

**Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer –  
Línea de Mecanismos Moleculares en el Desarrollo y Progresión del Cáncer**

**ACTA**

**III Reunión de Genética y Epigenética del Cáncer  
27 de Noviembre 2008 (Madrid)**

**Participantes**

En el grupo de Epigenética y Genética del cáncer participan más de 100 investigadores pertenecientes a 12 Grupos de investigación y 8 Hospitales

A la reunión asistieron miembros de 11 de los grupos que componen la sub-línea de investigación.

**Asistentes**

***Nombre***

Conxi Lazaro  
Xabi Aguirre  
Rubén Pío Osés  
José Ignacio Mayordomo  
Berta Saez Gutierrez  
Montse Sanchez-Cespedes  
Juan Torres-Lanzas  
  
Susana Nieto Cerón  
  
África García-Orad  
Anna González-Neira  
Rosa Miró  
M<sup>a</sup> Rosa Caballín  
Núria Sala  
Mirentxu Santos  
Carmen Segrelles  
Jesús M Paramio  
Ramón García Escudero

***Centro***

Institut Català d'Oncologia  
CIMA  
CIMA  
Hospital Clínico U. Zaragoza  
Hospital Clínico U. Zaragoza  
IDIBELL  
Hospital "Virgen de la Arrixaca"  
Murcia  
Hospital "Virgen de la  
Arrixaca" Murcia  
Univ. Pais Vasco  
CNIO  
Univ. Autónoma Barcelona  
Univ. Autónoma Barcelona  
Institut Català d'Oncologia  
CIEMAT  
CIEMAT  
CIEMAT  
CIEMAT

**Objetivo**

El objetivo de esta tercera reunión ha sido el análisis de los proyectos abiertos de cada grupo de investigación con la finalidad de buscar líneas comunes de estudio en los que se aborde un problema desde distintos ángulos, compartiendo tecnología, infraestructura, muestras y capital humano.

Conclusiones:

La próxima reunión será en junio en Barcelona, organizada por uno de los grupos de Barcelona que decidirá el lugar y programa. En esa reunión:

Se presentarán:

- 1- Los proyectos en curso de colaboración entre diferentes grupos de la red y
- 2- Propuestas de proyectos abiertas para colaboración

Presentaciones:

**10:00**            **Conxi Lazaro “Terapia antisentido en Neurofibromatosis 1 producida por mutaciones intrónicas”**,  
ICO, Barcelona

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disorder affecting 1:3500 individuals. Disease expression is highly variable and complications are diverse. However, currently there is no specific treatment for the disease. NF1 is caused by mutations in the *NF1* gene, approximately 2.1% of constitutional mutations identified in our population are deep intronic mutations producing the insertion of a cryptic exon into the mature mRNA. We used antisense morpholino oligomers (AMOs) to restore normal splicing in primary fibroblast and lymphocyte cell lines derived from six NF1 patients bearing three deep intronic mutations in the *NF1* gene (c.288+2025T>G, c.5749+332A>G and c.7908-321C>G).

AMOs were designed to target the newly created 5' splice sites in order to prevent the incorporation of cryptic exons. Our results demonstrate that AMO treatment effectively restored normal *NF1* splicing at the mRNA level for the three mutations studied in the different cell lines analyzed. We also found that AMOs had a rapid effect that lasted for several days, acting in a sequence-specific manner and interfering with the splicing mechanism. Finally, to test whether the correction of aberrant *NF1* splicing also restored neurofibromin function to wild-type levels, we measured the amount of Ras-GTP after AMO treatment in primary fibroblasts.

The results clearly show an AMO-dependent decrease in Ras-GTP levels, which is consistent with the restoration of neurofibromin function. To our knowledge this is the first time that an antisense technique has been used successfully to correct *NF1* mutations opening the possibility of a therapeutic strategy for this type of mutation not only for NF1 but for other genetic disorders.

**10:30**            **Rubén Pío Osés “Proteínas de unión a RNA en cáncer de pulmón”**,  
CIMA, Pamplona

El Dr. Rubén Pío presentó uno de los principales proyectos de investigación del laboratorio de Biomarcadores del Área de Oncología del CIMA de la Universidad de Navarra. Este laboratorio, codirigido por el Dr. Montuenga y el Dr. Pío, está centrado en la caracterización molecular del carcinoma pulmonar para la identificación de nuevos biomarcadores. Con este objetivo, nuestro grupo está estudiando las alteraciones en el metabolismo del RNA asociadas al proceso de carcinogénesis pulmonar. Las alteraciones en la maquinaria de procesamiento del RNA han sido frecuentemente asociadas con varias enfermedades, incluido el cáncer. En los últimos años, nuestro grupo ha estudiado la relevancia de proteínas unidoras del RNA, como hnRNP A1, ASF/SF2 y PCBP4, en la biología del cáncer de pulmón. Nuestros resultados indican que estas proteínas están anormalmente expresadas en tejido tumoral de pulmón, si lo comparamos con tejido pulmonar sano. Estos resultados sugieren que los tumores desarrollan un perfil específico de proteínas de unión al RNA que afecta a la regulación de genes clave en el desarrollo tumoral. Actualmente, nuestro grupo está investigando el papel del balance entre las proteínas hnRNP A1 y SF2/ASF en el control de la proliferación y la apoptosis en cáncer de pulmón. Estos dos factores son reguladores clave del splicing alternativo, afectando también a la estabilidad del RNA y al control de la traducción. La inhibición del mRNA de SF2/ASF mediante siRNA inhibe el crecimiento tumoral in vitro de una manera dosis dependiente,

mientras que la inhibición del mRNA de hnRNP A1 tiene un efecto inverso. En este momento estamos estudiando los posibles mecanismos implicados en este proceso. Por otro lado, estudios funcionales con la proteína PCBP4 sugieren que ésta se comporta como un gen supresor tumoral, debido a que su ausencia en tumores humanos se asocia con una alta capacidad proliferativa. Este hecho se refuerza con experimentos in vitro y modelos animales en los cuales la sobreexpresión de PCBP4 induce una inhibición del crecimiento tumoral. Finalmente, nuestro grupo, en colaboración con la compañía de biotecnología Oryzon Genomics y la Escuela de Ingenieros de la Universidad de Navarra, ha diseñado y desarrollado un array de splicing para la identificación de nuevas formas de splicing asociadas al cáncer de pulmón. Este array se ha evaluado en una serie de pacientes con cáncer de pulmón y en la actualidad estamos llevando a cabo la validación de los resultados. Posteriormente, se evaluará la relevancia funcional de las nuevas isoformas encontradas, así como su potencial uso como biomarcadores o dianas terapéuticas en cáncer de pulmón

**11:00**            **M<sup>a</sup> Rosa Caballín “Estudio de susceptibilidad a LLA mediante el análisis de CNV y SNPs”,**  
Univ Autónoma Barcelona

El objetivo general es realizar un estudio de susceptibilidad genética a la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica analizando todo el genoma (GWAS) con arrays de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) y Copy Number Variants (CNVs).

Los objetivos específicos son: 1. Realizar un genotipado de SNPs y CNVs en niños con LLA y en sus padres mediante microarrays.

2. Identificar los alelos de SNPs y CNVs que confieren susceptibilidad a la LLA pediátrica.

3. Confirmar y cuantificar el número de copias de los CNVs que se hayan detectado con una alta asociación a la LLA pediátrica, mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

4. Analizar las funciones de los genes con SNPs o CNVs asociados a LLA pediátrica mediante herramientas bioinformáticas e intentar establecer vínculos entre la LLA y determinadas rutas bioquímicas, para aumentar el conocimiento acerca de la biología y la etiología de la LLA pediátrica.

El estudio de asociación genética GWAS a LLA pediátrica se realizará con XXX tríos (niño afecto y los dos progenitores) con un análisis estadístico TDT. Se recogerán muestras de sangre de XXX pacientes pediátricos diagnosticados de LLA y de sus padres, provenientes de los siguientes hospitales: Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona, Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, Hospital Infantil Niño Jesús de Madrid, Hospital La Fe de Valencia, Hospital Miguel Servet de Zaragoza, Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia y el Hospital General de Alicante ...

Se les solicitará que rellenen un cuestionario epidemiológico y se realizará el genotipado de las muestras de los pacientes y los controles utilizando los arrays HumanCNV370-Duo DNA Analysis BeadChip de Illumina que contienen más de 318.000 marcadores tagSNPs y 52.000 marcadores de CNVs. Seguidamente se harán los análisis de asociación con softwares especializados y se interpretarán biológicamente los datos obtenidos

**11:15**            **Café**

**12:00**            **Berta Sáez Gutierrez “Identificación de mutaciones BRCA1 en pacientes con carcinoma de mama triple negativo”**  
Hospital Clínico Universitario, Zaragoza

**OBJETIVOS:** Determinar la prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en pacientes diagnosticadas antes de los 50 años de cáncer de mama triple negativo. Como objetivos secundarios: se comparará la frecuencia de mutaciones encontradas con la esperada, se identificará los casos de cáncer de mama que corresponden al subtipo epitelial basal y su asociación con mutación en BRCA1 y se determinará la expresión por inmunohistoquímica de

la proteína BRCA1.

**METODOLOGIA:** El estudio de mutaciones germinales en BRCA1 se realizará mediante DHPLC, secuenciación y MLPA. Se realizará una revisión centralizada del estudio anatomopatológico que se completará con el estudio de inmunohistoquímica de los marcadores: receptor de estrógeno, receptor de progesterona, Her-2, P53, Ki-67, bcl-2, e-cadherina, timidilato sintetasa, vimentina, citoqueratinas 5 y 6, factor de crecimiento epidérmico y BRCA1.

La prevalencia esperada de portadoras de mutaciones germinales en BRCA1 se estimará mediante las tablas de prevalencia de Myriad genetics laboratories. La comparación de la prevalencia observada y la esperada se realizará mediante el test de Poisson.

Se realizará un análisis multivariante de regresión de Poisson teniendo en cuenta las siguientes variables: historia familiar de alto riesgo de cáncer de mama y/o ovario hereditario, subtipo epitelial basal y expresión inmunohistoquímica de BRCA1.

**12:30 M<sup>a</sup> Rosa Caballín “Evaluación del daño cromosómico radioinducido en mujeres heterocigotas para BRCA1”**  
Univ Autónoma Barcelona

Double strand breaks (DSB) are critical lesions involved in the formation of chromosomal aberrations. In response to DNA damage, the cell has mechanisms of repair and cell-cycle control to maintain the genome integrity in which *BRCA1* gene is implicated. In the present study an evaluation of the radio-induced damage in G2 phase of the cell cycle in lymphocytes from BRCA1 heterozygotes is presented. For this purpose Calyculin-A-based premature chromosome condensation (PCC) combined with mitotic arrest has been applied to examine

with conventional cytogenetics the damage in G2 and M phase cells, and to evaluate the G2-to-M phase transition. Irradiated peripheral blood lymphocytes from seven heterozygote females (BRCA1+/-) and seven control females (BRCA1+/+) have been analyzed. The mean proportion of G2 cells in BRCA1+/- was significantly higher than in BRCA1+/+, indicating a higher G2 delay after IR exposure in cells from BRCA1+/- females. On the other hand, whereas the mean frequency of chromatid breaks (chtb) in G2 cells was not statistically different between both groups, the mean frequency of chtb in M cells of the BRCA1+/- group was significantly higher than in the BRCA1+/+ one. Moreover, the mean proportion of M cells with aberrations was significantly higher in BRCA1+/- than in BRCA1+/+ suggesting that in spite of the higher G2 delay of BRCA1+/- more damaged cells are able to pass the G2-to-M transition.

**13:00 Felipe Prósper y Xabi Aguirre “miRNAs en Leucemia linfoblástica aguda”**  
CIMA, Pamplona

Los miRNAs, conforman una familia de RNAs no codificantes de pequeño tamaño que regulan negativamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional y cuya regulación no se conoce. Nuestro grupo ha demostrado que la hipermetilación del promotor de múltiples genes participa en la patogenia de la Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL). En este trabajo hemos estudiado el papel que la expresión y regulación epigenéticas de miRNAs podría jugar en la LAL. **MÉTODOS Y RESULTADOS:** mediante ChIP-on-CHIP y CHIP-cuantitativo, observamos un aumento de marcas de Histona-3 de cromatina cerrada (2mK9H3, 3mK9H3, 3mK27H3) y disminución de marcas abiertas (3mK4H3, AcH3) en los tres miembros de la familia hsa-miR-124a (124a1, 124a2, 124a3) en líneas de LAL respecto a muestras de sangre periférica de donantes sanos. Asimismo, estudiamos la metilación de miR-124a1, 124a2 y 124a3 en líneas y 353 pacientes con LAL mediante Q-PCR específica de Metilación demostrando una hipermetilación de miR-124a1 (49%), 124a2 (46%) y 124a3 (42%), estando al menos uno de ellos metilado en el 59% de las LAL. La metilación de hsa-miR-124a se asoció con una disminución de su expresión ( $p < 0.001$ ), mayor recaída ( $p = 0.001$ ) y mortalidad ( $p < 0.001$ ), menor supervivencia libre de enfermedad ( $p < 0.001$ ) y supervivencia global ( $p = 0.007$ ) tanto en el análisis uni como multivariado, demostrando ser un factor pronóstico independiente. La reexpresión del hsa-miR-124a en líneas de LAL, disminuyó la proliferación celular y el

desarrollo xenogénico de leucemia en ratones BALB/cA-Rag2<sup>-/-</sup>gc<sup>-/-</sup>. A su vez hsa-miR-124a regula la expresión de CDK6 e indirectamente la fosforilación del Rb afectando a la proliferación de las células leucémicas. Los pacientes con hsa-miR-124a metilado presentaron una expresión significativamente mayor de CDK6 que los no metilados ( $p < 0.001$ ) y el tratamiento de las líneas tanto con butirato sódico como con el PD-0332991 (Pfizer), ambos inhibidores de CDK6, disminuyó la proliferación y aumentó la apoptosis de las células de LAL. En conclusión, nuestros resultados indican que la modificación de histonas y metilación del DNA contribuyen a la represión del hsa-miR-124a favoreciendo la proliferación celular dependiente de CDK6 y de Rb e identificando un nuevo mecanismo de regulación de miRNAs y una nueva estrategia terapéutica en la LAL.

**13:30**      **Susana Nieto Cerón Juan Torres Lanzas “Identificación de Células tumorales circulantes en sangre periférica en pacientes con cancer de pulmón”**  
Hospital “Virgen de la Arrixaca” Murcia

Se estima que la detección, cuantificación y caracterización de células tumorales en sangre circulante y médula ósea posee utilidad pronóstica en pacientes con cáncer. Aunque la presencia de células tumorales circulantes no supone necesariamente la aparición de metástasis, algunas de ellas podrían tener la capacidad para originar tumores lejos del primario, y por tanto, influir negativamente en el pronóstico del paciente.

Nos hemos planteado ensayar diversos métodos de aislamiento y detección de células tumorales circulantes (CTC) en sangre periférica para implantar su uso como nuevo marcador pronóstico en clínica. La conveniencia de la fácil extracción de la sangre periférica y su empleo establecido para la monitorización de marcadores tumorales para obtener valores indicativos de cáncer primario emergente o metastático, conforman la idoneidad de esta muestra.

Una vez identificada la presencia de CTC en sangre periférica, el estudio de su capacidad pronóstica debe ser continuado con el seguimiento de los pacientes, así como con el incremento del número de muestras analizadas.

#### **MATERIAL Y METODOS:**

36 varones y 3 mujeres, con edades comprendidas entre 45 y 81 años (edad media de 65 años) sometidos a resección quirúrgica.

A partir de dos muestras de sangre, extraídas de forma preoperatoria y posteriormente, al año de la cirugía, se obtiene la fracción de células mononucleadas pre y postoperatoria. Para ello hemos empleado tres kits proporcionados por Miltenyi Biotec, dirigidos a la identificación de CTC en muestras de sangre de pacientes con cáncer primario de pulmón: 1. Carcinoma Cell Detection Kit. Se aísla la fracción de células mononucleadas de la sangre mediante gradiente de Ficoll. Posteriormente se realiza la tinción inmunocitoquímica de las células tumorales con anticuerpos anti-citoqueratina (7/8/18/19); 2. Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit. Permite el enriquecimiento de las células tumorales mediante selección inmunomagnética de las células que expresan las citoqueratinas 7/8; 3. CD45 Microbeads. Se realiza una selección inmunomagnética de las células tumorales por depleción de las células que expresan el antígeno CD45.

La eficiencia de la recuperación de cada uno de ellos se ha comprobado mediante ensayos control en los que a sangre de pacientes no tumorales se ha añadido un número determinado de células tumorales en cultivo.

#### **RESULTADOS:**

Se han detectado células neoplásicas (células CK+) en sangre periférica de 19 pacientes (48,7%).

De los 39 pacientes, 4 habían sido previamente tratados por tumores malignos extrapulmonares (3 de ellos con células positivas).

Se ha detectado recidiva de la enfermedad en 8 pacientes durante el primer año, 5 con células tumorales en sangre. Ver tabla.

## CONCLUSIONES

Debemos destacar que se trata de valores provisionales, pendientes de evaluación final, hallándose una distribución similar por estadios y tipos histológicos, con detección de células CK+ en el 48,7% de los pacientes.

Hemos detectado variabilidad de resultados según la metodología empleada en el aislamiento de las células neoplásicas. Tras conseguir una metodología adecuada para la detección de las células neoplásicas (aislamiento e identificación), y disponer de una muestra suficiente de pacientes con un seguimiento mínimo de un año, podremos determinar su implicación pronóstica.

En la actualidad, se han publicado estudios sobre carcinoma colorrectal, mama y estadios avanzados de CP. Los hallazgos, por el momento, son contradictorios, probablemente debido en parte a problemas metodológicos.

Características del paciente	Pacientes con células citokeratina +	Pacientes sin células citokeratina +
Edad < ó = 65 años > 65 años	9 / 20 10 / 19	11 / 20 9 / 19
Tipo histológico Adenocarcinoma C. epidermoide C. indiferenciado células grandes C.bronquioloalveolar Adenoescamoso	4 / 9 6 / 12 5 / 10 3 / 7 1 / 1	5 / 9 6 / 12 5 / 10 4 / 7 0 / 1
Estadio I II III IV	12 / 23 2 / 4 3 / 5 2 / 4	11 / 23 2 / 4 2 / 5 2 / 4

14:00 Comida (Sala Edificio 1)

15:30 **Montse Sánchez-Céspedes “LKB1 y BRG1: análisis de dos genes supresores tumorales localizados en el cromosoma 19”**  
IDIBELL, Bellvitge

El estudio de los perfiles de pérdidas de heterocigosidad (LOH, del inglés loss of heterozygosity) ha proporcionado indicadores de la presencia de genes supresores tumorales. En el caso concreto del cáncer de pulmón, existen varias regiones de LOH que contienen genes supresores tumorales bien conocidos, es el caso de los cromosomas 17p y 9p donde se localizan los genes *TP53* y *P16*, respectivamente. Otra región frecuentemente delecionada en cáncer de pulmón es el cromosoma 19p. Uno de los genes supresores tumorales en esta región es *LKB1*, identificado por nuestro grupo como el gen diana de la elevada frecuencia de deleciones en el 19p. *LKB1* está inactivado en aproximadamente un tercio de los tumores

pulmonares de células no pequeña. Las mutaciones son homocigotas y somáticas, y, muy frecuentemente, dan lugar a la ausencia total de proteína LKB1. *LKB1* codifica para una proteína con actividad serina-treonina quinasa y uno de sus principales sustratos es la proteína quinasa dependiente de AMP, AMPK. En células tumorales sin LKB1, AMPK no se activa adecuadamente, ni se inactiva su diana corriente-abajo, mTOR. La reintroducción de LKB1 en células deficientes restaura estas habilidades, mientras que la depleción de LKB1 en células con LKB1-wild type, elimina dichas habilidades. Aunque es incuestionable que *LKB1* es una diana de la elevada frecuencia de deleciones en el cromosoma 19p, cerca del ochenta por ciento de los tumores pulmonares tiene LOH en esta región, mientras que el 30-50% de los tumores de pulmón presentan inactivación de *LKB1*, lo que sugiere la presencia de otro gen supresor en esta región. Varias razones nos hicieron pensar que *BRG1*, que codifica para la ATPasa principal del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, podría ser otro gen supresor diana en esa región. Nuestro grupo secuenció 60 líneas celulares de los principales tipos de cáncer de pulmón observando que, de forma similar a *LKB1*, *BRG1* estaba inactivado por mutaciones en su zona codificante en un 30% de los tumores de pulmón de célula no pequeña. Dichas mutaciones eran homocigóticas y somáticas y coexistían con mutaciones en varios de los genes supresores y oncogenes conocidos, pero no con la amplificación en los oncogenes de la familia MYC. Así pues, nuestros resultados muestran la importancia de los genes *LKB1* y *BRG1* en el desarrollo del cáncer de pulmón y ejemplifican como la deleción del cromosoma 19p, tiene como diana dos genes supresores tumorales.

**16:00**      **Carmen Segrelles “Genómica Funcional de alteraciones oncogénicas en células madre epidérmicas”**

CIEMAT, Madrid

Carmen Segrelles, Corina Lorz, Ramón García-Escudero, Ana B. Martínez-Cruz, Mirentxu Santos, Jesús M. Paramio

En los últimos años se han aislado poblaciones celulares capaces de proliferar y recapitular tumores completos con las mismas características que los tumores primarios. Estas “células madre cancerosas” comparten una serie de características con las células madre adultas, como su longevidad y su capacidad de autoperpetuarse y proliferar dando lugar a una progenie diferenciada. Además, muchas de las vías implicadas en la homeostasis de las células madre adultas, como es el caso de PTEN/PI3K/Akt, se encuentran mutadas en cánceres humanos, en los que la activación de Akt es un indicador de mala prognosis.

Hemos desarrollado animales transgénicos que expresan una forma permanentemente activa de Akt1 (myrAkt) bajo el promotor de la citoqueratina 5, que dirige la actividad del transgén a las células de la capa basal de la epidermis, incluidas las células madre foliculares. Estos animales presentan en su epidermis hiperplasia, lesiones tumorales espontáneas, alopecia, alteraciones en el ciclo del pelo y en el desarrollo de derivados ectodérmicos, así como alteraciones en la homeostasis de las células madre. Estas alteraciones se caracterizan por una expansión en la población de células madre foliculares (CD34+/Itgα6+). El análisis de perfiles de expresión de células CD34 positivas y negativas procedentes de animales control y myrAkt ha confirmado la importancia de vías como Wnt y Hedgehog en el mantenimiento de la homeostasis de las células madre epidérmicas, así como la expresión de determinadas moléculas de adhesión y la represión específica del ciclo celular. En la actualidad estamos analizando cómo la activación permanente de Akt afecta al perfil de expresión característico de las células madre epidérmicas. El estudiar de las vías alteradas podría permitir desarrollar nuevas estrategias antitumorales, dirigidas específicamente a las células madre del tumor que no afecten a las células madre del tejido