



MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN, CULTURA  
Y DEPORTE

## MEMORIA DEL PROYECTO DE TESIS E INFORME DEL DIRECTOR

Apellidos y nombre del solicitante de la ayuda: Olmedo Pelayo, José Joaquín

Apellidos y nombre del Director: de Álava Casado, Enrique  
DN.I., N.I.E. ó PASAPORTE: 18203958X

Apellidos y nombre del Codirector:  
(solo si figura en la solicitud)  
DN.I., N.I.E. ó PASAPORTE:

Título completo de la tesis: Mecanismos moleculares de resistencia a agentes genotóxicos y su aplicación al diseño de nanovehículos terapéuticos en el sarcoma de Ewing

Memoria del Proyecto de Tesis doctoral al que hace referencia la convocatoria. Máximo 3.000 palabras, incluido informe del director:

### Resumen

El sarcoma de Ewing (SE) es una neoplasia poco prevalente de hueso y partes blandas que afecta a niños y adultos jóvenes, y que se caracteriza por translocaciones y fusiones génicas específicas. La alta tasa de supervivencia en pacientes con enfermedad localizada contrasta con la elevada mortalidad en recaídas y metástasis. Aunque es un tumor particularmente sensible a agentes genotóxicos, la administración de estos agentes en monoterapia o en combinación no resulta efectiva en un número significativo de pacientes, sin que se hayan establecido las bases moleculares de su acción ni de la falta de respuesta, no existiendo, por tanto, marcadores predictivos de su eficacia. Es esperable que las posibles variantes alélicas que provocan la insensibilidad de ciertos SE sean también responsables de las resistencias en recaídas, fruto de las drásticas selecciones clonales durante los mismos. Resulta por lo tanto doblemente importante entender los mecanismos moleculares que se encuentran detrás de estas resistencias. Por otro lado, otro de los problemas asociados al tratamiento con estos quimioterápicos es la inespecificidad. El efecto sobre tejidos sanos se asocia a frecuentes efectos secundarios. Los *Protocells* multifactoriales (PM) se han desarrollado como herramientas que permiten la liberación farmacológica controlada, específica y secuencial; reduciendo la toxicidad sistémica y mejorando su eficacia.

En este proyecto de tesis establecemos un plan de estudio de los mecanismos moleculares de resistencia de SE a agentes genotóxicos y su aplicación al diseño, y evaluación *in vitro* e *in vivo* de la especificidad y eficacia terapéutica de los PM.

### Antecedentes

#### *Sarcoma de Ewing*

El sarcoma de Ewing (SE) es la segunda neoplasia ósea más frecuente en niños y adolescentes (Patel et. al,2014). Presenta una incidencia anual de aproximadamente 3 casos/millón y una media de edad de 15 años (Thomas et al.2012). Este tipo de tumor afecta principalmente al tejido óseo, aunque también a tejidos blandos (30%). Entre el 15 y el 30% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico, localizadas en pulmón (50%), hueso (25%) y médula ósea (25%) (Lessnick et. al,2005).



En cuanto a su histopatología, el SE clásico (células pequeñas e indiferenciadas con escaso citoplasma) presenta características clínicas y moleculares comunes con otros tumores como el neuroectodérmico primitivo (PTEN, *Primitive Neuroectodermal Tumor*) y el tumor de Askin, lo que ha permitido englobarlos como una única entidad (de Álava E. et. al,2013). El SE se caracteriza por una expresión intensa de CD99, una glicoproteína de superficie que, pese a no ser específica de esta patología, es de gran ayuda para su diagnóstico. (Park et. al,2016).

Pese a los esfuerzos realizados, poco conocemos acerca del origen celular de este tumor. La expresión de marcadores neuronales sugiere un posible origen mesenquimal o neuroectodérmico (Lin et. al,2011). Desde el punto de vista molecular, el SE se caracteriza por la presencia de una translocación cromosómica recíproca entre genes las familias TET-ETS. La más común (95% de los casos) se produce entre los cromosomas 11 y 22; t(11;22)(q24;q12), considerada patognomónica de la enfermedad. Esta alteración cromosómica genera la fusión de los genes EWS(EWSR1) y FLI1 (Jackson et. al,2016). La fusión EWS/FLI1 cuenta con el dominio activador de la transcripción de EWS, junto con el dominio de unión al ADN de FLI1 (Ordoñez et. al,2009); y codifica para una oncoproteína que actúa como un potente modulador transcripcional de las rutas Notch, Hedgehog/GL1, Wnt/b-catenina, entre otras (Lessnick et. al,2012). El resultado es la alteración de la expresión de oncogenes (PLD2, IGF1), genes supresores de tumores (p21) y otros relacionados con diferenciación, angiogénesis e invasión (Ordoñez et al,2009). Por otro lado, la proteína EWS juega un papel importante en la activación de la elongación de la ARN polimerasa II y en el procesamiento de intrones. La pérdida de estas funciones, en la fusión, se ha propuesto como otro mecanismo potenciador de la tumorigénesis (Panoretto, 2013).

De forma muy ocasional (10%), las translocaciones cromosómicas características del SE se asocian con otras mutaciones secundarias (mutaciones puntuales, ganancias y pérdidas cromosómicas) que confieren una mayor agresividad y mal pronóstico. Estudios llevados a cabo en MSCs, han mostrado que la expresión del oncogén EWS-FLI1, conlleva cambios transcripcionales, pero no el desarrollo de un fenotipo tumoral (Ordoñez et al,2009).

#### *Terapias actuales y sus limitaciones*

El primer reto de salud al que pretendemos dar respuesta es la elevada mortalidad y resistencia al tratamiento convencional de un grupo significativo de pacientes con SE, especialmente cuando se presentan con metástasis en el momento del diagnóstico o cuando recaen tras las primeras líneas de tratamiento. Gracias a los avances en terapia multimodal (en combinación) la tasa de supervivencia actual es del 70% en pacientes con enfermedad localizada. Sin embargo, esta cifra es inferior al 20% en los pacientes con enfermedad primaria diseminada o recaída (Jackson et. al,2016).

El SE se caracteriza por ser especialmente sensible a fármacos genotóxicos (aquellos que inducen daño al ADN) como la ciclofosfamida o el etopósido. Sin embargo, la administración de estos agentes terapéuticos en monoterapia y especialmente, en combinación, presenta una gran inespecificidad. Además, en un número significativo de pacientes, estos tratamientos no resultan efectivos, sin que hayan podido establecerse las bases moleculares de la falta de respuesta y, por tanto, no existan marcadores predictivos de la eficacia de estos.

Por ello, el entendimiento de las bases moleculares de la resistencia a los tratamientos y el desarrollo de herramientas que permitan una liberación farmacológica controlada y



secuencial, y a poder ser, más específica, serían clave en la mejora de los tratamientos, reduciendo la toxicidad y mejorando su eficacia.

#### *Resistencia a tratamientos y mecanismos de reparación del ADN.*

Como se ha indicado, entre los tratamientos más efectivos contra el SE se encuentran los fármacos genotóxicos, sin embargo, las bases moleculares de esta sensibilidad y su relación con la desregulación de la transcripción son poco conocidas, aunque podían estar relacionadas con el papel de EWS en *splicing* y en la transcripción de la polimerasa II (Panoretto, 2013). Recientemente se ha descrito cómo la actividad transcripcional de EWS/FLI1 induce la acumulación de híbridos DNA-RNA, incrementando el estrés replicativo y provocando una respuesta de los mecanismos de reparación celulares. A su vez, la retención de BRCA1 en regiones transcritas debido al estrés transcripcional que genera EWS/FLI1, provoca un déficit de este factor esencial en la respuesta a daños en el DNA. En consecuencia, la reparación de roturas de DNA por recombinación homóloga (HR) en la que participan BRCA1 y BRCA2 se ve comprometida, induciendo muerte celular (Gorthi et. al,2018). Cabe destacar las similitudes entre tumores BRCA1/2, afectados en los mecanismos de reparación por HR y SE. Éstas podrían deberse a que la actividad de EWS/FLI1 provoca un déficit de BRCA1 (Gorthi et. al,2018). También existe coincidencia en la eficacia del uso de inhibidores de PARP (PARPi) en tumores BRCA (George et. al,2017) y los resultados previos del grupo, que demuestran una sensibilidad de ES a PARPi en combinación con un agente inductor de daño en el DNA como la trabectedina (Ordoñez et. al,2015). Curiosamente no existe un mecanismo claro que explique la letalidad sintética entre HR y PARPi (Lord CJ. et. al,2009). Por tanto, los mecanismos por los cuales estos agentes interactúan con la actividad de EWS/FLI1 es incierta. Aún más, los mecanismos de insensibilidad y resistencia son totalmente desconocidos, aunque se cree debido al papel de mecanismos alternativos de reparación del ADN.

#### *Nuevos sistemas de liberación farmacológica. Protocells*

Muchos han sido los "carriers" que se han generado previamente con el objetivo de mejorar el transporte y liberación de fármacos: dendrímeros, liposomas, etc. Entre ellos, destacan las nanopartículas de sílice mesoporosa por presentar una gran capacidad de almacenaje, un perfil de liberación del contenido mantenido y controlable, fácil funcionalización de la cubierta, etc.

Estos sistemas han sido potenciados con su recubrimiento con bicapas lipídicas (Figura 1), permitiendo una liberación controlada de fármacos tras su fusión con endosomas celulares. Además, la superficie lipídica externa ha sido diseñada con la unión de dos grupos funcionales que permiten anclar moléculas para incrementar su especificidad (anticuerpos monoclonales) y dendrímeros policatiónicos que permiten la unión de moléculas de gran tamaño como proteínas o siRNAs. De este modo, este nanovehículo podrá suministrar de forma selectiva diversos agentes terapéuticos con diferentes secuencias (A->B;B->A; etc.) potenciando su eficacia terapéutica mediante un efecto sinérgico para suprimir los mecanismos de defensa de las células malignas, causando su destrucción.

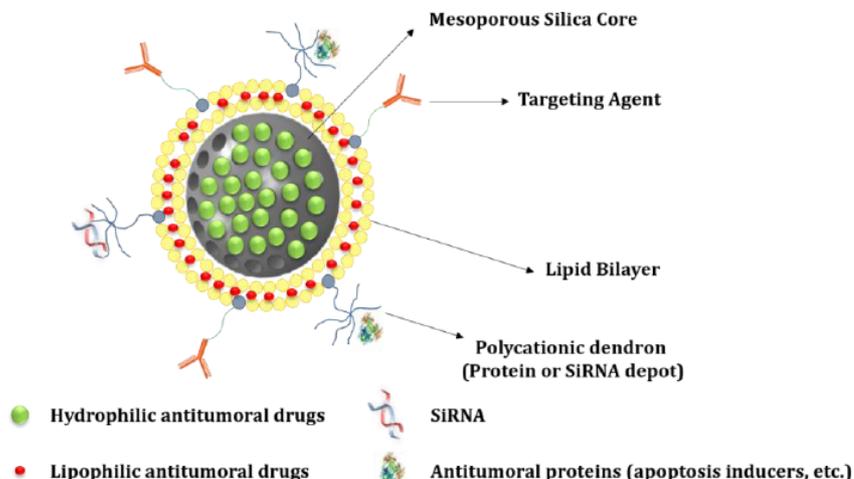


Fig 1. Protocells multifactoriales (obtenida:proyecto FIS\_PI17/00464).

## Hipótesis de trabajo

La utilización de sistemas de administración de fármacos que permitan una liberación secuencial de estos compuestos podría ser una alternativa terapéutica efectiva en el SE. Además, conocer los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a los tratamientos, permitirá establecer combinaciones adecuadas para los tratamientos y desarrollar marcadores predictivos de su eficacia.

## Objetivos

1. Estudio de los mecanismos moleculares de resistencia a quimioterapia a consecuencia de la alteración de los sistemas de reparación del ADN en SE.
2. Evaluación de la especificidad y eficacia de los PM en modelos *in vitro* e *in vivo* de SE.

## Metodología y plan de trabajo:

### Objetivo 1. Mecanismos moleculares de resistencia a quimioterapia en SE.

#### Tarea 1.1. Estudio de la relación entre defectos en mecanismos de reparación y variabilidad en la respuesta a terapia.

La respuesta a agentes genotóxicos depende en gran medida de la eficiencia de los sistemas de reparación celular. Como se ha discutido anteriormente, la sensibilidad de SE a estos fármacos puede ser dependiente de la depleción de BRCA1 y por tanto de la ineficiencia de la ruta de HR. La otra vía implicada en la reparación de DSBs en las células eucariotas es la de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Sabemos que mutaciones en factores implicados en NHEJ, como 53BP1, suprimen la sensibilidad de mutantes de HR a agentes genotóxicos (Bunting SF et. al,2010). Una posibilidad, por tanto, es que las alteraciones en esta ruta afecten



a la sensibilidad de SE a estos agentes. Para comprobar si este modelo de resistencia es válido, generaremos mutantes de NHEJ por CRISPR/cas en líneas de SE y analizaremos sensibilidad a una batería de fármacos genotóxicos. Disponemos además de una gran colección de líneas celulares de pacientes de SE con distinta sensibilidad a tratamientos genotóxicos, así como de tumores resistentes a terapia. Utilizaremos sistemas plasmídicos que permiten medir en células *in vivo* la eficiencia de HR y NHEJ (Chen CC et. al,2017) para estudiar posibles defectos en estas rutas y mediremos por ensayos de Western los niveles de factores esenciales implicados.

**Tarea 1.2. Búsqueda *in vitro* de alternativas terapéuticas basadas en el uso inhibidores de la respuesta a daño en el DNA en PM.**

Utilizaremos los mutantes generados en 1.1, así como posibles candidatos con defectos en NHEJ y resistentes o poco receptivos a tratamientos quimioterápicos. Mediante estudios de clonogenicidad mediremos sensibilidad a inhibidores de factores esenciales de las rutas HR y NHEJ, en combinación con fármacos genotóxicos. Combinaremos estos fármacos para su liberación secuencial a través de PM en un diseño que dependerá de las bases mecánicas de su resistencia observadas en la 1.1.

**Tarea 1.3. Escrutinio de factores implicados en resistencia a fármacos en SE.**

Uno de los problemas del tratamiento del SE es la resistencia. Dado que los mecanismos involucrados en las mismas no están claros, realizaremos un escrutinio por CRISPR para buscar posibles mutaciones inductoras. Realizaremos mutagénesis utilizando una genoteca lentiviral con códigos de barra en *pool* de RNAs guía. Seleccionaremos aquellos mutantes de SE que adquieran resistencia a agentes genotóxicos o combinaciones de los mismos y por tanto sobrevivan a los tratamientos. Seleccionaremos y secuenciaremos las guías responsables para determinar los genes cuyas mutaciones provocan estas resistencias. Se seleccionarán los candidatos más interesantes y se realizará un estudio individualizado.

**Objetivo 2. Evaluación de la especificidad y eficacia de los PM en modelos *in vitro* e *in vivo* de SE.**

**Tarea 2.1. Síntesis de los PM**

En colaboración con el grupo de Alejandro Baeza (UCM, Madrid) se sintetizará un conjunto completo de PM que porte diferentes agentes terapéuticos dentro de los canales de sílice o en la bicapa lipídica, respectivamente (inhibidores de proteínas de reparación del DNA, tales como inhibidores de PARP o trabectedina; quimioterapéuticos convencionales del SE como vincristina, adriamicina o ciclofosfamida). La superficie externa estará marcada con agentes anti-CD105/anti-CD90 para proporcionar una especificidad relativa para las células tumorales. Además, los dendrones policatiónicos se unirán a la superficie lipídica para evaluar la posibilidad de incorporar un tercer agente terapéutico en forma de proteína (CAS9), ARN silenciador (siRNA) o ARN guía para editar los *drivers* del SE (fusiones FET-ETS). Las mismas estructuras se dirigirán al tejido murino sano como una forma de definir la posible toxicidad.

**Tarea 2.2. Evaluación *in vitro***

Se expondrán varias líneas celulares de SE a diferentes fármacos/siRNAs de forma combinada/secuencial con el objetivo de determinar el efecto de la combinación. Al mismo



tiempo, se expondrán a los PM generados. Se determinará el efecto de las partículas sobre: (i) proliferación celular (ensayo MTT), (ii) apoptosis (ensayo de activación de la caspasa 3 luminiscente, western blot, FACS), (iii) ciclo celular (FACS) y (iv) migración e invasión. Además, se pretende implementar la generación de modelos 3D de muestras de tumor primario que permitan realizar ensayos *in vitro* más cercanos a la realidad clínica que los cultivos celulares bidimensionales.

### Tarea 2.3. Evaluación *in vivo*.

La toxicidad de los PM se analizará por medio de su administración en ratones sanos. Por otro lado, se generarán xenoinjertos a partir de líneas celulares, que serán expuestos a PM, determinándose el tamaño tumoral sistemáticamente. En caso de respuesta activa, una parte de los ratones se monitorizarán sin tratamiento para estudiar la supervivencia a largo plazo. Los tumores serán extraídos al mismo tiempo que pulmones, hígado y riñones; para su estudio histopatológico. Por último, se realizarán modelos PDX que serán expuestos a PM y sometidos al análisis anterior.

### Planificación temporal

Año	1				2				3				4			
Trimestre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Tarea 1.1	■	■	■	■												
Tarea 1.2					■	■	■	■								
Tarea 1.3									■	■	■	■	■	■	■	■
Tarea 2.1	■	■														
Tarea 2.2			■	■	■	■										
Tarea 2.3							■	■	■	■	■	■				

### Impacto

Esperamos que estos novedosos sistemas de liberación farmacológica, unidos al estudio en profundidad de los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia del SE a los tratamientos actuales nos permitan desarrollar estrategias terapéuticas cada vez más personalizadas y eficaces, al mismo tiempo que reducir el problema de la inespecificidad y toxicidad sistémica. Además, bajo nuestro punto de vista, esta propuesta tiene una gran capacidad de transferencia puesto que, a pesar de tener como objeto un tumor poco prevalente, estos nanovehículos podrán ser empleados en otros tumores sólidos con translocaciones, tales como otros sarcomas y algunos carcinomas.

### Bibliografía

1. Patel MD et.al.Seminars in Diagnostic Pathology.2014Jan;31(1):39-47.
2. Thomas DM et.al.Clin Sarcoma Res.2012Feb;2(1):6
3. Lessnick SL et.al.Curr Treat Options Oncol.2005 Nov;6(6):461-71.



MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN, CULTURA  
Y DEPORTE

4. de Alava E, et. al. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2013
5. Park YK et.al.Human pathology.2016;55,91–100.
6. Lin PP et.al.Sarcoma.2011;ArticleID:276463,8.
7. Jackson TM et. al.Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.2016;46:213-228.
8. Ordóñez JL et.al.Cancer Research.2009Sept;69(18):7140-7150.
9. Lessnick SL et.al.Annu Rev Pathol.2012;7:145-59.
10. Paronetto MP.Int J Cell Biol.2013Jul;2013:12.
11. Yang W et.al.Nucleic Acids Research.2013Jan;41(1):955–961.
12. Gorthi A. et.al.Nature.2018Mar;555:387-391
13. George, A.Nature Reviews Clinical Oncology.2017May;14(5):284-296.
14. Ordóñez JL. et.al.Oncotarget.2015Aug;6(22):18875-90.
15. Lord CJ et.al.EMBO Mol Med.2009 Sep;1(6-7):315-22.
16. Bunting SF et.al.Cell.2010Apr;141(2):243-54.
17. Chen CC et.al.PNAS.2017Jul;114(29):7665-7670

Informe del director. Máximo 500 palabras:



Indíquese:

La verosimilitud del proyecto: adecuación de recursos disponibles, vinculación del Director y del grupo investigador con la temática del proyecto y programa formativo asociado al proyecto.

Se valorará positivamente que el proyecto de tesis se incluya en las actividades previstas en un proyecto de investigación subvencionado a nivel institucional.

Dirigimos un equipo multidisciplinar, al que pertenece personal con actividad asistencial en sarcomas (anatomopatólogos, biólogos moleculares y oncólogos pediátricos) y personal investigador centrado en los mecanismos de sarcomagénesis y señalización en sarcomas. Por otro lado, es un equipo multicéntrico. Esto deriva de la pertenencia del grupo a un Instituto de Investigación Sanitaria del ISCIII, el IBI-S, que asegura el carácter traslacional de la investigación realizada en el campus Hospital Universitario Virgen del Rocío-IBIS. En dicho campus contamos con la infraestructura y el acceso a las muestras adecuados para realizar este estudio.

Esta propuesta se engarza en la línea de investigación sobre sarcoma de Ewing (SE) que el Director (IP) comenzó en los EE.UU.(1994). A partir de 1999 el IP obtuvo del ISCIII-FIS financiación independiente para su línea de investigación centrada en nuevas dianas terapéuticas y marcadores diagnósticos del SE, mediante 7 proyectos consecutivos del Plan Nacional: 99/0646 PI020828, PI052524, PI081828, PI1100018, PI1401466, PI1700464. Del año 2006 al 2010 el IP fue coordinador de un nodo de la Red de Excelencia de investigación en sarcomas óseos financiada por la Comisión Europea (FP7-EUROBONET). En esta red, que contaba con 24 grupos de 12 países, coordinó el “work package” de Biología Molecular del SE y las plataformas horizontales de proteómica e inmunohistoquímica. Nuestro grupo participa en la actualidad en tres consorcios europeos sobre el SE financiados por el FP7: EUROSARC, EUROEWING y PROVABES. En este último, coordina el WP de validación prospectiva de alteraciones de número de copia génica en SE. El grupo participa de consorcios nacionales tales como el área temática de cáncer del CIBER, a la que luego haremos referencia, y al Grupo español de Investigación en sarcomas(GEIS).

El candidato se integrará en nuestro proyecto sobre SE “Nuevas dianas terapéuticas en el sarcoma de Ewing a través del estudio del proceso metastásico” financiado por el Instituto de Salud Carlos III. Concretamente en el objetivo 2 del proyecto “Explorar el papel de las vesículas extracelulares en el diálogo entre las células tumorales (del tumor primario y el metastásico) y el microambiente, bajo condiciones basales, hipoxia y/o exposición a fármacos que también se dirigen al microambiente, como Trabectedina/Lurbinectedina”. Nuestra pertenencia al área de cáncer del CIBER nos ha hecho entrar en contacto con grupos del área de nanotecnología y biomateriales del CIBER. Esta interacción va a suponer un enriquecimiento de la dimensión terapéutica del Objetivo 2 de nuestro proyecto FIS vigente, que queda plasmado en la memoria adjunta. El papel del candidato va a ser clave en el desarrollo de este trabajo conjunto. Además, como se ha descrito, analizaremos los mecanismos involucrados en la resistencia farmacológica del SE. Para ello, hemos incluido en el equipo investigador de esta propuesta al Dr. Fernando Gómez Herreros (IBIS), un investigador Ramón y Cajal, especialista en el estudio de las rutas moleculares de reparación del ADN. Esta colaboración asegura las herramientas y conocimientos necesarios para el desarrollo del Objetivo 1 del proyecto. Joaquín Olmedo ha desarrollado parte de su formación con un contrato dirigido por este investigador.



MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN, CULTURA  
Y DEPORTE

Área reservada para el contenido principal del informe o memoria del proyecto de tesis.

Datos del director de la tesis:	Datos del codirector de la tesis:
Apellidos y Nombre: de Álava Casado, Enrique	Apellidos y Nombre
Cargo: Profesor Titular de Universidad Vinculado	Cargo
Departamento: Citología e Histología Normal y Patológica	Departamento
Organismo: Universidad de Sevilla	Organismo

Firma del director y solicitante

Fdo: Enrique de Álava Casado

Fdo: José Joaquín Olmedo Pelayo