

Proyecto Neuroblastoma – Grupo de Investigación IP: Cinzia Lavarino

LA EPIGENÉTICA EN LA PATOGÉNESIS DEL NEUROBLASTOMA: IMPLICACIONES CLÍNICAS Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

El Neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en los primeros años de vida y representa el 15% de las muertes por cáncer en niños. Clínicamente el neuroblastoma se caracteriza por un comportamiento complejo y heterogéneo, mostrando en ocasiones una regresión o maduración espontánea y en otras, una proliferación agresiva y resistente al tratamiento. Su comportamiento clínico varía dependiendo de la edad del paciente, la extensión de la enfermedad y la biología del tumor. El origen del neuroblastoma es desconocido y los índices de supervivencia en pacientes de alto riesgo siguen siendo inferiores al 40%.

Los tumores sólidos pediátricos, incluido el neuroblastoma, albergan una baja cantidad de mutaciones genéticas en comparación con los tumores más frecuentes en el adulto, sugiriendo que otros mecanismos moleculares contribuyen a definir la patogénesis de los tumores pediátricos.

La hipótesis principal de este proyecto sostiene que determinadas modificaciones químicas que afectan genes específicos o moléculas asociadas a genes pero que no afectan la secuencia de nucleótidos (denominadas modificaciones epigenéticas) pueden estar subyacentes al desarrollo y comportamiento clínico del neuroblastoma. Las modificaciones epigenéticas (metilación del ADN, modificaciones de las histonas o ARN no codificante) pueden regular la expresión de los genes y por lo tanto, el funcionamiento de la célula. Estas modificaciones ocurren de forma natural en la célula pero pueden verse moduladas por diversos factores como la edad, el medio ambiente y las enfermedades. Estudios recientes están poniendo de manifiesto el papel clave que juegan las modificaciones epigenéticas en enfermedades como el cáncer.

El objetivo principal de este proyecto es estudiar los cambios epigenéticos que pueden contribuir de manera significativa en el desarrollo y comportamiento clínico del neuroblastoma, con el fin de identificar nuevas dianas y estrategias terapéuticas. Para ello investigaremos las alteraciones de los perfiles de metilación a lo largo de todo el genoma del neuroblastoma así como su efecto sobre la regulación de la expresión génica o de moléculas asociadas a genes. Además investigaremos las modificaciones epigenéticas subyacentes a la quimioresistencia en pacientes de alto riesgo clínico; asimismo estudiaremos y validaremos un marcador de respuesta al tratamiento identificado previamente por nuestro grupo.

HIPÓTESIS

La hipótesis principal de este proyecto sostiene que las modificaciones epigenéticas contribuyen a definir las bases moleculares del neuroblastoma, quedando reflejadas en el comportamiento clínico-patológico del mismo.

OBJETIVOS

1. Determinar el papel funcional de los cambios de metilación en neuroblastoma.
2. Estudiar los cambios epigenéticos que alteran/regulan los patrones de expresión de los ARNs no codificantes.
3. Investigar los mecanismos epigenéticos implicados en la respuesta al tratamiento en neuroblastoma.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Muestras y líneas celulares de NB

Se incluirán en el estudio biopsias de pacientes diagnosticados y tratados en nuestra institución (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona). Los padres y/o tutores firmarán los consentimientos informados requeridos antes de la recogida de muestras.

Se incluirán en el estudio líneas celulares de neuroblastoma disponibles en nuestro laboratorio.

Análisis de las alteraciones de metilación del ADN en neuroblastoma

- 1.1 Tecnología de *microarray* para el estudio de la metilación del ADN (normalización, control de calidad y filtrados de los datos; identificación de citosinas diferencialmente metiladas).
- 1.2 Estudio de la expresión génica mediante *microarray* (normalización, control de calidad y filtrados de los datos; análisis de los perfiles de expresión).
- 1.3 Análisis de las alteraciones cromosómicas mediante tecnología de *arrays* (normalización, control de calidad y filtrados de los datos; análisis de las anomalías cromosómicas).
- 1.4 Validación y análisis de las genes/citosinas de interés hallados en los análisis de metilación, expresión génica y anomalías cromosómicas (Pirosecuenciación; PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR); análisis inmunohistoquímico; Western blot (WB); ensayos funcionales *in vitro*; análisis de enriquecimiento funcional, análisis de correlación con datos de metilación, expresión génica y anomalías cromosómicas, análisis estadísticos).

Alteraciones en la expresión de ARN no codificantes subyacentes a los cambios epigenéticos

- 2.1 Análisis de la expresión de ARN no codificantes mediante tecnología de *arrays* (normalización, control de calidad y filtrados de los datos; análisis de los perfiles de expresión del ARN no codificantes).

2.2 Predicción de las dianas de ARN no codificantes (Bioinformática genómica; qRT-PCR, WB, ensayos funcionales *in vitro*; análisis de enriquecimiento funcional, análisis de correlación con datos de metilación, expresión génica y anomalías cromosómicas; análisis estadísticos).

Mecanismos epigenéticos relacionados con la respuesta al tratamiento en NB

- 3.1. Validación de la expresión de marcador subrogado de respuesta a tratamiento (recogida de datos clínicos de pacientes; análisis inmunohistoquímico; qRT-PCR; análisis estadísticos).
- 3.2. Estudio de las alteraciones epigenéticas asociadas a respuesta al tratamiento (análisis de perfiles de metilación del ADN y de expresión de ARN no codificantes, correlación con datos clínicos; análisis estadísticos).
- 3.3. Validación y análisis de los cambios epigenético en genes/regiones de interés (qRT-PCR, WB, ensayos funcionales *in vitro*; análisis de enriquecimiento funcional, análisis de correlación con datos de metilación, expresión génica y anomalías cromosómicas; análisis estadísticos).