

8^a Beca Observador Internacional | Fundación Maripaz Jiménez Casado
Memoria de la estancia (Junio 2024)
Pablo Romero González

La estancia tuvo lugar durante el mes de Junio del 2024 (del 1 de Junio al 31 de Junio) en el Institute of Genetics and Cancer de la Universidad de Edimburgo (Escocia, Reino Unido), en el grupo liderado por la Dra. Val Brunton y bajo la supervisión de Piotr Manasterski (investigador postdoctoral) y Molly Danks (investigadora predoctoral). La Dra. Val Brunton estudió Farmacia y en 1990 se doctoró en Medicina Oncológica por la Universidad de Glasgow con una investigación preclínica sobre el desarrollo de inhibidores de los receptores tirosina quinasa EGF. Durante años trabajó en el desarrollo clínico y preclínico de inhibidores de FAK y Src en distintas instituciones del Reino Unido. En el año 2008 se unió a la Universidad de Edimburgo donde dirige un grupo de investigación y desde 2013 es la presidenta del departamento de investigación “Cancer Therapeutics”.

El objetivo de la estancia fue aprender dos técnicas de investigación preclínica con aplicaciones en el área de sarcomas, con el objetivo posterior de enseñar a los demás miembros de mi grupo en Madrid y aplicarlas en nuestros proyectos de investigación. Dichas técnicas son el análisis masivo de fármacos (high-throughput screening) y la modificación del genoma mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

El análisis “high-throughput” de fármacos fue realizado tanto en modelos 2D como 3D de varios subtipos de sarcomas. Las siguientes tablas muestran los modelos celulares que se usaron para el estudio y los distintos fármacos y combinaciones de fármacos que se analizaron.

Tabla 1. Modelos celulares usados de varios subtipos de sarcoma.

Modelo	Subtipo de sarcoma
IEC139	Tumor fibroso solitario
INT-SFT	Tumor fibroso solitario
1765-92	Liposarcoma mixoide
SK-N-MC	Sarcoma de Ewing
SK-UT-1	Leiomiosarcoma uterino
IEC005	Leiomiosarcoma

Tabla 2. Fármacos usados individualmente y en combinación.

Fármaco (monoterapia)	Combinación de fármacos
Berzosertib	Berzosertib + Doxorubicina
Trabectedina	Trabectedina + Doxorubicina
Ecubectedina	Ecubectedina + Doxorubicina
Doxorubicina	

El aspecto novedoso de este estudio fue el uso de un dispensador automático de fármacos para placas de cultivos celulares de 384 pocillos. Dicho aparato, aparte de dispensar los fármacos rápidamente y con una gran exactitud, también realiza los cálculos de concentraciones y volúmenes para cada condición experimental, lo cual supone un gran ahorro de tiempo y material. Además, al tratarse de un proceso automatizado, se elimina en gran medida el factor de error.

humano que siempre está presente cuando la tarea la realiza el investigador, por lo que los resultados son más fiables, robustos y reproducibles.

El experimento consistía en tratar las células durante 72h con concentraciones ascendentes de cada fármaco en solitario. Igualmente, se combinó Doxorrubicina con cada uno de los otros tres fármacos para estudiar si existe una respuesta sinérgica. Se entiende como sinergia a la acción de dos o más causas cuyo efecto es superior a la suma de los efectos tomados individualmente. Para el estudio en modelos 3D, usamos únicamente las líneas SK-UT-1 e IEC139. Las células fueron tratadas con seis concentraciones (0.01 μM , 0.03 μM , 0.1 μM , 0.3 μM , 1 μM y 3 μM) de Doxorrubicina y de Berzosertib combinadas entre ellas. Tras 72h de tratamiento, se analizó la viabilidad celular y se calculó la nota de sinergia (synergy score) usando el método Bliss. La Tabla 3 resume la interpretación del valor de sinergia. Los gráficos de la Figura 1 muestran la nota de sinergia para cada condición del experimento. En cada gráfico, la zona superior indica las concentraciones de Berzosertib, el lateral izquierdo indica las concentraciones de Doxorrubicina y el lateral derecho indica la escala de colores usada para señalizar sinergia o antagonismo. Como indican los resultados, existe sinergia entre Berzosertib y Doxorrubicina en la línea celular SK-UT-1 (condiciones marcadas en azul) mientras que, en el caso de IEC139, no existe sinergia sino todo lo contrario (antagonismo) en determinadas combinaciones.

Tabla 3. Interpretación de las notas de sinergia mediante el método Bliss.

Bliss synergy score							Significado	
Mayor de 10							Sinergia	
Entre 10 y -10							Adición	
Menor de -10							Antagonismo	

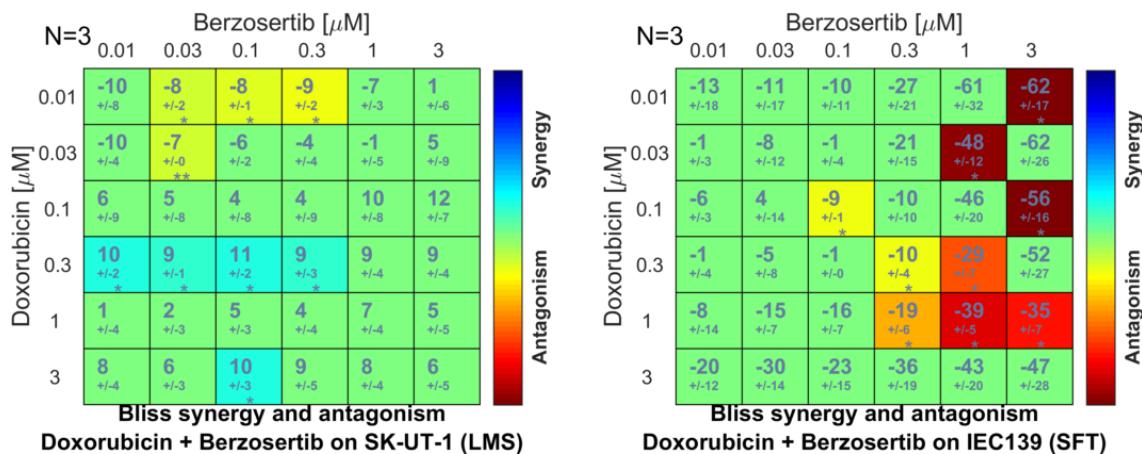


Figura 1. Matrices de combinación Berzosertib + Doxorubicina. Las líneas celulares SK-UT-1 (izquierda) e IEC139 (derecha) fueron tratadas con seis concentraciones de Doxorrubicina y de Berzosertib y la viabilidad celular fue analizada para determinar sinergia entre ambos fármacos. La escala de colores indica sinergia (azul) o antagonismo (marrón-rojo).

El mismo experimento se realizó en modelos 2D de todas las líneas celulares: SK-UT-1, IEC005, INT-SFT, IEC139, SK-N-MC y 1765-92. La Figura 2 nos muestra que solo la línea celular SK-UT-1 (leiomiosarcoma) obtuvo una respuesta sinérgica de la combinación de

Doxorrubicina y Berzosertib, al igual que ocurrió con los modelos 3D. La línea celular IEC005 presenta varias condiciones en las que existe sinergia o se aproxima lo suficiente. Por el contrario, las demás líneas celulares presentan respuestas antagonistas o de adición cuando se combinan ambos fármacos.

Cabe mencionar que todos los experimentos mencionados han sido realizados en triplicados en un periodo de un mes sin que la carga de trabajo fuese excesiva, lo cual demuestra la gran utilidad del dispensador y las placas de 384 pocillos.

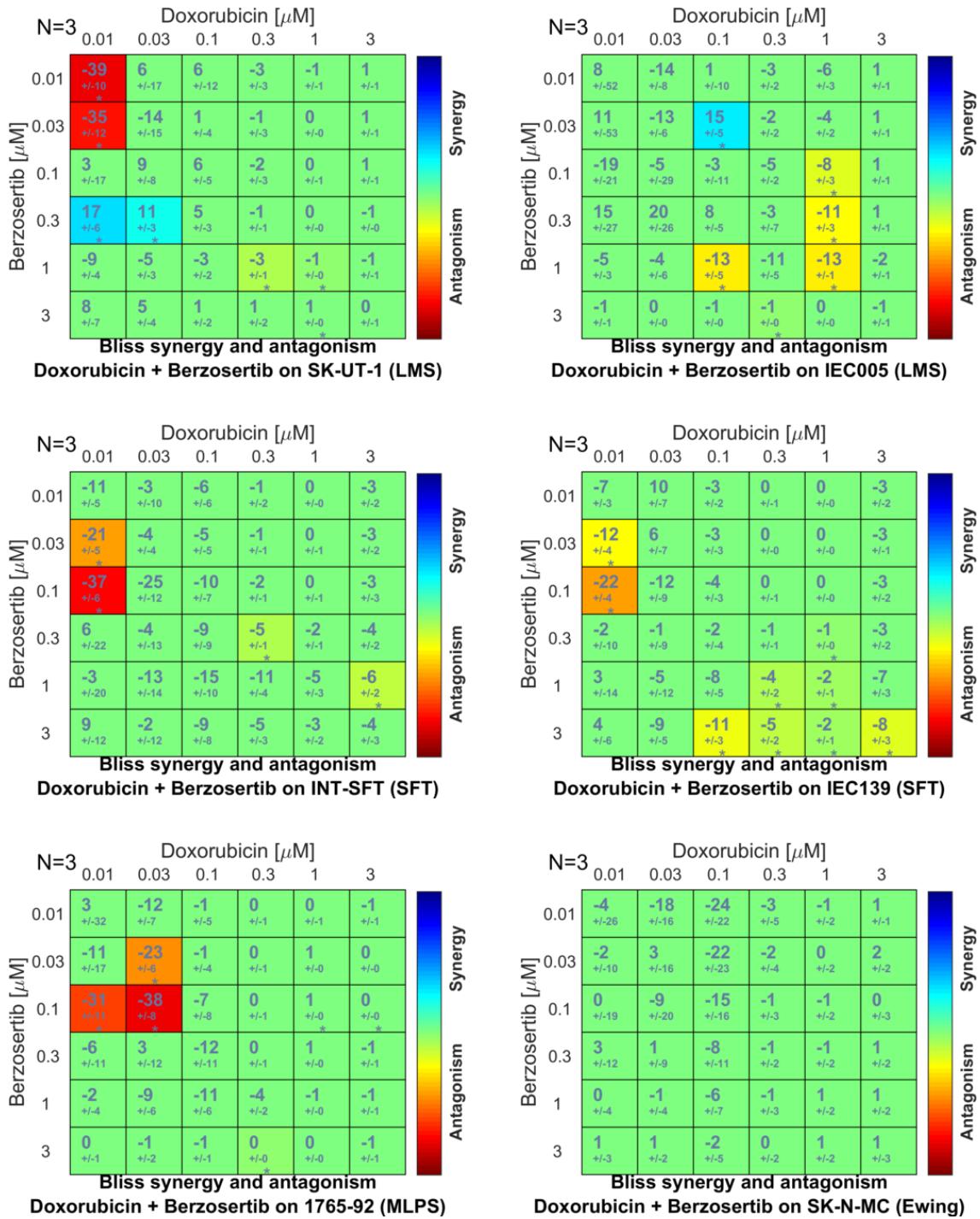


Figura 2. Matrices de combinación Doxorrubicina + Berzosertib en varias líneas celulares. Seis líneas celulares (SK-UT-1, IEC005, INT-SFT, IEC139, 1765-92, SK-N-MC) fueron tratadas con Doxorrubicina y de Berzosertib, en combinación. La viabilidad celular fue analizada para determinar sinergia entre ambos fármacos. La escala de colores indica sinergia (azul) o antagonismo (marrón-rojo).

La segunda técnica de investigación preclínica fue la modificación del genoma usando la tecnología CRISPR/Cas9. Esta tecnología se introdujo en 2009 y hace uso de plásmidos (moléculas pequeñas de ADN circular) producidos en bacterias que posteriormente se introducen (transfección) en las células que están siendo investigadas. Dichos plásmidos contienen información genética y otros componentes capaces de realizar cambios en el genoma original de la célula. Con el tiempo, el proceso se ha mejorado hasta el punto de que no es necesario usar plásmidos bacterianos sino unas moléculas conocidas como Ribonucleoproteínas (RNP). Este nuevo método presenta grandes ventajas:

- a. Evita usar plásmidos bacterianos. Esto implica que ya no es necesario trabajar con bacterias y conseguir que produzcan los plásmidos, lo cual supone un gran ahorro de material y, sobre todo, de tiempo.
- b. Simplifica el proceso de introducir la nueva información genética en la célula. Anteriormente, los plásmidos debían ser introducidos en la célula y pasar por una serie de eventos celulares previos a la modificación del genoma. Con el uso de RNP, la modificación de genoma se produce rápidamente tras la transfección.
- c. Las moléculas RNP se degradan antes que los plásmidos, que pueden estar presentes en la célula durante bastante tiempo. La degradación temprana de las RNP reduce las probabilidades de que se produzcan modificaciones erróneas en el genoma, lo cual también reduce la citotoxicidad que podría causar dicha modificación errónea.

Teniendo todo esto en cuenta, el experimento que se realizó como demostración de esta técnica consistió en silenciar el gen *ATR* en las líneas celulares SK-UT-1 e IEC139. El gen *ATR* codifica la proteína ATR que es un regulador de la integridad del genoma y actúa en respuesta a un tipo de daño en ADN conocido como estrés replicativo. En células tumorales, el estrés replicativo está acentuado debido a la gran velocidad con la que las células se reproducen y proliferan. Esto convierte a ATR en una debilidad de los tumores, ya que su ausencia supondría el aumento de la inestabilidad del genoma y la muerte celular.

Gracias a la estancia en el Institute of Genetics and Cancer de Edimburgo, el grupo de investigación del que formo parte aquí en Madrid ha aprendido dos técnicas nuevas que van a acelerar y mejorar los resultados de nuestros proyectos de investigación en sarcoma. Actualmente estamos en proceso de obtener un dispensador de fármacos similar al que usé en Edimburgo y esperamos que agilice la labor de descubrimiento de fármacos y combinaciones para aquellos sarcomas que no disponen de terapias establecidas. Además, vamos a incorporar la tecnología de las RNP (ribonucleoproteínas) en los experimentos de modificación genética debido al éxito y la facilidad con la que lo llevé a cabo en Edimburgo. Esperamos que ambas técnicas nuevas nos sean favorables para continuar con la investigación en sarcomas.



Pablo Romero González



Dra. Val Brunton