

Identificación y caracterización de células madres cancerígenas (CMCs) en Sarcoma de Ewing

Introducción

Una célula madre o célula troncal es una célula que tiene capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir subtipos celulares de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad. La mayoría de tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño.

Las células madre cancerígenas (CMCs) son aquellas células propagadoras del tumor. Son células troncales que han sufrido alteraciones genéticas-fenotípicas que le provocan, entre otros cambios, desregulación del ciclo celular. De este modo las células se dividen sin control y generan las diferentes neoplasias. Las CMCs pese a sufrir los cambios mencionados conservan características de células troncales, como son mayor resistencia a factores externos (quimiorresistencia), autorrenovación, etc.

Hipótesis

Durante el proceso de división, las CMCs de los pacientes con Sarcoma de Ewing, dan lugar a dos células hijas, una de ellas mantiene las cualidades de célula madre, mientras que la otra pierde estas características de célula stem. Desde este punto de vista, observaremos dos poblaciones celulares: las CMCs y el resto de células tumorales no troncales. Las CMCs, de forma análoga a lo que ocurre en tejidos sanos, son las encargadas de generar y mantener el sarcoma, pero además por tratarse de células cancerígenas tienen la capacidad de propagar el tumor. De modo que a la hora de tratar un paciente con Sarcoma de Ewing, se debería incidir en la eliminación de las CMCs; puesto que si estas células sobreviven al tratamiento, por sus cualidades intrínsecas regenerarían el tumor provocando la recaída del paciente.

Objetivos originales

Identificación de células madre propagadoras de ES y de sus marcadores característicos:

- a. Identificar y caracterizar las células madre tumorales propagadoras de Sarcoma de Ewing.

- b. Comprobar que las células separadas tienen características de células troncales “in vivo”.
- c. Estudios epigenéticos para analizar el estado de metilación y/o acetilación de promotores, ya que potentes represores epigenéticos expresados de forma aberrante, producen el silenciamiento, entre otros, de genes supresores de tumores, lo que puede contribuir a la aparición de CMC.

Objetivos alcanzados

1.- Análisis e identificación de muestras de pacientes.

Se realizó la identificación de muestra de paciente que nos facilitaron desde el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona: Paciente Px → Se realizó disgregación mecánica y se establecieron explantes (pequeños fragmentos de 1 mm. aproximadamente) del tumor primario que se dejan adherir al flask y a partir del cual comienzan a crecer células en cultivo. El análisis consistió en ensayos de FISH Break-Apart y RT-PCR con el fin de identificar qué tipo fusión tiene la muestra de SE. El estudio se completó con un análisis de citometría de flujo con el que se intentó encontrar el marcador de CMCs en Sarcoma de Ewing *CD133* (*Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma; Suvà ML, et al. Cancer Res. 2009 Mar 1;69(5):1776-81. Epub 2009 Feb 10*).

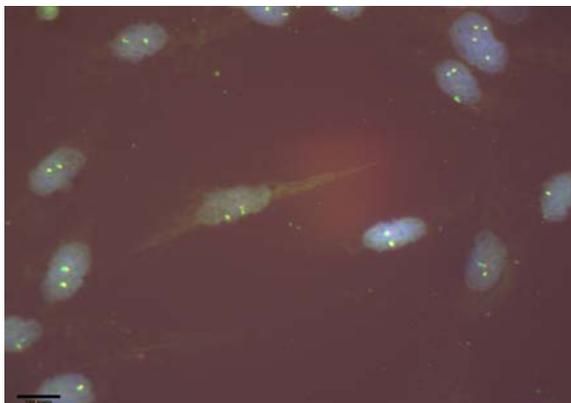


Fig. 1

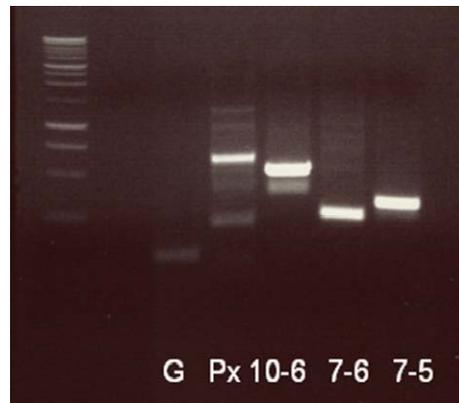


Fig.2

Los resultados de todos ellos fueron negativos para las alteraciones moleculares del Sarcoma de Ewing; el FISH (fig.1) mostró que no había traslocación y el patrón de banda de la muestra por RT-PCR (fig.2) no coincidía con ninguno de los patrones de banda de las fusiones señaladas en la imagen. Probablemente, la muestra perdió la representación de células tumorales y se enriqueció en fibroblastos. Esto impidió el inicio de la selección de CMCs a partir de la muestra de cultivo primario que nos facilitaron.

2.- Puesta a punto de obtención y aumento de la cantidad de muestra primaria de Sarcomas de Ewing:

Se ha diseñado un modelo basado en xenoinjertos murinos para procesar muestras primarias, y aumentar la cantidad de las mismas, con el fin de poder realizar los futuros estudios. Las muestras de pacientes, así como cultivos primarios que provienen de las mismas, son enviadas al laboratorio en medio de cultivo RPMI (10% FCS). Inoculamos las muestras en ratones NOD/SCID donde continúan su desarrollo: en el caso de fragmentos sólidos de SE se introduce una porción a nivel intraperitoneal. Las células de cultivo primario se inoculan junto a matrigel (proporción 1:1 v/v) en un número aproximado de 2×10^6 células/inoculo. Tras el progreso de tumor en el ratón se extrae y se disgrega mecánica-enzimáticamente para obtener cultivos primarios. Paralelamente otro fragmento del tumor que se ha desarrollado en el ratón se transfiere a otro ratón para continuar con el aumento de la cantidad de muestra.

Con este sistema se amplifica la cantidad de muestra de SE que se está desarrollando de una forma análoga a como ocurre en el paciente gracias a los xenoinjertos murinos. Con este método se impide la preselección o pérdida de poblaciones de células tumorales. Y además, obtenemos cultivos primarios para desarrollar estudios "in vitro".

3.- Comprobación del marcador CD133 de CMCs en Sarcoma de Ewing en líneas inmortalizadas.

Se realizó un estudio por citometría de flujo del marcador CD133. Dicho marcador propuesto en el artículo mencionado anteriormente, está presente en las células madres cancerígenas de Sarcoma de Ewing (suponen el 1% o menos del total de las células del sarcoma). Tras el análisis de las diferentes líneas de Sarcoma de Ewing el resultado fue negativo, es decir, ninguna línea presentaba el marcador. Esto no significa que no tengan CMCs, ya que con toda seguridad, el marcador CD133 sólo esté presente en ciertas poblaciones de CMCs.ientras que otras subpoblaciones cuentan con otros marcadores, pendientes de descripción.

4.- Selección de CMCs por quimiorresistencia a los fármacos Doxorubicina y Vincristina en líneas inmortalizadas de Sarcomas de Ewing.

Partimos de líneas inmortalizadas de SE a las cuales, mediante un ensayo de proliferación con MTT, se determinó sus respectivos IC_{50} (cantidad de fármaco necesario para inhibir a la mitad la proliferación de la población celular) para los fármacos Doxorubicina y Vincristina (fig.3).

Cell Lines	IC ₅₀ DXR (ng/ml)	Cell Lines	IC ₅₀ VCR (ng/ml)
ESCADO t(21;22) EWS/ERG fusions. (1q+)	171.65 +/- 14.98	ESCADO t(21;22) EWS/ERG fusions (1q+)	152.76 +/- 12.80
RDES t(11;22) 7-5 (1q+)	66.37 +/- 15.48	WE68 t(11;22) 7-6 (1q+)	17.66 +/- 1.05
STAET1 t(11;22) 7-6	64.83 +/- 8.02	STAET1 t(11;22) 7-6	14.15 +/- 0.58
WE68 t(11;22) 7-6 (1q+)	56.87 +/- 5.23	RDES t(11;22) 7-5 (1q+)	13.47 +/- 0.57
RM82 t(21;22) EWS/ERG(1q+)	37.65 +/- 8.58	RM82 t(21;22) EWS/ERG(1q+)	12.50 +/- 0.99
SKNMC t(11;22) 7-6	29.66 +/- 1.92	SKNMC t(11;22) 7-6	11.43 +/- 0.43

Fig.3

Una vez determinadas las correspondientes IC₅₀, se sometieron las diferentes líneas a un tratamiento de quimiorresistencia con cantidades crecientes de ambos fármacos. Además conservamos las líneas sin tratar a partir de las cuales realizamos la selección (células control). Tras varios meses de selección obtuvimos células resistentes que soportaban cantidades de fármaco elevadas (fig.4), entre las cuales, creemos que están las CMCs por sus cualidades intrínsecas de quimiorresistencia.

FÁRMACOS \ LINEAS	VINCRISTINA	DOXORRUBICINA
RDES (wt p30)	VCR 23 x IC50 (p44)	DXR 1,5 x IC50 (p32)
ES CADO (wt p19)	VCR 11 x IC50 (p40)	DXR 13 x IC50 (p20)
STAET 1 (wt p38)	VCR 14 x IC50 (p52)	DXR 15 x IC50 (p54)

Fig.4

De estas células seleccionadas con los fármacos y de las células control se extrajeron ADN, ARN y proteínas para su análisis. El ARN se ha utilizado para llevar a cabo arrays de expresión de tal modo que obtendremos gran información sobre aquellos genes que expresan. Entre éstos, esperamos encontrar marcadores de

células stem, de genes de resistencia, etc. Además validaremos estos resultados con RT-PCR y western blot para los cuales emplearemos las proteínas extraídas.