

# premios y becas



Informe Proyecto enero 2003

## Expresión de NO sintasas en carcinoma de mama

Dra. Victoria Casado Echarren

Laboratorio de Investigación Cardiovascular y Servicio de Oncología Médica. Fundación Jiménez Díaz. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.



Nuestro estudio tiene como objetivo la determinación de las diferentes isoformas de las enzimas que sintetizan óxido nítrico (NO sintasas) y otros factores moleculares, en pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama. Algunos estudios sugieren que el NO puede tener un papel en el proceso tumoral y como hemos expuesto en informes previos.

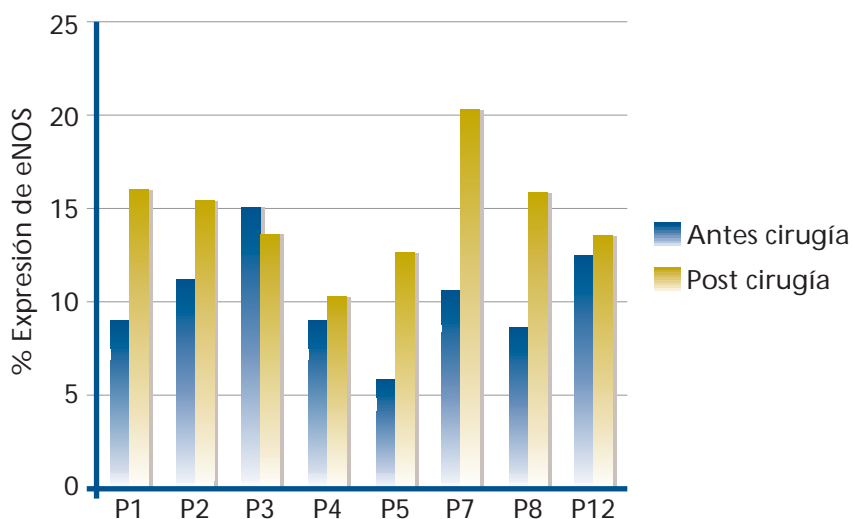
Durante estos meses se ha procedido a la recolección de 15 muestras de biopsias de tumor y de sangre periférica (SP), de pacientes postmenopáusicas con carcinoma de mama antes (SP1) y después de la cirugía (SP2). De las 15 pacientes seleccionadas inicialmente, una de ellas se desestimó al tratarse de patología benigna, y por otro lado, 4 de ellas se perdieron en el seguimiento por lo que no se pudo obtener SP2. De igual forma, se está procediendo al reclutamiento de controles para la obtención de muestras de SP y su posterior comparación con las muestras de pacientes.

Se obtuvieron lisados de monocitos y linfocitos de las sangres periféricas pre y postcirugía (SP1 y SP2) de 8 pacientes inicialmente, precediéndose posterior-

mente a la medición de NO sintasa endotelial (eNOS) y de los dos principales receptores del vascular endothelial growth factor (VEGFR): flt-1

(VEGFR1) y flk-1 (VEGFR2). Los resultados de eNOS en SP se muestran en la gráfica siguiente:

Se observa que existe aumento de la



expresión de eNOS en SP2 con respecto a la expresión en SP1 en 6 de las 8 pacientes/Se encuentran en fase de análisis los j resultados obtenidos mediante Westem-blot de la expresión de flt-1 y flk-1.

En el momento de redactar este informe hemos realizado igualmente la determinación de los niveles de VEGF en el plasma (P) de 5 pacientes, cuyos resultados se muestran en la tabla siguiente.

Pg/ml	P7	P8	P9	P12	P13
SP1	39,556	91,778	18,444	122,889	424
SP2	138,444	120,667	4	134	155,111

Observamos como el valor de VEGF en plasma post-cirugía (P2) aumenta respecto al mismo en Pl. No obstante estos datos tienen un valor relativo dado el escaso número de muestras, por

lo que continuamos el reclutamiento de pacientes y el análisis de las muestras. Las muestras de biopsias tumorales fueron procesadas mediante lisis y se determinó la NO sintasa endotelial

(eNOS) mediante técnica de Western-blot, estando pendientes de análisis estos resultados.

Finalmente se está desarrollando una base de datos con el objeto de recoger parámetros pronósticos clínico-patológicos de estas pacientes y correlacionarlos con los resultados de factores moleculares.

## Memoria Final del Proyecto 2002

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

Dr. Félix Bonilla

Servicio de Oncología Médica. Investigador principal

La ejecución del Proyecto desde la fecha del último informe, Junio de 2002, ha seguido desarrollándose con arreglo al plan de trabajo previsto en su Memoria para el primer año. La incorporación de la becaria, ha permitido optimizar el trabajo de extracción y purificación de ácidos nucleicos, incrementando de forma significativa la disponibilidad de este material imprescindible para el estudio.

1- Selección e incorporación de nuevos casos elegibles al estudio, aportando tejido tumoral, normal y sangre periférica, así como sus datos clínicos por cada caso, 18 desde Enero 2002.

2- Extracción de ácidos nucleicos (ADN,ARN) de tumor, tejido normal, linfocitos y plasma, de 85 casos de

nuestro banco desde Enero 2002. Igualmente se han procesado los 18 casos de nueva incorporación.

3- Estudio de pérdidas alélicas en las regiones 17q21 (BRCA1) y 10q23 (PTEN) usando 3 marcadores de tipo microsatélite. Este se ha realizado en 45 casos, para las dos regiones, con una media de 32% y 26% para cada región respectivamente.

4- Se ha iniciado el estudio de alteraciones en el gen ZBRK1, factor de transcripción que presenta dominios de unión y se piensa que esta razón justifica la presencia de complejos BRCA1-ZBRK1. Se han analizado hasta la fecha 22 casos para pérdidas de material cromosómico con 2 marcadores microsatélite, y se han detectado un 19% de pérdidas alélicas. También se ha iniciado el despista) e de mutaciones

con la realización de SSCP del fragmento donde se encuentra el gen, sin resultados valorables por el escaso número de casos estudiados.

5- Se están probando las diferentes condiciones para iniciar el estudio de expresión postranscripcional del gen BRCA1, mediante cuantificación a tiempo real. No tenemos datos concluyentes de este punto en la actualidad.

6- La valoración del estado de activación de Akt se iniciará una vez que tengamos datos ajustados sobre el estado de expresión de BRCA1.

En resumen, durante los primeros 10 meses de desarrollo de este Proyecto creemos que existen datos suficientes que justifican su continuación, ya que estos demuestran un paralelismo con la hipótesis de trabajo en la que se basaba el mismo.

Informe Final Beca SEOM 2001

# Valor pronóstico del DNA sérico y en líquido pleural en pacientes con carcinoma pulmonar

Dr. Juan Luis Martí Ciriquián

Investigador principal. Servicio de Oncología Médica. Hospital General. Alicante



De los objetivos que nos planteamos hemos alcanzado los siguientes:

1. - *Obtener DNA tumoral en sangre periférica y líquido pleural de pacientes con carcinoma pulmonar.* A fecha de noviembre de 2002 de los 77 pacientes han sido incluidos inicialmente en el protocolo de nuestro estudio. En todos los casos se ha extraído muestras de líquido pleural y se ha realizado extracción de sangre para la obtención de suero. Las muestras de líquido pleural se recogen mediante toracocentesis y/o toracoscopias realizadas por el Servicio de Neumología. 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 empleado las técnicas habituales en el procesamiento 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.- 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 mostrando una saturación en la concentración de DNA tanto en las muestras centrifugadas como en las no centrifugadas nos han hecho replantearnos 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 el 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. 2.- *Comparar dichos valores (sanguíneos y de líquido pleural) obtenidos en pacientes oncológicos, con los pacientes sin enfermedad neoplásica (grupo control).* La distribución de los 77 pacientes incluidos en el estudio en los grupos de estudio es la siguiente: 60 pacientes presentan derrame pleural asociado a patología no neoplásica (grupo B o control) y 17 pacientes presentan derrame pleural asociado a neoplasia broncopulmonar (grupo A o experimental). Por las razones explicadas en el punto anterior hemos desechado del grupo control o B los 42 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 control. Por ello a fecha de octubre de 2002 la distribución de los pacientes en los grupos de estudio es la siguiente: 18 pacientes presentan derrame pleural asociado a patología no neoplásica (grupo B o control) y 17 pacientes presentan derrame pleural asociado a neoplasia broncopulmonar (grupo A o experimental). Consideramos que no tenemos suficientes pacientes incluidos en el estudio actualmente para comparar estadísticamente los valores sanguíneos y de líquido pleural del grupo control con el grupo de estudio.

La concentración de DNA la hemos medido con un método colorimétrico, DNA dipstick de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Consideramos que es un método válido para determinar diferencias de concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 ng/ul. Pero no somos capaces de calcular la concentración de DNA cuando se satura la tira colorimétrica medidora aunque realicemos diluciones. Por ello hemos decidido aplicar otra metodología más sensible puesta a punto en el laboratorio del Dr Rosell en el Hospital Germa Trias i Pujol de Badalona basada en cuantificación de DNA por Real-Time PCR (PCR cuantitativa en tiempo real).