



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

LA BIOPSIA LÍQUIDA EN SARCOMAS PEDIÁTRICOS: DESCIFRANDO EL POTENCIAL PREDICTIVO DEL ADN TUMORAL CIRCULANTE Y DE LOS EXOSOMAS TUMORALES PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE RECAÍDAS

Dr. Josep Roma Castanyer

Hospital Universitari Vall d'Hebron - VHIR Institut de Recerca Vall d'Hebron

Dr. Francisco Javier Alonso García de la Rosa

Instituto de Investigaciones en Enfermedades Raras - Instituto de Salud Carlos III

1. Resumen

Antecedentes del proyecto

Los sarcomas constituyen una amplia familia de cánceres, entre los que destacan el rhabdomyosarcoma (RMS), los sarcomas de partes blandas no-RMS, el osteosarcoma y el sarcoma de Ewing por su malignidad e incidencia relativamente alta en pacientes pediátricos. Debido a su alta complejidad y variabilidad biológica, los sarcomas han sido históricamente poco estudiados en comparación con los cánceres más frecuentes. En este sentido, el desarrollo de nuevos métodos destinados a detectar biomarcadores específicos de recaída puede ser crucial para establecer nuevos protocolos de evaluación de riesgos para estas neoplasias, especialmente en los casos propensos a la recaída.

Objetivo principal

El seguimiento de la respuesta del tumor durante y después del tratamiento ha conducido a avances en la supervivencia de los pacientes, pero aún faltan biomarcadores precoces no invasivos.

Metodología

En este proyecto, se estudiarán dos componentes extracelulares clave de las células cancerígenas: el ADN tumoral circulante libre de células (ctDNA) y los exosomas derivados del tumor para estudiar su correlación con la carga tumoral.

Resultados esperados

El desarrollo de estas tecnologías asociadas a las biopsias líquidas abrirá nuevas vías para los marcadores biológicos del cáncer, con el consiguiente potencial de mejora de la gestión clínica del paciente. El objetivo del proyecto es traducir nuestra experiencia previa en tumores sólidos infantiles y la optimización de nuevas tecnologías en nuevos protocolos de seguimiento para permitir a corto plazo una detección más temprana de las recaídas. Una detección precoz de estos marcadores puede permitir la anticipación del diagnóstico de recaída y, por lo tanto, permite intensificar el seguimiento y/o iniciar antes el tratamiento, de modo que así aumentan las probabilidades de supervivencia de los pacientes con sarcoma pediátrico.

2. Resultados

Los resultados obtenidos han permitido demostrar la gran aplicabilidad clínica que podrá tener la tecnología de detección del ADN circulante tumoral que hemos desarrollado gracias a este proyecto. Los resultados son tan esperanzadores que tenemos claro que este proyecto no acaba aquí, sino que la consecución de este proyecto de La Marató de TV3 ha sido clave para poner la piedra angular de un nuevo sistema para evaluar la carga tumoral de los pacientes con sarcomas infantiles; esto no se verá reflejado únicamente en unas publicaciones científicas, sino que creemos que permitirá cambiar y mejorar el seguimiento clínico de los pacientes. Así, hemos demostrado que la tecnología que hemos desarrollado puede evaluar (con una simple muestra de sangre) el grado de eficacia de la terapia y, sobre todo, hemos sido capaces, en algunos pacientes, de detectar la recaída hasta 5 meses antes que con las técnicas convencionales. Este hecho es muy complejo en sarcomas (por la gran variabilidad mutacional que presentan, aunque tengan una tasa baja de mutación) y por eso creemos que los hallazgos son muy importantes y que cambiarán algunos paradigmas del seguimiento y también del tratamiento de estos pacientes. Una de las metas que perseguimos es llegar a poder anticipar los nuevos tratamientos en casos de recaída, lo que podría aumentar mucho la eficacia de los tratamientos de segunda línea.

Así, nos hemos encontrado con pacientes donde los 10 marcadores tumorales seleccionados desaparecen al finalizar el tratamiento y ya no vuelven a aparecer, lo que indica que no hay ninguna señal de enfermedad. En otros casos hemos visto pacientes en que al acabar el tratamiento de primera línea la enfermedad sigue activa, y son casos en los que el cáncer ha progresado rápidamente. En estos casos, la positividad nos indica que el tratamiento no ha sido lo suficientemente efectivo. Tenemos también casos que han respondido bien durante la terapia inicial pero en los que ha habido una recaída posterior, durante el seguimiento, que hemos podido detectar con una anticipación de hasta 5 meses mediante la tecnología que hemos desarrollado. Está claro que el sistema funciona y que puede tener una aplicabilidad clínica considerable. En la nueva etapa del proyecto que ahora comienza el objetivo será aumentar el número de pacientes incluidos en el estudio y valorar su correlación con la clínica con una cohorte mucho mayor y con seguimientos aún más largos.

Por otro lado, se ha podido avanzar mucho en la investigación básica del papel de los exosomas y de cómo se pueden utilizar para detectar algunos de los biomarcadores contenidos en su interior. Así, el proyecto se ha enfocado en las características moleculares, especialmente el perfil de proteínas y miRNA, de los exosomas en el plasma de pacientes con sarcomas pediátricos con el objetivo de identificar marcadores pronósticos y de evolución de la enfermedad. Debido a la escasez de muestras y pacientes con estos tumores, se ha dedicado mucho esfuerzo a encontrar el mejor método de aislamiento de exosomas del plasma. Así, se pudo evaluar la purificación de vesículas plasmáticas mediante columnas de cromatografía de exclusión. Este método ha permitido aislar poblaciones homogéneas de vesículas, eliminando contaminantes como la albúmina, lo que ha sido crucial para analizar las muestras por proteómica. Después de optimizar las mejores columnas de exclusión molecular, estas fueron utilizadas con muestras control proporcionadas por el laboratorio coordinador del proyecto, que mostraron resultados homogéneos tanto en la proteína presente en las eluciones como en el número de partículas analizadas. Una vez seleccionado el método de aislamiento de las vesículas se abordó la caracterización molecular de las proteínas y los miRNA que contenían. Gracias a este trabajo se ha podido elaborar un listado de proteínas y de miRNA que se podrán utilizar como candidatos a biomarcadores en fases posteriores para la evaluación de la enfermedad. Finalmente, también se ha podido optimizar el sistema en muestras de biopsias líquidas de pacientes con sarcomas infantiles, suministradas por el centro coordinador, y se han podido aislar de forma positiva las vesículas presentes en estas muestras.

Como síntesis, podemos afirmar que los resultados obtenidos en los dos subproyectos apuntan a un fuerte potencial clínico para mejorar la detección de la enfermedad y llevar a cabo un seguimiento preciso y poco invasivo, ya sea a través del ADN tumoral circulante o a través de los biomarcadores contenidos en las vesículas.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

El presente proyecto tiene un elevado componente de implicaciones clínicas; de hecho, estaba pensado para tenerlas, pero los resultados que hemos obtenido gracias a esta ayuda han convertido el elevado potencial que tenía el proyecto en su inicio en una firme realidad para avanzar hacia un mejor seguimiento de los pacientes. Este mejor

seguimiento supondrá una mejora en la detección de la enfermedad (más sensibilidad y especificidad, y al mismo tiempo un procedimiento menos invasivo y relativamente rápido). Además, la detección más precoz de la enfermedad puede llegar a suponer un inicio más temprano del tratamiento y, por lo tanto, aumentar su eficacia, lo que contribuye a incrementar las tasas de supervivencia. De este modo, hemos podido optimizar la detección del ADN tumoral circulante a pesar de las grandes dificultades para encontrar la forma adecuada de hacerlo, ya que los sarcomas no presentan mutaciones demasiado prevalentes que se puedan utilizar en todos los casos (y las translocaciones son muy difíciles de encontrar en sangre). Con el sistema que hemos ideado, podemos seguir 10 fragmentos de ADN específicos del tumor, de tal forma que cada uno de ellos se puede considerar un biomarcador independiente. Seguir 10 biomarcadores (en lugar de 1, como suele hacerse) otorga una elevada robustez al sistema. Así, hemos sido capaces de detectar pacientes que han recaído, y hemos podido anticipar hasta 5 meses la detección de la recaída mediante este sistema. También nos ha servido para detectar restos de enfermedad después del tratamiento en algunos de los pacientes, los cuales han progresado rápidamente al finalizar el tratamiento. Por lo tanto, creemos que nuestro sistema puede ser clave para evaluar la efectividad de la terapia y que permitiría tomar la decisión clínica de prolongarla hasta que la carga tumoral en sangre sea indetectable.

Respecto al subproyecto de exosomas, hemos podido definir el procedimiento para aislar exosomas del plasma de pacientes. Debido a las limitaciones en la obtención de muestras de pacientes con sarcomas pediátricos, hemos considerado esencial determinar experimentalmente el mejor procedimiento posible para el estudio de estas muestras. Hemos dedicado una gran parte del proyecto a este objetivo, evaluando diversas opciones comerciales y no comerciales. Después de estos estudios, hemos identificado claramente la mejor opción, que se utilizará en futuros estudios para identificar biomarcadores de progresión. Hemos identificado patrones de expresión de proteínas y miARN que podrían estar relacionados con perfiles prometastásicos en células de sarcoma de Ewing. Estos resultados nos permitirán analizar en futuros proyectos si estos patrones de expresión están presentes en muestras de plasma de los pacientes y si se correlacionan con el desarrollo de la enfermedad. Hemos establecido las bases para el desarrollo de una nueva terapia en sarcoma de Ewing, basada en el uso de exosomas y herramientas de edición genética. La experiencia acumulada en este proyecto sobre el análisis de exosomas ha sido fundamental para

avanzar en el desarrollo de esta terapia. En futuros proyectos continuaremos avanzando en el desarrollo de esta aproximación a nivel preclínico. En resumen, la biopsia líquida ha venido para quedarse y proyectos como este consolidan su uso para mejorar el seguimiento de los pacientes y facilitar su futura implantación como rutina clínica.

4. Bibliografía científica generada

Artículos ya generados donde se cita la ayuda de la Fundació La Marató:

Giralt I, Gallo-Oller G, Navarro N, Zarzosa P, Pons G, Magdaleno A, Segura MF, Sánchez de Toledo J, Moreno L, Gallego S, Roma J.

Dickkopf Proteins and Their Role in Cancer: A Family of Wnt Antagonists with a Dual Role.

Int J Mol Sci. 2021 Nov 29;22(23):12921. doi: 10.3390/ph14080810. PMID: 34451907.

Zarzosa P, Garcia-Gilabert L, Hladun R, Guillén G, Gallo-Oller G, Pons G, Sansa-Girona J, Segura MF, Sánchez de Toledo J, Moreno L, Gallego S, Roma J.

Targeting the Hedgehog Pathway in Rhabdomyosarcoma.

Cancers (Basel). 2023 Jan 24;15(3):727. doi: 10.3390/cancers15030727. PMID: 36765685

Navarro N, Molist C, Sansa-Girona J, Zarzosa P, Gallo-Oller G, Pons G, Magdaleno A, Guillén G, Hladun R, Garrido M, Segura MF, Hontecillas-Prieto L, de Álava E, Ponsati B, Fernández-Carneado J, Almazán-Moga A, Vallès-Miret M, Farrera-Sinfreu J, de Toledo JS, Moreno L, Gallego S, Roma J.

Integrin alpha9 emerges as a key therapeutic target to reduce metastasis in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma.

Cell Mol Life Sci. 2022 Oct 11;79(11):546. doi: 10.1007/s00018-022-04557-y. PMID: 36221013.

Artículos en preparación donde se citará la ayuda de la Fundació La Marató:

Gallo-Oller G, *et al.*

A new strategy based on cfDNA follow up to improve the detection of relapses in childhood sarcomas.