

Tratamiento con olaparib en células de hemangioblastomas de un paciente con la enfermedad de von Hippel-Lindau que presenta también una mutación en el gen *CHEK2*: un ejemplo de medicina personalizada *in vitro*.

Clara Sarro Miguel^{1, 2, a}, Virginia Albiñana Díaz², Luisa María Botella Cubells², Lidia Ruiz Llorente¹

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB).

a. clara.sarro@edu.uah.es

Palabras clave: von Hippel-Lindau; hemangioblastoma; VHL; CHEK2; olaparib

Resumen

La enfermedad de von Hippel-Lindau es una patología rara autosómica dominante que cursa con la aparición de tumores benignos en el sistema nervioso central, denominados hemangioblastomas. Su prevalencia es de 1:36.000. Los afectados de esta enfermedad presentan una mutación en el gen *VHL*, que está involucrado en diversas rutas de proliferación y angiogénesis, entre ellas la de HIF α . Esta enfermedad por lo general es familiar, heredándose la mutación en uno de los alelos de alguno de los progenitores. A pesar de esto, existe una gran variabilidad en los síntomas presentados y la gravedad de los mismos dentro de cada familia. Para que se formen los hemangioblastomas, es necesaria una segunda mutación en el otro alelo de *VHL*. Estudiamos un caso grave de von Hippel-Lindau en un paciente joven con un desarrollo de la enfermedad más agudo de lo normal. Se realizó un análisis proteico mediante *Western Blot* para detectar la presencia de proteína de VHL en cultivos de hemangioblastoma del paciente. Los resultados confirmaron la pérdida completa de la proteína en sus células mutadas. Es importante en este tipo de casos la atención personalizada a los pacientes, analizándose cada caso individualmente para obtener la mejor terapia posible para cada uno de ellos. Actualmente el único tratamiento real es la cirugía para extraer los tumores que generan síntomas graves. Es por tanto crucial encontrar fármacos que logren reducir el número de intervenciones que necesiten los afectados y que consigan parar el crecimiento de los tumores. Se analizó en este estudio también la eficacia de dos tratamientos posibles sobre las células del paciente, siendo estos ICI 118-551 y olaparib. Posteriormente, se analizó la viabilidad, observándose una reducción de esta con ambos tratamientos a diferentes niveles.

Cita: Sarro Miguel, Clara; Albiñana Díaz, Virginia; Botella Cubells, Luisa María; Ruiz Llorente, Lidia (2024) Tratamiento con olaparib en células de hemangioblastomas de un paciente con la enfermedad de von Hippel-Lindau que presenta también una mutación en el gen *CHEK2*: un ejemplo de medicina personalizada *in vitro*. *dianas* 13 (2): e202409fp06. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202409fp06](https://journal.dianas.uah.es) <https://dianas.web.uah.es/journal/e202409fp06>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Sarro-Miguel C, Albiñana-Díaz V, Botella-Cubells LM, Ruiz-Llorente L. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL) es una patología rara hereditaria autosómica dominante que afecta a 1 de cada 36.000 personas en el mundo [1]. Está caracterizada principalmente por la aparición de tumores benignos denominados hemangioblastomas (HB) en el sistema nervioso central (SNC) y retina. Además, pueden darse otras afecciones graves como el cáncer renal de células claras (ccRCC), adenomas en otros órganos o feocromocitomas [2]. Es importante destacar que en el 90% de los casos de ccRCC, existe una inactivación previa del gen VHL [3].

La enfermedad lleva el nombre del oftalmólogo Eugen von Hippel, quien primero identificó y describió los hemangioblastomas en la retina, y del médico Arvid Lindau, que descubrió la relación entre estas lesiones oculares y otros HB cerebrales, así como con tumores en órganos internos. Lindau también publicó por primera vez el espectro clínico de la enfermedad. Existen dos grupos principales en la enfermedad de VHL. En el tipo 1 no se desarrollan feocromocitomas, mientras que en el tipo 2 sí aparecen estos tumores. El tipo 2 se subdivide en tres categorías: el tipo 2A, que presenta un alto riesgo de cáncer renal; el tipo 2B, con un bajo riesgo de cáncer renal; y el tipo 2C, que agrupa a pacientes que únicamente desarrollan feocromocitomas [2].

La histología de los HB es altamente variable. Estos tumores proceden de tejido vascular, alrededor de los cuales suelen crecer quistes. Se componen esencialmente de dos tipos celulares: estromales y endoteliales

de vasos sanguíneos. Las primeras son células neoplásicas con mutación en *VHL* y presentan numerosas vesículas lipídicas. Los tumores presentan además una gran variabilidad estructural [1].

La penetrancia de la enfermedad es completa, se desarrollan síntomas en más del 90% de los pacientes a los 65 años. Esto subraya la importancia de un rápido diagnóstico y seguimiento en individuos con antecedentes familiares de la enfermedad. No obstante, aproximadamente el 20% de los casos de *VHL* se dan por mutaciones de *novo*, lo que enfatiza la necesidad de un eficiente diagnóstico incluso en personas sin antecedentes familiares. Además, los síntomas tan variados que presentan los pacientes pueden hacer que el diagnóstico se retrase en ocasiones durante muchos años. La enfermedad tiene una expresividad y severidad muy variable, con observación de distintos fenotipos dentro de cada familia.

A pesar de que los HB están clasificados como benignos desde un punto de vista anatomopatológico, el crecimiento de múltiples tumores en órganos tan sensibles conlleva un riesgo significativo para la salud de los afectados. Los síntomas más comunes son: amaurosis (pérdida temporal de la visión por ausencia de circulación en retina), cefaleas, dolor de espalda, pérdida de sensibilidad en miembros, mareos, desequilibrio, etc. Los tratamientos actuales se basan fundamentalmente en la cirugía convencional para la extracción de los tumores. Sin embargo, se procura evitar estas intervenciones siempre que su crecimiento no genere síntomas graves, debido a su complejidad. A causa de esto, las cirugías deben ser realizadas por un neurocirujano con experiencia probada en el manejo de pacientes con *VHL*.

Los pacientes con *VHL* familiar poseen un alelo del gen *VHL* mutado, que carece de función, y que normalmente es heredado de uno de los progenitores. Se han identificado hasta 500 mutaciones distintas en la línea germinal que pueden dar lugar a la patología. La alteración siempre será la misma en los miembros de una misma familia. Una mutación espontánea, conocida como *second-hit*, en la segunda copia del gen es la causante de la malignización de las células, permitiendo la formación de los tumores característicos de la enfermedad [2].

El gen *VHL* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 3 (citobanda 3p25-26) y es considerado un gen supresor de tumores. Este gen codifica una proteína (pVHL) compuesta por dos dominios α y β , que forma parte del complejo VCB-CUL2, junto con la Elongina B y C [4]. Este complejo es una ubiquitín ligasa E3 y tiene como función favorecer la degradación de distintas proteínas como el factor inducible por hipoxia, HIF α . Las consecuencias de la inactivación de *VHL* se pueden dividir en dependientes o independientes de HIF [1].

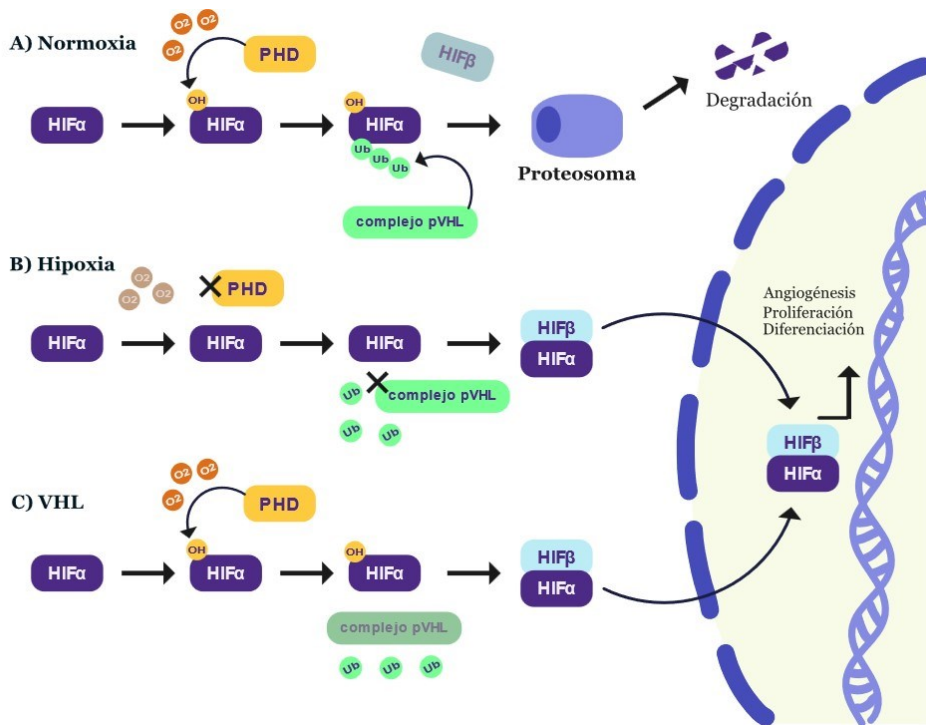


Figura 1.- Función del complejo de pVHL en normoxia (A) e hipoxia (B) sobre HIF α . Efectos de la alteración de pVHL en la enfermedad von Hippel-Lindau sobre HIF α (C).

En presencia de oxígeno, HIF α es hidroxilado por las polihidroxilasas (PHDs), pudiendo así ser reconocido por pVHL, que lo ubiquitina para que sea degradado por el proteosoma. En condiciones de hipoxia, las PHDs no pueden hidroxilar HIF α por lo que no puede ser reconocido por pVHL evitando así su degradación, dimerizando con HIF β y, tras dimerizar con HIF β , ambos se translocan al núcleo. Allí, favorecen la expresión de diversos genes implicados en proliferación, diferenciación y angiogénesis, entre ellos, *VEGF*. Las alteraciones en el gen de *VHL* resultan en una pseudohipoxia crónica y en la sobreexpresión de factores de crecimiento y otros genes proliferativos, desestabilizando así el ciclo celular

[3] (Figura 1). En cuanto a los efectos independientes de HIF, pVHL participa en la formación de la matriz extracelular, es un activador de p53 y retrasa la senescencia celular [1].

En el marco de este trabajo de Fin de Máster (TFM) se ha continuado un estudio previo sobre un paciente con VHL, que debutó con síntomas a los 11 años y que presenta una manifestación severa de la enfermedad, llevándolo a someterse a un gran número de cirugías a edad temprana. El paciente heredó la mutación en *VHL* de su padre, una delección completa de uno de los alelos, y tiene una hermana también afectada. Entre los 13 y los 25 años se le han realizado hasta 7 intervenciones, a su hermana solamente 1 y a su padre 4. El padre debutó con síntomas a una edad más tardía (a los 42 años) y desde 2014 se encuentra en una fase estable, sin síntomas (Figura 2). Este caso es de especial interés ya que se intenta identificar una posible causa para la expresión tan aguda de la enfermedad, en comparación con sus familiares que comparten la misma mutación, pero con manifestaciones clínicas en un grado mucho menor.

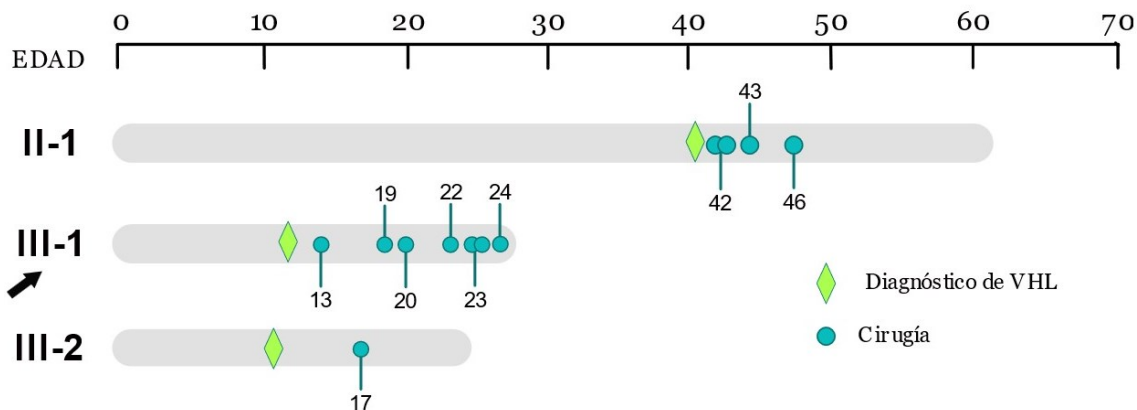


Figura 2.- Línea temporal que muestra las cirugías en el paciente (III-1), su hermana (III-2) y su padre (II-1), así como las edades a las que se dieron.

En un estudio genético previo a partir de una muestra de HB del 2022 y sangre del paciente, se localizó una heterocigosis en el gen *CHEK2* en la línea germinal, afectando al primer nucleótido del intrón 10. Esta mutación produce un cambio en el procesado del mensajero y una parada prematura en la traducción del exón 10, con la síntesis de una proteína truncada. Según la escala CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), tiene un valor de 34, indicativo de alto valor predictivo de patogenicidad [5]. Esta escala es una herramienta para la evaluación de los posibles efectos nocivos de una mutación, ya sean variantes de un nucleótido, deleciones, sustituciones, etc. Cada puntuación se obtiene tras una integración de diversos datos obtenidos tanto de variantes naturales como de otras simuladas [6]. Tras un análisis genético en la familia del paciente, se detectó la misma mutación en su madre, quien no presentaba mutaciones en *VHL*, y que había padecido de carcinoma de mama, también relacionado con alteraciones en *CHEK2* [5] (Figura 3).

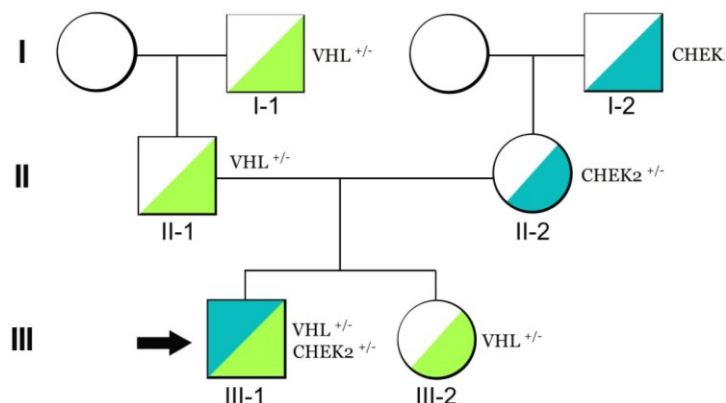


Figura 3.- Árbol genealógico del paciente (III-1), en el que se puede ver la herencia de la mutación en *VHL* de su padre (II-1) y de la mutación en *CHEK2* de su madre (II-2).

CHEK2 es un gen que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 22 (22q.13) y que codifica la proteína *checkpoint 2* quinasa, encargada de regular el ciclo celular mediante la fosforilación de múltiples sustratos. Se ha establecido como un supresor de tumores ya que su función elemental es prevenir la inestabilidad en el ADN mediante su reparación o, a última instancia, deteniendo el ciclo celular y provocando la apoptosis [7]. Uno de sus sustratos diana de activación en presencia de daño celular es la proteína VHL, al mismo tiempo que favorece la transactivación de p53 por parte de esta [8].

Tomando como punto de partida todos estos datos, en este TFM se busca localizar posibles *second-hits* en *VHL* en diferentes HB del paciente a partir de muestras obtenidas en varias cirugías. En un estudio previo del exoma de estos HB no se encontró evidencia de mutaciones en la secuencia del segundo alelo de *VHL*

no mutado en línea germinal, en todos ellos. Por tanto, se plantea la hipótesis de que estas alteraciones se encuentren en alguna zona reguladora del gen, o que sean consecuencia de una hipermetilación del ADN. Este tipo de modificaciones no son perceptibles para un análisis secuencial del ADN. Para averiguarlo, realizaremos un análisis de las proteínas de los diferentes HB mediante un ensayo de *Western Blot* (WB). En el caso de que se detectara presencia de pVHL en alguno de los hemangioblastomas, podríamos plantear una segunda hipótesis de que el *second-hit* puede darse en *trans* entre el alelo de *VHL* que está delecionado en línea germinal y el alelo mutado de *CHEK2*. Es decir, podría existir una cooperación entre las mutaciones en diferentes genes supresores tumorales para dar lugar a crecimiento de los hemangioblastomas.

En cuanto al abordaje terapéutico, solo las cirugías son el tratamiento general para el síndrome de VHL [2]. Sin embargo, en 2017, el propranolol, un antagonista no específico de los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 , fue declarado medicamento huérfano por la European Medicines Agency (EMA) para la enfermedad de VHL, después de un ensayo clínico con 7 pacientes, entre los que se incluía al paciente en estudio [9]. Este paciente fue tratado con una dosis de 120 mg de propranolol (Sumial) diaria durante 1 año desde diciembre del 2015 hasta enero del 2017. Durante este tiempo, no se registró ningún crecimiento en los hemangioblastomas de retina del paciente. Tras la finalización del ensayo, el paciente abandonó el tratamiento, por su efecto hipotensor. En efecto, el propranolol fue introducido en medicina, a mediados de los años 50 del siglo XX, para el tratamiento de hipertensión, migrañas, arritmias y para el tremor esencial. El propranolol tiene capacidad para la reducción de la presión sanguínea debido a la unión con los receptores β_1 , que son muy abundantes en el músculo cardíaco. Este efecto secundario, puede ser no deseado en pacientes con hipotensión, o que no son capaces de adaptarse a la bajada de tensión, lo cual puede ser un importante efecto secundario para ellos [10]. Es debido a esta razón por la cual no hubo adherencia en el tratamiento por parte del sujeto de este estudio.

Teniendo en cuenta esta circunstancia, se investigó en una serie de artículos cómo el ICI-118,551 (ICI) podría ser una alternativa para el tratamiento de pacientes con VHL e hipotensos. ICI es un bloqueador del receptor adrenérgico β_2 de forma específica. Ha sido demostrado su efecto sobre la viabilidad celular de HB, activando la apoptosis. También es capaz de dificultar la traslocación del factor HIF1 α al núcleo en estas células, reduciendo así los efectos proangiogénicos [10]. Este fármaco, nunca comercializado porque no se le encontraron aplicaciones terapéuticas, sería más favorable para el tratamiento de pacientes de VHL, al carecer de los efectos secundarios de hipotensión y bradicardia. Sin embargo, actualmente no está aprobado para su uso farmacológico, encontrándose en fases preclínicas.

Por tanto y ante la evidente la dificultad para tratar este caso en específico mediante fármacos dirigidos a *VHL*, se planteó, que una forma de reducir la frecuencia y severidad de las cirugías del paciente podía ser inhibiendo el efecto de la mutación de *CHEK2*, como una alternativa para frenar el disparo del crecimiento de los hemangioblastomas debido a la mutación en este gen. La opción de administrar un fármaco suficientemente eficaz para poder frenar el crecimiento de los HB es crucial dada la gravedad de su caso. Además, la demostración de los efectos positivos de un tratamiento sobre los cultivos primarios de este paciente sería un estudio de terapia personalizada, podría ayudar a superar las dudas para que el paciente pudiera empezar el tratamiento propuesto.

De esta forma se consideró el olaparib, como alternativa más sólida para aminorar el crecimiento tumoral. Este fármaco está aprobado por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) como tratamiento para diversos tipos de cáncer que presentan mutaciones en *BRCA* y otros genes como *CHEK2*, con función en la reparación de ADN mediante recombinación homóloga. Es un inhibidor de la ADP-ribosa polimerasa (PARP), que es el mecanismo principal de supervivencia en células con fallos en reparación de ADN [11].

En este trabajo hemos analizado los efectos tanto de ICI como de olaparib en 3 cultivos primarios de tres tumores de cirugías de HB como un primer paso para poder facilitarle una opción al paciente para un mejor tratamiento de su enfermedad. No sólo es importante la disminución de los síntomas y las cirugías, sino que el sujeto no se vea obligado a renunciar a una vida plena y satisfactoria para poder llegar a esta meta.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Los experimentos fueron realizados en cultivos primarios de HB del SNC a partir de muestras de tumores del paciente de estudio. Las muestras habían sido recogidas en tres cirugías distintas, en 2018 (Hb24cib), 2020 (Hb38cib), ambas de médula espinal, y 2024 (Hb73cib), de cerebelo.

Cada HB fue lavado con PBS y disgregado mecánica y químicamente con colagenasa (Sigma), durante 10 o 15 minutos en agitación a 37°C. Posteriormente se pasó por un filtro de 40 μ m para obtener las células de HB, que se sembraron en un pocillo de una placa P6 con medio de cultivo RPMI (Gibco) para favorecer su crecimiento.

Se utilizaron como control de los experimentos células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de una línea comercial (Lonza). Fueron cultivadas en medio basal para células endoteliales (EBM2, Lonza)

suplementado con medio de crecimiento para células endoteliales (EGM2, Lonza) y factores de crecimiento como VEGF, EGF, FGF, entre otros (EGM2 SingleQuots, Lonza). Para el cultivo de estas células endoteliales fue necesario realizar un tapizado o *coating* de las placas con colágeno o con gelatina bovina al 0,2% (Sigma) en PBS.

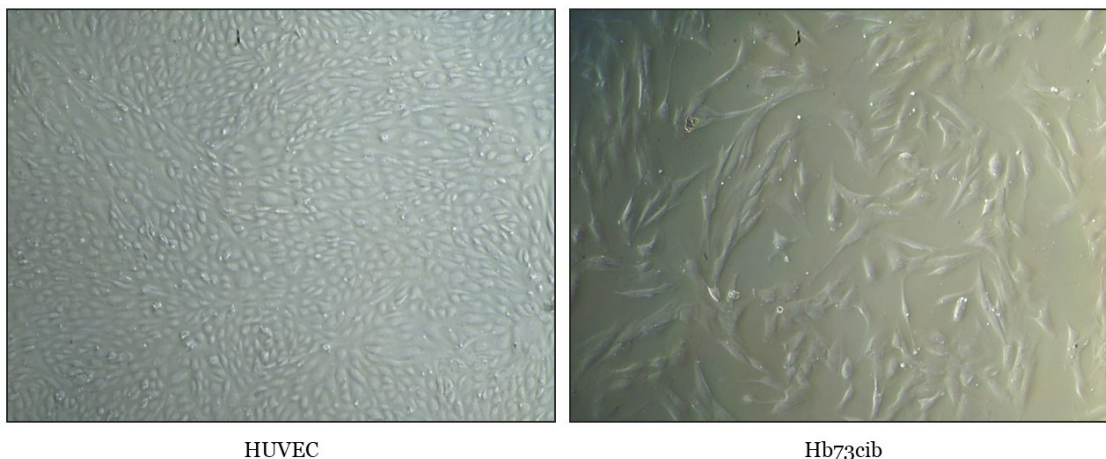


Figura 4.- Imagen comparativa de células HUVEC y de hemangioblastomas (en este caso, del cultivo Hb73cib) al microscopio óptico.

Todos los medios fueron suplementados además con 20% de suero bovino fetal (SFB, Gibco), 2mM de L-Glutamina, 100u/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco), antibiótico-antimicótico 100X (Gibco) y Mycozap (Lonza).

Western Blot para el análisis de los niveles de pVHL

Se realizó un lisado celular a partir de una placa P10, que contenía alrededor de 1 millón de células, con la finalidad de obtener proteínas para el WB. El cultivo se tripsinizó (tripsina-EDTA) y se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 minutos. Al pellet resultante se le añadieron 200µl de buffer de lisis (TNE 1x, Tritón 0,5%, inhibidor de proteasas 1x, inhibidor de fosfatasa 1x y lactacistina 5µM), congelándose a -20°C para facilitar la lisis. Continuando el procesamiento de las muestras, se descongelaron y tras unos minutos de agitación a 4°C para favorecer la lisis celular, cada una de las muestras se centrifugó a 12.000 rpm 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Mediante el protocolo de Coomassie (Bradford) Assay Kit (Promega), se establecieron las concentraciones de proteínas finales obtenidas en cada uno de los cultivos.

Las muestras se prepararon para la electroforesis en gel de poliacrilamida comercial Mini-Protean TGX Precast Gels (BIORAD) con una concentración de proteína óptima de 15µg por cada 20µl de volumen. Cada muestra se duplicó en tubos Eppendorf con Laemmli Loading Buffer 6x y Buffer 1x, y se calentaron a 95°C durante 10 minutos. Luego se centrifugaron brevemente. El gel se cargó en una cubeta Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIORAD) con buffer de electroforesis (Buffer 1x Tris-Glicina, SDS 0,1%), utilizando como marcador Full Range Rainbow Recombinant Protein Molecular Weight Marker (Amersham). La separación se realizó a 150W durante una hora y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 4°C durante toda la noche en tampón de transferencia (Buffer 1x Tris-Glicina, metanol 0,1%).

La membrana se reveló con rojo Ponceau, se lavó con PBS-Tween (0.05%) y se bloqueó con leche desnatada al 0.05% en PBS-Tween durante una hora. Se incubó con el anticuerpo primario monoclonal anti-von Hippel-Lindau (Novus Biologicals) a 1:500 durante toda la noche, se lavó y se añadió el anticuerpo secundario monoclonal anti-mouse (Dako) a 1:2.000. Finalmente, se eliminaron los restos de anticuerpo con solución Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) y se detectó actina como control de carga usando anticuerpo monoclonal anti-β-actina (Sigma) a 1:50.000 como anticuerpo primario y el mismo anticuerpo secundario utilizado para detectar pVHL..

Tratamiento de los cultivos de hemangioblastomas con olaparib e ICI118,551

En placas de 96 pocillos, se realizaron 2 experimentos de cada uno de los cultivos celulares, procedentes de 3 cirugías independientes y consecutivas de un mismo paciente. En cada experimento se establecieron 7 condiciones, cada una por cuadruplicado. Además, y como control de células sanas, se trató un cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC, Lonza).

Las células cultivadas se levantaron con tripsina-EDTA (0,05% y 0,02% respectivamente) de las placas y fueron disueltas en 1mL de medio para ser contadas con el aparato Bio-Rad TC10 Automated Cell Counter. Se realizaron los cálculos correspondientes para establecer la concentración de células deseada. A continuación, en cada placa se sembraron unas 5.000 células por pocillo, con 150µL de medio de cultivo cada uno.

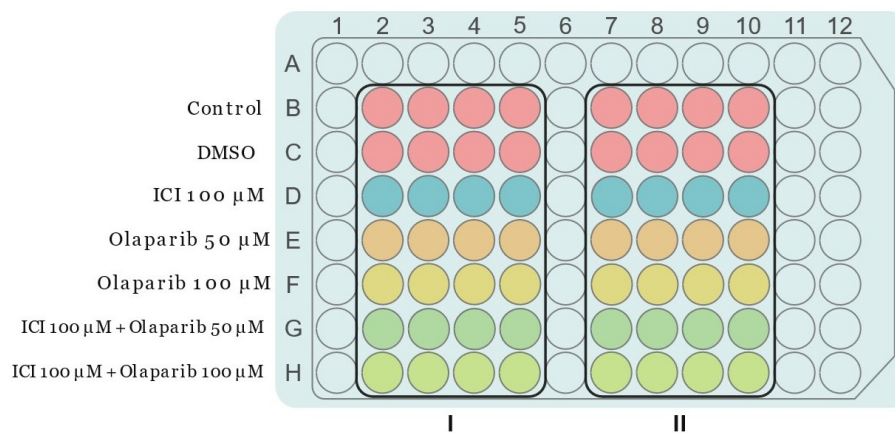


Figura 5.- Representación de las condiciones del experimento de tratamiento. El experimento se realizó dos veces en cada placa (I y II), estableciendo cuadruplicados para cada una de las condiciones.

Tras un día de crecimiento, las células se trataron durante 48 horas con ICI (100µM), olaparib (50µM y 100µM) o la combinación de ambos (ICI 100µM + olaparib 50µM y ICI 100µM + olaparib 100µM) siguiendo el patrón que se muestra en la Figura 4. Los controles del experimento fueron por un lado células tratadas sólo con medio de cultivo y por otro, células tratadas con DMSO (10%), ya que olaparib se reconstituye con este reactivo.

Ensayo de viabilidad por luminiscencia

La viabilidad celular tras el tratamiento fue medida mediante el kit comercial CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), utilizando la cantidad de ATP producida en cada condición para cuantificar la actividad de las células. Se añadieron 50µl del reactivo en cada uno de los pocillos (en relación 1:1 con el medio de tratamiento) y se lisó durante 2 minutos en agitación suave y oscuridad. A continuación, se dejó en oscuridad durante 10 minutos para que se completara y estabilizara la reacción de la luciferasa.

Antes de la cuantificación, de cada uno de los pocillos se tomaron 75µl de cada lisado celular y se transfirieron a otra placa P96 de paredes blancas opacas compatible con el lector de luminiscencia. Por último, se midió la señal luminiscente con el GloMax®-Multi+ Detection System (Promega). En cada placa se establecieron dos controles negativos para la medición de señal debida al fondo, uno solamente con medio de cultivo sin células y otro con medio de cultivo sin células y reactivo de luciferasa.

Análisis estadístico

Todos los resultados son presentados como media con su desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba t de *Student* en los resultados de los tratamientos y una prueba de Anova en los de WB. Los resultados estadísticamente significativos fueron aquellos con $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***)

Resultados

Para el desarrollo de este TFM, nos hemos centrado principalmente en los cultivos de 3 de los últimos HB del paciente, cuyas cirugías se realizaron en 2018 (Hb24cib), 2020 (Hb38cib), ambas en médula, y 2024 (Hb73cib) en cerebelo. Además del establecimiento de los cultivos primarios, anteriormente se habían realizado análisis del exoma a una alta profundidad de lectura (>500X) de los dos tumores más recientes. En todas las muestras están presentes las mutaciones en heterocigosis de *VHL* y de *CHEK2*, al tratarse de alteraciones en la línea germinal. En el Hb38cib se encontraron además mutaciones somáticas en *PTEN* y *Rb*, entre otras. Sin embargo, no se vio ninguna mutación en el segundo alelo de *VHL*. En el Hb73cib se detectó una pequeña delección somática de 4 nucleótidos (AATT) en el exón 2 del segundo alelo de *VHL*. Esta delección provoca una alteración del marco de lectura del gen, generando un codón de parada. Sobre la muestra de 2018 no se realizó el análisis del exoma del tumor, pero sí se realizó la búsqueda de las mutaciones en *VHL*, en el cultivo celular disponible, sin encontrarse ninguna adicional a la mutación de línea germinal.

Western Blot para el análisis de los niveles de pVHL

Para el WB utilizamos muestras de HUVEC, Hb24cib y Hb73cib. Del cultivo de Hb38cib no llegamos a tener suficientes células para poder obtener lisado a partir de ellas. Las concentraciones resultantes para cada uno de los lisados de cultivo de hemangioblastomas se determinaron por el método colorimétrico de Bradford, siendo: 2,19µg/µl en HUVEC, 1,67µg/µl en Hb24cib y 0,80 µg/µl en Hb73cib, obteniéndose un volumen total de 100µl.

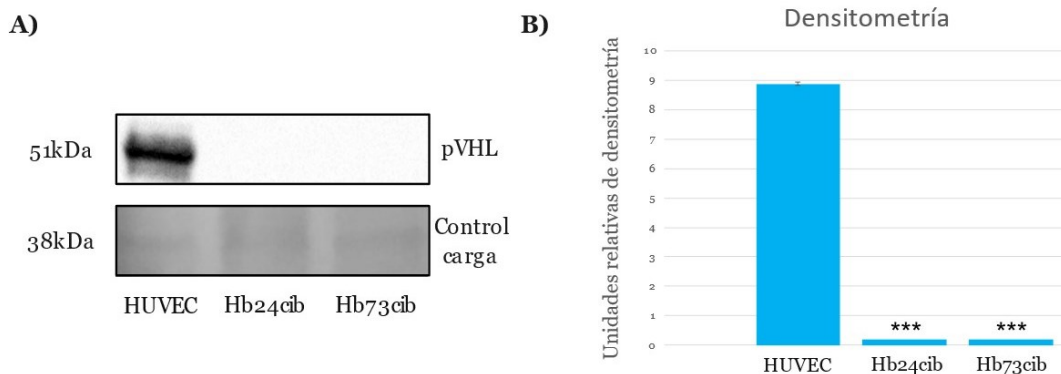


Figura 6.- Resultado de *Western Blot* para pVHL, la proteína se detectó en HUVEC y no en Hb24cib ni en Hb73cib. **A)** Bandas sobre la membrana correspondientes a la pVHL y al control de carga. **B)** Densitometría de la señal obtenida para pVHL en comparación con el control de carga.

No se observa la presencia de pVHL en los cultivos de hemangioblastoma. Como puede verse en la Figura 5 no se encontró proteína de VHL ni en el Hb24cib ni en Hb73cib, mientras que en HUVEC sí que aparece a gran concentración.

Estudios de viabilidad de los HB tras tratamientos con olaparib e ICI 118,551

ICI-118,551 reduce la viabilidad celular notablemente en hemangioblastomas respecto a células endoteliales sanas. La viabilidad celular se reduce entre un 40-60% en los cultivos de HB, mientras que en las HUVEC sólo se reduce un 30%. Puede verse, además, una tendencia a mayor reducción en la viabilidad en los HB más nuevos respecto a los más antiguos.

Olaparib tiene un efecto inhibitorio de la viabilidad celular. A la concentración de 50µM el cultivo de Hb24cib disminuyó su viabilidad en un 21%, en el caso de Hb38cib un 31% y Hb73cib, bajó hasta un 40%. A 100µM, el efecto del olaparib fue mayor, en Hb24cib una reducción del 43%, en Hb38cib un 38% y en Hb73cib, en torno al 50%. En las células control HUVEC la viabilidad se redujo en un 20% a la concentración menor de olaparib y a un 40% en la mayor.

El tratamiento conjunto de ICI y olaparib aumenta sus efectos inhibitorios aparentemente de manera sumatoria, sin llegar a tener un efecto sinérgico. En la combinación con olaparib a 50µM la viabilidad se redujo en los cultivos de HB entre el 70-85%. En la combinación con olaparib a 100µM se produce una reducción de hasta un 80-85% aproximadamente, en las células tumorales. En las HUVEC, la disminución fue de un 60% en la primera condición con ambos tratamientos y de un 78% en la segunda.

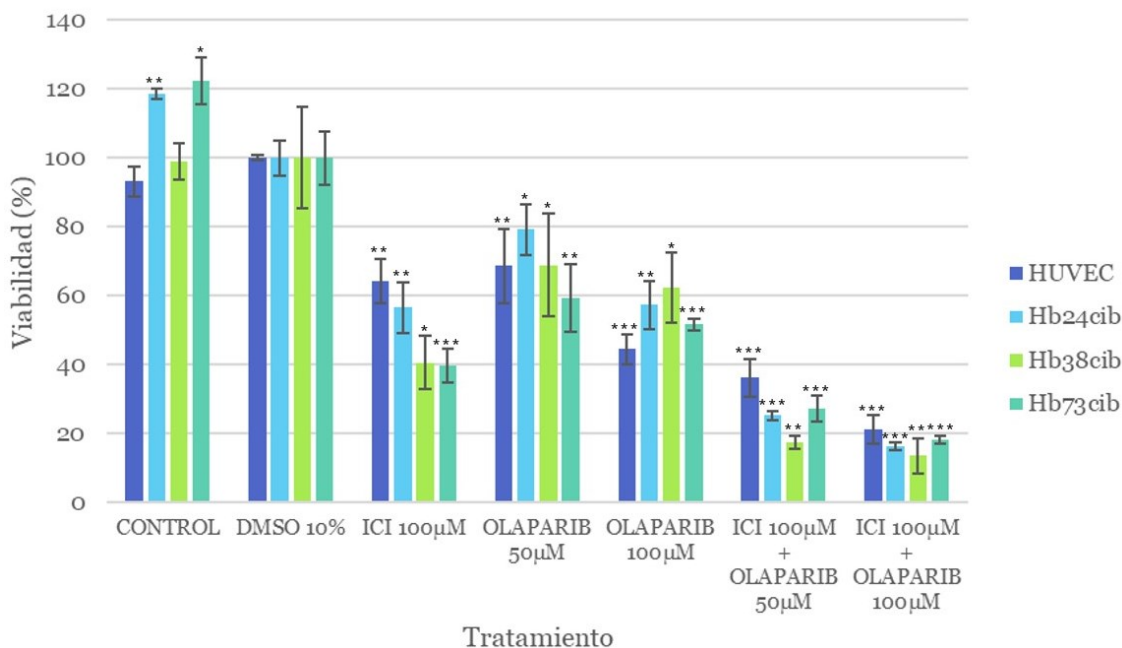


Gráfico 1.- Viabilidad celular en HUVEC y HB a las 48 horas del tratamiento. La densidad fue de 5.000 células por pocillo. Se relativizaron los resultados tomando la condición con DMSO como control, al haber ligeras variaciones en algunos de los HB en esta respecto al control sin DMSO. El tratamiento con ICI en hemangioblastomas tuvo un mayor efecto en la viabilidad que con olaparib a ambas concentraciones. El efecto conjunto de ambos fármacos redujo la viabilidad aún más.

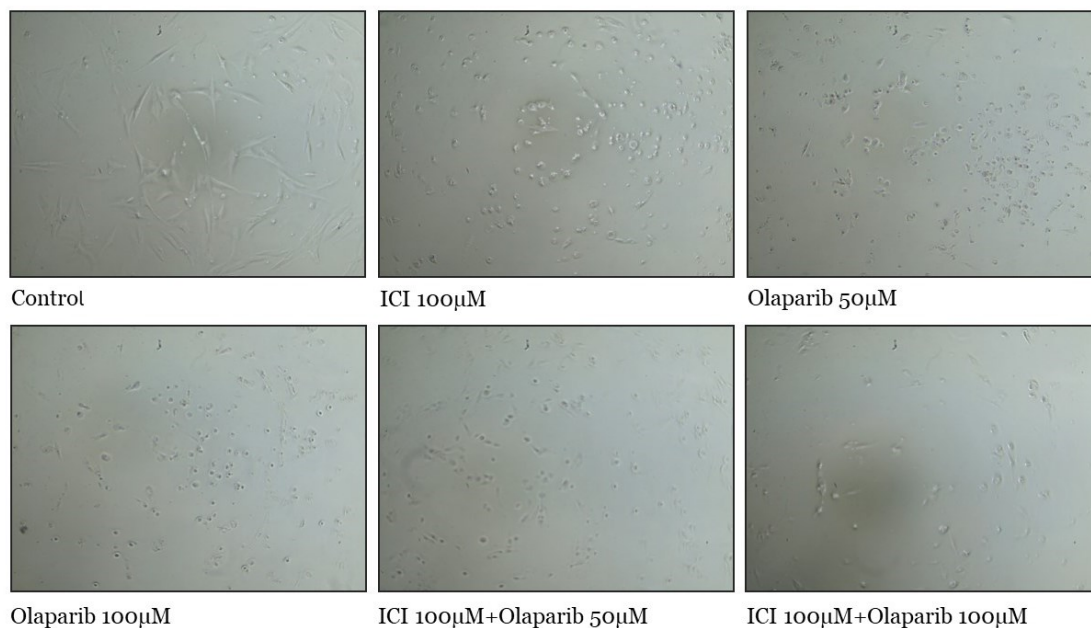


Figura 7.- Fotografías de las células de Hb73cib tras 48 horas de tratamiento. La imagen control es representativa tanto del control como del tratamiento con DMSO al ser ambas muy similares. Puede verse una disminución en el número de células y un cambio de forma de más alargada (típica de HB) a otra más redondeada y apoptótica, especialmente en las combinaciones de los dos tratamientos.

Los cambios en la viabilidad causados por los diferentes tratamientos pudieron observarse al microscopio en la placa P96. Las cantidad de células en los pocillos tratados se redujo considerablemente en comparación con los controles. Además, hubo alteraciones en la morfología celular, adquiriendo estas una forma más redondeada y con un mayor número de vacuolas en su interior. Los cambios fueron más evidentes en la combinación de los dos tratamientos y a niveles más altos de cada tratamiento.

Discusión

Los resultados del *Western Blot*, permiten afirmar que los cultivos de HB estudiados no producen una pVHL funcional ni detectable, sino que se observa una pérdida total de la expresión de esta proteína. Es por esto por lo que debe haber alguna mutación en el segundo alelo del gen que no es visible por secuenciación, ya sea en zonas reguladoras o deberse a hipermetilaciones del mismo, lo cual confirmaría nuestra primera hipótesis.

La mutación en un alelo de *CHEK2* no bastaría en este caso para la formación de hemangioblastomas en el paciente. Las alteraciones en *CHEK2*, por tanto, actúan con independencia de la anulación total de la expresión de pVHL. Lo que sí que puede intuirse, es el impacto de este segundo gen mutado en la línea germinal, pudiendo favorecer la aparición de nuevas mutaciones eventualmente, dado su papel como supresor tumoral que forma parte del complejo de reparación de mutaciones en ciclo celular. Esto se ha detectado a través de mutaciones patogénicas en supresores tumorales como *PTEN* y *Rb*, como aparece en el exoma intratumoral, de HB38cib, o la delección en el alelo no mutado en línea germinal de *VHL* en el Hb73cib.

Los tratamientos *in vitro* de las células de los hemangioblastomas de este paciente suponen un ejemplo de terapia personalizada *in vitro*. El tratamiento con olaparib es eficaz para la reducción en la viabilidad de hemangioblastomas, al igual que ICI 118-551.

El menor efecto en células endoteliales control sanas por parte de ICI concuerda con lo descrito previamente en la literatura, ya que estas células tienen un menor número de receptores β 2-adrenérgicos que las células de los hemangioblastomas [9].

El efecto del olaparib es claro, y disminuye en todos los casos la viabilidad tanto a 50, como a 100 μ M, con respecto a las células no tratadas. Estos resultados ocurren en las células de los tres últimos HB. El tratamiento produce un efecto más adecuado en el caso de Hb73cib, que es el cultivo desarrollado más recientemente y que tiene un mayor nivel de proliferación celular que Hb38cib, el cual estaba en una fase de crecimiento mucho más lento. Esto puede deberse a que el efecto de olaparib es mayor en células que se encuentran en alta tasa de división, al actuar este fármaco sobre mecanismos de reparación de ADN.

Especialmente, el tratamiento solo con olaparib a dosis de 50 μ M y en combinación con ICI tiene una ventana terapéutica en cuanto a los efectos diferenciales significativos entre HUVEC (controles) y células

tumorales (HB), habiendo una diferencia ligeramente mayor en esta concentración entre HB y controles, tanto individualmente como combinada con ICI.

El cambio en la morfología celular muestra, al menos, una parada en el ciclo celular al perderse la capacidad de adhesión a la placa, lo que impediría su división y proliferación. La presencia de vacuolas en el interior de las células podría indicar el inicio de un proceso de apoptosis. Para confirmarlo, sería necesario realizar nuevos experimentos en los que se administre el tratamiento durante más tiempo y se realice un análisis posterior de los niveles de caspasas en los cultivos, para evaluar una posible apoptosis.

No obstante, es necesario continuar la experimentación con un mayor número de cultivos, dosis de olaparib y tiempo de tratamiento, para poder encontrar una ventana terapéutica adecuada ya que en este caso las células control HUVEC también fueron afectadas por el tratamiento a dosis altas.

Este TFM pretende resaltar la importancia de la terapia personalizada en el tratamiento de pacientes con enfermedades raras, como es la enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL). Utilizando células procedentes del propio paciente se puede obtener un modelo experimental lo más cercano posible al real. A partir de estos cultivos se pueden conocer tanto las mutaciones de línea germinal como las presentes en los tumores recientes. La identificación de mutaciones somáticas en los hemangioblastomas, que aceleran el crecimiento tumoral y que varían según la zona del tumor y el tiempo, puede proporcionar una base sólida para personalizar el tratamiento.

Dado que las enfermedades raras suelen ser menos estudiadas, es fundamental promover investigaciones en este campo. Al descubrir más factores que influyen en estas enfermedades, se pueden desarrollar terapias más efectivas y personalizadas, mejorando así la calidad de vida de los pacientes mediante alternativas más precisas y adaptadas a sus necesidades individuales. Esto requiere una colaboración estrecha entre pacientes, clínicos expertos e investigadores.

Referencias

1. Gläsker, S., Vergauwen, E., Koch, C., Kutikov, A., Vortmeyer, A. 2020. Von Hippel-Lindau Disease: Current Challenges and Future Prospects. *OncoTargets and Therapy*, 13:5669-5690.
2. K, Villar. 1993. Manual VHL. Todo lo que necesita saber sobre la enfermedad de von Hippel-Lindau. Barcelona: Alianza Española de Familias de VHL. 44.
3. Kase, A., George, D., Ramalingam, S. 2023. Clear Cell Renal Cell Carcinoma: From Biology to Treatment. *Cancers*, 15:665.
4. Gossage, L., Eisen, T., Maher, E. 2015. VHL, the story of a tumour supressor gene. *Nature Reviews Cancer*, 15(1):55-64.
5. Cabrera-Montes, J., Aguirre, D., Viñas-López, J., Lorente-Herraiz, L., Recio-Poveda, L., Albiñana, V., Pérez.Pérez, J., Botella, L., Cuesta, A. 2023. Mutation in Chek2 triggers von Hippel-Lindau hemangioblastoma growth. *Acta Neurochirurgica*, 165:4241-4251.
6. What is Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)? 2024 (June 11) In Combined annotation dependent. <https://cadd.gs.washington.edu>
7. Antoni, L., Sodha, N., Collins, I., Garret, M. 2007. CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nature Reviews Cancer*, 7:925-36.
8. Roe, J., Kim, H., Hwang, I., Ha, N., Kim, S., Cho, E., Youn, H. 2011. Phosphorylation of von Hippel-Lindau protein by checkpoint kinase 2 regulates p53 transactivation. *Cell Cycle*, 10:4920-8.
9. Albiñana, V., Jiménez, R., Soler, I., Rodríguez, L., Recio-Poveda, L., Villar, K., Botella, L. 2017. Repurposing propranolol as a drug for the treatment of retinal hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12:122.
10. Cuesta, A., Albiñana, V., Gallardo-Vara, E., Recio-Poveda, L., de Rojas, I., Villar, K., Aguirre, D., Botella, L. 2019. The β 2-adrenergic receptor antagonist ICI-118,551 blocks the constitutively activated HIF signaling in hemangioblastomas from von Hippel-Lindau. *Scientific reports*, 11:10062.
11. Chi, J., Chung, S., Parakrama, R., Fayyaz, F., Jose, J., Wasif, M. 2021. The role of PARP inhibitors in BRCA mutated pancreatic cancer. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 14: 17562848211014818.