

ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DEL ARN EN CÁNCER



INVESTIGADOR: ¹Montero-Hidalgo AJ

¹Maimonides Institute of Biomedical Research of Córdoba IMIBIC

ALUMNADO (1º BACHILLERATO)

²Flores-Ortiz M, ²Medina-Yepes I, ²Langarica-Ortega P, ²Ortiz-Gil A

PROFESORA COORDINADORA

²Moreda-Moreno M (mmormor806@iesfidiana.es)

²IES Fidiana of Córdoba

ÍNDICE

ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
3.1 ADN (Ácido Desoxirribonucleico)	4
3.2 ARN (Ácido Ribonucleico)	5
3.3 CÁNCER DE VEJIGA	6
3.4 DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA	6
3.5 RETROTRANSCRIPCIÓN	7
3.6 PROCESO DE SPLICING	7
3.7 PCR Y ELECTROFORESIS	8
3.7.1 PCR	8
3.7.2 ELECTROFORESIS	9
3.8 PCR CUANTITATIVA	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1 PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	10
4.2 MATERIALES EMPLEADOS	11
4.3. MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	14
6. CONCLUSIONES	15
7. AGRADECIMIENTOS	15
8. BIBLIOGRAFÍA	16

ABSTRACT

Bladder cancer (BCa) is a tumor pathology highly prevalent worldwide with a limited life expectancy, which may be due to the lack of response to the currently used therapies (e.g., chemotherapy) as a result of the molecular heterogeneity of this pathology. In this regard, some reports indicate that the dysregulation of the RNA metabolism may influence the heterogeneity of various cancer types, suggesting that the inhibition of this process may represent a putative therapeutic tool in different tumor pathologies, although it has not been explored in BCa. Hence, the hypothesis of this study was that the pharmacological inhibition of the RNA metabolism may reduce the aggressiveness of BCa cells. Thus, the objective of this study was to evaluate whether the splicing pattern of relevant splicing variants involved in regulated cell death (apoptosis) might be altered in BCa cells in response to an inhibitor of the RNA metabolism. To do that, the RNA was extracted from samples derived from BCa cell lines (SW780 and RT4) treated with a vehicle or an RNA metabolism inhibitor. After that, the RNA was quantified and retrotranscribed to cDNA. Finally, the expression of proapoptotic (BCL-xS and MCL1-S) and antiapoptotic (BCL-xL and MCL1) splicing variants was determined by qPCR and conventional PCR. Thus, our results indicate that the pharmacological inhibition of the RNA metabolism increased the ratio between the proapoptotic vs. the antiapoptotic variants. Likewise, these results were also corroborated by conventional PCR, showing that the inhibition of the RNA metabolism altered the splicing pattern of the *BCL2L1* (or *BCL-x*) and *MCL1* apoptosis regulatory genes. As a result, our data suggest that the pharmacological inhibition of the RNA metabolism may reduce the aggressiveness of BCa cells through the modulation of the splicing pattern of the *BCL2L1* and *MCL1* genes to produce proapoptotic splicing variants (BCL-xS and MCL1-S), which may represent a promising therapeutic strategy for this tumor pathology.

KEYWORDS: RNA, splicing, apoptosis, genes, pharmacological inhibition

El cáncer de vejiga (CaV) es una patología tumoral de alta prevalencia a nivel mundial con una limitada esperanza de vida, lo que podría deberse a la pobre respuesta farmacológica a las terapias usadas actualmente (e.g., quimioterapia) como resultado de la heterogeneidad molecular de esta enfermedad. En este sentido, varios estudios sugieren que la desregulación del metabolismo del ARN podría influir en la heterogeneidad de diversos tipos de cáncer, por lo que la inhibición de este proceso podría representar una herramienta terapéutica en diferentes patologías tumorales, aunque no ha sido explorada en CaV. Así, la hipótesis de este estudio fue que la inhibición farmacológica del metabolismo del ARN podría disminuir la agresividad de células de CaV. Por ello, el propósito de este estudio fue evaluar si el patrón de splicing de dichas variantes de splicing relevantes involucradas en la muerte celular regulada (apoptosis) podría alterarse en células de CaV en respuesta a un inhibidor del metabolismo del ARN. Para ello, se extrajo el ARN de muestras derivadas de líneas celulares de CaV (SW780 y RT4) tratadas con un vehículo o inhibidor del metabolismo del ARN y, tras esto, se cuantificó y retrotranscribió el ARN a ADNc. Finalmente, se determinó la expresión de variantes de splicing proapoptóticas (BCL-xS y MCL1-S) y antiapoptóticas (BCL-xL y MCL1) mediante qPCR y PCR convencional. Así, nuestros resultados indicaron que la inhibición farmacológica del metabolismo del ARN incrementó la ratio de expresión de las variantes proapoptóticas frente a las variantes antiapoptóticas. Asimismo, este resultado se corroboró mediante PCR convencional al observar que la inhibición del metabolismo del ARN alteró el proceso de splicing de los genes reguladores de la apoptosis *BCL2L1* (o *BCL-x*) y *MCL1*. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la inhibición farmacológica del metabolismo del ARN podría reducir la agresividad de líneas celulares de CaV mediante la modulación del proceso de splicing de los genes *BCL2L1* y *MCL1* para producir variantes de splicing proapoptóticas (BCL-xS y MCL1-S), pudiendo representar una prometedora estrategia terapéutica para esta patología tumoral.

Palabras clave: ARN, splicing, apoptosis, genes, inhibición farmacológica

1. INTRODUCCIÓN

Cada día es más común escuchar la palabra cáncer, lo cual tiene sentido si tenemos en cuenta que actualmente es la primera causa de muerte a nivel mundial, suponiendo alrededor de 10 millones de muertes en 2020. Sin embargo, el aumento de los casos de esta enfermedad plantea un reto para la salud pública, con un incremento de 30.000 casos registrados sólo en España durante los últimos 6 años según la Asociación Española Contra el Cáncer. De hecho, la Comisión Europea ha pronosticado que para 2040 habrá un aumento del 32,2% en el número de casos en los países pertenecientes a la Unión Europea respecto al total de casos en 2020 (Dyba et al., 2021).

Concretamente, el cáncer de vejiga es la décima patología tumoral en términos de incidencia a nivel mundial. El tratamiento de esta enfermedad se basa en la cirugía combinada con inmunoterapia y/o quimioterapia. Su gran prevalencia puede verse altamente influenciada por la elevada tasa de recurrencia debido a la falta de respuesta de algunos pacientes a las terapias indicadas anteriormente. Esto, se encuentra a su vez drásticamente asociado a su elevada heterogeneidad molecular, lo que dificulta el establecimiento de estrategias terapéuticas realmente útiles y efectivas. En este sentido, recientemente se ha descrito la alteración en el proceso de splicing como una huella molecular de diversos tipos de cáncer, responsable en gran medida de la plasticidad tumoral y la resistencia a determinados fármacos. Así, la desregulación del metabolismo del ARN puede representar un mecanismo clave sobre la elevada heterogeneidad molecular de diversos tipos de cáncer, entre los que se incluye el cáncer de vejiga. Así, varios estudios indican que la inhibición del metabolismo del ARN podría ser una prometedora herramienta terapéutica en diferentes patologías tumorales, aunque esto aún no ha sido explorado en el cáncer de vejiga.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

La hipótesis del proyecto es que la inhibición farmacológica del proceso de splicing podría representar una herramienta terapéutica para el cáncer de vejiga. Para corroborar esta hipótesis, se plantean los siguientes objetivos:

- Analizar la expresión de variantes de splicing oncogénicas en respuesta al tratamiento de células de cáncer de vejiga con un inhibidor de la maquinaria de splicing.
- Interpretar, discutir y representar los resultados del proyecto y las conclusiones más relevantes.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 ADN (Ácido Desoxirribonucleico)

El ADN es una molécula del interior celular que contiene información genética responsable del desarrollo y el funcionamiento de un organismo. Estas moléculas son el medio de transmisión del material genético de generación en generación. Su estructura consiste en una hélice bicatenaria unida por enlaces de hidrógeno débiles entre los pares de bases nitrogenadas: la Adenina (A) se une con la Timina (T) y la Guanina (G) se une con la Citosina (C).

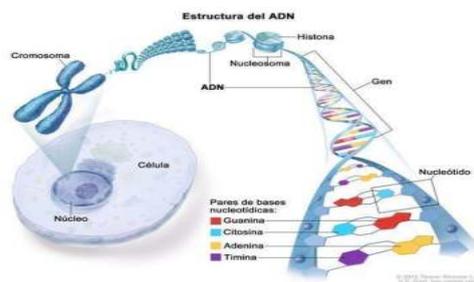


Imagen 1: Estructura del ADN

3.2 ARN (Ácido Ribonucleico)

El ARN es un tipo de ácido nucleico que contiene gran parte de la información contenida en el ADN mediante el proceso de transcripción a través de la ARN polimerasa.

Esta molécula está compuesta por una única cadena con estructura lineal y de menor longitud que la del ADN, con enlaces entre bases nitrogenadas son similares a los comentados para el ADN excepto por la Timina, que es sustituida por el Uracilo (U). Las células elaboran varias formas diferentes de ARN, donde cada una de ellas cumple una función específica en la célula: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr) y ARN transferente (ARNt).

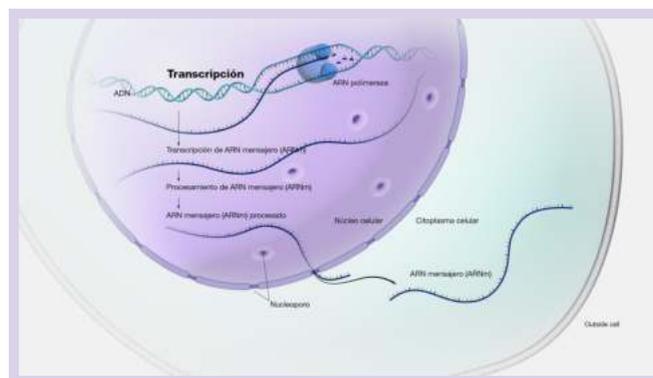


Imagen 2: Proceso de transcripción del ARN

3.3 CÁNCER DE VEJIGA

El cáncer se produce por una división incontrolada de células. Los genes que codifican proteínas involucradas directamente en que se encargan de este crecimiento se denominan son los proto-oncogenes, mientras que y, los encargados de frenarlo son los llamados genes supresores de tumores. Así, uno de los principales eventos asociados a la iniciación de un cáncer reside en la presencia de mutaciones en su material genético, ADN, de forma que su genoma se vuelve inestable y hay una pérdida de la actividad de los genes supresores de tumores.

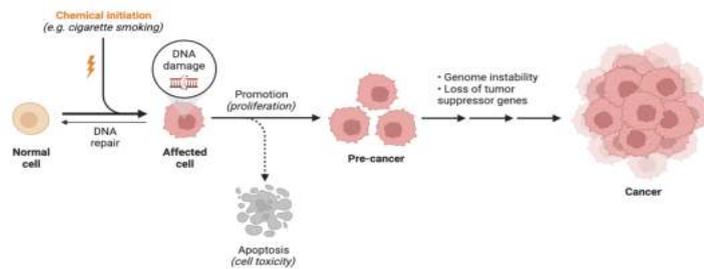


Imagen 3: Proceso de iniciación de un cáncer

En el caso del cáncer de vejiga, inicialmente el tumor se genera en las células que forman la superficie epitelial que posteriormente invaden el tejido conectivo subepitelial, a continuación el tejido muscular superficial y, finalmente, el tejido muscular profundo. En estadios más avanzados, el tumor invade tejidos perivesicales y, finalmente, invade tejidos adyacentes y otros órganos.

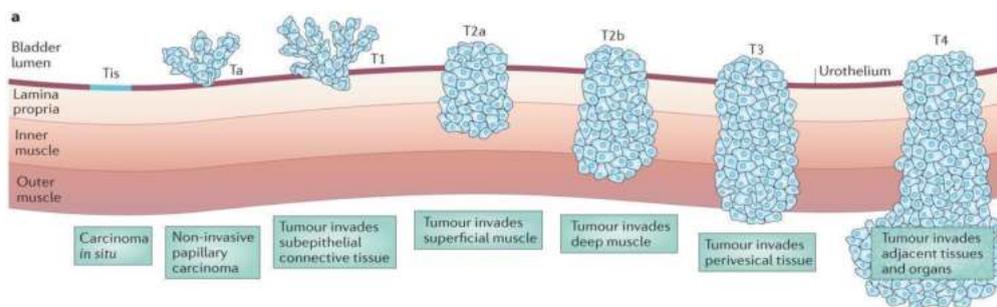


Imagen 4: Evolución Tumor en la vejiga

3.4 DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

El dogma central de la biología podría resumirse con el siguiente esquema: en él están representados, el ADN, el ARN y las proteínas. Mediante un proceso conocido como “transcripción”, se convierte en ARN. El siguiente proceso descrito es el que se conoce como “traducción” y supone la síntesis de proteínas a partir de una secuencia de ARN. Las proteínas son moléculas que forman estructuras, transportan otras moléculas, modifican sustancias y un largo sinfín de funciones más, todas esenciales para la vida.

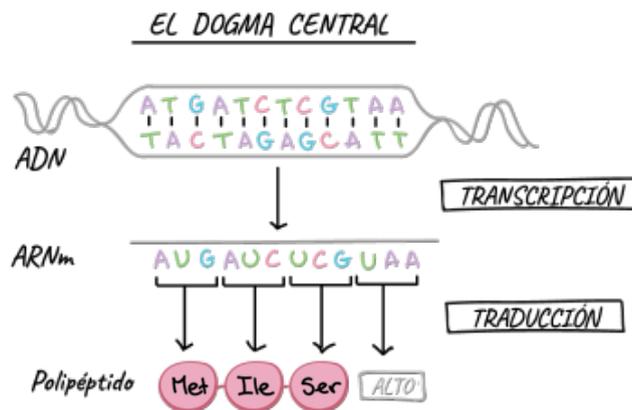


Imagen 5: Representación Dogma Central de la Biología

3.5 RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción, también conocida como transcripción inversa, es un proceso biológico en el cual se sintetiza ADN a partir de una molécula de ARN mediante la acción de una enzima llamada **transcriptasa inversa**. Este proceso se descubrió inicialmente en diversas cepas víricas y actualmente se utiliza en investigación para convertir el ARN en ADN y así permitir su amplificación y análisis. La retrotranscripción es un proceso altamente importante en la biología molecular, ya que permite la conversión de la información genética en diferentes formatos y su posterior manipulación en el laboratorio.

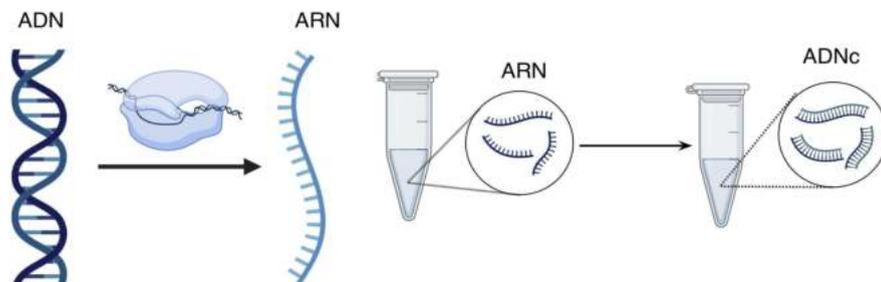


Imagen 6: Proceso de Retrotranscripción

3.6 PROCESO DE SPLICING

El proceso de splicing es un mecanismo de variabilidad celular y molecular que consiste en la maduración y procesamiento del ARN mensajero para generar diversas variantes de splicing, eliminando los intrones y uniendo los exones. De manera que aumenta la diversidad de proteínas posibles. Así, varios estudios sugieren que la aparición de variantes de splicing oncogénicas podría ser un factor clave en el desarrollo, progresión, agresividad y/o resistencia a terapia en cáncer de vejiga.

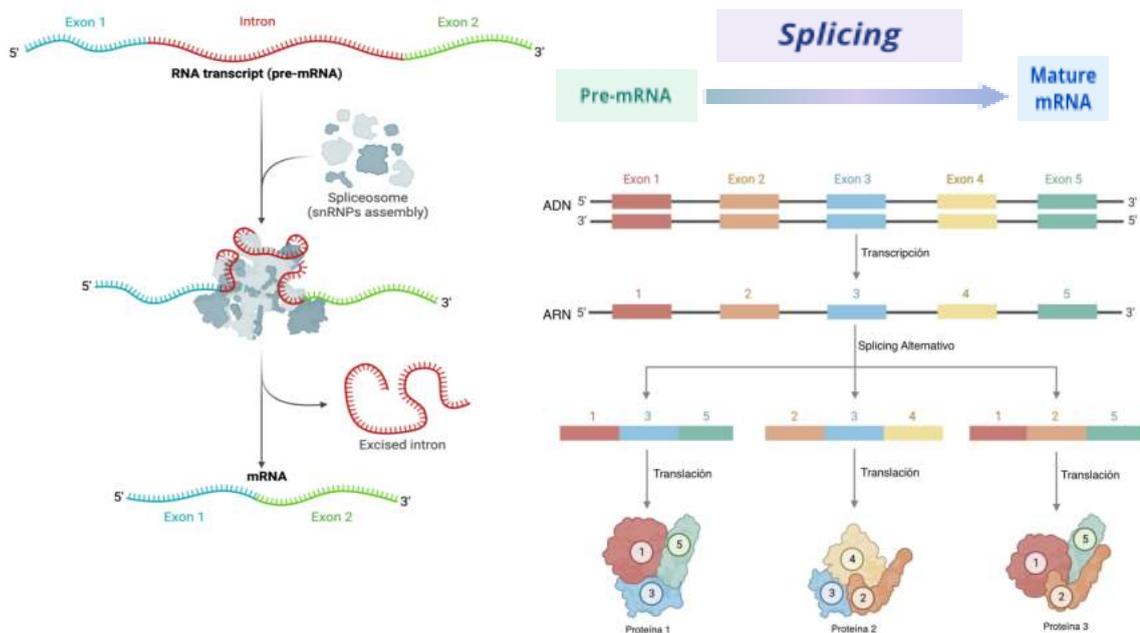


Imagen 7: Mecanismo de Splicing Alternativo

3.7 PCR Y ELECTROFORESIS

3.7.1 PCR

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica utilizada comúnmente para la amplificación de fragmentos de ADN. La amplificación permite aumentar la cantidad de material para poder hacer análisis posteriores. La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético (cebadores) para seleccionar el segmento del genoma que se amplificará.

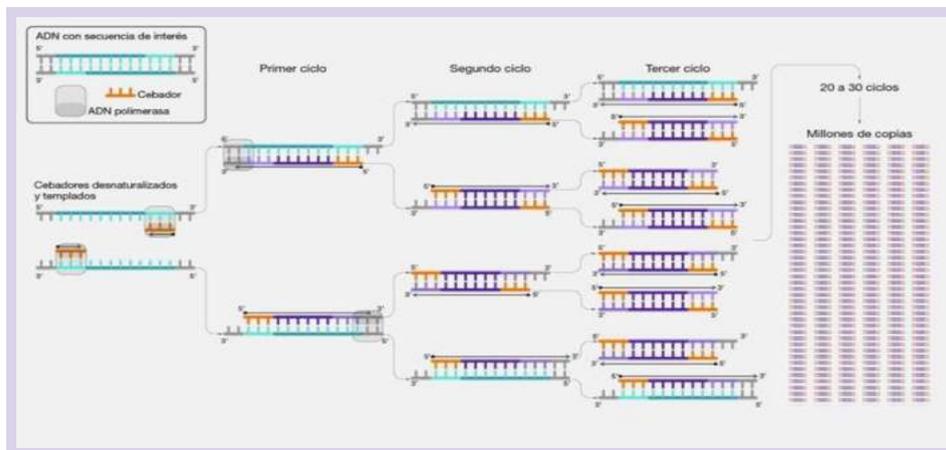


Imagen 8: Fundamento de la PCR

3.7.2 ELECTROFORESIS

La electroforesis es un método por el cual se separan moléculas por tamaño o peso molecular usando un campo eléctrico. La separación se realiza comúnmente en un gel que funciona como filtro poroso y está constituido habitualmente de materiales como agarosa o poliacrilamida. Su principal uso es la separación de mezclas de biopolímeros especialmente de ácidos nucleicos (ADN o ARN) o proteínas. En el caso de los ácidos nucleicos, como el ADN, estos disponen de una carga eléctrica negativa y, cuando son separados en el gel mediante una corriente eléctrica, se dirigen al polo positivo. Las moléculas de menor tamaño se moverán más rápidamente atravesando los poros del gel con facilidad, mientras que las moléculas de mayor tamaño migrarán menos ya que su tamaño impide que atraviesen los poros del gel fácilmente.

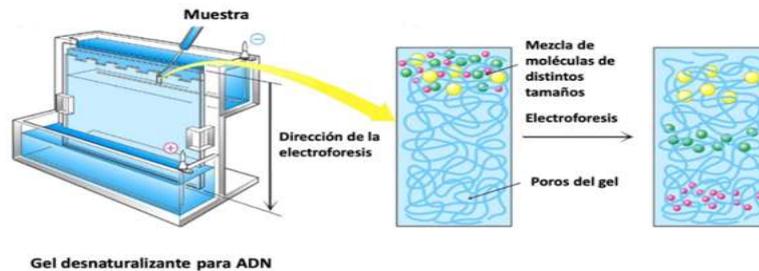
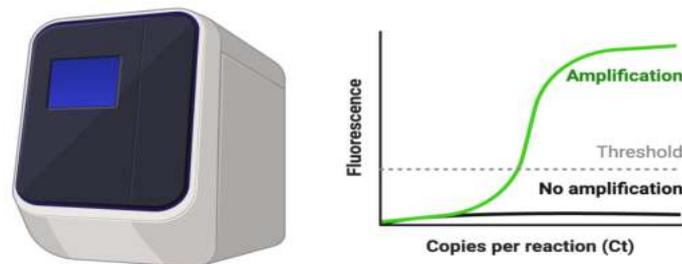


Imagen 9: Esquema de electroforesis.

3.8 PCR CUANTITATIVA

Es una modificación de la técnica de PCR convencional, descrita anteriormente, permitiendo cuantificar la cantidad inicial de un fragmento diana presente en una muestra. El fragmento diana puede ser tanto ADN como ARN. Se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Durante cada ciclo, se mide la fluorescencia y la señal de esta aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN replicado, por lo cual, el ADN se cuantifica en “tiempo real”.



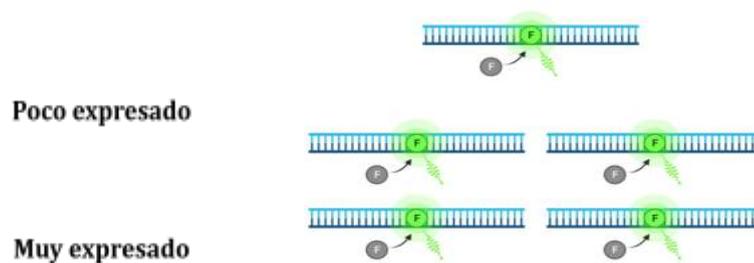


Imagen 10: Fundamento de la PCR cuantitativa

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

- **Sesión 1. 30/10/2023** (4 horas): Presentación institucional del IMIBIC y visita a las instalaciones del grupo GC27 “OncObesidad y Metabolismo”, del IMIBIC. Presentación de los objetivos del proyecto, resumen de las técnicas de laboratorio (métodos) empleados, introducción al metabolismo del ARN, su importancia en la regulación de la expresión génica y su implicación en los procesos tumorales con especial interés en el cáncer de vejiga.
- **Sesión 2. 29/11/2023** (4 horas): Presentación y descripción enfocada a los materiales y métodos empleados en la sesión. Extracción de ARN de células de cáncer vesical y obtención del ADN copia.
- **Sesión 3. 31/1/2024** (4 horas): PCR cuantitativa (qPCR) y PCR convencional para determinar la expresión de variantes de splicing en células de cáncer vesical.
- **Sesión 4. 21/2/2024** (4 horas): Análisis y discusión de los resultados obtenidos y asesoramiento para la realización de un póster científico.

4.2 MATERIALES EMPLEADOS

Entre otros, se han utilizado los siguientes materiales:



Fig 13. Tubo eppendorf



Fig 14. Micropipetas



Fig 15. Puntas de micropipetas



Fig 16. Gradilla de tubos eppendorf



Fig.17 Espectrofotómetro (NanoDrop)

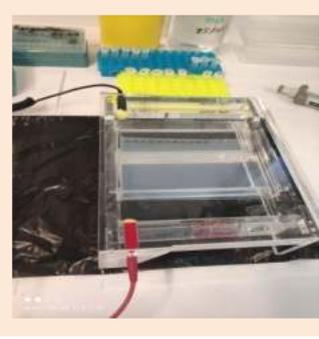


Fig.18 Cubeta de Electroforesis

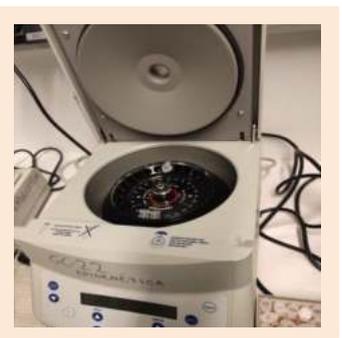


Fig 19. Centrífuga

Tubo eppendorf. Vial de almacenamiento para sustancias químicas y otros tipos de muestras.

Micropipetas. Instrumentos utilizados para la recolección de muestras en volúmenes pequeños (1 a 1000 microlitros).

Gradilla de tubos eppendorf. Soporte de tubos que facilita su transporte y manejo.

Espectrofotómetro (NanoDrop). Espectrofotómetro de microvolumen de espectro completo para cuantificar y evaluar la pureza de moléculas como ADN, ARN o proteínas.

Cubeta de electroforesis. Recipiente utilizado para la realización de la electroforesis.

Centrífuga. Máquina que utiliza la fuerza centrífuga para separar los componentes de una sustancia según sus densidades.

Trizol. Reactivo que permite disgregar la muestra de partida y el aislamiento del ARN.

Primers. Secuencia corta de nucleótidos.

4. 3. MÉTODOS

2ª Sesión.

- **Extracción de ARN de células de cáncer vesical y obtención del ADN copia.**

Se extrajo ARN a partir de pellets de líneas celulares de cáncer de vejiga (SW780 y RT4) tratadas con un vehículo o inhibidor del metabolismo del ARN.

Los reactivos utilizados han sido:

Trizol permite la obtención del ARN, manteniendo su integridad al inhibir eficientemente la actividad RNAasa al momento de romper y homogeneizar las células/tejidos.

Cloroformo permite la separación de una fase acuosa superior (conteniendo el ARN) y una fase inferior orgánica de color rosa (conteniendo ADN y proteínas).

Isopropanol permite la precipitación del ARN de la fase acuosa. Se utiliza **DNAsa** para eliminar cualquier resto de ADN que pueda quedar.

Etanol. Utilizado para limpiar la muestra de restos orgánicos.

Se determinó la concentración y calidad del ARN extraído mediante el NanoDrop.

Se cuantificó y retrotranscribió el ARN a ADNc y se llevó a cabo la retrotranscripción de ARN mensajero (ARNm) a ADN copia (ADNc). Finalmente, se determinó la expresión de variantes de splicing proapoptóticas y antiapoptóticas mediante qPCR y PCR convencional, obteniendo de resultado cómo la inhibición farmacológica incrementó la ratio entre las variantes proapoptóticas frente a las variantes antiapoptóticas. Asimismo, este inhibidor alteró el proceso de splicing de los genes reguladores de la apoptosis *BCL2L1* (o *Bcl-x*) y *MCL1*.

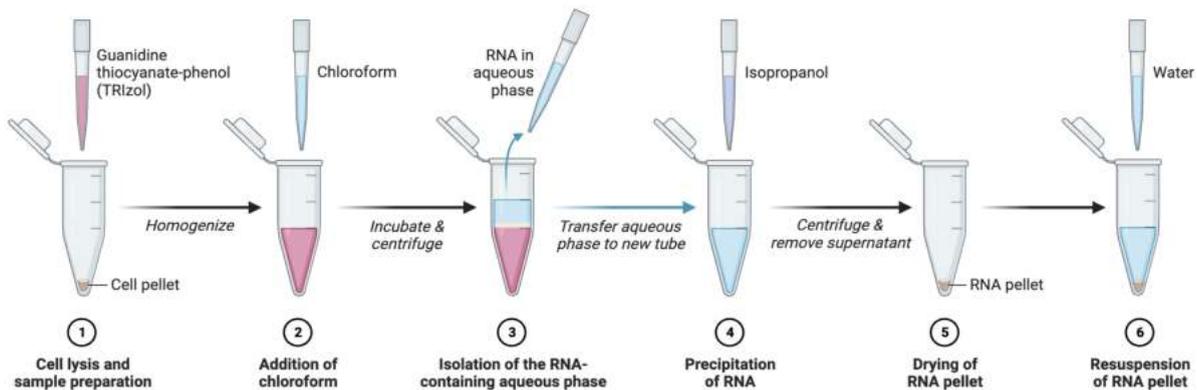


Imagen 20. Procedimiento para la obtención de ARN

3ª Sesión.

- **Amplificación mediante PCR y cuantificación mediante qPCR.**

Primero se realizó una cuantificación de transcritos mediante qPCR para determinar la expresión de variantes de splicing (BCLxS/BCLxL y MCL1-S/MCL1) en células de cáncer vesical. A continuación se amplificaron los transcritos de interés mediante PCR convencional con el mismo objetivo.

Por último se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las muestras derivadas de la PCR convencional.



Imagen 20. Preparación de muestras



Imagen 21. Realización de electroforesis

4ª Sesión.

Se expusieron los datos obtenidos, se discutieron los resultados y se comenzó con la realización del póster científico y del abstract del *proyecto* de investigación.



Imagen 22. Discusión de resultados



Imagen 23. Elaboración del póster científico

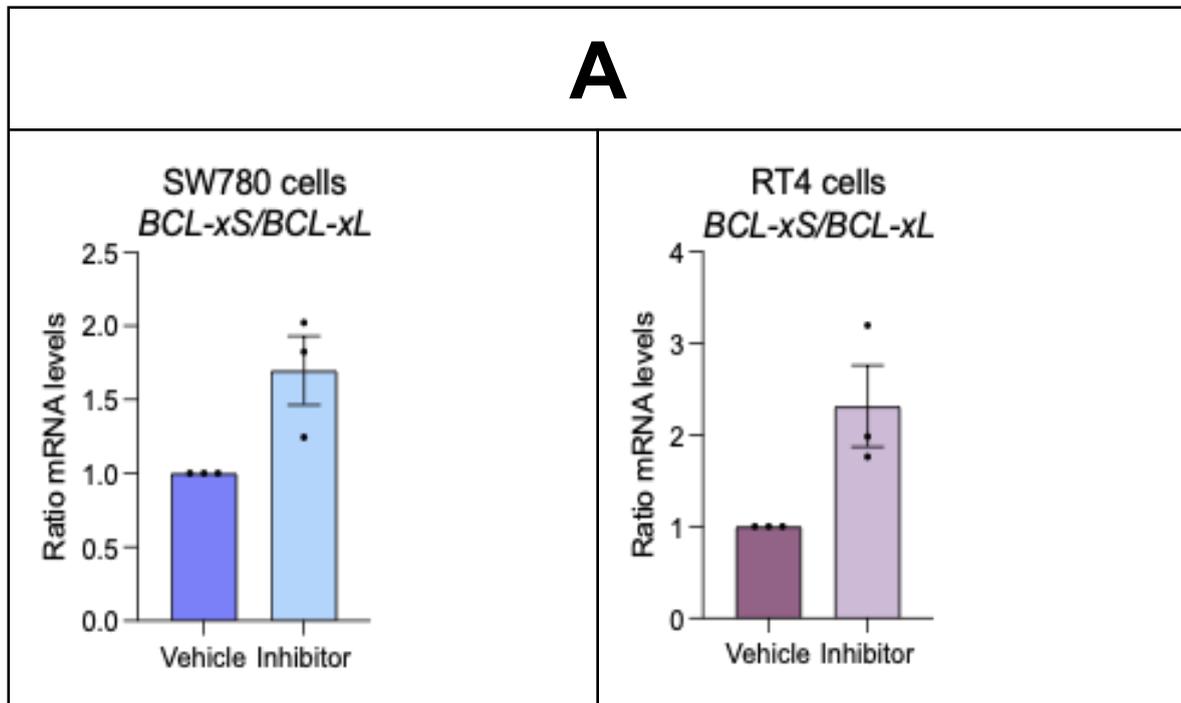
Sesiones posteriores

- **Elaboración de documentación mediante documentos compartidos en Drive.**

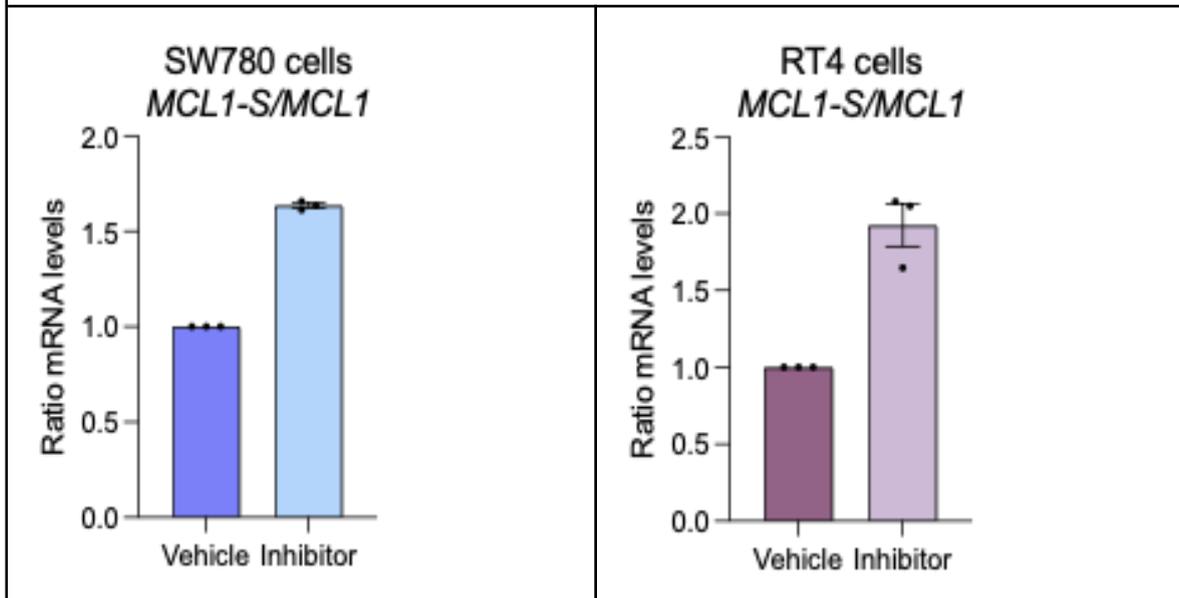
Se elaboraron los documentos correspondientes; abstract, memoria científica, póster científico y presentación del proyecto de investigación. Se contó con las correcciones de la profesora tutora del proyecto, M^a del Mar Moreda y del investigador del IMIBIC, Antonio Montero Hidalgo.

- **Preparación de la exposición oral para su defensa en el III Congreso Científico Internacional.**

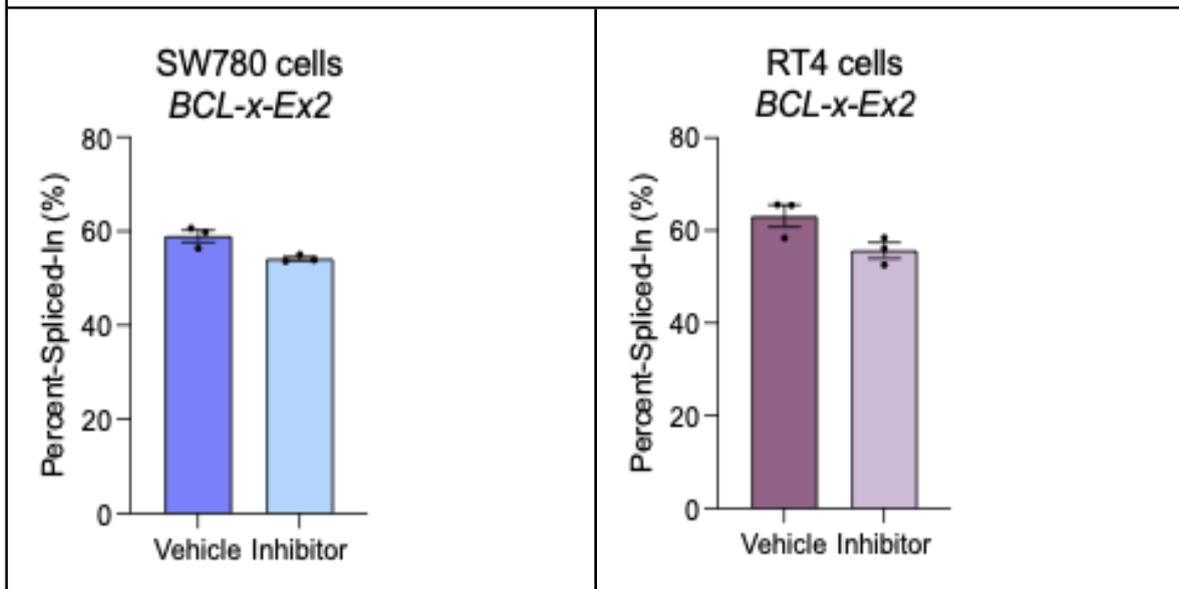
5. RESULTADOS



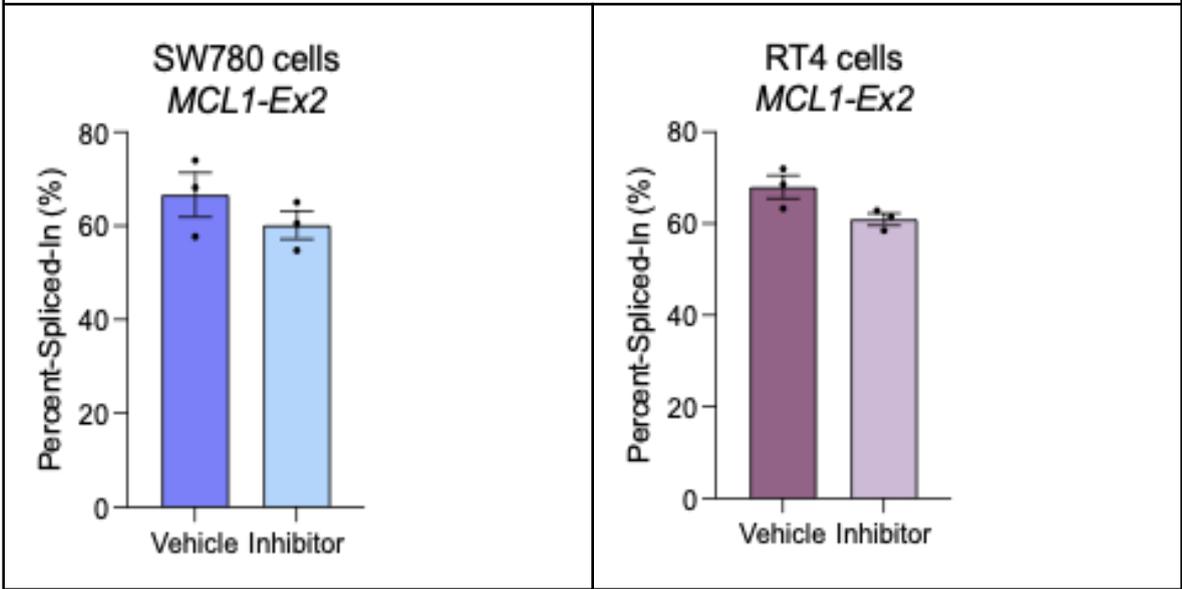
B



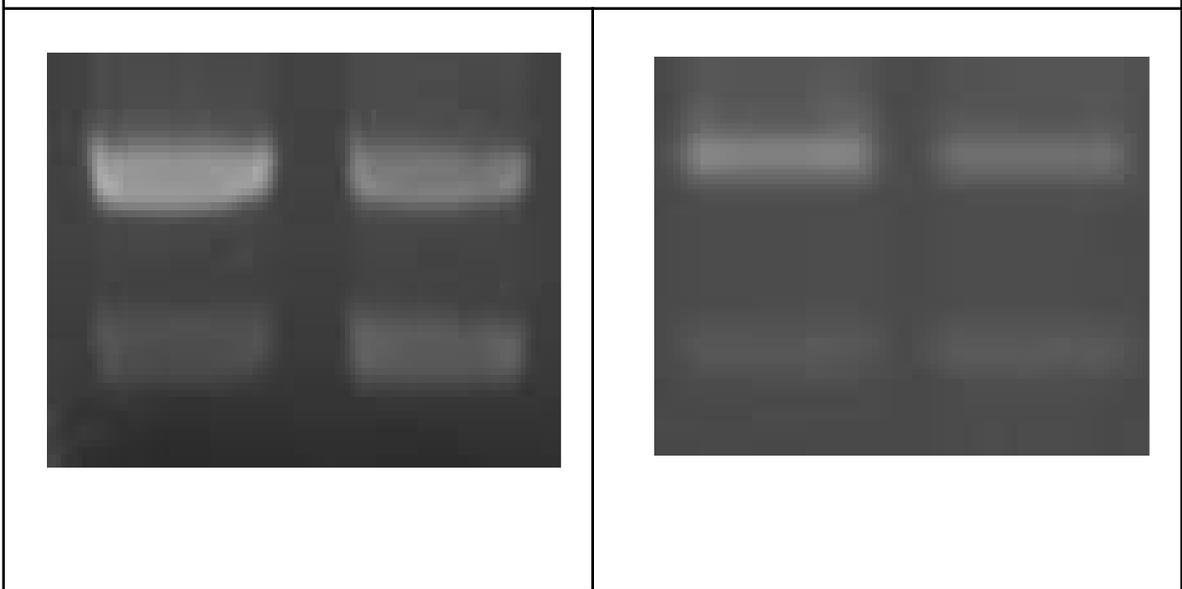
C

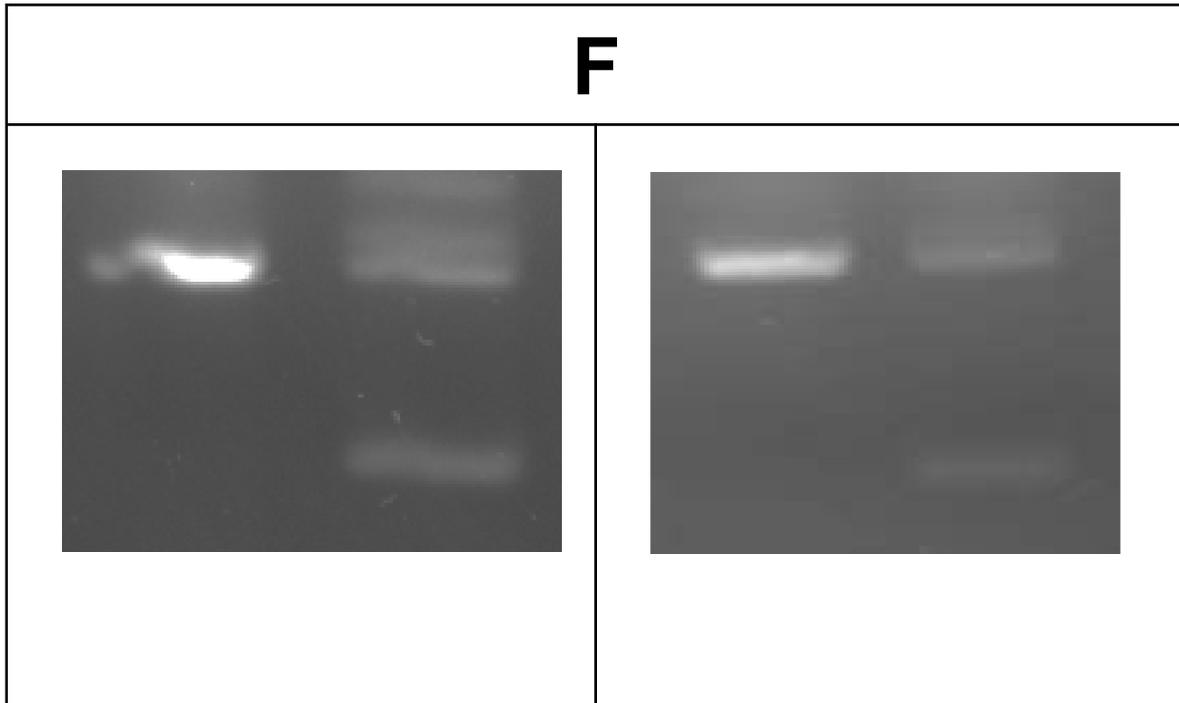


D



E





Efecto de la inhibición farmacológica del metabolismo del ARN sobre el proceso de splicing de los genes BCL-x y MCL1.

A,B: Relación de los niveles de expresión de BCL-xS/xL (A) y MCL1-S/MCL1 (B) en respuesta al inhibidor del metabolismo del ARN. Datos obtenidos por qPCR.

C,D: Porcentaje de inclusión del exón 2 del gen BCL-x (C) y MCL1 (D). Datos obtenidos por PCR convencional.

E,F : Imágenes representativas de las figuras C y D. Los datos se representan como media \pm SEM.

6. CONCLUSIONES

La inhibición farmacológica del metabolismo del ARN aumentó la expresión de variantes pro-apoptóticas (BCL-xS, MCL1-S) en células de cáncer de vejiga. Por ello, podemos concluir que la inhibición farmacológica del proceso de splicing podría representar una herramienta terapéutica para el cáncer de vejiga a través de la alteración de la expresión de variantes de splicing con papel oncogénico, apoyando, por tanto, hipótesis de partida.

7. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo. Sobre todo al IES Fidiana por ofrecernos esta oportunidad, entre ellos a la profesora de IES Fidiana María del Mar por orientarnos y ayudarnos en

todo momento. También agradecer al investigador, Antonio Montero, que nos ha ayudado en todo nuestro proceso. Y por último, a nuestras familias por su apoyo incondicional.

8. BIBLIOGRAFÍA

Slater, G. W., Guillouxic, S., Gauthier, M. G., Mercier, J. F., Kenward, M., McCormick, L. C., & Tessier, F. (2002). Theory of DNA electrophoresis (~ 1999–2002 ½). *Electrophoresis*, 23(22-23), 3791-3816.

Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2015). DNA structure and function. *The FEBS journal*, 282(12), 2279-2295.

Montero-Hidalgo AJ, Pérez-Gómez JM, Martínez-Fuentes AJ, et al. Alternative splicing in bladder cancer: potential strategies for cancer diagnosis, prognosis, and treatment. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2023;14(3):e1760. doi:10.1002/wrna.1760.

Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, et al. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2020;77(4):420-433.

doi:10.1016/j.eururo.2019.09.006.

Bonnal SC, López-Oreja I, Valcárcel J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer - implications for care. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(8):457-474. doi:10.1038/s41571-020-0350-x.

Dyba et al., 2021

<https://www.cancer.gov/espanol>

<https://es.quora.com>

<https://ellipse.prbb.org/es/splicing-o-empalme/>

<https://www.e-allscience.com>