

### TERCERA MEMORIA ANUAL DE LA 4ª LÍNEA DE INVESTIGACIÓN DE LA FUNDACIÓN MARÍA GARCÍA ESTRADA-LAB PMS

El Laboratorio de Patología Molecular de Sarcomas (LAB-PMS) del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, dirigido por el Profesor de Investigación Dr. Enrique de Álava, concluye la tercera anualidad del proyecto apoyado por la Fundación María García Estrada. Gracias a la financiación de la Fundación, que se inició en el año 2009, Daniel J. García llevó cabo sus estudios predoctorales que culminarán con la defensa de la tesis en 2013.

Durante el trascurso del proyecto se profundizó en estudios sobre Sarcoma de Ewing (SE), un agresivo tumor de células pequeñas y redondas que aparece generalmente en los huesos y, menos frecuentemente, en tejidos blandos y que afecta fundamentalmente a niños y adolescentes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418671>). Al finalizar los tres años de investigación se alcanzaron los objetivos previstos: En un primer abordaje se realizaron estudios sobre las alteraciones genéticas secundarias, los cuales nos permitieron caracterizar un subgrupo de pacientes definidos por la firma 1qG. En segundo lugar (como consecuencia de los resultados obtenidos en el anterior objetivo) estudio preclínico del fármaco MLN4924 (Millenium) como posible tratamiento frente al SE.

#### Estudios sobre las alteraciones genéticas secundarias en Sarcoma de Ewing

A pesar de la amplia caracterización de la función de la fusión EWS-ETS en Sarcoma de Ewing, es escasa la información sobre el papel que juegan las alteraciones genéticas secundarias y su contribución a la clínica del sarcoma. La fusión *per se* carece de valor pronóstico por lo que es interesante profundizar en aquellas alteraciones complementarias que podrían explicar los mecanismos moleculares subyacentes a las formas más agresivas y de peor pronóstico. Tras el estudio en una serie de 67 tumores de alteraciones en el número de copias mediante hibridación genómica comparativa (CGH) se observó que el 31% de las muestras tumorales presentaban la firma 1qG. Esta firma se asocia a una breve supervivencia libre de enfermedad, así como un aumento de las recaídas; se trata pues de un novedoso parámetro pronóstico en la clínica del SE. Tras estos hallazgos se profundizó en el estudio transcriptómico de este perfil en otro grupo independiente de 37 muestras tumorales. El resultado permitió la asociación con un patrón de expresión relacionado con la desregulación del ciclo celular, definido por un aumento de la proliferación. En este estudio destacó la sobreexpresión de un gen implicado en la maquinaria de ubiquitinación (sistema implicado en la regulación de la degradación de proteínas) Cdt2. En conclusión, demostramos el valor potencial de la firma 1qG y sobreexpresión de Cdt2 como biomarcadores pronósticos así como posibles objetivos de nuevos compuestos terapéuticos diseñados contra la maquinaria de ubiquitinación proteica.

NOTA: Enlace al repositorio bibliográfico *Pubmed* (NCBI) de artículo relacionado con el apartado anterior.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822310>

## **Estudio preclínico del fármaco MLN4924 (Millenium) como posible tratamiento frente al Sarcoma de Ewing**

En cuanto al tratamiento clínico del Sarcoma de Ewing, previamente al uso de quimioterapia múltiple, la supervivencia de los pacientes de SE era inferior al 10%. El uso de terapias multimodales ha conseguido mejorarla, incrementándola hasta alcanzar la tasa actual del 70%. Sin embargo, el pronóstico de supervivencia de aquellos pacientes con enfermedad primaria diseminada o recaída se mantiene aún por debajo del 20%. Se hace evidente la necesidad de búsqueda de nuevas terapias dirigidas a estos grupos más problemáticos. Tras los estudios de la firma 1qG y la sobreexpresión de Cdt2, nuestra investigación se enfocó en la inhibición de los complejos cullin-RING ubiquitina ligasa (CRL) a través del inhibidor MLN4924.

En primer lugar, nuestros resultados apoyan una alta sensibilidad de las células de SE para la inhibición de la proliferación mediado por MLN4924 tanto *in vitro* (probado en 14 líneas de células de SE: mediana de IC50 = 81 nM) como en xenoinjertos de tumor (regresión tumoral conseguida con 60 mg/kg mediante doble inyección por vía subcutánea, n = 9). En segundo lugar, se describió el doble mecanismo molecular de acción de MLN4924 en células de SE: una amplia gama de moderadas concentraciones de MLN4924 (~ 30-300 nM) desencadenan una detención del ciclo celular en fase G2, que sólo puede ser rescatado por inhibición mediante fármaco de la quinasa WEE1o el silenciamiento de la misma. A dosis de saturación del compuesto (> 300 nM) causa un retraso en la progresión de la fase S debido al desequilibrio de los niveles relativos CDK2-Ciclina E/CDK2-Ciclina A: se produce un acúmulo del primero que concomitantemente provoca el agotamiento del segundo complejo. La pérdida de CDC6 en el núcleo en la etapa final de la fase de ciclo celular S, demuestra la pérdida de funciones del complejo CDK2-Ciclina A. Este estudio justifica el diseño de un ensayo clínico para el fármaco MLN4924 en Sarcoma de Ewing y aporta mecanismos moleculares para una mejor comprensión de este prometedor agente antitumoral.

NOTA: Enlace al repositorio bibliográfico *Pubmed* (NBCI) de artículo relacionado con el apartado anterior.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641220>

Finalmente, gracias a la consecución de los objetivos planteados y al esfuerzo de la Fundación María García Estrada, se inicia el siguiente proyecto conjunto, que corresponde a la quinta línea de investigación financiada por la FMGE, y que se titula:

## **Estudios de los inhibidores de Parp como tratamiento en el Sarcoma de Ewing: estudio preclínico**