

### INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER INFANTIL

**Proyecto:** Estudio de las anomalías cromosómicas mediante tecnología de *microarrays*.  
Desarrollo de protocolos de tratamiento personalizados.

**Introducción:** La función, así como las características morfológicas de cada célula, están definidas por la información contenida en el material genético o genoma (ADN de ácido desoxirribonucleico). Esta enorme cantidad de información está estructurada en unidades físicas y funcionales denominadas genes, a partir de las cuales se sintetizan las proteínas.

En algunas ocasiones el ADN de una célula puede dañarse o alterarse. Las alteraciones pueden ser cambios muy pequeños que afectan a un gen (mutación puntual) y pueden dar lugar a un cambio en la información genética. Las mutaciones generalmente afectan genes en los que su versión dañada favorece el desarrollo del tumor (oncogenes y genes supresores de tumores). Las alteraciones también pueden ser grandes, estas modifican una parte importante del genoma (reorganizaciones cromosómicas) afectando a muchos genes. Las reorganizaciones cromosómicas originan de la ruptura del ADN por unos o más puntos. A veces los fragmentos sueltos se insertan del revés, o se insertan donde no les corresponde, o simplemente se pierden. Esto puede dar lugar a que dos genes, en principio distales en el genoma, entren en proximidad física de forma que uno de ellos pueda controlar la expresión del otro o incluso que se fusionen dando lugar a un gen híbrido con propiedades oncogénicas.

La alteración en un gen o una región cromosómica crítica, sitúa a la célula en una situación de incapacidad de realizar correctamente funciones primordiales (como un adecuado control de la división celular) y a la vez le confiere la capacidad para potenciar funciones que le darán ventajas sobre el resto de células no tumorales (como por ejemplo mantener un estado de proliferación constante). Este suceso puede desencadenar una proliferación incontrolada de la célula dañada, dando lugar a una expansión territorial de una clona de células mutadas y la formación de un tumor o neoplasia.

Aunque sabemos que el cáncer está relacionado con alteraciones en nuestro material genético, resulta complicado entender cómo se producen estos errores y como se traducen en alteraciones del comportamiento de las células.

Estudios recientes de secuenciación completa del genoma humano han permitido obtener una visión global del conjunto de mutaciones existentes en los distintos tumores. Así, se ha podido determinar que los tumores sólidos más frecuentes en la infancia y las leucemias presentan una media de 9 mutaciones que dañan genes que pueden favorecer el desarrollo del cáncer. En cambio, los tumores sólidos más frecuentes en el adulto presentan una media de 33-66 mutaciones en genes relevantes. Algunos tumores como los melanomas o los cánceres relacionados con el consumo de tabaco, presentan un número mucho más elevado de mutaciones (una media de 200).

Asimismo la investigación de las alteraciones cromosómicas ha permitido identificar, en algunos casos, reorganizaciones cromosómicas con una relación consistente con un tipo determinado de cáncer. En algunos tumores pediátricos, la presencia de alteraciones cromosómicas específicas tiene un claro significado diagnóstico (ej. sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma), o un valor pronóstico (ej. leucemias, neuroblastoma), mientras que en otros tumores condiciona el tratamiento (ej. neuroblastoma, tumor de Wilms). Sin embargo, en muchos casos todavía hoy no disponemos de suficiente conocimiento para determinar que alteraciones cromosómicas determinan o se relacionan con un tipo o un subgrupo determinado de tumor.

Con el desarrollo de nuevos sistemas de análisis más sofisticados, basados en nuevas tecnologías denominadas microchip o *array* (superficie de sílice con pequeños fragmentos de ADN adheridos), es posible estudiar el genoma de las células tumorales en su totalidad, con mayor resolución (cariotipo molecular) que la técnica tradicional de análisis de cromosomas (cariotipo convencional). De esta forma es posible identificar patrones de alteraciones del material genético en los tumores.

El hallazgo de patrones de alteraciones del ADN es un paso fundamental para una aplicación más racional de los actuales protocolos terapéuticos así como para el desarrollo de nuevos protocolos de tratamiento más dirigidos y personalizados.

En este proyecto nos proponemos investigar las alteraciones cromosómicas de los tumores pediátricos mediante una técnica innovadora, basada en *arrays* de última generación (*CytoScan HD array*, Affymetrix) que combina dos tecnologías avanzadas: 1) *array* de dosis

(*Comparative Genomic Hybridization array* [aCGH]) y 2) *array* basado en polimorfismos de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism* [SNP]). Esta técnica de análisis acopla la tecnología de *arrays* alto rendimiento con un software específico de análisis (*Chromosome Analysis Suite* [ChAS], Affymetrix) que permite analizar de forma simultánea varias regiones cromosómicas y realizar estudios comparativos entre diferentes muestras, además integra bases de datos de otros centros de investigación.

Este sistema de análisis del genoma proporciona varias ventajas respecto a otras técnicas. Permite estudiar con mayor detalle la totalidad de los cromosomas e identificar anomalías cromosómicas muy pequeñas (submicroscópicas) que con un análisis de cariotipo convencional o con *arrays* de más baja resolución pasarían desapercibidas. Permite una mejor caracterización de las alteraciones cromosómicas que afectan al número o estructuras de los mismos. Asimismo permite determinar el porcentaje de células tumorales que presentan una alteración; especialmente importante en tejidos complejos y heterogéneos como son los tumores que han recibido tratamiento. Además esta técnica no requiere grandes cantidades de muestra de ADN, lo que permite analizar biopsias pequeñas de tumor.

**Hipótesis:** La identificación de los cambios en el ADN de cada tipo de tumor y el estudio de cómo interactúan dichos cambios para impulsar el proceso de la enfermedad es un paso fundamental para una aplicación más racional de los protocolos terapéuticos así como para el desarrollo de nuevos protocolos de tratamiento más dirigidos y personalizados.

**Objetivo general:** Estudiar mediante tecnología de *array* de última generación (CytoScan + ChAS) el genoma de los tumores pediátricos diagnosticados en nuestro centro hospitalario (HSJD), con el fin de identificar alteraciones cromosómicas de importancia clínica (diagnostico, pronóstico, determinación del tratamiento) e investigar anomalías recurrentes hasta hoy desconocidas, que puedan ser relevantes para el proceso de enfermedad.

**Objetivos específicos:**

- Caracterizar las anomalías cromosómicas relacionadas con el **diagnostico o pronóstico**;
- Identificar marcadores moleculares para la determinación de **respuesta a tratamiento**;
- Identificar alteraciones cromosómicas asociadas con la **toxicidad de los tratamientos**;
- Estudio de la **biología molecular de los tumores pediátricos**;

- Estudio de la interacción de **las diversas alteraciones genéticas** para impulsar el proceso de la enfermedad;
- **Identificación de nuevas dianas terapéuticas.**

#### **Metodología:**

- Pacientes y muestras: Se recogerán muestras de tejido tumoral pre- o/y post-tratamiento de pacientes diagnosticados y tratados en nuestro centro hospitalario (HSJD). Criterios de inclusión de los casos: 1) recogida y preservación de las muestras según protocolos adecuados; 2) contenido adecuado de célula tumoral viable (determinado por un anatomopatólogo); 3) disponibilidad de datos clínicos (y biológicos).
- Extracción de ADN y ARN;
- Análisis mediante *arrays* Genómicos (*CytoScan HD array*, Affymetrix);
- Análisis de los datos generados por el *array* mediante herramientas bioinformáticas específicas (*ChAS*, Affymetrix);
- Estudio de la relevancia clínica de las alteraciones cromosómicas halladas mediante análisis estadístico y análisis comparativos con parámetros clínicos y biológicos establecidos;
- Estudios comparativos entre muestras pareadas de tumores pre- y post-tratamiento;
- Análisis de los niveles de expresión de genes de interés mediante la técnica de cuantificación con PCR en tiempo real (qRT-PCR);
- Análisis de expresión de proteínas de interés mediante inmunohistoquímica y Western Blot.