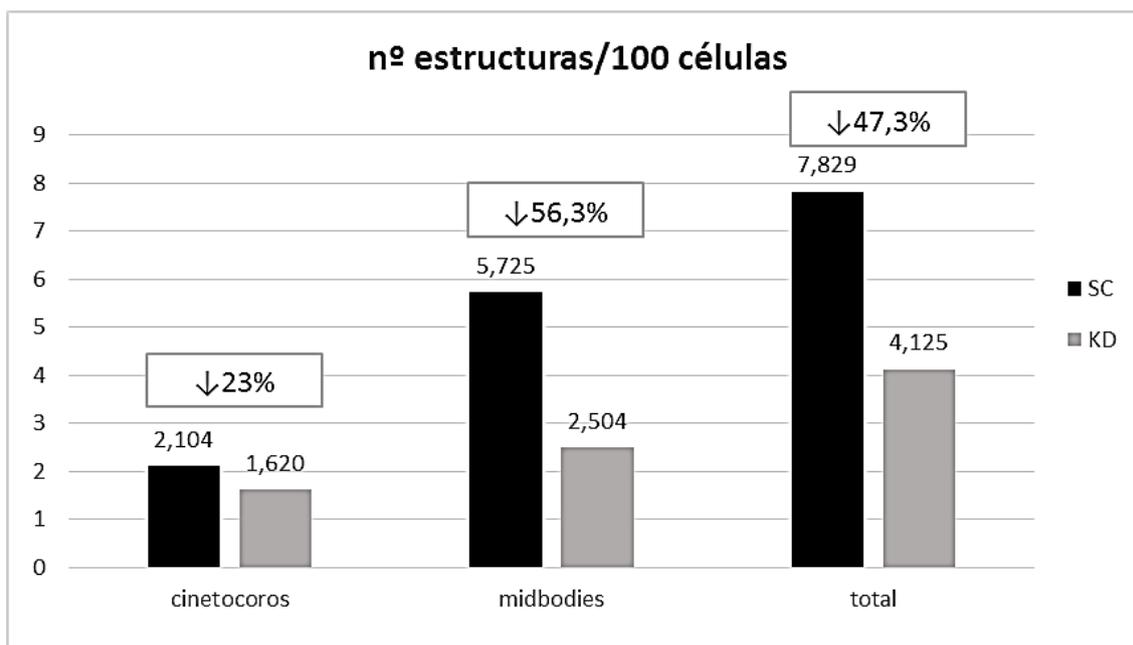


Figura 109. Resultados del conteo manual de *midbodies* y cinetocoros en 50 campos de células SK-MES-1 silenciadas para *Pkp1*. Todos los datos fueron normalizados conforme al número de células totales, y representados como ratio de nº estructuras/100 células. Las diferencias de frecuencia de estructuras respecto al control se muestran como porcentajes. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

Por otro lado, células de la línea SK-MES-1 fueron transducidas lentiviralmente mediante 3 ciclos utilizando para ello, o bien el plásmido vector vacío pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro EV (control o EV, del inglés *Empty Vector*), o bien el plásmido vector pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro, el cual contiene la secuencia de PKP1A-Myc-DDK-EGFP en lugar de AcGFP1.

Posteriormente fueron seleccionadas durante 4 días con 2µg/mL de puomicina y marcadas mediante técnicas inmunocitoquímicas combinando la fluorescencia propia de EGFP, la cual se encontraba fusionada a PKP1-Myc-DDK por el extremo carboxilo-terminal de DDK, y un anticuerpo contra α -tubulina.

Las imágenes de inmunofluorescencia resultantes mostraron una alta autofluorescencia de los *midbodies* y cierto marcaje nuclear inespecífico, incluso en las muestras control donde el gen reportero AcGFP se hallaba libre sin ser fusionado a ninguna proteína (Fig. 110). Debido a ello, las mismas células fueron marcadas nuevamente combinando la fluorescencia propia de EGFP con un anticuerpo contra α -tubulina y otro contra GFP, el cual es capaz de reconocer la variante EGFP.

El anticuerpo anti-GFP fue capaz de reconocer el gen reportero EGFP fusionado a PKP1A en los *midbodies* de las muestras transducidas con el plásmido vector pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro y no en aquellas transducidas con el plásmido vector vacío (control o EV, del inglés *Empty Vector*), lo cual demuestra la presencia de PKP1A en dichas estructuras (Fig. 111 y 112).

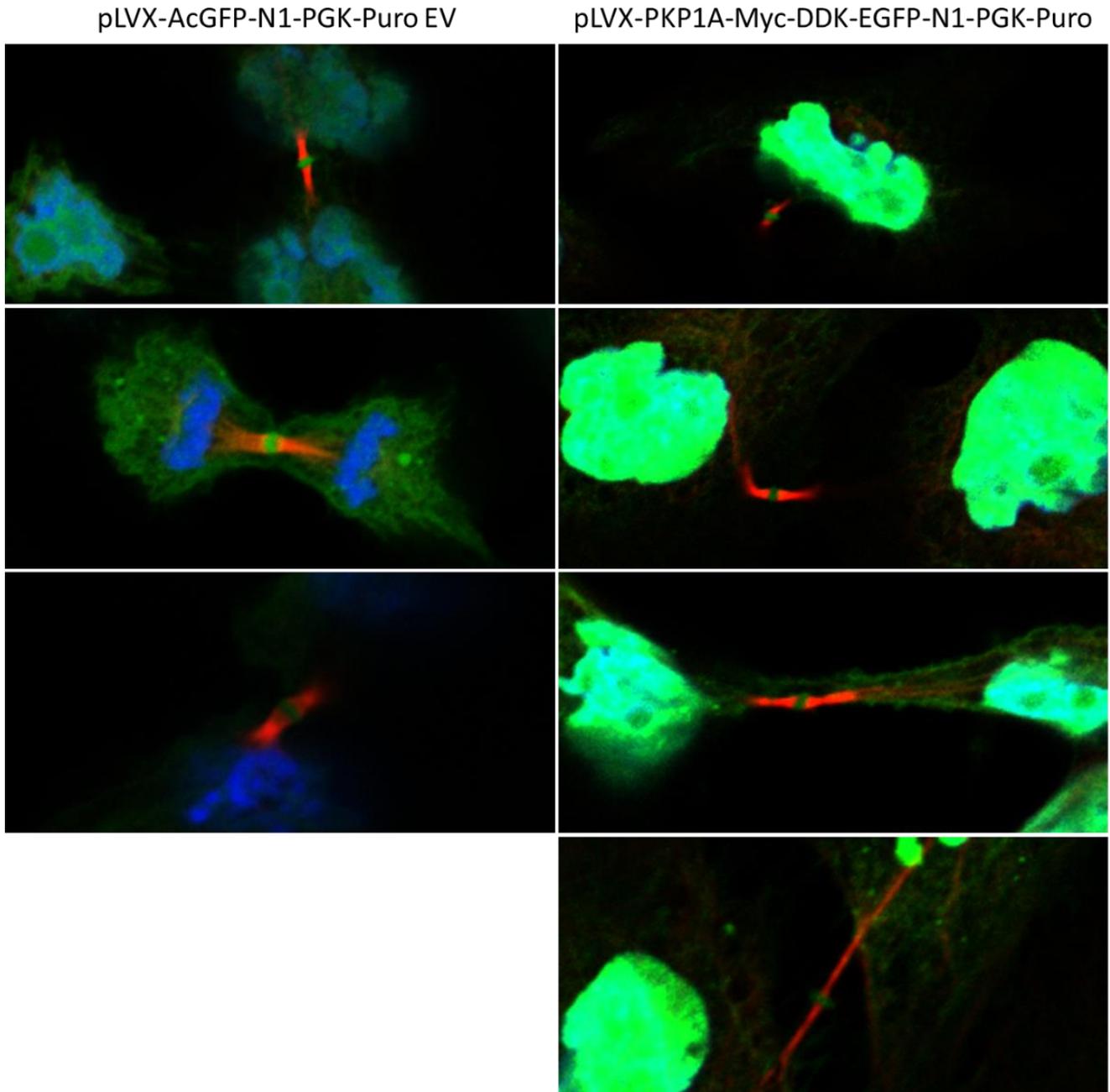


Figura 110. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 transducidas bien con un plásmido vector control (izquierda), bien con un plásmido vector que contenía la construcción PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP (derecha). Las muestras fueron fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI y α -tubulina con anti-mouse ALEXA 555. Se aprecia una alta autofluorescencia en los *midbodies*. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 2. (PKP1 en verde; α -tubulina en rojo; núcleos en azul con DAPI).

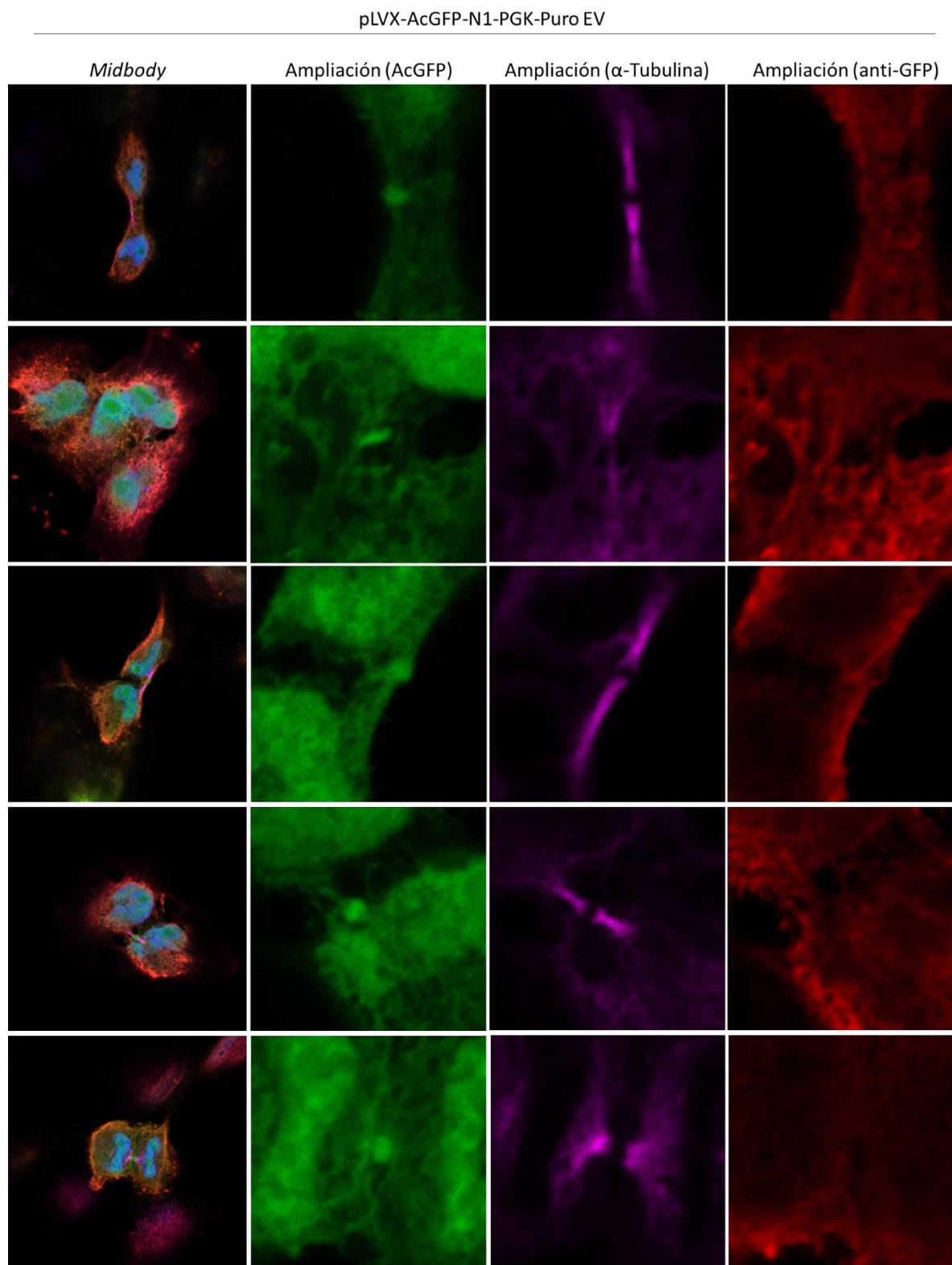


Figura 111. Imágenes de microscopía confocal de células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector control pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro EV, fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI, α -tubulina con anti-mouse ALEXA 647 y anti-GFP con anti-rabbit ALEXA 555. Se aprecia una alta autofluorescencia verde en los *midbodies*, la cual no se corresponde con la tinción de GFP y cierto marcaje nuclear inespecífico (ver ampliaciones). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 2. (AcGFP en verde; α -tubulina en magenta, GFP en rojo; núcleos en azul con DAPI).

pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro

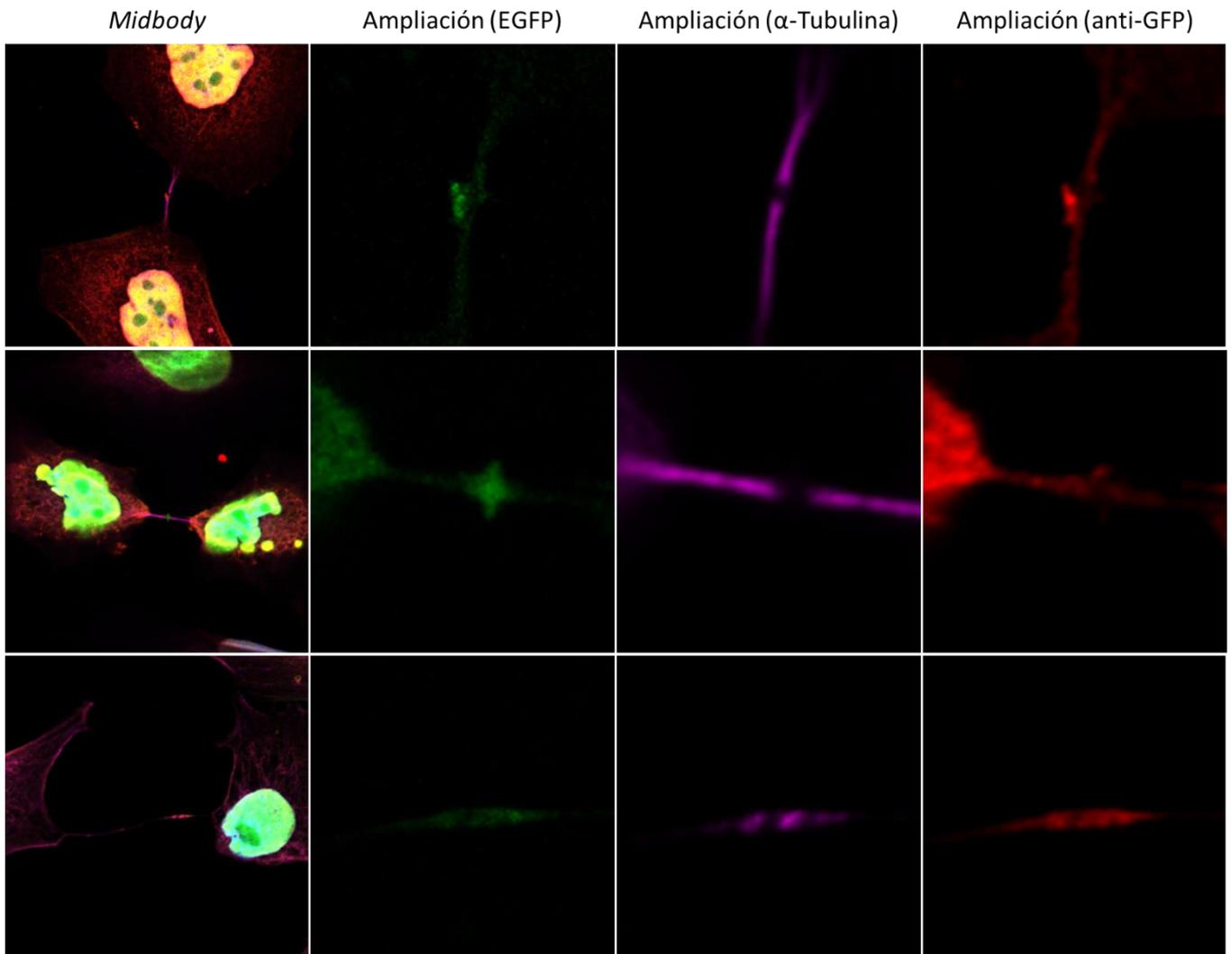


Figura 112. Imágenes de microscopía confocal de la proteína PKP1A fusionada a EGFP en células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro, fijadas y sometidas a una tinción nuclear con DAPI, α -tubulina con anti-mouse ALEXA 647 y anti-GFP con anti-rabbit ALEXA 555. Se aprecia una correlación entre la localización de la señal de PKP1-EGFP y anti-GFP en los *midbodies* y una fuerte localización de PKP1A-EGFP en núcleo (ver ampliaciones). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 2. (EGFP en verde; α -tubulina en magenta, GFP en rojo; núcleos en azul con DAPI).

6.4.12. Ensayo clonogénico

Los ensayos clonogénicos se llevaron a cabo en la línea SK-MES-1 para determinar la capacidad de las células de formar colonias después de haber sido sometidas al silenciamiento génico de *Pkp1*.

Los resultados obtenidos tras 21 días de ensayos se muestran en la Figura 113.

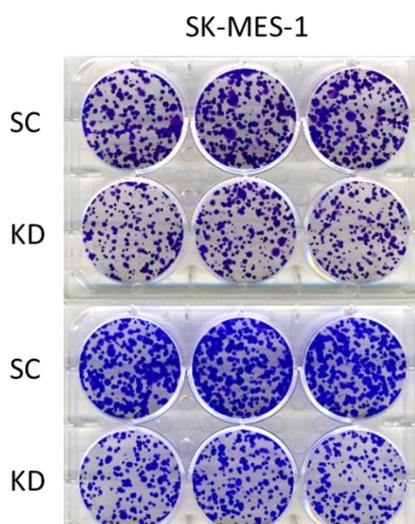


Figura 113. Tinción violeta de los ensayos de formación de colonias en células SK-MES-1 tras 21 días de haber sido transfectadas con siRNA control o siRNA contra *Pkp1*. El experimento se hizo independientemente por duplicado y, a su vez, se realizaron triplicados de cada condición. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

Como puede observarse, la inhibición de *Pkp1* produjo una disminución en el número y tamaño de las colonias formadas, indicando un detrimento en la capacidad de proliferación dependiente de anclaje.

6.4.13. Sobreexpresión de *Pkp1*

6.4.13.1. Transfección de vectores de ADN

Con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos tras el silenciamiento génico de *Pkp1*, se llevó a cabo la sobreexpresión del mismo gen tanto en A549, la cual no expresa niveles endógenos detectables de PKP1, como en SK-MES-1 y EPLC-272H, las cuales son líneas celulares con niveles endógenos considerables.

Para ello, se transfectaron los plásmidos comerciales pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK y pCMV6-Entry-PKP1B-Myc-DDK y el control vacío pCMV6-AC-3DDK, tras lo cual se realizaron WB para la comprobación del éxito de la sobreexpresión (Fig. 114).

Tras varios ensayos de transfección fallidos fue evidente la ineficacia de los plásmidos para la sobreexpresión de las diferentes isoformas de PKP1. Además, se observó una fuerte mortalidad celular tras las transfecciones. Se descartó que dicha citotoxicidad se debiera al agente de transfección (*Lipofectamina 2000*) o a la sobreexpresión de PKP1 propiamente dicha, ya que no se observó mortalidad en los controles “NT” (No Transfectado) y “NT+Lipo” (No Transfectado con adición de *Lipofectamina 2000*) mientras que en la transfección del plásmido control vacío pCMV6-AC-3DDK (EV, del inglés *Empty Vector*) se halló una citotoxicidad similar a la de los plásmidos de sobreexpresión.

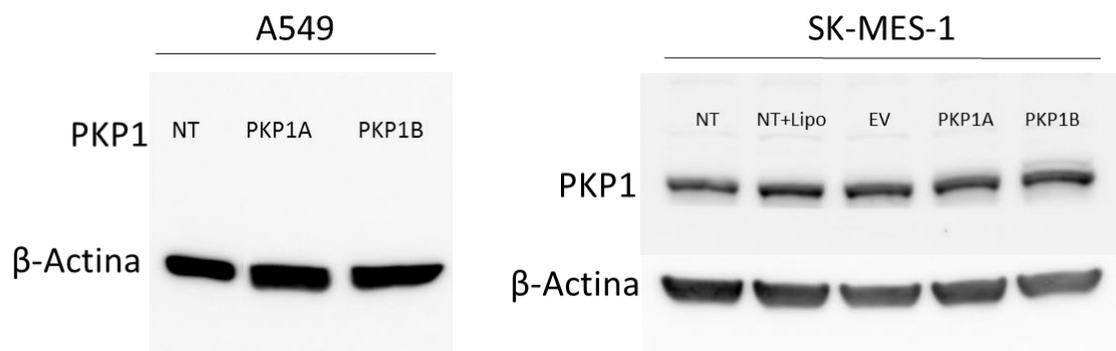


Figura 114. WB de la sobreexpresión génica de *Pkp1* en la línea celular A549 y SK-MES-1 a 24 h y 72 h de incubación, respectivamente. (NT, control No Transfectado; NT+Lipo, control No Transfectado al que se añadió *Lipofectamina 2000* para testar el efecto citotóxico del reactivo de transfección; EV, plásmido vacío control pCMV6-AC-3DDK; PKP1A, células transfectadas con el plásmido pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK; PKP1B, células transfectadas con el plásmido pCMV6-Entry-PKP1B-Myc-DDK).

6.4.13.1.1. Eficiencia de transfección

A la vista de los malogrados resultados de transfección de plásmidos de sobreexpresión, se realizaron ensayos para testar la eficiencia de transfección en las líneas modelo SK-MES-1 y EPLC-272H, y HEK 293T, una línea control de fácil transfección.

Para ello, se transfectaron distintas cantidades de ADN de los plásmidos pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK, el control vacío pCMV6-AC-3DDK y el control de transfección msCMV-PURO-IRES-GFP, el cual contiene el gen reportero EGFP.

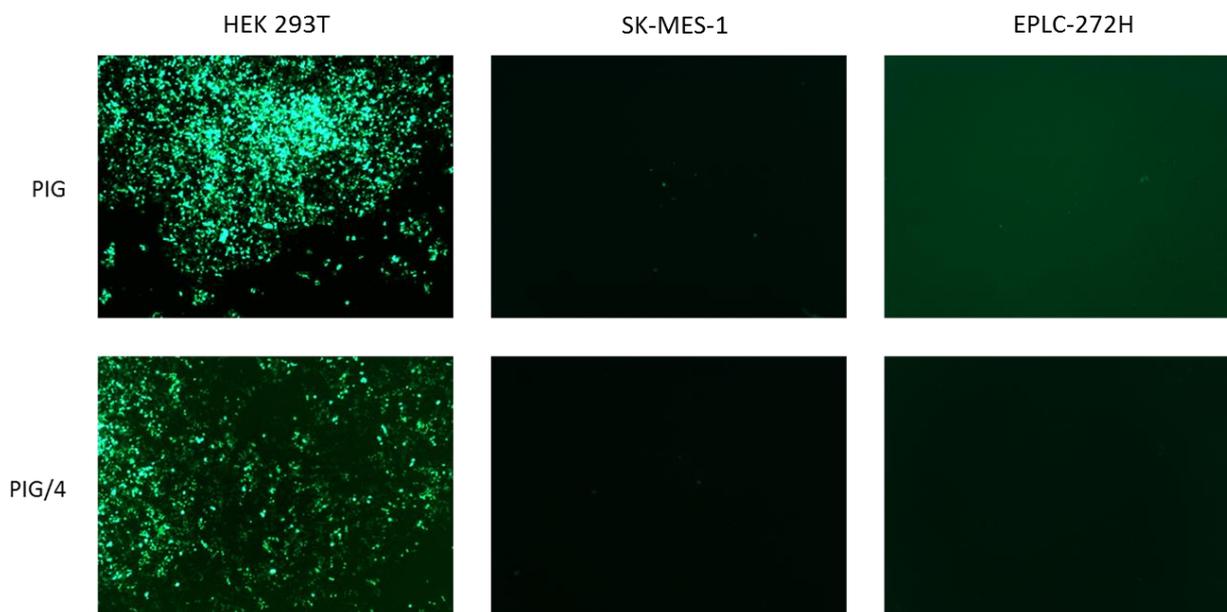


Figura 115. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la eficiencia de transfección del plásmido msCMV-PURO-IRES-GFP. Las imágenes fueron adquiridas a 5x. (PIG, células transfectadas con 0,8 μ g/pocillo de msCMV-PURO-IRES-GFP; PIG/4, células transfectadas con 0,2 μ g/pocillo de msCMV-PURO-IRES-GFP).

Transcurridas 48 h se visualizaron las células al microscopio y los resultados de fluorescencia (Fig. 115) mostraron una alta eficiencia de transfección para HEK 293T, aunque para las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H la eficiencia fue menor al 5%.

Por otro lado, apenas se apreciaron efectos citotóxicos en la transfección de la línea HEK 293T, mientras que en las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H hubo una alta mortalidad celular incluso con bajas cantidades de ADN plasmídico del control vacío pCMV6-AC-3DDK (Fig. 116).

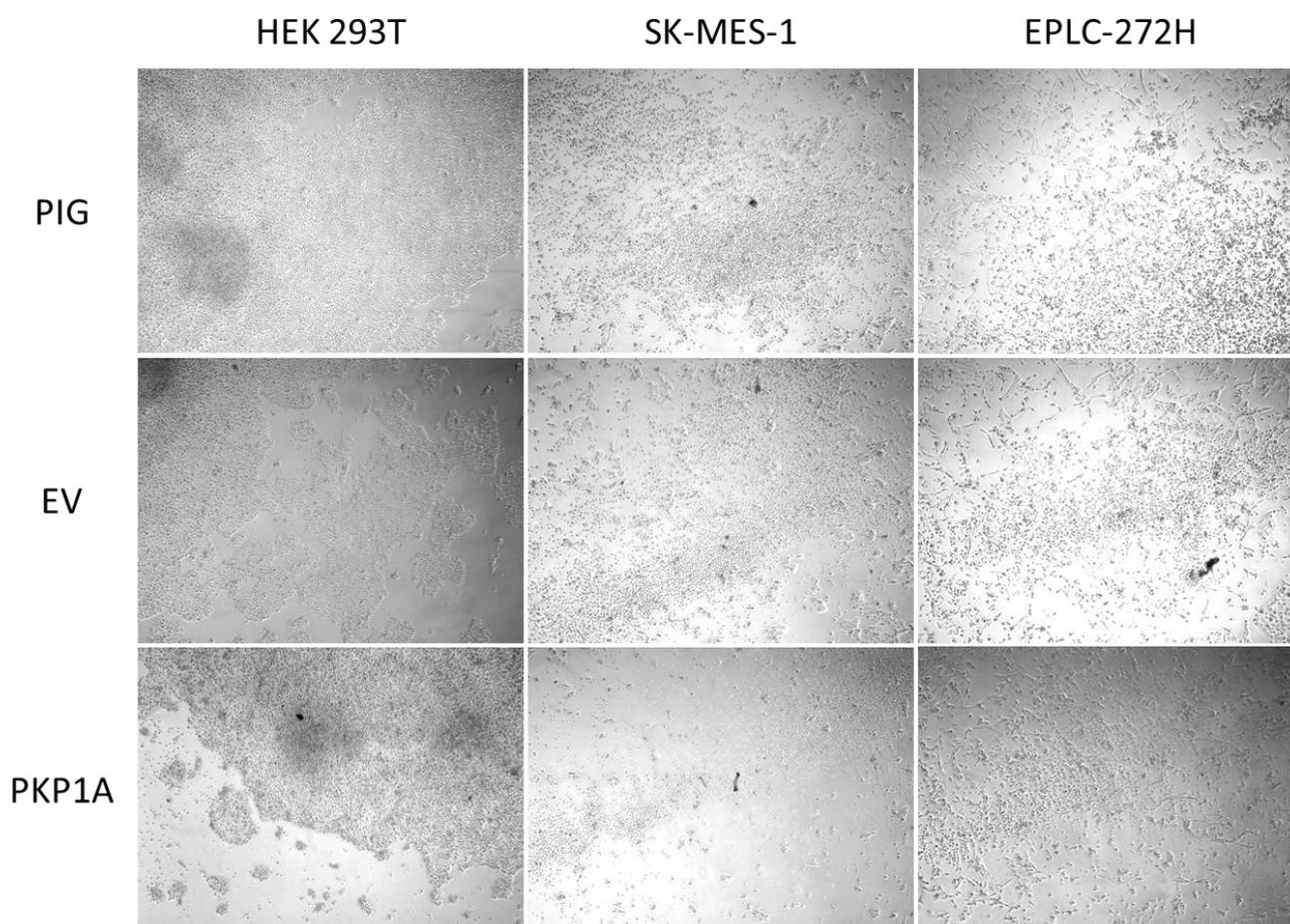


Figura 116. Imágenes de microscopía de contraste de fases donde se observa la citotoxicidad de las transfecciones ensayadas. Las imágenes fueron adquiridas a 5x. (PIG, células transfectadas con 0,8 μg /pocillo de msCMV-PURO-IRES-GFP; EV, células transfectadas con 0,2 μg /pocillo de pCMV6-AC-3DDK; PKP1A, células transfectadas con 0,2 μg /pocillo de pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK).

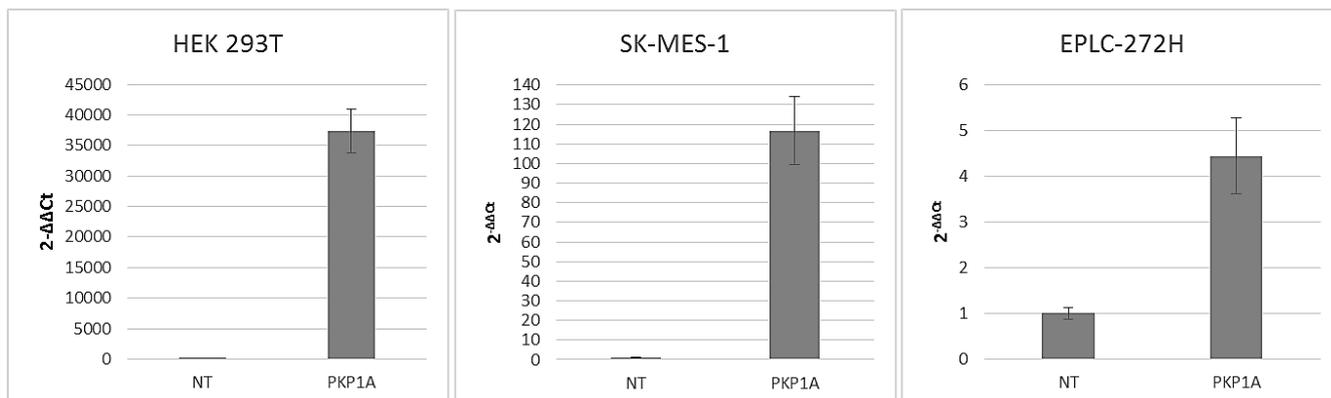


Figura 117. Niveles de expresión relativa de *Pkp1* (FC calculado con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$) en líneas celulares transfectadas. (NT, control No Transfectado; PKP1A, células transfectadas con el plásmido pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK).

A pesar de la baja eficiencia de transfección y la alta citotoxicidad, los resultados de qPCR mostraron un incremento en los niveles de expresión relativa de *Pkp1a*. Este incremento fue más evidente en la línea HEK 293T por su facilidad de transfección en comparación con SK-MES-1 y EPLC-272H. Ésta última fue la que mostró un menor incremento de la expresión, lo que se interpreta como una mayor resistencia de la línea EPLC-272H a ser transfectada en comparación con SK-MES-1 (Fig. 117).

6.4.14. Transducción lentiviral

A tenor de la ineficacia de los sistemas de transfección de vectores para la sobreexpresión de PKP1 en las líneas modelo seleccionadas, se optó por sistemas de transducción lentiviral tanto para sobreexpresar PKP1, como para producir un silenciamiento génico permanente del mismo mediante la metodología shRNA.

En cuanto a la sobreexpresión de PKP1, se realizaron transfecciones lentivirales de la línea H2170, la cual no expresa niveles endógenos detectables de *Pkp1*, utilizando los vectores pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A y el control vacío pLVX-IRES-ZsGreen1 EV (EV, del inglés *Empty Vector*). Se eligió la isoforma "a" por ser la isoforma presente en las líneas celulares modelo y en las muestras de tejido pulmonar sano testadas.

Para testar el funcionamiento del sistema pLVX-IRES-ZsGreen1, en primer lugar se analizaron mediante citometría de flujo los porcentajes de eficiencia de transducción en células H2170 tras 4 y 9 días desde la transducción. Los porcentajes de eficiencia (Tabla 69, Fig. 118) fueron mayores en las muestras control (EV) en comparación a las muestras sobreexpresadas (PKP1A), aunque en todos los casos hubo al menos un 70% aproximadamente de células positivamente transducidas. Este porcentaje aumentó con el transcurso del tiempo, indicando un aumento de la expresión de los insertos.

Línea celular	Vector	Inserto	% Eficiencia	
			4 días	9 días
H2170	pLVX-IRES-ZsGreen1	EV	86,5	92,5
		PKP1A	67	68,9

Tabla 69. Porcentajes de eficiencia de transducción de la línea H2170 con pLVX-IRES-ZsGreen1 EV y pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 4 y 9 días de transducción. (EV, del inglés *Empty Vector*).

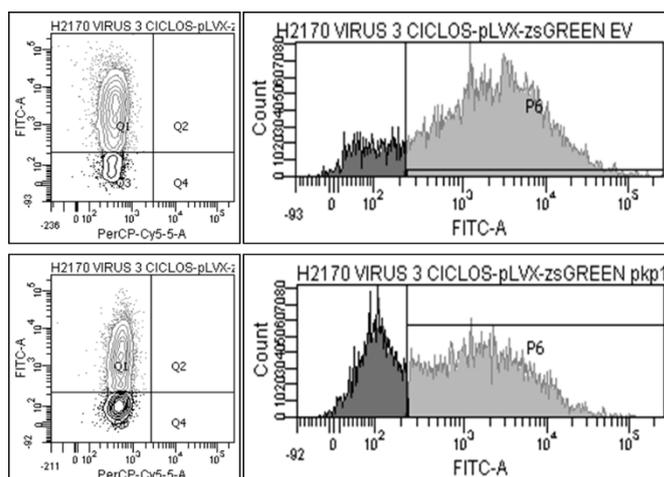


Figura 118. Gráficas de nubes de puntos e histogramas producidos por el software *FACSDiva* que muestran el número de eventos según la intensidad de señal de ZsGREEN1 en células H2170. Se presentan las muestras control EV (arriba) y las muestras sobreexpresando *Pkp1* (abajo). Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 4 y 9 días de transducción. (EV, del inglés *Empty Vector*).

Las células transducidas fueron, además, visualizadas al microscopio tras 7 días de la transducción y los resultados de fluorescencia (Fig. 119) corroboraron la alta eficiencia de transducción obtenida por citometría.

H2170

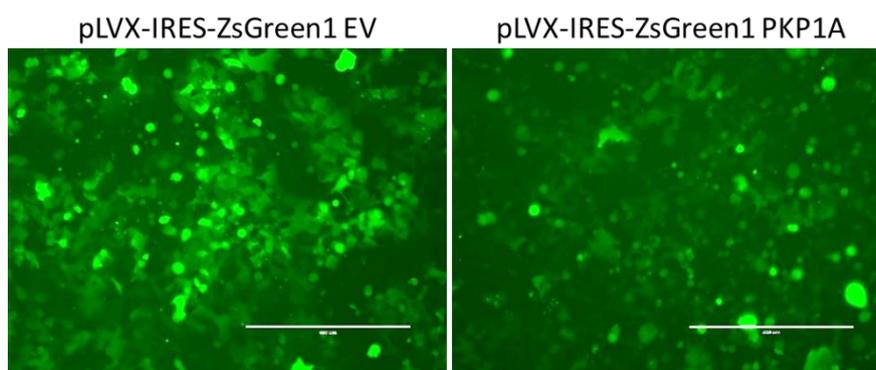


Figura 119. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la eficiencia de transducción de pLVX-IRES-ZsGreen1 EV y pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A. Las imágenes fueron adquiridas a 10x. (EV, del inglés *Empty Vector*).

En segundo lugar, el funcionamiento del sistema pLVX-IRES-ZsGreen1 fue testado mediante el análisis de los niveles de expresión de PKP1 por qPCR y WB (Fig. 120). Los resultados de estos experimentos mostraron que una alta sobreexpresión de *Pkp1*, con niveles de FC de 107,57 (T de Student, $p = 0,0089$) en la qPCR y la clara aparición de una banda en el WB.

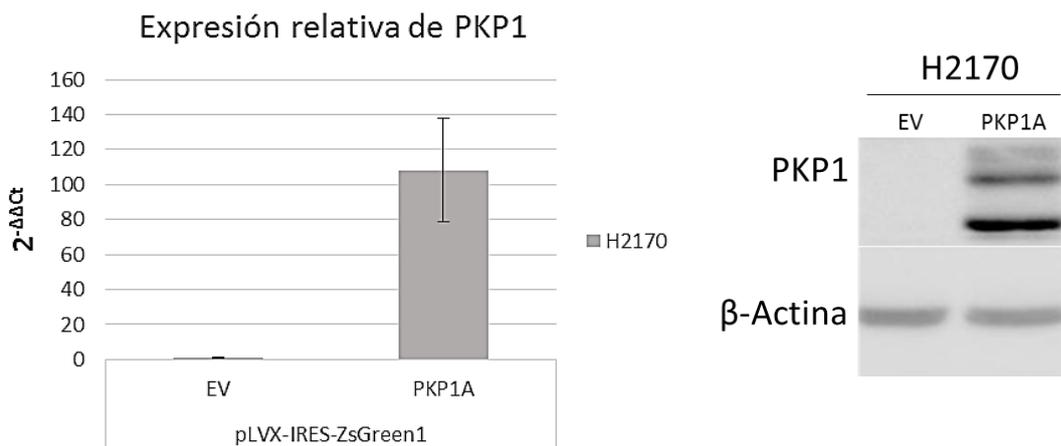


Figura 120. qPCR (izquierda) y WB (derecha) de la sobreexpresión de *Pkp1* en la línea celular H2170 mediante la transducción de pLVX-IRES-ZsGreen1 EV y pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A. (EV, del inglés *Empty Vector*).

Una vez testado el sistema con buenos resultados, se transdujeron células de H2170 y se llevaron a cabo los ensayos de viabilidad celular (MTT) por triplicado y durante un periodo de 48 h (Fig. 121). La sobreexpresión de *Pkp1a* produjo un incremento medio del 30,3% de proliferación celular en la línea H2170. Estos resultados fueron altamente significativos (T de Student, $p = 0,0001$).

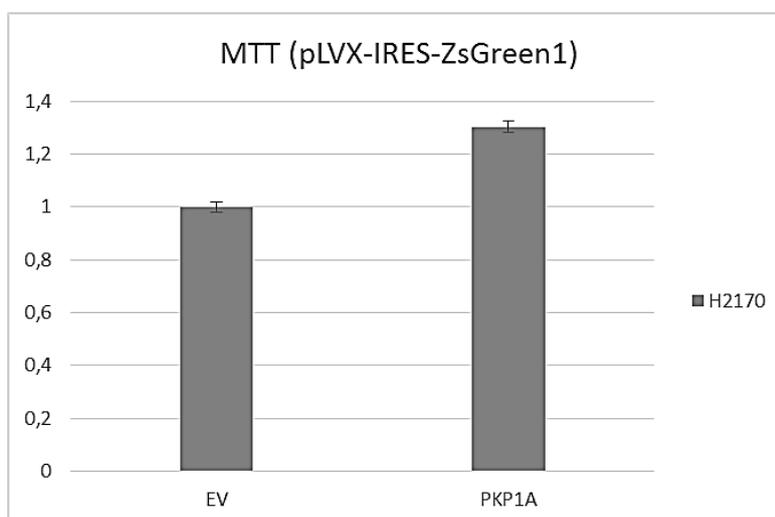


Figura 121. Ensayos de viabilidad celular mediante MTT en H2170 sobreexpresando *Pkp1a*. Todos los datos de absorbancia se han representado normalizados en tanto por uno \pm SD con respecto al control a los datos correspondientes a $t = 0$ h. (EV, células transducidas con pLVX-IRES-ZsGreen1 EV; PKP1A, células transducidas con pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A).

En relación al silenciamiento génico permanente de *Pkp1*, se eligió el vector lentiviral inducible por doxiciclina pLVPT-tTR-KRAB en el cual se había clonado un shRNA de *Pkp1* y otro control SC (SC, control *Scramble*). El sistema fue probado en las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H, utilizando en ocasiones la línea HEK 293T como control.

Los porcentajes de eficiencia de transducción para cada línea, obtenidos tras 5 días desde la transducción, los 3 últimos de ellos conteniendo doxiciclina en el medio, se muestran en la Tabla 70. Los porcentajes de eficiencia fueron mayores en las muestras control en comparación a las muestras silenciadas, y en ningún caso superaron el 20% de células positivamente transducidas.

Línea celular	Vector	Inserto	DOX [1 µg/mL]	% Eficiencia
SK-MES-1	pLVPT-tTR-KRAB	shRNA SC	-	0,7
			+	18,1
		shRNA PKP1	-	0,5
			+	13,1
EPLC-272H	pLVPT-tTR-KRAB	shRNA SC	-	0,5
			+	20
		shRNA PKP1	-	0,4
			+	13,9

Tabla 70. Porcentajes de eficiencia de transducción de las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H con pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC y pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-PKP1. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 5 días de transducción. Las células estuvieron en contacto con doxiciclina los 3 días previos a la citometría. (SC, control shRNA *Scramble*).

A pesar de que en las muestras control sin doxiciclina existió una leve expresión remanente (más conocido por el término inglés *leaking*) producida por la ausencia de una represión total del sistema, la adición de doxiciclina produjo en todos los casos un incremento de la expresión del shRNA correspondiente. Este incremento fue determinado mediante la cuantificación de la señal de EGFP por citometría (Fig. 122) y en ningún caso superó el 20%, como se ha mencionado.

Por otro lado, se analizaron mediante qPCR los niveles de expresión de las muestras silenciadas para *Pkp1* (transducidas con pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-PKP1 y en presencia de doxiciclina). Estos niveles de expresión fueron normalizados con respecto a las muestras control (transducidas con pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC y en presencia de doxiciclina). Además, para salvar el efecto *leaking*, los datos se calibraron con sus respectivas muestras sin doxiciclina.

Los resultados (Fig. 123) mostraron una inhibición de *Pkp1* del 71,5% en SK-MES-1 y del 64% en EPLC-272H. Estos resultados no alcanzaron los niveles de inhibición obtenidos con los siRNAs ni tan siquiera tras la separación celular por citometría de flujo (*Cell Sorting*).

El sistema pLVPT-tTR-KRAB mostró graves inconvenientes en la inducibilidad, mostrando un efecto *leaking* ya comentado, no consiguiendo expresión de los insertos en ocasiones e incluso presentando pérdidas de expresión repentinas. Todo esto, junto al hecho de que el sistema no logró los niveles de inhibición alcanzados con el sistema de siRNA, produjo el abandono de esta construcción y la adopción de otros shRNAs no inducibles como el pLVX-IRES-tdTomato.

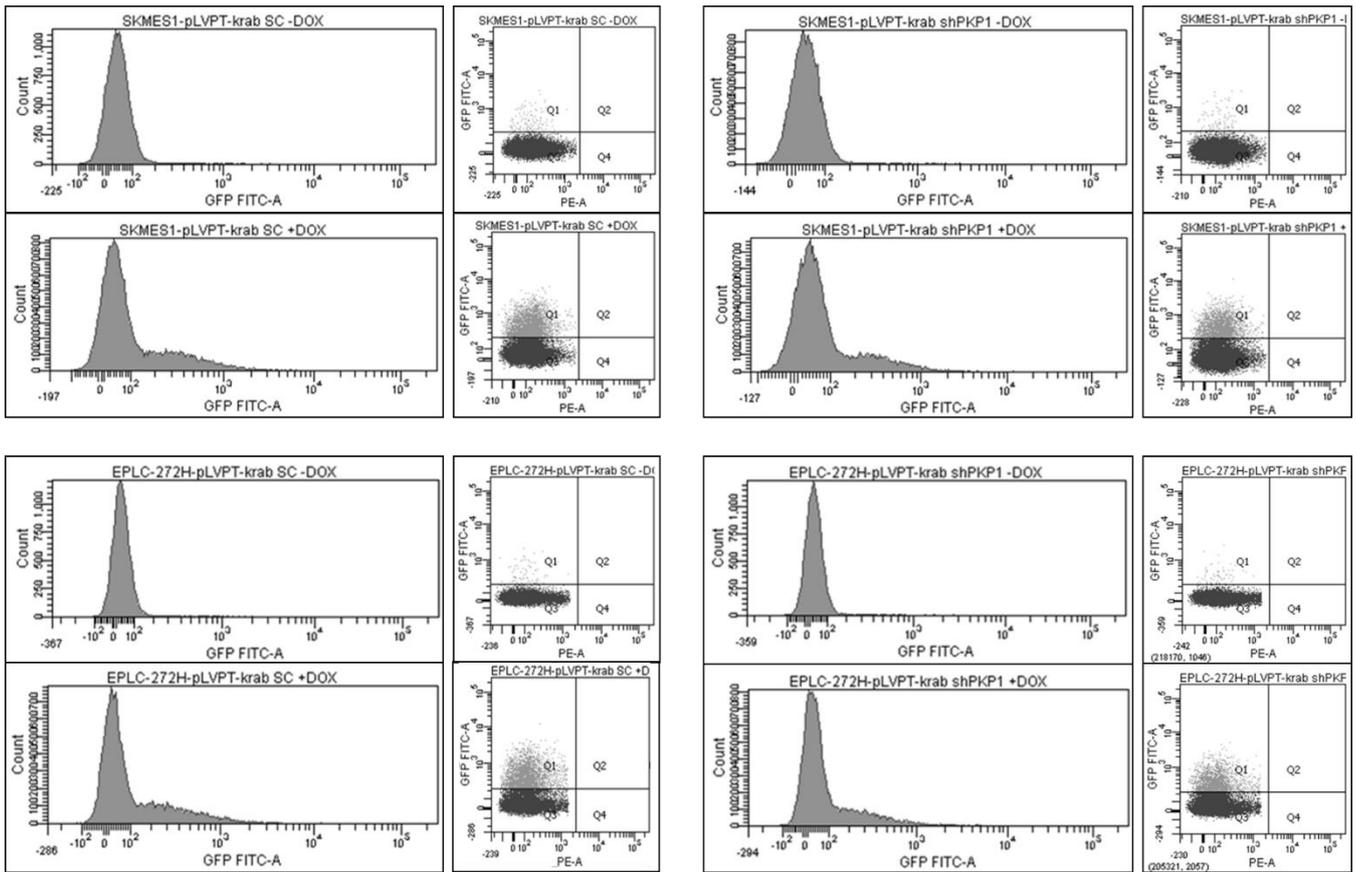


Figura 122. Histogramas y gráficas de nubes de puntos producidos por el software *FACSDiva* representativos que muestran el número de eventos según la intensidad de señal de 7-AAD y EGFP en células SK-MES-1 y EPLC-272H. Se presentan las muestras control SC (izquierda) y las muestras silenciadas con shRNA de *Pkp1*. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 5 días de transducción. Las células estuvieron en contacto con doxiciclina los 3 días previos a la citometría. (SC, shRNA control *Scramble*).

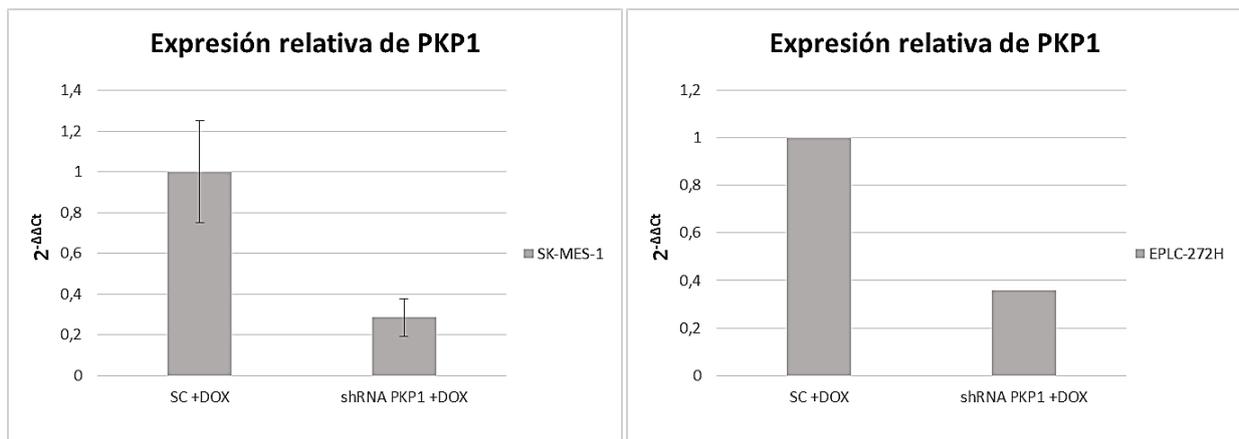


Figura 123. Niveles de expresión relativa de *Pkp1* (FC calculado con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) en líneas celulares transducidas con el sistema pLVPT-tTR-KRAB. Los datos fueron obtenidos tras 5 días de transducción. Las células estuvieron en contacto con doxiciclina los 3 días previos a la citometría. (SC, control shRNA *Scramble*).

Con el fin de testar el plásmido vector pLVX-IRES-tdTomato, se transdujeron células de la línea SK-MES-1 y se analizaron mediante citometría de flujo los porcentajes de eficiencia de transducción tras 4 y 9 días desde la transducción.

Curiosamente y al contrario que en el caso de pLVX-IRES-ZsGreen1, los porcentajes de eficiencia (Tabla 71, Fig. 124) fueron mayores en las muestras silenciadas para PKP1 en comparación a las muestras control, aunque en todos los casos hubo al menos un 75% aproximadamente de células positivamente transducidas. Este porcentaje aumentó con el transcurso del tiempo, indicando un aumento de la expresión de los insertos.

Línea celular	Vector	Inserto	% Eficiencia	
			4 días	9 días
SK-MES-1	pLVX-IRES-tdTomato	sh SC	75	79
		sh PKP1	77	83

Tabla 71. Porcentajes de eficiencia de transducción de la línea SK-MES-1 con pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC (sh SC), pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1 (sh PKP1). Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 4 y 9 días de transducción. (SC, shRNA control *Scramble*).

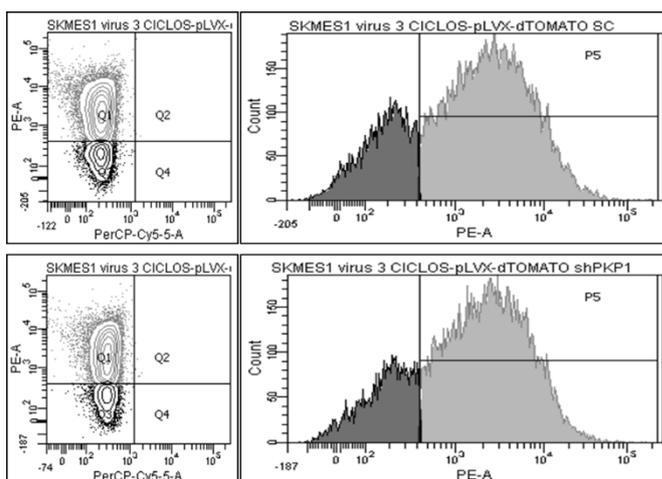


Figura 124. Gráficas de nubes de puntos e histogramas producidos por el software *FACSDiva* que muestran el número de eventos según la intensidad de señal de tdTomato en células SK-MES-1. Se presentan las muestras control SC (arriba) y las muestras silenciando *Pkp1* (abajo). Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 4 y 9 días de transducción. (SC, shRNA control *Scramble*).

Las células transducidas fueron, además, visualizadas al microscopio tras 7 días de la transducción y los resultados de fluorescencia (Fig. 125) corroboraron la alta eficiencia de transducción obtenida por citometría, aunque en este caso la intensidad de señal fue mayor en el control.

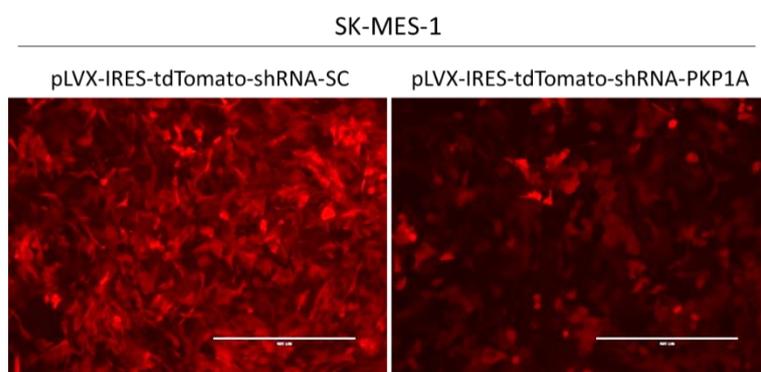


Figura 125. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la eficiencia de transducción de pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC y pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1A. Las imágenes fueron adquiridas a 10x. (SC, shRNA control *Scramble*).

Posteriormente y de manera análoga al procedimiento seguido para pLVX-IRES-ZsGreen1, el funcionamiento del sistema pLVX-IRES-tdTomato fue testado mediante el análisis de los niveles de expresión de PKP1 por qPCR y WB (Fig. 126).

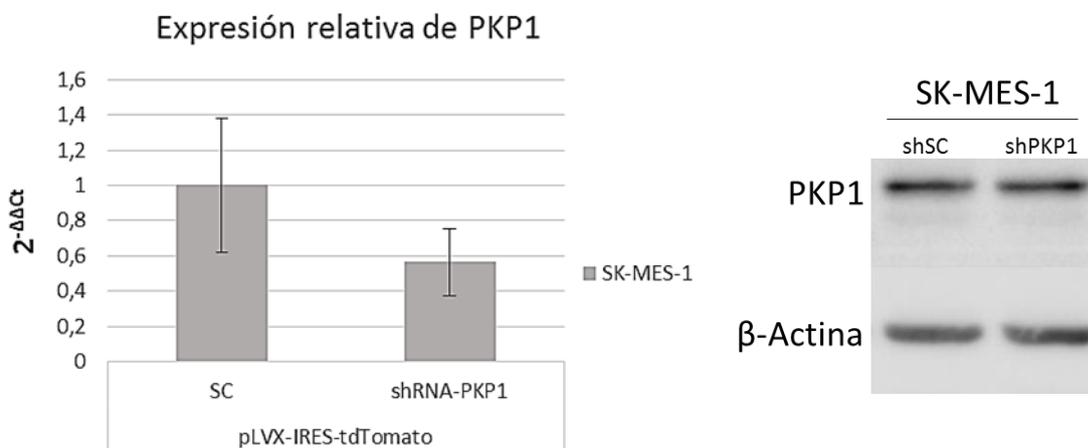


Figura 126. qPCR (izquierda) y WB (derecha) del silenciamiento de *Pkp1* en la línea celular SK-MES-1 mediante la transducción de pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC y pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1. (SC, shRNA control *Scramble*).

Los resultados de estos experimentos mostraron que una inhibición de *Pkp1* del 43,4% en la qPCR mientras que en los resultados del WB no se apreciaron cambios.

6.4.15. Ensayo de competencia de crecimiento celular

Con el objetivo de detectar pequeños cambios en la tasa de proliferación de células SK-MES-1 transducidas con vectores lentivirales para el silenciamiento de *Pkp1* en comparación con células SK-MES-1 transducidas para la sobreexpresión del mismo gen, se realizó un ensayo de competencia de crecimiento celular entre las mismas en una proporción 1:1.

6.4.15.1. Separación celular por citometría de flujo (Cell Sorting)

Transcurridos 5 días de la transducción con los plásmidos pLVX-IRES-ZsGreen1 EV, pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A, pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC y pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1, se procedió a comprobar la eficiencia de la transducción mediante citometría de flujo. Los porcentajes de eficiencia (Tabla 72, Fig. 127) fueron escasos, excepto en la muestra control pLVX-IRES-ZsGreen1 EV (68,2% de eficiencia). Sin embargo, en todos los casos hubo al menos un 10% aproximadamente de células positivamente transducidas.

Línea celular	Vector	Inserto	% Eficiencia
SK-MES-1	pLVX-IRES-tdTomato	sh SC	11,4
		sh PKP1	12,4
	pLVX-IRES-ZsGreen1	EV	68,2
		PKP1A	16,3

Tabla 72. Porcentajes de eficiencia de transducción de la línea SK-MES-1 con pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC, pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1, pLVX-IRES-ZsGreen1 EV y pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 5 días de transducción. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

SK-MES-1

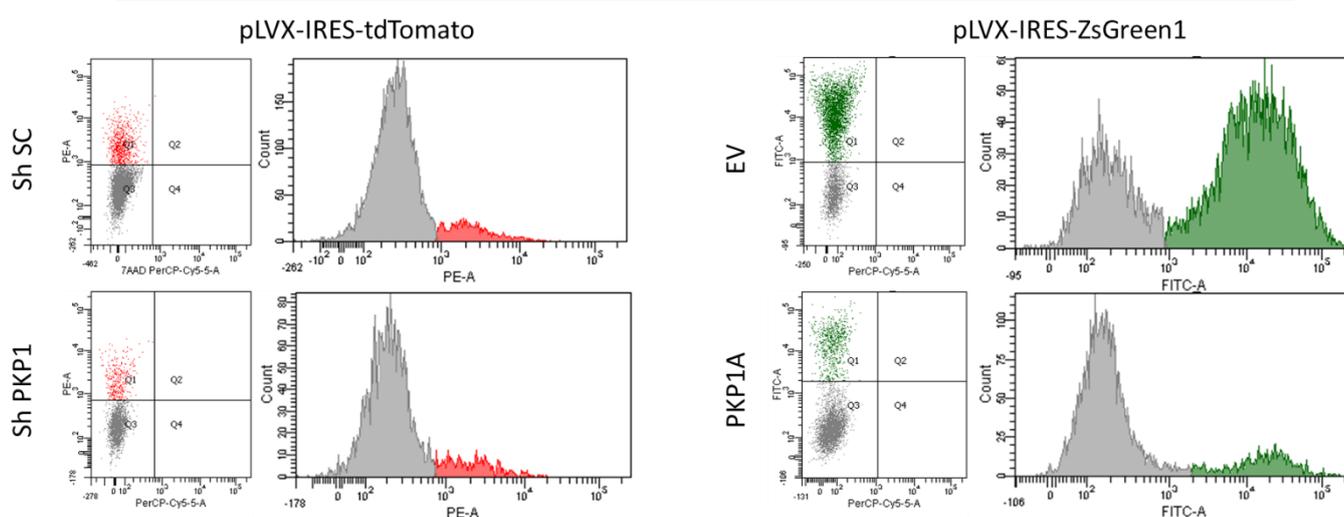


Figura 127. Gráficas de nubes de puntos e histogramas producidos por el software *FACSDiva* que muestran el número de eventos según la intensidad de señal de tdTomato (izquierda) y ZsGREEN1 (derecha) en células SK-MES-1. Se presentan las muestras control EV y sh SC (arriba) y las muestras silenciando y sobreexpresando *Pkp1* (abajo). Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 4 y 9 días de transducción. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

A continuación, se procedió a separar las poblaciones ZsGreen1 y tdTomato positivas mediante citometría de flujo (*Cell Sorting*). En consecuencia con los porcentajes de eficiencia de transducción, los porcentajes de eficiencia de *cell sorting* (Tabla 73) fueron también reducidos, excepto en la muestra control pLVX-IRES-ZsGreen1 EV (41,9% de eficiencia). Se recogieron en torno a 400.000 células positivamente transducidas para pLVX-IRES-ZsGreen1 EV, 280.000 células para pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A y 150.000 para pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC y pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1. Por ello, las células aisladas fueron sembradas para su expansión durante 7 días.

Línea celular	Vector	Inserto	% Eficiencia <i>sorting</i>
SK-MES-1	pLVX-IRES-tdTomato	sh SC	5,3
		sh PKP1	3,6
	pLVX-IRES-ZsGreen1	EV	41,9
		PKP1A	10,9

Tabla 73. Porcentajes de eficiencia de *cell sorting* de la línea SK-MES-1 con pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC, pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1, pLVX-IRES-ZsGreen1 EV y pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 5 días de transducción. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

6.4.15.2. Mezcla de poblaciones

Transcurridos 7 días de la separación de las poblaciones mediante citometría de flujo (*Cell Sorting*), las células estuvieron suficientemente expandidas y se calculó el porcentaje de células positivas en las poblaciones aisladas de nuevo por citometría. Los porcentajes de células positivas (Tabla 74, Fig. 128) fueron considerablemente mayores que los obtenidos tras la transducción y el *cell sorting*, con al menos un 55% aproximadamente de células positivamente transducidas.

Línea celular	Vector	Inserto	% Eficiencia
SK-MES-1	pLVX-IRES-tdTomato	sh SC	65,2
		sh PKP1	71,8
	pLVX-IRES-ZsGreen1	EV	85,3
		PKP1A	56,3

Tabla 74. Porcentajes de eficiencia de transducción de la línea SK-MES-1 con pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-SC, pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1, pLVX-IRES-ZsGreen1 EV y pLVX-IRES-ZsGreen1-PKP1A. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 12 días de transducción y 7 días de *cell sorting*. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

Posteriormente se procedió a mezclar células ZsGreen1 y tdTomato positivas en una proporción 1:1, utilizando para este cálculo el factor de corrección relativo al porcentaje de células positivas de cada población aislada previamente obtenido (Tabla 74), y se sembraron.

Las cuatro mezclas poblacionales utilizadas se describen en la Tabla 75. En la mezcla 1 se ensayaron células que sobreexpresan *Pkp1a* (verdes) junto con células que sufren un silenciamiento génico del mismo gen (rojas). En las mezclas 2 y 3 se analizaron células que sobreexpresan *Pkp1a* (verdes) y células silenciadas para *Pkp1* (rojas) con los controles del color contrario. Finalmente, en la mezcla 4 se testaron las células control de cada color.

Una vez realizadas las mezclas, inmediatamente se recalculó el porcentaje de células ZsGreen1 y tdTomato positivas por citometría para su comprobación (Tabla 76, Fig. 129), y se consideraron estas condiciones como el punto inicial de las curvas de competencia celular.

SK-MES-1

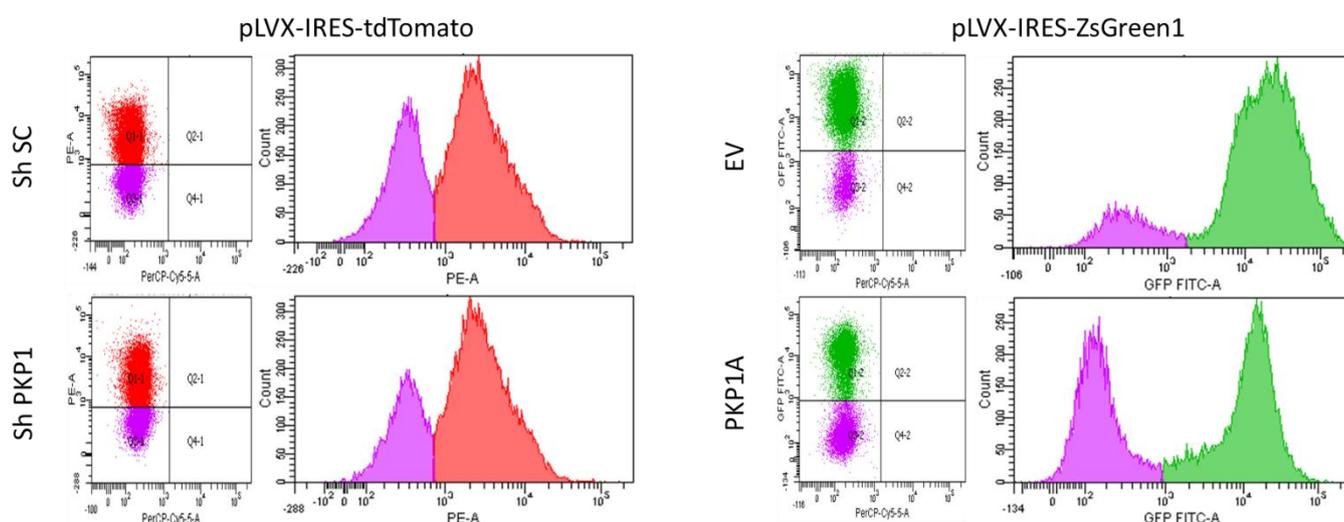


Figura 128. Gráficas de nubes de puntos e histogramas producidos por el software *FACSDiva* que muestran el número de eventos según la intensidad de señal de tdTomato (izquierda) y ZsGREEN1 (derecha) en células SK-MES-1. Se presentan las muestras control EV y sh SC (arriba) y las muestras silenciando y sobreexpresando *Pkp1* (abajo). Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 12 días de transducción y 7 de *cell sorting*. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

	mezcla 1	mezcla 2	mezcla 3	mezcla 4
pLVX-IRES-ZsGreen1 EV			X	X
pLVX-IRES-ZsGreen1 PKP1A	X	X		
pLVX-IRES-tdTomato sh SC		X		X
pLVX-IRES-tdTomato sh PKP1	X		X	

Tabla 75. Mezclas poblacionales utilizadas en el ensayo de competencia celular.

Línea celular	Vector	Inserto	% Células			
			Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4
SK-MES-1	pLVX-IRES-tdTomato	sh SC	-	-	42,4	41,4
		sh PKP1	30,1	27,4	-	-
	pLVX-IRES-ZsGreen1	EV	-	26,2	-	30,9
		PKP1A	25	-	32,9	-
	No transducidas			44,9	46,9	24,7

Tabla 76. Porcentajes de células SK-MES-1 positivas para ZsGreen1 y tdTomato en cada una de las mezclas ensayadas. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 12 días de transducción y 7 días de *cell sorting*. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

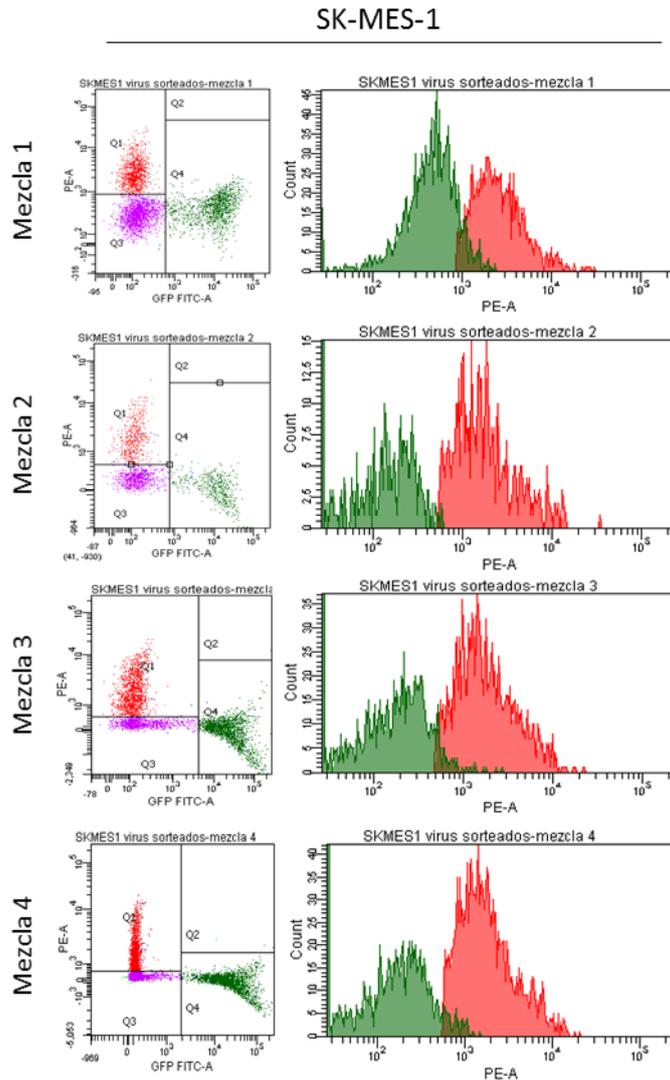


Figura 129. Gráficas de nubes de puntos e histogramas producidos por el software *FACSDiva* que muestran el número de eventos según la intensidad de señal de tdTomato y ZsGREEN1 en cada una de las mezclas ensayadas. Se consideraron estas condiciones como el punto inicial de las curvas de competencia celular. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo tras 12 días de transducción y 7 de *cell sorting*.

(SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

6.4.15.3. Curvas de competencia celular

Tanto las poblaciones aisladas como las mezclas obtenidas, se mantuvieron en cultivo durante un periodo total de 34 días, durante los cuales se analizaron semanalmente los porcentajes de células ZsGreen1 y tdTomato positivas por citometría. En todos los casos quedó un porcentaje de células no transducidas o negativas para ambos genes reporteros.

Las curvas de competencia celular no mostraron en ningún caso cambios en la tasa de proliferación de células transducidas ni para la sobreexpresión ni para el silenciamiento de *Pkp1*.

Tanto las poblaciones aisladas (Fig. 130) como las mezclas o poblaciones mixtas (Fig. 131) se mostraron estables a lo largo del tiempo que duró el ensayo, observándose en ocasiones una leve inversión de las poblaciones en los primeros días posiblemente ocasionados por efectos asociados al *cell sorting*.

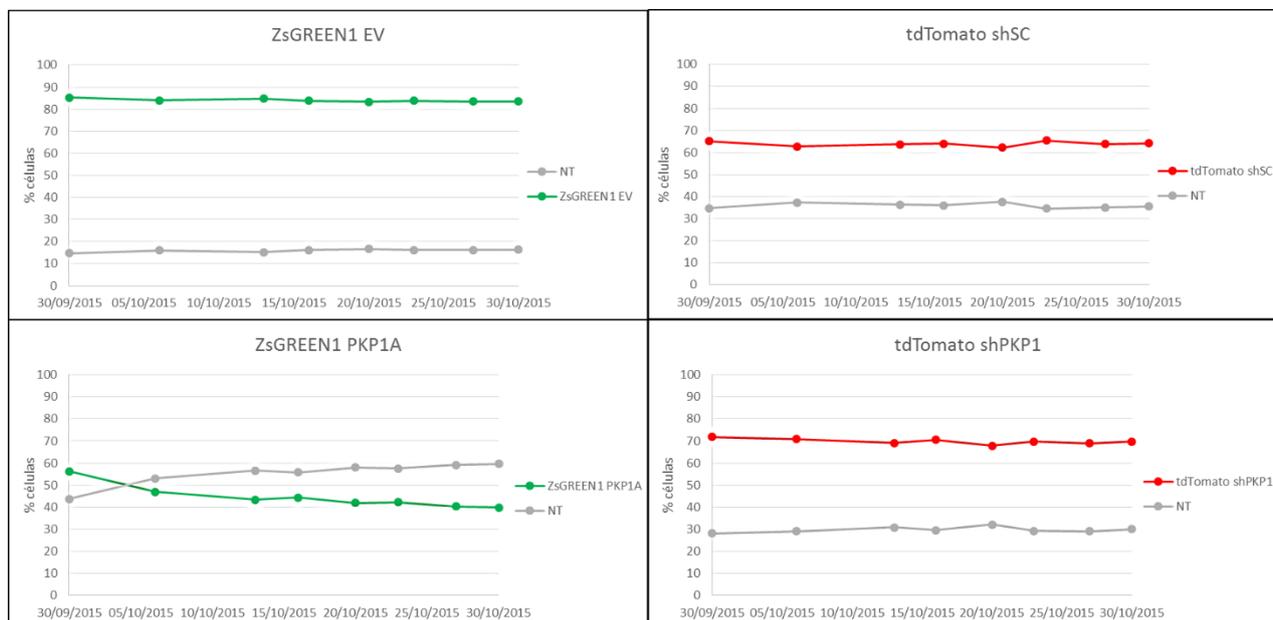


Figura 130. Curvas de competencia celular en poblaciones aisladas de SK-MES-1 que muestran el porcentaje de células positivas para tdTomato y ZsGREEN1. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo durante un total de 34 días. (NT, células No Transducidas).

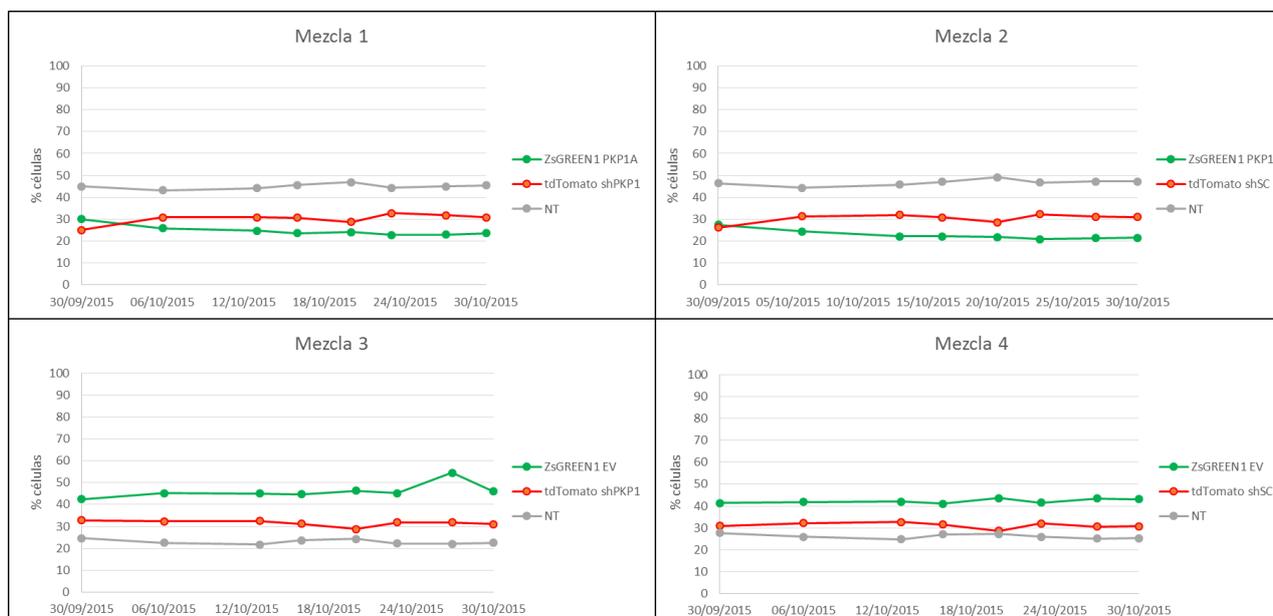


Figura 131. Curvas de competencia celular en poblaciones mixtas de SK-MES-1 que muestran el porcentaje de células positivas para tdTomato y ZsGREEN1. Los datos fueron obtenidos mediante citometría de flujo durante un total de 34 días. (NT, células No Transducidas).

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de los sistemas lentivirales pLVX-IRES-ZsGREEN1 para la sobreexpresión de *Pkp1a* y pLVX-IRES-tdTomato para el silenciamiento de *Pkp1*, se realizaron periódicamente análisis de la expresión génica de *Pkp1* de las poblaciones aisladas por qPCR durante el tiempo que duró el ensayo de competencia (Fig. 132).

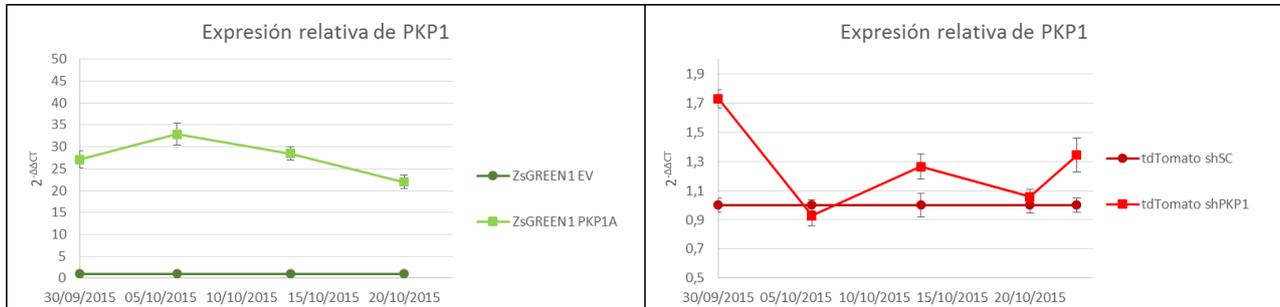


Figura 132. qPCRs de la sobreexpresión de *Pkp1a* con el sistema pLVX-IRES-ZsGREEN1 (izquierda) y del silenciamiento de *Pkp1* con el sistema pLVX-IRES-tdTomato (derecha) en la línea celular SK-MES-1 durante el ensayo de competencia celular. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

Los resultados de qPCR mostraron que el sistema pLVX-IRES-ZsGREEN1 para la sobreexpresión de *Pkp1a* funcionó correctamente, con un nivel mínimo de FC de 22. Sin embargo, el sistema de shRNAs en pLVX-IRES-tdTomato no produjo ningún silenciamiento de *Pkp1*, presentando valores de FC cercanos a los valores de expresión del shRNA control.

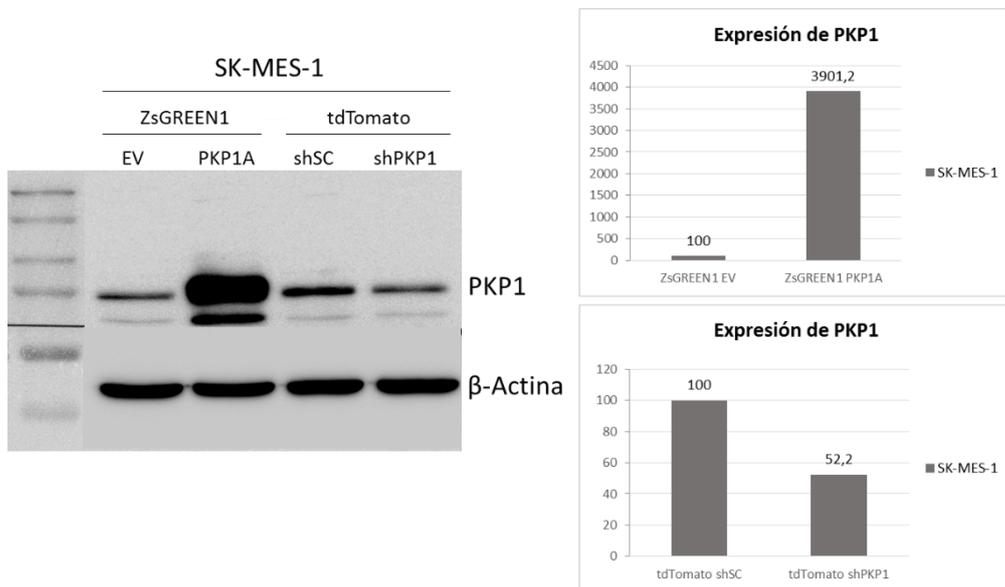


Figura 133. Análisis de la expresión proteica de PKP1 en la línea celular SK-MES-1 tras la sobreexpresión y silenciamiento génico de *Pkp1*. La figura muestra WB (izquierda), y cuantificación relativa de las bandas correspondientes normalizadas de acuerdo a los controles y la expresión de β -Actina (derecha). Los datos fueron obtenidos tras 6 días del *cell sorting*. (SC, shRNA control *Scramble*; EV, del inglés *Empty Vector*).

Sin embargo, los resultados de la expresión proteica de PKP1 mediante WB y cuantificación relativa de las bandas obtenidas mostraron un fuerte incremento en la expresión

de PKP1 con el sistema pLVX-IRES-ZsGREEN1, con un nivel de FC cercano a 40. Por otro lado, el sistema pLVX-IRES-tdTomato produjo un silenciamiento de *Pkp1* del 47,8% (Fig. 133). Estos datos contradicen los obtenidos por qPCR y corroboran el correcto funcionamiento de los sistemas lentivirales.

6.4.16. Ensayos celulares de microscopía *in vivo*

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo con la línea celular SK-MES-1 y utilizando, en todo momento, un sistema de incubación con control de CO₂ y temperatura.

6.4.16.1. Ensayos de silenciamiento génico de *Pkp1*

Los ensayos de microscopía *in vivo* de células SK-MES-1 silenciadas genéticamente para *Pkp1* con la metodología siRNA, se llevaron a cabo por triplicado y se adquirieron imágenes de luz transmitida (DIC) cada 30 minutos durante un periodo total de 17 h 59 min 33 s.

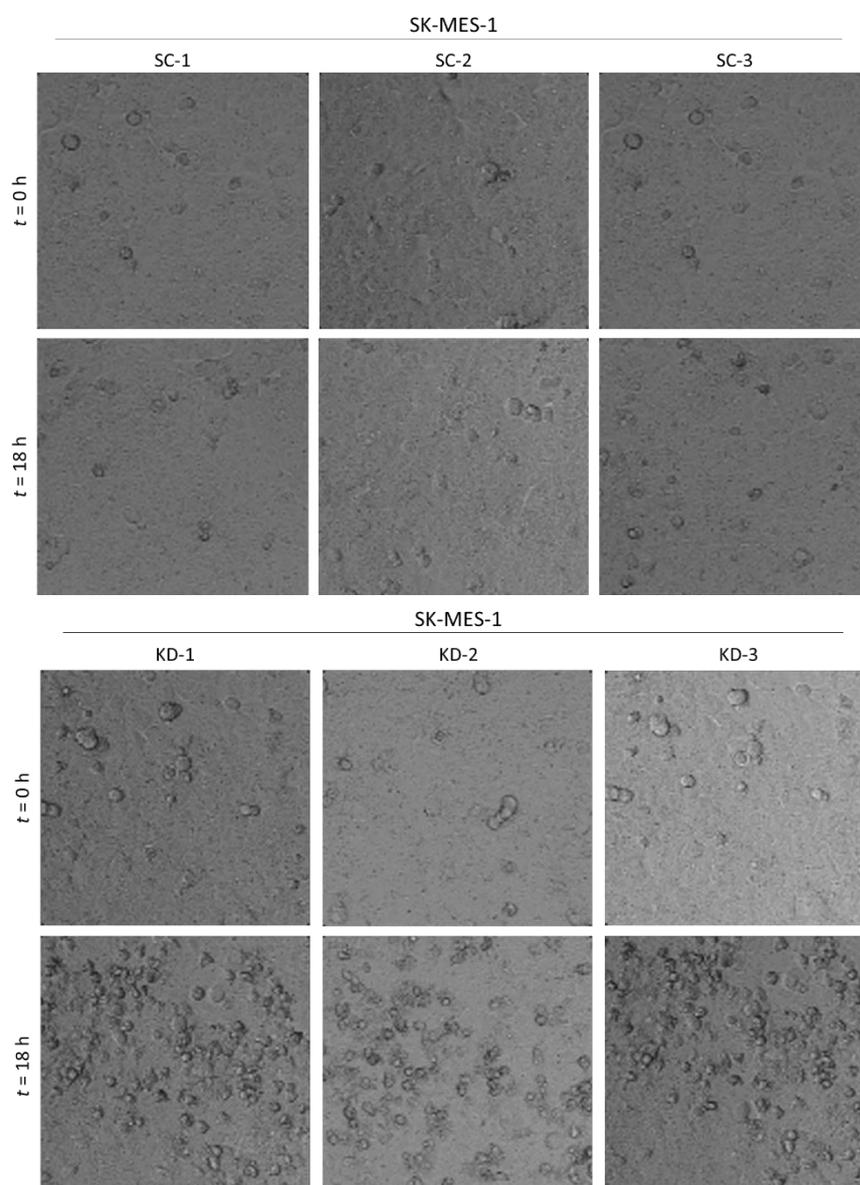


Figura 134. Fotogramas de los videos *in vivo* de células SK-MES-1 control (arriba) y silenciadas (abajo) tras transfección con siRNA control o siRNAs contra *Pkp1* en las que claramente aparecen células de morfología esférica tras 18 h de grabación. Este tiempo correspondió a las 48-72 h desde la transfección. Las imágenes fueron adquiridas con técnicas de luz transmitida (DIC) cada 30 minutos a 10x aplicando un factor zoom de 0,6. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

En los fotogramas a $t = 0$ h y a $t = 18$ h de los vídeos obtenidos (Fig. 134) se observa un notable incremento de células de morfología esférica en las células silenciadas, mientras que en las células control no aparecieron esta serie de células.

6.4.16.2. Ensayos de viabilidad celular tras silenciamiento génico de *Pkp1*

Ante la sospecha de que las células de morfología esférica que aparecieron tras el silenciamiento génico de *Pkp1* fueran células apoptóticas, se valoró la viabilidad *in vivo* de las mismas mediante tinción con PI a las 72 h de la transfección. Los experimentos se hicieron por triplicado y se adquirieron imágenes de luz transmitida (DIC).

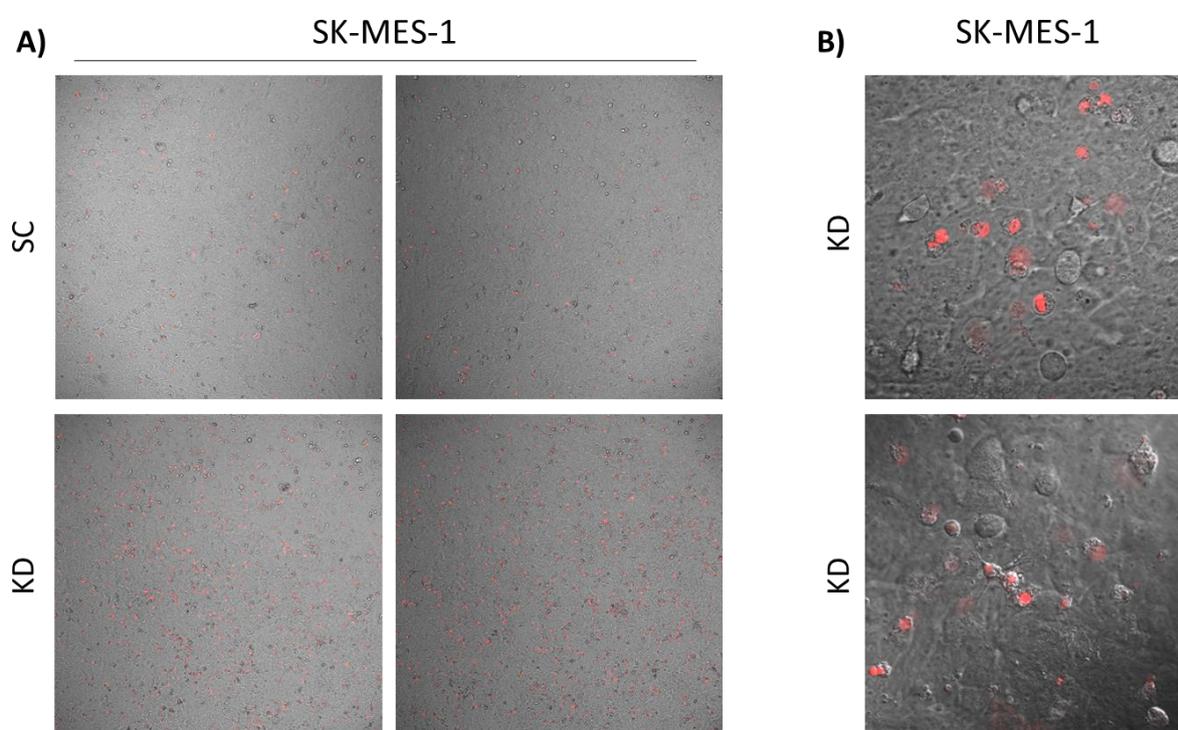


Figura 135. Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de células SK-MES-1 control y silenciadas tras transfección con siRNA control o siRNAs contra *Pkp1* teñidas con PI para valorar la viabilidad celular. A) Incremento de las células positivamente teñidas con PI tras el silenciamiento génico indicando mortalidad. Las imágenes fueron adquiridas a 10x aplicando un factor zoom de 0,6. B) Detalle de los *Z-stacks* de la tinción con PI donde se observa que no todas las células de morfología esférica fueron positivas. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

La tinción *in vivo* con PI en las células SK-MES-1 transfectadas mostró, por un lado, un notable incremento de células positivamente teñidas, mientras que en las células control el número de células positivas fue mucho menor. Estos resultados indican una mayor mortalidad celular en las muestras silenciadas para *Pkp1* en comparación con los controles (Fig. 135A).

Por otro lado, se observó que no todas las células de morfología esférica fueron positivamente teñidas con PI, lo cual podría ser indicativo de que estas células se encontraban en fases apoptóticas tempranas (Fig. 135B).

Con el fin de corroborar el incremento de las células positivamente teñidas, se llevó a cabo el análisis de partículas en las imágenes obtenidas (Fig. 136A) utilizando para ello el software gratuito *ImageJ*. Dicho análisis mostró un incremento de partículas de 4,5 veces (T de Student, $p = 0,0001$) en las células silenciadas con respecto a las control (Fig. 136B), indicando un incremento en la mortalidad celular tras el silenciamiento génico de *Pkp1*.

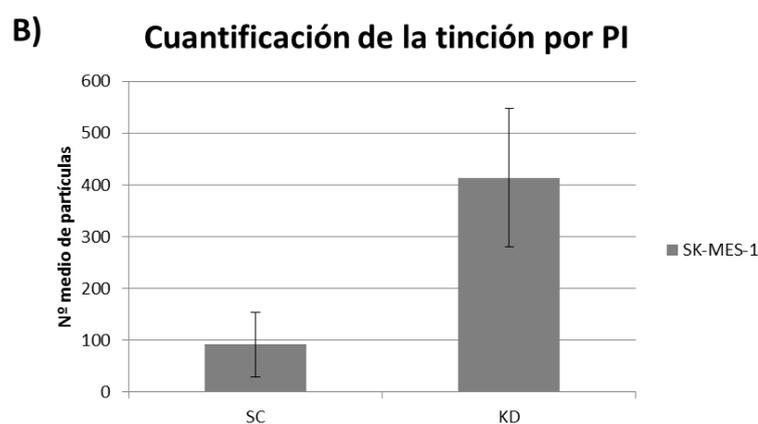
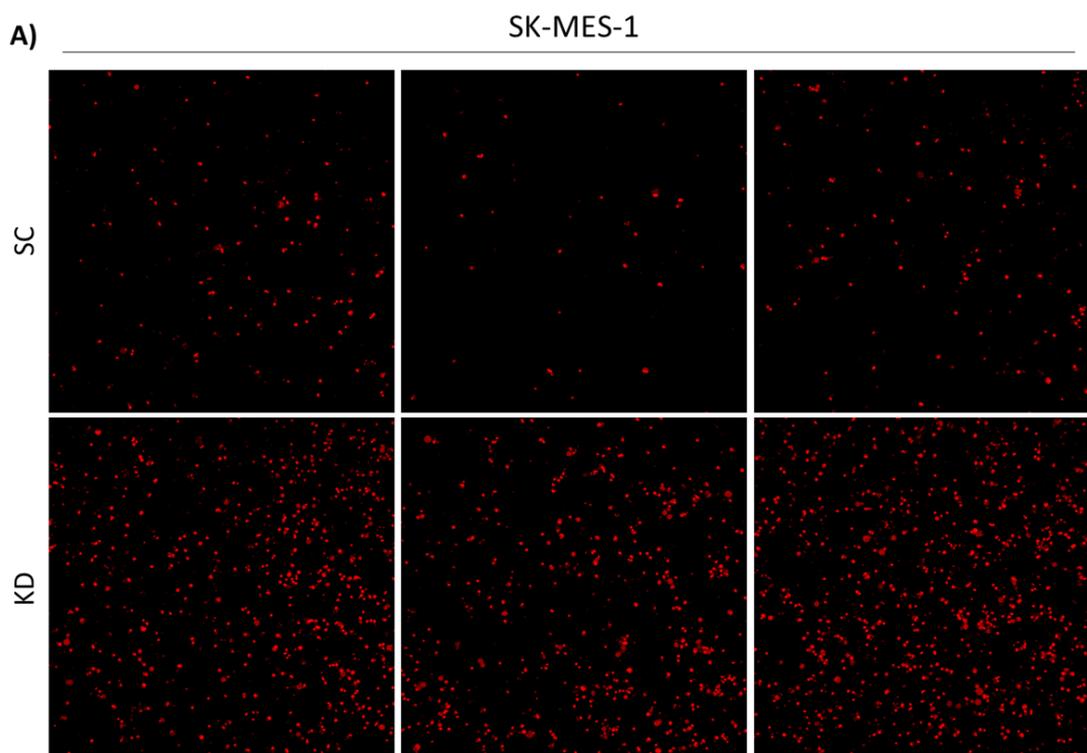


Figura 136. Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de células SK-MES-1 control y silenciadas tras transfección con siRNA control o siRNAs contra *Pkp1* teñidas con PI para el análisis de partículas. A) Incremento de las células positivamente teñidas con PI tras el silenciamiento génico indicando mortalidad. Las imágenes fueron adquiridas a 10x aplicando un factor zoom de 0,6. B) Cuantificación del número medio de partículas en cada campo en células SK-MES-1 control y silenciadas. (SC, control *Scramble*; KD, *KnockDown* o muestra silenciada para *Pkp1*).

6.4.16.3. Ensayos de sobreexpresión de *PKP1A-Myc-DDK-EGFP*

Con el fin de confirmar la participación de PKP1 en la formación de estructuras tales como los *midbodies* y los cinetocoros, los cuales habían sido observado anteriormente mediante técnicas de inmunocitoquímica, se realizaron ensayos de microscopía *in vivo* en células SK-MES-1 transducidas lentiviralmente con el plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro que contiene la secuencia codificante de PKP1A-Myc-DDK-EGFP. Estas células fueron seleccionadas previamente durante 4 días con puromicina para asegurar que el 100% de las células hubiesen sido transducidas.

En primer lugar, las células SK-MES-1 transducidas lentiviralmente para expresar PKP1A-Myc-DDK-EGFP se visualizaron *in vivo* al microscopio de epifluorescencia tras 2 días del primer ciclo de la transducción y 1 día con puromicina. Los resultados de fluorescencia (Fig. 137) mostraron una alta eficiencia de transducción y una fuerte localización nuclear de PKP1A-Myc-DDK-EGFP mientras que las células control (EV, del inglés *Empty Vector*) presentaron una fluorescencia inespecífica por toda la célula.

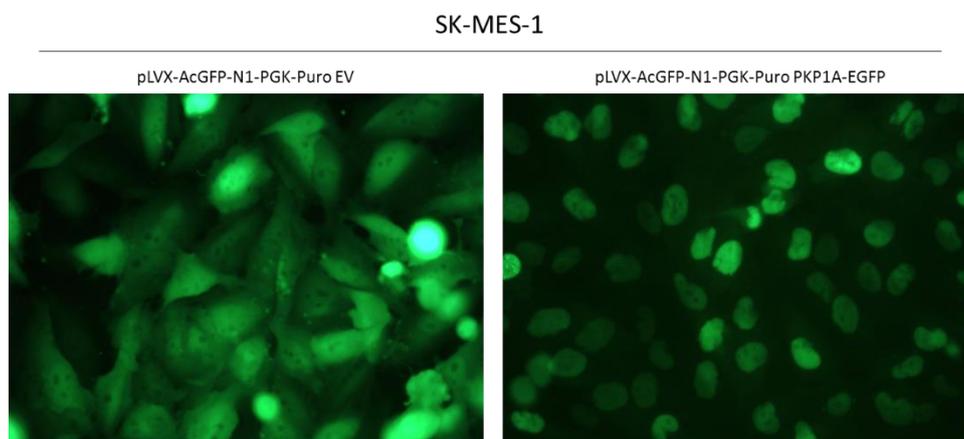


Figura 137. Imágenes de microscopía de epifluorescencia *in vivo* de la eficiencia de transducción de pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro EV y el plásmido vector pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro. Las imágenes fueron adquiridas a 10x. (EV, del inglés *Empty Vector*).

Posteriormente, estas células SK-MES-1 se visualizaron *in vivo* mediante microscopía confocal tras 17 días del primer ciclo de la transducción y 4 días con puromicina. Las imágenes de fluorescencia adquiridas (Fig. 138) mostraron de nuevo una fuerte localización nuclear de PKP1A-Myc-DDK-EGFP. En el caso de las células control (EV, del inglés *Empty Vector*) se observó una señal inespecífica por toda la célula con cierto marcaje de los núcleos celulares.

Las células transducidas con PKP1A-Myc-DDK-EGFP presentaron núcleos muy lobulados e intensa aunque heterogéneamente marcados, con intensidades de señal diferentes (Fig. 139A). Dentro de un mismo núcleo, el marcaje fue granular, heterogéneo y se caracterizó por ausencia de señal en los nucléolos (Fig. 139B). Por otro lado, la señal citoplasmática de PKP1A-Myc-DDK-EGFP evidenció la presencia de numerosas vesículas de tamaño variable (Fig. 139C) que también estuvieron presentes en los controles aunque en menor número; y en células en división, se incrementó el marcaje citoplasmático y periférico, tal y como se había observado previamente en células SK-MES-1 por inmunocitoquímica (Fig. 139D).

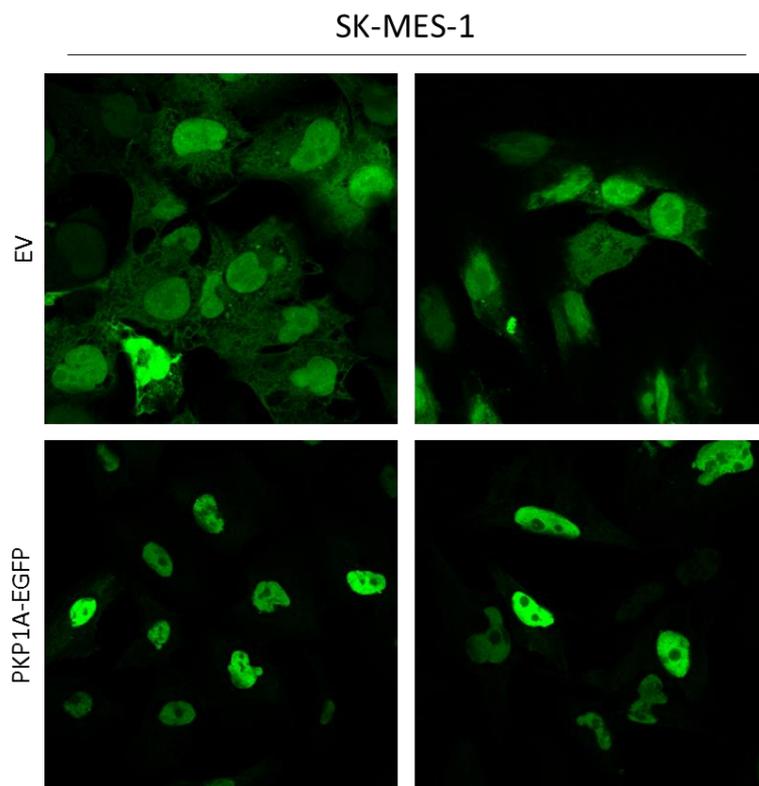


Figura 138. Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de la localización subcelular de PKP1A-Myc-DDK-EGFP tras la transducción de pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro EV y pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 1 para los controles EV y de 0,6 para las muestras PKP1A-Myc-DDK-EGFP. (EV, del inglés *Empty Vector*).

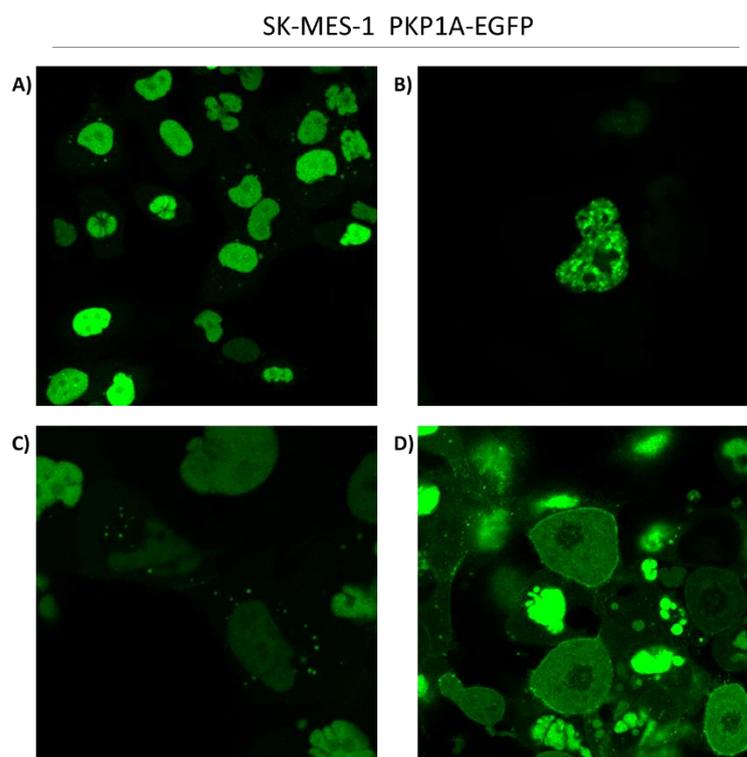


Figura 139. Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de la localización subcelular de PKP1A-Myc-DDK-EGFP tras la transducción de pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro. A) Localización nuclear mostrando lobulación y heterogeneidad de los núcleos. B) Marcaje granular y heterogéneo de un núcleo, dejando nucleolos sin marcar. C) Localización en vesículas citoplasmáticas. D) Marcaje citoplasmático y periférico de células en división. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6 (A), 1,5 (B y C) y 1 (D).

Al igual que en las inmunocitoquímicas comentadas anteriormente, en los ensayos *in vivo* de células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro se observó la presencia de *midbodies* (Fig. 140), aunque en esta ocasión no se corroboró con la ayuda de anticuerpos anti-GFP por ser estudios *in vivo*.

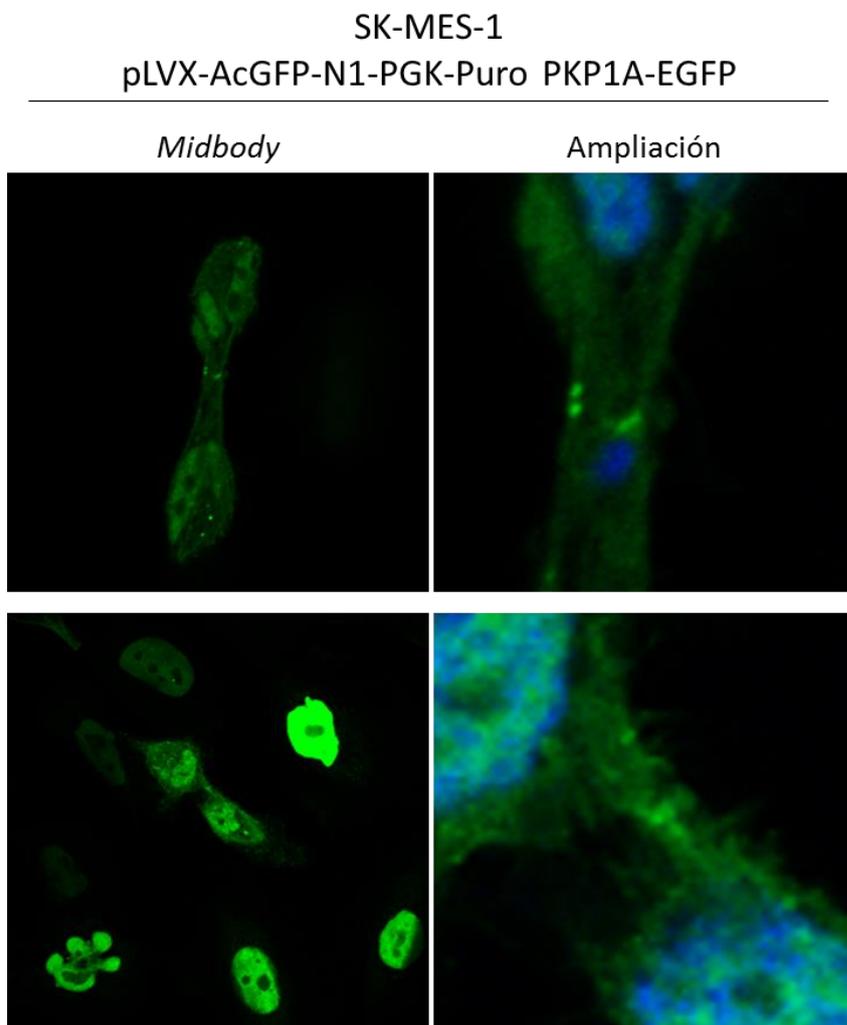


Figura 140. Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector que contenía la construcción PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP. Se aprecian los *midbodies* y la localización de PKP1A-Myc-DDK-EGFP en los mismos (ver ampliaciones). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 2 (arriba) y 1 (bajo). (PKP1 en verde; núcleos en azul con DAPI).

Se realizaron, además, una serie de videos *in vivo* mediante microscopía confocal de diferentes duraciones e intervalos de adquisición de imágenes utilizando células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector pLVX-PKP1A-Myc-DDK-EGFP-N1-PGK-Puro.

En estos videos se apreciaron células con una alta movilidad y diversas células en proceso de división en las cuales se observó señal con un patrón punteado intenso muy similar al patrón observado mediante inmunocitoquímica y que podría corresponderse con cinetocoros (Fig. 141 y 142).

En estas células en división, en las cuales eran patentes estos patrones cinetocóricos, también fue evidente el incremento de la señal citoplasmática de PKP1 debida a la diseminación de la proteína nuclear comentada anteriormente (Fig. 142).

También se observó una acumulación de PKP1 formando un patrón bipolar que no había sido observado previamente por inmunocitoquímica y que podría corresponder con un patrón centrosómico (Fig. 143).

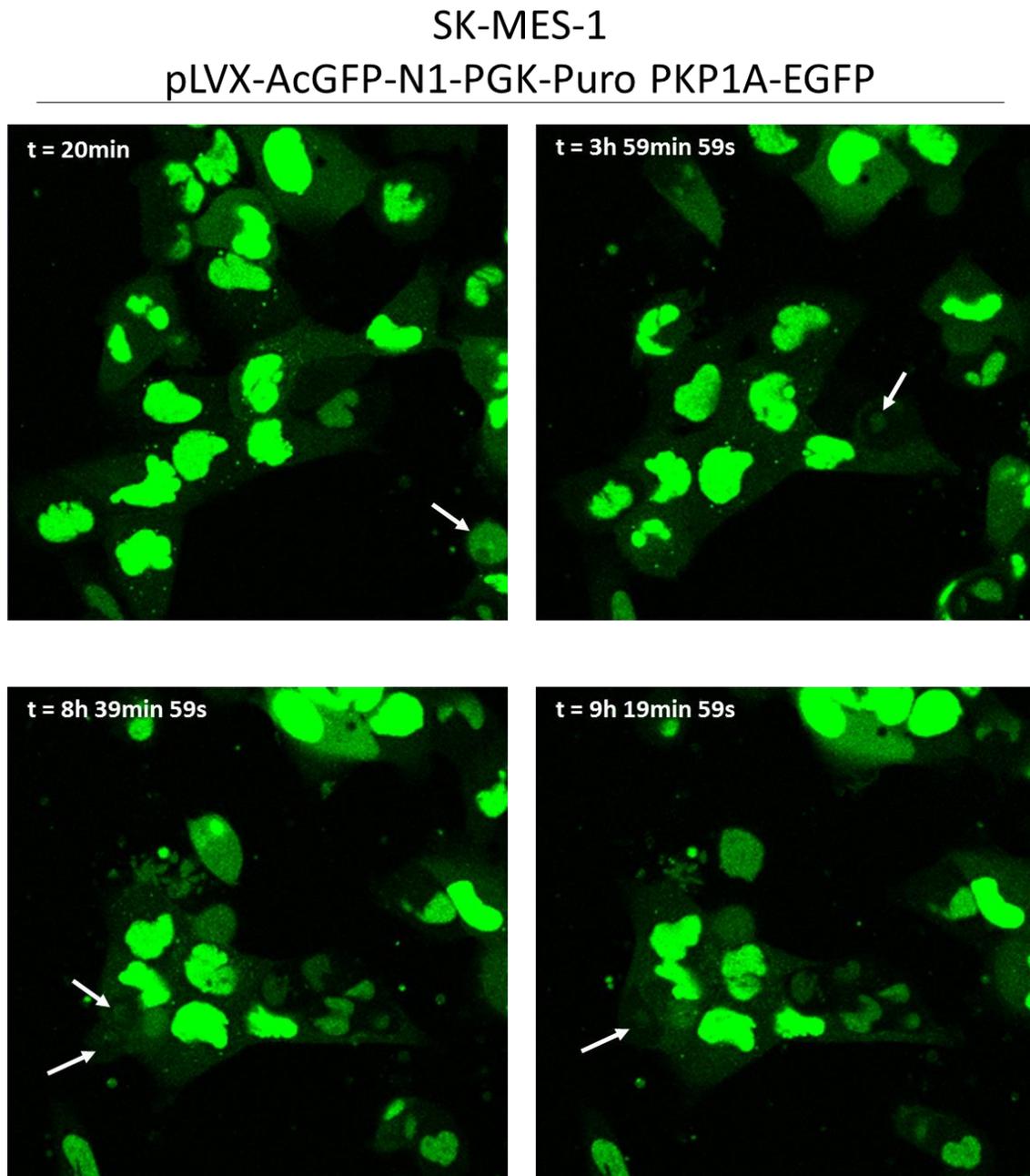


Figura 141. Fotogramas de un video *in vivo* de microscopía confocal de células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector que contenía la construcción PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP. Se aprecian los patrones cinetocóricos y la localización de PKP1A-Myc-DDK-EGFP en los mismos (flechas). Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6 en intervalos de 20 minutos durante un tiempo total de 13 h 39 min 59 s. (PKP1 en verde).

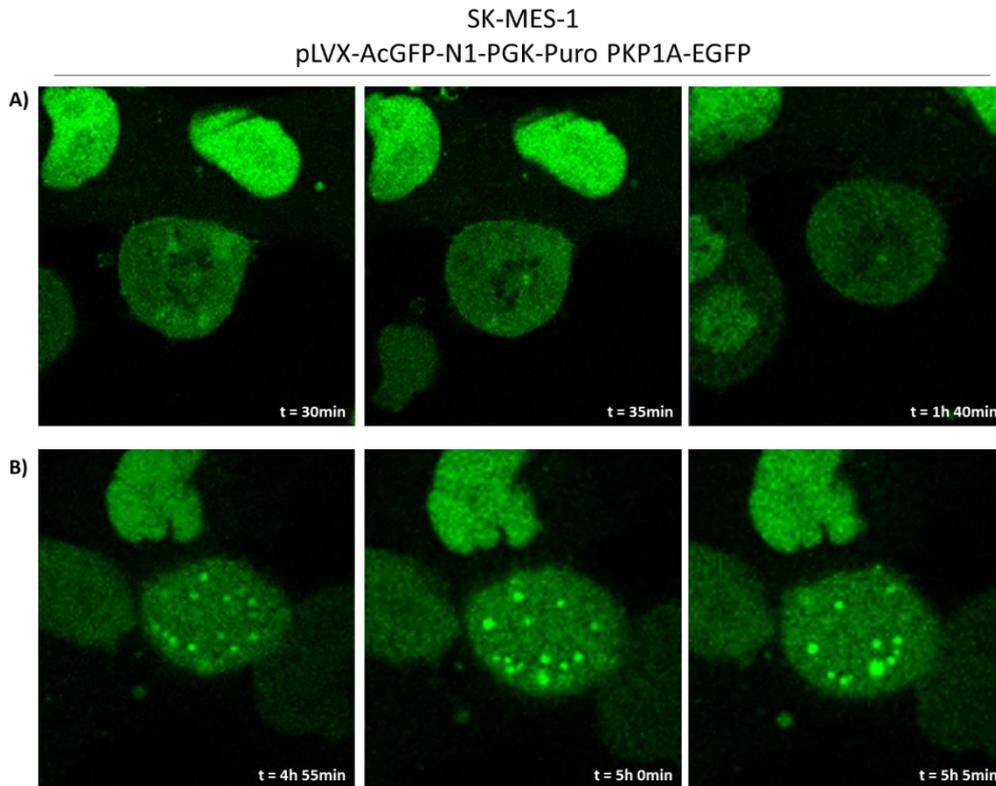


Figura 142. Ampliaciones de dos campos diferentes (A y B) de los fotogramas de un video *in vivo* de microscopía confocal de células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector que contenía la construcción PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP en división. Se aprecian los patrones cinetocóricos y el incremento de la señal citoplasmática de PKP1. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6 en intervalos de 5 minutos durante un tiempo total de 5 h 55 min 0 s. (PKP1 en verde).

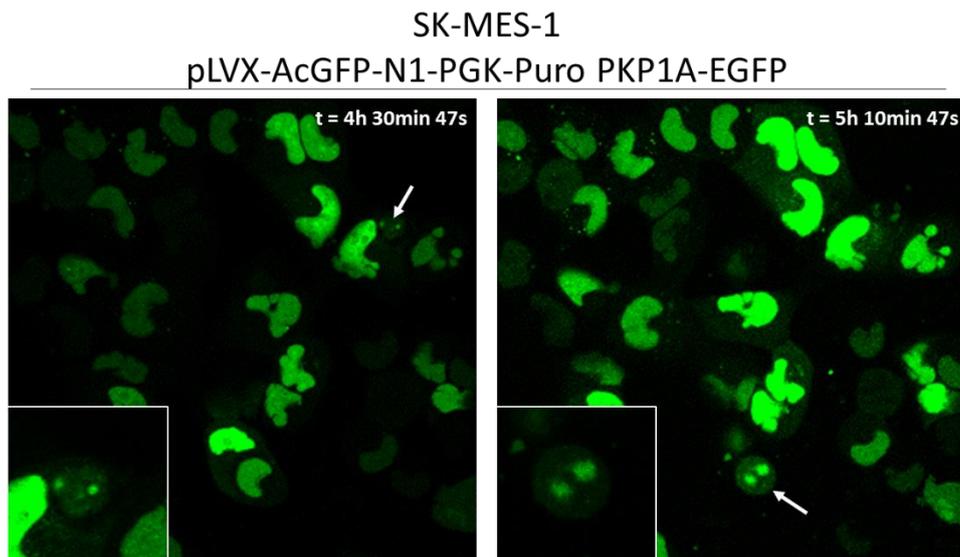


Figura 143. Fotogramas de un video *in vivo* de microscopía confocal de células SK-MES-1 transducidas con el plásmido vector que contenía la construcción PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP. Se aprecian los patrones centrosómicos (ver ampliación) y la localización de PKP1A-Myc-DDK-EGFP en los mismos. Las imágenes fueron adquiridas a 63x aplicando un factor zoom de 0,6 en intervalos de 20 minutos durante un tiempo total de 6 h 53 min 14 s. (PKP1 en verde).

6.4.17. Clonación de plásmidos

6.4.17.1. Clonación de *shRNA-PKP1* en *pLVPT-tTR-KRAB*

Para la clonación del *shRNA-PKP1* en el plásmido *pLVPT-tTR-KRAB* se clonó primero en el plásmido intermediario *pLVTHM*, el cual contiene el promotor H1 de la polimerasa III que es esencial para la transcripción de los *shRNAs*.

6.4.17.1.1. Clonaje del *shRNA-PKP1* en el plásmido *pLVTHM*

En primer lugar, se procedió a la digestión, desfosforilación y purificación mediante electroforesis del plásmido *pLVTHM* (Fig. 144A).

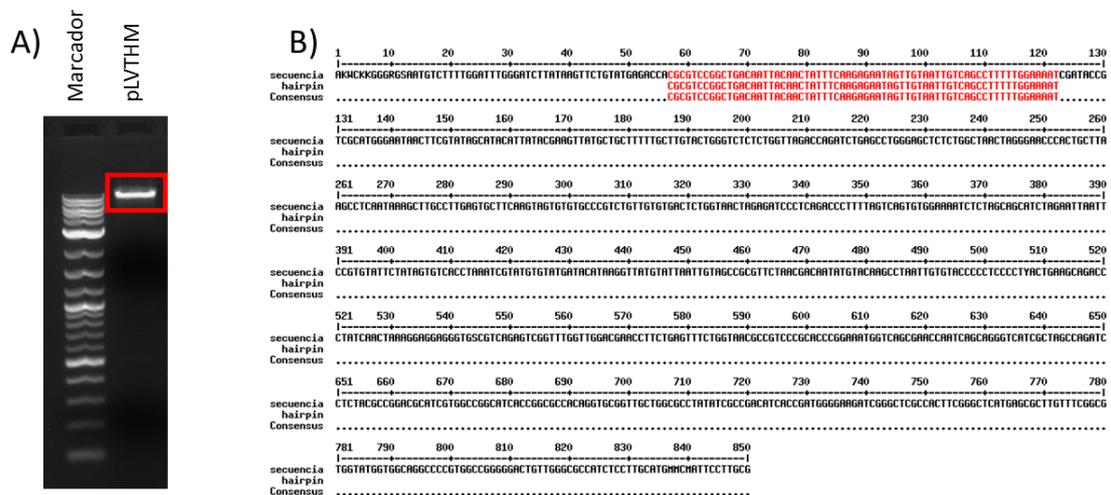


Figura 144. A) Electroforesis del plásmido *pLVTHM* digerido y desfosforilado. Se escindió para su purificación la banda enmarcada en rojo (11,063 kb). A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 1 Kb. B) Análisis de la secuenciación de las colonias bacterianas obtenidas con el software on-line *MultAlin*.

Tras el anillamiento y fosforilación de los oligos *shRNA-PKP1-1 Fw* y *shRNA-PKP1-1 Rv*, se preparó una dilución 1:100 de los mismos y se llevó a cabo una reacción de ligación entre el vector y el inserto en una proporción 1:3. Posteriormente, se transformaron bacterias y el ADN de las colonias crecidas se purificó y secuenció utilizando el oligo H1-promoter-Fw para comprobar el éxito de la clonación (Fig. 144B).

Al alinear las secuencias obtenidas por secuenciación con la secuencia teórica de la construcción, se corroboró que 2 colonias contenían la secuencia correcta.

6.4.17.1.2. Subclonaje de shRNA-PAK1 en el plásmido pLVPT-tTR-KRAB

Una vez obtenido con éxito el clonaje del shRNA-PAK1 en el plásmido pLVTHM se procedió a subclonarlo junto con el promotor H1 en el plásmido pLVPT-tTR-KRAB.

Por un lado, se digirió el plásmido pLVTHM-shRNA-PAK1 y, por otro, se digirió y desfosforiló el plásmido pLVPT-tTR-KRAB. Ambas digestiones fueron purificadas mediante electroforesis (Fig. 145A) y se llevó a cabo una reacción de ligación entre el vector y el inserto en una proporción 1:14. Posteriormente, se transformaron bacterias y el ADN de las colonias crecidas se purificó y secuenció utilizando el oligo H1-promoter-Fw para comprobar el éxito de la clonación (Fig. 145B).

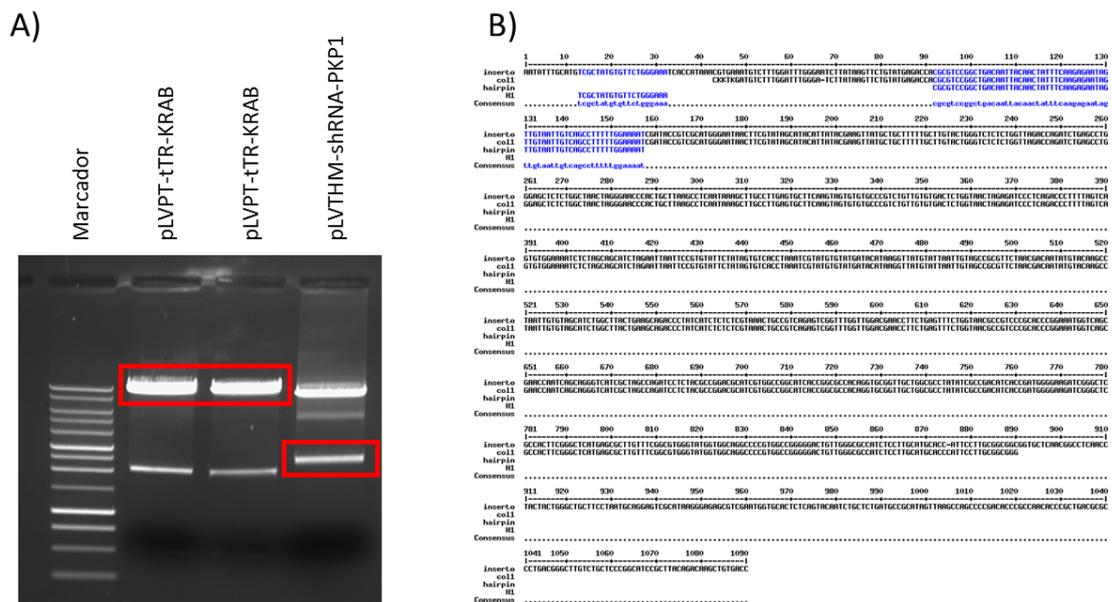


Figura 145. A) Electroforesis del plásmido pLVPT-tTR-KRAB digerido y desfosforilado, y del plásmido pLVTHM-shRNA-PAK1 digerido. Se escindió para su purificación las bandas enmarcadas en rojo (9,5 kb en pLVPT-tTR-KRAB y 2,5 kb en pLVTHM-shRNA-PAK1). A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 1 Kb. B) Análisis de la secuenciación de las colonias bacterianas obtenidas mediante el software on-line *MultAlin*.

Al alinear las secuencias obtenidas por secuenciación con la secuencia teórica de la construcción, se corroboró que 2 colonias contenían la secuencia correcta. Sin embargo, al digerir las construcciones con la enzima EcoRI, sólo una de las colonias presentó el patrón de restricción esperado de 9,3 Kb, 1,6 Kb, 1,1 Kb y 17 pb (Fig. 146).

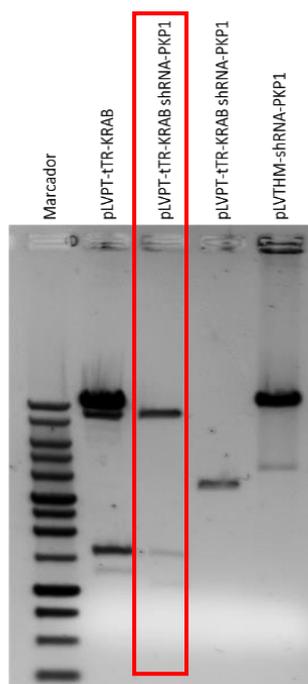


Figura 146. Electroforesis del ensayo de restricción con EcoRI de las colonias pLVPT-tTR-KRAB shRNA-CPK1 obtenidas. A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 1 Kb. Como control se utilizaron los plásmidos pLVPT-tTR-KRAB vacío y pLVTHM-shRNA-CPK1. Sólo una de las dos colonias (enmarcada en rojo) presentó el patrón de bandas esperado de 9,3 Kb, 1,6 Kb, 1,1 Kb y 17 pb (esta última no visible).

6.4.17.2. Clonación de shRNA-SC y shRNA-CPK1 en pLVX-IRES-tdTomato

Para la clonación de los shRNAs en el plásmido pLVX-IRES-tdTomato se procedió a subclonarlos de los plásmidos pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC y pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-CPK1 previamente clonados, los cuales contienen el promotor H1 de la polimerasa III que es esencial para la transcripción de los shRNAs.

En primer lugar se amplificaron por PCR los insertos consistentes en el promotor H1 de la polimerasa III y el shRNA-SC o el shRNA-CPK1, utilizando como moldes los plásmidos pLVPT-tTR-KRAB-shRNA-SC y pLVTHM-shRNA-CPK1. A continuación, se digirieron los productos de PCR y se purificaron mediante electroforesis (Fig. 147).

Posteriormente, se digirió y desfosforiló el plásmido pLVX-IRES-tdTomato y se purificó también mediante electroforesis. Una vez purificado, se llevó a cabo una reacción de ligación entre el vector y los insertos, se transformaron bacterias y el ADN de las colonias crecidas se purificó y se llevaron a cabo ensayos de restricción para comprobar el éxito de la clonación utilizando como control el plásmido pLVX-IRES-tdTomato vacío (Fig. 148).

Finalmente, se secuenciaron las colonias positivas utilizando los oligos H1-promoter-Fw, CMV-Rv o IRES-Rv para corroborar la secuencia final del plásmido.

Al alinear las secuencias obtenidas por secuenciación con la secuencia teórica de la construcción, se corroboró que varias colonias contenían la secuencia correcta tanto de shRNA-SC o de shRNA-CPK1 y en el sentido correcto (Fig. 149).

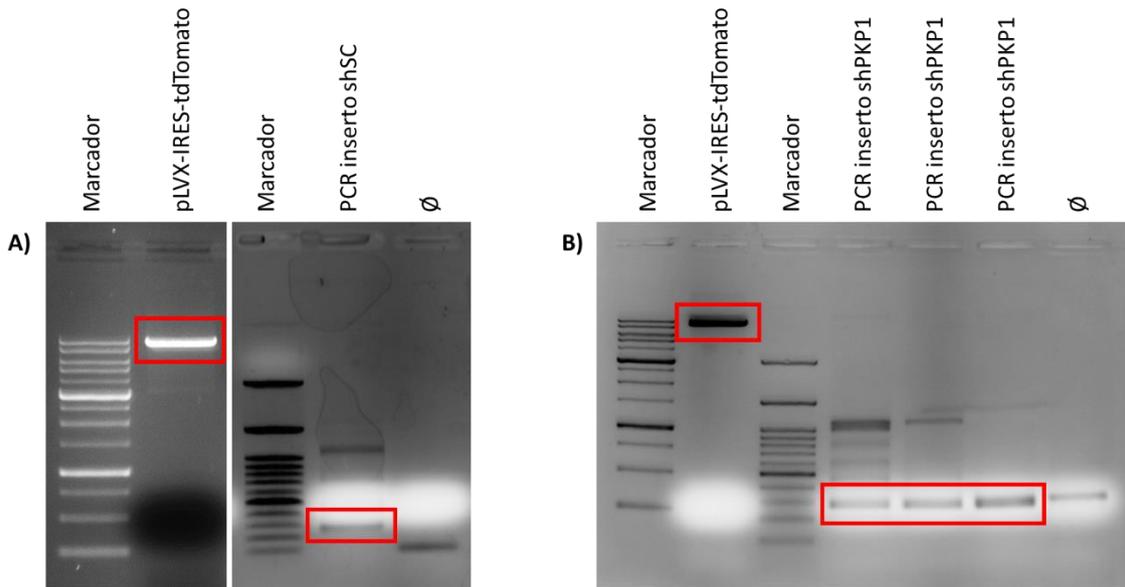


Figura 147. Electroforesis del plásmido pLVX-IRES-tdTomato digerido y desfosforilado, y de las PCRs de los insertos shRNA-SC (A) y shRNA-PKP1 (B) digeridos. Se escindió para su purificación las bandas enmarcadas en rojo (8,9 kb en pLVX-IRES-tdTomato y 290 pb en insertos). Marcador de pesos moleculares de 1 Kb para los vectores y de 100 pb para los insertos. (\emptyset , control negativo de la PCR indicada).

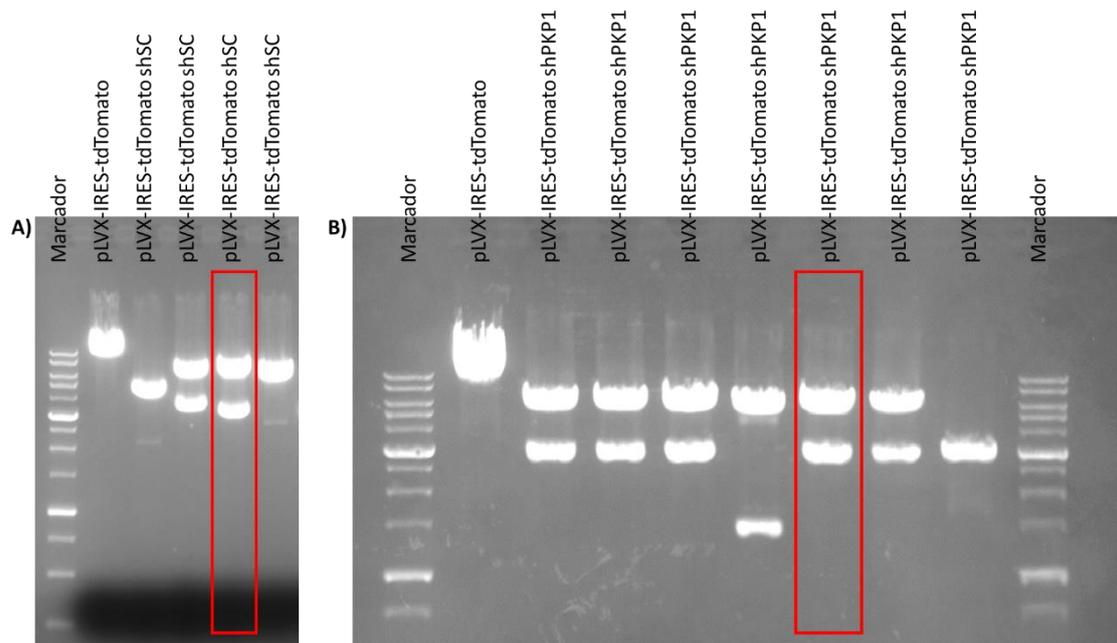


Figura 148. Electroforesis del ensayo de restricción con la enzima PvuI de las colonias pLVX-IRES-tdTomato shRNA-SC (A) y shRNA-PKP1 (B) obtenidas. Marcador de pesos moleculares de 1 Kb. Las colonias enmarcadas en rojo presentaron el patrón de bandas esperado de 6,1 y 3 kb.

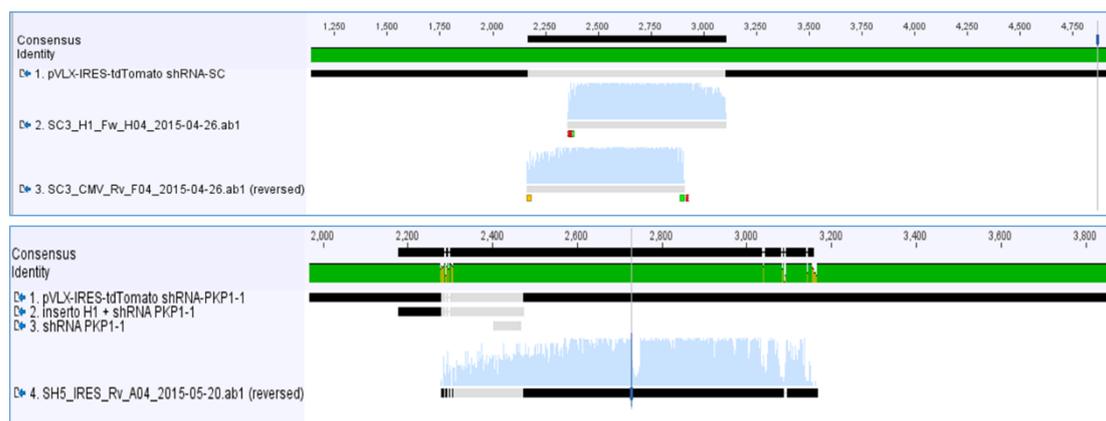


Figura 149. Alineamiento de las diversas secuenciaciones de las colonias pLVX-IRES-tdTomato shRNA-SC (arriba) y shRNA-PKP1 (abajo) obtenidas con la secuencia teórica de las construcciones mediante el software *Geneious*.

6.4.17.3. Clonación de PKP1A-Myc-DDK en pLVX-IRES-ZsGreen1

Para la clonación del gen *Pkp1a* en el plásmido pLVX-IRES-ZsGreen1 se procedió a subclonarlo del plásmido comercial pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK (Origene, RC216972), de modo que el plásmido pLVX-IRES-ZsGreen1 resultante contiene la secuencia de *Pkp1a* marcada en su extremo carboxilo-terminal con las etiquetas Myc y DDK.

En primer lugar se amplificó por PCR el inserto consistente en la secuencia del gen *Pkp1a*-Myc-DDK utilizando como molde el plásmido pCMV6-Entry-PKP1A-Myc-DDK y se purificó mediante electroforesis (Fig. 150A). A continuación, se digirieron tanto el plásmido como el producto de PCR y ambos fueron purificados de nuevo por electroforesis (Fig. 150B).

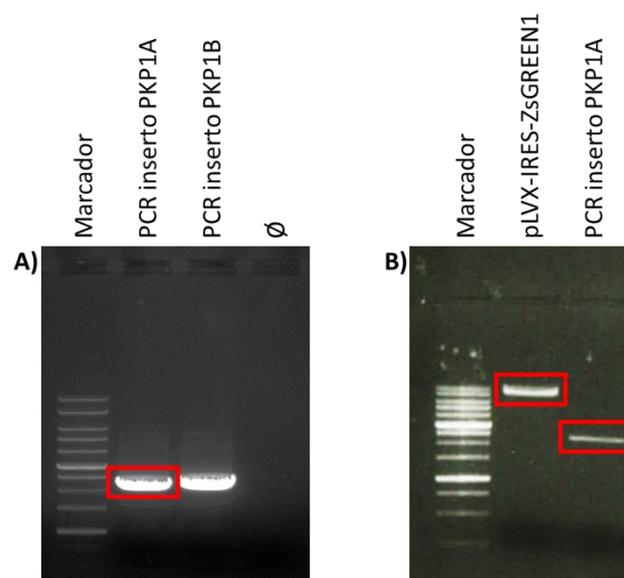


Figura 150. A) Electroforesis de la PCR del inserto PKP1A-Myc-DDK. Se escindió para su purificación la banda enmarcada en rojo (2,7 kb). B) Electroforesis de las digestiones del plásmido pLVX-IRES-ZsGREEN1 y de la PCR del inserto PKP1A-Myc-DDK. A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 1 Kb. Se escindieron para su purificación las bandas enmarcadas en rojo (8,2 kb en pLVX-IRES-ZsGREEN1 y 2,7 Kb en el inserto).

Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de ligación entre el vector y el inserto en un ratio 1:6, se transformaron bacterias y el ADN de las colonias crecidas se purificó y se llevaron a cabo ensayos de restricción para comprobar el éxito de la clonación utilizando como control el plásmido pLVX-IRES- ZsGREEN1 vacío (Fig. 151).

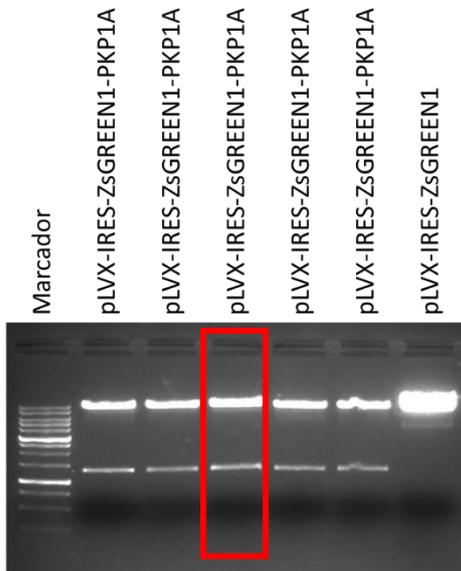


Figura 151. Electroforesis del ensayo de restricción con la enzima BamHI de las colonias pLVX-IRES-ZsGREEN1-PKP1A obtenidas. Marcador de pesos moleculares de 1 Kb. La colonia enmarcada en rojo presentó el patrón de bandas esperado de 9,2 y 1,3 kb.

Finalmente, se secuenciaron las colonias positivas utilizando los oligos Fw-PKP1-isoforms, PKP1-seq-1-FW, CMV-FD o FW-PKP1-1 para corroborar la secuencia final del plásmido.

Al alinear las secuencias obtenidas por secuenciación con la secuencia teórica de la construcción, se corroboró que varias colonias contenían la secuencia correcta (Fig. 152).

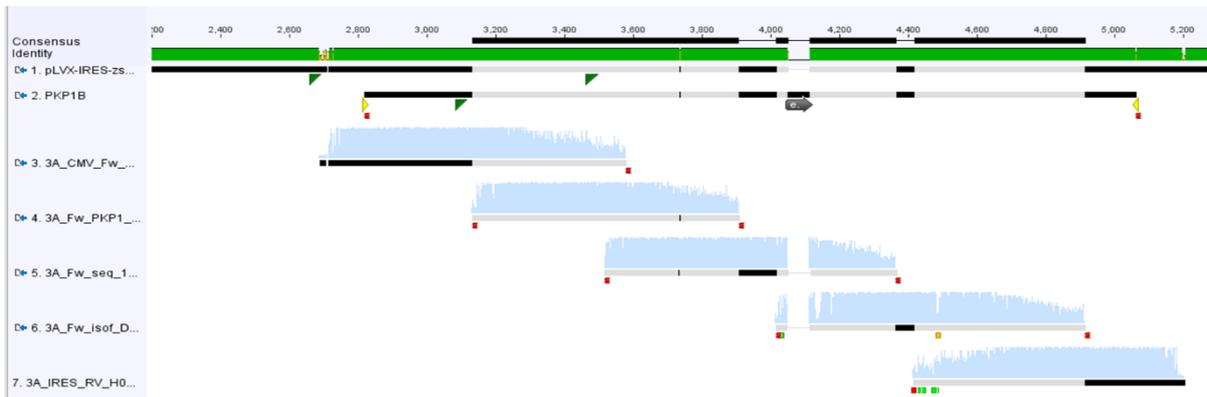


Figura 152. Alineamiento de las diversas secuenciaciones de la colonia pLVX-IRES-ZsGREEN1-PKP1A obtenidas con la secuencia teórica de la construcción mediante el software Geneious.

6.4.17.4. Clonación de PKP1A-Myc-DDK fusionado a EGFP en pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro

Para la clonación del gen *Pkp1a* en el plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro se procedió a sustituir la secuencia codificante de AcGFP1 por la secuencia de *Pkp1a* marcada en su extremo carboxilo-terminal con las etiquetas Myc y DDK, y fusionada a EGFP por el extremo carboxilo-terminal de DDK. La construcción de PKP1A-Myc-DDK fusionada a EGFP fue obtenida mediante el método descrito por Higuchi.

Dicho método consistió en un sistema de dos PCRs parciales diseñadas con regiones solapantes. La primera PCR parcial se diseñó para amplificar la secuencia codificante de *Pkp1a*-Myc-DDK la cual tiene un tamaño de 2,3 kb y se llevó a cabo por duplicado (Fig. 153A), la segunda PCR parcial se diseñó para amplificar la secuencia codificante de EGFP con un tamaño de 700 pb (Fig. 153B).

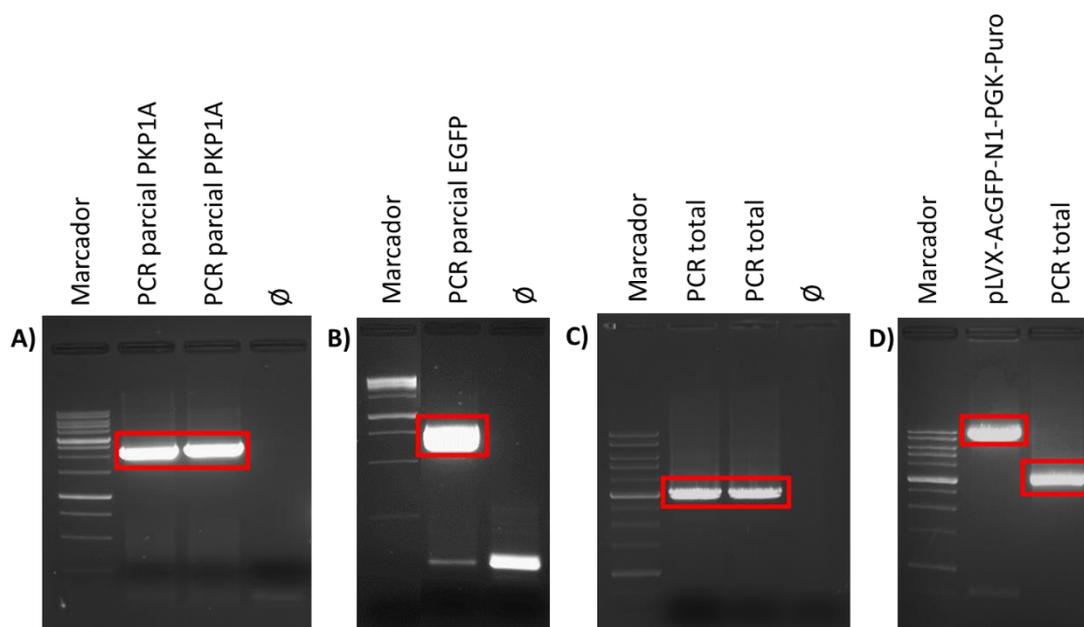


Figura 153. A) Electroforesis de la PCR parcial de PKP1A-Myc-DDK. Se escindió para su purificación la banda enmarcada en rojo (2,7 kb). B) Electroforesis de la PCR parcial de EGFP. C) Electroforesis de la PCR total de PKP1A-EGFP. D) Electroforesis de las digestiones del plásmido pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro y de la PCR total de PKP1A-EGFP. A la izquierda, marcador de pesos moleculares de 1 Kb. Se escindieron para su purificación las bandas enmarcadas en rojo.

Finalmente, los productos de ambas PCRs parciales se usaron como molde en una PCR mayor capaz de amplificar los productos de ambas PCRs parciales fusionados entre sí gracias a las regiones solapantes. Esta PCR total se llevó a cabo por duplicado y presenta un amplicón de aproximadamente 3 kb (Fig. 153C).

Este producto de PCR se purificó y, a continuación, se digirieron tanto el plásmido como el producto de PCR y ambos fueron purificados por electroforesis (Fig. 153D).

Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de ligación entre el vector y el inserto en un ratio 1:3, se transformaron bacterias y el ADN de las colonias crecidas se purificó y se llevaron a cabo ensayos de restricción para comprobar el éxito de la clonación (Fig. 154).

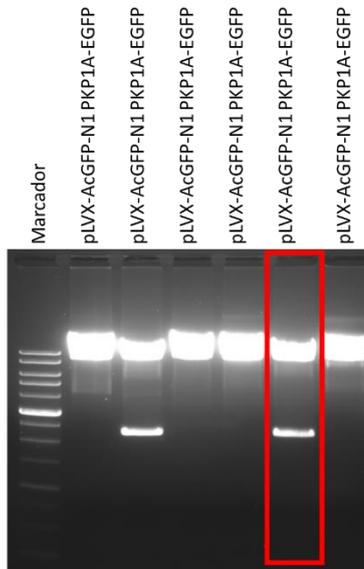


Figura 154. Electroforesis del ensayo de restricción con la enzima XhoI de las colonias pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro PKP1A-EGFP obtenidas. Marcador de pesos moleculares de 1 Kb. La colonia enmarcada en rojo presentó el patrón de bandas esperado de 8,1 y 2,2 kb.

Finalmente, se secuenciaron las colonias positivas utilizando los oligos CMV-FD, Fw-PKP1-isoforms, PKP1-seq-2-FW, PKP1-seq-3-Rv o EGFPseq-Rv para corroborar la secuencia final del plásmido. Al alinear las secuencias obtenidas por secuenciación con la secuencia teórica de la construcción, se corroboró que al menos una colonia contenía la secuencia correcta (Fig. 155).

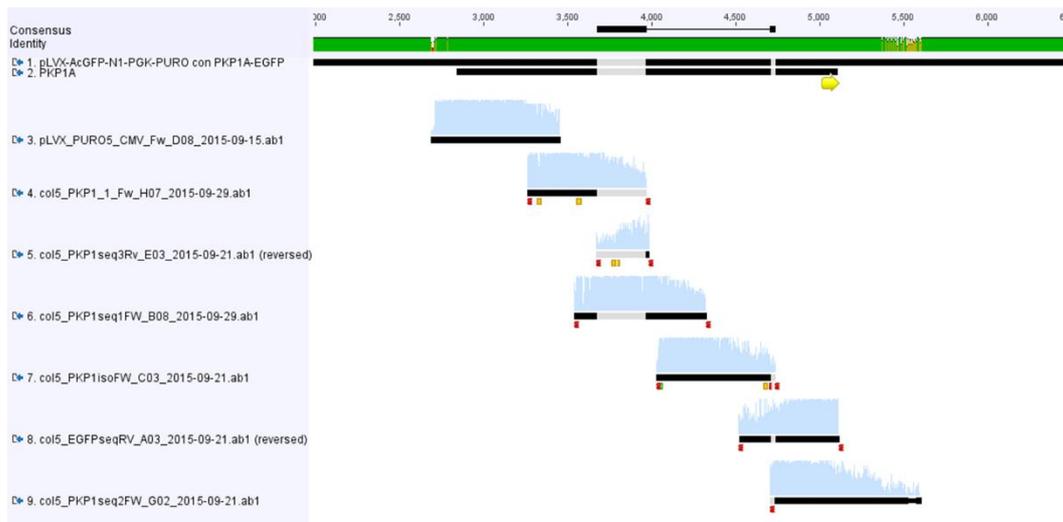


Figura 155. Alineamiento de las diversas secuenciaciones de la colonia pLVX-AcGFP-N1-PGK-Puro PKP1A-EGFP obtenidas con la secuencia teórica mediante el software *Geneious*.

7. DISCUSIÓN

7.1. Validación de los datos del microarray por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Los perfiles de expresión génica realizados mediante microarrays y qPCR son útiles para la clasificación de tumores, y su aplicación puede mejorar el diagnóstico, estadificación e identificación de marcadores pronósticos (Hoheisel, 2006; Lossos *et al.*, 2004; Pedraza *et al.*, 2010; Singhal *et al.*, 2008) y persiguen el objetivo de descubrir nuevos marcadores terapéuticos y personalizar las terapias de acuerdo a la composición genética tumoral de cada individuo.

En el caso concreto de los pacientes de cáncer de pulmón, las decisiones terapéuticas y las predicciones de supervivencia generalmente se basan en una combinación de la clasificación patológica del tumor y el estadio de la enfermedad. Sin embargo, los actuales métodos de clasificación y estadificación no son completamente eficaces ya que pacientes con idéntica histología, grado de diferenciación, localización y estadio, pueden tener tiempos de supervivencia y respuesta a terapia muy diferentes (Potti *et al.*, 2006). Para obtener una verdadera relevancia clínica, los perfiles de expresión génica deben ser reconocibles a pesar de las variaciones en el procesamiento muestral que pueda haber entre las diferentes instituciones. Para salvar esta limitación, en esta investigación los resultados del microarray fueron validados mediante qPCR y el test estadístico de Bonferroni, en un conjunto de pacientes independiente.

Los resultados, una vez validados por qPCR, permitieron diferenciar los fenotipos tumorales (muestra tumoral de muestra control no tumoral), AC de SCC (incluyendo los estadios I y IB) y grados de diferenciación ($FDR \leq 0,05$; Test de Bonferroni $\leq 0,05$). Así, estos análisis ofrecen una mejor clasificación molecular del cáncer del pulmón.

A menudo los perfiles de expresión génica no distinguen entre AC o SCC bien, moderada y pobremente diferenciados y en muchos casos tampoco entre estadios de la enfermedad. Además, es difícil establecer si la subclasificación obtenida refleja diferencias biológicas significativas o simplemente son aberraciones estadísticas (Ransohoff, 2007).

Sin embargo, los resultados de este estudio arrojaron una serie de genes diferencialmente expresados en función del tipo tumoral, estadio y grado de diferenciación, obteniendo una concordancia (CCC) (Carrasco *et al.*, 2003) aceptable entre los resultados del microarray y los de qPCR.

En la comparación entre muestras de SCC de estadio I y muestras no tumorales, los genes validados por qPCR tras la corrección con el test de Bonferroni con mayores variaciones de FC (referidos al valor de la segunda condición de la comparación) fueron: *Ager* (FC: -129,192), *Nkx2-1* (FC: -92,7819), *Cacna2d2* (FC: -37,7477), *Grem-1* (FC: 54,6104), *Col10a1* (FC: 44,9704), *Krt17* (FC: 102,711), *Tfap2a* (FC: 84,4879), *Krt15* (FC: 137,961) y *Pkp1* (FC: 82,6606). En la comparación entre muestras de AC de estadio I y muestras no tumorales, estos genes fueron: *Col10a1* (FC: 55,0485), *Grem1* (FC: 61,0049) y *Ager* (FC: -24,1423). En la comparación entre muestras de AC de estadio IB y SCC de estadio IB, estos genes fueron: *Pkp1* (FC: -53,0899), *Trim29* (FC: -39,6855), *Krt15* (FC: -39,2892) y *Dsc3* (FC: -127,568).

Un hallazgo interesante fue que los genes *Pkp1* y *Krt15* estaban altamente sobreexpresados en los SCC, lo que sugiere que podrían ser marcadores útiles para diferenciar

las muestras del subtipo epidermoide. En general, el carcinoma epidermoide de pulmón se caracteriza por la alta expresión de genes de queratinas y la evidencia histológica de queratinización. Entre los marcadores de expresión génica de SCC de pulmón, sobresalen los genes de las queratinas 5, 6, 13, 14, 16, 17 y 19. En este estudio, se confirmó la sobreexpresión de varias de estas queratinas y hallamos que *Krt15* podría ser un marcador de SCC de pulmón no descrito previamente.

Por otro lado, la desmogleína 3 (*Dsg3*) mostró una fuerte inhibición (FC: -229,762) en AC de estadio IA frente a AC de estadio IB, lo que indica que podría servir como marcador para distinguir el estadio IA de AC. Cabe destacar que las isoformas *Dsg1* y *Dsc1* de las cadherinas desmosomales se expresan en las capas epidérmicas suprabasales, mientras que *Dsg3* y *Dsc3* se expresan más fuertemente en las capas basales. Así, esta expresión diferencial podría tener una función en la morfogénesis epidérmica y/o podría regular la proliferación de queratinocitos.

En relación al grado de diferenciación tumoral, los genes con mayores variaciones de FC tras la corrección con el test de Bonferroni en la comparación entre muestras tumorales de estadio I moderadamente diferenciadas y las muestras control fueron: *Col10a1* (FC: 74,1007), *Grem1* (FC: 57,3972), *Col1a1* (FC: 28,9145) y *Fndc1* (FC: 28,898). Mientras que en la comparación entre muestras tumorales de estadio I pobremente diferenciadas y las muestras control fueron: *Grem1* (FC: 52,8579), *Gkn2* (FC: -173,309) y *Col10a1* (FC: 50,1116).

Desde nuestro punto de vista, los perfiles de expresión génica diferencial observados en este estudio ofrecen una nueva visión de la base molecular del cáncer de pulmón. No obstante, los genes diferencialmente expresados que se han definido en este trabajo deben validarse *in vivo* e *in vitro* para ser propuestos como marcadores de SCC y de AC de estadio I.

7.2. Estudio de supervivencia

En cuanto al estudio de supervivencia, los resultados obtenidos según el estadio TNM variaron dependiendo de la edición de TNM usada. Cuando se aplicaron los criterios de clasificación TNM de la 6ª edición, la tasa de supervivencia a 5 años fue 80,4% para el estadio I (n=51), 60% para el estadio II (n=5) y 20% para el estadio III (n=5). Sin embargo, cuando se aplicaron los criterios de la 7ª edición, la tasa fue 85,7% para el estadio IA (n=14), 81,8% para el estadio IB (n=22), 70% para el estadio IIA (n=10), 66,7% para el estadio IIB (n=12) y 25% para el estadio IIIA (n=4). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre estadios con ambas ediciones. Así, en nuestro estudio 35/62 (56,5%) pacientes tuvieron el mismo estadio tanto con los criterios de clasificación TNM de la 6ª como de la 7ª edición; mientras que el resto, 27/62 (43,5%), se asignaron a diferentes estadios TNM según la edición utilizada.

Rena *et al.* (Rena *et al.*, 2010) concluyeron que el uso de la 7ª edición del sistema de estadificación del cáncer de pulmón diferenciaba mejor los pacientes de NSCLC operados en subgrupos pronósticos en comparación con la edición anterior, obteniendo tasas de supervivencia a 5 años del 83% para pacientes del estadio IA, 77% para el estadio IB, 72% para el estadio IIA, 52% para el estadio IIB, y 29% para el estadio IIIA, (estadio IIB frente a IIIA, $p = 0,001$). En cuanto al uso de la 6ª edición, Riquet *et al.* (Riquet *et al.*, 1997) encontraron que la tasas de supervivencia a 5 años de los pacientes de NSCLC disminuía conforme aumentaba el

índice T y el estadio de I a III, obteniendo tasas del 65,5% para el estadio I, 54% para el estadio II, 24,3% para el estadio IIIA y 50% para pacientes del estadio IIIB, con diferencias significativas entre los estadios I y IIIA y entre los estadios II y IIIA. Por otro lado, usando la 7ª edición, Li *et al.* (Li *et al.*, 2009) describieron la tasa de supervivencia media a 5 años del 75,5%, 74,6%, 60,9%, 55,6% y 46,2% para pacientes con diámetros tumorales ≤ 2 cm (T1a), > 2-3 cm (T1b), > 3-5 cm (T2a), > 5-7 cm (T2b) y > 7 cm (T3), respectivamente. Estos investigadores también observaron que la tasa de supervivencia a 5 años en pacientes de NSCLC en estadio I tras una resección quirúrgica completa variaba significativamente entre el 55% y el 77,6%. En nuestro estudio, al utilizar el sistema de agrupación recomendado en la 7ª edición, encontramos tasas de supervivencia a 5 años del 83,3% para el estadio IA-IB (n=30/36) y 68,2% para el estadio IIA-IIB (n=15/22) (Tabla 77).

Estadio TNM	n	Pacientes	MS (meses)	%supervivientes		
6ª Edición TNM	I	41 supervivientes	35,5	80,4		
		10 fallecidos	23,1			
		7 muertes postop	-			
		1 perdido	-			
	II	6	3 supervivientes	25,7	60	
			2 fallecidos	14		
			1 muertes postop	-		
	III	7	1 superviviente	16	20	
			4 fallecidos	21		
			1 muerte postop	-		
			1 perdido	-		
	IV	1	1 superviviente	30	100	
	7ª Edición TNM	IA	12 supervivientes	34	85,7	
2 fallecidos			27,5			
IB		25	18 supervivientes	34,2	81,8	83,3
			4 fallecidos	19,8		
			2 muertes postop	-		
			1 perdido	-		
IIA		14	7 supervivientes	42,9	70	
			3 fallecidos	16,3		
			4 muertes postop	-		
IIB		14	8 supervivientes	30	66,7	68,2
			4 fallecidos	24,3		
			2 muertes postop	-		
IIIA		6	1 supervivientes	16	25	
			3 fallecidos	10,5		
			1 muerte postop	-		
	1 perdido		-			

Tabla 77. Tasas de supervivencia a 5 años usando la 6ª y 7ª edición de clasificación TNM, supervivencia media y porcentaje de supervivencia de los pacientes. (n = número de muestras; MS = Media de Supervivencia; % = % del grupo muestral de 73 pacientes; muerte postop = muerte producida durante el postoperatorio; perdido = paciente perdido durante el seguimiento).

Otros factores pueden jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer de pulmón y en la supervivencia de los pacientes. Ejemplo de ello son los estudios realizados por Konaka *et al.* (Konaka *et al.*, 1999), quienes encontraron una relación estadísticamente significativa entre el diámetro del tumor y la profundidad de invasión intrabronquial, indicando que la segunda es una variable importante en el análisis de supervivencia (Chen *et al.*, 2010).

En este estudio, a pesar de que las tasas de supervivencia fueron mayores en los pacientes de SCC en comparación con los pacientes de AC, esta diferencia no fue significativa ($p = 0,162$). Aproximadamente el 80% de los pacientes de SCC en estadio I (T1 N0 M0) resecado permanecieron vivos tras 5 años desde el momento del diagnóstico, frente al 70% de los pacientes de AC del mismo estadio. Otros autores también han encontrado diferencias comparables entre las tasas de supervivencia de pacientes de SCC en estadio II y de pacientes de AC del mismo estadio (Cancer *et al.*, 2015). Sin embargo, Cooke *et al.* (Cooke *et al.*, 2010) observaron que tras un proceso de lobectomía, la supervivencia se reducía significativamente en pacientes de SCC en estadio I y II de la enfermedad frente a los de AC con los mismos estadios ($p < 0,0001$). Por consiguiente, se requieren más estudios para clarificar este aspecto.

Li *et al.* (Li *et al.*, 2009) concluyeron que el índice T es un factor pronóstico independiente y significativo en el estadio I de NSCLC. En nuestro estudio de la supervivencia en función del índice T mediante curvas de Kaplan-Meier, encontramos diferencias significativas entre pacientes cuando se aplicaron los criterios de clasificación TNM de la 6ª edición, pero no cuando se aplicaron los de la 7ª edición. Al analizar la supervivencia como una función tanto del índice T como del estadio TNM, no se encontraron diferencias significativas al utilizar la 6ª edición, aunque sí fue significativa para el estadio IA al utilizar la 7ª edición. Además, al utilizar la 6ª edición (pero no la 7ª), también se encontraron diferencias significativas en la supervivencia para recurrencia tumoral y para el índice T en casos sin recurrencia tumoral.

En el estudio previo de perfiles de expresión génica de AC y SCC primarios llevado a cabo por nuestro grupo de investigación (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011), se determinaron secuencias génicas diferencialmente expresadas en distintos estadios TNM y se identificaron secuencias con significado biológico en progresión tumoral. Posteriormente, en este estudio se validó, mediante qPCR y el test Bonferroni, el nivel de expresión de 92 genes seleccionados, identificando así genes que son expresados diferencialmente en función del tipo tumoral, estadio TNM y grado de diferenciación, obteniendo un Coeficiente de Correlación de Concordancia (CCC) (Carrasco *et al.*, 2003) aceptable entre los niveles de FC obtenidos mediante microarray y qPCR en cada condición (Sanchez-Palencia *et al.*, 2011). Así, en todos los genes validados, el cambio de expresión tuvo lugar en el mismo sentido (sobreexpresión o inhibición) y no hubo variaciones significativas en los niveles de FC en la mayoría de las comparaciones. De los pacientes analizados en el microarray, 40 fueron incluidos en el estudio de supervivencia (12 AC [30%], 28 SCC [70%]); mientras que de los analizados por qPCR, se evaluó la supervivencia de 21 (12 AC [57,1%], 9 SCC [42,9%]). Cabe destacar que en el momento en que se llevó a cabo el estudio previo, aún no se había publicado la 7ª edición del sistema de clasificación TNM, por lo que en esta parte de la investigación se decidió realizar la comparación entre ambas ediciones.

Dentro del conjunto de pacientes analizados por microarray, aquellos que presentaron sobreexpresión de *Pkp1* tuvieron una media de supervivencia de 30,4 meses (16,3 meses para el conjunto de casos de AC frente a 34,6 para los casos de SCC). En contraste, un estudio previo realizado con pacientes de AC de pulmón reveló que la sobreexpresión de *Pkp3* se asociaba con una peor supervivencia y un mayor estadio TNM patológico y clasificación TNM, sugiriendo que la expresión de este gen juega algún papel en el desarrollo del cáncer de pulmón (Furukawa *et al.*, 2005).

Por otro lado, los pacientes que presentaron sobreexpresión de *Krt15* tuvieron una media de supervivencia de 30,9 meses (24,1 meses en AC; 34,1 meses en SCC). En este sentido, Shi *et al.* (Shi *et al.*, 2011) previamente habían observado que la expresión de *Krt15* y otras queratinas estaban sobreexpresadas en SCC de pulmón. Así, las queratinas podrían funcionar como biomarcadores humanos en carcinomas, mejorando la clasificación de los subtipos de cáncer de pulmón de acuerdo a perfiles de queratinas característicos; sin embargo, son necesarios más estudios para definir su participación en SCC de pulmón (Shi *et al.*, 2011; Wieskopf *et al.*, 1995).

La diferencia en los resultados de expresión génica entre métodos analíticos (p. ej., *Pkp1* se encontró sobreexpresado en el 25% [microarray] frente a 50% [qPCR] de las muestras de AC) se debe a los criterios elegidos para considerar que los genes de *Pkp1* y *Krt15* se hallan sobreexpresados. Así, el criterio seguido para considerar que había sobreexpresión tras la validación por qPCR fue que el nivel de FC fuera ≥ 2 veces el nivel medio de FC de la muestra control. Por lo tanto, aunque el sentido del cambio en todas las muestras validadas por qPCR fue el mismo que el encontrado en el microarray, un gen no se consideró sobreexpresado si el nivel de FC medio fue < 2 veces.

Por otro lado, el relativamente pequeño tamaño muestral conforma una limitación de estudio; sin embargo, la mayoría de los pacientes de nuestro análisis se encontraban en estadios TNM tempranos de NSCLC, lo cual es un valor añadido dado la usualmente tardía detección de esta enfermedad.

En el conjunto de pacientes de NSCLC tratados quirúrgicamente de este estudio, los resultados de supervivencia relacionados con la recurrencia tumoral, recurrencia tumoral en función del índice T, y estadio TNM en función del índice T, difirieron significativamente de acuerdo a la edición del sistema de clasificación TNM utilizada (6ª o 7ª edición). Además, se detectó sobreexpresión de *Pkp1* en casi tres cuartas partes (43/59) de los pacientes estudiados, cuya supervivencia media fue de 30,4 meses. Mientras, la sobreexpresión de *Krt15* se halló en una proporción incluso mayor de pacientes (51/59), los cuales presentaron una supervivencia de 30,9 meses. No obstante, serán necesarios más análisis para confirmar estos hallazgos y determinar la precisión del índice T.

7.3. Estudio inmunohistológico

El estudio inmunohistológico proporcionó información detallada de la localización subcelular de PKP1, KRT15 y DSG3 en tumores de NSCLC.

Existen estudios que evidencian y destacan la importancia de los desmosomas y sus componentes en cáncer (Chidgey *et al.*, 2007; Demirag *et al.*, 2011; Neuber *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2006). Dado que la adhesión epitelial es una ruta fundamental en la arquitectura tisular y la diferenciación epitelial, se ha observado que los cambios en las interacciones epiteliales inter y extracelulares están implicados en la carcinogénesis, invasión tumoral y metástasis. Además, se ha propuesto que los genes de adhesión tienen un papel en la susceptibilidad al cáncer y metástasis, y existen cada vez más evidencias de que la modulación de los desmosomas es un paso importante en el inicio e invasividad de los tumores malignos humanos.

El análisis inmunohistológico de las muestras mostró que la expresión de PKP1 y KRT15 generalmente se restringió a carcinomas epidermoides (SCC) y se localizó principalmente en las membranas, aunque también en citoplasma y, en menor medida, en núcleo. La expresión de estas proteínas fue más extensa e intensa en tumores bien-moderadamente diferenciados, especialmente en las membranas. Otros estudios también han demostrado que la tinción de PKP1 es más intensa en áreas mejor diferenciadas que en las no tan bien diferenciadas (Moll *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 2006). Por otro lado, en nuestro conjunto de muestras no se observó tinción de PKP1 ni KRT15 en el citoplasma o membrana de adenocarcinomas (AC), y sólo una pequeña parte de las muestras presentaron tinción nuclear de estas proteínas. Estos resultados apoyan los datos de sobreexpresión de *Pkp1* y *Krt15* en tumores primarios de SCC de pulmón obtenidos mediante la validación del microarray por qPCR, y refuerzan la propuesta de que ambas proteínas sean buenos marcadores de SCC en el diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón.

El patrón de tinción de DSG3 también difirió según el subtipo histológico (AC o SCC), presentando ausencia de tinción en membranas en los casos de AC.

Así, teniendo en cuenta los patrones de tinción de las 3 proteínas, la tinción de membrana fue característica de los SCC de pulmón. Además, DSG3 ha sido propuesta previamente como factor pronóstico en cáncer de pulmón, después de que tinciones negativas de DSG3 se asociaran con una peor supervivencia (Fukuoka *et al.*, 2007). Debido a que los diferentes subtipos de NSCLC requieren diferentes estrategias terapéuticas, un diagnóstico preciso resulta esencial. Por ello, hoy en día se recomienda complementar los criterios morfológicos establecidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud) (Cancer *et al.*, 2015) con técnicas histoquímicas (como la tinción de mucinas) e inmunohistoquímicas junto con test moleculares, siempre que sea posible, especialmente en el caso de tumores pobremente diferenciados y en el análisis de muestras de biopsias pequeñas (Travis *et al.*, 2013). Dado que una alta proporción (hasta del 70%) de carcinomas de pulmón no son resecables en el momento de su diagnóstico (Travis *et al.*, 2013), a menudo la biopsia es el único material disponible para el correcto subtipaje de la neoplasia. Por ello, este estudio se llevó a cabo con pequeñas biopsias incisionales obtenidas durante la cirugía.

Se considera que la mayoría de las biopsias pequeñas pueden ser subtipadas mediante la combinación de un marcador de AC (TTF-1) y un marcador de SCC (p63 o p40) (Bishop *et al.*, 2012; Pelosi *et al.*, 2012; Travis *et al.*, 2013). Los estudios de secciones de tejido completo indican que los SCC presentan un inmunofenotipo relativamente preciso, siendo negativos para TTF-1 y positivos para p63, KRT5/6 y 34βE12. Por el contrario, los AC son mucho más heterogéneos y sólo se considera característica la positividad difusa para TTF-1 debido a que un porcentaje considerable de los AC pueden expresar marcadores que se consideran típicos de SCC, como p63 (32%), KRT5/6 (18%) y 34βE12 (82%). De este modo, aunque son útiles, ninguno de los marcadores de SCC es completamente específico (Rekhtman *et al.*, 2011). Sin embargo, p40 sí ha demostrado ser mucho más específico para el diagnóstico de SCC (98%), aunque una pequeña parte de AC (3%) puede ser también positiva para este marcador (Bishop *et al.*, 2012).

En este estudio, PKP1 y DSG3 mostraron una alta especificidad para marcar membrana y KRT15 presentó una alta sensibilidad para teñir membrana y citoplasma en las muestras de SCC testadas, lo cual es indicativo de que estas proteínas pueden ser útiles en el diagnóstico diferencial de NSCLC. No obstante, el uso de estos tres marcadores es aconsejable en

combinación con marcadores ya establecidos debido a la menor sensibilidad de PKP1 y DSG3 y su distribución irregular, marcando predominantemente áreas mejor diferenciadas. Esta mayor expresión en áreas mejor diferenciadas también puede ser importante a la hora de establecer el grado de diferenciación, especialmente en muestras pequeñas o artefactadas.

La comparación de los resultados de estos tres marcadores con los de marcadores ya establecidos para SCC (p40, p63, KRT5/6, 34bE12) es difícil debido a que los criterios usados para considerar un marcador como positivo varían entre los distintos estudios. En este trabajo se realizó una doble evaluación, teniendo en cuenta la intensidad de tinción y porcentaje de células teñidas, mientras que otros autores realizan valoraciones cuantitativas (>10% de células teñidas) (Mukhopadhyay *et al.*, 2011; Tacha *et al.*, 2012).

Los resultados de marcaje de este estudio revelaron características de las uniones intercelulares que son particulares del epitelio escamoso estratificado y de neoplasias con este tipo de diferenciación, tales como los SCC; y además estos resultados fueron consistentes con investigaciones previas (Boelens *et al.*, 2007) donde se observan fuertes incrementos en la expresión de ARN y proteína de DSP, PG y DSC3 en SCC, mientras que tejido bronquial normal y AC revelaron una ausente o relativamente baja expresión de DSP y DSC3 pero una expresión de PG similar a la observada en SCC, lo que podría estar relacionado con su papel de unión a filamentos de actina en uniones adherentes (o zonula adherens) (Cowin *et al.*, 1986). Otros investigadores han encontrado expresión de PKPs en varios tipos histológicos de cáncer, como SCC oral y faríngeo y AC colorrectal, pancreático y prostático (Schwarz *et al.*, 2006); y observaron que la expresión de PKP1 era característica de SCC y que el nivel de expresión se correlacionaba inversamente con el grado de malignidad. Además, encontraron inmunorreactividad nuclear focal para PKP1 en algunos SCC y carcinomas hepatocelulares. En cuanto al resto de PKPs, en el citado estudio observaron que PKP2 se expresaba en todos los AC testados y la expresión de PKP3 era frecuente, mientras que PKP1 se expresó sólo en los AC de próstata.

Aunque se requieren más estudios para poder definir completamente la relación entre PKP1, KRT15, DSG3 y otros componentes desmosomales con el comportamiento metastásico del cáncer de pulmón, el hecho de que exista una fuerte expresión de estas proteínas en SCC y que se distribuyan en las membranas, podría estar asociado con que en los SCC haya menor frecuencia de metástasis y aparezcan de manera más tardía que en AC. En este estudio, se pudo observar una relación entre la presencia/ausencia de estas proteínas en la membrana de SCC y el grado de diferenciación, encontrando una mayor intensidad de tinción en las áreas mejor diferenciadas de los tumores. De este modo, la medición de la expresión de PKP1, KRT15 y DSG3 podría ser útil en el diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón.

7.4. Ensayos funcionales

Para desarrollar estrategias de tratamiento más sofisticadas y mejorar el pronóstico de los pacientes, es necesario estudiar ampliamente los mecanismos moleculares que subyacen la carcinogénesis del cáncer de pulmón (Takahashi *et al.*, 2012). Con este fin, muchos investigadores en los últimos años han tratado de identificar y caracterizar genes asociados específicamente a tumores, desarrollando nuevas drogas anti-cáncer dirigidas contra dianas moleculares específicas. El hecho de determinar correctamente los mecanismos de acción de

tales drogas y la especificidad de las mismas, garantiza la minimización de los efectos secundarios (Furukawa *et al.*, 2005).

Siguiendo estas premisas, nuestro grupo de investigación ha tratado de validar mediante una serie de ensayos funcionales el papel en el proceso tumorigénico del gen *Pkp1*, el cual se encontró diferencialmente expresado y ha sido propuesto como marcador de SCC de estadio I tras el análisis de expresión de muestras tumorales de NSCLC mediante microarray y posterior validación por qPCR y ensayos inmunohistoquímicos.

Gracias a todo este conjunto de aproximaciones, determinamos que *Pkp1* se encontraba altamente sobreexpresado en las muestras primarias de SCC de pulmón estudiadas por nuestro grupo de investigación, lo cual fue refrendado también con datos bioinformáticos de estudios independientes realizados por otros investigadores en muestras primarias (Bhattacharjee *et al.*, 2001; Gemma *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2010; Kuner *et al.*, 2009; Miyanaga *et al.*, 2008; Wachi *et al.*, 2005) y obtenidos a través de diversas bases de datos. En todos los casos, los perfiles de expresión génica claramente diferenciaron las muestras de acuerdo al subtipo histológico, lo que subraya lo diferentes que son las histologías de SCC y AC respecto a los cambios genéticos y, probablemente, el tipo celular de origen (Angulo *et al.*, 2008).

Nuestros datos también fueron respaldados por datos de microarrays de estudios independientes de colaboradores de nuestro grupo realizados en tumores primarios (código de acceso GEO, GSE8569) (Angulo *et al.*, 2008), donde *Pkp1* fue el gen más sobreexpresado en la comparación de muestras de SCC frente a las de AC y tejido normal (FC = 27) seguido por *Dsc3* (FC = 20). Estos datos refuerzan la propuesta de la potencial utilidad de *Pkp1* en el diagnóstico histopatológico.

Con respecto a las líneas celulares de cáncer de pulmón, sin embargo, los niveles de expresión de *Pkp1* observados por qPCR y Western Blot habitualmente fueron bajos o casi inexistentes, lo que fue también observado por otros investigadores en diversos arrays (Gemma *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2009; Miyanaga *et al.*, 2008) y PCRs semicuantitativas (Furukawa *et al.*, 2005). No obstante, de las líneas que expresaron niveles detectables de *Pkp1*, la mayoría pertenecieron al subtipo SCC. Bases de datos como la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) del *Broad Institute*, la cual cuenta con datos de más de 1000 líneas celulares, también ponen de manifiesto la baja expresión de *Pkp1* en líneas de NSCLC (aunque existe cierta variabilidad) y muestran que los mayores niveles de expresión de este gen se encuentran entre las líneas celulares tumorales de sarcoma de Ewing, de aparato aerodigestivo superior y de esófago.

De manera similar, el tejido pulmonar normal presenta una expresión de *Pkp1* relativamente baja que nuevamente puede observarse en investigaciones independientes (Angulo *et al.*, 2008; Bhattacharjee *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2010; Wachi *et al.*, 2005), situándose en la posición n° 11 del *ranking* según la base de datos *Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal* del *NIH*, el cual estaría encabezado por los tejidos de piel y esófago.

Las discrepancias encontradas en los niveles de expresión de *Pkp1* entre tumores primarios y líneas celulares no son algo inusual, ya que las líneas celulares derivadas de tumores a menudo presentan diferencias genómicas (Domcke *et al.*, 2013) y no son representativas del espectro clínico del tipo de cáncer del que han sido derivadas, a pesar de ser una de las herramientas más utilizadas en investigación. En clínica, el cáncer es clasificado según el estadio

y grado de diferenciación. Sin embargo, los cánceres que producen líneas celulares continuas tienden a presentar un crecimiento rápido, un estadio avanzado de la enfermedad y tumores pobremente diferenciados que han acumulado una serie de mutaciones necesarias para el crecimiento indefinido *in vitro*. De hecho, existen pocas líneas celulares derivadas de tumores primarios bien diferenciados, aunque estos representan la mayor parte de algunos tipos de cánceres como el cáncer de vejiga.

Los cambios genéticos necesarios para la inmortalización celular son, en su mayoría, eventos tardíos en la progresión tumoral, por lo que no sorprende que muchos tumores primarios no sean inmortales. Además, no es habitual el desarrollo de líneas a partir de tumores de crecimiento lento. Por todo ello, los tiempos de duplicación de las líneas celulares tumorales generalmente son cortos y reflejan una mayor dificultad para establecer estas líneas de crecimiento lento, y la preferencia de la comunidad científica por las líneas de rápido crecimiento y fáciles de manipular.

Existen estudios preocupantes en los que los datos muestran que las líneas celulares crecidas *in vitro* o *in vivo* son más parecidas entre sí, independientemente del tejido de origen, que a las muestras clínicas a las que se supone que sirven de modelo (Gillet *et al.*, 2011).

Es también frecuente que sublíneas que derivan de una misma línea celular tumoral difieran fenotípica y genotípicamente. Esto es debido, en primer lugar, a que estas líneas constantemente generan variantes fenotípica y genotípicamente diferentes de la población predominante. Si estas células se cultivan continuamente durante muchas generaciones, los clones de crecimiento más rápido pueden ser seleccionados a pesar de que sean menos representativos en la población. En segundo lugar, cuando las células se someten a cambios de ambiente (medio, suero, tripsina, niveles de CO₂, humedad y temperatura), incluso intercambios entre laboratorios, pueden seleccionarse las variantes mejor adaptadas a estas nuevas condiciones (Masters, 2000).

Por todos estos motivos el uso líneas celulares, aun siendo una herramienta muy útil, presenta ciertas limitaciones. Por ejemplo, en el estudio de los cambios asociados a la progresión tumoral, la mayoría de líneas suelen haber adquirido ya todos los cambios necesarios para metastatizar (Masters, 2000); en los estudios de citotoxicidad de drogas, las líneas son más sensibles que sus correspondientes tumores sólidos y, en muchos estudios, existe una mayor resistencia a citotoxinas cuando las células son crecidas en cultivos tridimensionales sólidos que cuando se crecen en monocapa, lo cual se cree que es debido a que los tumores sólidos son adherentes y relativamente inertes (bajo potencial de síntesis proteica) (Stein *et al.*, 2004); en el análisis de transcriptomas en ensayos de resistencia a multidrogas, todas las líneas tumorales presentaron sobreexpresión de genes que facilitarían la supervivencia de las mismas en comparación con muestras primarias (Gillet *et al.*, 2011). Todas estas razones explican las diferencias halladas entre muestras primarias y líneas celulares.

En cuanto a expresión génica, es bien conocido que *Pkp1* interactúa o colocaliza con varias proteínas del complejo desmosomal (Bornslaeger *et al.*, 2001). Por ello, estudiamos el patrón de expresión del resto de miembros de la familia de las placofilinas (*Pkp2*, *Pkp3* y *Pkp4*) y otras proteínas desmosomales principales (*Dsg1* y *Dsp*) mediante PCR semicuantitativa. Al igual que en estudios de *Pkp3* (Furukawa *et al.*, 2005), no se observaron correlaciones entre la expresión génica de *Pkp1* y los otros componentes desmosomales testados en líneas celulares

de pulmón. Esto sugiere que la activación de *Pkp1* podría ser independiente del complejo desmosomal asociado al mismo y mediaría el crecimiento y/o invasión de las células de cáncer de pulmón a través de la interacción con otras proteínas.

No obstante, los patrones de expresión resultaron ser algo diferentes a los encontrados por otros investigadores (Furukawa *et al.*, 2005) para las mismas líneas celulares y genes, quizás debido a la utilización de oligonucleótidos diferentes a los usados por dichos investigadores.

Aunque la mayoría de las células contienen tanto PKP1a como PKP1b (Schmidt *et al.*, 1997), las líneas celulares seleccionadas para este estudio (SK-MES-1 y EPLC-272H) así como las muestras de tejidos sanos utilizadas, tan sólo expresaron la isoforma PKP1a, la cual se detecta tanto en desmosomas como en núcleo, tal y como corroboran los datos de inmunocitoquímica aquí presentados. Esto sugiere que el procesamiento postranscripcional de PKP1 está involucrado en regular la localización y función del mismo (Hatzfeld, 2010; Munoz *et al.*, 2014; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010). Además, se comprobó que PKP1a no se encontraba alterada en ninguno de los casos testados, observando únicamente algunos polimorfismos sinónimos que no afectaron en ningún caso la secuencia aminoacídica de la proteína.

El conjunto de ensayos funcionales de *Pkp1* llevados a cabo en este estudio demuestran la implicación de dicho gen en el incremento del crecimiento y la progresión tumoral en el cáncer de pulmón. Algunas proteínas de la familia armadillo, como las cateninas clásicas, han sido también estudiadas por su relación e importante función en el desarrollo fetal y carcinogénesis. Asimismo, otras PKPs como *Pkp3* han mostrado desempeñar un papel oncogénico y ser dianas moleculares potenciales para el tratamiento de cánceres de pulmón, pudiendo servir como marcadores pronósticos de forma similar a la que presenta *Pkp1* en este trabajo. Además, la localización subcelular de PKP1 y otras PKPs y proteínas relacionadas con p120-catenina en el núcleo y citoplasma (a pesar de no estar bien definidas), así como en uniones intercelulares, implica un amplio abanico de funciones para estas proteínas en diferentes compartimentos celulares (Furukawa *et al.*, 2005); y su redistribución de la membrana al citoplasma durante el desarrollo tumoral reafirma el papel oncogénico de las PKPs (Dusek *et al.*, 2011).

Así, el silenciamiento génico de *Pkp1*, el cual se demostró por diversos métodos, disminuyó significativamente la proliferación celular entre un 15 y un 20%, redujo el número y tamaño de las colonias formadas, produjo parada del ciclo celular (entre un 11 y un 16%) con alteraciones en los niveles de expresión de *p16* y *p21* e incrementó la apoptosis por la vía de la activación de la caspasa 3 dando lugar a un aumento de la mortalidad 4,5 veces superior. En algunas líneas incluso produjo cambios en la morfología celular. Por el contrario, la sobreexpresión de *Pkp1* mediante transducción vírica de células sin expresión basal del mismo, incrementó significativamente la proliferación de las mismas en un 30%.

Debido a que *p16* inhibe a los complejos CDK4, 6-ciclina D, interponiéndose entre ellos, la célula no es capaz de pasar el punto de restricción y se impide que el ciclo progrese de la fase G1 a S. De igual modo, la síntesis de *p21*, la cual se une a CDK2 y ciclina E, inhibe la acción del complejo e impide que la célula pase a la fase S. Así pues, el aumento de expresión de *p16* y *p21* que sufren las células SK-MES-1 tras el silenciamiento génico de *Pkp1* produce la parada del ciclo celular en la fase G0-G1. Por otro lado, teniendo en cuenta que *p21* se encarga también de la inhibición de cualquier complejo CDK- 1,2, 4 y 6-ciclina, en el punto G2-M; los patrones de

expresión de *p16* y *p21* observados en las células EPLC-272H tras el silenciamiento génico de *Pkp1* explican la parada en G2-M.

Con el objetivo de detectar pequeños cambios en la tasa de proliferación debidos a la alteración de la expresión génica de *Pkp1*, se llevó a cabo un ensayo de competencia de crecimiento celular. Dichos ensayos han demostrado ser una metodología sensible que puede llegar a detectar significativamente variaciones de incluso el 10% de la tasa de proliferación, fácil de usar y controlada internamente para evaluar efectos sutiles en la proliferación de transducciones lentivirales y expresión transgénica. Este ensayo se basa en el crecimiento competitivo que se establece entre células positivamente transducidas y células no transducidas. De este modo, los genes reporteros son una medida directa de la tasa de proliferación celular, lo que otorga a esta técnica la capacidad para evaluar la seguridad de terapias génicas en base al impacto negativo de efectos inespecíficos (*off-target*) de shRNAs, saturación de la ruta de ARNs interferentes (más conocidos por sus siglas en inglés, *RNAi*) y alteración de la regulación de microARNs por sobreexpresión de shRNAs, respuestas inmunes innatas desencadenadas por sobreexpresión de shRNAs, alteración de cofactores y efectos adversos debidos a la integración genómica (esto es especialmente relevante en casos de eficiencias de transducción muy altas, incluso para los controles *Scramble*) (Eekels *et al.*, 2012). Desafortunadamente, los resultados del ensayo de competencia de crecimiento celular no fueron capaces de reflejar los cambios observados previamente en la tasa de proliferación de células SK-MES-1 con niveles de expresión de *Pkp1* alterados. La estabilización del crecimiento, tanto de las poblaciones aisladas como las mezclas o poblaciones mixtas a lo largo del tiempo, pudo deberse a distintos factores.

En el caso de células SK-MES-1 transducidas lentiviralmente con el sistema pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1, sólo se produjo un silenciamiento de *Pkp1* cercano al 50% mientras que con el sistema de siRNA se obtenía una inhibición de aproximadamente el 90% de la expresión basal de dicho gen. Así, teniendo en cuenta que los resultados de un 15% de decrecimiento de la proliferación fueron obtenidos con silenciamientos génicos cercanos al 90%, cabe la posibilidad de que el sistema lentiviral no fuese lo suficientemente eficiente inhibiendo *Pkp1* como para que esto repercutiera visiblemente en la proliferación celular.

Por otro lado, aunque el sistema pLVX-IRES-ZsGREEN1 demostró ser muy eficiente para la sobreexpresión de *Pkp1a*, incrementando los niveles del mismo entre 20 y 40 veces por encima del basal, tampoco se observó un impacto en la proliferación celular. Esto podría ser debido a que la sobreexpresión de *Pkp1a* para el ensayo de competencia se llevó a cabo en la línea celular SK-MES-1, la cual ya expresa de manera basal niveles de *Pkp1* endógeno relativamente importantes. Así pues, la expresión de *Pkp1* habría llegado a un nivel máximo, por encima del cual no provocaría ningún efecto adicional sobre la proliferación por saturación del sistema celular. En apoyo a esta hipótesis, cuando la sobreexpresión de *Pkp1a* se llevó a cabo en la línea celular H2170 (SCC de pulmón), la cual no expresa basalmente *Pkp1*, sí se observó un incremento significativo de la proliferación del 30%.

A pesar de que el sistema de sobreexpresión pLVX-IRES-ZsGREEN1 demostró ser útil en líneas como H2170, se descartó realizar el ensayo de competencia de crecimiento celular entre células SK-MES-1 que incorporaran el sistema pLVX-IRES-tdTomato-shRNA-PKP1 y células H2170 con el sistema pLVX-IRES-ZsGREEN1-PKP1A, debido a que cambios en la tasa de proliferación

podrían ser debido no sólo a alteraciones en los niveles de expresión de *Pkp1*, sino también a diferencias entre los tiempos de duplicación de ambas líneas.

Otros autores también han correlacionado la inhibición de *Pkp1* con una menor proliferación y tamaño celular a través de su función de regulación de la traducción mediante la actividad de eIF4A1. Estos investigadores evidenciaron que el silenciamiento de *Pkp1* daba lugar a células de un tamaño menor que las control y a una menor proliferación (Wolf *et al.*, 2010b). Nuestros resultados de citometría de flujo no mostraron variaciones en el tamaño celular de ninguna de las líneas testadas tras la inhibición de *Pkp1*. Únicamente se observaron cambios morfológicos en la línea celular HaCaT, la cual sufrió un incremento del tamaño celular que contrasta con los resultados de estos otros autores.

En general, también se ha analizado el contenido de otras PKPs y proteínas del desmosoma en cultivos deficientes de *Pkp1*, observándose que no existía una compensación de la pérdida de expresión de PKP1 llevada a cabo por otras proteínas. De manera similar, el análisis de secciones histológicas revela distintos patrones de expresión específicos de tejido entre las PKPs. Así, PKP1 se localiza en el núcleo de SCC orales y faríngeos, mientras PKP2 muestra una expresión nula o leve que suele restringirse a las células tumorales más periféricas; y PKP3 presenta un patrón similar al de PKP1 y su expresión se correlaciona inversamente con el grado de malignidad tumoral. Por otro lado, en el estudio de AC de diferentes órganos, como colon y páncreas, no fue posible detectar PKP1 (excepto levemente en próstata) y, sin embargo, PKP2 y PKP3 se encontraron expresados frecuentemente (Mertens *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2006), a veces asociados a un cambio de la tinción desmosomal apical hacia una localización lateral casi completa. En el caso de tumores y células de NSCLC se observó una alta expresión de PKP3 (Neuber *et al.*, 2010). La visión global de todos estos datos sugiere que, a pesar de solapar funcionalmente en cierta medida, cada PKP juega un papel distinto que no puede ser sustituido o asumido completamente por otra PKP (Neuber *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2005; South *et al.*, 2003).

De manera similar a *Pkp1*, la inhibición de *Pkp3* en células de NSCLC redujo la formación de colonias, la viabilidad celular y suprimió el crecimiento celular significativamente; mientras que su sobreexpresión produjo el efecto contrario, potenciando la proliferación e invasividad celular, un patrón de crecimiento multicapa, la formación de colonias más grandes y provocando, también, un cambio en la morfología mediante la aparición de protrusiones celulares (Furukawa *et al.*, 2005; Neuber *et al.*, 2010). La sobreexpresión de *Pkp3* incluso se relacionó con una peor supervivencia en los pacientes de AC de pulmón, algo que no ha sido posible demostrar para *Pkp1* en esta investigación y que significaría un fenotipo altamente maligno de las células cancerosas con altos niveles de dicho producto génico. En el caso de *Dsg3*, el cual se ha descrito previamente como un oncogén del cáncer de cabeza y cuello, la inhibición del mismo nuevamente redujo el crecimiento celular, produjo un arresto celular en fase G0-G1 y disminuyó la capacidad migratoria e invasiva, sugiriendo un papel oncogénico a través de la ruta DSG3-PG-LEF/TCF (Chen *et al.*, 2013). Asimismo, el aumento de los componentes del desmosoma promovió la proliferación, inhibió la apoptosis e incrementó la invasión en algunos casos (Dusek *et al.*, 2011).

Durante la embriogénesis, los desmosomas se forman posteriormente a la zonula adherens, pero su importancia biológica es subrayada por la letalidad embrionaria que muestran los ratones transgénicos *knockout* de PG y DSP (South *et al.*, 2003). En cuanto a las PKPs,

tradicionalmente se las ha considerado proteínas no esenciales. Sin embargo, está bien definido que mutaciones en *Pkp1* producen una enfermedad autosómica recesiva llamada *Displasia Ectodérmica* o *Fragilidad de la Piel*, lo cual sugiere funciones asociadas a la regulación de la morfogénesis epidérmica. Recientemente han sido descritos modelos murinos deficientes para *Pkp1*. Estos ratones nacieron con un 20% menos de peso que los control, probablemente debido a defectos en el desarrollo del tejido adiposo subcutáneo, pero aparentemente normales. Sin embargo, su estado empeoró rápidamente y todos murieron en menos de 24 horas, desarrollando lesiones epidérmicas en ausencia de traumatismos mecánicos evidentes (muy similares a las observadas en el fenotipo humano) y sus células contenían desmosomas pequeños y dispersos, alteraciones en la zonula ocludens con pérdida de la homeostasis tisular, menor resistencia transepitelial y menor tasa de proliferación. Estos datos, sobretodo el bajo peso de nacimiento y la caída en la tasas de proliferación, apuntan que *Pkp1* cumple con una función esencial *in vivo* de control del crecimiento e integridad epidérmica, a través de desmosomas y zonula ocludens, que es crucial en procesos como la cicatrización y la carcinogénesis epidérmica (Rietscher *et al.*, 2016). De manera similar, ratones *Pkp2*^{-/-} sufren letalidad embrionaria alrededor del día 11 de gestación, aunque en esta ocasión es debido a afecciones cardíacas (Hatzfeld, 2007). Sin embargo, la extirpación de *Pkp3* produce un fenotipo leve con anormalidades capilares e inflamación cutánea (Wolf *et al.*, 2010a).

De forma similar, ratones transgénicos *knockout* de las tres isoformas de DSC difieren mucho en la severidad de los fenotipos que producen: mientras que ratones *Dsc2*^{-/-} no presentan un fenotipo obvio, los ratones *Dsc1*^{-/-} son viables y fértiles pero muestran alteraciones cutáneas similares a las de los ratones *Pkp1*^{-/-}; y los *Dsc3*^{-/-} sufren letalidad preimplantacional que sugiere un papel independiente del desmosoma durante el desarrollo temprano (Rietscher *et al.*, 2016).

Los datos aquí presentados, tomados en conjunto con lo publicado en la bibliografía previa, fuertemente apuntan a una función oncogénica de *Pkp1* en NSCLC similar a la descrita previamente para *Pkp3* por otros investigadores. A diferencia de este último, la función oncogénica no se llevaría a cabo a través de la interacción con DNMT1L, sino a través de otras proteínas citoplasmáticas (diferentes de los componentes desmosomales) y proteínas nucleares, asociando características agresivas a estos tumores a la vista de los resultados obtenidos.

Aunque los mecanismos moleculares subyacentes no han podido ser desvelados completamente en nuestras observaciones, una posibilidad es que las rutas implicadas en la tumorigenicidad de *Pkp1* sean la vía de señalización de PI3K/AKT2, donde PI3K juega un papel clave aguas debajo de la cascada de señalización de muchos receptores como el de la insulina o el de factores de crecimiento tipo insulina (Wolf *et al.*, 2010a). Esta ruta sería muy similar a la de la regulación de la β -catenina-LEF/TCF a través de la ruta de señalización de *Wnt* (Delva *et al.*, 2009; Dusek *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2013). La otra ruta implicada sería la regulación de la traducción dependiente del factor de inicio de la traducción eIF4A1, la cual está correlacionada con una función reguladora del tamaño y proliferación celular (Wolf *et al.*, 2010b). En relación a esta implicación en la traducción, cabe destacar que las moléculas de PKP1 y PKP3 localizadas en citoplasma son componentes de las partículas ribonucleoprotéicas del ARNm (RBPs, del inglés), lo que sugiere que PKP1 y PKP3 actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica, ya que todas estas RBPs contribuyen a la estabilidad del ARNm y regulan la traducción (Yang *et al.*, 2013). Apoyando esta posible función de las PKPs en la traducción se encuentra, además, el hecho de que existe correlación entre los niveles de expresión de PKP1 y

PKP3, y los niveles proteicos de PKP2 y DSP; siendo PKP3 un posible regulador de la traducción de PKP2 y otros ARNm específicos (pues las tasas globales de traducción no se vieron alteradas). La interacción entre las PKPs y ARN podría ser directa, a falta de motivos de unión a ARN, a través de interacciones electroestáticas directas debidas a la alta alcalinidad y punto isoeléctrico de las PKPs, de forma similar a la encontrada para otras proteínas de unión a ARN que carecen de los dominios canónicos (Fischer-Kešo *et al.*, 2014; Hofmann *et al.*, 2006).

De acuerdo con el hecho de que la pérdida de adhesión celular contribuye a la progresión tumoral, existen también evidencias de la pérdida de expresión de proteínas desmosomales en tumores. Por ejemplo, DSG1-3, DSC2, DSC3, PG, PKP1-3 y DSP se encuentran inhibidos en diversos cánceres epiteliales como cánceres de piel, cabeza y cuello, gástrico, colorrectal, vejiga, mama, próstata, cervical y endometrial y frecuentemente se correlacionan con estadios avanzados de la enfermedad, incrementando la metástasis y/o un peor pronóstico. De forma similar, deficiencias en PERP promueven el desarrollo y progresión tumoral por varios mecanismos (p. ej., en casos de inactivación de *p53* o *p63*). También se ha encontrado una disminución en los niveles de PKP1 y 3 en varios tipos de cáncer, pudiendo ser debida a una metilación aberrante y el subsecuente silenciamiento génico, y que se ha correlacionado con inestabilidad del desmosoma, menor adhesión celular, aumento de la migración y, nuevamente, peor pronóstico en los pacientes. Curiosamente, en este contexto, la reexpresión de PKP1 en queratinocitos *Pkp1*^{-/-}, o bien, la sobreexpresión del mismo en queratinocitos control retardó la migración celular pero no afectó a las tasas de crecimiento (South *et al.*, 2003). Del mismo modo, líneas de SCC orales que expresaban bajos niveles de PKP1 mostraban una mayor movilidad celular, que disminuía con la expresión ectópica de PKP1; mientras que líneas de SCC orales que expresaban niveles de PKP1 más altos aumentaban la invasividad y migración al silenciar *Pkp1* (Neuber *et al.*, 2010; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2007). En cuanto a PKP2, no se ha observado un efecto supresor tumoral del mismo en ningún tipo de célula tumoral (Takahashi *et al.*, 2012). Los resultados relativos a las PKPs contrastan fuertemente con los hallados en esta y otras investigaciones dentro del escenario tumoral.

Esta dualidad de PKP1 dependiente de contexto observada en carcinogénesis, puede ser explicada por desequilibrios entre las rutas implicadas en tumorigénesis y supresión tumoral, y probablemente también otras desconocidas que puedan estar involucradas. Esta hipótesis del doble papel de PKP1 en cáncer, propuesta por Wolf *et al.* en 2013 (Wolf *et al.*, 2013), plantea que el papel oncogénico o supresor tumoral que desempeña PKP1 está relacionado con la localización subcelular del mismo, y que dicha localización podría depender de su estado de fosforilación. Así, PKP1 jugaría una función estructural y un papel de protección frente al cáncer en los desmosomas, mientras que en el citoplasma (y posiblemente en el núcleo) estimularía la proliferación como un oncogén a través de la liberación de componentes con potencial oncogénico y de la activación de rutas de señalización implicadas en el desarrollo tumoral (Dusek *et al.*, 2011).

Los datos de inmunocitoquímica obtenidos en esta investigación revelaron una fuerte y heterogénea localización subcelular de PKP1 en núcleo (a excepción de los nucleolos) que mostró ser específica tras el silenciamiento génico de *Pkp1*. Esta localización nuclear ha sido verificada por diferentes autores y aunque aún no se conoce el papel que juega en esta localización, el hecho de que PKP1 se encuentre en el núcleo es indicativo de una posible función de señalización, tal y como se ha demostrado para otros miembros de la familia armadillo (Peifer *et al.*, 1994; South *et al.*, 2003). Resulta muy interesante la investigación llevada a cabo en

muestras tumorales de SCC orales y faríngeos en la cual se observó la localización nuclear de PKP1, mientras que en las muestras de epitelio escamoso no neoplásico adyacente no hubo marcaje nuclear de PKP1 (Neuber *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2006). La interacción *in vitro* de PKP1 y ADN de cadena sencilla (*ssDNA*, del inglés) sugiere, además, una función de protección celular frente a daño del ADN (Hatzfeld, 2010; Munoz *et al.*, 2014; Sobolik-Delmaire *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2010a). Otros miembros de la misma familia parecen jugar también importantes funciones en el núcleo. Ejemplo de ello es PKP2, la cual es capaz de participar en la transcripción génica (Bass-Zubek *et al.*, 2009) y asociarse con la subunidad mayor de la ARN polimerasa III y el factor de transcripción TFIIB (Mertens *et al.*, 2001; South, 2004; South *et al.*, 2003).

Asimismo, PKP1 presenta también una localización citoplasmática difusa que se acentuaba durante la mitosis en células no silenciadas y una fuerte presencia de la proteína en los desmosomas, la cual se hizo más evidente tras el silenciamiento debido a la disminución general de la señal celular.

La inmunocitoquímica también demostró distintos patrones de expresión de DSG3 y E-cadherina en las líneas celulares modelo de SCC de pulmón, siendo ambas negativas en SK-MES-1 y positivas en EPLC-272H. Debido a que PKP1, a pesar de incrementar el contenido de proteínas desmosomales por su función reclutadora, no afecta a los niveles de proteínas de la zonula adherens tales como E-cadherina o β -catenina ni de queratinas (South *et al.*, 2003), los diferentes patrones de expresión observados podrían suponer que ambas líneas tienen diferente grado de *transición epitelio-mesénquima* (EMT, del inglés), el cual tiene especial relevancia en la metástasis de células tumorales.

La EMT comprende una serie de alteraciones en la fisiología y morfología celular necesarias para la adquisición de un fenotipo tumoral. Entre estas alteraciones se incluye la pérdida de expresión de E-cadherina por diversos factores (alteraciones genéticas, hipermetilación del promotor o mediante factores de transcripción) y, consecuentemente, la afectación de la adhesión intercelular basada en esta proteína y de rutas de señalización, fundamentalmente la ruta de *Wnt*. Asimismo, se verían afectadas la polaridad, diferenciación, migración, proliferación y supervivencia de las células epiteliales.

Existen diversos estudios, además, que relacionan las PKPs con la EMT. Por ejemplo, PKP3 parece estar inhibida por ZEB-1, un potente represor de la expresión de E-cadherina que está también implicado en EMT al menos en cáncer de mama. Y algo parecido sucede con PKP2 y ZEB-2 en cáncer de colon (Neuber *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2012). La relación entre ZEB y las PKPs sugiere que hay una regulación común para desmosomas y zonula adherens durante la EMT y progresión tumoral (Wolf *et al.*, 2010a).

Las diferencias de expresión de DSG3 y E-cadherina entre SK-MES-1 y EPLC-272H pueden ser debidas al distinto origen de las líneas. Mientras que EPL-272H deriva de un carcinoma escamoso de pulmón no diferenciado obtenido mediante cirugía de un varón caucásico de 57 años que no recibió radio ni quimioterapia previamente (año 1986), SK-MES-1 deriva de una efusión pleural de un varón caucásico de 65 años (año 1970); es decir, SK-MES-1 tiene un origen metastásico que explicaría la ausencia de expresión de DSG3 y E-cadherina.

No obstante, muchos tumores malignos mantienen la expresión de E-cadherina y, en los cánceres de origen epitelial, la adquisición de características mesenquimales no suele ser

completa, por lo que existe controversia sobre la relevancia del fenómeno de EMT en los procesos neoplásicos (Suárez Nieto, 2007). La teoría más aceptada por el momento es un modelo de progresión tumoral en dos pasos. Por un lado, la invasión local se debería a la pérdida de los desmosomas y sería independiente de la EMT. Seguidamente, la progresión tumoral completa sería a causa de la inhibición de la zonula adherens (Dusek *et al.*, 2011).

Los resultados de inmunocitoquímica presentados en este trabajo mostraron, además de los patrones de tinción nuclear, citoplasmática y desmosomales mencionados, distintos patrones de fuerte señal (incluso mayor a la de los núcleos más intensos de la muestra) que podrían corresponderse con los cuerpos medios (*midbodies*), los cuales están presentes al final de la citocinesis; y con los cinetocoros, los cuales aparecen con un patrón punteado intenso durante la profase y metafase, desapareciendo en el resto de fases mitóticas como anafase y telofase. Se halló además un incremento de la señal citoplasmática y periférica de PKP1 debido a la diseminación de la proteína nuclear durante la mitosis. La sobreexpresión lentiviral de PKP1A y posterior aislamiento de las células positivas mediante *Cell Sorting*, confirmó la aparición de estas estructuras; e incluso, tras la sobreexpresión de la proteína de fusión PKP1A-EGFP, se apreciaron *in vivo* núcleos muy lobulados, teñidos fuerte pero heterogénea y granularmente, con nucleolos no marcados; y marcaje citoplasmático y periférico de células en división. También se observaron múltiples vesículas citoplasmáticas que podrían relacionar PKP1 con el transporte celular, una motilidad celular significativamente alta y estructuras bipolares semejantes a centrosomas. Además, se advirtió que PKP1 fue rápidamente excluido del núcleo durante la apoptosis. Esta reorganización desde el núcleo y los desmosomas hacia el citoplasma, ya había sido descrita previamente para las proteínas desmosomales, incluyendo PKP1, en células inducidas a apoptosis. Una vez en el citoplasma, PKP1 parecía ser rápidamente degradada sugiriendo que podría estar alterada una función de señalización de PKP1 (Schmidt *et al.*, 2005; Weiske *et al.*, 2001). También son conocidos cambios de localización de p120 y β -catenina, así como de las proteínas que interactúan con ellas, durante el desarrollo del cáncer, promoviendo o inhibiendo la transformación maligna (Fischer-Kešo *et al.*, 2014); y el traslado de la PG del citoplasma al núcleo, reduciendo la actividad transcripcional de LEF/TCF tras el silenciamiento génico de *Dsg3* (Chen *et al.*, 2013).

Existen estudios que demuestran que los *midbodies* contienen no sólo proteínas relacionadas con el citoesqueleto, sino que también presentan proteínas involucradas en otras rutas como la acumulación lipídica y el tráfico de vesículas (Hu *et al.*, 2012; Skop *et al.*, 2004). Así pues, existe una relación entre *midbodies* y vesículas que explicaría la observación de PKP1 en ambas estructuras celulares. En relación a la localización vesicular de PKP1, resulta interesante la interacción observada entre PKP3 y DNM1L, el cual es un miembro de la superfamilia dinamina de GTPasas grandes. Esta familia participa además de en procesos como la migración, endocitosis y secreción, en el transporte vesicular dentro de las rutas secretoras, mantenimiento de la morfología mitocondrial y modulación de protrusiones como podosomas (fundamentales en adhesión y motilidad) e invadopodios (responsables de la degradación focal de la matriz extracelular) (Furukawa *et al.*, 2005). El conjunto de estos datos apoyan una función de PKP1 en transporte citoplasmático a través de vesículas celulares y en motilidad celular.

Sin embargo, también han sido descritas acumulaciones de PKP1 en pequeñas entidades postmitóticas rodeadas por una envuelta nuclear especial (Schmidt *et al.*, 1997) que podrían corresponderse también con las vesículas observadas por microscopía.

Otras proteínas relacionadas con PKP1 han sido también localizadas en los centrosomas y polos del huso. Tal es el caso de PKP4, la cual se encuentra durante la interfase celular en los centrosomas y uniones celulares, cambiando su localización durante la mitosis a los polos del huso acromático y el *midbody* (Nahorski *et al.*, 2012). La proteína p120-catenina también ha sido detectada en los centrosomas en *Drosophila melanogaster* aunque estuvo ausente de estas estructuras en las células de mamíferos (Wolf *et al.*, 2006). Además, en el caso de *Drosophila*, cabe destacar que en los embriones tempranos, la proteína oncogénica AKT regula la migración del centrosoma y la orientación del huso mitótico a través de un complejo compuesto por Zw3, proteínas armadillo, APC2, y EB1 (Buttrick *et al.*, 2008).

En el caso de los *midbodies*, estas estructuras se confirmaron a través de la tinción de α -tubulina. Sin embargo, la señal de PKP1 no colocalizó con la de α -tubulina, sino que se localizó a continuación de ésta, dejando una *zona oscura* en el centro del *midbody*.

A pesar de que los *midbodies* y cinetocoros siguieron observándose tras el silenciamiento de *Pkp1*, lo que podría suponer que se trataba de artefactos debidos a inespecificidades del anticuerpo, el número de estas estructuras disminuyó casi un 50%, mientras que la reducción de la proliferación celular, medida por MTT, cayó sólo un 15% aproximadamente. Esto significa que la disminución de la proliferación resultante tras el silenciamiento de *Pkp1* no sería capaz de explicar por completo la caída del número de estructuras observadas. En otras palabras, aunque hay más células que dejan de dividirse, hay muchas más que dejan de formar *midbodies* y cinetocoros.

La persistencia de estas estructuras a pesar de la inhibición de *Pkp1* podría deberse a que los porcentajes de eficiencia de transfección de los siRNAs no fue del 100%, lo cual está relacionado con la menor capacidad de transfección y la alta citotoxicidad observada en las líneas SK-MES-1 y EPLC-272H en comparación con otras como HEK 293T. Además, las células positivamente transfectadas muestran diferentes grados de inhibición, pudiendo permanecer ciertos niveles de expresión de *Pkp1* en parte de la población. De este modo, tanto las células no transfectadas como aquellas que habrían sufrido una escasa inhibición, reteniendo ciertos niveles de expresión, conformarían una subpoblación capaz de dividirse y formar todas estas estructuras.

La presencia de PKP1A en los *midbodies* fue confirmada gracias a la introducción de la proteína de fusión PKP1A-Myc-DDK-EGFP mediante transducción lentiviral y selección con puromicina de las células positivas. En la inmunocitoquímica de estas muestras se observó una alta autofluorescencia de los *midbodies* y cierto marcaje nuclear inespecífico, incluso en las muestras control. La autofluorescencia de los *midbodies* es un hecho constatado por otros autores. Por un lado, se ha observado que la expresión de proteínas fusionadas a GFP saturaba la señal en el centro de la *zona oscura* del *midbody* dificultando la localización de las mismas, algo que se solucionó expresando dichas proteínas a muy bajos niveles y que desveló diferentes localizaciones para proteínas que un principio daban el mismo patrón de saturación (Hu *et al.*, 2012). También está bien establecida la autofluorescencia en los *midbodies* de H2B marcada (Rinaldo *et al.*, 2012). Resultan muy interesantes estudios previos que demuestran que GFP, como proteína aislada, se localiza en el citoplasma y es capaz de difundir a través del *midbody* a la otra célula hija (Steigemann *et al.*).

Para resolver la cuestión de la autofluorescencia observada en nuestros ensayos, las muestras transducidas lentiviralmente con la proteína de fusión fueron marcadas nuevamente combinando la fluorescencia propia de EGFP con un anticuerpo contra GFP, el cual es capaz de reconocer la variante EGFP. El anticuerpo anti-GFP fue capaz de reconocer el gen reportero EGFP fusionado a PKP1A en los *midbodies* de estas muestras y no en aquellas transducidas con el plásmido vector vacío (control o EV, del inglés *Empty Vector*), lo cual demuestra la presencia de PKP1A en dichas estructuras. Además, este ensayo confirmó la localización de PKP1A en la *zona oscura* del *midbody*, flanqueando la señal de α -tubulina, con un patrón similar al de otras proteínas del *midbody* como PRC1, KIF4, CENPE y AURKB.

En general, el estudio de los *midbodies* resulta ser todo un reto científico debido a que la región central es altamente electrodensa y excluye los anticuerpos, dificultando el estudio por inmunofluorescencia. De este modo, a pesar de existir listas de proteínas participantes, no hay un conocimiento preciso de su organización y reclutamiento en los *midbodies* (Hu et al., 2012).

Cabe destacar que, a lo largo del proceso de división celular o mitosis, la localización subcelular de PKP1 varió dando un patrón punteado intenso (posiblemente cinetocórico) durante la profase y metafase, desapareciendo durante la anafase y reapareciendo en la telofase en forma de *midbody*. Esta interesante secuencia descarta nuevamente la posibilidad de que los patrones observados sean consecuencia de inespecificidades del anticuerpo, ya que de ser así y en el caso de que el anticuerpo contra PKP1 fuera capaz de reaccionar contra cualquier componente del *Complejo Cromosómico Pasajero*, el patrón observado incluiría, además, una fuerte señal en la *zona media* durante la anafase.

La entrada de la célula en mitosis es regulada por CDK1–ciclina A y CDK1– ciclina B. La activación de CDKs es compleja pero, en parte, es desencadenada por quinasas de la familia Polo, particularmente por PLK1. Sin embargo, estos reguladores generales no son suficientes para ejecutar el programa de mitosis, sino que se necesitan también reguladores “manipulables” que activan o desactivan ciertos procesos en localizaciones espacio-temporales específicas una vez que el programa de división celular ha comenzado. De estos reguladores, el *Complejo Cromosómico Pasajero* (del inglés, CPC) es el mejor caracterizado y comprende proteínas como la quinasa Aurora-B, su diana y subunidad activadora INCENP y otras subunidades como Survivina y Borealina/Dasra B (Ruchaud *et al.*, 2007). Este complejo tiene muchas proteínas diana, incluyendo la histona H3, la cual se fosforila cuando la cromatina se condensa al inicio de la mitosis. El complejo CPC también conecta los microtúbulos a los centrómeros y coreografía la separación de las dos células hijas.

La localización de los componentes del complejo CPC es altamente dinámica y pueden regular procesos mitóticos clave moviéndose de un sitio a otro de la célula en división (Fig. 156). Inicialmente, los componentes del CPC se localizan en los brazos cromosómicos y progresivamente se concentran en el interior de los centrómeros durante la prometafase y metafase. Entre el final de la metafase y el principio de la anafase, se transfieren de los centrómeros a la zona media del huso mitótico, de ahí al córtex ecuatorial en la anafase y, finalmente, se concentran en el *midbody* durante la telofase y citocinesis (Ruchaud *et al.*, 2007).

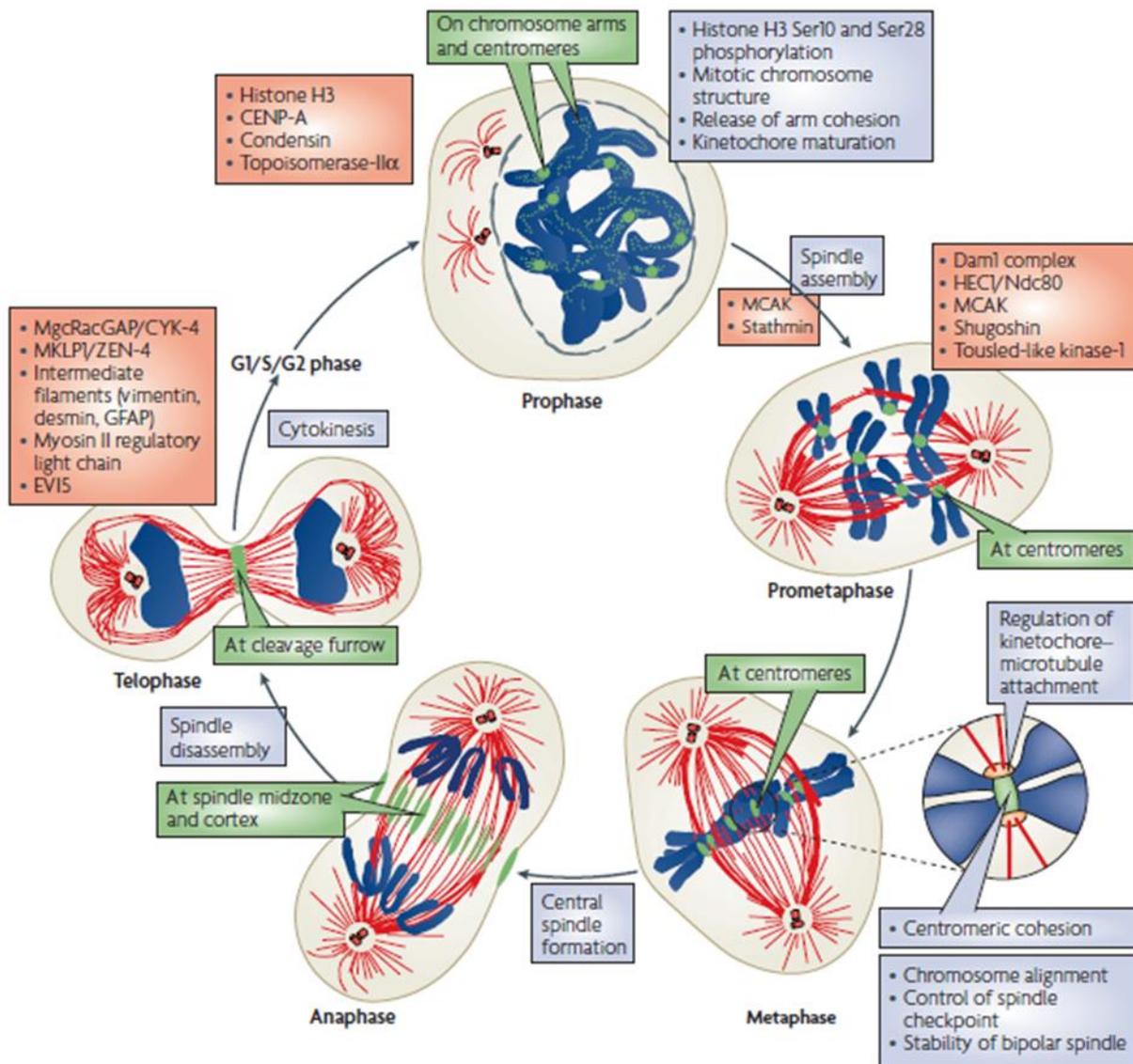
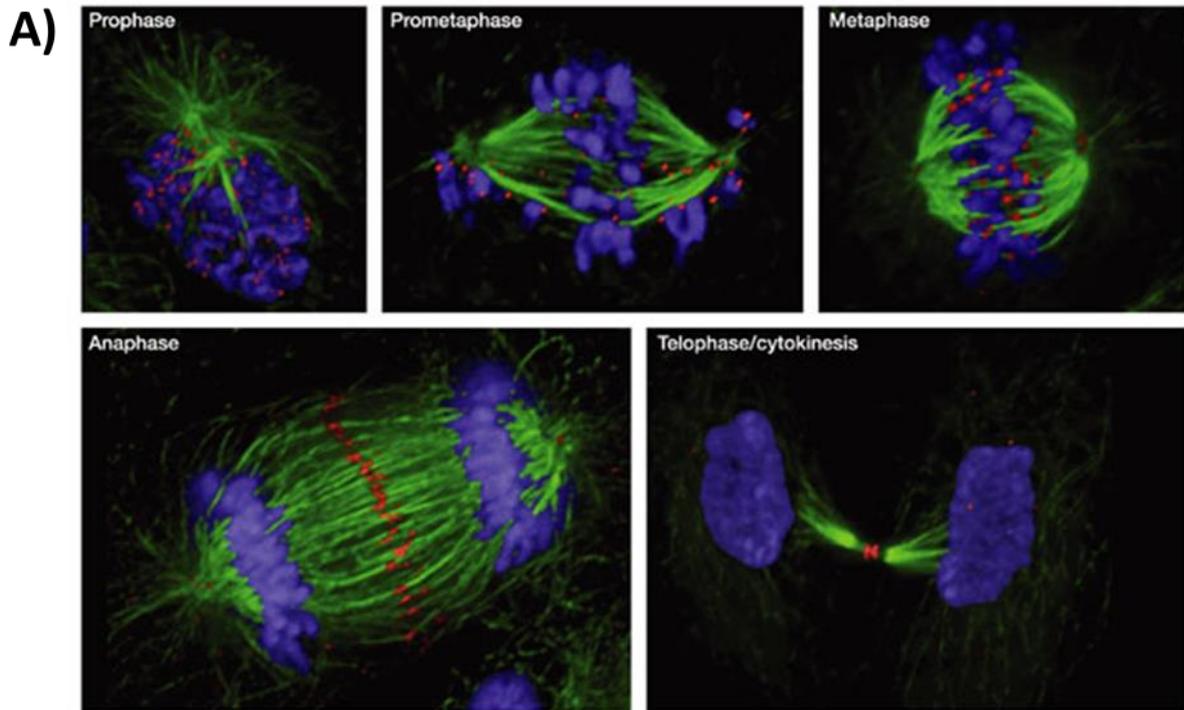


Figura 156. Localización y función del *Complejo Cromosómico Pasajero* durante la mitosis. La localización del complejo (en verde), en relación a la tubulina y la dinámica cromosómica, correlaciona con sus múltiples funciones (recuadros grises) y sus principales dianas (recuadros rojos) durante las diferentes fases de la mitosis. En la profase el CPC se encuentra en los brazos cromosómicos donde fosforila la histona H3 en las posiciones Ser10 y Ser28. Durante esta fase se acumula en los centrómeros, que es donde comienza la maduración de los cinetocoros que continúa hasta la prometafase. El CPC se requiere para la formación y estabilización del huso mitótico desde la profase/prometafase hasta la anafase. En la metafase se localiza en los centrómeros, donde juega un papel fundamental en la cohesión centromérica y regulación de las uniones entre cinetocoros y microtúbulos. Aquí controla el correcto alineamiento de los cromosomas en el plano medio y el punto de control del huso. En la anafase, el CPC se traslada al plano medio del huso (*midzone*) y aparece en el córtex celular. En este punto está involucrado en la formación del huso central. Durante la telofase, el CPC se concentra en la hendidura de escisión y, finalmente, en el *midbody* donde se requiere para la culminación de la citocinesis. (Cromosomas en azul, tubulina en rojo, membrana nuclear en gris, CPC en verde) (Ruchaud *et al.*, 2007).

De este modo, la localización de los componentes del complejo CPC a lo largo de las distintas fases de la mitosis conforma un patrón de tinción inmunofluorescente muy específico (Fig. 157) que no se correspondió totalmente con el patrón observado para PKP1, ya que este último nunca se localizó en el plano ecuatorial del huso durante la anafase. Este hecho, como se ha comentado, descarta la posibilidad inespecificidades del anticuerpo contra PKP1 y confirma, junto con la totalidad de ensayos llevados a cabo en este trabajo, la localización de PKP1 en *midbodies* y cinetocoros, aunque queda por determinar si su papel es meramente accesorio.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

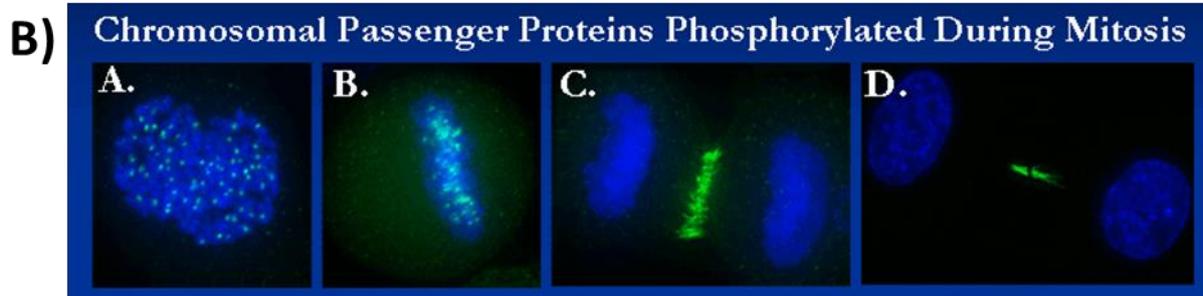


Figura 157. Patrón de tinción típico de los componentes del *Complejo Cromosómico Pasajero* durante la mitosis. A) La imagen muestra la tinción de la proteína centromérica CENP-E, la cual es un marcador de cinetocoros, plano ecuatorial del huso y *midbodies*. (Cromosomas en azul, microtúbulos en verde, CENP-E en rojo) (Carmena *et al.*, 2003). B) Secuencia de la tinción de P190 durante la mitosis (A. Profase, B. Metafase, C. Anafase y D. Telofase). No hay marcaje de P190 en núcleos interfásicos. (Cromosomas en azul, P190 en verde) (Yang *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, los resultados aquí presentados son, para nuestro conocimiento, los primeros datos que relacionan PKP1 con distintas fases de la mitosis a través de su localización en *midbodies* y cinetocoros. Sin embargo, otra proteína de la familia de las placofilinas, PKP4, también ha sido recientemente localizada en los *midbodies*, centrosomas y polos del huso acromático (Nahorski *et al.*, 2012), y se le ha relacionado con la división celular, considerándola un constituyente de la matriz citoesquelética del *midbody* (Wolf *et al.*, 2006). Más tarde se demostró que la localización de PKP4 en el *midbody* era dependiente de KIF3b el cual es un miembro de la familia de la quinesina-II (Keil *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2006). El equilibrio en los niveles de expresión de PKP4 resultó ser esencial para la progresión del ciclo celular, interfiriendo tanto la sobreexpresión como la inhibición de PKP4 en la supervivencia y el normal crecimiento celular mediante defectos de la citocinesis, los cuales producían células multinucleadas y de un tamaño anormalmente grande e inducción a apoptosis.

A diferencia de PKP1, durante la anafase PKP4 sí es reclutado y localizado en el plano ecuatorial del huso acromático, concentrándose luego en la *zona media* y, finalmente, en el *midbody* con una localización similar a la de PKP1. Este hecho, junto con la ausencia de bandas del peso molecular de PKP4 (131 KDa) en los WB, reafirma que la localización de PKP1 en cinetocoros y *midbodies* no son artefactos debido a reacciones inespecíficas del anticuerpo de PKP1 contra PKP4.

La citocinesis requiere una gran coordinación espacio-temporal del ciclo celular y reorganización del citoesqueleto y, en este proceso, algunas proteínas de la familia Rho de GTPasas resultan ser reguladores indispensables del ensamblaje del anillo contráctil, el cual depende de la activación local de la ruta Rho. Así, alteraciones de la citocinesis parecen ser debidas a la desregulación de la actividad de Rho. En este sentido, se ha observado que alteraciones de la expresión de PKP4 pueden causar dicha desregulación (Wolf *et al.*, 2006).

En resumen, PKP4 interaccionaría con *RhoA* y *Ect2* (un factor esencial para la citocinesis), y junto con *Ect2* estimularía la actividad *RhoA* y promovería la formación del anillo contráctil y su constricción. Estos datos suponen que las PKPs podrían regular minuciosamente la ruta de Rho-GTPasa espacial y temporalmente, dando lugar a la activación de efectores específicos en el momento y lugar adecuados (Hatzfeld, 2007). Además, resulta interesante el hecho de que *RhoA*, como regulador de la formación del surco de escisión, también se localice en el *midbody*, tanto en la protuberancia central como en dos sitios de posible abscisión del mismo (Hu *et al.*, 2012).

De forma similar, otras proteínas de la misma familia que PKP4 podrían jugar también un papel regulador de la actividad Rho-GTPasa, contribuyendo al equilibrio entre adhesión y motilidad celular. Ejemplo de ello es la proteína p120-catenina, la cual interacciona con GTPasas de la familia Rho regulando el ensamblaje del citoesqueleto en las uniones intercelulares (Choi *et al.*, 2005).

Cabe destacar también que, a través de la ruta de *RhoA*, entre otras muchas rutas de señalización, las PKPs son capaces de coordinar la remodelación de actina. De hecho, las PKPs son capaces de interaccionar directamente con actina, proteínas reguladoras de la actina y microtúbulos (Bass-Zubek *et al.*, 2009). En concreto, PKP1 colocaliza con los filamentos de actina en los bordes de ciertas células (Hatzfeld, 2007), su forma fosforilada produce un fenotipo caracterizado por grandes lamelipodios y protrusiones celulares (Schmidt *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2013) y la rápida degradación del mismo llevada a cabo por las caspasas durante la apoptosis de queratinocitos sustenta la función remodeladora de PKP1 (Neuber *et al.*, 2010). En este contexto, PKP1 estaría involucrado en la comunicación cruzada con otras estructuras del

contexto, PKP1 estaría involucrado en la comunicación cruzada con otras estructuras del citoesqueleto o en procesos de migración. Por otro lado, también se han encontrado interacciones entre PKPs y otras GTPasas, como la anteriormente mencionada interacción entre PKP3 y DNML1, un miembro de la superfamilia dinamina que se caracteriza por interactuar con gran variedad de proteínas, incluyendo la actina, regulando la reorganización de la misma e influyendo así en la estructura celular durante procesos como la migración, endocitosis y secreción (Furukawa *et al.*, 2005).

En relación al cáncer, desórdenes en la citocinesis son eventos frecuentes en este tipo de enfermedades humanas y, dado que *RhoA* y sus reguladores son cruciales para el buen funcionamiento de la citocinesis, remodelación de actina, adhesión celular y migración, no resulta extraño que la desregulación de *RhoA* se haya correlacionado previamente con ciertas enfermedades metastásicas y haya surgido la hipótesis de que el incremento de su actividad o sobreexpresión podría asociarse con un fenotipo más migratorio, implicando mayor invasión y metástasis (Nahorski *et al.*, 2012).

El desarrollo del cáncer también puede ser promovido por disfunciones del desmosoma a través de la ruta WNT/ β -catenina, también a través de la activación de la ruta AKT/ β -catenina, la activación de la ruta ERK1/2 y AKT, y la activación de EGFR. Cabe destacar que la ruta de señalización MAPK (originalmente llamada ERK) es un regulador principal de proliferación celular, migración e invasión; mientras que EGFR juega un papel importante en modular la adhesión intercelular, especialmente en tumores que sobreexpresan esta tirosín-quinasa. Se encontró que en el 50-70% de los cánceres de pulmón humanos se sobreexpresaba EGFR y el gefitinib (Iressa), inhibidor de la tirosín-quinasa EGFR, recientemente ha sido considerado terapia de primera línea para pacientes de NSCLC avanzado obteniendo una máxima respuesta en tumores con mutaciones de EGFR (Angulo *et al.*, 2008; Cui *et al.*, 2012). Los tumores con mutaciones de EGFR presentan patrones de expresión específicos (algo que no es tan evidente en tumores con mutaciones de *Kras* y *p53*, por ejemplo), con sobreexpresión de los genes del cromosoma 3q, el cual contiene el oncogén PIK3CA. Las mutaciones activadoras de PIK3CA en el cáncer de pulmón no son frecuentes; sin embargo, la ganancia del cromosoma 3q22-q26, que incluye PIK3CA, si es común en cáncer de pulmón sobretodo en el subtipo SCC (Angulo *et al.*, 2008).

En cuanto a otras rutas a través de las cuales *Pkp1* se encuentra implicada en tumorigenicidad, destaca también la anteriormente comentada vía de señalización de PI3K/AKT2. Está bien establecido el papel de AKT en crecimiento celular, proliferación y apoptosis, así como en mediación de respuestas metabólicas (Coffer *et al.*, 1998) y regulación de la progresión del ciclo celular. Además, se ha demostrado en mamíferos que en la transición G2/M se encuentra fosforilada, incrementando así su actividad a lo largo de la mitosis (Buttrick *et al.*, 2008).

En resumen, nuestro estudio aporta evidencias del papel oncogénico de *Pkp1* en NSCLC demostrando que existen patrones de expresión específicos que resaltan las diferencias histológicas y comportamientos clínicos de estos tumores. Además, los datos aquí presentados reafirman que *Pkp1* juega un papel directo en el control del crecimiento celular, aportando características agresivas a los NSCLC, y abren la posibilidad de diseñar nuevos biomarcadores de cáncer de pulmón y drogas anti-cáncer específicas basados en la molécula de PKP1.

Sin embargo, resulta esencial definir completamente las interacciones proteicas y rutas de señalización en las que está implicada PKP1 para arrojar luz sobre la base molecular del cáncer de pulmón y sobre la función tumorigénica de las PKPs, las cuales están atrayendo cada vez más atención de la comunidad científica.

8. CONCLUSIONES

1. Existen diferencias significativas entre los perfiles de expresión génica de muestras de tejido no tumoral y muestras de adenocarcinomas (AC) y carcinomas epidermoides (SCC) primarias de pulmón tras la validación de los datos de microarray por qPCR.
2. Los perfiles de expresión génica se expresaron diferencialmente en función del tipo tumoral, el estadio de la enfermedad y el grado de diferenciación de la misma.
3. De entre los genes diferencialmente expresados, *Pkp1* y *Krt15* estaban altamente sobreexpresados en los SCC, lo que sugiere que podrían ser marcadores útiles para diferenciar las muestras del subtipo epidermoide (SCC).
4. De entre los genes diferencialmente expresados, *Dsg3* mostró una fuerte inhibición en AC de estadio IA frente a AC de estadio IB, lo que indica que podría servir como marcador para distinguir el estadio IA de adenocarcinoma (AC).
5. El análisis de la supervivencia de los pacientes fue diferente dependiendo de la edición de los criterios de clasificación TNM usada (6ª o 7ª edición).
6. La supervivencia de los pacientes varió significativamente en función de la recurrencia tumoral y en función del estadio TNM con ambas ediciones de clasificación TNM (6ª y 7ª edición), mientras que el subtipo histológico del cáncer no influyó en la supervivencia del paciente.
7. La media de supervivencia varió de acuerdo a los niveles de expresión de *Pkp1* y/o *Krt15*, aunque esta relación no fue estadísticamente significativa.
8. La tinción de membrana de PKP1, KRT15 y DSG3 fue característica de los carcinomas epidermoides (SCC) de pulmón y existe una relación entre la expresión de estas proteínas en la membrana de SCC y el grado de diferenciación, indicando que podrían ser marcadores de SCC útiles en el diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón.
9. Los ensayos de genómica funcional aportan evidencias del papel oncogénico de *Pkp1* en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) y de su implicación directa en el control del crecimiento celular, aportando características agresivas a estos tumores, y abren la posibilidad de diseñar nuevos biomarcadores de cáncer de pulmón y drogas anti-cáncer específicas basados en la molécula de PKP1.
10. Experimentos preliminares de inmunocitoquímica sugieren que PKP1 juega un papel en el proceso de división celular o mitosis, pudiendo ejercer un control sobre el ciclo celular que repercutiría en la supervivencia y el normal crecimiento celular.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla EM, Has C (2014). A Plakophilin-1 Gene Mutation in an Egyptian Family with Ectodermal Dysplasia-Skin Fragility Syndrome. *Mol Syndromol* 5(6): 304-306.
- Alberts B (2010). *Biología molecular de la célula*. Edn: Ediciones Omega, S.L.
- Alberts B, Coll MD, Sande ML (2004). *Biología molecular de la célula*. Edn: Ediciones Omega, S.L.
- Angulo B, Suarez-Gauthier A, Lopez-Rios F, Medina PP, Conde E, Tang M, et al. (2008). Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol* 214(3): 347-356.
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391): 603-307.
- Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. (2013). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue): D991-995.
- Bass-Zubek AE, Godsel LM, Delmar M, Green KJ (2009). Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Curr Opin In Cell Biol* 21(5): 708-716.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate. A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 57: 284-300.
- Berridge MV, Tan AS (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303(2): 474-482.
- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, et al. (2001). Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13790-13795.
- Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N (2012). p40 (DeltaNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 25(3): 405-415.
- Blanco Rodríguez A, Méndez Sánchez A, Pérez Arévalo J, Bautista Pérez MJ (2001). *Citología Veterinaria*. Edn: Córdoba.
- Boelens MC, van den Berg A, Vogelzang I, Wesseling J, Postma DS, Timens W, et al. (2007). Differential expression and distribution of epithelial adhesion molecules in non-small cell lung cancer and normal bronchus. *J Clin Pathol* 60(6): 608-614.
- Bonne S, Gilbert B, Hatzfeld M, Chen X, Green KJ, van Roy F (2003). Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *J Cell Biol* 161(2): 403-416.
- Bornslaeger EA, Godsel LM, Corcoran CM, Park JK, Hatzfeld M, Kowalczyk AP, et al. (2001). Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with

- plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *J Cell Sci* 114(4): 727-738.
- Boyce AE, McGrath JA, Techanukul T, Murrell DF, Chow CW, McGregor L, et al. (2012). Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome due to a new homozygous internal deletion mutation in the PKP1 gene. *Australas J Dermatol* 53(1): 61-65.
- Buccheri G, Ferrigno D (2004). Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J* 24(6): 898-904.
- Buttrick GJ, Beaumont LM, Leitch J, Yau C, Hughes JR, Wakefield JG (2008). Akt regulates centrosome migration and spindle orientation in the early *Drosophila melanogaster* embryo. *J Cell Biol* 180(3): 537-548.
- Cagle PT, Chirieac LR (2012). Advances in treatment of lung cancer with targeted therapy. *Arch Pathol Lab Med* 136(5): 504-509.
- Cancer IARC, cancer CIRC (2015). WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Edn. IARC.
- Capaldo CT, Farkas AE, Nusrat A (2014). Epithelial adhesive junctions. *F1000Prime Rep* 6: 1.
- Carbone D (1992). Smoking and cancer. *Am J Med* 93(1A): 13S-17S.
- Carmena M, Earnshaw WC (2003). The cellular geography of Aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(11): 842-854.
- Carrasco JL, Jover L (2003). Estimating the generalized concordance correlation coefficient through variance components. *Biometrics* 59(4): 849-858.
- Chang L, Goldman RD (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8): 601-613.
- Chen C, Zheng H, Gao W, Zhou Y, Jiang S, Suen HC (2010). Prognosis and staging of superficial endobronchial lung cancer: the impact of invasion depth, tumor diameter, and coexistent pneumonitis or atelectasis. *Chin Med J (Engl)* 123(12): 1505-1509.
- Chen X, Bonn e S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ (2002). Protein Binding and Functional Characterization of Plakophilin 2: evidence for its diverse roles in desmosomes and β -catenin signaling. *J Biol Chem* 277(12): 10512-10522.
- Chen YJ, Lee LY, Chao YK, Chang JT, Lu YC, Li HF, et al. (2013). DSG3 facilitates cancer cell growth and invasion through the DSG3-plakoglobin-TCF/LEF-Myc/cyclin D1/MMP signaling pathway. *PLoS One* 8(5): e64088.
- Chidgey M, Dawson C (2007). Desmosomes: a role in cancer? *Br J Cancer* 96(12): 1783-1787.
- Choi H-J, Weis WI (2005). Structure of the Armadillo Repeat Domain of Plakophilin 1. *Journal of Molecular Biology* 346(1): 367-376.

- Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335(Pt 1): 1-13.
- Cooke DT, Nguyen DV, Yang Y, Chen SL, Yu C, Calhoun RF (2010). Survival comparison of adenosquamous, squamous cell, and adenocarcinoma of the lung after lobectomy. *Ann Thorac Surg* 90(3): 943-948.
- Cooper GM (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd Edition. Edn: Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cooper GM, Hausman RE (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. Edn. ASM Press.
- Corpet F (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16(22): 10881-10890.
- Cowin P, Kapprell HP, Franke WW, Tamkun J, Hynes RO (1986). Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 46(7): 1063-1073.
- Cui T, Chen Y, Yang L, Knosel T, Huber O, Pacyna-Gengelbach M, et al. (2012). The p53 target gene desmocollin 3 acts as a novel tumor suppressor through inhibiting EGFR/ERK pathway in human lung cancer. *Carcinogenesis* 33(12): 2326-2333.
- de Fries R, Mitsuhashi M (1995). Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamar Blue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal* 9(2): 89-95.
- Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP (2009). The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(2): a002543.
- Demirag GG, Sullu Y, Gurgenyatagi D, Okumus NO, Yucel I (2011). Expression of plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in gastric cancers. *Diagn Pathol* 6: 1.
- Demirag GG, Sullu Y, Yucel I (2012). Expression of Plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in breast cancers. *Med Oncol* 29(3): 1518-1522.
- Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I (2004). Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 328(7455): 1519.
- Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* 4: 2126.
- Dusek RL, Attardi LD (2011). Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 11(5): 317-323.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30(1): 207-210.
- Eekels JJ, Pasternak AO, Schut AM, Geerts D, Jeeninga RE, Berkhout B (2012). A competitive cell growth assay for the detection of subtle effects of gene transduction on cell proliferation. *Gene Ther* 19(11): 1058-1064.

- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127(12): 2893-2917.
- Ferlay JS, I; Ervik, M; Dikshit, R; Eser, S; Mathers, C; Rebelo, M; Parkin, DM; Forman, D; Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. : Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Fischer-Kešo R, Breuninger S, Hofmann S, Henn M, Röhrig T, Ströbel P, et al. (2014). Plakophilins 1 and 3 Bind to FXR1 and thereby influence the mrna stability of desmosomal proteins. *Mol Cell Biol* 34(23): 4244-4256.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5): 2315-2319.
- Fukuoka J, Dracheva T, Shih JH, Hewitt SM, Fujii T, Kishor A, et al. (2007). Desmoglein 3 as a prognostic factor in lung cancer. *Hum Pathol* 38(2): 276-283.
- Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Ito T, Tsuchiya E, et al. (2005). Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 65(16): 7102-7110.
- Gabrielson E (2006). Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology* 11(5): 533-538.
- Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaessler Z, Pacyna-Gengelbach M, et al. (2001). Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13784-13789.
- Gemma A, Li C, Sugiyama Y, Matsuda K, Seike Y, Kosaihira S, et al. (2006). Anticancer drug clustering in lung cancer based on gene expression profiles and sensitivity database. *BMC Cancer* 6: 174.
- Getsios S, Huen AC, Green KJ (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4): 271-281.
- Gillet J-P, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, et al. (2011). Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(46): 18708-18713.
- Goldstraw P, Cancer IAftSoL (2009). Staging Manual in Thoracic Oncology. Edn: Editorial Rx Press.
- Golub TR (2001). Genome-wide views of cancer. *N Engl J Med* 344(8): 601-602.
- González Baron M (2006). Cáncer no microcítico de pulmón: Un reto para el siglo XXI. Edn: Madrid.
- Green KJ, Gaudry CA (2000). Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 208-216.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.

- Harlow E, Lane D (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hatzfeld M (1999). The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol* 186: 179-224.
- Hatzfeld M (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta* 1773(1): 69-77.
- Hatzfeld M (2010). A nuclear function for plakophilin-1 in the DNA damage response? *J Invest Dermatol* 130(11): 2538-2540.
- Hatzfeld M, Green KJ, Sauter H (2003). Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J Cell Sci* 116(7): 1219-1233.
- Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE (1997). *Histology*. Edn: Williams & Wilkins.
- Hensing TA SR (2013). Molecular biomarkers for future screening of lung cancer. *J Surg Oncol*. 108(5): 327-333.
- Hernández-Martín A, Torrelo A, Ciria S, Colmenero I, Aguilar A, Grimalt R, et al. (2013). Ectodermal dysplasia–skin fragility syndrome: a novel mutation in the PKP1 gene. *Clin Exp Dermatol* 38(7): 787-790.
- Herold A, Truant R, Wiegand H, Cullen BR (1998). Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor. *J Cell Biol* 143(2): 309-318.
- Herrero J, Muffato M, Beal K, Fitzgerald S, Gordon L, Pignatelli M, et al. (2016). *Ensembl comparative genomics resources*. Database (Oxford) 2016.
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16(15): 7351-7367.
- Hirschl D, Bayer P, Muller O (1996). Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein. *FEBS Lett* 383(1-2): 31-36.
- Hofmann I, Casella M, Schnolzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW (2006). Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Mol Biol Cell* 17(3): 1388-1398.
- Hoheisel JD (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet* 7(3): 200-210.
- Hou J, Aerts J, den Hamer B, van Ijcken W, den Bakker M, Riegman P, et al. (2010). Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One* 5(4): e10312.
- Hu CK, Coughlin M, Mitchison TJ (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell* 23(6): 1024-1034.

- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90(5): 871-882.
- Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62(8): 2636-2643.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2): 69-90.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60(5): 277-300.
- Jiménez-Massa AE (2011). *Cáncer de pulmón y citocinas: Variantes clínicas y genéticas* (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca, Salamanca.
- Karp DD, Paz-Ares LG, Novello S, Haluska P, Garland L, Cardenal F, et al. (2009). Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 27(15): 2516-2522.
- Kashyap S, Shanker V, Sharma N (2015). Ectodermal Dysplasia-Skin Fragility Syndrome: A rare case report. *Indian J Dermatol* 60(4): 421.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- Keil R, Kiessling C, Hatzfeld M (2009). Targeting of p0071 to the midbody depends on KIF3. *J Cell Sci* 122(Pt 8): 1174-1183.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12(6): 996-1006.
- Konaka C, Hirano T, Kato H, Furuse K, Takada M, Saito Y, et al. (1999). Comparison of endoscopic features of early-stage squamous cell lung cancer and histological findings. *Br J Cancer* 80(9): 1435-1439.
- Kornreich M, Avinery R, Malka-Gibor E, Laser-Azogui A, Beck R (2015). Order and disorder in intermediate filament proteins. *FEBS Lett* 14;589(19 Pt A):2464-76.
- Koster MI, Dinella J, Chen J, O'Shea C, Koch PJ (2014). Integrating animal models and in vitro tissue models to elucidate the role of desmosomal proteins in diseases. *Cell Commun Adhes* 21(1): 55-63.
- Koyi H HG, Branden E. (2002). A prospective study of a total material of lung cancer from a county in Sweden 1997-1999: gender, symptoms, type, stage, and smoking habits. *Lung Cancer*. 36(1): 9-14.

- Kuner R, Muley T, Meister M, Ruschhaupt M, Bunes A, Xu EC, et al. (2009). Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes. *Lung Cancer* 63(1): 32-38.
- Lacasse Y, Wong E, Guyatt GH, Cook DJ (1999). Transthoracic needle aspiration biopsy for the diagnosis of localised pulmonary lesions: a meta-analysis. *Thorax* 54(10): 884-893.
- Li Z, Yu Y, Lu J, Luo Q, Wu C, Liao M, et al. (2009). Analysis of the T descriptors and other prognosis factors in pathologic stage I non-small cell lung cancer in China. *J Thorac Oncol* 4(6): 702-709.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69(2): 581-593.
- Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, et al. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* 45(6): 580-585.
- Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, et al. (2004). Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 350(18): 1828-1837.
- Loubeyre P, Copercini M, Dietrich PY (2005). Percutaneous CT-guided multisampling core needle biopsy of thoracic lesions. *AJR Am J Roentgenol* 185(5): 1294-1298.
- Masters JRW (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 233-236.
- McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B (1991). A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254(5036): 1359-1361.
- McGrath JA, Mellerio JE (2010). Ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome. *Dermatol Clin* 28(1): 125-129.
- McMillan JR, Haftek M, Akiyama M, South AP, Perrot H, McGrath JA, et al. (2003). Alterations in desmosome size and number coincide with the loss of keratinocyte cohesion in skin with homozygous and heterozygous defects in the desmosomal protein plakophilin 1. *J Invest Dermatol* 121(1): 96-103.
- Medina PP, Castillo SD, Blanco S, Sanz-Garcia M, Largo C, Alvarez S, et al. (2009). The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer. *Hum Mol Genet* 18(7): 1343-1352.
- Medvetz DA, Khabibullin D, Hariharan V, Ongusaha PP, Goncharova EA, Schlechter T, et al. (2012). Folliculin, the product of the Birt-Hogg-Dube tumor suppressor gene, interacts with the adherens junction protein p0071 to regulate cell-cell adhesion. *PLoS One* 7(11): e47842.
- Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Sepehri Chong S, Schnolzer M, et al. (2001). Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7795-7800.

- Mertens C, Kuhn C, Moll R, Schwetlick I, Franke WW (1999). Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation* 64(5): 277-290.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 56-68.
- Miyana A, Gemma A, Noro R, Kataoka K, Matsuda K, Nara M, et al. (2008). Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. *Mol Cancer Ther* 7(7): 1923-1930.
- Moh MC, Shen S (2009). The roles of cell adhesion molecules in tumor suppression and cell migration: A new paradox. *Cell Adh Migr* 3(4): 334-336.
- Moll I, Kurzen H, Langbein L, Franke WW (1997). The distribution of the desmosomal protein, plakophilin 1, in human skin and skin tumors. *J Invest Dermatol* 108(2): 139-146.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Mountain CF (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 111(6): 1710-1717.
- Mountain CF C, Anderson WA. (1974). A system for the clinical staging of lung cancer. *American Journal of Roentgenology* 120(1): 130-138
- Mühmer M, Ditthardt D, Jäkel J, Wischmann V, Moll R, Schmidt A (2014). An alternative promoter of the human plakophilin-3 gene controls the expression of the new isoform PKP3b. *Cell Tissue Res* 355(1): 143-162.
- Mukhopadhyay S, Katzenstein AL (2011). Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol* 35(1): 15-25.
- Munoz WA, Lee M, Miller RK, Ahmed Z, Ji H, Link TM, et al. (2014). Plakophilin-3 catenin associates with the ETV1/ER81 transcription factor to positively modulate gene activity. *PLoS One* 9(1): e86784.
- Muñoz A (1997). *Cáncer. Genes y Nuevas terapias*. Edn: Hélica.
- Nahorski MS, Seabra L, Straatman-Iwanowska A, Wingenfeld A, Reiman A, Lu X, et al. (2012). Folliculin interacts with p0071 (plakophilin-4) and deficiency is associated with disordered RhoA signalling, epithelial polarization and cytokinesis. *Hum Mol Genet* 21(24): 5268-5279.
- Neuber S, Mühmer M, Wratten D, Koch PJ, Moll R, Schmidt A (2010). The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family. *Dermatol Res Prac* 2010: 11.
- Nilda L, Fernández B, Valdés C, Conde SV (2010). *Fundamentos de enfermería. Parte II*. Edn: Editorial Ciencias Médicas.

- Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C (1998). A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 213(2): 157-167.
- Okegawa T, Li Y, Pong RC, Hsieh JT (2002). Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* 167(4): 1836-1843.
- Olivry T, Linder KE, Wang P, Bizikova P, Bernstein JA, Dunston SM, et al. (2012). Deficient plakophilin-1 expression due to a mutation in PKP1 causes ectodermal dysplasia-skin fragility syndrome in Chesapeake Bay retriever dogs. *PLoS One* 7(2): e32072.
- Pedraza V, Gomez-Capilla JA, Escaramis G, Gomez C, Torne P, Rivera JM, et al. (2010). Gene expression signatures in breast cancer distinguish phenotype characteristics, histologic subtypes, and tumor invasiveness. *Cancer* 116(2): 486-496.
- Peifer M, Berg S, Reynolds AB (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76(5): 789-791.
- Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, Maisonneuve P, Rossi G, Barbareschi M, et al. (2012). DeltaNp63 (p40) and thyroid transcription factor-1 immunoreactivity on small biopsies or cellblocks for typing non-small cell lung cancer: a novel two-hit, sparing-material approach. *J Thorac Oncol* 7(2): 281-290.
- Perera FP, Mooney LA, Stampfer M, Phillips DH, Bell DA, Rundle A, et al. (2002). Associations between carcinogen-DNA damage, glutathione S-transferase genotypes, and risk of lung cancer in the prospective Physicians' Health Cohort Study. *Carcinogenesis* 23(10): 1641-1646.
- Petty RD, Nicolson MC, Kerr KM, Collie-Duguid E, Murray GI (2004). Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application. *Clin Cancer Res* 10(10): 3237-3248.
- Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman HK, Bild A, Koontz J, et al. (2006). A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355(6): 570-580.
- Puck TT, Marcus PI (1956). Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 103(5): 653-666.
- Ransohoff DF (2007). How to improve reliability and efficiency of research about molecular markers: roles of phases, guidelines, and study design. *J Clin Epidemiol* 60(12): 1205-1219.
- Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL (2011). Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 24(10): 1348-1359.
- Rena O, Massera F, Robustellini M, Papalia E, Delfanti R, Lisi E, et al. (2010). Use of the Proposals of the International Association for the Study of Lung Cancer in the forthcoming edition of lung cancer staging system to predict long-term prognosis of operated patients. *Cancer J* 16(2): 176-181.

- Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. (2004). ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6(1): 1-6.
- Rietscher K, Wolf A, Hause G, Rother A, Keil R, Magin TM, et al. (2016). Growth retardation, loss of desmosomal adhesion, and impaired tight junction function identify a unique role of plakophilin 1 in vivo. *J Invest Dermatol* 136(7): 1471-1478.
- Rinaldo C, Moncada A, Gradi A, Ciuffini L, D'Eliseo D, Siepi F, et al. (2012). HIPK2 controls cytokinesis and prevents tetraploidization by phosphorylating histone H2B at the midbody. *Mol Cell* 47(1): 87-98.
- Riquet M, Manac'h D, Le Pimpec Barthes F, Dujon A, Debrosse D, Debesse B (1997). Prognostic value of T and N in non small cell lung cancer three centimeters or less in diameter. *Eur J Cardiothorac Surg* 11(3): 440-443; discussion 443-444.
- Rivera MP, Mehta AC (2007). Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132(3 Suppl): 131S-148S.
- Ross MH, Pawlina W (2007). *Histología*. Edn: Médica Panamericana.
- Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 798-812.
- Sánchez de Cos Escuín J, Hernández Hernández J (2004). Marcadores tumorales y cáncer de pulmón. ¿Qué hay de nuevo?. *Arch Bronconeumol* 40(Supl.6): 35-40.
- Sanchez-Palencia A, Gomez-Morales M, Gomez-Capilla JA, Pedraza V, Boyero L, Rosell R, et al. (2011). Gene expression profiling reveals novel biomarkers in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 129(2): 355-364.
- Sánchez-Palencia Ramos A (2012). Estudio de los perfiles de expresión génica en muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico sometidos a toracotomía con objetivo curativo (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Scagliotti G (2001). Symptoms, signs and staging of lung cancer. *European Respiratory Monograph* 6: 86-119.
- Schmidt A, Jager S (2005). Plakophilins--hard work in the desmosome, recreation in the nucleus? *Eur J Cell Biol* 84(2-3): 189-204.
- Schmidt A, Langbein L, Rode M, Pratzel S, Zimbelmann R, Franke WW (1997). Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res* 290(3): 481-499.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108.
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286(6): C1213-1228.

- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7): 671-675.
- Schwarz J, Ayim A, Schmidt A, Jager S, Koch S, Baumann R, et al. (2006). Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation. *Hum Pathol* 37(5): 613-622.
- Shahan TA, Siegel PD, Sorenson WG, Kuschner WG, Lewis DM (1994). A sensitive new bioassay for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 175(2): 181-187.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22(12): 1567-1572.
- Shi I, Hashemi Sadraei N, Duan ZH, Shi T (2011). Aberrant signaling pathways in squamous cell lung carcinoma. *Cancer Inform* 10: 273-285.
- Singhal S, Miller D, Ramalingam S, Sun SY (2008). Gene expression profiling of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 60(3): 313-324.
- Sklyarova T, Bonne S, D'Hooge P, Denecker G, Goossens S, De Rycke R, et al. (2008). Plakophilin-3-deficient mice develop hair coat abnormalities and are prone to cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 128(6): 1375-1385.
- Skop AR, Liu H, Yates J, 3rd, Meyer BJ, Heald R (2004). Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* 305(5680): 61-66.
- Sobolik-Delmaire T, Katafiasz D, Keim SA, Mahoney MG, Wahl JK 3rd (2007). Decreased plakophilin-1 expression promotes increased motility in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cell Commun Adhes* 14(2-3): 99-109.
- Sobolik-Delmaire T, Reddy R, Pashaj A, Roberts BJ, Wahl JK 3rd (2010). Plakophilin-1 localizes to the nucleus and interacts with single-stranded DNA. *J Invest Dermatol* 130(11): 2638-2646.
- South AP (2004). Plakophilin 1: an important stabilizer of desmosomes. *Clin Exp Dermatol* 29(2): 161-167.
- South AP, Wan H, Stone MG, Dopping-Hepenstal PJ, Purkis PE, Marshall JF, et al. (2003). Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *J Cell Sci* 116(Pt 16): 3303-3314.
- Sprecher E, Molho-Pessach V, Ingber A, Sagi E, Indelman M, Bergman R (2004). Homozygous splice site mutations in PKP1 result in loss of epidermal plakophilin 1 expression and underlie ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome in two consanguineous families. *J Invest Dermatol* 122(3): 647-651.
- Steigemann P, Wurzenberger C, Schmitz MHA, Held M, Guizetti J, Maar S, et al. Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization. *Cell* 136(3): 473-484.

- Stein WD, Litman T, Fojo T, Bates SE (2004). A Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) Database Analysis of Chemosensitivity. Comparing solid tumors with cell lines and comparing solid tumors from different tissue origins. *Cancer Res* 64(8): 2805-2816.
- Stewart BWa, Kleihues P (2003). *World Cancer Report*. Edn: IARC Press.
- Suárez Nieto C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J (2007). *Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. Edn: Editorial Médica Panamericana.
- Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D, Aebischer P (2006). A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* 3(2): 109-116.
- Tacha D, Yu C, Bremer R, Qi W, Haas T (2012). A 6-antibody panel for the classification of lung adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20(3): 201-207.
- Takahashi H, Nakatsuji H, Takahashi M, Avirmed S, Fukawa T, Takemura M, et al. (2012). Up-regulation of plakophilin-2 and Down-regulation of plakophilin-3 are correlated with invasiveness in bladder cancer. *Urology* 79(1): 240 e241-248.
- Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S, et al. (2001). Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 61(18): 6708-6712.
- Tortora GJ, Derrickson BH (2008). *Principles of Anatomy and Physiology*. Edn: John Wiley & Sons.
- Travis WD, Brambilla E, et al. (2004). *WHO Classification. Tumors of the lung, pleura, thymus and heart*. Edn: NY: WHO Publication Center.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. (2013). Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med* 137(5): 668-684.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Vannini I, Fanini F, Fabbri M (2013). MicroRNAs as lung cancer biomarkers and key players in lung carcinogenesis. *Clin Biochem* 46(10-11): 918-925.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51(10): 2515-2520.
- Wachi S, Yoneda K, Wu R (2005). Interactome-transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues. *Bioinformatics* 21(23): 4205-4208.
- Weinberg RA (2014). *The biology of cancer. Second Edition*. Edn: New York and London.

- Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O (2001). The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* 276(44): 41175-41181.
- Whitsett JA, Bachurski CJ, Barnes KC, Bunn PA, Case LM, Cook DN, et al. (2004). Functional genomics of lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 31(supplement_1): S1-S81.
- Whitlock NV, Haftek M, Angoulvant N, Wolf F, Perrot H, Eady RA, et al. (2000). Genomic amplification of the human plakophilin 1 gene and detection of a new mutation in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *J Invest Dermatol* 115(3): 368-374.
- Wieskopf B, Demangeat C, Purohit A, Stenger R, Gries P, Kreisman H, et al. (1995). Cyfra 21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. Evaluation of sensitivity, specificity, and prognostic role. *Chest* 108(1): 163-169.
- Wigle DA, Jurisica I, Radulovich N, Pintilie M, Rossant J, Liu N, et al. (2002). Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res* 62(11): 3005-3008.
- Wiznerowicz M, Trono D (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77(16): 8957-8961.
- Wolf A, Hatzfeld M (2010a). A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle* 9(15): 2973-2978.
- Wolf A, Keil R, Gotzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, et al. (2006). The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* 8(12): 1432-1440.
- Wolf A, Krause-Gruszczynska M, Birkenmeier O, Ostareck-Lederer A, Huttelmaier S, Hatzfeld M (2010b). Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol* 188(4): 463-471.
- Wolf A, Rietscher K, Glass M, Huttelmaier S, Schutkowski M, Ihling C, et al. (2013). Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 function from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *J Cell Sci* 126(Pt 8): 1832-1844.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 1692(2-3): 103-119.
- Yang C, Strobel P, Marx A, Hofmann I (2013). Plakophilin-associated RNA-binding proteins in prostate cancer and their implications in tumor progression and metastasis. *Virchows Arch* 463(3): 379-390.
- Yang F, Camp DG, Gritsenko MA, Luo Q, Kelly RT, Clauss TRW, et al. (2007). Identification of a novel mitotic phosphorylation motif associated with protein localization to the mitotic apparatus. *Journal of Cell Science* 120(22): 4060-4070.
- Yates A, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Billis K, Carvalho-Silva D, et al. (2016). Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res* 44(D1): D710-716.

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85.

10. ABREVIATURAS

7-AAD: 7-Amino-Actinomicina

AC: Adenocarcinoma

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AJCC: Comité Unido Americano de Cáncer (del inglés, *American Joint Committee on Cancer*)

APC: poliposis adenomatosa coli

APS: Persulfato amónico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN interferentes

ARNip: ARN interferentes pequeños

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ARVCF: Deleción de gen de repeticiones armadillo en síndrome velocardiofacial

ATCC: Colección americana de cultivos tipo (del inglés, *American Type Culture Collection*)

AURK: Quinasa Aurora

Bcl2: Linfoma de células-B 2

Brc: Regulador de la diferenciación de queratinocitos

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CCC: Coeficiente de Correlación de Concordancia

CCLE: Enciclopedia de líneas celulares de cáncer (del inglés, *Cancer Cell Line Encyclopedia*)

CDS: Secuencia codificante del ADN

CEACAM1: Molécula de adhesión celular 1 relacionada con antígeno carcinoembriogénico

CK: Citoqueratina

CPC: Complejo Cromosómico Pasajero

Ct: Ciclo umbral (del inglés, *threshold cycle*)

DABCO: 1,4-diazobiciclo-(2,2,2)-octano

DAPI: 4'6'-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DownR: Inhibición génica (del inglés, *Downregulated*)

DSC: Desmocolina

dsDNA: ADN de doble cadena (del inglés, *double strand DNA*)

DSG: Desmogleína

dsRNA: ARN de doble cadena (del inglés, *double strand RNA*)

E-cad: E-cadherina

EDSFS: Síndrome de Displasia Ectodérmica o Fragilidad de la Piel

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

eIF4A1: Factor eucariótico de inicio de la traducción 4A1

EMT: Transición epitelio-mesénquima

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

EV: Plásmido vacío (del inglés, *Empty Vector*)

FBS: Suero bovino fetal

FC: Nivel o tasa de cambio (del inglés, *Fold-change*)

FDR: Tasa de Falsos Descubrimientos (del inglés, *False Discovery Rate*)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FN: Falsos Negativos

FP: Falsos Positivos

FXR1: Proteína relacionada con X-frágil

G3BP: Proteína de unión a ras-GAP-SH3

GST: Glutación S-transferasa

hepaCAM: Molécula de adhesión de células hepáticas y gliales

HRP: Peroxidasa del rábano

IASLC: Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (del inglés, *International Association for the Study of Lung Cancer*)

IC: Intervalo de Confianza

JAM: Molécula adhesiva de la unión

JNK2: Quinasa c-Jun N-terminal 2

KD: muestra silenciada (del inglés, *KnockDown*)

KIF: Filamento intermedio de queratina

LCC: Carcinoma de células grandes (del inglés, *Large Cancer Cells*)

LEF/TCF: Factor potenciador linfoide/factor de células T

MAL/SRF: Factor de transcripción/factor de respuesta sérica

MCS: Sitio de clonado múltiple (del inglés, *Multiple Cloning Site*)

miRNA: micro ARN (del inglés, *micro RNA*)

MS: Media de Supervivencia

MTT: Metil-tiazol-difeniltetrazolium

N: Número de casos

NMD: Degradación del ARNm mediada por mutaciones terminadoras

NSCLC: Cáncer de pulmón no microcítico (del inglés, *Non-Small Cell Lung Cancer*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PABPC1: Proteína de unión a Poli-A

Pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate buffer saline*)

PCA: Análisis de componentes principales

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: Ficoeritrina

PERP: Efector de apoptosis de p53 relacionado a PMP-22

PFA: Paraformaldehido

PI: Ioduro de propidio

PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKC α : Proteína quinasa C alfa

PKP: Placofilina

PS: Fosfatidilserina

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

Rb: Proteína del retinoblastoma

Rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: Medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

RT: Reverso-transcripción

SC: Control negativo diseñado para que no sea específico de ningún producto génico (del inglés, *Scramble*)

SCC: Carcinoma escamoso o epidermoide (del inglés, *Squamous Cell Carcinoma*)

SLC: Cáncer de pulmón microcítico (del inglés, *Small Cell Lung Cancer*)

SD: Desviación estándar

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

shRNA: Horquilla pequeña de ARN (del inglés, *short hairpin RNA*)

siRNA: ARN interferentes pequeños (del inglés, *small interference RNA*)

SP-A: Apoproteína A del surfactante

ssDNA: ADN de cadena sencilla (del inglés, *single strand DNA*)

T-25, T-75, T-175: Frascos de cultivo de 25 mm³, 75 mm³ y 175 mm³ respectivamente

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilnediamina

TIF-IA: Factor de inicio de la transcripción IA

Tm: Temperatura de fusión (del inglés, *Melting Temperature*)

TNM: Sistema de clasificación Tumor, Nódulo y Metástasis

TTF-1: Factor de transcripción del tiroides

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

UPF1: Factor 1 de cambio de pauta de lectura

UpR: Sobreexpresión génica (del inglés, *Upregulated*)

UTR: Región no codificante

UTR: Región no traducida del ARNm

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VN: Verdaderos Negativos

VP: Verdaderos Positivos

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

WB: Inmunoblot (del inglés, *Western Blot*)

ZO: Proteína de zonula occludens

