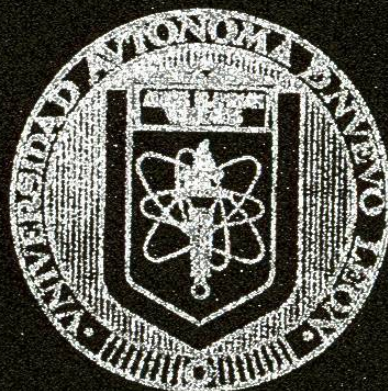


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFEECTO DE LA EXPRESION DEL GEN WT1 EN LA
PROLIFERACION CELULAR DE CANCER DE PULMON**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

BIOL. DIANA ELISA ZAMORA AVILA

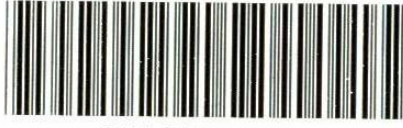
MONTERREY, N. L.

ENERO 2005

DEA

EXPRESSION DEL GEN VVTTI EN LA
PROTEINERACION CREDITIAR DE CHAMORR DE PULMON

TM
Z5 320
FCB
2005
. Z3



1020150352

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 EN LA
PROLIFERACIÓN CELULAR DE CÁNCER DE PULMÓN**

**QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

PRESENTA

BIOL. DIANA ELISA ZAMORA AVILA

MONTERREY, N. L.

ENERO 2012

9 17

TH

Z5300

FCB

2005

.Z3



FONDO
RESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 EN LA
PROLIFERACIÓN CELULAR DE CÁNCER DE
PULMON**

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

BIOL. DIANA ELISA ZAMORA AVILA

MONTERREY, N.L.

ENERO 2005

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 EN LA
PROLIFERACIÓN CELULAR DE CÁNCER DE PULMON**

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE


DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES

SECRETARIO


DR. JUAN MANUEL ALCOCER

VOCAL


DRA. LAURA MARIA TREJO AVILA

SUPLENTE


DR. EDGAR MENDOZA GAMBOA

MONTERREY, N.L.

ENERO 2005

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 EN LA
PROLIFERACIÓN CELULAR DE CÁNCER DE
PULMON**

DIRECTOR


DR. PABLO ZAPATA BENAVIDES

CO-DIRECTOR


DRA. LAURA MARIA TREJO AVILA

MONTERREY, N.L.

ENERO 2005

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida, por su amor incondicional y por brindarme la fortaleza siempre que la he necesitado.

Dedico este trabajo con todo mi amor a mi familia, a mis padres Diana y Jose Luis que siempre me han apoyado y que con su confianza, ayuda incondicional, preocupación e amor inigualable me han dado las fuerzas y motivación para salir siempre adelante y llegar hasta este punto en mi vida.

A ti, Mely, por ser una amiga más que una hermana a la que admiro y quiero.

A ti Pedro, con todo mi amor, por el amor que siempre me has brindado, por estar siempre a mi lado ayudándome a superarme y ser mejor cada día y por compartir mis alegrías y penas y hacerme saber que siempre estas y estarás conmigo .Te amo cielo...

A toda mi familia, tíos, primos y sobrinitos que siempre me han seguido, se han preocupado por mi y siempre me han demostrado su cariño.

A mis abuelitos, Papa Toño y Andrés que me cuidan y guían desde el cielo y a mis angeles en la tierra Mama Cheva y Tomasita..

A dos maestras y amigas que a pesar del tiempo y la distancia siempre han sido un ejemplo en mi vida: Maestra Rosario y Elvira..

A todos quienes compartieron conmigo de una u otra manera un espacio de su tiempo en estos dos años.....

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pablo Zapata Benavides, por su amistad y confianza, por ser mi guía y mi ejemplo, por sus enseñanzas que me han permitido desarrollarme y superarme día con día, por ayudarme a madurar y a crecer como persona , por inculcarme el amor a la ciencia y a la investigación y por permitirme trabajar a su lado en este proyecto que significa mucho para mi..

A la Dra. Laura Trejo por su confianza, su amistad y su apoyo para la realización y culminación de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por su ayuda y por todas las experiencias vividas, Santiago y Ana.

A mis compañeros de los diferentes laboratorios de Inmunología y Virología que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de este proyecto.

GRACIAS

*Cuando la desesperanza te invada,
cuando la desesperación te atormente,
confía en tu fuerza interior,
nútrete infinitamente de tu amor.*

Eres agua, no te agites

Eres sol, no te apagues

Eres cielo, no te nubles

Eres tierra, no te seques.

Piensa y confía en el poder infinito que hay dentro de ti..

*Ámate a ti mismo y cambiaras tu vida de manera
milagrosa.*

*Rompe las cadenas de tus pensamientos y échate a volar
con alas del corazón.*

Se Feliz, Goza, Vive...!Se Libre!

Se como tu Quieras Ser.

Silvia Susana Luconi

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la dirección del Dr. Pablo Zapata Benavides y co-dirección de la Dra. Laura Trejo Avila.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	33
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL.....	36
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
METODOLOGÍA.....	39
1. Cultivo de líneas celulares.....	39
2. Extracción de RNA.....	40
3. Síntesis del fragmento del cDNA.....	41
4. PCR- Reacción en cadena de la polimerasa.....	41
5. Western Blot.....	43
6. Diseño de un RNAi para WT1 y su síntesis comercial.....	45
7. Diseño de plásmidos contra WT1.....	46
8. Producción de RNAi en el plásmido pGSH1-GFP.....	48
9. Transfección.....	53
10. Ensayo de Proliferación celular con MTS.....	54
11. RT-PCR para genes apoptóticos.....	55

RESULTADOS.....	56
-Líneas celulares.....	56
-Cinéticas celulares.....	57
<i>I. Caracterización molecular del gen WT1 en las líneas celulares de cáncer pulmonar</i>	<i>58</i>
<i>II. Caracterización de las isoformas de WT1 en las líneas celulares de Cáncer pulmonar.....</i>	<i>60</i>
<i>III. Construcción de un RNAi para bloquear la expresión de WT1.....</i>	<i>62</i>
<i>IV. Transfección de la línea celular leucémica K562 con las cuatro Construcciones de plásmidos.....</i>	<i>63</i>
<i>V. Transfección de las líneas celulares de cáncer pulmonar con los Plásmidos para bloquear al gen WT1.....</i>	<i>67</i>
<i>VI. Transfección de las líneas celulares de cáncer pulmonar con el RNAi sintético para bloquear al gen de WT1.....</i>	<i>69</i>
<i>VII. Transfección de las líneas celulares de cáncer de pulmón I15, A427 y CALU con los plásmidos WT1/S y WT1/H.....</i>	<i>73</i>
DISCUSIÓN.....	75
CONCLUSIONES.....	78
PERSPECTIVAS.....	79
LITERATURA CONSULTADA.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

WT	Tumor de Wilms
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
PEI	Polietilenamina
Ad	Adenovirus
RNA	Acido Ácido
EGR1	Factor de respuesta a crecimiento temprano
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
RNAi	RNA de interferencia
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNAi
KTS	Lisina- Treonina- Serina
AA	Aminoácidos
ATCC	American Type Culture Collection
OD	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Dithiotreitol
nm	Nanómetros
g	gramos
ml	mililitros
RT	Transcriptasa Reversa
Mg	Magnesio
cDNA	DNA complementario
kb	Kilobases

kda	Kilodaltones
pm	Picomolar
ug	Microgramos
CO2	Dióxido de carbono
RPM	Revoluciones por minuto
min	Minutos
A	Adenina
T	Timina
C	Citosina
G	Guanina
Hrs	Horas
V	Volts
mM	Milimolar
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
μl	Microlitros
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
DNA	Acido Desoxirribonucleico
Hr	Horas
Min	Minutos
PBS	Buffer de Fosfatos
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PH	Potencial Hidrógeno
RNA	Acido Ribonucleico

RT	Transcriptasa Reversa
SFB	Suero Fetal Bovino
Taq	Thermophilus acuaticus
TBE	Regulador Tris-Boratos
TBS	Solución balanceada de Tris
EDTA	Acido Etilen diamino-tetra-acético
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Fig 1.Relación del número de cigarrillos fumados por día y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.....	7
Fig 2.Anatomía del pulmón.....	9
Fig.3. Células pequeñas de cáncer de pulmón.....	10
Fig.4.Células no pequeñas de cáncer de pulmón.....	11
Fig.5.Anormalidades en el ciclo celular en células cancerosas.....	13
Fig.6. Mecanismos del RNA de interferencia (RNAi).....	26
Fig.7.Estructura del RNAm de WT1 y sus isoformas.....	29
Fig.8. Mapa del plásmido pGSH1-GFP.....	48
Fig.9. Elementos del vector pGSH1-GFP.....	48
Fig.10. Secuencia del plásmido lineal pGSH1-GFP.....	49
Fig.11.Prototipo del diseño de los oligos sentidos y antisentidos para su expresión en el plásmido pGSH1-GFP.....	49
Fig.12. Fotografías de las líneas celulares no pequeñas de cáncer de pulmón estudiadas.....	56
Fig.13.Cinéticas celulares de las líneas I37 y A427 a diferentes cantidades iniciales de células por pozo a las 72 horas.....	57
Fig.14. A)RNAm de WT1 y localización de la secuencia amplificada con los "primers" 71-72 (barra).....	58

B) RT-PCR de B-actina y WT1 de las líneas celulares de cáncer depulmón.....	58
Fig.15 A) RNAm de WT1 y localización del anticuerpo policlonal C19..	59
B)Western blot para WT1 de la slíneas celulares de cáncer de pulmón.....	59
Fig.16 A) RNAm de WT1 y localización de los "primers" para las isoformas de WT1.....	60
B) RT-PCR de las isoformas de WT1 E5 +/-, KTS +/- . Control positivo (línea celular leucémica K562).....	60
Fig.17."Minipreps" de las transformaciones con las construcciones de los plásmidos.....	62
Fig.18.Línea K562 transfectada con los plásmidos para inhibir al gen de WT1 observadas con el microscopio confocal.....	64
Fig.19.Transfección de la línea K562 con diferentes concentraciones del plásmido 5 6.....	65
Fig.20. Western Blot para WT1 y GFP de la línea J562 con diferentes concentraciones del plásmido 5-6.....	66
Fig.21.Transfección de la línea CALU con los plásmidos contra WT1..	67
Fig.22. Western Blot para WT1 y GFP de la línea celular CALU con el plásmido 5-6.....	68
Fig.23. Transfección de la línea I15 con el RNAi sintético contra WT1.....	69
Fig.24. Transfección de la línea A427 con el RNAi sintético contra WT1.....	70
Fig.25. Transfección de la línea SKMES con los RNAi sintéticos.....	71

Fig.26. Transfección de la línea CALU con los RNAi sintéticos.....72

Fig.27.RT- PCR para genes apoptóticos en las líneas I15, A427 y CALU
transfectadas con WT1.....74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Líneas celulares de cáncer de pulmón.....	37
Tabla 2. Primers específicos para la expresión total de WT1.....	42
Tabla 3. Primers específicos para las isoformas de WT1.....	43
Tabla 4. Secuencias de RNAi sintetizadas por Invitrogen.....	45
Tabla 5. Características de las secuencias blanco para WT1.....	47
Tabla 6. Secuencias de oligos para su expresión en el plásmido pGSH1-GFP.....	50
Tabla 7. Densidades ópticas de las cinéticas celulares con su media y su desviación estándar.....	57
Tabla 8. Isoformas de WT1 en las líneas celulares de cáncer Pulmonar.....	61
Tabla 9. Resultados de la transfección de la línea celular K562 con los plásmidos para inhibir al gen de WT1 con un número inicial de 300,00 células por pozo.....	63



RESUMEN

El cáncer de pulmón es la neoplasia con mayores índices de mortalidad en el mundo y en nuestro país el número de casos de muertes por esta patología va en aumento.

WT1 es un factor de transcripción involucrado en procesos como diferenciación sexual, proliferación celular y apoptosis y se encuentra sobreexpresado en numerosos tipos de neoplasias. Recientemente se ha reportado la expresión de WT1 en líneas celulares de cáncer de pulmón.

En este trabajo se estableció como objetivo principal analizar el efecto del gen WT1 en la proliferación celular de líneas celulares de cáncer de pulmón bloqueándolo con RNA de interferencia.

Se trabajaron seis líneas de cáncer de pulmón, las cuales se caracterizaron para la expresión del gen WT1 tanto por RT-PCR como por Western Blot y en todas las líneas se observó expresión de este gen, predominando las isoformas KTS- y Exón 5 negativo. Se silenció al gen de WT1 con un RNAi-WT1 sintético y con cuatro construcciones de plásmidos que albergaban diferentes secuencias contra WT1.

Las líneas de cáncer pulmonar I15, A427, SKMES y CALU tratadas con el RNAi-WT1 sintético mostraron inhibición de la proliferación celular de un 40% a un 60%.

La línea de cáncer pulmonar CALU fue la que mostró efecto de la inhibición en la proliferación celular al ser tratada con los plásmidos recombinantes ,principalmente con los plásmidos 5-6 y 7-8.



En base a los resultados obtenidos concluimos que el bloqueo de la expresión de la proteína WT1 induce inhibición de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de pulmón , lo cual contribuye a considerar a WT1 como un biomarcador y blanco terapéutico para este tipo de neoplasia.



INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer de pulmón es el tumor maligno más frecuente en el mundo (12.3% de todos los tipos de cáncer), con un estimado de 1.2 millones de nuevos casos en el 2000 y un índice de mortalidad del 17.8%. Se estima que para el año 2025 se incrementará el número de muertes en más del 80%, es decir, a tres y medio millones en países en desarrollo.

En nuestro país se calcula para el año 2010 mas de 10,000 muertes por esta causa, asimismo en hospitales especializados como el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el numero de casos atendidos por esta patología va en aumento.

El 11% de los fumadores activos desarrollan cáncer pulmonar, lo que sugiere que probablemente existan factores genéticos que constituyen un factor de riesgo.

Menos del 15% de los pacientes con cáncer pulmonar son curables y tienen una sobrevivencia de 5 años.

Los bajos índices de sobrevivencia asociados con cáncer pulmonar conllevan a nuevas alternativas de tratamiento.

Existen genes que están involucrados en la patogénesis y proliferación celular del cáncer pulmonar, entre los que se encuentran c-myc, p53, Rb, p16 y recientemente se ha encontrado la expresión del gen del tumor de Wilms (WT1) en líneas celulares de cáncer pulmonar.



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

El gen de WT1 codifica para un factor de transcripción involucrado en procesos de diferenciación celular y apoptosis.

Se ha encontrado una alta expresión de WT1 en leucemia y diferentes tumores sólidos, entre los que se encuentra el cáncer de pulmón sugiriendo que WT1 juega un papel importante en la tumorigénesis del cáncer pulmonar y provee nuevas estrategias terapéuticas, considerando a este gen como un buen blanco para terapia génica.

En este trabajo se pretende establecer si el gen de WT1 se encuentra involucrado en la proliferación celular de cáncer de pulmón caracterizando la expresión de este gen en líneas celulares no pequeñas de cáncer pulmonar, asimismo se pretende bloquear la expresión del gen utilizando construcciones de RNA de interferencia que se suministrarán a las células para ver su efecto en la proliferación celular.



ANTECEDENTES

El cáncer agrupa a una serie de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento sin control y propagación anormal de células que pierden su capacidad de diferenciación, aumentan su invasividad y tienen baja sensibilidad a las drogas citotóxicas; en los hispanos adultos constituye la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardíacas. (1)

EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE PULMON

El cáncer pulmonar es la forma más común de cáncer en el mundo, y es la causa de 170,000 muertes al año en los Estados Unidos (2). Antes del siglo XX, el cáncer pulmonar era una entidad patológica muy rara. A partir de 1930, su frecuencia ha aumentado. Se estima que para el año 2025 se incrementará el número de muertes en más de 80% en países en desarrollo (3).

La frecuencia de cáncer de pulmón en nuestro país se ha incrementado considerablemente en décadas recientes. Marina y col. describen la epidemia de cáncer pulmonar en México durante el siglo XX y sus tendencias para la época actual, ellos observaron un incremento en la mortalidad para las cohortes nacidas durante las primeras décadas del siglo XX y un descenso mayor en las regiones más desarrolladas



del país. Las muertes por cáncer pulmonar crecerán en las regiones menos marginadas a tasas inferiores a las tasas de crecimiento de la población, mientras que en las regiones menos desarrolladas, las muertes por cáncer pulmonar tendrán un crecimiento superior al crecimiento anual de la población. La reducción en las cohortes más recientes parece deberse a una disminución en la intensidad del tabaquismo. En la década actual continuará aumentando el número de casos de cáncer pulmonar, ya sea por envejecimiento de la población en las regiones más desarrolladas del país, así como por una alta incidencia de la enfermedad en las regiones menos desarrolladas (4).

Medina y col. en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias encontraron una alta frecuencia en pacientes entre 61 y 70 años, en otro estudio realizado durante el periodo 1997-2000 encontraron que el 8% de los pacientes eran menores de 40 años y tenían un riesgo cuatro veces mayor de presentar adenocarcinoma que los pacientes mayores de 40 años. Esta distribución por edad refleja una probable propensión de los hombres jóvenes a desarrollar este tipo de tumor o un incremento de la incidencia en años recientes que se está reflejando en las cohortes más jóvenes (3,5).

Actualmente se ha reflejado un aumento en los índices de mortalidad por cáncer pulmonar en las mujeres; en Estados Unidos un cuarto de las mujeres continúan fumando a pesar del conocimiento de los efectos negativos que el cigarro produce y el índice de mortalidad ha aumentado un 600% de 1930 a 1997. Las mujeres parecen ser más susceptibles a los carcinogénicos del cigarro que los hombres, aunado a esto están las diferencias en la biología del cáncer pulmonar entre los dos sexos como un



incremento en la expresión del gen CYP1A1, un decremento en la capacidad de reparación del DNA y un incremento en las mutaciones del gen K-ras, todas éstas características que se presentan en las mujeres. El receptor estrógeno beta también se ha detectado en tumores de pulmón sugiriendo que la señal del estrógeno participe en la tumorigénesis. (6,7,8,9)

El tabaquismo es el principal factor de riesgo para desarrollo de cáncer pulmonar en el 80% de los casos., y el asbesto, radón y otras exposiciones laborales y ambientales, así como factores genéticos, constituyen los factores de riesgo restantes. (2,10)

La Organización Mundial de la Salud estima que el 47% de los hombres y el 12% de las mujeres en el mundo de 15 años o menos son fumadores, sin embargo, los rangos de tabaquismo han decrecido en ciudades industrializadas desde 1975.(2, 10,11,12)

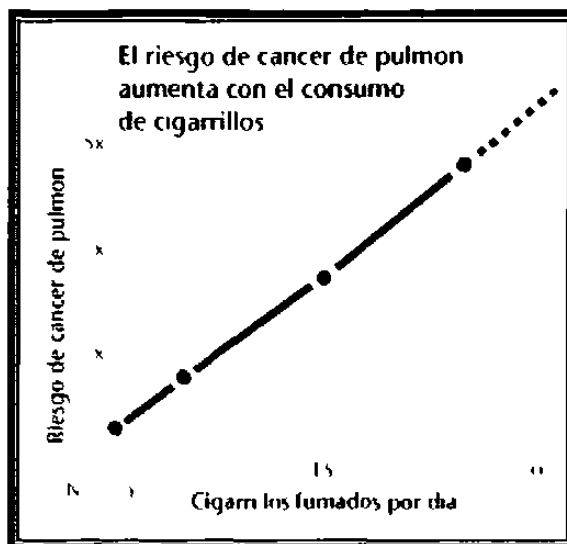


Fig.1. Relación del número de cigarrillos fumados por día y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.



El rango de mortalidad por cáncer pulmonar aumenta 7.5 veces en fumadores activos que consumen de 1 a 14 cigarros al día y 25.4 veces en aquellos que fuman 25 o más cigarros diarios. *Fig.1. (2)*

Existe una predisposición genética para el desarrollo de cáncer pulmonar, los fumadores con antecedentes familiares de cáncer de pulmón tienen un riesgo relativo de 2 a 2.5 veces mayor en relación con fumadores sin antecedentes familiares (2,13).

Hay diferencias raciales notables en la incidencia de cáncer pulmonar, los Afroamericanos poseen un riesgo 1.8 veces mayor que los individuos de raza blanca y los grupos de población Hispana, Asiáticos y los grupos que habitan las islas del Pacífico tienen un índice reducido comparado con los individuos de raza blanca. Entre fumadores, las mujeres tienen un riesgo mayor que los varones de 1.7 (2,12).

La dieta es otro factor, el riesgo se incrementa con una dieta alta en colesterol y en consumo de grasas; se ha mencionado un efecto protector de las vitaminas A y C y los betacarotenos. (2,14,15)



ANATOMIA DEL PULMON

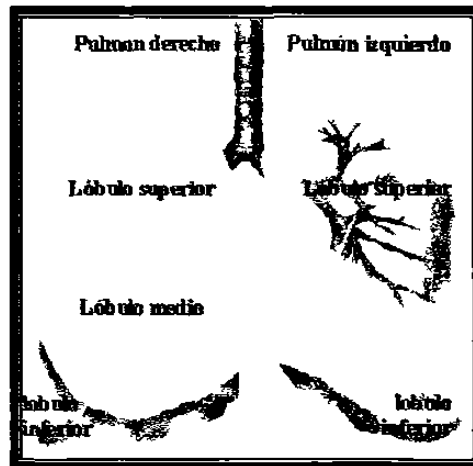


Fig.2. Anatomía del pulmón.

El pulmón está compuesto por regiones anatómicas diferentes: los conductos aéreos (tráquea, bronquios y bronquiólos) y los espacios de intercambio gaseoso (alvéolos).*Fig.2.*

Cada una de éstas regiones está compuesto por distintos tipos de células epiteliales con características fisiológicas únicas. Hay dos tipos de epitelio en los conductos aéreos: el alveolar tipo I y células del tipo II. Las células alveolares del tipo II representan la población de células progenitoras y son blanco para terapia génica por la expresión persistente de transgenes al ser integrados en esta zona del pulmón. En contraste, las células tipo I constituyen el área de superficie de éste órgano. (16)



CLASIFICACION DEL CANCER PULMONAR

Existen dos tipos principales de cáncer de pulmón: el cáncer de pulmón de células pequeñas y el de células no pequeñas.

1. Cáncer de pulmón de células pequeñas:



Fig.3 Células Pequeñas de Cáncer de Pulmón.

Constituyen el 20% de todos los cánceres, las células se multiplican rápidamente y poseen la capacidad de extenderse a otros órganos mayores como ganglios linfáticos, huesos, cerebro, glándulas suprarrenales e hígado. El tumor primario generalmente se origina cerca de los bronquios y se expande hacia el centro de los pulmones. Se reconocen los siguientes subtipos: Carcinoma de células pequeñas; Carcinoma mixto de células pequeñas y grandes y Carcinoma combinado de células pequeñas: Hay células pequeñas de cáncer de pulmón, combinadas con componentes neoplásicos escamosos, glandulares o ambos.

La causa principal de este tipo de cáncer es el tabaco.(11)



2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas:



Fig.4. Células No Pequeñas de Cáncer de Pulmón

Representa casi el 80% del total de cánceres de pulmón. Se extiende más lentamente que el de células pequeñas. Existen tres subtipos: Carcinoma de células escamosas o epidermoide (30%): Suele iniciarse en los tubos bronquiales, se desarrolla por etapas que suelen evolucionar en varios años, Adenocarcinoma (40%) y Carcinoma indiferenciado de células grandes (10%). (11)

En México, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) durante el periodo de 1997 a diciembre del 2002 ingresaron 845 pacientes con diagnóstico de Cáncer pulmonar de los cuales 577(68.3%) presentaron adenocarcinoma, 175 pacientes (20.7%) presentaron carcinomas celulares escamosos y 93 pacientes (11%) presentaron otro tipo histopatológico. (5)

El adenocarcinoma es el subtipo histopatológico más frecuente en hombres jóvenes y con menor proporción al tabaquismo.(5)



DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

Para el diagnóstico de cáncer de pulmón se utilizan diversas pruebas como las radiografías, tomografías, resonancia magnética, citología del esputo y la biopsia de tejido.(2,11)

El tratamiento para pacientes con cáncer pulmonar consiste en una combinación de varias técnicas como lo son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Actualmente se ha incursionado en el ámbito de la terapia génica con elementos antisentidos para bloquear la expresión de genes involucrados en proliferación de células cancerosas y vectores adenovirales para reestablecer la función de genes mutados. (17,18,19).

En el cáncer de pulmón de células no pequeñas el tratamiento de primera línea es el platino con gemcitabina o paclitaxel (taxol) y carboplatino. El tratamiento de segunda línea es por docetaxel, carboplatino, topotecan, irinotecan y vinorelvina. (18)

Para el cáncer de pulmón de células pequeñas, los quimioterápicos se emplean combinados, los más frecuentes son EP (etopósido y cisplatino), ET (etopósido y carboplatino), ICE (ifosamida, carboplatino y etopósido) y CAV (ciclofosfamida, doxorubicina y vincristina).(18)



ANORMALIDADES MOLECULARES EN EL CICLO CELULAR EN LA PATOLOGÍA DEL CANCER PULMONAR

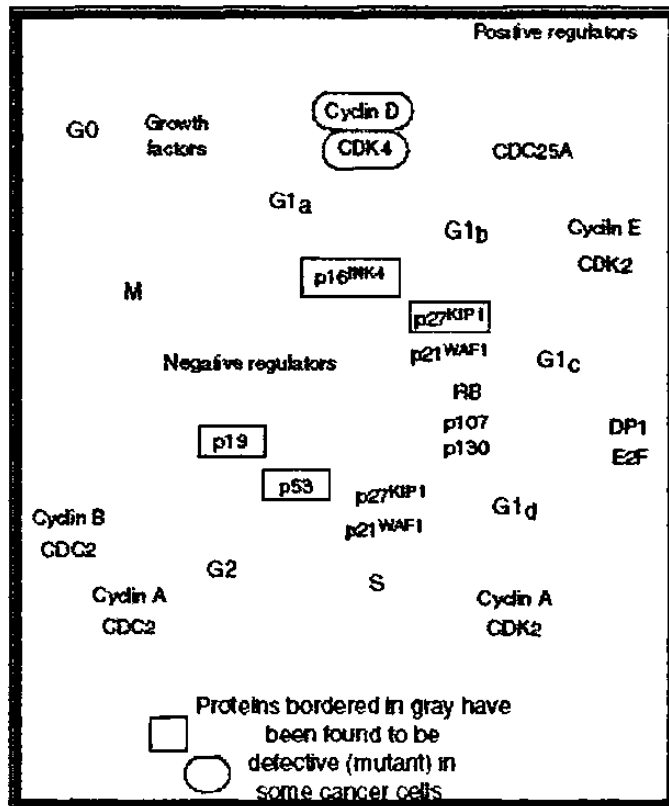


Fig.5. Anormalidades en el ciclo celular en células cancerosas.

Existe una amplia gama de genes celulares involucrados en la proliferación celular regulándola positivamente (factores de crecimiento) o negativamente (genes supresores de tumores), sin embargo, el desbalance en la expresión de estos genes pueden conducir a un proceso neoplásico. **Fig.5.**

La transformación maligna de las células epiteliales de pulmón es el resultado de la acumulación de múltiples pasos de alteraciones genéticas y moleculares altamente relacionadas con los carcinogénicos contenidos en el tabaco, en donde se ven



involucrados numerosos elementos de regulación del ciclo celular y mecanismos de proliferación y apoptosis.

La activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores elimina los puntos de revisión del ciclo celular y apoptosis y aceleran la división celular.

Se han descrito alrededor de 50 genes supresores de tumores y 100 oncogenes. Los genes que contribuyen a la patogénesis del cáncer pulmonar son c-myc, mutaciones en K-ras, sobreexpresión del EGFR, cíclica D1 y BCL2. (20). Los genes supresores de tumores incluyen a p53 (90% en SCLC; 50% NSCLC), Rb (90% SCLC; 20% NSCLC) y p16 (50% NSCLC; 1% SCLC). (21). Otros genes supresores de tumores involucrados con menor frecuencia son PTEN, hOGG1 (reparador del DNA), BAP1. El principal modo de inactivación de la expresión de un gran número de genes supresores de tumores involucra la hipermetilación del promotor (22).

Los componentes críticos del ciclo celular incluye a las ciclinas dependientes de cinasas (Cdk) y las proteínas retinoblastoma (Rb), p53 y E2F; cada Cdk está regulada por una subunidad de ciclina, la cual es requerida para la actividad catalítica y especificidad al sustrato. (2)

Un paso crucial en ciclo celular ocurre en la fase tardía de G1, donde interaccionan factores de competencia como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factores de progresión como el factor de crecimiento tipo insulina-I



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

(IGF-I), ambos factores son utilizados por las células tumorales de cáncer de pulmón para potenciar el crecimiento tumoral. Las señales de transducción de la superficie celular al núcleo causa un incremento transiente y rápido de los niveles de ciclinas tipo D. La ciclina D1 se acompleja con Cdk 4/6 y fosforila a Rb. (23) La sobreexpresión de D1 es una anomalía común en cáncer de pulmón. (24)

Existen dos familias de inhibidores de Cdk que son cruciales en la progresión de G1: la familia INK4 que contiene cuatro genes (INK4 a, b, c y d) cuyos productos se unen a los dímeros de ciclina D-Cdk 4/6 para inactivar la función de quinasa; y la familia Kip1 (p21, p27 y p57) se une a los complejos de ciclina D-Cdk 4/6, ciclina E-Cdk-2 y ciclina A-Cdk-2. (25)

La proteína Retinoblastoma (Rb) se encuentra mutada o deletada en más del 90% de los casos de cáncer pulmonar.

La inactivación de pRb produce un incremento en los niveles de E2F en la célula, el cual es un factor de transcripción que activa los genes de la fase S del ciclo celular por lo que es crítico para la replicación del DNA en donde las proteínas del complejo del reconocimiento de origen (ORC) llevan gran parte del control.

Las proteínas ORC se unen a Cdc6 para controlar el inicio de la replicación del DNA. En cáncer de pulmón, E2F se encuentra libre y puede regular a Cdc6 causando una desregulación del ciclo celular con anomalías en la proliferación celular. Cdc6



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

puede ser considerado un marcador de la desregulación del ciclo celular y puede ser blanco para detección o estrategias terapéuticas a seguir en esta patología.

La inactivación de p53 es una de las alteraciones más comunes en cáncer pulmonar (75%), en el 50% de las NSCLC y de un 70%-80% en SCLC. (2)

La proteína p53 es un factor de transcripción nuclear que se une al promotor de p21 induciendo su expresión e inhibiendo la progresión del ciclo celular en la fase G1/S. De manera alternativa p53 induce a bax el cual promueve la apoptosis. Para la expresión fenotípica de los genes supresores de tumores que se pierdan los dos alelos por mutaciones, deleciones grandes o mecanismos de recombinación.

La proteína p16 del cromosoma 9p21 se une a Cdk4 e inhibe la fosforilación de Rb. Una sobreexpresión de E2F sobreexpone la expresión de p16 e inhibe la actividad de quinasa dependiente de ciclina D.

P16 puede ser inactivado por metilación del DNA en estadios tempranos de NSCLC, en donde deleciones homocigotas y/o mutaciones ocurren más frecuentemente en etapas tardías. Alteraciones tanto en las vías de p16/Rb como de p53 conllevan a un incremento en la proliferación celular de NSCLC y NSCLC.

Kelley y colaboradores encontraron que 18 de 77 (23%) de NSCLC poseen p16 mutado en comparación con el 1% en SCLC. (2)



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

Por medio de inmunohistoquímica se mostró una tinción de p16 nuclear en células NSCLC Rb negativas, lo cual se correlaciona con un incremento en la proliferación, especialmente en las NSCLC con mutaciones en p53.

De esta manera se observa que hay una relación inversa entre p16 y Rb en cáncer de pulmón, en SCLC Rb está mutado pero no así p16, en cambio en NSCLC la expresión de p16 está interrumpida pero no así la de Rb.

La pérdida de localización nuclear de p14ARF ocurre en el 70% de SCLC y en el 25% de NSCLC. Las células SCLC tienen una mayor propensión de proliferación celular debido tanto a la pérdida de p14ARF como a la falla en p53. (2)

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citosina clave que media la inflamación en los pulmones e influye en el ciclo celular induciendo a p15 a cesar la proliferación celular y arresto en G1. Rb es un activador transcripcional de TGF- β 1 y TGF- β 2. TGF- β induce a p21 y reprime a c-myc, sin embargo estos mecanismos no ha sido reportados en cáncer de pulmón.

La activación del oncogén K-ras por mutaciones puntuales en el codón 12 ocurren en el 50% de los adenocarcinomas y por medio de PCR éstas mutaciones se pueden identificar en las células broncoalveolares(BAL). En 52 pacientes con cáncer pulmonar se encontraron mutaciones en las células BAL en 14 de 25 adenocarcinomas,



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

1 de 3 carcinomas broncoalveolares, 1 de 5 carcinoma de células grandes y en 0 de 14 carcinomas de células escamosas. (2)

El protooncogen c-myc está amplificado en un subset de SCLC y menos comúnmente en NSCLC. El producto de este gen es un factor de transcripción que forma heterodímeros con Max que activa genes involucrados en crecimiento celular y apoptosis; estos dímeros activan al promotor de cdc25A el cual activa a Cdk2 y Cdk4 que estimulan la progresión de G1/S.

La desregulación del ciclo celular en NSCLC puede explicarse, en parte, por la sobreexpresión de c-myc que conduce a la potenciación de la actividad de ciclina E7CDK2 y la fosforilación/inactivación de Rb y la entrada a la fase S. (2)

La anomalía más común en cáncer de pulmón que involucra a c-myc es la amplificación del gen o bien sobreexpresión del mismo sin amplificación. La sobreexpresión con y sin amplificación ocurren en el 80% a 90% de SCLCs, en contraste con las NSCLC en donde solo se encuentra la amplificación en un 10% y una sobreexpresión sin amplificación en un 50%. (2)

La telomerasa se expresa en la mayoría de los cánceres humanos, incluyendo el cáncer de pulmón. Se detectó actividad de telomerasa en el 80% (109 de 136) de los casos de cáncer de pulmón. (2)

Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón



La survivina se expresa durante el desarrollo embrionario pero no así en los tejidos adultos ya diferenciados, sin embargo ésta se reexpresa en líneas celulares transformadas y en una gran variedad de tumores humanos, la expresión ocurre en la fase G2-M del ciclo celular y su interacción con el huso mitótico es fundamental para el proceso de apoptosis ya que inhibe la el efecto río abajo de las caspasas 3 y 7. Las células de cáncer de mama y pulmón expresan los niveles más altos de survivina que se encuentran en tumores humanos y su expresión se ha relacionado con una baja sobrevivencia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, por lo que se ha considerado como blanco terapéutico para terapia génica en donde se han utilizado ya oligonucleótidos antisentidos en una línea celular de adenocarcinoma (A549) induciendo apoptosis, además se ha visto que en combinación con la droga etopósido, las células cancerosas se sensibilizan a la quimioterapia. (26)

Recientemente se ha encontrado la expresión de **WT1** en líneas celulares de cáncer de pulmón, Mensen y col. detectaron la expresión de WT1 en 5 de 11 líneas celulares de cáncer de pulmón (45%) por medio de RT-PCR, en 5 líneas SCLC se encontraron 2 positivas (40%) y en 3 de 6 de NSCLC (50%), en otra investigación WT1 también se encontró sobreexpresado en 12 de 15 líneas celulares de cáncer pulmonar. (27,28)

En un estudio realizado por Oji y col. encontraron la expresión de WT1 en el 96% (54/56) por RT-PCR, de igual manera se demostró la sobreexpresión de WT1 en el 83% (5/6) de los casos de cáncer de pulmón por inmunohistoquímica, además se



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

realizó la secuenciación de 7 casos y no se encontraron mutaciones, sugiriéndose así que WT1 wild type juega un papel importante en la tumorigénesis del cáncer pulmonar.

(29)

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta revelaron la proteína de WT1 en el núcleo de 1 de 6 líneas celulares de cáncer pulmonar (NSCLC HTB57). (27)

Por otra parte, se han utilizado oligos antisentidos para WT1 que suprimen el crecimiento celular de la línea pulmonar OS3, concluyendo que la expresión de WT1 juega un rol importante en el crecimiento de este tipo de cáncer. (28)

La distinción entre mesoteliomas y adenocarcinoma pulmonar es importante desde el punto de vista clínico. El mesotelioma es un raro tipo de neoplasia asociado principalmente al manejo del asbesto y generalmente invade a pulmón. Foster y col. determinaron que WT1 es un biomarcador histológico que permite diferenciar el adenocarcinoma pulmonar del mesotelioma, en su trabajo encontraron que el 86% de los mesoteliomas mostraron una localización nuclear de WT1, mientras que en adenocarcinomas no está presente en el núcleo (0/51). La localización nuclear de WT1 es 100% específica para mesoteliomas y esto constituye una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de mesoteliomas malignos. Estos resultados indican que WT1 es un buen indicador tumoral y que además puede permitir un diagnóstico diferencial entre estos dos tipos de neoplasias.(30)



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

Los pacientes con cáncer pulmonar de células pequeñas son tratados diferentes de aquellos de células no pequeñas, por lo que la distinción entre estos dos tipos de patologías es muy importante.

En el cáncer pulmonar de células pequeñas la progresión del tumor sigue su curso clínico típico caracterizado por una excelente respuesta inicial a la quimioterapia y generalmente le siguen a ésta meses de una completa regresión, la cual con el tiempo es seguida de recurrencia, desarrollo de resistencia a la quimioterapia y finalmente la muerte debida a una diseminación sistémica. En contraste en el cáncer pulmonar de células no pequeñas es más difícil predecir el desarrollo del cuadro clínico del paciente.

Aproximadamente el 50% de los pacientes mueren por metástasis aún incluso después de una remoción del tumor primario. (31)

Algunas alteraciones genéticas en cáncer, han servido como biomarcadores los cuales se han utilizado para establecer el pronóstico de la enfermedad, así como para el desarrollo y uso de la terapia génica.

La terapia génica para el tratamiento de cáncer pulmonar es una rama muy importante ya que más del 80% de los cánceres pulmonares no responden favorablemente a la radiación o a la quimioterapia.(31)

La restauración de la función del gen supresor p53 con adenovirus han mostrado inhibición de crecimiento de células de cáncer de pulmón in vitro, en modelos



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

animales y en casos clínicos humanos. Otra estrategia que se ha empleado para restaurar la función de p53 es el uso de un polímero catiónico polietilenamina, (PEI) como vector génico en un sistema de aerosol, en donde p53 induce mecanismos antiangiogénicos para suprimir el desarrollo de metástasis en el cáncer pulmonar en un modelo de melanoma murino. (33)

Adicionalmente, la actividad de supresión del tumor resultante de esta terapia génica se potencia con la combinación de múltiples drogas quimioterapéuticas o radiación ionizante (32,34).

La terapia génica con Ad-p53 restaura potencialmente la sensibilidad a la terapia de radiación y quimioterapia de cánceres pulmonares que pierden la función de p53 (32,34).

Utilizando un sistema de aerosol para la transferencia de complejos de PEI-p53 silvestre en modelo de micrometástasis a pulmón como modelo de osteosarcoma humano en ratones se logró reducir significativamente el número y tamaño de los tumores y nódulos, sensibilizando a las células a la quimioterapia (33)

Para terapia génica en cáncer pulmonar actualmente se encuentran en estudio diversos genes como el gen RB2/p130 el cual es un miembro de la familia de Rb que tiene propiedades de suprimir el crecimiento, éste se ha estudiado en una línea celular de tumor cerebral de hamster y se ha demostrado que puede ser utilizado para reducir el crecimiento (69% de reducción), además se ha reportado que existen



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

mutaciones en este gen en líneas celulares humanas de cáncer pulmonar de células pequeñas así como en tumores primarios de pulmón. (35)

Una de las causas que dificulta el tratamiento del cáncer pulmonar es la alta frecuencia de metástasis que se presenta. Existen dos ramas que están en investigación en terapia génica para ayudar al tratamiento en estos casos: la terapia con genes suicidas y la terapia con genes que codifican citocinas. En la primera, un gen codifica un producto que convierte una pro-droga inocua en un metabolito tóxico que mata solamente a las células que expresan el gen, el cual esta dirigido a las células cancerosas. La timidina cinasa del virus herpes simple (HSV-tk) fosforila a la droga antiviral ganciclovir (GCV) en formas que son altamente tóxicas a las células en división. Las células normales no pueden fosforilar GCV y son insensibles a éste. El uso de este tipo de terapia fue demostrado en primera instancia en células tumorales permanentemente transformadas con HSV-tk. (31)

El segundo tipo de terapia génica consiste en la estimulación de la inmunidad antitumoral del hospedero que resulta en la regresión del tumor o el control de la metástasis. La interleucina (IL-2) es un factor importante en el crecimiento de células T, y para el desarrollo de terapias génicas in vivo, se ha utilizado el vector adenoviral (ADV). La administración in vivo del un vector ADV que expresa HSV-tk en conjunción con GCV resulta en la regresión experimental de gliomas y tumores en cabeza y cuello. (31)



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

Con estos conocimientos se ha desarrollado un modelo murino de metástasis de cáncer de pulmón al hígado y se ha demostrado que una combinación de genes suicidas y que codifican para citocinas pueden ser utilizados para tratar la metástasis del cáncer pulmonar in vivo. (31)

ELEMENTOS ANTISENTIDOS

La utilización de elementos antisentidos han permitido el desarrollo de terapia génica y el estudio de los mecanismos de proliferación celular en este tipo de neoplasias. Dentro de las estrategias de los elementos antisentidos se encuentran los oligos antisentidos, las ribozimas y el RNA de interferencia.

El **RNA de interferencia** o RNAi fue descrito inicialmente por Fire y colaboradores para describir el fenómeno de que cadenas dobles de RNA (dsRNA) pueden bloquear la expresión génica al introducirse en el gusano *Caenorhabditis elegans*. (36)

El RNAi ha sido descubierto en una gran variedad de animales, incluyendo moscas, tripanosomas, planarias, hidras, peces zebra y ratones y está relacionado con el silenciamiento de genes en plantas (cosupresión). (36, 37)

El RNA de interferencia (RNAi) es una herramienta poderosa y ampliamente utilizada para el análisis de la función de los genes en invertebrados y plantas. (38)



En el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional por RNAi pueden reconocerse 2 etapas principales (Fig.6):

- En la etapa de iniciación una vez que se han introducido a la célula RNAs largos de doble cadena (dsRNA >200nt) éstos entran en la vía celular conocida como la vía del RNAi, en primera instancia los dsRNA son procesados en pequeños RNAs de interferencia de 20-25 nucleótidos por una enzima tipo RNAsa III denominada Dicer.
- En la etapa efectora los siRNAs se ensamblan con el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNAi), las cadenas de siRNA guían al RISC a las moléculas de RNA complementarias, las cuales son cortadas y destruidas. (39,40) **Fig.6**

Adicionalmente, los siRNAs pueden funcionar como primers para un RNA dependiente de RNA polimerasa que sintetiza dsRNA adicionales, los cuales serán procesados posteriormente en siRNAs, amplificando de esta manera, los efectos de los siRNAs originales.(26)

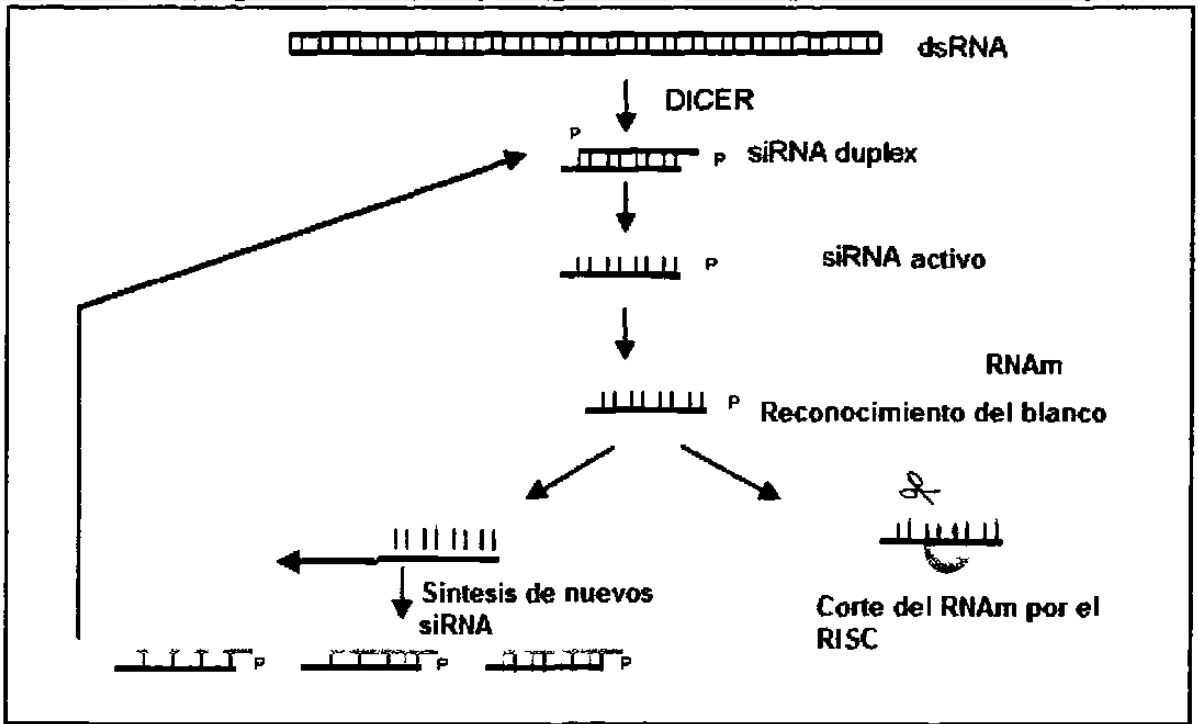


Fig.6. Mecanismo del RNA de interferencia (RNAi)

Los RNAi pueden ser sintetizados por transcripción in vitro con la T7 RNA polimerasa, igualmente pueden ser expresados en un vector basado en la RNA polimerasa III con el promotor de ratón U6 o bien pueden ser enviados a sintetizar a una casa comercial que cuente con el servicio. (36,37)



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón
LA PROTEINA DEL TUMOR DE WILMS - WT1

El tumor de Wilms o nefroblastoma es una enfermedad pediátrica de cáncer en el riñón que afecta a 1 en 10,000 niños aproximadamente de 5 años de edad.

De una manera poco común, esta enfermedad puede también presentarse en adultos debido a la persistencia de restos embrionarios. (41)

Se han asociado a tres genes con las anomalías genéticas de esta neoplasia: WT1 que se encuentra inactivado en el 15%, el factor de crecimiento 2 semejante a insulina que normalmente se expresa solo del alelo paterno y la activación de B-catenina(15%) implicada en la diferenciación renal.

Entre los síndromes asociados a esta neoplasia se encuentran: el síndrome de WARG (tumor de Wilms, aniridia, malformaciones genitourinarias y retraso mental); el síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) caracterizado por organomegalia asimétrica, hernia umbilical e hipoglicemia; el síndrome de Denys-Drash que afecta principalmente a varones e incluye anomalías y malformaciones uretrales y el síndrome de Frasier que causa defectos genitourinarios y esclerosis glomerular. (41)

Durante la embriogénesis, WT1 se encuentra altamente expresado durante el desarrollo de los riñones, gónadas, hígado y el mesotelio de los órganos abdominales. (41,42)



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

La proteína WT1 (Tumores de Wilm's) es un factor de transcripción

involucrado en el proceso de diferenciación celular y apoptosis

WT1 se localiza en el cromosoma 11p13 y codifica una proteína de 50kDa que contiene dos dominios: el carboxilo terminal en donde se encuentra el dominio de unión al DNA constituido por cuatro dedos de zinc tipo Kruppel y el extremo amino terminal que tiene un dominio de transactivación rico en prolina y glutamina.

Posee tres sitios de inicio de la traducción, de manera se producen tres isoformas de la proteína con diferente peso molecular: 62-64 kDa, 52-54 kDa, y 36-38 kDa respectivamente. (41)

La secuencia del gen comprende 10 exones y cada dedo de zinc está codificado por un exón. En su RNAm de 3.5kb se llevan a cabo dos procesos de splicing alternativos: uno en el exón 5 en donde se insertan o no 17AA entre el dominio de transactivación y los dominios de unión al DNA y el segundo entre los exones 9 y 10 en donde se insertan o no 3 aminoácidos: lisina, treonina y serina (KTS) entre el tercer y cuarto dedo de zinc, la inserción de estos 3 aminoácidos alteran el espacio existente entre estos dos dedos de zinc resultando en la pérdida de la secuencia consenso de unión al DNA. **Fig.7.** (41, 43,44)

Las distintas isoformas generadas, dependiendo de la arquitectura del promotor y del tipo celular, pueden reprimir o estimular la expresión de ciertos tipos de genes.



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

La forma WT1 KTS + parece estar relacionada con el procesamiento del RNA y la

forma KTS- con la activación transcripcional. (41,43,44)

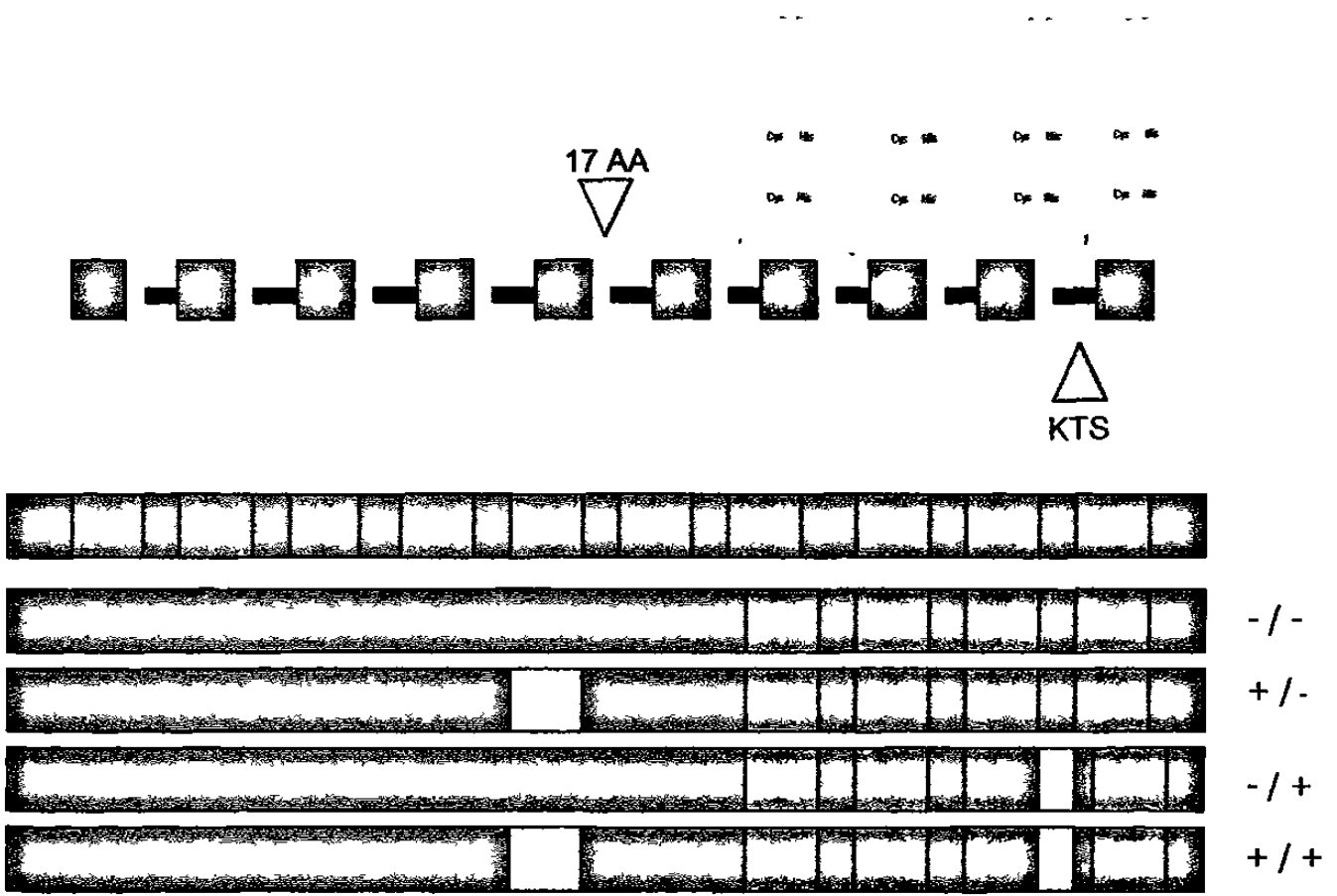


Fig.7. Estructura del RNAm de WT1 y sus isoformas.

Se han descrito isoformas adicionales de Wt1 como resultado de la edición del RNA (leucina a prolina en el codón 280) y el uso del inicio del codón de iniciación CUG que se encuentra río arriba. Se ha descrito una forma truncada de WT1 en muchas líneas celulares donde se pierden los primeros 127 AA dando lugar a la proteína de 36-



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

38 kDa, de donde pueden originarse también las 4 variantes por splicing. La ausencia de los 127 aa origina la pérdida de su dominio de dimerización y parte de su dominio de represión. La proteína pequeña WT-1 KTS – tiene la capacidad de transactivar 1.5 veces más que WT1 KTS (-) de 52-54 KDa. Sin embargo, la función biológica de esta proteína aún no se ha determinado. Los dominios de WT1 le confieren una localización nuclear. (41)

La función transactivadora de WT1 es realizada mediante la interacción de sus cuatro dedos de zinc con el DNA, principalmente por isoforma KTS (-)

Los dedos de zinc 2-4 tienen un grado alto de homología en la secuencia de aminoácidos con el gen EGR1. El dominio de los dedos de zinc de WT1 se unen a una secuencia rica en GC de EGR1, un segundo sitio potencial de unión de este gen es la secuencia repetida de TCC del promotor del gen PDGF-A. Por PCR se han hecho selecciones de secuencias de DNA con una gran afinidad por los dedos de zinc de WT1 KTS- a la secuencia 5'-GCGTGGGACT-3', este sitio se ha nombrado como WTE, este sitio se ha reportado recientemente en los promotores de los genes de Anfirregulina y Bcl-2. (41,45).

Al unirse a esa secuencia reprime la expresión de un gran número de genes relacionados con el crecimiento y proliferación celular como PDGF, EGF, EGFR, ILGF, RAR, EGR 1, ILGFR, Pax2, TGF- β , c-myc, n-myc, entre otros. Además se ha demostrado que WT1 tiene la capacidad de inducir proliferación y diferenciación celular,



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

diferenciación sexual, bloquear apoptosis, así como el arresto celular a través de una Activación transcripcional.

La capacidad de WT1 KTS (-) de inducir arresto en el ciclo celular debido a la activación de p21, un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina ; asociaciones físicas *in vivo* de WT1 con el coactivador transcripcional CBP/P300 (40) y análisis de expresión de genes endógenos, tales como anfirregulina, que es transcripcionalmente inducida por WT1 KTS -; han establecido la relevancia fisiológica de WT1 como activador de la transcripción (41,46,47).

WT1 puede reprimir o activar la expresión de un gen dependiendo del tipo de células como es el caso del promotor de Bcl-2 que contiene 2 elementos consensos para la unión de WT1, se ha reportado que la secuencia -1460 funciona como un elemento represor en células HeLa mientras que el sitio - 1807 funciona como un elemento activador de la expresión en la línea celular de rabdosarcoma (41,48,49).

Asociaciones físicas entre WT1 y p53 pueden modular sus respectivas propiedades reguladoras de la transcripción. En ciertos tipos celulares, p53 bloquea la función de WT1 reprimiendo su actividad transcripcional , mientras que WT1 ejerce un efecto cooperativo en la transcripción activada por p53 mediante sus dedos de zinc uno y dos que estabilizan a esta proteína (41,50).



RELACION WT1 - TUMORIGENESIS

Debido a que el tumor de Wilms solamente presenta un 15% de mutaciones en el gen de WT1 se dedujo que WT1 además de ser un gen supresor de tumor podría estar actuando como un oncogén.

En recientes estudios se ha demostrado que el gen WT1 se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de leucemias adultas, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia linfocítica aguda, y en algunos pacientes con síndromes mielodisplásicos . En leucemias linfoblásticas agudas humanas (ALL), WT-1 se encuentra sobre-expresado 10 veces más que en células normales, y es asociado a un pronóstico desfavorable, por lo que ha sido considerado como antígeno tumoral en este tipo de neoplasias. (50-57). Se ha reportado la expresión de WT1 en tumores sólidos, tales como cáncer de ovario, útero, pulmón, testículo, tiroides, melanoma y cáncer de mama (27,28,58,59).

La sobre-expresión de la proteína en estos tipos de tumores y la inhibición celular mediante el bloqueo de la expresión de este gen con oligos antisentidos y ribozimas, indica su posible papel oncogénico, reportes recientes indican que WT-1 reprime la tumorigenicidad de muchas líneas celulares (27,28,60). Es posible que el desbalance entre las diferentes isoformas de WT1 sea el factor responsable para determinar su efecto como supresor de tumor o como factor oncogénico.



JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte en el mundo y en México, ocupa el primer lugar de mortalidad por neoplasias. El cáncer de pulmón es una neoplasia multifactorial que expresa una serie de biomarcadores que predicen el pronóstico y establecen las estrategias terapéuticas, entre los cuales se encuentran p53, RB (retinoblastoma), Bcl-2. Debido a esto, consideramos que es de gran importancia realizar investigaciones que amplíen el conocimiento de algunos factores de riesgo que favorecen el desarrollo del cáncer de pulmón, así como la búsqueda de nuevos biomarcadores y blancos terapéuticos.

En este trabajo, nos enfocamos específicamente en los productos del gen del tumor de Wilm (WT1) analizando las diferentes isoformas en líneas celulares de cáncer de pulmón. WT1 es un factor de transcripción miembro de la familia de los dedos de zinc, en leucemias mielocíticas agudas la proteína de WT1 se encuentra expresada 10 veces más que en las células normales por lo que es considerado como un oncogen y un antígeno tumoral para este tipo de neoplasias, también ha sido detectada en algunos tumores sólidos entre ellos el cáncer de mama, donde hemos observado que la expresión de WT1 es esencial para la proliferación celular y se ha reportado que tiene un mal valor pronóstico para el paciente.



HIPÓTESIS:

La expresión del gen WT1 es importante para la proliferación celular en líneas celulares de cáncer pulmonar.



OBJETIVO GENERAL:

Determinar si los productos del gen del tumor de Wilm (WT1) están involucrados en la proliferación celular de líneas tumorales de cáncer de pulmón

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Analizar la expresión del gen WT1 en líneas celulares de cáncer de pulmón por medio de las técnicas de RT-PCR y Western-Blot (WB).
2. Determinar el patrón de expresión de las diferentes isoformas del gen WT1 en líneas de células no pequeñas de cáncer de pulmón.
3. Diseño y expresión de un RNA de interferencia para silenciar la expresión del gen de WT1
4. Determinar si el gen WT1 está involucrado en la proliferación celular, bloqueando la expresión de la proteína con elementos antisentidos (RNA de interferencia).



MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO

1. LINEAS CELULARES DE CANCER DE PULMON

Se trabajaron 6 líneas de cáncer de pulmón, todas estas pertenecientes al grupo de células no pequeñas y del subtipo adenocarcinoma, todas estas líneas nos fueron proporcionadas por el Dr. Ricardo Barrera del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), 3 de ellas obtenidas del ATCC. En la **Tabla 1** se muestra la relación de estas líneas celulares.

2. LINEA CELULAR LEUCEMICA K562

Como control positivo en los experimentos se utilizó la línea celular leucémica K562 en donde previamente se había reportado la expresión de WT1; esta línea fue donada por el Instituto de Bioquímica de la UNAM.

3. BACTERIAS

Se utilizó la cepa E.coli DH5 α para la elaboración de bacterias competentes para su posterior transformación con los plásmidos que expresaban los RNAs de interferencia.



NOMBRE	CLASIFICACION	SUBTIPO	ORIGEN
INER 37	NSCLC	ADENOCARCINOMA	INER
INER 15	NSCLC	ADENOCARCINOMA	INER
A427	NSCLC	ADENOCARCINOMA	ATCC
E3P3	NSCLC	ADENOCARCINOMA	INER
CALU	NSCLC	ADENOCARCINOMA	ATCC
SKMES	NSCLC	ADENOCARCINOMA	ATCC

Tabla 1. Líneas celulares de Cáncer de Pulmón

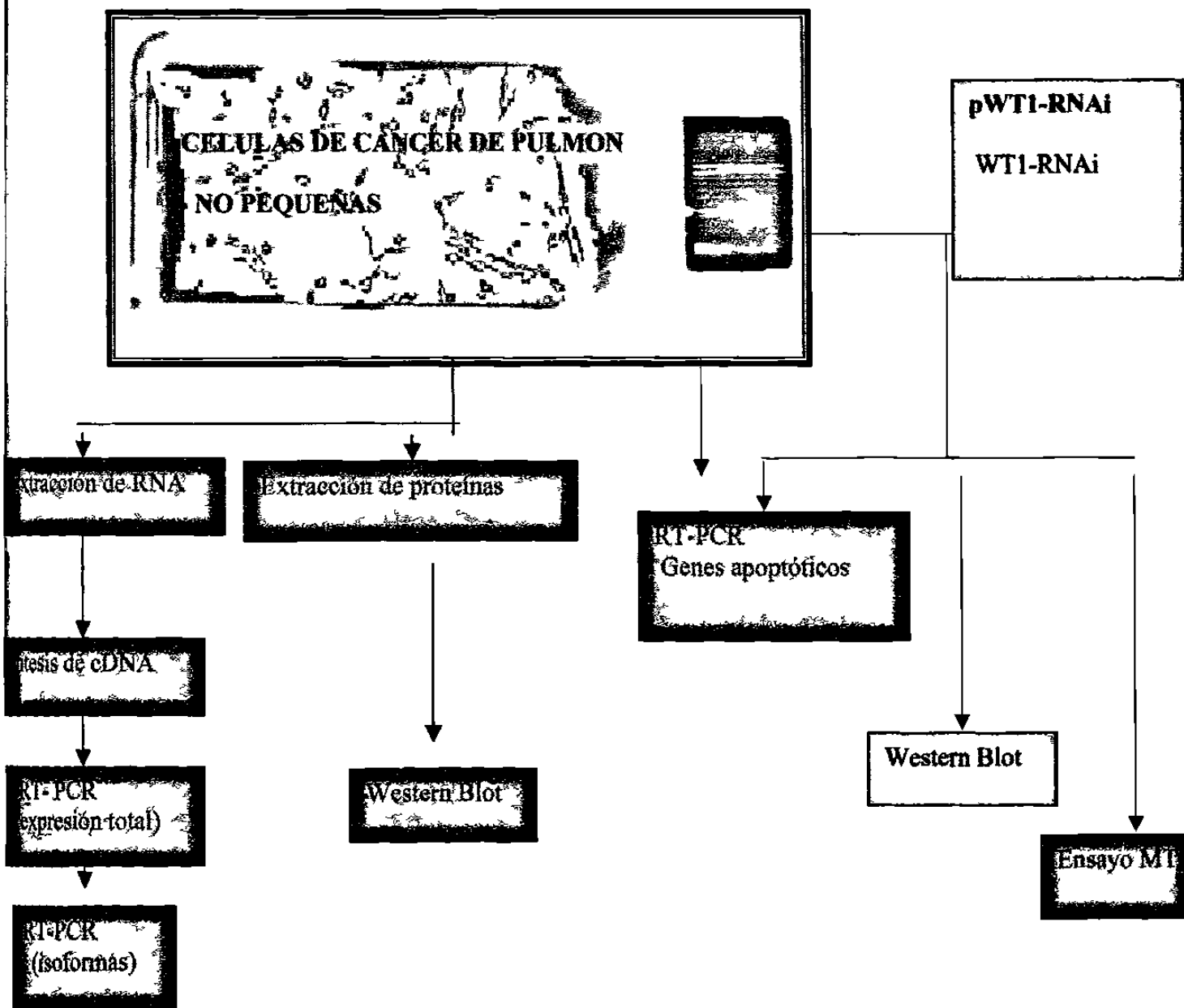


DISEÑO EXPERIMENTAL

Análisis de la expresión Determinar las diferentes isoformas de WT1

Determinar si WT1 modula genes apoptóticos

Determinar si WT1 está involucrado en proliferación celular





OBTENCIÓN DE PELLETS CELULARES

Se procedió a la obtención de "pellets" celulares que serían indispensables en los futuros experimentos.

Se tomaron cajas confluentes de todas las líneas celulares, las líneas de cáncer de pulmón se disgregaron utilizando 1ml de Tripsina-EDTA (ácido diaminotetracético) al 0.05%-0.5%, se incubaron por 1 a 2 minutos, posteriormente se eliminó la tripsina-EDTA y se desprendieron las células en PBS 1X y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5ml, se centrifugaron a 3000 r.p.m para obtener los "pellets" celulares.

Asimismo, se obtuvieron "pellets" de la línea celular K562, tomando las células directamente de la caja y centrifugando.

2. EXTRACCION DE RNA

Las células se lisaron con 1 ml de trizol y se incubaron por 5min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 200 ul de cloroformo y se agitaron vigorosamente por 15 segundos, la mezcla se incubó por 2 o 3 min y se centrifugaron a 12000g por 5 minutos a 4°C.

Después de centrifugar la mezcla, ésta se separó en tres fases: una fase inferior roja que es la fase orgánica (fenol cloroformo), una interfase y una fase superior acuosa. Se tomó la fase acuosa en donde se encuentra el RNA y se precipitó en un tubo eppendorf con 0.5ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 5 o



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

10min, se centrífugo a 12,000g por 10min a 4°C. Posteriormente se lavó el paquete de RNA con etanol al 70%, se disolvió la pastilla con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) y se incubó de 10 o 15min a 55 o 60°C para posteriormente leer su concentración.

Los RNAs de todas las líneas celulares fueron almacenados a -70°C para su conservación.

3. SINTESIS DEL FRAGMENTO DEL cDNA

Para cada línea celular se adicionó en un tubo eppendorf un volumen correspondiente a 5ug de RNA, 1ul de oligo dT 0.5mg/ul y 1ul de una mezcla de dNTP 10mM y se llevó a un volumen de 12ul con agua DEPC, se calentó a 65°C por 5 min, después se adicionaron 4ul de Buffer First Strand 5x, 2ul de DTT 0.1M y 1ul de Inhibidor de Ribonucleasa, se mezcló y se incubaron las muestras a 42°C por 2min, posteriormente se adicionó 1ul de Superscript RT una unidad por microlitro a cada muestra y se mezcló por pipeteo, se incubaron a 42°C por 50 minutos y se inactivó la reacción calentando a 70°C por 15min.

4. PCR- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Se realizó el PCR para conocer expresión de WT1 en las líneas celulares, así como un PCR para ver el patrón de las isoformas de WT1 que se estaban expresando. Se realizó la reacción utilizando .5ug de cDNA, se adicionó el volumen necesario para esta concentración de DNA, posteriormente se adicionó 1ul de una mezcla de dNTP



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

10mM, 1.5ul de MgCl₂ 25mM, 1ul de cada uno los primers (50ng/ul), 10mM de solución de Tris- HCl, 0.5ul de Taq polimerasa (una unidad por microlitro) y se aforó con agua purificada estéril a un volumen de 50ul.

La reacción de PCR para WT1 se realizó bajo las condiciones siguientes: 35 ciclos, la temperatura de desnaturalización fué de 94 °C por 40 seg, el alineamiento de los "primers" fué a 64 °C por 0.5 minutos y la extensión a 72 °C por 0.5 minutos.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.2%, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz Ultravioleta (UV).

En la Tabla 2 se encuentran las especificaciones de los primers utilizados para conocer expresión total de WT1 así como su localización.

En la Tabla 3 se encuentran las especificaciones de los primers utilizados para las isoformas de WT1.

NOMBRE	SECUENCIA
71	CACATGAGAGAAACGCCCTTCATGTG
72	TTTGAGCTGGTCTGAACGAGAAA

Tabla 2. Primers específicos para la expresión total de WT1.



Wt1 isoforma 17AA+/17AA-

Sentido F2 GACCTGGAATCAGATGAACTTAG

Antisentido R2 GAGAACTTTCGCTGACAAGTT

Wt1 isoforma KTS+/KTS-

Sentido F3 GTGTGAAACCATTCCAGTGTA

Antisentido R3 TTCTGACAACTTGGCCACCG

Wt1 isoforma 17aa+ KTS-/17aa- KTS+

Sentido F4 GACCTGGAATCAGATGAACTTAGGAGCCA

Antisentido R4 ACGGCTGAAGGGCTTTTCAC

Tabla 3. Primers específicos para las isoformas de WT1.

5. WESTERN – BLOT (W.B.)

1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se corrieron 50ug de proteína de cada línea celular más 4ul de buffer de carga (B mercaptoetanol) y se ajustó el volumen a 20ul con buffer de lisis en un gel de poliacrilamida al 12%.

Se corrió el gel en la cámara de electroforesis con buffer para electroforesis (25mM Tris Base, 250mM glicina pH 8.3 y SDS 1%) por 20 min a 46V y después a 100V por aproximadamente 1hr 40min.



2. TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Se formó un "sandwich" para realizar la transferencia de la siguiente manera: se colocan en buffer de transferencia (sol. de trabajo: 100ml de stock 10X (Tris-Base y Glicina) más 200ml de metanol y 700ml de agua) esponjas, papel filtro y la membrana de nitrocelulosa, el "sandwich" se formó en el siguiente orden: esponja, papel filtro, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulosa y de nuevo papel filtro y esponjas. Se corrió en la cámara húmeda de transferencia a 26V por 2hrs.

3. INMUNODETECCION

Se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución de TBS-Tween con leche descremada al 5% durante 1hr. Posteriormente se colocó la membrana en una solución de TBS-Tween 2.5% con leche descremada y el primer anticuerpo a una dilución de 1:300.

Se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween y se agregó el segundo anticuerpo en una dilución 1:5000 y se incubó por 2hrs.

Nuevamente se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween y se agregó el sustrato de quimioluminiscencia (partes iguales de Luminol A y B) por 5min y se reveló.



6. DISEÑO DE UN RNAi PARA WT1 Y SU SÍNTESIS COMERCIAL

Se procedió al diseño de un RNAi para silenciar al gen WT1 utilizando un programa de diseño de la casa comercial Invitrogen que se encuentra en su página de internet, al proveerle la secuencia del RNAm de WT1 y un bajo porcentaje de guanina-citosina nos proporcionó una serie de probables secuencias funcionales, de las cuales se seleccionó una secuencia sentido y antisentido, cuyas características se observan en la Tabla 4, éstas secuencias se mandaron sintetizar, alinear y purificar por HPLC, para que de ésta manera estuvieran listas para la transfección en las líneas celulares.

NOMBRE	TAMAÑO	SECUENCIA	% G-C
RNAi WT-1 1	21 bases	CAU GCA UCA GAG AAA CAU GUU	38%
RNAi WT-1 2	21 bases	CAU GUU UCU CUG AUG CAU GUU	38%

Tabla 4. Secuencias de RNAi sintetizadas por Invitrogen.

La mezcla de los RNAs se diluyó con agua tratada DEPC para obtener una concentración final de 20uM.



7. DISEÑO DE PLASMIDOS CONTRA WT1.

SECUENCIA DEL RNAm de WT1 y LOCALIZACIÓN DE LAS CUATRO

SECUENCIAS BLANCO:

1 gttcaaggca ggcgccacac ccgggggctc tccgcaacc gaccgcctgt ccgctcccc
61 acttcccgcc ctccctcca cctactcatt caccaccca ccacaccaga gccgggacgg
121 cagcccaggc gcccgggccc cgcgctcc tgcgcgat cctggacttc ctctgtctg
181 aggacccggc ttccacgtgt gtcccggagc cggcgtctca gcacacgctc cgctccggg
241 ctgggtgctt acagcagcca gagcagcagg gagtccggga ccggggcggc atctgggcca
301 agttaggcgc cggcaggcc agcgtgaac gtctccaggg ccggaggagc cgcggggcgt
361 ccgggtctga gcctcagcaa atgggctccg acgtgcggga cctgaacgag ctgtgccc
421 ccgtccctc cctgggtggc ggcggcggct gtgcctgcc tgtgagcggc ggcgcgagt
481 gggcgcgggt gctggacttt gcgccccgg gcgctcggc ttacgggtcg ttgggcggc
541 ccgcgcggc accggctccg ccgcccccc cgcgcggcc gcctcactcc ttcatcaaac
601 aggagccgag ctggggcggc gcggagccgc acgaggagca gtgcctgagc gcctcactg
661 tccactttc cggccagtc actggcacag ccggagcctg tcgctacggg cccttcggc
721 ctctccgcc cagccaggcg tcctccggcc aggccaggat gtttctaac gcgcctacc
781 tgcccagctg cctcagagc cagcccgta ttcgcaatca gggttacagc acggtcact
841 tcgacgggac gccagctac ggtcacagc cctgcacca tgcggcagc tccccaac
901 actcattcaa gcatgaggat cccatgggcc agcagggctc gctgggtgag cagcagtact
961 cgggtccgc ccggtctat ggtgccaca ccccaccga cagctgcacc ggcagccagg
1021 cttgtctgt gaggacgcc tacagcagt acaattata ccaatgaca tccagctg
1081 aatgcatgac ctggaatcag atgaactag gagccactt aaagggagt gctgctgga
1141 gctccagctc agtgaatgg acagaagggc agagcaacca cagcacaggg tacgagagc
1201 ataaccacac aacgccatc ctctcggag ccaatacag aatacacag cacggtgtct
1261 tcagaggcat tcaggatgtg cgacgtgtc ctggagtgc cccgactctt gtacggctg
1321 catctgagac cagtgagaaa gcgccctca tgtgtgcta ccaggctgc aataagagat
1381 atttt ~~ctggaatcag atgaactag gagccactt~~ caca gcaggaagca cactggtgag aaaccatacc
1441 agtgtgactt caaggactgt gaacgaaggt tttctgtc agaccagctc aaaagacacc
1501 ~~aaaggagaca tacaggtgtg~~ aaccattcc agtgtaaac ttgtcagcga aagttctcc
1561 ggtccgacca cctgaagacc cacaccagga ctatacagg taaaacaagt gaaaagcct
1621 tcagctgtc gtggccaagt tgcagaaaa agtttgcgg gtcagatgaa ttagtccgc
1681 atcaacaat gcatcagaga aacatgacca aactccagct ggcgcttga ggggtctcc
1741 tggggaccg ttcagtgtc caggcagcac agtgtgtgaa ctgcttcaa gctgactct
1801 ccactctcc tcaataaaa ggaacttca gttgatctt ttatccaac ttcaagaca
1861 agataccggt gcttctgaa actaccaggt gtgcctgaa gagttggtct ctgcctgcc
1921 tacttttagt tgactcacag gccctggaga agcagctaac aatgtctgt tagttaaag
1981 cccattgcca tttgtctgg attttact gtaagaagag ccatagctga tcatgtccc
2041 ctgaccctc cctctttt ttatgctgt ttcgctggg gatggaatta ttgtaccat
2101 ttcatcatg gaattttat aggcagggc atgtgatgt gctgctaata gtaaacttg



8. PRODUCCIÓN DE RNAi EN EL PLASMIDO pGSH1-GFP

1. CARACTERÍSTICAS DEL PLASMIDO pGSH1-GFP:

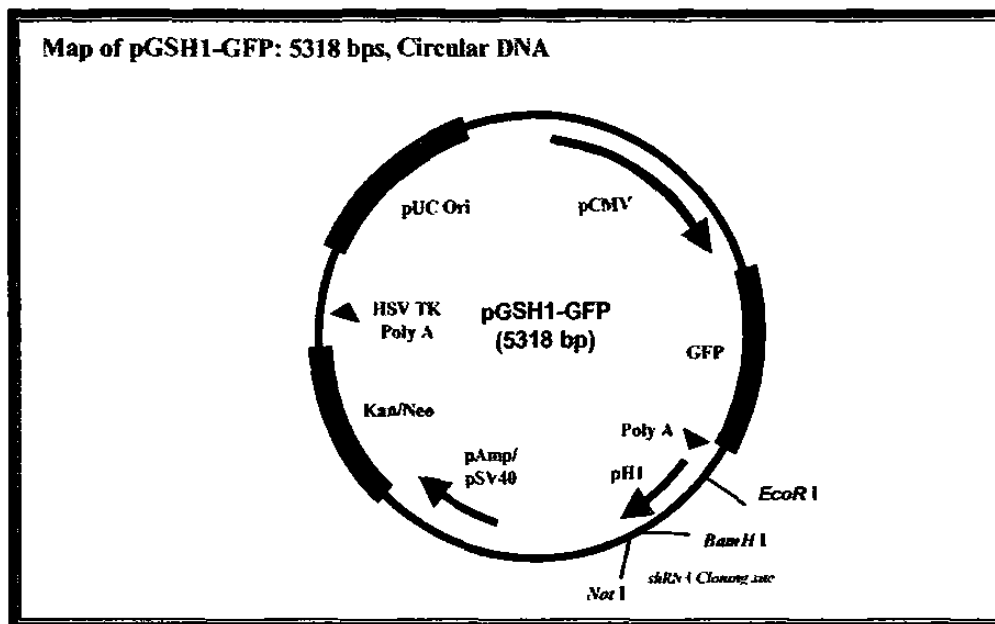


Fig.8. Mapa del plásmido pGSH1-GFP.

Vector Elements		
Element	Start-End	Description
pCMV	59-808	Human CMV promoter sequence
GFP	843-1500	Green Fluorescent Protein gene sequence
Poly A	1572-1801	Transcription stop and polyadenylation sequence
pHi promoter	1808-1900	HI RNA Polymerase III promoter
pAmp/pSV40	2689-3030	Ampicillin and SV40 promoters (in tandem)
Kan/Neo	3152-3942	Kanamycin and Neomycin resistance gene sequence
HSV TK Poly A	4182-4200	HSV Thymidine Kinase polyadenylation signal sequence.
pUC Ori	4531-5174	pUC origin of replication sequence.

Fig.9. Elementos del vector pGSH1-GFP.



10. TRANSFORMACIÓN

Se transformaron 70ul de bacterias E.coli competentes con 5ul del producto de ligación y se sembraron las bacterias en cajas petri con agar LB con 50ug/ml de kanamicina y se crecieron toda la noche a 37°C.

Se tomaron de 3-4 colonias transformadas y se sembraron en medio LB con 50ug/ml de kanamicina, se crecieron toda la noche a 37°C para posteriormente realizar un "miniprep" y obtener el plásmido.

11. VERIFICACION DEL PLASMIDO RECOMBINANTE

Se realizaron reacciones de digestión para verificar el DNA plasmídico positivo con 17ul del resultado del miniprep (100-200ng), 1ul de la enzima Hind III, 2ul del buffer de restricción 10X y de 0-16ul de agua grado PCR, para obtener un volumen final de 20ul.

Se incubaron las reacciones a 37°C por 2 horas y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1% para su verificación.

NOTA: Las clonas con los RNAi positivos tienen un sitio único de corte para Hind II en medio de la estructura del loop, por lo que la digestión producirá un plásmido lineal. Las clonas negativas serán similares al plásmido control superenrollado después de la digestión.



12. "MIDIPREP" PARA OBTENCIÓN DE LOS PLASMIDOS

Para obtener cantidades suficientes de los plasmidos para las transfecciones en las líneas celulares, se procedió a la realización de minipreps con el kit comercial de Marligen Biosciences Inc. Se pusieron a sembrar en 25ml las bacterias transformadas con cada uno de los plasmidos a 37°C toda la noche, posteriormente se centrifugo para obtener el pellet al cual se le adicionó 1.2ml del buffer de suspensión celular (G1) y se homogenizaron las bacterias, después se adicionaron 1.2ml de la solución de lisis celular (G2), se mezcló por inversión 5 veces (No vortex) y se incubó a temperatura ambiente por 5min. Posteriormente se adicionó 1.6ml del buffer de neutralización (G3) se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo 5 veces (NO vortex) y se centrifugo a 15,000g por 10min. Se colocó una columna en un tubo de 15ml, se pasó el sobrenadante de la centrifugación anterior por la columna, se centrifugo a 5,000g por 1 min, se descartó el flujo resultante, se montó de nuevo la columna y se adicionó 3ml del buffer de lavado (G4), se centrifugó a 5,000g por 5min. Por último, se colocó la columna en un tubo nuevo de 15ml, se adicionó 0.8ml del buffer TE caliente directamente al centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1min y después se centrifugó a 5,000g por 2min.



9. TRANSFECCION

Para la transfección de las líneas celulares con los RNAi sintéticos, éstas se plaquearon en cajas de 96 pozos y al día siguiente se procedió a la transfección. Para la línea celular K562 el día que se plaqueó se procedió a la transfección.

Se probaron 4 RNAs para transfectar: el RNAi para WT1 producido en el plásmido Psilencer U6, el RNAi para WT1 sintetizado comercialmente y los controles: como control positivo el RNAi del gen GAPDH y un control negativo.

Para cada muestra se preparó un complejo: Lipofectamina diluida con medio sin suero que se mezcló e incubó por 5min a temperatura ambiente y por otra parte el RNAi (WT1 y controles) se diluyó también en medio sin suero. Ambas mezclas diluidas se mezclaron y se incubaron por 20min a temperatura ambiente para que se formara el complejo.

A cada muestra se agregaron diferentes concentraciones del RNAi , las células se incubaron a 37°C por 72hrs para el posterior ensayo de viabilidad.

Los DNA plasmídicos se transfectaron en las líneas celulares de cáncer de pulmón por el método de GenePORTER.

Se cultivaron las líneas celulares de cáncer pulmonar en placas de 96 y 6 pozos un día antes de la transfección (60-80% de confluencia), el DNA se diluyó con medio libre de suero en el volumen de transfección adecuado (0.1ml). Se diluyó el reactivo GenePORTER con medio libre de suero (0-5 a 2.5ul). Se agregó el DNA diluido al



GenePORTER diluido, se mezcló rápidamente y se incubó a temperatura ambiente por 10-45min. Se aspiró el medio de cultivo de las células, y se adicionó con cuidado la mezcla de DNA-GenePORTER a las células y se incubó a 37°C por 3-5 hrs.

Transcurrido este tiempo, se adicionó un volumen de medio que contenía 20% de suero fetal bovino, se continuó con la incubación toda la noche a 37°C , 24 horas después de la transfección, se adicionó más medio fresco.

10. ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR CON MTS

El ensayo de proliferación celular se realizó con MTS. El MTS y el MTT son sales de tetrasodio utilizadas en ensayos de sensibilidad colorimétrica, estas sales son tomadas por las mitocondrias de las células por la cadena transportadora de electrones, éste proceso convierte las sales en compuestos de formazan cuya absorbancia se mide a 490nm para MTS y a 570nm para MTT.

Las células se plaquearon en cajas de 96 pozos y se realizaron los tratamientos correspondientes, posteriormente se le adicionó a cada pozo 20ul de una mezcla de MTS/PMS (100ul de PMS por cada 2ml de MTS), se homogenizó la mezcla y se dejó incubando a 37° el tiempo necesario para el cambio de color y posteriormente se leyó la absorbancia a 490nm.



11. RT-PCR PARA GENES APOPTOTICOS

Se utilizó el kit de MPCR Set-7 para Genes Apoptóticos Humanos. Se realizó la extracción de RNA de las células para la elaboración del cDNA y la elaboración de la reacción de PCR de la siguiente manera: 25ul de la Mezcla de buffer MPCR 2x, 5ul de los primers MPCR 10X, 0.5ul de Taq DNA polimerasa (5U/ul), 5ul del cDNA y del cDNA control 10X del kit, 14.5ul de H₂O, 50ul de aceite mineral (opcional). La reacción se llevó a cabo en el siguiente programa: 96°C 1min, 58-60°C 4min (2X); 94°C 1min, 58-60°C 2min (28-35X), 70°C 10 min (1X). Posteriormente se corrieron 10ul del producto con 2ul del buffer de carga 6X con el marcador del kit MPCR en un gel de agarosa 2% con 0.5mg/ml de bromuro de etidio.



RESULTADOS

Las líneas celulares de cáncer de pulmón y la línea leucémica K562, se mantuvieron en cultivo, se realizaron pases 1:4 semanalmente, se congelaron en criotubos para su preservación y se obtuvieron pellets celulares para las extracciones de RNA y proteínas. A continuación se muestran en la Fig.12 las fotografías de las líneas celulares de cáncer de pulmón estudiadas.

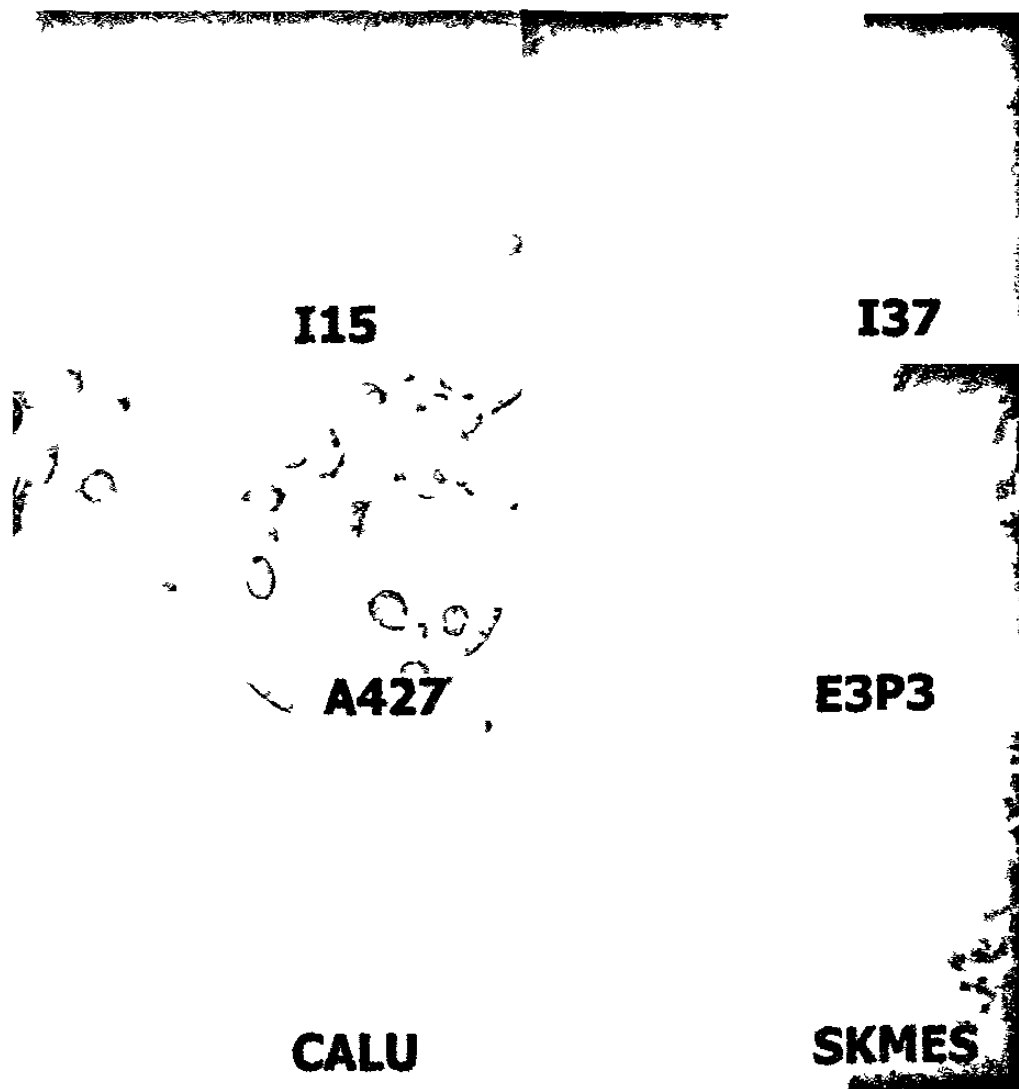


Fig. 12. Fotografías de las líneas celulares no pequeñas de cáncer de pulmón estudiadas.



Se realizaron cinéticas celulares a cada una de las líneas que utilizamos en este trabajo con la finalidad de conocer el número inicial de células para plaquear en los experimentos con las transfecciones. Se sembraron en placas de 96 pozos tres diferentes cantidades iniciales de células (1000, 3000 y 5000 células por pozo) dos veces por triplicado y posteriormente a las 72hrs se realizó el ensayo de MTS para determinar proliferación celular, se graficaron los resultados con las densidades ópticas obtenidas (Fig.13), se calcularon la media y la desviación estándar (Tabla 7). A continuación se muestran los resultados de las cinéticas de las líneas celulares I37 y A427.

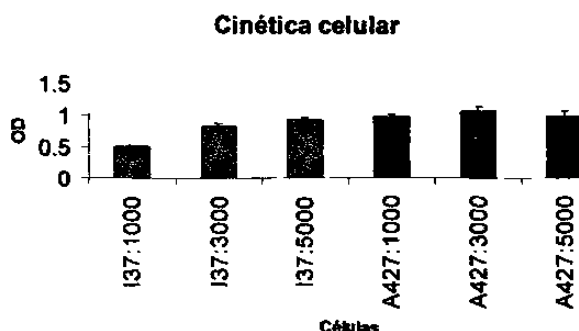


Fig.13. Cinéticas celulares de las líneas I37 y A427 a diferentes cantidades de células iniciales por pozo 72 horas.

	I37:1000	I37:3000	I37:5000	A427:1000	A427:3000	A427:5000
Densidades ópticas	0.566	0.842	0.808	0.893	1.051	1.039
	0.585	0.906	0.926	1.007	1.004	0.918
	0.413	0.906	0.831	0.988	1.257	1.008
	0.495	0.647	0.983	0.89	0.873	1.139
	0.461	0.726	0.986	1.08	1.119	0.761
	0.441	0.839	0.99	0.978	1.076	1.04
Media	0.4935	0.811	0.92066667	0.97266667	1.06333333	0.98416667
Desviación estándar	0.0239235	0.053916	0.03372333	0.02614333	0.08066533	0.08484683

Tabla 7. Densidades ópticas de las cinéticas celulares con su media y su desviación estándar.



I. CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN WT1 EN LAS LINEAS

CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.

1. Para caracterizar la expresión de WT1 en las líneas celulares de cáncer pulmonar se realizó un RT-PCR con los "primers" 71-72 los cuales se utilizan para ver expresión total de WT1 ya que su localización (Fig.14) no interviene en ninguno de los procesos de splicing. En la Fig. 15 se aprecian los resultados del RT-PCR para el gen constitutivo B-actina el cual nos sirvió para verificar la integridad del cDNA y el RT-PCR para WT1 en las líneas celulares de cáncer pulmonar (se aprecia que en todas las líneas es posible detectar la expresión de este gen).

A)



B)

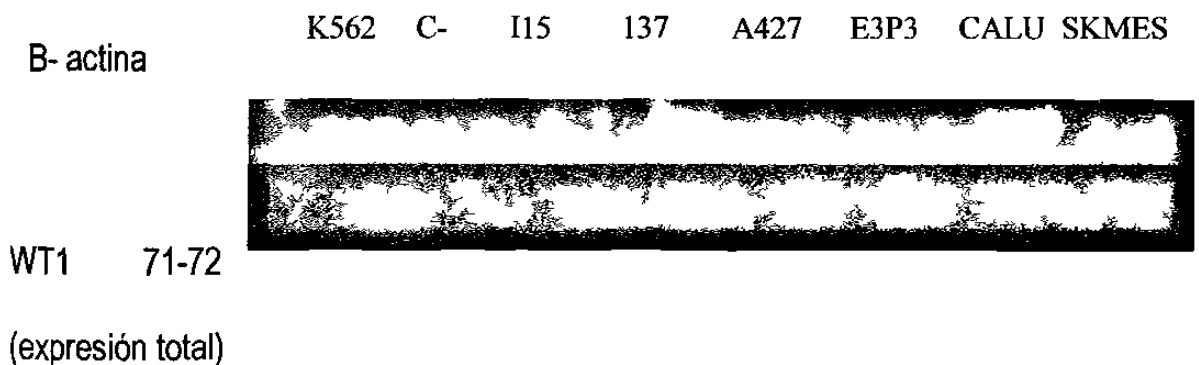


Fig. 14. a) RNAm de WT1 y localización de la secuencia amplificada con los "primers" 71-72 (barra)

b) RT-PCR de B-actina y WT1 de las líneas celulares de cáncer de pulmón.



3. Para caracterizar la expresión de WT1 en las líneas celulares de cáncer pulmonar se realizó un Western blot con un anticuerpo policlonal (C-19) para WT1 dirigido contra el exón 10, el cual permite detectar la proteína típica de 52-54kDa y la proteína pequeña de 36-38kDa de WT1. En la Fig.15A se muestra un esquema que representa al RNAm de WT1 con sus 10 exones y la localización del anticuerpo policlonal. La expresión de la proteína WT1 fue determinada por Western blot como se observa en la Fig.15B y en la parte inferior el Western blot para el gen B-Actina utilizado como control de carga. Como se puede apreciar en la fotografía todas las líneas expresan el gen de WT1.

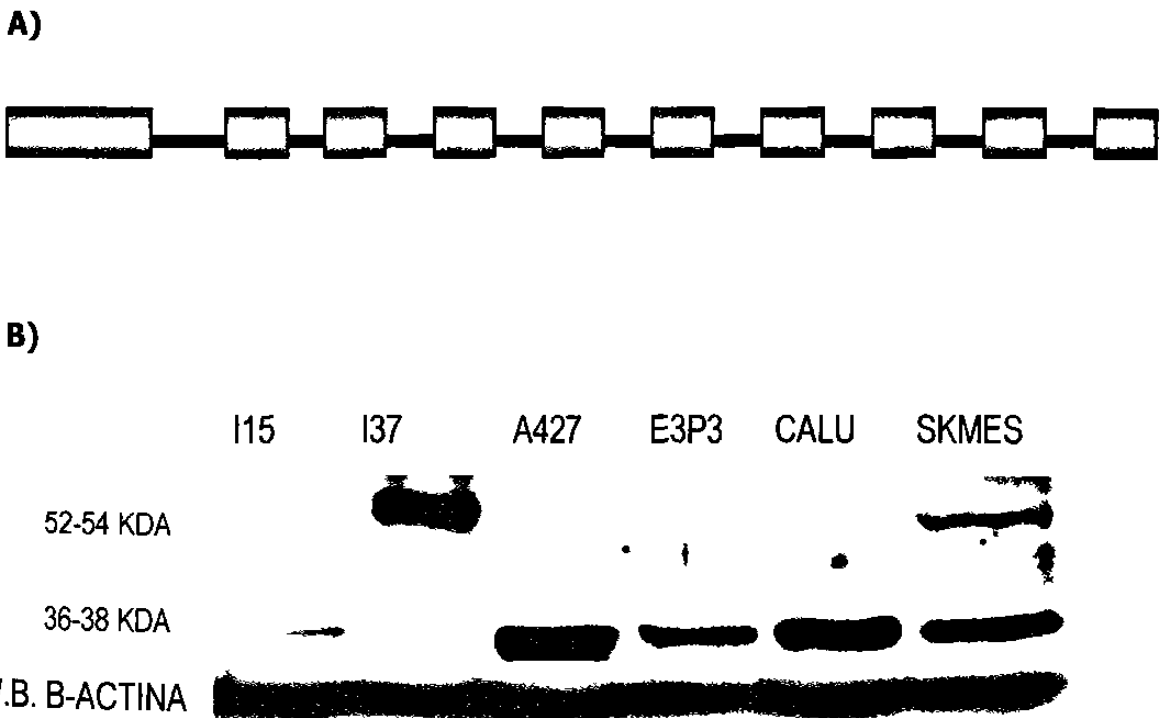


Fig. 15.A) RNAm de WT1 y localización del Anticuerpo policlonal C-19.

B) Western blot para WT1 de las líneas celulares de cáncer de pulmón.



II. CARACTERIZACION DE LAS ISOFORMAS DE WT1 EN LAS LINEAS CELULARES DE CANCER PULMONAR

Para conocer el patrón de las isoformas de los RNAm de WT1 que se están expresando en las líneas celulares de cáncer pulmonar se realizaron RT-PCRs con "primers" dirigidos contra exón 5 ("primers" 1-3) y KTS ("primers" 1-2) cuya localización se muestran en la Fig.16 A y los resultados se muestran en la Fig.16B. En base a los resultados obtenidos se elaboró la Tabla 7

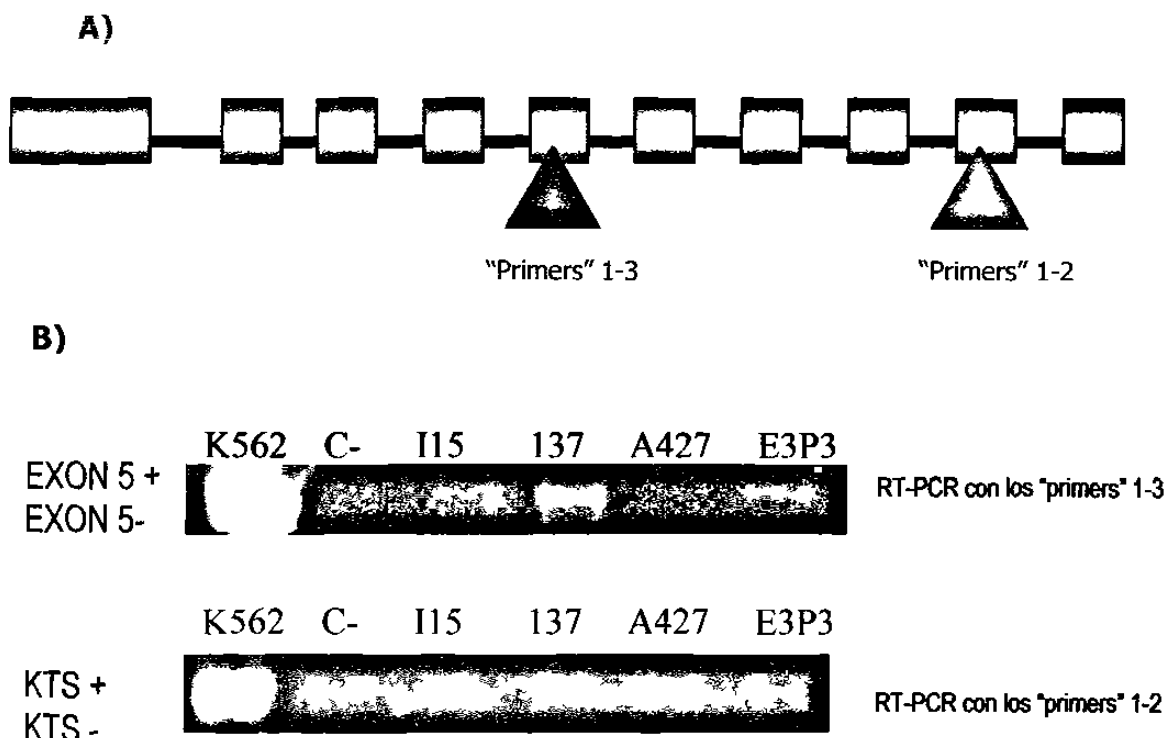


Fig. 16. A) RNAm de WT1 y localización de los "primers" para las isoformas de WT1.

B) RT-PCR de las isoformas de WT1 E5 +/-, KTS +/- . Control positivo (línea celular leucémica K562).



Línea celular	KTS	E5
I 15	-	-
I37	+, -	+, -
A 427	-	-
E3P3	-	-

Tabla 8. Isoformas de WT1 en las líneas celulares de cáncer pulmonar.



III. CONSTRUCCIÓN DE UN RNAi PARA BLOQUEAR LA EXPRESIÓN DE WT1

Con las secuencias seleccionadas para bloquear al gen de WT1, una vez alineadas y ligadas al plásmido pGSH1-GFP se realizó la transformación de bacterias competentes con las cuatro construcciones y se realizó un miniprep para verificarlos, el resultado de este ensayo se aprecia en la Fig. 17, en donde se aprecia que se logró la correcta transformación y extracción de los plásmidos de las cuatro construcciones, posteriormente se realizó un midiprep para obtener cantidades suficientes de plásmidos para las transfecciones en las líneas celulares.

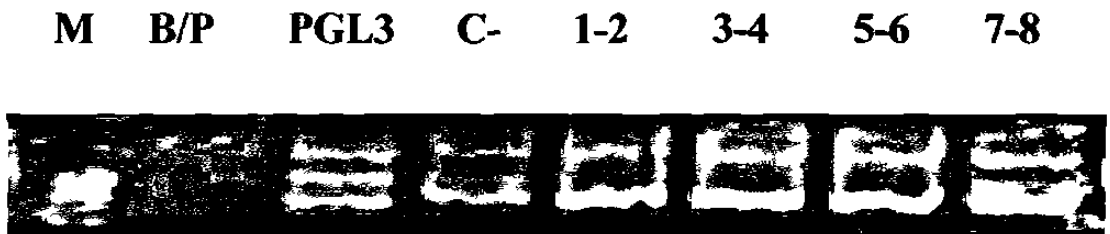


Fig. 17.. "Minipreps" de las transformaciones con las construcciones de los plásmidos.



IV. TRANSFECCION DE LA LINEA CELULAR LEUCEMINA K562 CON LAS CUATRO CONSTRUCCIONES DE PLASMIDOS.

Para verificar la efectividad de las construcciones se realizó un primer ensayo de transfección en la línea celular K562 con las cuatro construcciones y un plásmido control. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de un conteo de viabilidad celular con azul tripán, en donde se observa el número de células, el porcentaje de proliferación y el porcentaje de inhibición. Se aprecia que todas las construcciones muestran inhibición de la proliferación celular.

PLASMIDO	CELULAS X10³	% PROLIFERACION	% DE INHIBICION
C -	1,195	97.55	-
C Plásmido	1,225	100	0
1-2	425	34.69	65.31
3-4	630	51.42	48.58
5-6	625	51.02	48.98
7-8	655	53.46	46.54

Tabla 9. Resultados de la transfección de la línea celular K562 con los plásmidos para inhibir al gen de WT1 con un número inicial de 300,000 células por pozo.



Posteriormente se realizó en una placa de 6 pozos la transfección de la línea K562 con diferentes concentraciones del plásmido 5-6 (2ug, 4ug y 6ug). En la Fig.18 se muestran dos fotografías de la línea K562 observadas en un microscopio confocal para analizar la fluorescencia del plásmido como un control de transfección.

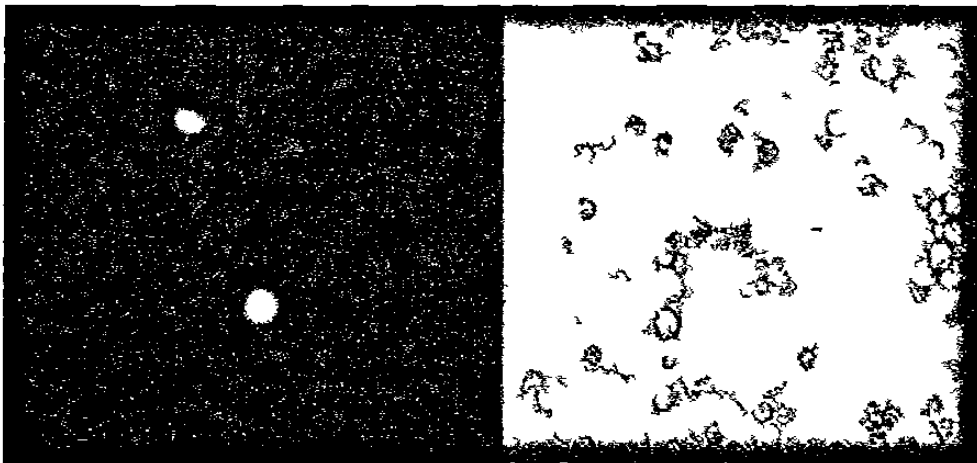


Fig. 18. Línea K562 transfectada con los plásmidos para inhibir al gen de WT1 observadas con el microscopio confocal.



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

Una vez llevada a cabo la transfección se procedió a realizar el ensayo de MTS, observándose que había una relación entre el aumento de la concentración del plásmido y la disminución de la proliferación celular, lográndose disminuir hasta en un 60% la proliferación celular con 6ug del plásmido 5-6. Estos resultados se aprecian a continuación en la Fig.19.

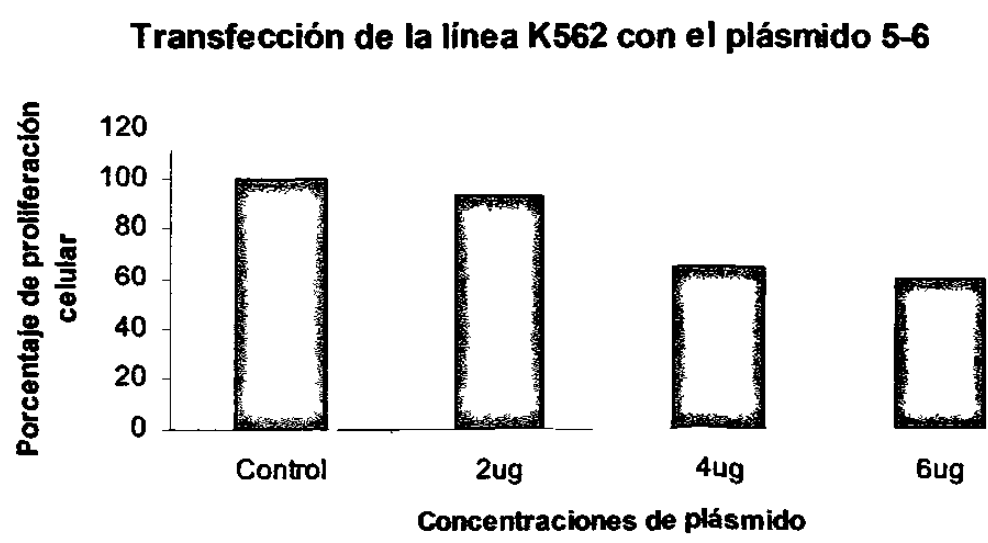


Fig. 19. Transfección de la línea K562 con diferentes concentraciones del plásmido 5-6.



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

Para correlacionar estos resultados de la proliferación celular con la disminución de la expresión del gen WT1, se realizó un Western blot cuyo resultado se muestra en la Fig. 20 en donde se observa una disminución de la proteína de WT1 respecto al control en las células transfectadas, la reducción más drástica de la expresión de la proteína de WT1 se observan en las células transfectadas con 6ug del plásmido 5-6. En la parte inferior se observa el Western blot de la proteína GFP como control de la transfección.

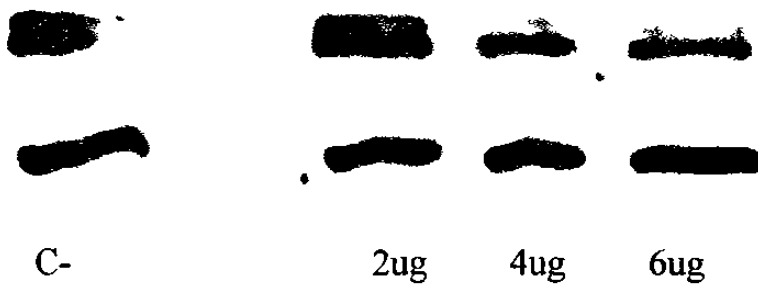


Fig.20. Western Blot para WT1 y GFP de la línea K562 con diferentes concentraciones del plásmido 5-6



V. TRANSFECCION DE LAS LINEAS CELULARES DE CANCER PULMONAR CON LOS PLASMIDOS PARA BLOQUEAR AL GEN DE WT1.

Se transfectaron todas las líneas celulares con las cuatro construcciones de plásmidos que codifican para los RNAi contra WT1. A continuación en la Fig.21 se muestra el resultado de las transfecciones en la línea celular CALU, en la cual se observaron los mejores efectos ya que en el resto de las líneas los efectos en la inhibición de la proliferación celular no fueron significativos. Con el control de plásmido se observó una proliferación celular de un 76.35%, con el plásmido 1-2 un 84.1%, con el plásmido 3-4 un 57.3%, con el plásmido 5-6 un 46% y con el plásmido 7-8 un 60%.

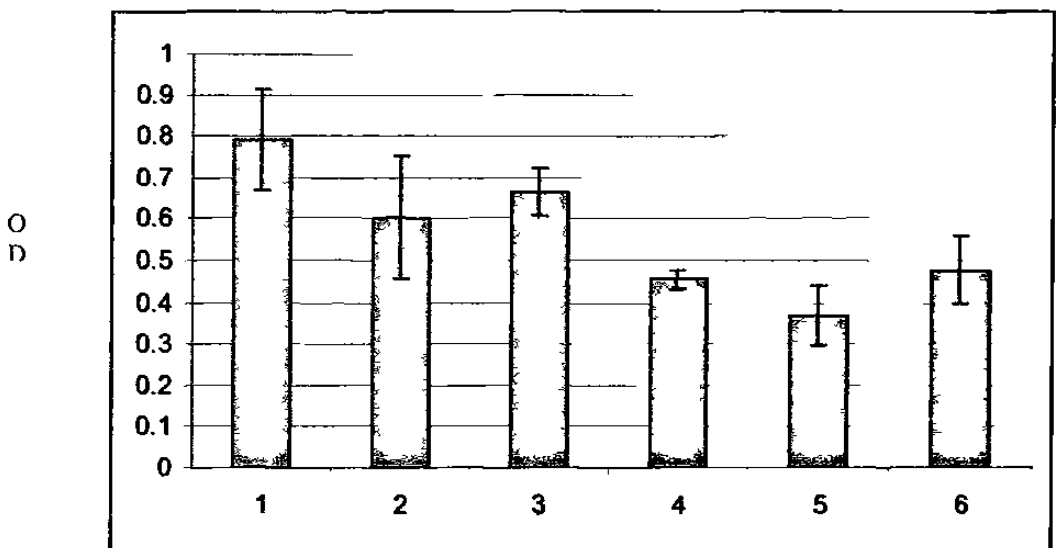


Fig.21. Transfección de la línea CALU con los plásmidos contra WT1. 1: Células sin tratamiento; 2: Control del plásmido; 3: Plásmido 1-2; 4: Plásmido 3-4; 5: Plásmido 5-6 y 6: Plásmido 7-8.

Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón



Para ver como se correlacionaban estos resultados con la inhibición de WT1, se transfeció esta línea con diferentes concentraciones del plásmido 5-6 (2,4 y 6ug) y posteriormente se realizó un Western blot contra WT1. En la Fig.22 se observa que la proteína de WT1 disminuye en las células transfectadas en comparación con las células sin tratamiento. En la parte inferior de la figura se observa el Western blot contra GFP como control de la transfección.



Fig.22. Western Blot para WT1 y GFP de la línea celular CALU con el plásmido 5-6.



VI. TRANSFECCION DE LAS LINEAS CELULARES DE CANCER PULMONAR

CON EL RNAi SINTETICO PARA BLOQUEAR AL GEN DE WT1.

Debido a la baja eficiencia de transfección obtenida en las líneas celulares con los plásmidos recombinantes, se diseñó y se mandó sintetizar un RNAi-WT1 sintético.

Se procedió a la transfección de las líneas celulares de cáncer pulmonar con el RNAi sintético para bloquear al gen de WT1 y observar sus efectos en la proliferación celular. La línea I15 se transfectó con 3,6,9 y 12pm del RNAi-WT1 (Fig. 23). El control positivo del RNAi (contra GAPDH) condujo a una proliferación celular de un 48%, el control negativo del RNAi condujo a un 80% de proliferación, mientras el RNAi-WT1 12pm solamente un 52% de proliferación, lográndose un 48% de inhibición de la proliferación celular, esto con respecto al control de las células sin tratamiento. En esta línea celular la lipofectanina no es tan dañina como en algunas otras.

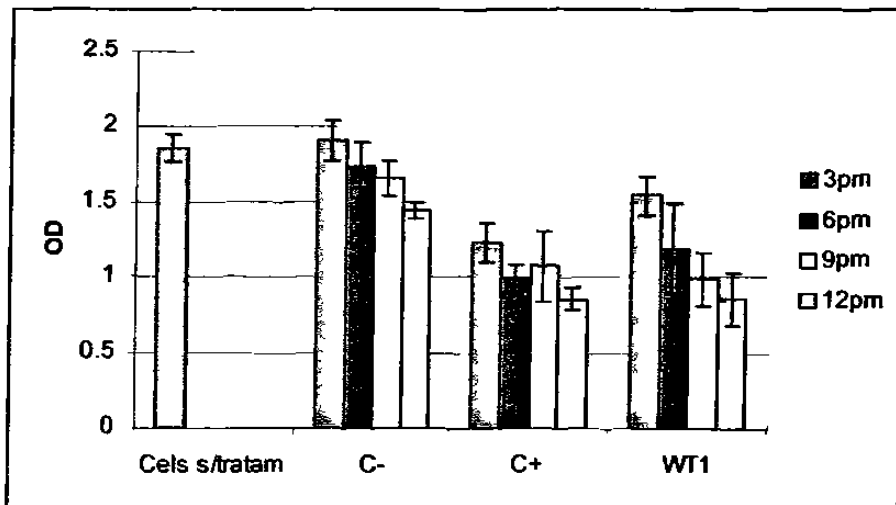


Fig.23. Transfección de la línea I15 con el RNAi sintético contra WT1.



En la línea A427 se observa una proliferación celular de un 72% para el control negativo, un 56% para el control positivo y un 57% para el RNAi contra WT1, lográndose un 43% de inhibición en la proliferación celular con 12pm del RNAi.

Fig.24. Observamos que tanto en la línea I15 como en la A427 se presentaba una relación dosis dependiente.

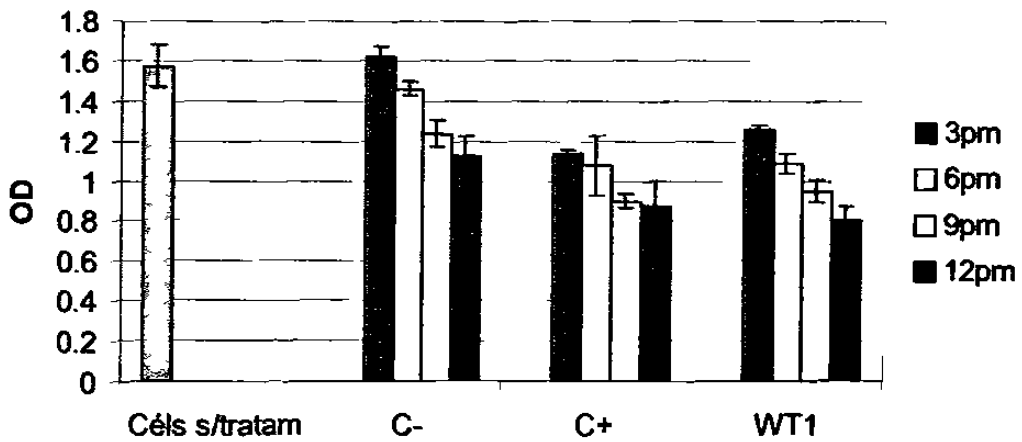


Fig.24. Transfección de la línea A427 con el RNAi sintético contra WT1.



Efecto del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón

Al transfectar la línea SKMES se observó una alta mortalidad celular en el control negativo debido al efecto de la lipofectamina, por lo que se transfectó con las diferentes concentraciones de lipofectamina sola y se compararon al transfectar con el RNAi contra WT1 con 5, 15 y 30pm. Fig.25

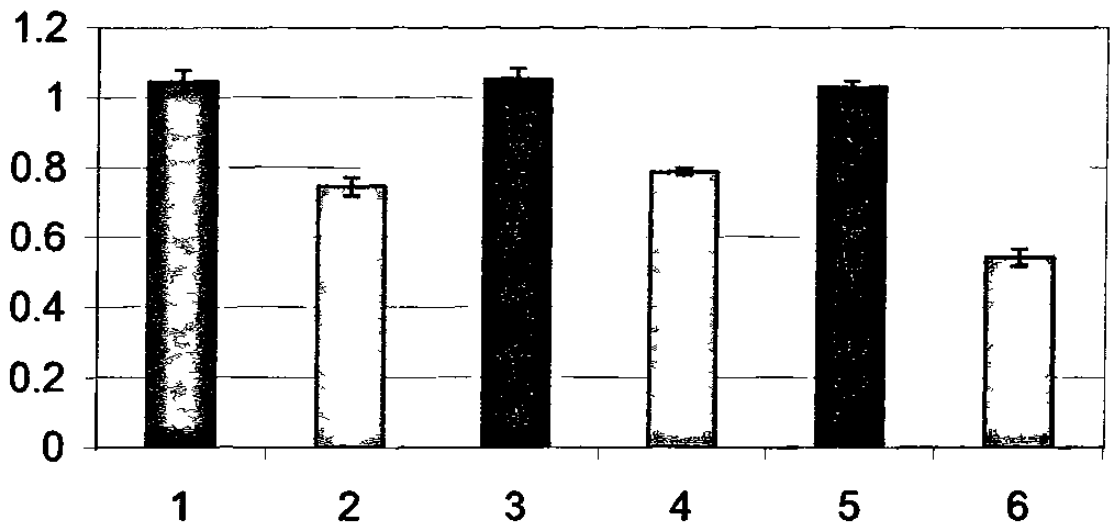


Fig.25. Transfección de la línea SKMES con los RNAi sintéticos. 1.Lipofectamina .375ug. 2.- 5pm del RNAi-WT1 + .375ug de lipofectamina. 3. Lipofectamina 1.125ug. 4.- 15pm del RNAi-WT1 + 1.125ug de lipofectamina. 5.- Lipofectamina 2.25ug. 6.- 30pm del RNAi-WT1+2.25ug de lipofectamina.



Al transfectar la línea celular CALU se observó que había una mortalidad celular alta debido a la lipofectamina, por lo que se procedió a comparar el efecto de la lipofectamina sola utilizada para cada concentración de RNAi contra el efecto al transfectar con el RNAi de WT1, al realizar esta comparación se logró observar una proliferación celular del 85% con 5pm del RNAi, un 50.28% con 15pm del RNAi y un 29% con 30pm del RNAi, es decir, se logró una inhibición de la proliferación celular en un 71% con 30pm. Fig.26.

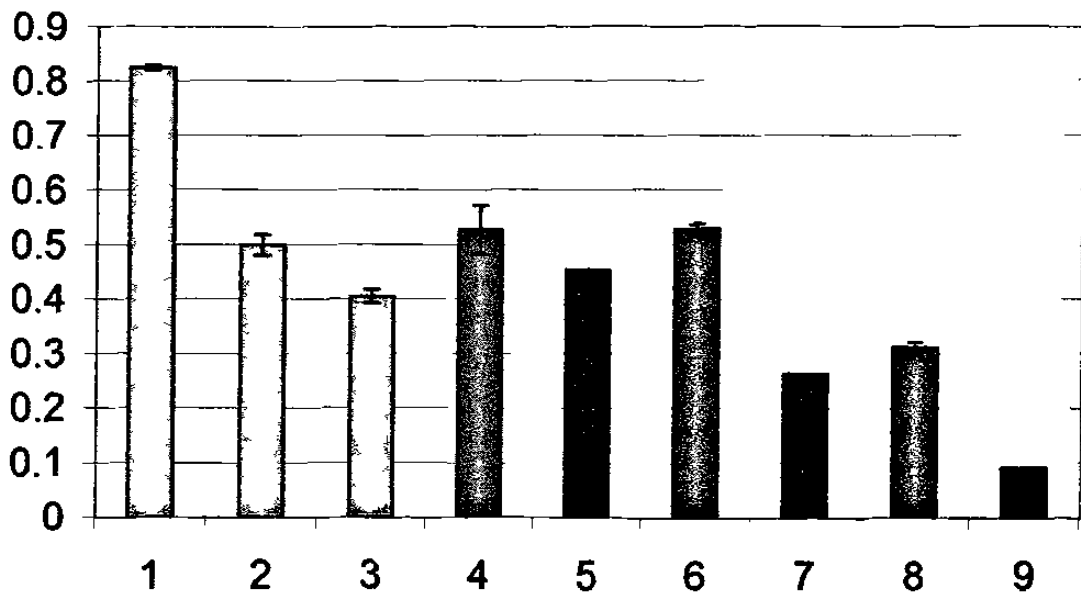


Fig.26. Transfección de la línea CALU con los RNAi sintéticos. 1. Células sin tratamiento. 2. Control negativo del RNAi. 3. Control positivo del RNAi. 4. Lipofectamina .375ug. 5.- 5pm del RNAi-WT1+.375ug de lipofectamina. 6. Lipofectamina 1.125ug . 7.-15pm del RNAi-WT1 + 1.125ug de lipofectamina. 8. Lipofectamina 2.25ug 9.- 30pm del RNAi-WT1 + 2.25ug de lipofectamina.



VII. TRANSFECCION DE LAS LINEAS CELULARES DE CANCER DE PULMON I15, A427 Y CALU CON LOS PLASMIDOS WT1/S Y WT1/H.

De manera adicional se transfectaron las líneas I15, A427 y CALU con el plásmido de la isoforma grande (WT1/H) y pequeña de WT1 (WT1/S) y posteriormente se realizó el RT-PCR para los genes apoptóticos.

Los resultados se muestran en la Fig. 27 en donde se observa que en la línea celular I15 hay un incremento en la expresión de Bax en las células transfectadas, en la línea A427 se observa un incremento en la expresión de Bax y Bcl-2 en las células transfectadas con la isoforma pequeña de WT1, mientras que en la línea CALU no se observan diferencias entre las células transfectadas y no transfectadas, además se observa una banda adicional que representa la expresión del gen Bag específica para esta línea celular.

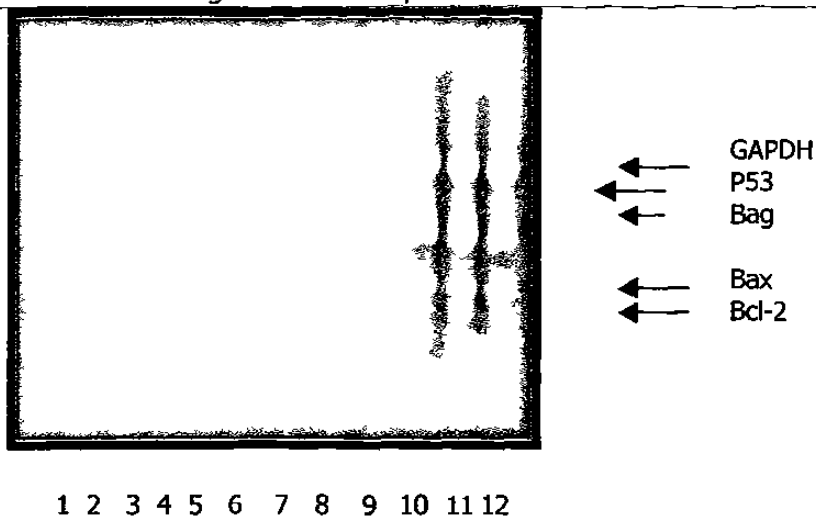


Fig.27. RT-PCR para genes apoptóticos en las líneas I15, A427 y CALU transfectadas con WT1. 1.- Marcador de peso molecular. 2.- Control negativo. 3.- Control positivo del kit. 4.- I15 sin transfectar. 5.- I15 transfectada con WT1/S. 6.- I15 transfectada con WT1/H. 7.- A427 sin transfectar. 8.- A427 transfectada con WT1/S. 9.- A427 transfectada con WT1/H. 10.- CALU sin transfectar. 11.- CALU transfectada con WT1/S. 12.- CALU transfectada con WT1/H.



DISCUSIÓN

La expresión del gen de WT1 se ha correlacionado con proliferación celular en diferentes tipos de neoplasias como leucemias y cáncer de mama.

Estudios previos como el realizado por Mensen y col. detectaron la expresión de WT1 en líneas celulares de cáncer de pulmón tanto pequeñas como no pequeñas, al ser considerado WT1 como un antígeno tumoral universal, se han desarrollado vacunas anti-WT1 para cáncer pulmonar y otros tipos de neoplasias, sin embargo, no se ha establecido si WT1 está involucrado en la proliferación celular en cáncer pulmonar.

Zapata y col. en su estudio en cáncer de mama observaron que WT1 estaba involucrado en la proliferación celular al bloquear el gen en líneas celulares de cáncer de mama con oligos antisentidos.

En este trabajo se analizaron 6 líneas celulares, 3 de las cuales son del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y en todas las líneas encontramos la expresión de WT1 tanto por RT-PCR como por Western blot.



Se analizaron las isoformas en éstas líneas ya que es importante debido a que se les atribuyen funciones biológicas distintas, en nuestras líneas predominaron las isoformas KTS- asociadas a procesos de transactivación y las isoformas Exón 5- .

La herramienta utilizada en este trabajo para silenciar al gen de WT1 y analizar su efecto en la proliferación celular fue el RNA de interferencia (RNAi), el cual se ha descrito como una herramienta poderosa y de actualidad para estudiar la función de un gen en particular.

Los resultados obtenidos en las líneas celulares I15, A427, SKMES y CALU tratadas con el RNAi-WT1 sintético mostraron inhibición de la proliferación celular, sin embargo no fueron totalmente satisfactorios, debido a que obtuvimos de un 40% a un 60% de inhibición en la proliferación celular.

Por otra parte, éstas líneas celulares y la línea celular leucémica K562 fueron tratadas con cuatro RNAs de interferencia que albergaban cuatro secuencias diferentes de WT1 en el plásmido pGSH1-GFP, al transfectar la línea celular leucémica K562 con las cuatro construcciones de plásmidos, con todos se observó un efecto de inhibición en la proliferación celular, el cual es proporcional al aumento en la concentración del plásmido. De los plásmidos probados en las líneas celulares de cáncer de pulmón, la línea CALU fue la que mostró efecto inhibitorio de la proliferación celular con los plásmidos 5-6 y 7-8.



Probablemente el poco efecto inhibitorio de los plásmidos en las líneas celulares de cáncer de pulmón se debió a la baja eficiencia de transfección, comparado con el RNAi sintético, sin embargo la inhibición de la proteína de WT1 fue específica, ya que se analizó con un western blot la disminución de la proteína en las líneas celulares K562 y CALU tratadas con el plásmido 5-6.

Las diferencias en la inhibición de la proliferación celular observadas entre la línea leucémica K562 y las líneas celulares de cáncer de pulmón, probablemente se deban a la ausencia de p53 en las líneas tumorales de pulmón, ya que p53 es un inductor de apoptosis.

De manera adicional, para observar el efecto contrario al de la inhibición de WT1, se transfectaron las líneas celulares I15, A427 y CALU con los plásmidos de WT1/S y WT1/H , lo cual nos permitió observar que ocurría con los genes apoptóticos, sin embargo, es necesario realizar transfecciones estables para verificar los cambios en los patrones de expresión de estos genes .



CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó el efecto del gen WT1 en la proliferación celular de líneas celulares de cáncer de pulmón al bloquear la expresión de este gen con RNA de interferencia.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir lo siguiente:

1. El bloqueo de la expresión de la proteína WT1 induce inhibición de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de pulmón
2. Los RNAi sintéticos fueron mejores en la inhibición de la proliferación celular que los plásmidos recombinantes.
3. Las líneas de cáncer de pulmón son sensibles a la transfección usando lipofectamina como vehículo de transfección
4. La línea celular CALU fué la que mostró inhibición de la proliferación celular con la transfección de plásmidos que contiene las secuencias de RNAi.
5. Los plásmidos recombinantes 5-6 y 7-8 presentaron mejor capacidad de bloqueo que el resto de los plásmidos.
6. En la línea I15 transfectada con WT/S se incrementó la expresión de Bax.
7. En la línea A427 transfectada con WT1/S se incrementó la expresión de Bax y Bcl-2.
8. Las líneas celulares de cáncer pulmonar probadas carecen de la expresión del gen p53.



PERSPECTIVAS

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por neoplasia en el mundo por lo que el estudio de los genes involucrados en la proliferación celular en este tipo de neoplasia es de suma importancia ya que contribuirá al descubrimiento de nuevos genes biomarcadores y futuros candidatos para terapia.

Para ampliar este estudio sería muy conveniente la elección de otras secuencias contra WT1 para ser expresadas en el plásmido pGSH1-GFP buscando obtener mejores niveles de inhibición de la proliferación celular.

Para contrarrestar los efectos tóxicos de la lipofectamina como agente de transfección del RNAi sintético podría probarse un método diferente de transfección con mayor eficiencia y menos toxicidad como la electroporación.

Hoy en día se utilizan vacunas anti-WT1 en cáncer pulmonar, sin embargo éste tipo de terapia se restringe a los pacientes que expresan el HLA-2102, por lo que si utilizamos una terapia génica basada en elementos antisentidos contra WT1 podríamos abarcar un mayor número de pacientes.



LITERATURA CONSULTADA

1. Kirsch Ilan R. 1997. Genetics of human cancer: pathogenesis and diagnosis Keystone, Colorado, January 27-February 2, 1997. *Biochimica et Biophysica Acta* 1333 R1-R7.
2. Rom William., Hay John., Lee Theodore., Jiang Yixing and Tchou Wong. 2000. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *AM J Respir Crit Care Med.*, 161:1355-1367.
3. Medina Morales Frumencio., Salazar Flores Margarita. 2000. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México *Salud pública de México.*, 42:333-336.
4. Franco Marina Fco., Villalba Cloca Jaime. 2001. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.*, 14: 207-213.
5. Medina Morales Frumencio., Flores Salazar Margarita., García-Sancho Cecilia., Franco M. Francisco. 2002. Epidemiología descriptiva del cáncer pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, 1997-2000.. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.*, 15 : 149-152.
6. Stabile, L.P., Siegfred, J.M. 2004. Estrogen receptor pathways in lung cancer. *Curr Oncol Rep.* 2004 Jul;6(4):259-67.
7. Risch HA, Howe GR, Jain M, et al. 1993. Are female smokers at higher risk for lung cancer than male smokers?. A case-control analysis by histologic type. *Am J Epidemiol* 138: 281-293.



8. Zan EA, Wynder EL.1996. Differences in lung cancer risk between men and women: Examination of the evidence. J Natl Cancer Inst 88:183-192.
9. McDuffie HH, Klaassen DJ, Dosman JA: Men, women and primary lung cancer: A Saskatchewan personal interview study. J Clin Epidemiol 44:537-544.
10. Collisharv, N.E, A.D.Lopez. 1996. The tobacco epidemic: A global public health emergency. Tobacco Alert. World Health Organization, Geneva.
11. Minna John D., Roth Jack and Gazdar Adi F.2002. Focus on lung cancer. Cancer cell., 1:49-52.
12. Beckett W.S.1993. Epidemiology and etiology of lung cancer. Clin Chest Med; 14:1; 1-15.
13. Ossan KE. 1991. Lung cancer in women: The importance of smoking, family history of cancer and medical history of respiratory disease. Cancer Res 51:4893-4897.
14. Miller A.B., Harve A.R.1989. Diet and lung cancer, vitamin A and B carotenos. Chest;96:8S-9S.
15. Sinha R, Kulldorff M, Swanson CA, et al. 2000. Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among Missouri women. Cancer Res 60: 3753-3756.
16. Engelhardt John F. 2002. The lung as a metabolic factory for gene therapy. J.Clin.Invest. 110:429-432.
17. Minna, J. 200. Neoplasms of the lung. In Harrison's Principles of the internal medicine, 15th edition. Chapter 88.



18. Bunn, P.A.Jr. 2001. Triplet combination chemotherapy and targeted therapy regimens. *Oncology*. 15:26-32.
19. Swisher Stephen, Roth Jack. 2000. Gene Therapy in Lung Cancer. *Current Science Inc*. 2: 64-70.
20. Fong,K.M, Sekido,Y, Minna ,J.D. 2001. The molecular basis of lung carcinogenesis. In the molecular basis of human cancer, W.B. Coleman and G.Tsongalis.eds.p.p. 379-405
21. Zochbauer-Muller,S, Gazdar A,F, Minna J,D. 2002. Molecular Pathogenesis of lung cancer. *Annu.Rev.Physiol*.64:681-708.
22. Zochbauer-Muller,S, Fong, K,M, Virmani, A,K, Geradts,J, Gazdar,A,F, Minna,J,D. 2001. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*.61: 249-255.
- 23.Hunter,T, Pines,J. 1994. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come age. *Cell* 79: 573-582.
24. Schaur,E.I, Siriwardana, S, Langan, T.A, Sciafani,R.A.1994. Cyclin D1 overexpression vs retinoblastoma inactivation:implications for growth control evasion in non-small cell lung cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*.91: 7827-7831.
25. El-Deiry, W.S, Tokino,T, Velculescu, V.E, et al. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor supresión. *Cell* 75:817-825.



26. Olie Robert,A, Simoes-Wust Paula, Baumann Bettina, Leech Sian, Fabbro Dorian, Stahel Rolf, Zangemeister Uwe. 2000. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Can Res*, 60: 2805-2809.
27. Messen,H.D, Bertelmann,E, Bartlet,S, Schmidt,R.A, Pecher,G, Schramm, Thiel,E. 2000. Wilm´s tumor gene (WT1) expression in lung cancer, colon cancer and glioblastoma cell lines compared to freshly isolated tumor-specimens. *J Cancer Res Clin Oncol*. 126: 226-232.
28. Yosuke Oji, Hiroyasu Ogawa, Hiroya Tamaki, Yoshihiro Oka, Akihiro Tsuboi, Eui Ho Kim, Toshihiro Soma, Toyoshi Tatekawa, Manabu Kawakami, Momotaro Asada, Tadimitsu Kishimoto, Haruo Sugiyama. 1999. Expresión of the Wilm´s Tumor Gene WT1 in solid tumors and its ivolvement in tumor cell growth. *Jpn.J.Cancer Res*. 90, 194-204.
29. Yosuke Oji,Miyoshi Shinchiro, Maeda Hajime, et al. 2002, Overexpression of the Wilm´s tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J.Cancer*.100: 297-303.
30. Foster Matthew., Johnson Joyce., Olson Snady., Allred Craig.2001. Immunohistochemical analysis of nuclear versus cytoplasmic staining of WT1 in malignant mesotheliomas and primary pulmonary adenocarcinomas.*Arch Pathol Lab Med*.,125.
31. Kwong Yok-Lam., Chen Shu-Hsia., Kosai Ken., Finegold Milton and Savio L,C.1997.Combination therapy with suicide and cytokine genes for hepatic metastases of lung cancer.Laboratory and animal investigations.*Chest* 112(5) :1332-1337.



32. Masahiko N, Meyn R, Levy L, Atkinson E, White A, Roth J, Ji L. 2001. Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutics in vitro and in vivo. Clin Can Res.7: 2887-2897.

33. Densmore Charles, Kleinerman Eugenie, Gautam Ajay, Shu-Fang Jia, Bo Xu, Worth Laura, Waldrep Clifford, Fung Yuen-Kai, Ang Anne, Knight Vernon. 2001. Growth suppression of established human osteosarcoma lung metastases in mice by aerosol gene therapy with PEI-p53 complexes. Vol8, Vol9, 619-627.

34. Swisher S, Roth J, Komaki R, et.al. 2003. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. Clin Can Res. 9: 93-101.

35. Pier Paolo Claudio, Caputi Mario, Giordano Antonio. The RB2/p130 gene: The latest weapon in the war against lung cancer. Clin Can Res. 6: 754-764.

36. Zamore Philip, Tuschl Thomas, Sharp Philip, Bartel David. 2000. RNAi: Double-Stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell.101: 25-33.

37. Elbashir Sayda, Lendeckel Winfried, Tuschl Thomas. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes & Development.15:188-200.

38. Harborth Jeans, Elbashir Sayda, Bechert Kim, Tuschl Thomas, Weber Klaus. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. Journal of cell Science 114:4557-4565.



39. Yu Jenn-Yah, DeRuiter Stacy, Turner Davida. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. 99:6047-6052.
40. Hannon Gregory J. 2002. RNA interference. Nature.418:244- 251.
41. Lee Sean Bong, Harber Daniel. 2001.Wilm's tumor and the WT1 gene. Experimental Cell Research.264:74-99.
42. Mrowka C, Schedl A.2000. Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. J Am Soc Nephrol., 16:S106-115
43. Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb AJ, Jochemsen AG.1999. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. J Biol Chem., 274:23456-23462
44. Hastie Nicholas D. 2001. Life, sex and WT1 isoforms- Three Amino Acids can make all the difference. Cell. 106: 391-394.
- 45.Rauscher FJ. 1993. Tumor suppressor genes which encode transcriptional repressors: studies on the EGR and Wilms' tumor (WT1) gene products. Adv Exp. Med.. Biol., 348:23-29
46. Englert, C.,Maheswaran, D., Garvin, A.J., Kreidberg, J., Haber, D.A. 1997.Induction of p21 by the Wilm's tumor suppressor gene WT1. Cancer Res., 57(8):1429-34.
47. Lee, S.B., Huang, K., Palmer,R., Truong, V,B., Herzlinger, D., Kolquist, K.A., Wong, J., Paulding, C., Yoon, S,K., Gerald, W., Oliner, J,D., Haber, D,A.1999. The Wilm's tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulina. Cell., 98:663-673.



48. Nakagama, H., Heinrich, G., Pelletier, J., Housman, D,E.1995. Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Mol Cell Biol*, 15(3):1489-98
49. Heckman C, Mochon E, Arcinas M, Boxer, L,M.1997. The WT1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in T lymphomas. *J Biol Chem.*, 272 (31):19609- 14.
50. Mahesware, S., Englert,C., Bennet, P., Heinrich, G., Haber, D.A.1995. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.*, 9:2143-2156.
51. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, et al. 1994.WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood.*, 84:3071-3079.
52. Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EH, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H. 1998. Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood.*, 15;91(8):2969-76.
53. Menssen HD, Renkl H-J, Rodeck U, et al.1995. Presence of Wilms' tumor gene (*wt1*) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia.*, 9:1060-1067.
54. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, Miyoshi I. 1993. Expression of the candidate Wilms' tumor gene, Wt-1, in human leukemia cells. *Leukemia.*, 7:970-977.



55. Schmid D, Heinze G, Linnerth B, et al. 1997. A. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia.*, 11:639-643
56. Chen Zing. 2000. The Possible Role and Application of Wt1 in Human Leukemia. *J. Hematology.*, 1.
57. Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al. 1999. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia.*, 13:393-399.
58. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, Sukumar S. 2001. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res.*, 61:921-925
74. Bruening W, Gros P, Sato T, Stanimir J, Nakamura Y, Housman D, Pelletier J. 1993. Analysis of the 11p13 Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in ovarian tumors. *Cancer Invest.*, 11:393-399
59. Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P, Roberts CT Jr, Daniel CW. 1997. Altered expression of the WT1 Wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:8135-8137.
60. Zapata-Benavides P, Tuna M, López-Berestein G, Tari AM. 2002. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295:784-790

