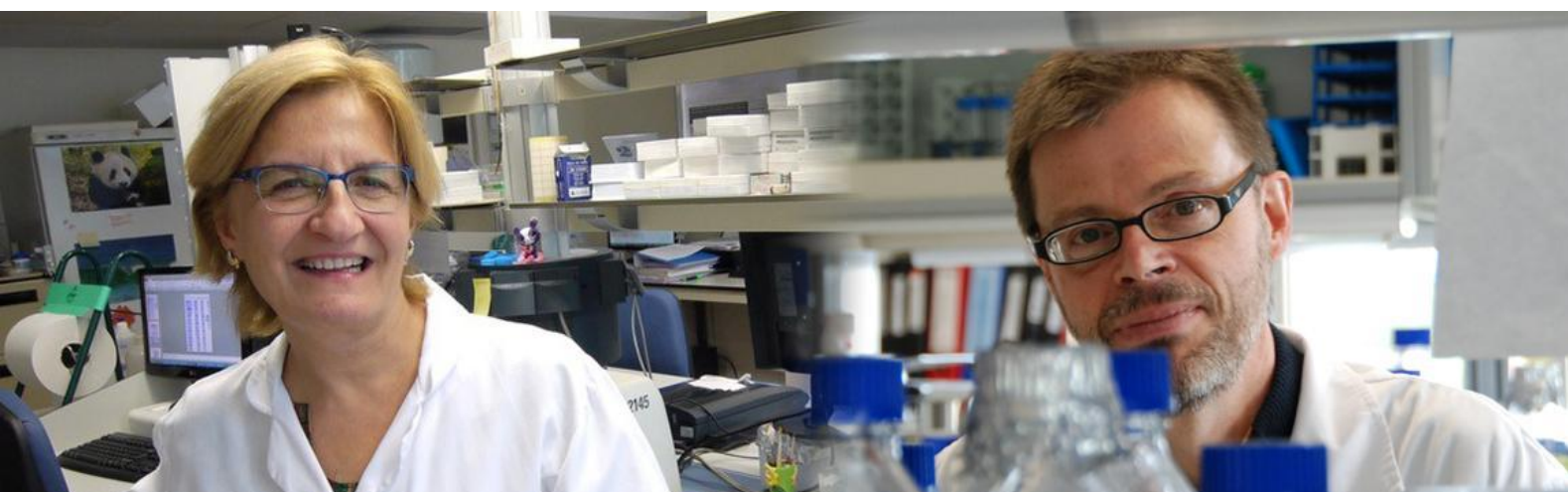




Proyecto CRIS de Sarcoma de Ewing

Investigadores: Dra. Rosa Noguera Salvá, Dr. Enrique de Álava

Centro: INCLIVA Instituto de Investigación Sanitaria, Valencia - Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) - Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla - Universidad de Sevilla - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid.



Introducción

No todos los tumores son iguales. Nuestro cuerpo está compuesto por muchos tipos de células diferentes, y, en función del tipo de célula a la que se parece un cáncer, los tumores se denominan de una manera u otra. Por ejemplo, las células que recubren las superficies internas o externas del cuerpo (denominadas epiteliales), dan lugar a tumores que denominados carcinomas. En cambio, las células que componen el interior de los tejidos, su estructura interna, etc., cuando originan un tumor se denomina sarcoma.

Los sarcomas de células redondas afectan a menudo a niños y jóvenes adultos, y tienen la particularidad de que son muy heterogéneos. Esto siempre supone un problema, puesto que dificulta el estudio de estos tumores y la elección de la terapia más adecuada. Es muy importante definir y clasificar los tumores de los diferentes pacientes en función de sus características y de sus puntos débiles, porque cuanto más sepamos de ellos, más fácil será identificar una terapia adecuada (y en caso de no existir, crear una específica).

El sarcoma de células redondas más conocido es el Sarcoma de Ewing, que aparece generalmente en los huesos y suele ser muy agresivo. Aunque sus características están bastante bien definidas, aún hoy en día los niños que sufren una recaída o metástasis tienen una tasa de supervivencia menor al 20%. Por eso es esencial encontrar métodos pronósticos para determinar qué niños tienen mayor riesgo de metástasis o recaída.

En esta dirección, CRIS lleva años apoyando la investigación llevada conjuntamente por el equipo del Dr. Enrique de Álava y de la Dra. Rosa Noguera, a través de dos proyectos dirigidos a mejorar el diagnóstico de Sarcoma de Ewing. Por ejemplo, los equipos utilizaron una metodología sencilla que permite identificar a los pacientes que portaban ciertas alteraciones en los cromosomas 1 y 16, y que están relacionadas con un peor pronóstico.

Existen, además, otros sarcomas que, cuando se ven al microscopio, se parecen al Sarcoma de Ewing, por lo que se denominan de forma genérica “sarcoma similar a Sarcoma de Ewing” o en inglés “Ewing like Sarcoma”. Sin embargo, a diferencia del primero, en los sarcomas similares al Sarcoma de Ewing no hay unos criterios inequívocos que permitan definirlos, clasificarlos de manera clara y buscar terapias adecuadas y personalizadas para cada niño. De hecho, hay tan pocas publicaciones sobre estos tumores que pese a su gravedad se sabe muy poco de ellos.

Ahora bien, durante la última década se ha avanzado mucho en la comprensión de cómo funcionan los tumores y cómo interaccionan con su entorno. La relación entre las células tumorales, las de su entorno y el andamiaje de los tejidos (llamado matriz extracelular) tienen un enorme papel en el crecimiento del tumor, su agresividad y su diseminación. Las células interaccionan entre ellas, se envían señales, se suicidan o multiplican y se expanden en función de por ejemplo lo denso o laxo que sea su matriz extracelular.



El proyecto

El objetivo de este trabajo consiste en identificar factores en el andamiaje de los tejidos (la matriz extracelular) que permitan describir, clasificar y predecir el comportamiento de los “Ewing like Sarcoma” y los Sarcomas de Ewing, estudiando simultáneamente la genética de las células tumorales para comprobar qué alteraciones pueden estar implicadas en la modificación de su entorno y en la aparición de metástasis.

Este estudio permitirá identificar nuevas maneras de determinar las características y riesgo de recaída y diseminación de estos sarcomas, y además facilitará la identificación de nuevas dianas terapéuticas que reviertan en tratamientos más efectivos y personalizados.

Avances recientes

Gracias a un intensivo trabajo, el equipo ha reunido 36 casos de sarcomas infantiles tipo Ewing y “Ewing Like”. Se trata de un número muy importante de casos, ya que se trata de enfermedades raras y que ocurren con



muy poca frecuencia. De hecho, esta colección constituye una de las más numerosas en este tipo de tumores, y esto sólo ha sido posible gracias a un trabajo conjunto entre diversos biobancos y hospitales de Sevilla y Valencia. Además, se continuará incluyendo nuevos casos en este estudio, así que el número irá creciendo continuamente.

Los investigadores han llevado a cabo un profundo análisis de estas muestras, que ha proporcionado datos con gran relevancia clínica. Este análisis se está haciendo desde dos puntos de vista: Analizando en detalle diferentes elementos genéticos de la muestra y analizando los detalles morfológicos bajo el microscopio de elementos de la matriz extracelular.

Análisis genético de las muestras

El principal objetivo de este estudio es identificar elementos que puedan ayudar a predecir, a partir de las biopsias, si el paciente tiene más o menos riesgo. Para conseguirlo, por un lado, estudian el ARN en estas muestras: Si el ADN fuera la biblioteca que contiene todas las instrucciones para el aspecto y comportamiento de las células, el ARN sería los volúmenes específicos, las instrucciones que extrae la célula para realizar una función en concreto. Dependiendo de qué ARNs esté utilizando la célula podemos conocer su comportamiento, y utilizar este conocimiento para mejorar los diagnósticos o incluso desarrollar terapias específicas.

Por otro lado, están estudiando la estructura de los cromosomas, los paquetes que contienen el ADN dentro de las células. En ocasiones, trocitos de un paquete pueden acabar en otro, y esto puede desencadenar alteraciones que lleven al cáncer o a peor pronóstico. Lo están haciendo gracias a una moderna técnica que supera a otras que se hacían tradicionalmente, denominada *optical genome mapping*. Gracias a esta técnica, que ya han terminado de poner a punto, han conseguido identificar movimientos, ausencias o multiplicaciones de trozos de cromosomas, o incluso movimientos que implican a varios cromosomas a la vez. Este análisis está permitiendo ver que el genoma de los pacientes de Sarcoma de Ewing y otros sarcomas Ewing-like no es tan estable como se pensaba.

Los resultados de estas técnicas están mostrando resultados importantes. En primer lugar, los investigadores han podido constatar que la técnica de *optical genome mapping* puede resultar más útil que otras a la hora de diagnosticar con precisión a los pacientes. Gracias a esta técnica han conseguido identificar tanto las alteraciones en el genoma de los tumores que causan el sarcoma como otros movimientos y reordenamientos dentro de estos genomas. Las técnicas de análisis de ARN son muy sensibles, pero el *optical genome mapping* tiene la capacidad de detectar incluso alteraciones que no se conocían. Por lo tanto, los investigadores están valorando la posibilidad de incorporar esta técnica a la práctica clínica.

Este tipo de análisis podría ayudar a identificar los pacientes con un peor pronóstico, y podrían dar pistas del pronóstico de cada paciente y cómo tratarlos. Entre los datos más importantes que han obtenido es que algunos pacientes tienen bastantes reordenamientos y alteraciones en la posición de partes de su genoma (una situación que se denomina cromoplexía). Los resultados señalan que los pacientes a cuyos tumores les ocurre esto, tienen un peor pronóstico, y más posibilidades de que sus enfermedades sean agresivas.

Por lo tanto, la técnica de *optical genome mapping* tiene dos ventajas importantes: Por un lado, ayudar a diagnosticar con mayor precisión al niño con sarcoma. Por otro, da información muy importante sobre si la enfermedad será agresiva o no.

Finalmente, los investigadores comenzarán en breve la realización de análisis transcriptómicos (del ARN de las células). El objetivo es comparar células tumorales en distintas condiciones de rigidez y composición de la matriz (con o sin vitronectina añadida) y distintos tiempos de cultivo (14 y 21 días), para estudiar cómo varía la expresión de genes en relación con los cambios en el microambiente.



Análisis morfológico de la matriz extracelular de las muestras

Esta parte del proyecto consiste en estudiar en profundidad las muestras de los pacientes utilizando Patología Digital, una detallada digitalización de las muestras que permite hacer análisis profundos, muy precisos y cuantitativos utilizando técnicas computacionales.

Han estudiado determinados elementos de la matriz extracelular relacionadas con la rigidez, como las llamadas proteínas fibrilares (fibras de reticulina) y material clásicamente llamado amorfo o sin forma constituido por azúcares unidos a las proteínas.

El objetivo es correlacionar los resultados de los estudios genéticos con lo que se ve en el microscopio tras digitalizar las muestras y estudiar cada uno de los elementos con softwares específicos. Esto es fundamental, porque los estudios genéticos no sólo son caros, sino que requieren equipos especiales y personal que los analice. Si sabemos que los pacientes con ciertos cambios genéticos presentan unas características concretas bajo el microscopio, podríamos predecir los cambios genéticos simplemente mirando por el microscopio y buscando determinados patrones. Esto permitiría empezar a tener una idea más clara de su pronóstico antes de tener (o incluso en ausencia de) las pruebas genéticas.

Tal y como se esperaba, los resultados señalan a que la estructura, cantidad y disposición de varios elementos del entorno tumoral (como elementos llamados vitronectina, los glucosaminoglucanos o las fibras de reticulina) tiene importancia en el desarrollo y la agresividad del tumor. Como estos elementos tienen que ver con la elasticidad del tejido, con las posibilidades de movimiento de las células o de cómo las células se adhieren al andamiaje de los tejidos, parecen tener mucha relevancia como se desarrolla el tumor.

Pero el dato más importante es que las diferentes características del entorno tumoral se asocian a diferentes alteraciones y cambios de los cromosomas. Es decir, según la alteración genética que tengan los tumores de los pacientes, el entorno de las células tumorales tiene unas características u otras.

Estos resultados tienen una gran relevancia clínica. En primer lugar, la combinación de los datos genéticos con las características del entorno tumoral pueden ser clave para diagnosticar, identificar y clasificar diferentes tipos de Sarcoma y, por tanto, determinar el tratamiento y seguimiento de cada paciente de manera más personalizada.

Pero, además, proporcionan información muy valiosa de por qué esos tumores se comportan de manera agresiva, avanzan tan rápido y producen metástasis.

Esto abre la puerta para desarrollar tratamientos dirigidos contra estos mecanismos, y avanzar en la lucha contra un tipo de tumores que en muchas ocasiones son complicados de tratar.

Con todos estos datos en mente, han iniciado ya los nuevos pasos de este proyecto. Los equipos de investigación quieren analizar en profundidad los mecanismos por los cuales el entorno del tumor favorece o induce la aparición de alteraciones genéticas en las células tumorales que les ayuden a invadir mejor o provocar metástasis. Para ello están utilizando células derivadas de tumores de pacientes del Hospital Virgen del Rocío para hacer cultivos en 3 Dimensiones, que simulen las condiciones reales de los tumores y su entorno.

De hecho, uno de los principales avances ha sido la generación y análisis de más de 50 cultivos celulares tridimensionales (3D) a partir de líneas celulares tumorales y muestras de pacientes. Se trata de un número enorme. Este tipo de cultivos permite simular de manera más realista el entorno tumoral y estudiar su influencia sobre el comportamiento celular. En ellos, se ha observado que determinadas líneas celulares muestran un crecimiento muy limitado y una aparente detención de su multiplicación, a pesar de liberar una gran cantidad de vitronectina al medio (una sustancia que podría estar favoreciendo la adhesión, migración y diseminación de las células tumorales). Este fenómeno ha despertado gran interés, ya que podría estar relacionado con rutas de estrés celular, daño en el ADN o modificaciones en el microambiente que bloquean la proliferación.

También se han detectado diferencias notables en la liberación al medio de esta vitronectina entre las líneas



tumorales, tanto en cultivos en dos dimensiones (2D) como en 3D- Ciertas líneas apenas la liberan en cultivos 2D pero sí lo hacen intensamente al crecer en cultivos tridimensionales.

Esta secreción diferencial podría estar relacionada con mecanismos de movimiento e invasión celular y formación de estructuras como halos, que ya se habían descrito previamente en neuroblastoma y podrían asociarse con procesos de metástasis.

Todos estos resultados, y la relación entre genética y morfología, no solo aportan nuevas claves para entender la interacción entre las células tumorales y su entorno, sino que también abren la puerta a nuevas estrategias terapéuticas y posibles biomarcadores de agresividad de la enfermedad y respuesta a terapias.

Otros avances

A través de los estudios del entorno de los tumores, los investigadores también han observado un mecanismo que podría tener mucho interés para desarrollar nuevas terapias.

El entorno de los tumores, el andamiaje, las células, los vasos sanguíneos, etc. no es algo estático, sino que está constantemente cambiando, remodelándose y reajustándose. Es extremadamente dinámico. Por ejemplo, en los entornos de los tumores es frecuente que haya gran cantidad de una especie de tijeras moleculares que rompen las estructuras (que luego vuelven a formar las células del entorno de los tumores). Una de estas tijeras (llamada MMP14) parece liberar, al cortar algunas estructuras, una molécula llamada Endoglina. En un trabajo que han publicado en la revista *International Journal of Molecular Sciences*, los investigadores han mostrado que esta Endoglina liberada por MMP14 ayuda a que las células del Sarcoma de Ewing sean más agresivas. Lo interesante es que se pueden crear terapias contra Endoglina, lo que a que controlen la invasión y mejoren la supervivencia de los pacientes.