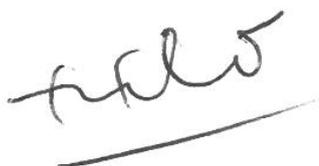


**La patogenia del Sarcoma de Ewing  
Implicaciones de las Células Madre Mesenquimales  
y Nuevas Estrategias Terapéuticas**

Tesis Doctoral titulada **“La patogenia del Sarcoma de Ewing. Implicaciones de las Células Madre Mesenquimales y Nuevas Estrategias Terapéuticas”** realizada por **Ana Teresa Monteiro Amaral** dirigida por:



**Dr. Enrique de Álava Casado**



**Dr. José Luís Ordoñez García**

## Índice

Glosario de Términos

Lista de Figuras

Lista de Tablas

|   |           |
|---|-----------|
| <b><u>Introducción</u></b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1. Introducción al Cáncer</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>2. El Sarcoma de Ewing</b> .....   | <b>6</b>  |
| 2.1. Características Clínicas y Pronóstico.....                                     | 6         |
| 2.2. <i>Standard of care</i> .....  | 8         |
| <b>3. El dilema de la origen celular del SE</b> .....                               | <b>10</b> |
| <b>3.1. La Célula Madre Mesenquimal: Definición del Término</b> .....               | <b>10</b> |
| 3.1.1. Caracterización y propiedades de las CMM.....                                | 11        |
| <b>3.2. La posible implicación de las CMM en la iniciación tumoral del SE</b> ..... | <b>13</b> |
| <b>4. La Patología Molecular del SE</b> .....                                       | <b>16</b> |
| <b>4.1. El transcripto de la fusión en el SE</b> .....                              | <b>16</b> |
| <b>4.2. CD99 como un target terapéutico en el SE</b> .....                          | <b>23</b> |
| <b>4.3 El eje IGF-1/ IGF-1R</b> .....   | <b>25</b> |
| 4.3.1 Relevancia clínica e implicaciones terapéuticas.....                          | 25        |
| 4.3.2 Anticuerpos Monoclonales Anti-IGF-1R.....                                     | 27        |
| <b>4.3.3 Pequeñas Moléculas</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>4.4 PARP1 e Inhibidores de PARP: Revisión general</b> .....                      | <b>31</b> |
| <b>5. Las rutas de reparación de daño del DNA</b> .....                             | <b>33</b> |
| 5.1 Inducción de daño del DNA.....  | 33        |
| 5.2 Activación de las rutas de reparación.....                                      | 35        |
| 5.3 Trabectedina: activación de NER y las demás rutas de                            |           |

|   |           |
|---|-----------|
| Reparación.....   | 38        |
| 5.4 Compuestos relacionados con Trabectedina y la activación de rutas. de reparación..... | 39        |
| 5.5 Olaparib y la activación de rutas de reparación.....                                  | 40        |
| <b><u>Hipótesis y Objetivos</u></b> .....   | <b>43</b> |
| <b><u>Material y Métodos</u></b> .....  | <b>47</b> |
| <b>1. Líneas Celulares y muestras</b> .....   | <b>49</b> |
| 1.1 Caracterización de las Líneas celulares .....   | 49        |
| 1.2 Células Stem Mesenquimales. Aislamiento, expansión y cultivo.....                     | 50        |
| 1.3 Muestras tumorales de SE.....   | 53        |
| <b>2. Ensayos con DNA</b> .....   | <b>54</b> |
| 2.1 Extracción de DNA .....   | 54        |
| 2.2 Ensayo de <i>laddering</i> .....  | 54        |
| 2.3 Ciclo Celular.....  | 55        |
| 2.4 <i>FISH</i> .....   | 55        |
| 2.4.1 Sondas EWSR1 y EWS-FLI1 .....   | 56        |
| 2.4.2 Sondas de PARP1 .....   | 57        |
| <b>3. Ensayos con RNA</b> .....   | <b>58</b> |
| 3.1 Extracción de RNA.....  | 58        |
| Purificación de RNA .....   | 59        |
| 3.2 Evaluación de la cualidad de RNA.....   | 60        |
| 3.3 Diseño de primers.....  | 62        |
| 3.4 RT-PCR Cuantitativa.....  | 62        |
| 3.5 <i>Low Density Micro Array</i> .....  | 64        |
| 3.5.1 Extracción de RNA.....  | 64        |
| 3.5.2 Síntesis de cDNA .....  | 65        |
| 3.5.3 PCR cuantitativa.....   | 65        |
| 3.5.4 Control de calidad.....   | 70        |
| 3.5.5 Genes de interés.....   | 70        |
| <b>4. Ensayos de Proteína</b> .....   | <b>71</b> |
| 4.1 Extracción de proteína.....   | 71        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2 Método de <i>Bradford</i> .....                      | 71        |
| 4.3 Electroforesis y Trasferencia.....                   | 72        |
| 4.4 Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado ..... | 74        |
| 4.5 Citometria de Flujo.....                             | 75        |
| 4.5.1 Detección de Caspase-3.....                        | 75        |
| 4.5.2 Citometria de flujo Multiparamétrica.....          | 75        |
| 4.6 Inmunofluorescencia.....                             | 77        |
| <b>5. Ensayos de migración y invasión.....</b>           | <b>79</b> |
| 5.1 Ensayos de Migración.....                            | 79        |
| 5.2 Ensayos de Invasión.....                             | 79        |
| 6. Ensayos de Proliferación Celular.....                 | 80        |
| <b>7. Ensayos de diferenciación.....</b>                 | <b>81</b> |
| 7.1 Osteogénica .....                                    | 81        |
| 7.2 Adipogénica .....                                    | 82        |
| 7.3 Condrogénica .....                                   | 83        |
| <b>8. Fármacos antitumorales.....</b>                    | <b>83</b> |
| <b>9. Ensayos <i>Ex vivo</i> .....</b>                   | <b>84</b> |
| <b>10. Ensayos <i>In vivo</i> .....</b>                  | <b>85</b> |
| 10.1 Xenografts.....                                     | 85        |
| 10.2 Tratamiento.....                                    | 86        |
| 10.3 Histopatología.....                                 | 87        |
| 10.4 Inmunohistoquímica.....                             | 88        |
| <b>11. Análisis Estadística.....</b>                     | <b>88</b> |
| 11.1 MFC .....   | 88        |
| 11.2 Análisis de Clúster.....                            | 89        |
| 11.3 IC50 y Índices de Combinación.....                  | 89        |

**Resultados.....91**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. La implicación del inmunofenotipo en la biología del SE y su tratamiento.....</b>     | <b>95</b> |
| 1.1. Caracterización de las CMM.....  | 97        |
| 1.2. Las CMM derivadas de pacientes con SE no presentan reordenamientos del gene EWSR1..... | 99        |

|   |            |
|---|------------|
| 1.3. Las CMM derivadas de pacientes con SE presentan una baja expresión de los marcadores de SE.....  | 101        |
| 1.4. El perfil de expresión de antígenos de membrana de las líneas celulares de SE es distinto del de las CMM.....  | 102        |
| 1.5. Las CMM derivadas de pacientes con SE expresan menos CD99 que las células de SE.....   | 106        |
| 1.6. CD99 se expresa de forma heterogénea en CMM derivadas de varios tipos de tejidos sanos.....  | 107        |
| 1.7. La inhibición de CD99 no conlleva a una disminución en la supervivencia de CMM.....  | 110        |
| <b>2. Estudios comparativos de la actividad de los derivados marinos Trabectedina , Zalypsis y Lurbinectedina en el SE.....</b>   | <b>113</b> |
| 2.1 Trabectedina inhibe la proliferación de las células de SE a dosis sub-nanomolares.....  | 115        |
| 2.2 Los derivados de Trabectedina inducen citotoxicidad en las células de SE.....   | 116        |
| 2.3 Zalypsis y Lurbinectedina son incapaces de superar la Resistencia a Trabectedina.....   | 119        |
| 2.4 Trabectedina, Zalypsis y Lurbinectedina inducen rupturas de doble cadena en el DNA de las células de SE.....  | 120        |
| 2.5 Trabectedina, Zalypsis y Lurbinectedina, inducen activación de las rutas de reparación del daño del <i>DNA</i> .....  | 122        |
| <b>3. La inhibición de la ruta de IGF1R .....</b>   | <b>127</b> |
| 3.1 Trabectedina disminuye la unión de EWSR1-FLI1 a las zonas de unión del DNA de algunos targets como TGFβR2 and CD99 e incrementa la unión al promotor de IGF-1R <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> ..... | 129        |
| 3.2 Actividad antitumoral de la combinación de Trabectedina y HAb AVE1642.....  | 132        |
| 3.3 Eficacia del inhibidor dual Linsitinib en combinación con Trabectedina.....   | 137        |
| <b>4. Estudios de la inhibición de PARP <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....</b>  | <b>143</b> |

|   |            |
|---|------------|
| 4.1 Las células de SE son especialmente sensibles al tratamiento con Olaparib, el cual induce acumulación en la fase G2/M, de forma independiente del estado de 1q.....             | 145        |
| 4.2 La combinación de Olaparib y Trabectedina es altamente sinérgica en las líneas de SE.....   | 148        |
| 4.3 La combinación de Olaparib y Trabectedina incrementa la inducción del daño en el DNA en las células de SE.....  | 151        |
| 4.4 Olaparib y/o Trabectedina inducen una desregulación de las rutas de reparación del daño en el DNA en las células de SE.....   | 154        |
| 4.5 La combinación de Olaparib y Trabectedina reducen drásticamente el crecimiento tumoral en un modelo <i>in vivo</i> de SE.....   | 158        |
| 4.6 La combinación de Olaparib y Trabectedina incrementa tanto la inducción del daño en el DNA como la activación de las rutas de reparación en el modelo <i>in vivo</i> de SE..... | 162        |
| <b><u>Discusión</u></b> .....   | <b>167</b> |
| <b>1. El papel de las Células Madre Mesenquimales en la biología del SE. El CD99 como target terapéutico.....</b>   | <b>169</b> |
| <b>2. Establecimiento de terapias innovadoras en el</b>   |            |
| <b>3. tratamiento del SE: Resultado de los estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....</b>   | <b>172</b> |
| 3.1. La relevancia de la administración de Trabectedina, Zalypsis y Lurbinectedina en el tratamiento del SE: resultado de los estudios <i>in vitro</i> .....                        | 172        |
| 3.2. La combinación del inhibidor dual Linsitinb con Trabectedina.....  | 174        |
| 3.3. Los inhibidores de PARP en el SE. La combinación de Olaparib con Trabectedina.....   | 178        |
| <b>3. Desenlace Final y Perspectivas Futuras.....</b>   | <b>182</b> |
| <b><u>Conclusiones</u></b> .....  | <b>187</b> |
| <b><u>Información Complementaria</u></b> .....  | <b>191</b> |
| <b><u>Bibliografía</u></b> .....  | <b>205</b> |

## Introducción

### **1. Introducción al Cáncer**

La organización mundial de la salud (OMS) publicó que el cáncer causa 7,6 millones de muertes anuales en todo el mundo (datos del 2008), representando una de las mayores causas de mortalidad en el hombre.

DeHanahan D y Weinberg R, han resumido y actualizado de forma brillante las principales características que permiten el desarrollo y crecimiento de las células tumorales:

- i) Capacidad de auto-supervivencia basada en señales de crecimiento;
- ii) Capacidad de superar señales inhibitorias;
- iii) Capacidad de evadir las señales de muerte y apoptosis;
- iv) Capacidad de replicación constante;
- v) Angiogénesis;
- vi) Capacidad de invasión y metástasis.

Recientemente, debido a los resultados obtenidos en la investigación en cáncer desde niveles básicos a pre-clínicos y clínicos, se han incorporado nuevas características. Éstas se encuentran relacionadas principalmente con el micromedioambiente tumoral, la capacidad para evadir el sistema inmune y la desregulación de los mecanismos que proporcionan la energía a la célula. Consecuentemente, se han añadido dos nuevas características: inestabilidad genética y/o mutación, así como la inflamación.

Los tumores de manera genérica se pueden dividir en dos grandes grupos: tumores hematológicos y tumores sólidos. Dentro de los tumores

sólidos, donde también hay muchísima complejidad, los tumores se pueden dividir en carcinomas, sarcomas, melanomas y tumores neurales, entre otros, dependiendo de la célula que les ha dado origen.

Los **Sarcomas** son un grupo de tumores sólidos raros, con una incidencia menor al 10% dentro del conjunto de los distintos tipos de cáncer. Estos tumores presentan un alto nivel de complejidad molecular/genética, y una diferenciación mesenquimal. En general, los sarcomas son más comunes en niños y adultos jóvenes y se diferencian unos de los otros a nivel molecular y en sus características patológicas. Desde un punto de vista genético, existen dos grupos de sarcomas: i) sarcomas con cariotipos complejos; ii) sarcomas con cariotipos sencillos y translocaciones cromosómicas balanceadas.

Dentro de todo el grupo de sarcomas, el Sarcoma de Ewing (SE) es el segundo sarcoma óseo más común en niños y adultos jóvenes, después del osteosarcoma.

## **2. El Sarcoma de Ewing**

### **2.1 Características clínicas y pronóstico**

El SE es un sarcoma de células pequeñas y redondas, que representa entre el 6-8% de los tumores óseos primarios. Este tipo de tumor, tiene una incidencia mayor en hombres que en mujeres, con un ratio de 1.4 a 1. Prácticamente el 80% de los pacientes de SE tienen menos de 20 años de edad y el pico de incidencia surge durante la segunda década de la vida.

Desde el punto de vista molecular, el SE se caracteriza por la presencia de translocaciones balanceadas recurrentes que implican, en más del 95% de

los casos, el gen EWSR1 localizado en el cromosoma 22 y un miembro de la familia de factores de transcripción ETS. Los distintos tipos de translocaciones en SE serán explicados y discutidos más adelante. Estas translocaciones conducen a la formación de genes de fusión que son un elemento clave en la patogénesis de estos tumores. Las proteínas de fusión EWSR1-ETS activan o reprimen determinados conjuntos de genes diana que, junto con el momento y el contexto celular adecuados, dan lugar al fenotipo maligno del SE.

La presentación clínica del SE puede incluir un dolor intenso, lo suficiente como para despertar a los pacientes (96%), con o sin una masa en el área afectada (61%). Por otra parte, también se ha observado fiebre intermitente (21%), anemia. Las fracturas (16%) en el momento del diagnóstico son infrecuentes. Desde el punto de vista Radiográfico, la observación de una lesión osteolítica mal definida que implica la diáfisis de un hueso largo es el rasgo más común. La destrucción ósea a menudo asociada con "piel de cebolla"-como reacción perióstica de varias capas es también característica. Una masa de tejido blando grande, mal definida es una asociación frecuente. La resonancia magnética ayuda a demostrar la extensión del tumor en el hueso y el tejido blando. Los sitios más frecuentes de localización del tumor en orden decreciente son:

- i) La diáfisis o la metáfisis - porción diafisaria de los huesos largos (fémur, tibia, húmero);
- ii) la pelvis y las costillas;
- iii) Otros huesos, como el cráneo, vértebras, escápula y los huesos tubulares cortos de manos y pies;
- iv) solamente alrededor del 10% de los casos son extra-esqueléticos.

El pronóstico en el SE ha mejorado considerablemente con el tratamiento actual, y aproximadamente dos tercios de los pacientes muestran una remisión de la enfermedad. Sin embargo, los resultados para los pacientes con enfermedad diseminada o recaída temprana siguen siendo desalentadores, y la presencia de enfermedad metastásica es un factor pronóstico adverso. Otras características pronósticas importantes incluyen el estadio, la localización anatómica y el tamaño del tumor. La evaluación histopatológica de necrosis tumoral después de la quimioterapia de inducción también tiene valor pronóstico. Además también se han descrito varias características moleculares que confieren valor pronóstico, incluyendo el estado de p53, pérdida INK4A, expresión de la telomerasa, porcentaje del genoma alterado, y aberraciones cromosómicas adicionales, tales como ganancias del cromosoma 1q. Sin embargo, la aplicación clínica de los factores pronósticos moleculares aún requiere de la validación en estudios cooperativos prospectivos.

Inicialmente, el subtipo molecular EWSR1-FLI1 parecía proporcionar información pronóstica. Así, entre los tumores EWSR1-FLI1, aquellos con el tipo más común, tipo 1, con fusiones EWSR1 exón 7/FLI1 exón 6, parecían conferir un mejor pronóstico en estudios prospectivos que los tumores con otros transcritos EWSR1-FLI1. Sin embargo, el uso de regímenes terapéuticos más intensivos y el desarrollo de estudios prospectivos parecen haber eliminado estas diferencias.

## **2.2 Standard of Care**

La terapia local complementada con quimioterapia / radioterapia es el tratamiento de referencia actual para un gran número de tumores malignos sólidos, incluyendo el SE. En consecuencia, este tipo de tratamiento no se dirige específicamente a los mecanismos patogénicos de las células madre embrionarias, y la resistencia a los fármacos- surge con elevada frecuencia. La terapia de primera línea consiste en una terapia de un neoadyuvante, por lo general con la combinación de 4-6 agentes quimioterapéuticos entre vincristina (V), doxorrubicina (DXR) (D), etopósido (E), ciclofosfamida (C), ifosfamida (I) y / o dactinomicina (D) también llamada actinomicina-D (a), seguida de cirugía y / o radioterapia siempre que sea recomendado.

La combinación más ampliamente empleada en Europa es la VIDE / VAI mientras que en los EE.UU. es la VDC/IE. Estos tratamientos multimodales son capaces de aumentar la supervivencia global hasta 75% en la enfermedad localizada. Sin embargo, en los casos de enfermedad multifocal, la supervivencia global es inferior al 20%.

En el marco del ensayo clínico Euro-EWING99 (NCT00020566) los pacientes que presentaban SE multifocales primarios o diseminados, se les trató con varios ciclos de combinaciones terapéuticas multimodales de VIDE, VAI, radioterapia, cirugía y la quimioterapia de alto grado (busulfán - melfalán) con trasplante de células madre autólogas. El resultado de este estudio reveló que el mejor enfoque es la combinación de un tratamiento local con cirugía y / o radioterapia combinada con estrategias multimodales intensivas. En este sentido, los resultados de este ensayo clínico prospectivo determinaron una falta de beneficio pronóstico relacionado con el subtipo molecular de la fusión

EWSR1-FLI1, en contraste con lo descrito en estudios retrospectivos anteriores, en los que se había incluido un número más pequeño de pacientes.

En el marco del ensayo clínico de Fase III, EWING 2008 (NCT00987636), los pacientes con SE localizado y diseminado han sido randomizados en tres grandes grupos según el riesgo base: 1) pacientes con enfermedad localizada con un volumen tumoral <200ml están siendo tratados con ácido zoledrónico y o *retinoid derivative fenretinide* además de la quimioterapia de inducción (VIDE); 2) los pacientes con enfermedad localizada /metástasis con un volumen tumoral > 200ml están siendo tratados con quimioterapia de alto dosis (busulfán-melfalán) y el trasplante autólogo de células madre; 3) los pacientes con enfermedad diseminada primaria, están siendo tratados con 8 ciclos de quimioterapia adyuvante estándar (VIDE / VAI) ,seguido de altas dosis de quimioterapia de alta dosis (treosulfano - melfalán) acompañado de trasplante autólogo de células madre.

En cuanto a los pacientes con recidiva y metástasis, hay varios ensayos clínicos en curso actualmente. Estos estudios incluyen: el tratamiento con Trabectedina y su compuesto análogo Zalypsis (NCT 01222767); Dasatinib un inhibidor de tirosina quinasas de la familia Src (NCT01643278); o el bortezomib, un inhibidor de proteasoma (NCT00027716), entre otros, en monoterapia, así como en combinación.

### **3. El dilema de la histogénesis del SE**

El origen del SE ha sido durante mucho tiempo un foco de investigación. De hecho, en un principio, las células madre neurales (NSC) se señalaron

como la célula de origen más probable del SE. Recientemente algunos estudios han mostrado que las células madre de la cresta neural (NCSC) son un tipo de célula permisiva a la transducción de la fusión del SE Sin embargo, el estudio y caracterización en profundidad de las células madre mesenquimales (MSC), indican que la MSC podría ser la célula de origen más plausible del SE.

### **3.1 La célula madre mesenquimal: Definición del término**

El sistema de células del estroma ha sido un claro objeto de estudio e interés durante los últimos años. De hecho, hay tres principales tipos celulares en la médula ósea: hematopoyéticas, endoteliales y del estroma. MSC residen en la médula ósea y son células estromales no hematopoyéticas que se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y por exhibir una capacidad de diferenciación multilínea. Las MSC en el cuerpo humano funcionan como reservorios de células reparadoras, que pueden ser movilizadas en el tejido dañado, donde se diferencian y reparan el daño. Entre los acontecimientos que pueden movilizar las MSC se pueden incluir trauma, fractura, inflamación, necrosis o tumores. Por otra parte, la quimiotaxis también puede desempeñar un papel importante en el destino de las MSC.

Las MSC fueron inicialmente aisladas de la médula ósea, estroma de bazo y del timo y se definieron como fibroblastos. Más tarde, aspirados de médula ósea fueron considerados la fuente más accesible y enriquecida de MSC. Sin embargo, en los últimos años, las MSC se han aislado con éxito a partir de tejidos como cartílago, periostio, membrana sinovial, líquido sinovial, músculo y

tendones. También se ha descrito que el tejido fetal, la placenta, la sangre umbilical y el tejido vascular también contienen MSCs.

### **3.1.1 Caracterización y propiedades de MSC: inmunofenotipo, capacidad de diferenciación y aplicaciones clínicas**

La Sociedad Internacional de Terapia Celular, declaró que " células estromales mesenquimales multipotentes" es la denominación que actualmente se recomienda para el tipo celular a menudo denominado como MSC. El principal problema de acuerdo con esta organización es que la caracterización particular de MSC es todavía inconsistente entre los investigadores. Además, muchos laboratorios han aislado y expandido MSC de una gran variedad de tejidos y se han observado diferencias significativas entre las poblaciones de los distintos laboratorios.

Para abordar este problema se propusieron tres criterios que permitieran clarificar y unificar la investigación basada en el MSC:

- i) Capacidad de adherirse al plástico;
- ii) la expresión específica de antígenos de superficie;
- iii) potencial de diferenciación Multipotente.

Las MSC deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar utilizando frascos de cultivo de plástico. La adherencia al plástico es una propiedad bien descrita de las MSC. A nivel de expresión antigénica, por lo menos el 95% de la población MSC debe expresar:

CD105 (conocido como endoglina), CD73 (conocida como ecto 5 'nucleotidasa) y CD90 (conocida como Thy-1). Por otra parte, las MSC no deben expresar (<2%): CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19 y el receptor de HLA-DR. Las MSC expresan numerosos receptores importantes para la adhesión celular con las células hematopoyéticas. Estos incluyen las familias de integrina, la expresión de moléculas de adhesión intracelular (ICAM) y la molécula de adhesión vascular (VCAM).

Para asegurar la pureza de esta población se recomienda demostrar la falta de expresión de antígenos hematopoyéticos, tales como el marcador pan-leucocitario CD45 y CD34, los cuales son expresados por los progenitores hematopoyéticos primitivos y las células endoteliales. Por otra parte existen antígenos que se expresan principalmente por monocitos y macrófagos y también marcadores de células B tales como CD79 $\alpha$  y CD19. Las MSC son no inmunogénicas, por lo que no deben expresar moléculas HLA-DR en condiciones normales. Por último, las MSC deben ser capaces de diferenciarse a diversos tipos de células. Cuando se utilizan condiciones estándar de crecimiento *in vitro*, deben ser capaces de diferenciarse en, al menos, osteoblastos, condroblastos y adipoblastos.

### **3.2 La posible implicación de MSC en la iniciación del ES: hechos y relevancia**

El origen del SE ha sido objeto de gran interés en los últimos años. Recientemente, la célula mesenquimal ha sido propuesta como la posibilidad

más aceptable del origen de este tumor. De hecho, varios estudios se han centrado en las MSC como célula de origen de diferentes sarcomas, tales como el sarcoma sinovial, liposarcoma, y el SE.

Se ha determinado que la acumulación de alteraciones genéticas en MSC cultivadas a largo plazo dio lugar al desarrollo de células tumorales espontáneas-tipo sarcoma y posterior transformación en células de leiomioma. De manera semejante, en el liposarcoma, la expresión ectópica de la proteína quimérica FUS-CHOP acoplada a la deficiencia de p53, resultó en la transformación de MSC en células de liposarcoma. Además, en el sarcoma sinovial, el silenciamiento de la proteína de fusión SYT-SSX1 en las células tumorales cambió el crecimiento en de las sarcoesferas de las células tumorales a un crecimiento en monocapa de células con un mayor potencial de diferenciación seguido por la expresión de genes MSC. Además, un estudio reciente realizado en osteosarcoma, comparó MSC transformadas espontáneamente con muestras tumorales de un conjunto de pacientes de osteosarcoma y determinó que la pérdida de *cdKn2/p16* podría ser un evento temprano importante en el desarrollo de este tumor favoreciendo de este modo un origen MSC probable para el osteosarcoma. También en el osteosarcoma, la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) en MSC llevó al desarrollo de grupos de células con capacidad de diferenciación. Sin embargo, este experimento también demostró que a pesar de esta semejanza en capacidad pluripotente con las MSC, estas células eran altamente tumorigénicas y presentaban un perfil de expresión similar a las células de osteosarcoma y drásticamente distinta de las MSC parentales.

Particularmente en SE, datos iniciales mostraron que el silenciamiento de la proteína de fusión EWSR1-FLI1 en las células tumorales de SE resultaba en un aumento de la expresión de marcadores de MSC, así como en un aumento de la capacidad de diferenciación en las células tumorales silenciadas. Curiosamente, a largo plazo las células de SE silenciadas para la fusión mostraron un potencial de diferenciación superior en comparación con las células de SE silenciadas a corto plazo, lo que demuestra que la fusión quimérica bloquea la diferenciación en las células de SE. En consecuencia, la disminución de la expresión de la fusión cambia la expresión de SE a un perfil más mesenquimal. Además, el enfoque opuesto, que consiste en la expresión ectópica de la proteína de fusión en MSC de ratón, condujo a la formación de células tumorigénicas con fuerte expresión de CD99 y con dependencia de IGF1, característica intrínseca de las células de SE. Más tarde, un pequeño grupo de células dentro de la población total de las líneas celulares de SE se caracterizaron como células madre cancerosas. Este grupo de células presenta un potencial de diferenciación similar al de las MSC y con mantenimiento de la capacidad tumorigénica incluso cuando se inocularon en un pequeño número de células en ratones.

A pesar de las pruebas descritas anteriormente, los datos recientes también sugieren que las NCSC no son solamente permisivas a la expresión de la proteína de fusión de SE, sino que la expresión de la proteína de fusión es también capaz de iniciar la transición a las células de SE, lo que demostraría un posible origen neuro-mesenquimal de SE.

## **4. La Patología Molecular del SE**

En cuanto a la Patología Molecular del SE algunos aspectos particulares parecen ser cruciales para el desarrollo y mantenimiento de los tumores: la transcripción de la fusión, la expresión de CD99, la vía IGF1-IG1R, y la ganancia de 1q y de los genes como PARP1 localizados en esta región del genoma.

### **4.1 El Transcripto de SE**

El SE se caracteriza por la presencia de translocaciones cromosómicas aberrantes que dan lugar a proteínas quiméricas, implicando típicamente el gen EWSR1 y un miembro de la familia ETS. La translocación  $t(11; 22)(q24; q12)$  es la más común en el SE y se produce entre los genes EWSR1 y FLI1 y provoca, la sobre-expresión de genes diana, directos e indirectos, tales como CD99, IGF1, TERT, HSP, CAV1, TOPK entre otros, y a la desregulación de IGFBP3 o p21. Translocaciones entre el gen EWSR1 y otros genes pertenecientes a la familia ETS, como ERG, ETV1, ETV4 o FEV son menos frecuentes en SE.

#### **4.1.1 EWSR1-FLI1 como diana terapéutica**

La expresión de la proteína de fusión oncogénica EWSR1-FLI1 en las células tumorales, la convierte en un candidato muy atractivo en términos de terapia dirigida. A pesar de la idea común de que los factores de transcripción se consideran a menudo “*undruggable*”, trabajos recientes han demostrado que

ciertos compuestos, bien agentes quimioterapéuticos o pequeñas moléculas y péptidos, podrían presentar cierta especificidad interfiriendo la actividad de EWSR1-FLI1 y por lo tanto actuando como agentes citotóxicos para las células de SE:

- i) mitramicina;
- ii) YK-4-279;
- iii) Ara-C;
- iv) Trabectedina y compuestos relacionados.

En un estudio de alta resolución, que incluía 50.000 compuestos farmacológicos destacó la mitramicina por su especificidad hacia las células portadoras de translocaciones EWSR1-FLI1. Estudios *in vivo* e *in vitro* corroboraron que la mitramicina inhibe la actividad EWSR1-FLI1, desregulando sus genes diana. La Mitramicina ha demostrado actividad como agente antineoplásico, y sus parámetros de seguridad de fase I ya han sido superados en otras neoplasias. Actualmente se están reclutando pacientes de SE para realizar un estudio de fase I / II con mitramicina en monoterapia en pacientes portadores de la translocación EWSR1-FLI1 (NCT01610570), y otros tumores sólidos en los niños y adultos.

La pequeña molécula **YK-4-279**, específicamente el enantiómero (S)-YK-4.279, también ha mostrado resultados prometedores en términos de desregulación de EWSR1-FLI1, sobre todo mediante la interrupción de la unión de esta proteína oncogénica con la RNA helicasa A (RHA). Este agente bloquea la interacción entre el factor de transcripción y la RHA, que aparentemente es

relevante en la mejora de la actividad oncogénica de EWSR1-FLI1. Estudios preclínicos revelaron que el tratamiento con YK-4-279 dio lugar a inducción de apoptosis y reducción del tumor en xenoinjertos de SE.

También **ARA-C**, citosina arabinosa, fue identificada a través de un estudio de alta resolución que empleó arrays de expresión de alta densidad. Ara-C es un compuesto capaz de atenuar la firma transcripcional de EWSR1-FLI1. En consecuencia, ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que Ara-C induce la muerte celular y disminuye el crecimiento tumoral en xenoinjertos. Este hecho se justifica principalmente por la reducción de la expresión de la proteína quimérica EWSR1-FLI1 en células de SE durante el tratamiento con Ara-C. Sin embargo, otro trabajo evaluó la sensibilidad de un gran panel de líneas celulares de tumores pediátricos (n = 23) a la acción de Ara-C. En este estudio *in vivo* en xenoinjertos de SE se observó que en comparación con otros tumores, las células de SE no eran particularmente sensibles a Ara-C.

Finalmente, **Trabectedina**, también conocida como ET-743 o Yondelis, es un compuesto de origen marino, desarrollado actualmente a través de una técnica semi-sintética, que ha sido estudiado intensivamente por su conocida actividad anti-tumoral. Trabectedina es particularmente tóxica en sarcomas con translocaciones. De hecho, en el liposarcoma mixoide, Trabectedina down regula la unión de FUS-CHOP a las regiones promotoras de los genes regulados por esta proteína quimérica, apoyando así la especificidad particular de este agente hacia a este tipo de sarcomas.

Visto que las células de SE se caracterizan por la presencia de factores de transcripción con homología estructural y funcional con FUS-CHOP, Trabectedina representa un agente terapéutico prometedor. Observaciones recientes sugieren que la Trabectedina se puede dirigir específicamente a translocaciones cromosómicas EWSR1-FLI1 presentes en SE. Estos estudios mostraron cómo la Trabectedina interfiere directamente con la actividad transcripcional de EWSR1-FLI1. Además, varios estudios describen que este agente es uno de los antitumorales *in vitro* más potentes en el SE.

Pese a la gran sensibilidad de las células de SE frente a la Trabectedina, la resistencia observada se ha relacionado con un aumento de la expresión del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF1R) y del receptor de insulina (IR), así como una sobre expresión de la glicoproteína-P. Además, la inhibición de EWSR1-FLI1, aumenta la sensibilidad a la acción de los inhibidores de IGF-1R .

Curiosamente, un manuscrito reciente publicado por Germano *et al* informa que la Trabectedina puede tener también un papel importante en la inhibición de la angiogénesis y la reducción de macrófagos asociados al tumor, contribuyendo, por lo tanto, a la reducción del tumor. Este trabajo incluyó un estudio *in vitro*, y modelos *in vivo* de xenoinjertos de sarcomas pero no de SE. En la clínica, Trabectedina ya ha terminado los estudios de Fase I en tumores sólidos pediátricos (NCT01453283), así como estudios Fase II en pacientes pediátricos de SE en recaída y refractarios (NCT00070109). A pesar de ser

seguro en las dosis probadas, resultó ser no ser lo suficientemente eficaz para detener el crecimiento tumoral administrado como agente en monoterapia.

#### 4.1.2 Compuestos relacionados con la Trabectedina

El desarrollo de la Trabectedina condujo a la creación de un nuevo grupo de agentes relacionados con este fármaco, que incluye PM00104 (**Zalypsis**) y PM01183 (**Lurbinectidin**). Este grupo particular de compuestos presenta una estructura común básica compuesta por dos anillos de tetrahidroisoquinolina (A y B) responsables del reconocimiento y unión al DNA y, y una tercera unidad, el anillo C, que se proyecta hacia fuera del surco menor, por lo tanto incapaz de entrar en contacto con el DNA, y que es responsable de la interacción con las proteínas nucleares.

PM00104 o **Zalypsis** es una tetrahidroisoquinolina semi-sintética nueva con actividad citotóxica demostrada en neoplasias hematológicas y otros tipos de células tumorales *in vitro*, incluyendo SE. Los estudios iniciales con Zalypsis mostraron que, al igual que Trabectedina, este compuesto es un potente inductor de rupturas de doble cadena (DSB), detectadas por la presencia de  $\gamma$ H2Ax tanto en células NER deficientes como competentes. En este estudio, las líneas celulares de SE TC71 y TC32, presentaron una sensibilidad ligeramente superior a la Trabectedina en comparación con Zalypsis. Otra conclusión importante de este estudio tiene que ver con la evaluación del anillo C y de su valor estructural en términos de unión al DNA y activación de los mecanismos de reparación. El daño al DNA, inducido por Zalypsis es, al

contrario de Trabectedin, independiente de NER.

Un estudio más global, incluyendo 24 líneas celulares de cáncer de diversos tumores sólidos (próstata, páncreas, ovario, pulmón, hígado, riñón, estómago, colon, vejiga y mama) y tumores hematológicos (líneas celulares de leucemia), sugiere que Zalypsis es capaz de unirse al DNA desnudo y metilado (islas CpG), y forma aductos en puntos G específicas del DNA (GGC; AGC; AGG; TGG; CGG), diferentes de los de la Trabectedina (TGG; CGG; AGC; GGC). Más importante aún, las observaciones de este estudio también sugieren que Zalypsis, a pesar de la formación de aductos en zonas G específicas de la doble hélice, es de alguna manera capaz de escapar de la maquinaria NER, probablemente debido a la estructura del anillo C.

Curiosamente, Zalypsis fue descrito como uno de los agentes citotóxicos más potentes en el mieloma múltiple. Un primer estudio mostró que Zalypsis era un potente inductor de DSB y de apoptosis en estudios *in vitro* e *in vivo* de mieloma múltiple. De hecho, incluso las líneas celulares resistentes a agentes anti mieloma fueron sensibles a este compuesto. Zalypsis actúa selectivamente en las células tumorales sin afectar la población de células madre de medula ósea normal. Más tarde, otro estudio observó que este agente también es capaz de inducir la muerte celular por inducción de DSB seguida de una reparación ineficaz del daño del DNA. En la clínica, Zalypsis ya ha llegado a la conclusión de la Fase II en SE metastásicos y en recaída (NCT01222767) y la Fase I en tumores sólidos avanzados / linfoma (NCT00359294).

Poco se sabe sobre **Lurbinectedin**, inicialmente conocido como PM01183.

Este compuesto fue descrito como un agente alquilante con una estructura química similar a la de Trabectedina (subunidades A y B), donde las principales diferencias son con respecto al anillo C. En un primer estudio, Lurbinectedin mostró capacidad de inducir DSB y parada de ciclo celular en fase S en diversas líneas celulares tumorales (cáncer de mama, carcinoma de pulmón, adenocarcinoma / carcinoma colorrectal, carcinoma de ovario, entre otros). Sin embargo, este estudio no incluyó líneas celulares de sarcoma.

Lurbinectedin se encuentra actualmente en CT fase I en pacientes con leucemia aguda (NCT01314599) y en fase II en cáncer de mama (NCT01525589).

#### **4.2 CD99: un antígeno sobre expresado y una posible diana en SE**

**CD99**, o MIC2, es un receptor de membrana celular de 32 kDa sobre-expresado en casi todas las células de SE (más del 90%). En el tejido normal, una alta expresión de CD99 se puede observar en los timocitos corticales, células de los islotes pancreáticos, células de la granulosa de ovario y células de Sertoli de los testículos. En el sistema hematológico, las células CD34 positivas presentes en la médula ósea también muestran alta expresión de CD99, especialmente en todos los linajes de leucocitos. En neoplasias, la alta expresión de CD99 no es exclusiva de SE y también se puede encontrar en linfoma / leucemia y a veces también en el sarcoma sinovial, condrosarcoma mesenquimal y rhabdomiosarcoma.

CD99 se ha descrito como fundamental en procesos tales como adhesión, migración, apoptosis y la regulación del tráfico intracelular de proteínas de membrana. Esta glicoproteína es esencial para la adecuada diferenciación de las células T y timocitos. Además, esta proteína es crítica para la correcta diapédesis de los leucocitos. CD99 se expresa de forma difusa en la membrana celular de los leucocitos, sin embargo, puesto que es necesario para la finalización de la diapédesis a los sitios inflamatorios, se sobre expresa y se concentra en las barreras de membrana entre leucocitos y células endoteliales. Evidencias también sugieren una relación entre CD99 y la diferenciación osteoblástica, a través del factor de transcripción RUNX2, clave en el proceso de osteoblastogénesis.

En osteosarcoma, cuando CD99 está sobre expresado, hay una reducción en la malignidad, con reducción de la migración, reducción de la resistencia a anoikis, reducción de la capacidad de inducir la formación de tumores y metástasis *in vivo*. De hecho, los efectos particulares sobre la migración celular fueron posteriormente atribuidos a la inhibición de la actividad ROCK2.

Varios trabajos han definido que, junto con el gen de fusión de SE, CD99 representa el acontecimiento molecular más característico en la biología del SE. A pesar de esto, la sobreexpresión de CD99 es muy inespecífica ya que esta característica es compartida con otras neoplasias. No obstante, la funcionalidad de CD99 sigue sin definirse. Estudios recientes han determinado que CD99 es crucial para la malignidad de las células de SE y por lo tanto una

potencial diana terapéutica. Las células de SE de la línea celular TC71, que presentan una muy alta expresión de CD99, fueron sometidas a una inhibición estable de la expresión de CD99. Esta inhibición provocó un crecimiento dependiente de anclaje inferior al habitual, así como una disminución significativa en la capacidad de migración. Además, la inhibición de CD99 indujo una disminución en la formación y crecimiento del tumor, y en la formación de metástasis. Tanto la tumorigenicidad como la capacidad de generar metástasis se recuperaron cuando se restableció la expresión de CD99.

De hecho, evidencias anteriores han mostrado que hay una conexión entre la proteína quimérica EWSR1-FLI1 y CD99, debido principalmente a la presencia de miRNAs, lo que sugiere que CD99 está regulada por EWSR1-FLI1. En consecuencia, CD99 es el responsable de mantener el fenotipo oncogénico y la diferenciación del SE.

CD99 representa una diana de tratamiento muy atractiva, ya que se encuentra en la casi totalidad de las células tumorales. Scotlandi *et al* mostraron que la inhibición con un anticuerpo monoclonal específico para CD99 conduce a la muerte celular a través de apoptosis. De hecho, la combinación de doxorubicina y 0662, un anticuerpo monoclonal anti-CD99, no sólo aumentó la apoptosis sino, también, la reducción de la formación de tumores en ratones xenografts.

### 4.3 El eje de IGF-1 / IGF-1R

#### 4.3.1 Relevancia clínica y las implicaciones

Una de las dianas downstream mejor descritas de la fusión EWSR1-FLI1S es la vía de IGF-1 / IGF-1R. IGF-1R es un receptor tirosina-quinasa (TK) situado en la membrana celular, que está formado por 4 subunidades, dos unidades ubicadas en la parte extracelular de la membrana celular y otros dos transmembrana. De hecho todo el sistema involucra a varios receptores de TK: IGF-1R; Receptor de insulina (IR) (isoformas A y B), híbrido de los receptores de IGF-1R y el IGF-2R, así como ligandos: el IGF-1, IGF-2 e insulina. Además, las proteínas de unión a IGF (IGFBP) juegan un papel importante en el bloqueo de IGF-1 e IGF-2 a partir de la activación de los respectivos receptores.. En condiciones fisiológicas la unión entre el receptor de IGF-1R y su ligando, el IGF-1, son críticos en términos de crecimiento y diferenciación celular.

La activación de IGF1R se produce por una unión reversible de IGF-1 que puede conducir a la dimerización del receptor y la activación del IGF-1R próximo, mejorando por lo tanto, la activación de la vía. Inmediatamente, una cascada de dianas downstream se activan. La cascada de IGF-1R también se puede mejorar por la internalización del receptor activado través del citoplasma en vesículas recubiertas por caveolina o vesículas de clatrina

IGF-1R es una diana terapéutica atractiva en SE ya que es una conocida diana regulada por EWSR1-FLI-1. Particularmente, se ha observado que *in vitro*, las células de SE muestran una reducción de la expresión de IGFBP-3 con un

exceso de expresión y activación constitutiva de IGF-1R y sus dianas downstream. Curiosamente, estudios *ex vivo* han mostrado que entre 290 muestras, 70-80 % de los pacientes de SE presentaban alta expresión de IGF-1R y también de IR. Sólo un 10% eran IGF-1R negativo, mostrando una expresión elevada de IR.

Varios esfuerzos se están llevando actualmente a cabo, ya sea a través de la inhibición de IGF-1R con moléculas pequeñas o anticuerpos monoclonales (MAb), humanizados (HAb) o totalmente humanos. En SE, la inhibición de la vía de IGF-1R tiene una relevancia importante a nivel pre-clínico; sin embargo, a día de hoy el impacto clínico de la inhibición de IGF-1R sigue siendo pobre, lo que recalca la necesidad de desarrollar enfoques diferentes, o más adecuados, para inhibir esta vía.

#### **4.3.2 Anticuerpos Monoclonales anti-IGF1R**

Los anticuerpos monoclonales han sido desarrollados en ratones. En un principio eran HAb, IgG1MAb (Human-ratón-humano) y recientemente IgG1 completamente humano; IgG2 o IgG4. La administración de anticuerpos monoclonales está rodeada de altas medidas de seguridad con el fin de evitar respuestas inmunogénicas. Entre los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos monoclonales totalmente humanos representan un enfoque más seguro en comparación a los anticuerpos monoclonales humanizados que aumentan la probabilidad de efectos secundarios. El mecanismo anti-IGF-1R-MAb se basa no sólo en el antagonismo evidente con IGF-1 y la consecuente

inhibición de IGF-1R, sino también por la down regulación de la cascada de IGF-1R. De hecho, varios anti-IGF-1R MAb: AVE1642, figitumumab, cixutumumab, Robatumumab ya han demostrado eficacia preclínica y / o clínica en sarcomas. Estos compuestos se han descrito brillantemente en una revisión reciente de Olmos D et al. .A En esta parte describiremos los MAbs más representativos con evidencia preclínica o clínica en SE.

El **AVE1642** es un HAB IgG1, anti-IGF-1R MAb, con actividad *in vitro* demostrada en SE. La resistencia de las células de SE a este agente se han relacionado con la diferenciación neuronal y angiogénesis. El resultado del estudio de Fase I de AVE1642 en pacientes con tumores sólidos avanzados, que no incluyó pacientes SE, mostró la buena tolerabilidad de este fármaco en combinación con docetaxel y gemcitabina.

El **Figitumumab** (CP-751, 871) es un anti-IGF-1R MAb IgG2 completamente humanizado que ha demostrado evidencia preclínica en SE y ya ha pasado los estudios fase I y II en pacientes con SE refractarios (NCT00560235). Según la evidencia preclínica, la resistencia a figitumumab se relaciona con angiogenesis. El estudio clínico de Fase I incluyó 15 pacientes con SE refractario. El estudio de fase II incluyó 107 ES pacientes y mostró actividad antitumoral modesta en monotherapy. En este grupo de pacientes, altas concentraciones de IGF-1 en suero, se correlacionaron con mal pronóstico y ya que tanto figitumumab como el IGF-1 muestran una afinidad muy similar frente al IGF-1R.

**Cixutumumab** (IMC-A12) es también un MAb completamente humano, con actividad *in vitro* demostrada en diversos tipos de tumores, cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas (HNSCC) y enfermedades malignas de la infancia, incluyendo neuroblastoma, tumor de Wilms y los sarcomas (rabdomyosarcoma, SE y osteosarcoma) . La evidencia preclínica según el Programa de Evaluación preclínica Pediátrica (PPTP) concluyó que cixutumumab es un agente citotóxico de actividad intermedia. En HNCSS, las células mostraron co-expresión de IGF-1R y EGFR. El tratamiento con cixutumumab bloqueaba IGF-1R lo cual resultó en la inducción de la expresión de AKT y mTOR. Cuando cixutumumab se combinó con rapamicina que causa la inhibición de EGFR y de mTOR, respectivamente, se redujeron los efectos tumorigénicos. Estos resultados sugirieron que la resistencia a anti-IGF-1R MAb podría estar relacionada con la inducción de AKT/mTOR. De hecho, también se estudió la combinación cixutumumab y rapamicina. en el PPTP. Entre el conjunto de modelos de xenoinjertos estudiados (SE, osteosarcoma y rabdomyosarcoma), el SE registró la respuesta antitumoral más importante con el régimen de combinación, presentando claros efectos sinérgicos. Además, cixutumumab se encuentra actualmente en estudios de Fase II en sarcomas avanzados. En este estudio clínico los SE metastásicos / avanzados representan uno de los brazos de estudio.(NCT00668148).

**Robatumumab** (R1507) es otro anticuerpo anti-IGF-1R MAb con evidencia preclínica y clínica en líneas celulares y pacientes con SE. El SE es sensible al tratamiento con R1507, aunque siRNA dirigidos a la proteína de fusión

EWSR1-FLI1 fue capaz de inducir niveles más altos de apoptosis que el MAb. En la clínica, un estudio de fase II de R1507 en 132 pacientes con SE recurrente o refractarios dio como resultado un 10% de respuestas totales durante más de 6 meses. Como resultado de este estudio se demostró que R1507 tiene actividad modesta como agente único; algunas de las razones que podrían explicar este fracaso incluyen, por ejemplo, la falta de un screening previo del ratio de IGF-1R:IR en los tumores de los pacientes con SE

#### 4.3.3 Pequeñas moléculas

Varias moléculas pequeñas, tales como los compuestos de Novartis: NVP-AEW541 y NVP-ADW742: han sido desarrolladas para inhibir selectivamente IGF-1R por competencia con el ATP.

Recientemente, una nueva pequeña molécula llamada **Linsitinib**, anteriormente conocido como OSI-906, ha demostrado que inhibe tanto el IGF-1R como IR. Ello representa un claro beneficio respecto a otros inhibidores de IGF1R, ya que Linsitinib es capaz de inhibir IR que es la “vía de escape” que emplean las células de SE para evitar la acción de los inhibidores de IGF1R.

**AEW541 y ADW742** han demostrado actividad *in vitro* y *in vivo* en el SE.

Nuestro grupo demostró previamente la actividad tóxica de ADW742 y AEW451 *in vitro* e *in vivo*, solos o en combinación con el inhibidor 17AAG, un inhibidor específico de la heat-shock protein 90.

**Linsitinib** ha demostrado actividad tóxica en las células SE, con la particularidad de inhibir específicamente IGF-1R / IR, y bloqueando así el bucle automático descrito anteriormente en el que las células de SE cambian de una dependencia en IGF-1 / IGF-1R a IGF- 2 / IR dada la homología entre estos dos receptores. Linsitinib ha demostrado actividad *in vitro* e *in vivo* en SE. Además, la actividad de Linsitinib está siendo evaluada en ensayos de Fase I / II CT en pacientes con SE recurrente / enfermedad diseminada.

Curiosamente, los sistemas *in vitro* muestran que las células de SE resistentes a AVE1642, figitumumab y AEW541 fueron capaces de mantener su supervivencia y su capacidad de proliferación por el cambio de IGF-1 / IGF-1R a IGF-2 / IR-A. De hecho, existe evidencia de que la relación IGF-1R: IR podría muy bien ser la responsable de la resistencia al tratamiento con inhibidores de IGF-1R (MAbs o moléculas pequeñas).

#### **4.4 PARP1 y PARPInh: Revisión general y hechos en SE**

PARP1 es una enzima de la familia de las poli-(ADP-ribosa) polimerasas. Este gen, localizado en el cromosoma 1 (1q41-q42), es regulado en algunos cánceres humanos y su sobre-expresión a menudo se relaciona con la resistencia a la quimioterapia. Recientemente, un estudio retrospectivo reveló el valor pronóstico de la ganancia del brazo largo del cromosoma 1 (1qG) en SE.

La familia de las proteínas PARP incluye varios miembros: PARP1, PARP2, PARP3, PARP4, PARP5a, PARP5b. Entre ellos, PARP1 y PARP2 interactúan físicamente entre sí y poseen funciones redundantes. Ellos son los únicos miembros conocidos de la familia PARP que se activan por la unión al DNA. Las proteínas PARP catalizan un tipo de modificación post-transducional que implica la adición de grupos ADP-ribosa a las proteínas aceptoras utilizando NAD + como sustrato donante de los grupos-ADP ribosa y la formación de los biopolímeros poli-ADP-ribosa (PAR). En respuesta a situaciones de estrés, lo que implica daño en el DNA, las proteínas PARP son activadas y el PAR biopolímero generado recluta a otros miembros del sistema DDR, como el factor de XRCC1 y la DNA-ligasa III, al sitio en el que ha ocurrido el daño en el DNA. A su vez, estas proteínas son poli-ADP ribosiladas y consecuentemente activadas, favoreciendo la señalización y activación del sistema DDR. Además del papel relevante en DDR, la familia de proteínas PARP también participa en otros procesos de la célula:

- i) El mantenimiento de la estabilidad genómica;
- ii) la remodelación de la cromatina;
- iii) la transcripción;
- iv) la regulación del ciclo celular y la muerte celular.
- v) La angiogénesis.

El primer concepto a introducir respecto a los PARP es el concepto de letalidad sintética. La letalidad sintética surge cuando una combinación de mutaciones en dos o más genes implicados normalmente en un mismo proceso

celular conduce a la muerte celular por apoptosis, mientras que una mutación en sólo uno de estos genes no lo hace.. Por ejemplo, sucede con los genes BRCA, que participan en el proceso recombinación homóloga (HR) para reparación de las DSBs y PARP1 que desempeña un papel principal en la reparación del DNA principalmente en el sistema de reparación por escisión de base (BER). El uso de PARPinh en los tumores con defectos en los genes BRCA se ha explorado en gran medida.

Además de la monoterapia, los PARPinh también pueden desempeñar el papel de coadyuvante, sensibilizando a las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos

El papel de PARP1 en los tumores con fusiones ETS también ha sido recientemente estudiado. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las células de SE son sensibles al tratamiento con el PARPinh olaparib cuando se combina con el agente alquilante Temozolamida. Esta combinación de fármacos, elimina prácticamente el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de SE. Dada la importancia de estos resultados preclínicos, un ensayo de Fase II se inició en pacientes con SE metastásicos / recurrentes con Olaparib como agente en monoterapia como tratamiento de segunda línea (NCT01583543). Este estudio fue detenido recientemente ya que los datos preliminares sugieren que olaparib parece ser insuficiente en monoterapia. Por tanto la terapia en combinación parece ser una opción muy interesante.

## **5. Información general sobre el daño en el DNA y las rutas de reparación del daño**

## 5.1 Inducción de daño en el DNA

Las células cancerosas se caracterizan por un ciclo celular desregulado con una relación de crecimiento-muerte desequilibrado. En consecuencia, los agentes que inducen daños en el DNA o inhiben moléculas implicadas en DDR representan una estrategia terapéutica importante en la terapia del cáncer. El Daño en DNA puede ser inducido ya sea directa o indirectamente. La radiación, por ejemplo, genera un daño directo. Sin embargo, algunos agentes tales como los inhibidores de la topoisomerasa generan daños de forma indirecta. El daño en el DNA podría afectar a una de las cadenas de la doble hélice (SSB), o ambas cadenas (DSB). Es importante notar que los DSB representan la forma más letal de daño en el DNA.

En el complejo contexto global de las rutas de reparación de daño, las moléculas pueden ser divididas en moléculas de señalización; moléculas mediadoras y moléculas efectoras. Las rupturas de doble cadena por ejemplo, generan una cascada de señalización que activa moléculas mediadoras y estas finalmente reclutan moléculas efectoras con el fin de reparar el daño. Si se repara el daño, las células continúan con su ciclo, sin embargo, cuando el daño es irreparable, las células activan la muerte celular programada: apoptosis. Agentes de radiación UV y químicos generan aductos en zonas particulares de la doble cadena de DNA que causan la ruptura de las dos cadenas, de ahí DSB. Los DSBs representan el tipo de daño en el ADN más letal para las células.

El marcador inicial de este tipo de daño es la fosforilación de la histona H2AX en la serina 139, y la formación de focos de esta histona fosforilada en las áreas que rodean el daño. En el estado de DNA condensado, con el núcleo de cuatro histonas, los genes se encuentran inactivos, pero cuando se induce daño, las colas de H2AX son fosforiladas y el núcleo de las histonas se abre, exponiendo el DNA a los mecanismos de reparación. Por consiguiente, el daño del DNA está rodeado por los focos pH2AX. Varios trabajos centrados en estos mecanismos de señalización, han llegado a la conclusión de que la presencia de cada uno de los foci de pH2AX contiene cientos de histona fosforilada. La cantidad de histona fosforilada es directamente proporcional al número de DSB que han sido inducidas..

## **5.2 La activación de las vías de DDR**

Vías fisiológicas incluyen HR; el Non Homologous End Joining; (NHEJ); NER, BER y Mismatch repair (MMR). Diferentes agentes anti-tumorales activan vías distintas para reparar el daño. NER y BER son responsables de la reparación de SSB. Por el contrario, DSB activa de las rutas de HR o NHEJ dependiendo de la fase del ciclo celular.

Los mecanismos de reparación del DNA son modelos dinámicos en constante cambio. BER elimina bases de DNA defectuosos, por ejemplo a través de ADN-glicosilasas, (8 oxoguanina ADN glicosilasa 1 (OGG1)), que luego se hidrolizan por APE1, una endonucleasa. Aquí, PARP1 juega un papel importante

participando en el reclutamiento activo de otras enzimas de reparación, como se explicó anteriormente. De hecho, PARP1 puede unirse tanto a SSB y DSB, sin embargo, parece ser más relevante en SSB e innecesario para HR.

La ruta de NER es capaz de reconocer el daño inducido por la luz UV. Este daño genera aductos voluminosos. Los aductos se eliminan y la reparación se lleva a cabo utilizando la cadena de DNA afectada solo como modelo. NER incluye proteínas como la familia *xeroderma pigmentosum* de proteínas (XPA, XPC y XPG) y ERCC1.

Las rupturas de doble cadena, por el contrario pueden ser reparadas por HR o NHEJ. La maquinaria de reparación de NHEJ es principalmente activa durante la fase G1 del ciclo celular e incluye proteínas tales como heterodímeros Ku70-Ku80 que se unen al sitio dañado y reclutan DNA-PKcs (DNA dependiente de la proteína quinasa subunidad catalítica). Estos pueden fosforilar H2AX.

Mientras que Artemis procesa los extremos de DNA, la DNA ligasa 4 (Lig4) une ambos extremos y XRCC4 estabiliza el complejo. Por último, 53BP1 (Proteína1 vinculante p53) se acumula rápidamente en los alrededores de los focos pH2AX. Parece que tiene un papel importante en el equilibrio entre los sistemas HR y NHEJ.

HR es un mecanismo altamente complejo activo en las fases finales de S o G2 del ciclo y que se describe como un mecanismo libre de errores de reparación, al contrario de NHEJ. Esta vía incluye moléculas tales como ATM; BRCA1; BRCA2; RAD51 y RAD52. ATM y ATR quinasas amplifican y estabilizan los

foci de  $\gamma$ H2AX. BRCA1 se activa a través de la fosforilación de ATM-quinasa ATR, y representa una molécula central en HR. BRCA1 activa el dímero BRCA2-RAD51. Recombinasas RAD51 y RAD52 son las moléculas efectoras finales y responsables de la restauración de la información genética. RAD51 es crucial para la supervivencia celular. ATR también fosforila CHK1 que conduce a la activación de la molécula de RAD51.

Agentes como Trabectedina, Zalypsis y Lurbinectedin pueden inducir directamente daños en el DNA, por otra parte Olaparib es un agente que daña el DNA de forma indirecta, ya que su target principal es inhibir PARP1.

### **5.3 La Trabectedina: NER y activación de otros componentes del sistema DDR**

Trabectedina presenta un mecanismo de acción único, creando aductos en el surco menor del DNA, zonas ricas en guaninas que se doblan hacia el surco mayor finalmente rompiendo doble helix. Este mecanismo particular da lugar a un DDR muy único. Como era de esperar, Trabectedina interactúa con la maquinaria NER, pero el daño inducido parece ser reparado exclusivamente por máquinas HR. Varios estudios realizados en células competentes en NER / deficientes en NER, así como en células deficientes en HR observó que la Trabectedina es muy citotóxica en células deficientes en HR, y menos tóxico en las células deficientes NER que en células NER competentes.

Sorprendentemente, la estructura química de la Trabectedina permite al anillo C generar complejos con NER (TC-NER). Estos complejos inducen DSB que luego activan moléculas de HR, los genes BRCA1 y BRCA2. En cuanto a la

maquinaria NHEJ, esta parece que tiene una influencia menor en la respuesta al tratamiento con Trabectedina ya que las células deficientes en NHEJ muestran un ligero descenso de la sensibilidad (4 veces) a la Trabectedina. Sin embargo, el papel de NHEJ en el daño inducido por Trabectedina es todavía incierto ya que algunos trabajos describen que las deficiencias en Ku80 y DNA-PK no muestran diferencias cuando se compara con líneas celulares parentales en términos de sensibilidad.

En suma, HR parece tener un papel mayor en la reparación de los daños inducidos por Trabectedina que NHEJ. Por otra parte, NER forma complejos con Trabectedina, incrementando la actividad tóxica del compuesto.

#### **5.4 Compuestos relacionados con la Trabectedina y la activación de DDR**

Los estudios iniciales utilizando Zalypsis mostraron que, de manera similar a la Trabectedina, este compuesto era también un inductor potente de DSB. Este hecho se detectó por la presencia de  $\gamma$ H2Ax tanto en las células deficientes en NER como en las competentes, así como en células de SE. Las líneas celulares de SE, TC71 y TC32, presentan una sensibilidad ligeramente superior a la Trabectedina que a Zalypsis. Otra conclusión importante de este estudio fue relativa al valor estructural del anillo C en términos de unión al DNA y posterior mecanismo de activación de la reparación. Aparentemente, el daño al DNA inducido por Zalypsis es independiente de NER, en contraste a la Trabectedina, y se repara por HR.

Algunos estudios muy recientes profundizaran en el mecanismo de acción de Lurbinectidin, principalmente a nivel de unión al DNA y activación de DDR. De hecho, un trabajo publicado por Llagas *et al*, mostraron que con las células resistentes a platino, tanto Trabectedina y Lurbinectidin mostraron sensibilidad sin cambios en comparación con las líneas celulares parentales. Estas líneas celulares desarrollaron un mecanismo de resistencia sobre-expresando componentes NER. Este hecho llevó a la conclusión de que los agentes de platino, como el cisplatino y oxiplatin inducen daño en el DNA pasible de ser reparado vía NER en contraste con Trabectedina. Curiosamente, este estudio también llegó a la conclusión de que aunque las lesiones inducidas en el DNA por el tratamiento con Trabectedina y Lurbinectidin no reclutan la maquinaria NER, pero interactúan con NER bloqueando su actividad de reparación y aumentando la actividad tóxica intrínseca del fármaco. Por otra parte, los modelos de celulares con HR deficientes presentan una mayor sensibilidad al tratamiento con Lurbinectidin. Como conclusión, el daño del DNA inducido por Lurbinectidin es muy similar al inducido por Trabectedina: formación complejos tóxicos con NER y activando HR.

### **5.5 Olaparib y la activación de rutas de reparación**

En cuanto a los PARPih Olaparib, intensos estudios principalmente en líneas celulares de cáncer de mama y cáncer de mama muestras han aclarado el mecanismo de acción en términos de inducción de daño en el DNA.

Hay varios PARPih conocidos, tales como Olaparib o Veliparib. La mayoría de

ellos compiten con NAD + sustrato interferir de unión al sitio activo de la enzima, una región altamente conservada entre los diferentes miembros de la familia PARP, El uso de PARPinh en monoterapia para el cáncer de mama en BRCA1 y / o BRCA2 tumores defectuosos es probablemente el mejor ejemplo de letalidad sintética en la clínica. La pérdida de heterozigosis en genes supresores de tumores como BRCA1 o BRCA2 provoca una deficiencia fuerte en maquinaria HR, la inducción de la inestabilidad genómica que conduce a la aparición de tumores. Dado que esta pérdida de función de la HR no se observa en las células normales, PARPinh se puede utilizar como un citotóxica selectiva en células tumorales defectuosas en BRCA1 y / o BRCA2 a través de la siguiente cadena de eventos. La administración de PARPinh conduce a más y más SSB irreparables, dado que PARP no está activo y es incapaz de repararlos. En consecuencia, la horquilla de replicación se colapsa dando lugar a DSB. A su vez, estas DSB que deben ser reparadas por los efectores de HR, sólo puede ser reparado por el sistema de NHEJ, que también induce inestabilidad genómica y finalmente muerte celular. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar PARPinh en los tumores con defectos graves en los componentes de HR es de gran interés clínico.

Los PARPinh son agentes eficaces en la terapia no sólo en monoterapia, sino también combinados con otros agentes. De hecho, la combinación con agentes capaces de inducir daño en el DNA, tales como Temozolamida, DXR o Trabectedina, representan un enfoque prometedor en la clínica.

## Resumen de los resultados y discusión

El SE es un tumor de origen mesenquimal que surge normalmente en hueso y tejidos blandos. Los estudios llevados a cabo hasta la fecha no han conseguido identificar y caracterizar la célula de origen y determinar los eventos tempranos en la iniciación tumoral. Sin embargo, la CMM es actualmente considerada como la más probable célula de origen del SE. En el **capítulo 1** realizamos un amplia caracterización de las CMM derivadas de pacientes con SE (P-SE), en comparación con CMM derivadas de donantes sanos (DS) y líneas celulares de SE.

Hemos evaluado la presencia de la fusión génica EWSR1-FLI1 y de reordenamientos del gen EWSR1 en las CMM-P-SE, por FISH. La presencia del gen fusión fue validada por q-PCR-RT. Para identificar posibles eventos secundarios involucrados en la transformación maligna, llevamos a cabo una estrategia multiparamétrica cuantitativa que incluyó los marcadores de superficie de CMM positivos y negativos, así como los marcadores de superficie intrínsecos de SE. Marcadores como CD105, CD90 son expresados por las CMM y también por las líneas celulares de SE y muestras tumorales de SE. Marcadores como CD34 y CD45 son negativos en CMM y también están ausentes en las líneas celulares de SE y en muestras tumorales de SE. Las CMM-P-SE no presentan la fusión génica EWSR1-FLI1 ni tan poco reordenamientos del gen EWSR1, al contrario de las líneas celulares de SE.

Este estudio reveló que las CMM-P-ES son más parecidas a las CMM-DS que a las células de SE. En concreto, la expresión de CD99, marcador clave en SE, también está presente en las CMM. Además y de manera importante, al a

diferencia de lo que ocurre con las células de SE, las CMM no son sensibles a la inhibición de CD99 con el anticuerpo monoclonal O662, lo cual puede ser de gran utilidad clínica.

En conclusión, los estudios del **capítulo 1** sugieren que las CMM-P-ES se comportan con las CMM-DS, y a nivel fenotípico son distintas de las células de SE, planteando importantes cuestiones con respecto al papel de las CMM en la sarcomagénesis.

A posteriori, estudiamos uno de los agentes citotóxicos más potentes *in vitro* frente a células de SE, el compuesto marino Trabectedina. Trabectedina es un compuesto natural aislado del mar, que dio origen a un grupo de agentes a los que llamamos agentes derivados de la Trabectedina, entre los que se incluyen Zalypsis y Lurbinectedina.

En el **capítulo 2**, estudiamos la sensibilidad de un amplio panel de líneas celulares de SE a Trabectedina, Zalypsis y Lurbinectedina. Observamos que los tres compuestos son altamente activos a nivel de inhibición de la proliferación celular, inducción de apoptosis y parada de ciclo celular. También estudiamos la capacidad de inducción de rupturas de doble cadena en el DNA a través de la presencia de foci intranucleares de  $\gamma$ H2AX y 53BP1 por parte de los tres compuestos. Trabectedina y Lurbinectedina desregularan activamente las rutas de reparación del daño del DNA fundamentalmente la recombinación homóloga. Además, analizamos la sensibilidad de una línea resistente a Trabectedina a los compuestos Zalypsis y Lurbinectedina. Esta línea resistente mostró también resistencia a la acción de los dos compuestos.

En resumen, los compuestos Zalypsis y Lurbinectedina son muy activos frente a las líneas celulares de SE y pueden ser una buena alternativa terapéutica a la Trabectedina en el tratamiento de SE.

En el **capítulo 3**, demostramos que Trabectedina no solamente desregula la actividad transcripcional de la proteína fusión, sino que, de acuerdo con los resultados obtenidos por Immunoprecipitation de Cromatina, Trabectedina desregula la unión de la proteína fusión a promotores de genes diana tales como CD99 y TGFBR-II. Curiosamente en el caso de IGF1R, el tratamiento con Trabectedina activa la unión de EWSR1-FLI1 al promotor de IGF1R, resultando en una sobreexpresión de IGF1R, lo cual es muy interesante desde el punto de vista terapéutico porque dicha expresión podría ser inhibida con inhibidores de IGF1R.

Mediante estudios *in vivo* hemos corroborado esta aproximación terapéutica demostrando que las combinaciones de Trabectedina tanto con un anticuerpo monoclonal anti-IGF1R como con Linsitinib, un inhibidor dual de IGF1R-IR fueron sinérgicas en ambos casos.

Además de manera interesante, la combinación con Linsitinib desreguló las rutas de reparación del daño celular, provocando un incremento del daño celular, acompañado además de inducción de apoptosis y parada de ciclo celular.

En el **capítulo 3** podemos concluir que Trabectedin conlleva a una sobreexpresión de IGF1R, y la combinación con un agente anti-IGF1R bien mediante un anticuerpo monoclonal y sobre todo preferentemente con el inhibidor dual Linsitinib es altamente sinérgico en las líneas celulares de SE.

Finalmente, en el **capítulo 4**, estudiamos la sensibilidad de las líneas celulares de SE a un conjunto de inhibidores de PARP y para ello estudiamos (la ganancia del locus de PARP1 mediante FISH, y su expresión génica mediante q-RT-PCR y Western Blotting).

Las líneas de SE previamente descritas con ganancia de 1q, presentaron varias copias de PARP1, validando un estudio anterior previo (Cita). El estudio del efecto sobre la proliferación celular de tres PARPi en un amplio panel de 14 líneas celulares de SE reveló que Olaparib es el agente más potente de los estudiados, en comparación con Iniparib y Veliparib. Esta sensibilidad no se correlacionó con el estado de 1q ni tan poco con el estado de p53 (mutado o normal). El tratamiento con Olaparib reveló además una parada de ciclo en G2/M.

Posteriormente, estudiamos el efecto de la combinación de Trabectedina con Olaparib. Esta combinación se fundamenta en el hecho de que Trabectedina es una agente inductor de daño celular e inhibidor de la actividad transcripcional de EWSR1-FLI1. Olaparib por su parte impide la reparación del daño del DNA y además también interfiere con la actividad transcripcional de EWSR1-FLI1 al inhibir a PARP1 que es un cofactor necesario de la fusión de EWSR1-FLI1.

Esta combinación fue fuertemente sinérgica, y resultó en acumulación de células en fase S-G2/M y fuerte inducción de apoptosis y reducción de la capacidad de invasión. Además, el tratamiento con Trabectedina y Olaparib, resultó en acumulación de foci de pH2AX y 53BP1 ambos indicadores de daño celular, y alteración de las rutas de reparación del daño del DNA.

Finalmente, en un modelo *in vivo* se validó que esta combinación es altamente sinérgica, con reducción drástica del crecimiento tumoral y acumulación de daño del DNA

En este capítulo, se puede concluir que la combinación de Trabectedina y Olaparib resulta en una desregulación drástica de rutas de reparación de daño al DNA y puede representar una prometedora estrategia terapéutica que debe ser estudiada con vistas a una muy posible aplicación clínica.

## Conclusiones

1. Las Células Madre Mesenquimales derivadas de Pacientes de Sarcoma de Ewing presentan un perfil fenotípico muy semejante a las Células Madre Mesenquimales derivadas de Donantes Sanos con respecto a los marcadores patogénicos de SE CD99, CD271 y CD117. Las CMM expresan bajos niveles de los tres marcadores. Las líneas celulares y muestras tumorales de SE presentan ciertas características mesenquimales tales como la sobre-expresión de CD90 y CD105 y la falta de expresión de CD34 y CD45.
2. CD99 está sobre-expresado en las líneas celulares y en muestras tumorales con respecto a las CMM. Las CMM derivadas de tejidos sanos expresan CD99 de forma heterogénea. La inhibición de CD99 induce apoptosis en las células de SE sin embargo no afecta la viabilidad de las CMM.
3. Trabectedina y los compuestos relacionados Zalypsis y Lurbinectedina son altamente tóxicos para las células de SE. Todos los compuestos inducen rupturas de doble cadena. Trabectedina es más potente a nivel de inhibición de proliferación y en la desregulación de las rutas de reparación de daño del DNA., Trabectedina y Lurbinectidina son más potentes que Zalypsis desregulando las rutas de reparación del daño del DNA.

4. Trabectedina desregula la actividad transcripcional de la proteína de fusión EWSR1-FLI1. El tratamiento con Trabectedina conlleva a una sobreexpresión de IGF1R.
5. El inhibidor dual de IGF1R-IR, Linsitinib, es tóxico para las células de SE, induciendo parada de ciclo celular, inhibición de la proliferación y apoptosis. La combinación de Linsitinib con Trabectedina es sinérgica, y resulta en un incremento del daño del DNA y una mayor desregulación de las rutas de reparación de dicho daño.
6. Entre un grupo de inhibidores de PARP, incluyendo Olaparib, Iniparib y Veliparib, Olaparib demostró ser el agente más tóxico para las células de SE. La sensibilidad a Olaparib es independiente de la expresión de PARP1 y de la ganancia de 1q. El tratamiento con Olaparib induce muerte células por apoptosis y parada del ciclo celular en la fase G2/M.
7. La combinación de Trabectedina y Olaparib es altamente sinérgica en la mayoría las líneas celulares de SE estudiadas. La combinación induce una reducción del tamaño tumoral en un modelo xenograft de SE. Esta inhibición del crecimiento tumoral se debe a un incremento en la inducción del daño del ADN observada por la acumulación de foci de pH2AX y una mayor desregulación en los mecanismos de reparación del DNA.