



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

LA BIÒPSIA LÍQUIDA EN SARCAMES PEDIÀTRICS: DESXIFRANT EL POTENCIAL PREDICTIU DEL DNA TUMORAL CIRCULANT I DELS EXOSOMES TUMORALS PER A LA DETECCIÓ PRECOÇ DE RECAIGUDES

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. Resum

Antecedents del projecte

Els sarcomes constitueixen una àmplia família de càncers, entre els quals destaquen el rabdomiosarcoma (RMS), els sarcomes de parts toves no-RMS, l'osteosarcoma i el sarcoma d'Ewing per la seva malignitat i incidència relativament alta en pacients pediàtrics. A causa de la seva alta complexitat i la seva variabilitat biològica, els sarcomes han estat històricament poc estudiats en comparació amb els càncers més freqüents. En aquest sentit, el desenvolupament de nous mètodes destinats a detectar biomarcadors específics de recaiguda pot ser crucial per establir nous protocols d'avaluació de riscos per a aquestes neoplàsies, especialment en els casos propensos a la recaiguda.

Objectiu principal

El seguiment de la resposta del tumor durant i després del tractament ha portat avenços en la supervivència dels pacients, però encara falten biomarcadors precoços no invasius.

Metodologia

En aquest projecte, s'estudiaran dos components extracel·lulars clau de les cèl·lules cancerígenes: el DNA tumoral circulant lliure de cèl·lules (ctDNA) i els exosomes derivats del tumor amb l'objectiu d'estudiar-ne la correlació amb la càrrega tumoral.

Resultats esperats

El desenvolupament d'aquestes tecnologies associades a les biòpsies líquides obrirà noves vies per als marcadors biològics del càncer, amb el consegüent potencial de millora de la gestió clínica del pacient. L'objectiu del projecte és traduir la nostra experiència prèvia en tumors sòlids infantils i l'optimització de noves tecnologies en nous protocols de seguiment per permetre a curt termini una detecció més primerenca de les recaigudes. Una detecció precoç d'aquests marcadors pot permetre l'anticipació del diagnòstic de recaiguda i, per tant, permetre intensificar el seguiment o iniciar abans el tractament, per augmentar així les probabilitats de supervivència dels pacients amb sarcoma pediàtric.

2. Resultats

Els resultats obtinguts han permès demostrar la gran aplicabilitat clínica que podrà tenir la tecnologia de detecció del DNA circulant tumoral que hem desenvolupat gràcies a aquest projecte. Els resultats són tan esperançadors que tenim clar que aquest projecte no acaba aquí, sinó que la consecució d'aquest projecte gràcies a La Marató de TV3 ha estat clau per posar la pedra angular d'un nou sistema per avaluar la càrrega tumoral dels pacients amb sarcomes infantils; això no només es veurà reflectit en unes publicacions científiques, sinó que creiem que permetrà canviar i millorar el seguiment clínic dels pacients. Així, hem demostrat que la tecnologia que hem desenvolupat pot avaluar (amb una simple mostra de sang) el grau d'eficàcia de la teràpia i sobretot hem estat capaços, en alguns pacients, de detectar la recaiguda fins a 5 mesos abans que amb les tècniques convencionals. Aquest fet és molt complex en sarcomes (per la gran variabilitat mutacional que presenten, tot i tenir una taxa baixa de mutació) i per això creiem que les troballes són molt importants i que canviaran alguns paradigmes del seguiment i també del tractament d'aquests pacients. Una de les fites que perseguim és arribar a poder anticipar els nous tractaments en casos de recaiguda, fet que podria augmentar molt l'eficàcia dels tractaments de segona línia.

Així, ens hem trobat amb pacients en què els 10 marcadors tumorals seleccionats desapareixen en finalitzar el tractament i ja no tornen a aparèixer, cosa que indica que no hi ha cap senyal de malaltia. En altres casos hem trobat pacients en què, en acabar el tractament de primera línia, la malaltia segueix activa i són casos en què el càncer ha progressat ràpidament. En aquests casos, la positivitat ens indica que el tractament no ha estat prou efectiu. Tenim també casos que han respost bé durant la teràpia inicial però que han tingut una recaiguda posterior, durant el seguiment, que hem pogut detectar amb una anticipació de fins a 5 mesos mitjançant la tecnologia que hem desenvolupat. És evident que el sistema funciona i que pot tenir una aplicabilitat clínica molt rellevant. En la nova etapa del projecte que ara comença l'objectiu serà augmentar el nombre de pacients inclosos en l'estudi i valorar la seva correlació amb la clínica amb una cohort molt més gran i amb seguiments encara més llargs.

D'altra banda, s'ha pogut avançar molt en la investigació bàsica encara del paper dels exosomes i sobre com es poden utilitzar per detectar biomarcadors dins seu. Així, el projecte s'ha centrat en les característiques moleculars, especialment el perfil de

proteïnes i miRNA, dels exosomes en el plasma de pacients amb sarcomes pediàtrics amb l'objectiu d'identificar marcadors pronòstics i d'evolució de la malaltia. A causa de l'escassetat de mostres i pacients amb aquests tumors, s'ha dedicat molt d'esforç a trobar el millor mètode d'aïllament d'exosomes del plasma. Així, es va poder avaluar la purificació de vesícules plasmàtiques mitjançant columnes de cromatografia d'exclusió. Aquest mètode ha permès aïllar poblacions homogènies de vesícules, eliminant contaminants com l'albúmina, cosa que ha estat crucial per analitzar les mostres per proteòmica. Després d'optimitzar les millors columnes d'exclusió molecular, aquestes es van utilitzar amb mostres control proporcionades pel laboratori coordinador del projecte i van mostrar resultats homogenis tant en la proteïna present en les elucions com en el nombre de partícules analitzades. Un cop seleccionat el mètode d'aïllament de les vesícules es va encarar la caracterització molecular de les proteïnes i el miRNA que contenien. Gràcies a aquest treball s'ha pogut elaborar una llista de proteïnes i de miRNA que es poden utilitzar com a candidats a biomarcadors en fases posteriors per avaluar la malaltia. Finalment, també s'ha pogut optimitzar el sistema en mostres de biòpsies líquides de pacients amb sarcomes infantils, subministrades pel centre coordinador, i s'han pogut aïllar de forma positiva les vesícules presents en aquestes mostres.

Com a síntesi, podem afirmar que els resultats obtinguts en els dos subprojectes apunten a un fort potencial clínic per arribar a millorar la detecció de la malaltia i portar a terme un seguiment acurat i poc invasiu, ja sigui a través del DNA tumoral circulant o a través dels biomarcadors continguts en les vesícules.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Aquest projecte té un gran nombre d'implicacions clíniques i, tot i que estava pensat per tenir-les, els resultats que hem obtingut gràcies a aquest ajut han convertit l'elevat potencial que tenia el projecte en el seu inici en una ferma realitat per avançar cap a un millor seguiment dels pacients. Aquest millor seguiment suposarà una millora en la detecció de la malaltia (més sensibilitat i especificitat, amb un procediment menys invasiu i relativament ràpid). A més, la detecció més precoç de la malaltia pot arribar a suposar un inici més primerenc del tractament i, per tant, en pot augmentar l'eficàcia, fet que contribuirà a incrementar les taxes de supervivència. D'aquesta manera, hem

pogut optimitzar la detecció del DNA tumoral circulant. Vam tenir moltes dificultats per trobar la manera adequada de fer-ho, ja que els sarcomes no presenten mutacions gaire prevalents que es puguin utilitzar en tots els casos (i les translocacions cromosòmiques són molt difícils de trobar en sang) i amb el sistema que hem ideat podem seguir 10 fragments de DNA específics del tumor i cadascun d'ells es pot considerar un biomarcador independent. Seguir 10 biomarcadors (en lloc d'1, com se sol fer) dota d'una elevada robustesa el sistema. Així, hem estat capaços de detectar pacients que han recaigut, i hem pogut anticipar fins a 5 mesos la detecció de la recaiguda mitjançant aquest sistema. També ens ha servit per detectar restes de malaltia després del tractament en alguns dels pacients, els quals han progressat ràpidament en acabar el tractament. Per tant, creiem que el nostre sistema pot ser clau per avaluar l'efectivitat de la teràpia i, per tant, es podria prendre la decisió clínica de perllongar-la fins que la càrrega tumoral en sang sigui indetectable.

Pel que fa al subprojecte d'exosomes, hem pogut definir el procediment per aïllar exosomes del plasma dels pacients. A causa de les limitacions en l'obtenció de mostres de pacients amb sarcomes pediàtrics, hem considerat essencial determinar experimentalment el millor procediment possible per a l'estudi d'aquestes mostres. Hem dedicat una gran part del projecte a aquest objectiu, avaluant diverses opcions comercials i no comercials. Després d'aquests estudis, hem identificat clarament la millor opció, que s'utilitzarà en futurs estudis per identificar biomarcadors de progressió. Hem identificat patrons d'expressió de proteïnes i miRNA que podrien estar relacionats amb perfils prometastàtics en cèl·lules de sarcoma d'Ewing. Aquests resultats ens permetran analitzar en futurs projectes si aquests patrons d'expressió estan presents en mostres de plasma dels pacients i si es correlacionen amb el desenvolupament de la malaltia. L'experiència acumulada en aquest projecte sobre l'anàlisi d'exosomes ha estat fonamental per avançar en el desenvolupament d'aquesta teràpia. En futurs projectes continuarem avançant en el desenvolupament d'aquesta aproximació en l'àmbit preclínic.

En resum, la biòpsia líquida ha vingut per quedar-se, i projectes com aquest consoliden el seu ús per millorar el seguiment dels pacients i faciliten la seva implantació futura com a rutina clínica.

4. Bibliografia científica generada

Articles ja publicats en què s'esmenta l'ajut 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.

Articles en preparació en què s'esmentarà l'ajut 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.