

# VALIDACIÓN POR RT-qPCR DE BIOMARCADORES CANDIDATOS A ADENOCARCINOMA DE PULMÓN Y A CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE PULMÓN

M. Arroyo Varela<sup>1</sup>, R. Larrosa Jiménez<sup>2</sup>, D. Lozano Peral<sup>3</sup>, R. Bautista Moreno<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Respiratorias, Hospital Regional de Málaga.

<sup>2</sup>Dpto. de Arquitectura de Computadores, Universidad de Málaga.

<sup>3</sup>Unidad de Genotipado, Centro de supercomputación y Bioinnovación, Universidad de Málaga.

<sup>4</sup>Unidad de Bioinformática, Centro de Supercomputación y Bioinnovación, Universidad de Málaga.

Artículo financiado con la Beca Neumosur nº 6/2018

## RESUMEN

El cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres. La falta de herramientas para realizar un diagnóstico precoz es uno de los problemas, así como la escasez de terapias dirigidas. En trabajos anteriores identificamos por técnicas de ultrasecuenciación una serie de biomarcadores de adenocarcinoma pulmonar (LUAD) y carcinoma epidermoide de pulmón (ISCC), en este trabajo comprobamos cuántos de ellos se comportan de forma estable en poblaciones de pacientes con ambos tipos de cáncer. Para ello se han medido la expresión de 10 genes en 29 pacientes usando RT-qPCR de muestras de tejido sano y tumoral y se ha calculado la expresión diferencial usando genes de referencia. Se ha constatado que tres de esos genes, ADCYAP1, BMX y TUBA1A parecen conformarse como biomarcadores estables para cáncer de pulmón.

**Palabras clave:** Biomarcadores, cáncer de pulmón, PCR, genes, adenocarcinoma, carcinoma epidermoide.

VALIDATION BY RT-QPCR OF CANDIDATE BIOMARKERS FOR LUNG ADENOCARCINOMA AND LUNG SQUAMOUS CELL CARCINOMA.

## ABSTRACT

Lung cancer remains the leading cause of cancer death in men and women. The lack of tools to make an early diagnosis is one of the problems, as well as the shortage of targeted therapies. In previous works, we identified using ultrasequencing techniques a series of biomarkers for lung adenocarcinoma (LUAD) and lung squamous cell carcinoma (ISCC); in this work we verified how many of them behave stably in populations of patients with both types of cancer. To do this, the expression of 10 genes has been measured in 29 patients using RT-qPCR of healthy and tumor tissue samples and the differential expression has been calculated using reference genes. It has been found that three of these genes, ADCYAP1, BMX and TUBA1A, seem to be stable biomarkers for lung cancer.

**keywords:** Biomarkers, lung cancer, PCR, genes, adenocarcinoma, squamous cell carcinoma.

## INTRODUCCIÓN

El avance conjunto de las técnicas de secuenciación y de la bioinformática hace posible conocer la génesis de enfermedades, lo que puede contribuir a mejorar su diagnóstico y tratamiento. Gracias a esto, en los últimos años se ha logrado un mejor conocimiento de enfermedades como el cáncer.

En todo el mundo, el cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado y es la principal causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres. Su tasa de supervivencia a los 5 años es del 13%<sup>1</sup>. Esto es debido, entre otros factores, a la falta de herramientas para un diagnóstico precoz, y a la escasez de terapias dirigidas frente al tumor, lo que contribuye al mal pronóstico. Es necesario, por tanto, un mejor conocimiento etiopatogénico de la enfermedad para poder realizar una medicina personalizada que consiga mejores resultados con respecto a su tratamiento y frente a las resistencias

que estas terapias producen a lo largo del tiempo. Sin embargo, y hasta hace poco, la búsqueda de anomalías genéticas de forma masiva no era rentable por su coste, por el tiempo requerido, ni por la disponibilidad de material tumoral. El desarrollo de la tecnología de secuenciación masiva parece estar siendo la solución, ya que abre la posibilidad de determinar, de manera simultánea y con un coste aceptable, las variaciones genéticas y las diferencias de expresión génica relacionadas directamente con esta enfermedad. La información derivada de estos estudios podría ser la base de nuevos biomarcadores.

Por otro lado, la detección temprana del cáncer de pulmón podría reducir su mortalidad, ya que con frecuencia se diagnostica en estadios avanzados de la enfermedad, donde los tratamientos disponibles son poco o nada efectivos. En la actualidad se están realizando numerosos estudios para intentar determinar que genes podrían estar implicados en esta patología<sup>2</sup>; sin embargo,

Recibido: 30.06.2022 Aceptado: 17.09.2023

Dra. Macarena Arroyo Varela  
[macarrojo@gmail.com](mailto:macarrojo@gmail.com)

su uso como método diagnóstico no está aún establecido, principalmente por existir resultados incoherentes entre ellos. Por tanto, existe un gran potencial en el uso, por ejemplo, de los cambios de expresión de los genes tanto para el diagnóstico como para el pronóstico, es decir, que estos elementos se comporten como biomarcadores, lo que hace necesario nuevos estudios para llevarlos a su aplicación en la práctica clínica.

En todos estos procesos de establecimientos de nuevos biomarcadores, uno de los puntos más importantes, en cuanto a su utilidad, es su validación poblacional para así minimizar estas incoherencias. Para ello, la técnica de *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) es la más utilizada en los estudios de investigación y diagnóstico. En este caso, la RT-qPCR se considera el método más fiable para determinar la expresión relativa (RE) de un biomarcador en una muestra biológica. La RE se define como el cociente entre un biomarcador candidato y una referencia (generalmente admitida por la comunidad científica como *housekeeping*), obteniendo así, una expresión relativa de ese biomarcador para cada tejido histológico.

En relación a este punto, nuestro grupo de investigación ha descrito ya, mediante técnicas de secuenciación masiva, una serie de biomarcadores que podrían filiar de forma fiable los dos tipos principales de cáncer de pulmón: adenocarcinoma pulmonar (LUAD) y carcinoma epidermoide de pulmón (ISCC) [3-5]. Determinar si estos biomarcadores se comportan de forma estable en poblaciones de enfermos con ambos tipos de cáncer de pulmón es el objetivo final de este trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1 Genes candidatos

Resultados previos descritos en nuestro grupo de investigación marcaban como posibles biomarcadores diana la diferencia de expresión entre tejido tumoral y sano de los genes: C4BPB, CAPN8-2, IYD, MSLN, MUC1, SLC44A4, TMC5, ADCYAP1, BMX y TUBA1A. De estos posibles biomarcadores candidatos, la sobreexpresión (medida como logaritmo de las veces de cambio, *logFC*) en tejido tumoral de los genes C4BPB, CAPN8-2, IYD, MSLN, MUC1, SLC44A4 y TMC5, sería determinante para la identificación de adenocarcinoma pulmonar; mientras que la baja expresión en tejido tumoral de los genes de todos ellos, serían determinantes para la identificación de carcinoma epidermoide de pulmón.

### 2 Muestras de estudio

Se seleccionó una cohorte de 29 pacientes (n = 29), analizando tejido tumoral y sano pulmonar no parafinado.

Esta cohorte está clasificada en 17 pacientes intervenidos de adenocarcinoma pulmonar (LUAD) y 12 pacientes intervenidos de carcinoma epidermoide de pulmón (ISCC). El total de las 58 muestras estaban almacenadas en Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, BSSPA (<http://www.juntadeandalucia.es/salud/biobanco/>). Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que recibieron quimioterapia o radioterapia previa a la intervención quirúrgica, así como los pacientes que previamente hubiesen tenido un tumor en otra localización. La extracción del RNA total de las muestras de LUAD y ISCC se realizó siguiendo las especificaciones marcadas por el BSSPA.

### 3 Validación técnica y biológica: RT-qPCR para evaluación de expresión

Los niveles de expresión de los candidatos a biomarcadores seleccionados se evaluaron mediante la técnica de RT-qPCR utilizando 10 ng de RNA para la retrotranscripción a cDNA. Para cada gen, se diseñaron cebadores específicos y sondas indicadoras (Taqman) desde ThermoFisher (Alemania). La RT-qPCR se realizó en un volumen total de 25  $\mu$ l, conteniendo 2,5  $\mu$ l, del cDNA molde obtenido utilizando la ADN Hotmaster™ Taq Polimerasa (5 Prime, Alemania). Las muestras se analizaron por triplicado. Para corregir posibles desviaciones en los cálculos de expresión se utilizarán los genes 18s rRNA y RPLP0, como control de expresión de la RT-qPCR, y los genes HPRT, GAPDH, ACTB y GUSB, como control de expresión, es decir, genes de expresión constante ante la enfermedad<sup>6-8</sup>.

Los ensayos multiplexados de RT-qPCR se realizaron utilizando placas de 96 de Temoficher. Las imágenes resultantes se analizaron con el software *Applied Biosystems QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System*, usando parámetros estándar. La expresión génica se midió a partir del denominado ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct). Para cada uno de los genes candidatos, en tejido tumoral y en tejido sano, se calculó un umbral Ct. Los datos de Ct (expresión génica) se procesaron con un script de R hecho a medida.

Se realizó una normalización de la expresión utilizando los genes de referencia, calculándose una expresión relativa (RE) para cada gen. Los datos de RE normalizados se emparejaron en muestras de tejido tumoral y sano para candidato a biomarcador en cada paciente, separadas por tipo tumoral, LUAD y ISCC. Así, para cada candidato se calculó un incremento de Ct ( $\Delta\Delta CT$ )<sup>9</sup>. La significancia de los  $\Delta\Delta CT$  se estudió aplicando un coeficiente de correlación de Pearson. Se marcaron como significativos aquellos  $\Delta\Delta CT$  con un p-value <0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1 Análisis de expresión de los genes candidatos

La evaluación de las modulaciones del perfil de expresión génica entre tejido tumoral y sano de cada gen en cada paciente se han estudiado utilizando el método  $\Delta\Delta CT$  (valor incremental de Ct). Los datos de  $\Delta\Delta CT$  se han normalizado utilizando distintos genes de referencia: 18s rRNA y RPLP0, HPRT, GADPH, ACTB y GUSB.

A partir de la representación en forma de boxplot (figura 1) de la normalización de la RE en base a la expresión del gen GADPH, y posterior cálculo de los  $\Delta\Delta CT$ , observamos que los genes de referencia 18s rRNA y RPLP0, HPRT, ACTB y GUSB presentan el mismo nivel de expresión entre tejido tumoral y sano en adenocarcinoma de pulmón. Sin embargo, estos mismos genes de referencia tienen un comportamiento errático en carcinoma epidermoide de pulmón (figura 1). De este resultado deducimos que los  $\Delta\Delta CT$  calculados para los biomarcadores candidatos utilizando este gen de referencia no serían fiables, dato que se corrobora con los coeficientes de correlación de Pearson para la referencia GADPH, donde no se muestra ningún valor significativo (tabla 1).

Por otro lado, la representación en forma de boxplot (figura 2) de la normalización de la RE en base a la expresión del gen GUSB, y posterior cálculo de los  $\Delta\Delta CT$ , observamos que los genes de referencia 18s rRNA y RPLP0, HPRT, ACTB y GADPH presentan el mismo nivel de expresión entre tejido tumoral y sano en adenocarcinoma de pulmón. En carcinoma epidermoide de pulmón sólo los genes de referencia GADPH y HPRT presentan un comportamiento errático (figura 2). De estos resultados podemos deducir los  $\Delta\Delta CT$  calculados para los biomarcadores candidatos sí serían fiables a nivel poblacional. Los coeficientes de correlación de Pearson para la referencia GUSB, nos indica que sí existe una  $\Delta\Delta CT$  significativa en los genes ADCYAP1 y TUBA1A, al menos para carcinoma epidermoide de pulmón (tabla 1).

Si realizamos los cálculos de RE y  $\Delta\Delta CT$  en base al gen de referencia HPRT, observamos que los genes de referencia 18s rRNA y RPLP0, GUSB, ACTB y GADPH vuelven a presentar el mismo nivel de expresión entre tejido tumoral y sano en adenocarcinoma de pulmón (figura 3). Por el contrario, los genes de referencia ACTB y GADPH no muestran comportamientos fiables (figura 3). De estos resultados podemos deducir los  $\Delta\Delta CT$  calculados para los biomarcadores candidatos sí serían fiables a nivel poblacional. Los coeficientes de correlación de Pearson

para la referencia GUSB, nos indica que sí existe una  $\Delta\Delta CT$  significativa en los genes TUBA1A, al menos para adenocarcinoma de pulmón (tabla 1).

Por último, al realizar los cálculos de RE y  $\Delta\Delta CT$  en base al gen de referencia RPLP0, observamos que los genes de referencia 18s rRNA y RPLP0, GUSB, HPRT, ACTB y GADPH presentan de nuevo el mismo nivel de expresión entre tejido tumoral y sano en adenocarcinoma de pulmón (figura 4). En esta ocasión, y para carcinoma epidermoide solo el gen de referencia GADPH no muestra un comportamiento fiable entre tejido tumoral y sano (figura 3). Al igual que en los casos anteriores, podemos deducir que los  $\Delta\Delta CT$  calculados para los biomarcadores candidatos sí serían fiables a nivel poblacional. Los coeficientes de correlación de Pearson para la referencia RPLP0, nos indica que sí existe una  $\Delta\Delta CT$  significativa en los genes ADCYAP1, BMX y TUBA1A, al menos para carcinoma epidermoide de pulmón (tabla 1).

En la literatura científica ya se muestra resultados donde el gen ADCYAP1, también conocido como PACAP, puede ser un marcador para el cáncer de pulmón de células no pequeñas<sup>10</sup>. Por otro lado, se conoce que BMX promueve el crecimiento en LUAD y en otros tipos de cáncer<sup>11, 12</sup>. Con respecto al gen TUBA1A es bien conocida su relación con el cáncer<sup>13, 14</sup>. Todas estas evidencias nos hace pensar que sean tres posibles biomarcadores poblacionales para la filiación del cáncer de pulmón.

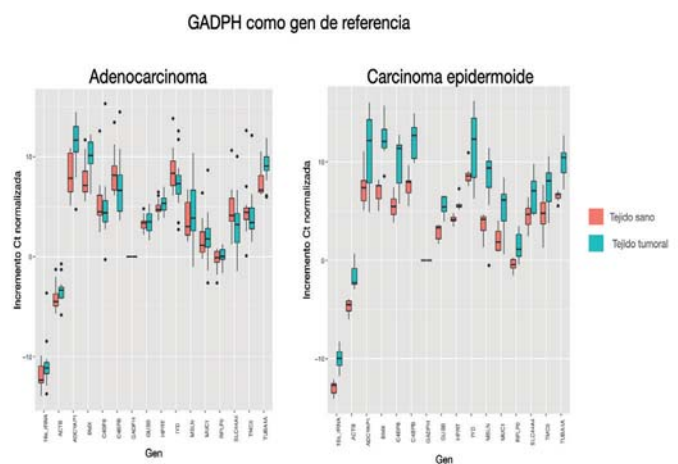
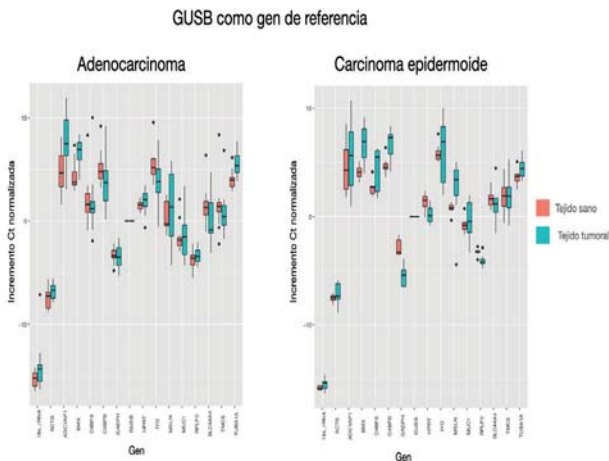


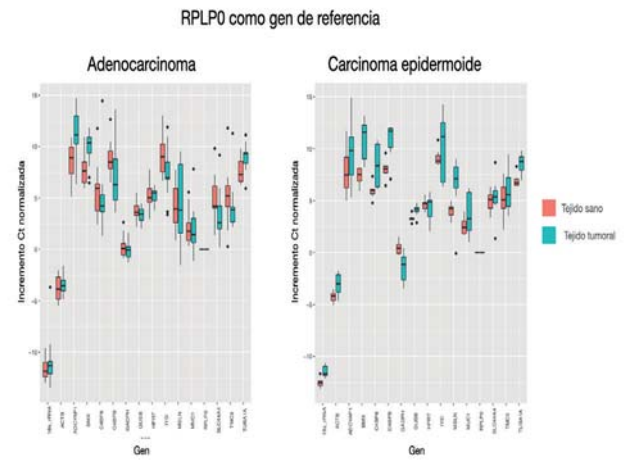
Figura 1: Boxplot del incremento de Ct de los candidatos a biomarcadores normalizado por la expresión del gen GADPH.

**Tabla 1:** Valores de *p*-value del índice correlación de Pearson para cada gen en cada tipo tumoral, índices corregidos por sus respectivos genes de referencia.

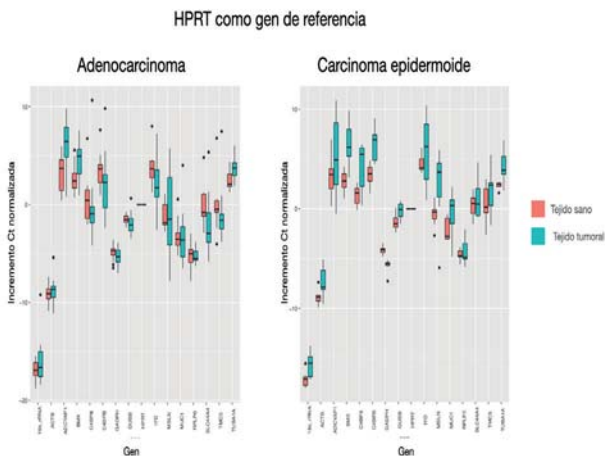
Gen	RLP0		GADPH		HPRT		GUSB	
	LUAD	ISCC	LUAD	ISCC	LUAD	ISCC	LUAD	ISCC
<b>ADCYAP</b>	0.46522	<b>0.0265323</b>	0.75644	0.11792	0.88211	0.09272	0.75910	<b>0.01454485</b>
<b>1</b>	<b>81</b>		62	85	06	849	77	
<b>BMX</b>	0.15071	0.02494925	0.22272	0.80903	0.14606	0.84676	0.34188	0.08573544
	36		74	67	29	16	87	
<b>C4BP8</b>	0.70881	0.6558005	0.77536	0.98599	0.62277	0.31305	0.34174	0.5572666
	65		67	18	55	84	45	
<b>C4BP8</b>	0.28050	0.06669905	0.13718	0.78816	0.24250	0.63672	0.41011	0.1709346
	35		58	18	44	17	41	
<b>IYD</b>	0.67593	0.5759265	0.25567	0.96137	0.09195	0.36783	0.44159	0.4611931
	82		05	16	521	78	33	
<b>MSLN</b>	0.97435	0.2623404	0.44583	0.24184	0.35988	0.05128	0.52998	0.6694264
	67		2	59	84	663	73	
<b>MUC1</b>	0.68951	0.8903001	0.36630	0.79501	0.56344	0.14882	0.89916	0.9451442
	35		29	58	44	2	39	
<b>SLC44A4</b>	0.44271	0.158245	0.19384	0.71052	0.39612	0.87644	0.54976	0.2044324
	1		11	77	77	06	15	
<b>TMC5</b>	0.37603	0.919956	0.81640	0.53237	0.56855	0.17976	0.30458	0.7025885
	38		31	31	06	24	36	
<b>TUBA1A</b>	0.85138	0.04695167	0.72641	0.54891	0.05802	0.98810	0.51038	<b>0.003980808</b>
	52		87	88	924	77	81	



**Figura 2:** Boxplot del incremento de Ct de los candidatos a biomarcadores normalizado por la expresión del gen GUS.



**Figura 4:** Boxplot del incremento de Ct de los candidatos a biomarcadores normalizado por la expresión del gen RPLP0.



**Figura 3:** Boxplot del incremento de Ct de los candidatos a biomarcadores normalizado por la expresión del gen HPRT.



## CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestro estudio confirma que los genes ADCYAP1, BMX y TUBA1A parecen conformarse como biomarcadores poblacionales para la determinación mediante broncoscopia de enfermos con cáncer de pulmón. Como perspectiva de futuro se podría comprobar si los cambios de expresión de algunos de estos genes podrían detectarse en fluidos, como plasma o suero, haciéndolos viables en biopsias líquidas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Annals of global health*. 2019; 85 (1).
2. Yatabe Y, Sunami K, Goto K, Nishio K, Aragane N, Ikeda S et al. Multiplex gene-panel testing for lung cancer patients. *Pathology international*. 2020; 70 (12): 921–931.
3. Varela MA, Moreno RB, Jiménez RL, de la Cruz Ríos J, Dols MC, Díaz MGC. Potencial uso biomarcador de los retrotransposones en el adenocarcinoma de pulmón. *Revista española de patología torácica*. 2018;30 (4): 224–230.
4. Varela MA, Jiménez RL, Dols MC, Díaz MC, Moreno RB. Biomarcadores de cáncer de pulmón basados en la expresión de genes, transposones y secuencias repetitivas. *Revista española de patología torácica*. 2021;33 (1): 46–53.
5. Arroyo M, Bautista R, Larrosa R, Cobo MA, Claros MG. Biomarker potential of repetitive-element transcriptome in lung cancer. *PeerJ*. 2019;7:e8277.
6. Sharan R, Vaiphei ST, Nongrum S, Keppen J, Ksoo M. Consensus reference gene (s) for gene expression studies in human cancers: end of the tunnel visible? *Cellular Oncology*. 2015; 38 (6): 419–431.
7. Carmona R, Arroyo M, Jiménez-Quesada MJ, Seoane P, Zafra A, Larrosa R et al. Automated identification of reference genes based on RNA-seq data. *Biomedical engineering online*. 2017;16 (1): 1–23.
8. Jo J, Choi S, Oh J, Lee SG, Choi SY, Kim KK et al. Conventionally used reference genes are not outstanding for normalization of gene expression in human cancer research. *BMC bioinformatics*. 2019; 20 (10): 13–21.
9. Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R et al. ddCt method for qRT-PCR data analysis. *Citeseer*. 2013; 48(4): 346–356.
10. Sun L, Zhang Z, Yao Y, Li WY, Gu J. Analysis of expression differences of immune genes in non-small cell lung cancer based on TCGA and ImmPort data sets and the application of a prognostic model. *Annals of translational medicine*. 2020; 8 (8).
11. Huang WC. Biologic functions of BMX/BTK in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*. 2018; 78 (13\_Supplement): 3.455–3.455.
12. Li C, Fan K, Qu Y, Zhai W, Huang A, Sun X et al. Deregulation of UCA1 expression may be involved in the development of chemoresistance to cisplatin in the treatment of non-small-cell lung cancer via regulating the signaling pathway of microRNA-495/NRF2. *Journal of Cellular Physiology*. 2020; 235 (4): 3.721–3.730.
13. Zhu Y, Zhang X, Wang L, Zhu X, Xia Z, Xu L et al. FENRRR suppresses cervical cancer proliferation and invasion by targeting miR-15a/b-5p and regulating TUBA1A expression. *Cancer Cell International*. 2020; 20 (1): 1–10.
14. Wang D, Jiao Z, Ji Y, Zhang S. Elevated TUBA1A Might Indicate the Clinical Outcomes of Patients with Gastric Cancer, Being Associated with the Infiltration of Macrophages in the Tumor Immune Microenvironment. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*. 2020; 29 (4).

## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo ha sido posible gracias a las becas Neumosur 12/2015, 14/2016, 5/2017 y 5/2018. Además, quisiéramos agradecer al Servicio de Supercomputación y Bioinformática (SCBI) de la Universidad de Málaga, el apoyo que ha prestado para el desarrollo de este proyecto.