

premios y becas



Informe Preliminar Beca SEOM 2001

Tratamiento del Cáncer de Próstata con Mutaciones en el Gen PTEN

Investigador Principal:

Dra. M^a Luz Amador

The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center

The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, EEUU



Introducción

El cáncer de próstata es el tumor maligno más frecuente en el hombre y la segunda causa de muerte por cáncer. El gen PTEN, localizado en el cromosoma 10, codifica una fosfatasa que está implicada en procesos de proliferación, supervivencia, adhesión, migración y diferenciación celular. Estas acciones las ejerce a través de la inhibición de la vía de transducción de señales PI3K/Akt. Entre un 30 y un 50% de los pacientes con cáncer de próstata tienen mutaciones o deleciones en el gen PTEN que se asocian a una mayor agresividad tumoral, con alta puntuación en la escala pronóstica de Gleason, mayor afectación linfática, aumento de la angiogenesis, estadios tumorales más avanzados y resistencia al tratamiento quimioterápico. Estas alteraciones se deben a una hiperactivación de la vía de transducción de señales PI3K/Akt que en condiciones normales está inhibida por la proteína PTEN. Cuando existe un déficit de dicha proteína, la quinasa mTOR (diana molecular de la rapamicina) pasa a ser el principal regulador de la vía PI3K/Akt.

Los datos que aquí se presentan son los obtenidos hasta el momento en un proyecto de investigación que se está lle-

vando a cabo con el apoyo, entre otros de la Sociedad Española de Oncología Médica. La hipótesis principal del proyecto es que la inhibición farmacológica de la vía PI3K/Akt inhibe la proliferación celular y revierte la resistencia a la quimioterapia en el cancer de próstata con mutaciones en PTEN.

Metodología

Las líneas celulares que se están empleando para este estudio son: PC3(PTEN-) y DU-145(PTEN+) y dos sublíneas derivadas de éstas a través de la transfección estable con oligonucleótidos antisentido, PC3(PTEN+) y DU-145(PTEN-). Dichas líneas celulares crecen en el medio de cultivo Improved Minimal Essential Medium (IMEM) a 37°C, en una atmósfera con el 5% de CO₂. Para determinar el estado de activación de la vía PI3K/Akt, empleamos un análisis de Western-Blott con anticuerpos contra PTEN, Akt, p-Akt, mTOR y p-mTOR (todos ellos comercializados). Para semicuantificar los resultados del análisis de Western-Blott, empleamos un análisis de densitometría.

Resultados

Las líneas celulares PC3 y DU-145 tienen

distinta expresión de PTEN y activación de la vía Akt. La pérdida en la expresión de PTEN da lugar a la hiperactivación de la vía PI3K/Akt, que es crucial para la regulación de la supervivencia y proliferación celular. Se ha realizado un análisis de Western-Blott para comprobar la expresión de PTEN y la fosforilación de Akt, su principal diana molecular. En la línea celular PC3 no se ha observado expresión de PTEN. Este hallazgo se correlaciona con unos niveles altos de Akt fosforilada. En la línea celular DU-145, por el contrario, se han detectado niveles altos de la proteína PTEN y los niveles de Akt fosforilada son indetectables (Figura 1).

Al tratar estas dos líneas celulares con distintas concentraciones de Doxorrubicina (1ng/ml; 10ng/ml; 50ng/ml) hemos observado que la línea celular que expresa PTEN (DU-145) responde a concentraciones de Doxorrubicina de 10ng/ml, observándose un incremento del 25% en la respuesta de estas células al compararla con la respuesta al tratamiento con las mismas dosis de Doxorrubicina de la línea PC3 que no expresa PTEN (Figura 2).

El estado de PTEN predice la respuesta al tratamiento con Doxorrubicina en células

transfетadas con dicho gen. En la línea celular PC3 (PTEN+) transfectada, se observó una disminución del 50% en la expresión de Akt fosforilada. Al tratar estas células con las mismas concentraciones de Doxorubicina, observamos una respuesta a dicho agente similar a la observada previamente en la línea celular DU-145. El tratamiento de la línea celular PC3 (PTEN-) con Rapamicina como agente único a 10nM inhibe el crecimiento celular en un 14%. Cuando se trata esta línea celular con Doxorubicina como agente único no se observan respuestas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran la existencia de una relación entre el estado del gen

PTEN y de la proteína que codifica con la resistencia al tratamiento con Doxorubicina de líneas celulares de cáncer de próstata. Esta relación está mediada a través de la vía de transducción de señales PI3k/Akt.

En estos momentos se están tratando las líneas celulares mencionadas con Doxorubicina y Rapamicina de forma combinada. Si el tratamiento conjunto revierte la resistencia a Doxorubicina, esta previsto realizar el experimento en un modelo animal de cáncer de próstata empleando las mismas líneas celulares. Los resultados de estos experimentos pueden suponer la base de futuros estudios clínicos en pacientes con cáncer de próstata que presenten alteraciones en el gen PTEN.

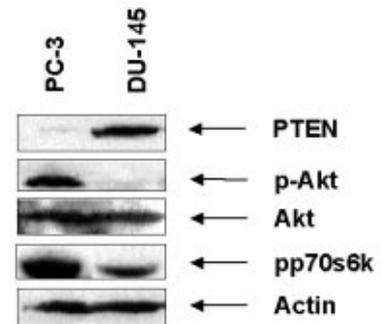


Figura 1. Expresión de PTEN y correlación con el estado de fosforilación de Akt.

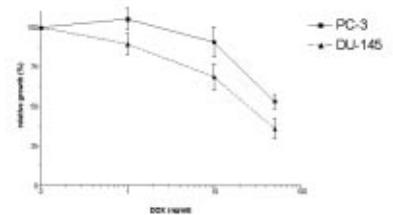


Figura 2. Respuesta de las distintas líneas celulares al tratamiento con Doxorubicina.

Informe Preliminar. Proyecto

“Expresión de no sintasas en cáncer de mama”

Dra. Victoria Casado Echarren.

Laboratorio de Investigación Cardiovascular y Servicio de Oncología Médica. Fundación Jiménez Díaz. Madrid



Durante estos meses se ha procedido a la recolección de muestras tumorales y de sangre periférica SP (precirugía y postcirugía) de 8 pacientes postmenopáusicas con carcinoma de mama, de las 10 previstas. Una paciente fue perdida tras la toma de muestra de sangre periférica inicial y otra de ellas, inicialmente seleccionada ante la sospecha de padecer enfermedad tumoral, fue posteriormente excluida del estudio ya que se trataba de patología benigna.

De igual forma, se ha recogido SP de 7 pacientes postmenopáusicas sanas que sirven como controles. Continúa el reclutamiento de pacientes (3 pacientes restantes con diagnóstico de carcinoma de mama) y la recolección de muestras. Por otro lado, se ha iniciado el procesamiento de las muestras y la medición de los factores moleculares a través de Western-blot. Las características clínico-patológicas de las pacientes son: edad comprendida entre 56 y 79 años, el tipo histológico corresponde a carcinoma ductal infiltrante en todos los casos excepto uno de ellos que se trataba de un carcinoma lobulillar infiltrante. En el estudio inmunohistoquímico se ha encontrado expresión de receptores estrogénicos en todos los tumores, en 4 de las muestras tumorales existía un bajo grado de diferenciación tumoral y en las 4 restantes eran tumores moderadamente diferenciados. Respecto a la cirugía, se ha practicado cirugía conservadora en todos los casos excepto en 2 en los que se ha practicado mastectomía.

En los próximos meses completaremos la inclusión de pacientes, la obtención de muestras y dispondremos de resultados acerca de la expresión de iNOS en SP y tejido tumoral.

Informe Preliminar Beca SEOM 2001

Implicaciones pronósticas del DNA tumoral en pacientes con carcinoma pulmonar

Dr. Martí Ciriquián

Servicio de Oncología Médica. Hospital General. Alicante



Hipótesis de trabajo

La primera demostración científica de la presencia de DNA tumoral circulante en la sangre de pacientes oncológicos fue publicada en 1977. La presencia de DNA tumoral en suero es de extrema importancia en la clínica oncológica para detectar diversas alteraciones genéticas que pueden desarrollarse a lo largo de la evolución del tumor.

En sangre periférica se ha aislado el DNA tumoral en pacientes con carcinoma pulmonar. Pensamos que en líquido pleural de pacientes con derrame pleural por carcinoma pulmonar también puede aislarse dicho DNA tumoral. Por ello, y en base a lo anteriormente expuesto, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo.

¿QUÉ IMPLICACIONES PRONÓSTICAS TIENE EL DNA TUMORAL AISLADO EN SANGRE PERIFÉRICA Y LÍQUIDO PLEURAL EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR?

Objetivos:

Nos planteamos los siguientes objetivos: Obtener DNA tumoral en sangre periférica y líquido pleural de pacientes con carcinoma pulmonar.

Demostrar que dichos valores (sanguí-

neos y de líquido pleural) obtenidos en pacientes oncológicos, son distintos de los pacientes sin enfermedad neoplásica (grupo control).

Valorar la sensibilidad y especificidad del DNA tumoral según los diversos tipos histológicos tumorales y la estadiación de la enfermedad.

Análisis de supervivencia de los pacientes según los valores establecidos, buscando un punto de corte con valor pronóstico.

Puesta en marcha del proyecto

MATERIAL DISPONIBLE:

Para la puesta en marcha y desarrollo del proyecto de investigación se cuenta con un termociclador, una microcentrífuga, un vortex, un juego de micropipetas, un agitador de placas y/o geles, una centrífuga tubos de 15 ml, baño con recirculación de agua.

A cargo de la beca SEOM se ha adquirido un Kit de extracción de DNA para 250 muestras de QIAGEN.

SUJETOS DE ESTUDIO:

Se ha definido la población incluyente en este estudio prospectivo observacional de la siguiente forma:

2 grupos de estudio, definidos como sigue:

Pacientes afectos de neoplasia pulmonar primaria (grupo A o experimental); Pacientes afectos por patologías no neoplásicas (Grupo B o control).

Los requisitos de inclusión en el estudio son:

Presentar derrame pleural abordable para la extracción de una muestra de líquido.

El grupo A (grupo a estudio) debe tener diagnóstico histológico o citológico de carcinoma de pulmón.

Variables: sexo, edad, fecha cirugía, TNM (clasificación internacional del tumor tras análisis patológico definitivo), diagnóstico anatomo patológico, tamaño tumoral (diámetro máximo del tumor resecado), localización tumoral (lóbulo pulmonar afecto/afectos), afectación pleural (visceral y/o parietal), DNA (sangre y líquido pleural), tratamientos adyuvantes (quimioterapia y/o radioterapia), recidiva tumoral (localización y fecha), reestadiación tumoral, fecha exitus, causa del exitus. Todas estas variables vienen especificadas en un protocolo denominado "protocolo líquido pleural", donde se recogen los datos del paciente y los valores de los marcadores tumorales, y un segundo protocolo denominado "protocolo de

seguimiento”, donde se lleva a cabo el seguimiento del paciente según fechas establecidas.

Labor desarrollada

A fecha del informe había incluidos 41 pacientes, 29 en el grupo de control y 12 en el grupo de investigación. En todos los casos se ha extraído muestras de líquido pleural y se ha realizado extracción de sangre para la obtención de suero. La distribución de los pacientes en los grupos de estudio es la siguiente: 29 pacientes presentan derrame pleural asociado a patología neoplásica (grupo B o control) y 12 pacientes presentan derrame pleural asociado a neoplasia broncopulmonar (grupo A o experimental).

Los pacientes incluidos proceden en su mayor parte del Servicio de Cirugía Torácica; el resto de pacientes proceden del Servicio de Neumología, manteniéndose estrecho contacto con ambos servicios ya que algunos de sus miembros forman parte del equipo de investigación del proyecto.

Recogida: A todos los pacientes se les realiza tomas sanguíneas y de líquido pleural. Las muestras de líquido pleural se recogen mediante toracocentesis y/o toracoscopias realizadas por el Servicio de Neumología. La muestra es repartida en tubos de ensayo, y remitida a la Unidad de Investigación de nuestro hospital para su procesamiento.

Procesamiento de las muestras: Hasta la fecha las mayores dificultades con las que nos hemos encontrado hacen referencia a este punto.

El procesamiento y técnica de determinación de DNA en suero de sangre periférica ha sido previamente desarrolladas por otros investigadores y difundida a la comunidad científica. Por el contrario no existe experiencia documentada sobre la manipulación de las muestras de líquido pleural para la determinación de dicho material. Por ello se han empujado las técnicas habituales en el proce-

samiento del suero de los pacientes incluidos en el estudio; mientras que las muestras de líquido pleural se han procesado de dos formas diferentes para poderlas comparar y evaluar la técnica más adecuada para cumplir los objetivos de detección de material génico.

Los tubos de ensayo con muestras de suero son centrifugadas a una velocidad de 3.000 rpm durante 10 minutos para la obtención de suero guardándose a -20°C hasta su procesamiento. Una alícuota de la muestra de líquido pleural de cada paciente se centrifuga de la misma forma que la sangre, mientras que otra no se centrifuga guardándose igualmente a -20°C hasta su procesamiento.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA

En los 41 pacientes incluidos hasta la fecha se ha realizado la extracción del DNA circulante a partir del suero mediante sistemas de columnas. Cuantificación del DNA extraído mediante un kit de cuantificación de DNA, Dipstick Invitrogen y visualización del DNA en ultravioleta por medio de geles de agarosa mediante tinción con bromuro de etidio.

En esos mismos 41 pacientes se ha realizado la cuantificación de DNA de las dos muestras de líquido pleural (la centrifugada y la no centrifugada) siguiendo la técnica descrita para el suero.

En su conjunto se han realizado una cantidad total de 150 extracciones de DNA y unas 200 cuantificaciones de DNA de suero y líquido pleural.

Resultados obtenidos: la concentración de DNA determinada en ng/ml para las muestras de suero es congruente con los datos esperados. Sin embargo los resultados obtenidos a partir de las muestras de líquido pleural han mostrado una saturación en la concentración de DNA tanto en las muestras centrifugadas como en las no centrifugadas, esto nos ha hecho plantear la necesidad de un procesamiento diferente para dichas muestras.

Por ello hemos modificado las condiciones de centrifugación de las muestras de líquido pleural eliminando así las células y extrayendo DNA que queda libre en el sobrenadante. Los resultados obtenidos tras esta modificación son congruentes con los datos esperados y vienen a ser del mismo orden que el suero en los 9 pacientes del grupo control o B testado. También hemos desechado del grupo control o B los 13 pacientes con procesos inflamatorios o infecciones (empiema y/o derrame tuberculoso) con alta concentración de células y por tanto de DNA, que en la determinación y cuantificación de DNA saturaban el sistema de detección y que aunque no tienen enfermedad neoplásica hemos observado que no son buenos candidatos para pertenecer a este grupo de control.

Por ello a fecha de julio de 2002 la distribución de los pacientes en los grupos de estudios es la siguiente: 16 pacientes presentan derrame pleural asociado a patología neoplásica (grupo B o control) y 12 pacientes presentan derrame pleural asociado a neoplasia broncopulmonar (grupo A o experimental).

Pasos siguientes

Continuar la inclusión de pacientes tanto en grupo control como en grupo de estudio para cumplir los objetivos 1 y 2. Para cumplir el objetivo 3 hemos escogido un papel de alteraciones moleculares que muestran una frecuencia de mutación desde un 30 hasta un 50% según citan diversos estudios realizados en pacientes con carcinoma pulmonar (pérdida del brazo corto del cromosoma 3, mutaciones en los genes XPD, XRCC1, XRCC3, p53). Estas alteraciones algunas se testarán por medio de la técnica PCR-RFLP con su posterior visualización en geles de agarosa y otras por secuenciación de los exones donde están localizadas las mutaciones en un ABI PRISM 310.

Informe Preliminar Beca SEOM 2001

Vías de inactivación del gen BRCA1 en cáncer de colon e interacciones con otros genes y moléculas de señalización



Dra. Celia Miralles

Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid

El proyecto "Vías de inactivación del gen BRCA1 en cáncer de colon e interacciones con otros genes y moléculas de señalización" está siendo llevado a cabo en el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Puerta de Hierro, con financiación de la Fundación Banco Santander Central Hispano para el periodo 2002-2004, y para el mismo se cuenta con la Dra. Celia Miralles, exresidente de Oncología Médica de nuestro Servicio, como becaria asignada al mismo mediante una beca de la SEOM para el año 2002. Durante los 6 primeros meses de ejecución de este Proyecto, siguiendo el plan de trabajo previsto a 3 años en la Memoria del mismo, se ha

realizado el siguiente trabajo:

Se han revisado por parte del patólogo miembro del equipo, Dr. R. Rodríguez Merlo, 80 de los casos acumulados desde 1996, tejido tumoral y normal, para comprobar sus condiciones de viabilidad previo a la extracción de ácidos nucleicos.

La becaria, Dra. Miralles, junto con JM. García Ruiz biólogo miembro del equipo, han extraído ADN y ARN de los tejidos de 60 de los casos ya revisados, y del plasma (ADN) de otras 50 muestras de sangre de estos pacientes. Los mismos miembros, han puesto a punto, para comenzar el chequeo de las pérdidas alélicas en los ADN tumorales,

las condiciones de los oligos de la región BCRA1 y de PTEN (tres oligos por región).

A nivel de reclutamiento y selección de nuevos casos de cáncer de colon, se han conseguido, de 10 nuevos casos de cáncer de colon, muestras de sangre, de mucosa colónica normal y de tejido tumoral, así como la incorporación de sus parámetros clínico-patológicos a nuestra base de datos.

Consideramos que en esta primera fase del Proyecto no se han presentado problemas o limitaciones importantes en el plan elaborado, y que su ejecución ha sido acorde con el planteamiento teórico de la misma.

en la SEOM trabajamos por la oncología



- ayudas a la investigación
- publicaciones
- convocatoria de premios, congresos y cursos
- servicios web



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA

Conde de Aranda nº 20, 5ª Dcha.

28001 Madrid.

Tel.: 91 577 52 81 • Fax: 91 436 12 59

e-Mail: seom@seom.org

<http://www.seom.org>