

Descubrimiento de nuevos marcadores terapéuticos en neuroblastoma mediante la generación de modelos basados en técnicas de ingeniería de cáncer.

IP: Dr. Aránzazu Villasante.

Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC). Barcelona

1. Antecedentes y estado actual del tema

A lo largo de décadas se han realizado numerosos estudios para comprender las vías moleculares de la patogénesis del cáncer, así como para evaluar medicamentos contra el cáncer utilizando cultivos celulares en monocapa y animales como modelos de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no han trascendido a pacientes y así, solo ~ 5% de los fármacos que funcionaban en estos modelos animales mostraron actividad antitumoral en ensayos clínicos. Esto se debe a que estos modelos de estudio carecen de la capacidad de replicar el microentorno tumoral de los enfermos. Entre otros, los cultivos de monocapa carecen de un microentorno tridimensional, lo que representa una limitación importante ya que las interacciones célula-célula y célula-matriz juegan un papel crucial en el desarrollo de los tumores y en la quimiorresistencia. Por otro lado, los estudios in vivo con modelos animales muchas veces no replican la progresión de la enfermedad tal y como ocurre en humanos. Estos hechos pueden dar lugar a resultados experimentales no trasladables a aplicaciones clínicas.

En el caso del neuroblastoma, la vascularización del tumor desempeña un papel crucial en la regulación del crecimiento del mismo. Por desgracia, los fármacos antiangiogénicos que han demostrado ser efectivos en el tratamiento de esta enfermedad en modelos de ratón, no han mejorado la supervivencia de los pacientes en los ensayos clínicos. Esta disparidad se debe a la naturaleza de los modelos de laboratorio tradicionales, centrados únicamente en la vasculatura generada por angiogénesis de forma “canónica”. Actualmente, se sabe que existe un **mecanismo de vascularización alternativo, conocido como mimetismo vasculogénico**, que se produce en algunos tumores como el neuroblastoma. Durante el proceso de mimetismo vasculogénico, **las células de neuroblastoma se pueden transdiferenciar en células endoteliales derivadas de tumores o TEC** (*tumor-derived endothelial cells*) para formar vasos sanguíneos (**Figura 1a**). Las células TEC parecen ser quimiorresistentes a los tratamientos actuales y además, podrían ser la causa de la recidiva del neuroblastoma. Por lo tanto, **la generación de modelos preclínicos que recapitulen la presencia de células TEC, y los distintos tipos de vasculatura presentes en neuroblastoma, es de vital importancia para posteriormente desarrollar terapias dirigidas a estas células.**

En el año 2017, **desarrollé el primer modelo de neuroblastoma humano vascularizado mediante técnicas de ingeniería de cáncer, que es capaz de recapitular in vitro el mimetismo vasculogénico y la presencia de células TEC observadas en pacientes.** Este modelo se basa en

la técnica conocida como ingeniería *cell sheet* mediante la cual se genera tejido de neuroblastoma sobre un lecho vascular que se cultiva en un biorreactor en condiciones de perfusión de flujo (**Figura 1b**). En este modelo in vitro, al igual que sucede en pacientes, el tratamiento con quimioterapia también desestabiliza las redes vasculares y reduce el volumen del tumor pero no logra actuar sobre las células TEC.

Aunque altamente predictivo de la enfermedad, este modelo de tamaño fisiológico, sin embargo tiene ciertas limitaciones. Estas son el tamaño del mismo, similar al de una glándula suprarrenal de un paciente, lo cual requiere el uso de un gran número de células y de reactivos, así como la necesidad de unas instalaciones especializadas para albergar biorreactores de perfusión de gran tamaño.

Una manera de mejorar y optimizar este

primer modelo de neuroblastoma es mediante su miniaturización en un chip microfluídico. Un chip microfluídico es un dispositivo de plástico, del tamaño de un pulgar, que dispone de microcanales para cultivar múltiples tipos de células humanas y pequeñas

cámaras llenas de medio de cultivo (**Figura 1c**). La principal **ventaja de estos chips**, además de su potencial predictivo, es que ofrecen un **sistema altamente personalizable**, económico ya que utiliza una baja cantidad de células del paciente y de microlitros de reactivos, que requiere poco tiempo de ensamblaje y que es compatible con plataformas de ensayos de fármacos de alto rendimiento. Recientemente he miniaturizado el modelo de tamaño fisiológico y he generado un **modelo de neuroblastoma-on-a-chip vascularizado y funcional**, que de nuevo recapitula el mimetismo **vasculogénico y la existencia de células TEC** (**Figura 1c**). Este modelo de “neuroblastoma-on-a-chip” sienta las bases de la propuesta de investigación que presento en la Asociación NEN.

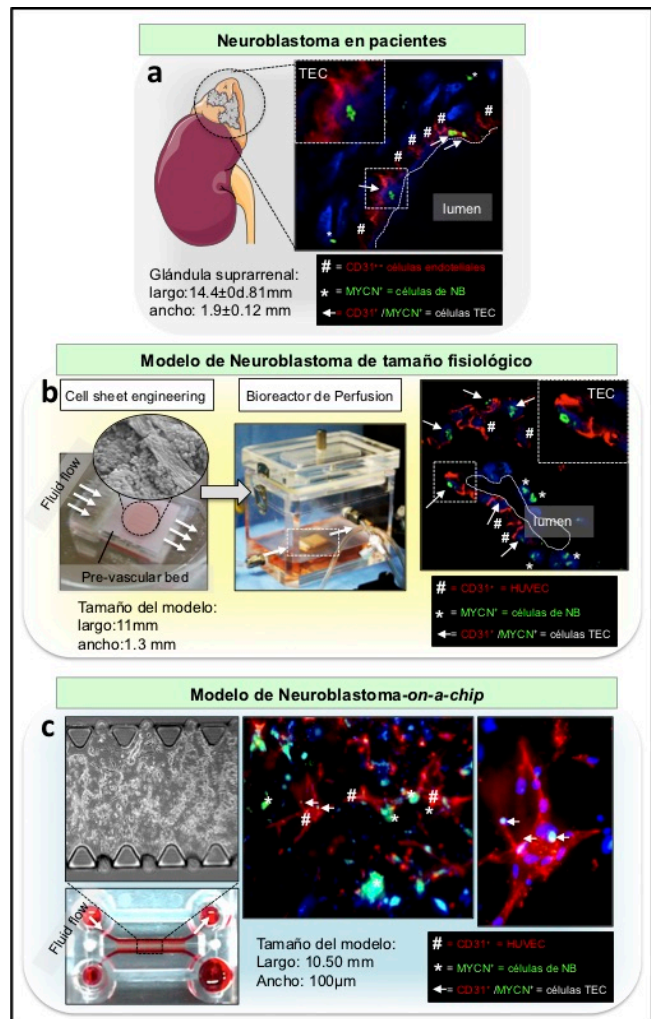


Figura 1. Modelos de neuroblastoma generados por técnicas de ingeniería de cáncer. (a) Sección de neuroblastoma de paciente mostrando la presencia de vasculatura y células TEC. **(b)** Modelo de neuroblastoma de tamaño fisiológico, generado por ingeniería *cell sheet* y acoplado a un bioreactor de perfusión, en el cual se observa vasculatura funcional y células TEC. **(c)** Modelo de neuroblastoma miniaturizado -“neuroblastoma-on-a-chip”, mediante el cual también recapitulamos la presencia de vasculatura y células TEC.

2. Hipótesis de trabajo y objetivo general del proyecto

El neuroblastoma es un tumor altamente heterogéneo y existe una necesidad real de terapias más efectivas para su tratamiento. Sin embargo, la dificultad de replicar con fidelidad el complejo entorno del cáncer humano es una barrera crítica para comprender los mecanismos subyacentes a la progresión de esta enfermedad y, además, dificulta la posibilidad de evaluar las terapias dirigidas contra el cáncer. **Esta propuesta se enfoca en tres problemas principales:** (1) ensayos clínicos fallidos con fármacos antiangiogénicos los cuales previamente demostraron ser efectivos en modelos de laboratorio, (2) la presencia de células TEC quimiorresistentes a los tratamientos actuales que además, podrían ser la causa de la recidiva del neuroblastoma y, (3) el desconocimiento de marcadores específicos en las células TEC.

La **hipótesis general de trabajo** es que con un mayor conocimiento de la biología de las células TEC seríamos capaces de generar una terapia específica (fármacos, nanopartículas dirigidas, inmunoterapia...), contra estas células. El **principal objetivo** de esta propuesta es identificar marcadores específicos en las células TEC, para lo cual se va a generar un modelo biomimético de neuroblastoma que recapitulará la heterogeneidad del tumor, así como la biología de las células TEC. Finalmente, esperamos que el descubrimiento de nuevos marcadores ayude a desarrollar una terapia contra las células TEC, que sería complementaria al resto de estrategias utilizadas en la clínica para frenar la angiogénesis “tradicional” y la progresión de las células “normales” de neuroblastoma.

3. Metodología

3.1- Aislamiento y caracterización de células TEC [8 meses].

En estudios previos utilizamos la línea comercial de neuroblastoma SK-N-BE(2) (MYCN amplificado). Seguiremos trabajando con esta línea, pero transducida doblemente con plásmidos que incluyan dos proteínas fluorescentes diferentes GFP y Tomato. La expresión de GFP estará controlada por el promotor de CD31 (que se expresa en células endoteliales y TEC) y la expresión de tomato por un promotor constitutivo. La masa tumoral (células normales de neuroblastoma) expresará solo tomato, mientras que las células TEC, además de expresar tomato, expresarán GFP, lo cual facilitará el aislamiento de éstas células mediante sorter. Mediante espectrometría de masas, compararemos las proteínas de membrana presentes en células TEC, células normales de neuroblastoma y una línea de células endoteliales. Mediante análisis de proteómica seleccionaremos aquellos marcadores que sólo se expresan en las células TEC.

3.2- Validación de nuevos marcadores en muestras de pacientes [16 meses]

En colaboración con el laboratorio del Dr. Jaume Mora (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona), validaremos los marcadores candidatos utilizando muestras de neuroblastoma de pacientes con MYCN amplificado de dos formas:

a) mediante técnicas de inmunofluorescencia y doble marcaje (anticuerpo anti-MYCN y anticuerpo anti-marcador candidato) en cortes histológicos. [2/16 meses]

b) generación de neuroblastoma-on-a-chip utilizando células de neuroblastoma de pacientes transducidas doblemente, para posterior sorter de células, espectrometría de masas y proteómica. [14/16 meses]

3. Presupuesto económico y justificación

PRESUPUESTO (en euros)	1ª Anualidad	2ª Anualidad	Total
Material inventariable	4.000		4.000
Material fungible	10.500	10.500	21.000
Servicios tecnológicos	10.000	16.000	26.000
Costes indirectos	6.125	6.625	12.750
TOTAL	30.625	33.125	63.750

MATERIAL INVENTARIABLE:

• Bomba peristáltica de 8 canales	4.000
SUBTOTAL	4.000

MATERIAL FUNGIBLE:

• Material para chips, holders, tubing, conectores, etc.	6.000
• Medios de cultivo, placas, flasks, pipetas, puntas y otros reactivos para cultivos celulares	9.000
• Consumibles de laboratorio para biología celular y molecular (incluidos medios, anticuerpos, plásmidos, kits de biología celular y molecular, reactivos químicos, material de laboratorio, etc.).	6.000
SUBTOTAL	21.000

SERVICIOS TECNOLÓGICOS:

• Unidad de citometría y sorter (IRB– Barcelona)	6.000
• Unidad de Espectrometría de masas y proteómica (IRB – Barcelona)	20.000
SUBTOTAL	26.000
TOTAL DE AYUDA SOLICITADA	51.000

JUSTIFICACIÓN GENERAL

Se solicita financiación para cuatro ítems principalmente, equipamiento para la compra de una bomba peristáltica nueva; fungible para el mantenimiento de las actividades básicas de investigación del día a día; una partida para servicios tecnológicos y finalmente costes indirectos del centro donde se desarrollará el proyecto.

- **EQUIPAMIENTO:** Para poder cultivar y perfundir el mayor número de chips en paralelo de manera independiente, se precisaría de una bomba peristáltica de 8 canales con la cual podríamos generar 8 modelos de neuroblastoma por experimento. Esta bomba sería de uso exclusivo para este proyecto.

Calculamos que el total de este equipamiento de acuerdo con el precio de mercado y a ofertas previas, es de 4.000 euros

- **FUNGIBLE:** Se solicita también una partida presupuestaria que cubra los gastos de material fungible, como la compra de material para chips y demás elementos necesarios para el uso de sistemas microfluídicos (tubing, holders, conectores, etc); gastos derivados del funcionamiento de un laboratorio de biología celular y molecular (mantenimiento de cultivos incluyendo medios, placas de cultivo, anticuerpos, plásmidos para generar la línea reporter, etc...

****En base a nuestra experiencia en otros proyectos de investigación previos, se estima un coste total en fungible para la ejecución del proyecto de 21.000 euros****

- **SERVICIOS TECNOLÓGICOS:**

Incluiría el coste de los servicios tecnológicos necesarios para el procesamiento de las muestras y la obtención de datos/resultados experimentales (sorter de células, espectrometría de masas y proteómica).

****El coste estimado en base al precio establecido por el IRB es de 26.000 euros****

- **COSTES INDIRECTOS:**

El centro donde desarrollaré el proyecto, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), aplica por regla general un porcentaje del 25% de los costes directos, en concepto de costes indirectos para hacer frente a los gastos estructurales que conllevará este proyecto. Desconocemos la política de la fundación NEN en este ámbito y no sabemos cuanto de elegibles son estos costes, con lo que nos adaptaremos a lo que indiquen las bases de sus convocatorias o sus prácticas habituales.