(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 849 965**

(21) Número de solicitud: 202030147

(51) Int. CI.:

C12Q 1/6886 (2008.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

21.02.2020

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

24.08.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

20.10.2023

Fecha de concesión:

10.11.2023

(45) Fecha de publicación de la concesión:

17.11.2023

(73) Titular/es:

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN BIOSANITARIA DE ASTURIAS (FINBA-ISPA) (100.0%)
Avenida de Roma s/n
33011 Oviedo (Asturias) ES

(72) Inventor/es:

ANDERSON, Per;
CARRILO- GÁLVEZ, Ana Belén;
MARTÍN, Francisco y
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, René

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **MÉTODO PARA PREDECIR O PRONOSTICAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

(57) Resumen:
Biomarcador para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento del cáncer, en concreto, al tratamiento de los sarcomas, preferiblemente del osteosarcoma.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA PREDECIR O PRONOSTICAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, y se refiere a un biomarcador y a un método para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento del cáncer, preferiblemente al tratamiento de los sarcomas.

ESTADO DEL ARTE

Los sarcomas óseos primarios, que incluyen principalmente osteosarcoma, condrosarcoma y sarcoma de Ewing, son un grupo de tumores raros de origen mesenquimatoso o ectodérmico que constituye <0.2% de todas las neoplasias malignas en adultos. Sin embargo, los osteosarcomas de alto grado y los sarcomas de Ewing afectan principalmente a niños y adultos jóvenes (<20 años) donde representan aproximadamente el 3.5% y el 2%, respectivamente, de todos los cánceres sólidos. Aunque los avances en la cirugía y la quimioterapia con múltiples agentes han mejorado notablemente el pronóstico del sarcoma óseo, la tasa de supervivencia a 5 años se mantiene en 60-70% para pacientes con enfermedad localizada, y tan baja como 20-30% para pacientes con metástasis. El mal pronóstico de los sarcomas óseos está en parte relacionado con su resistencia a las terapias convencionales de quimioterapia y radiación. Esto hace que los cánceres de hueso y cartílago sean la tercera causa más importante de muerte por cáncer en niños y adolescentes en los Estados Unidos. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas terapias, biomarcadores (diagnósticos, pronósticos o terapéuticos) y una mayor comprensión de los mecanismos detrás de la quimio y radiorresistencia de los sarcomas óseos.

El factor de crecimiento transformante (TGF) -β es una citocina pleiotrópica que regula la proliferación, la angiogénesis, la carcinogénesis y las respuestas inmunes. El TGF-β se produce como un complejo inactivo que consiste en el homodímero de TGF-β maduro unido al péptido asociado a la latencia (LAP). Un cambio conformacional de LAP inducido por integrinas, proteasas, especies reactivas de oxígeno o pH bajo, libera TGF-β que luego puede unirse a sus receptores e inducir la señalización a través de vías canónicas (SMAD) y no canónicas. Si bien el TGF-β actúa inicialmente como un supresor tumoral, en las etapas posteriores de la carcinogénesis promueve el

crecimiento tumoral y la metástasis a través de la inducción de la transición epitelial a mesenquimatosa (EMT), la promoción de la proliferación de células tumorales, la inhibición de la respuesta inmune antitumoral y el reclutamiento/inducción de fibroblastos asociados al cáncer en el microambiente tumoral. Es importante destacar que los datos recientes sugieren que el TGF-β también puede desempeñar un papel en la quimio y radiorresistencia de los tumores. Las repeticiones de glicoproteína A predominantes (GARP), también conocidas como repeticiones ricas en leucina que contienen 32 (LRRC32) se unen a TGF-β1 latente a la superficie de las células T reguladoras activadas (Tregs) y las células B donde promueven la activación de TGF-β1 y es fundamental para sus funciones supresoras y el cambio de isotipo, respectivamente. Estudios recientes han demostrado que la expresión de GARP en tumores colorrectales y de cáncer de pulmón humanos se asocia con un peor pronóstico. Sin embargo, se desconoce la expresión y el papel de GARP en las neoplasias mesenquimales. Las células madre mesenquimales (MSC) son células multipotentes no hematopoyéticas que pueden diferenciarse en osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Las MSC representan un componente importante de la médula ósea (BM) donde regulan la hematopoyesis y participan en la homeostasis ósea. La evidencia abundante puede contener los eventos oncogénicos durante la diferenciación de las MSC pueden dar lugar a sarcomas óseos. De hecho, algunos sarcomas incluyen marcadores de superficie y perfil de expresión génica con las MSC y las BM-MSC murinas pueden dar lugar a un osteosarcoma a través de la transformación espontánea y la modificación genética.. Sin embargo, se desconoce si GARP se expresa en células de sarcoma óseo y se desconoce los posibles efectos de GARP sobre su tumorgenicidad y quimio/radiosensibilidad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención muestran, en los ejemplos de la invención, que GARP se expresa en MSC derivadas de BM y en varias líneas celulares primarias de sarcoma óseo derivado de pacientes establecidas y recientemente aisladas. También que el silenciamiento de GARP inhibió su proliferación, mientras que la sobreexpresión de GARP aumentó su proliferación *in vitro* e *in vivo*, a través de un mecanismo dependiente de TGF-β. Las células de sarcoma óseo que sobreexpresan GARP fueron más resistentes a la muerte celular *in vitro* inducida por etopósido, doxorrubicina e irradiación, que nuevamente dependía de un aumento de la activación de TGF-β. Además muestran que GARP se sobreexpresa en los sarcomas osteo, condro y

pleomórficos humanos y se asocia con un pronóstico significativamente peor. Es importante destacar que la expresión de GARP en tumores de sarcoma humano se asoció con una menor supervivencia y se observó una tendencia hacia la expresión de GARP que tiene un valor pronóstico independiente. Por tanto, GARP podría servir como un objetivo terapéutico para el tratamiento del sarcoma óseo y también como un posible marcador pronóstico y predictivo de la respuesta de los sarcomas óseos a la quimioterapia y la radioterapia.

Por tanto, GARP podría servir como un marcador con valor terapéutico, pronóstico y predictivo para los tumores, y más concretamente, de sarcoma óseo.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a GARP para su uso como biomarcador para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento del cáncer en un individuo.

En esta memoria se entiende GARP (también llamado *Glycoprotein A Repetitions Predominant, Leucine Rich Repeat Containing 32, Transforming Growth Factor Beta Activator LRRC32, Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 32, D11S833E, Garpin, LRRC32*) es un regulador clave del factor de crecimiento transformante beta (TGFB1, TGFB2 y TGFB3) que controla la activación de TGF-beta manteniéndolo en estado latente durante el almacenamiento en el espacio extracelular. Se asocia específicamente mediante enlaces disulfuro con el péptido asociado a la latencia (LAP), que es la cadena reguladora de TGF-beta, y regula la activación dependiente de integrina de TGF-beta. Capaz de competir con LTBP1 para unirse a la cadena reguladora LAP de TGF-beta. Controla la activación de TGF-beta-1 (TGFB1) en la superficie de las células T reguladoras activadas (Tregs). Requerido para la fusión epitelial durante el desarrollo del paladar mediante la regulación de la activación de TGF-beta-3 (TGFB3) (por similitud).

En el contexto de la presente invención, “GARP” se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia del gen “GARP”, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) Moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

b) Moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) Moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético.

d) Moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GARP. Entre otras posibles secuencias nucleotídicas que codifican GARP se encuentra, pero sin limitarse, SEQ ID NO: 1.

Gene ID: 2615

Localización del gen: 11q13.5

SEQ ID NO: 1

GGTGGGGCAGCTGAGCGGCCTGCTCCTCCTCGGGCCGTGACCCCGGGGTCTGGCGCGGGGTGGGACC
CGGGGGCGGGTTTGCGCAAAATGTGCCGAGACTGCCCGGGAGAGGAGCTGCGGCCGCGCTGAGCCA
GGTGGACAAGAAGGTCTCGTGCCAGGTTCTGGGCCTGCTCCAGGTCCCCTCGGTGCTCCCGCCAGACA
CTGAGACCCTTGATCTATCTGGGAACCAGCTGCGGAGTATCCTGGCCTCACCCCTGGGCTTCTACACAG
CACTTCGTCACCTGGACCTGAGCACCAATGAGATCAGCTTCCTCCAGCCAGGAGCCTTCCAGGCCCTGA
CCCACCTGGAGCACCTCAGCCTGGCTCACAACCGGCTGGCGATGGCCACTGCGCTGAGTGCTGGTGGC
CTGGGCCCCCTGCCACGCGTGACCTCCCTGGACCTGTCTGGGAACAGCCTGTACAGCGGCCTGCTGGA
GCGGCTGCTGGGGGAGGCACCCAGCCTGCATACCCTCTCACTGGCGGAGAACAGTCTGACTCGCCTCA
CCCGCCACACCTTCCGGGACATGCCTGCGCTGGAGCAGCTTGACCTGCATAGCAACGTGCTGATGGAC
ATCGAGGATGGCGCCTTCGAGGGTCTGCCCCGCCTGACCCATCTCAACCTCTCCAGGAATTCCCTCACCT
GCATCTCCGACTTCAGCCTCCAGCAGCTGCGGGTGCTAGACCTGAGCTGCAACAGCATCGAGGCCTTTC
AGACGGCCTCCCAGCCCCAGGCTGAGTTCCAGCTCACCTGGCTTGACCTGCGGGAGAACAAACTGCTC
CATTTCCCCGACCTGGCCGCGCTCCCGAGACTCATCTACCTGAACTTGTCCAACAACCTCATCCGGCTCC
CCACAGGGCCACCCCAGGACAGCAAGGGCATCCACGCACCTTCCGAGGGCTGGTCAGCCCTGCCCCTC
TCAGCCCCCAGCGGGAATGCCAGCGGCCGCCCCCTTTCCCAGCTCTTGAATCTGGATTTGAGCTACAAT
GAGATTGAGCTCATCCCCGACAGCTTTCTTGAGCACCTGACCTCCCTGTGCTTCCTGAACCTCAGCAGAA
ACTGCTTGCGGACCTTTGAGGCCCGGCGCTTAGGCTCCCTGCCCTGCCTGATGCTCCTTGACTTAAGCC
ACAATGCCCTGGAGACACTGGAACTGGGCGCCAGAGCCCTGGGGTCTCTGCGGACGCTGCTCCTACAG
GGCAATGCCCTGCGGGACCTGCCCCCATACACCTTTGCCAATCTGGCCAGCCTGCAGCGGCTCAACCTG
CAGGGGAACCGAGTCAGCCCCTGTGGGGGGCCAGATGAGCCTGGCCCCTCCGGCTGTGTGGCCTTCTC
CGGCATCACCTCCCTCCGCAGCCTGAGCCTGGTGGATAATGAGATAGAGCTGCTCAGGGCAGGGGCCT
TCCTCCACACCCCACTGACTGAGCTGGACCTTTCTTCCAATCCTGGGCTGGAGGTGGCCACGGGGGCCT
TGGGAGGCCTGGAGGCCTCCTTGGAGGTCCTGGCACTGCAGGGCAACGGGCTGATGGTCCTGCAGGT
GGACCTGCCCTGCTTCATCTGCCTCAAGCGGCTCAATCTTGCCGAGAACCGCCTGAGCCACCTTCCCGCC
TGGACACAGGCTGTGTCACTGGAGGTGCTGGACCTGCGAAACAACAGCTTCAGCCTCCTGCCAGGCAG
TGCCATGGGTGGCCTGGAGACCAGCCTCCGGCGCCTCTACCTGCAGGGGAATCCACTCAGCTGCTGCG
GCAATGGCTGGCTGGCAGCCCAGCTGCACCAGGGCCGTGTGGACGTGGACGCCACCCAGGACCTGAT
CTGCCGCTTCAGCTCCCAGGAGGAGGTGTCCCTGAGCCACGTGCGTCCCGAGGACTGTGAGAAGGGG
GGACTGAAGAACATCAACCTCATCATCATCCTCACCTTCATACTGGTCTCTGCCATCCTCCTCACCACGCT
GGCCGCCTGCTGCTGCGTCCGCCGGCAGAAGTTTAACCAACAGTATAAAGCCTAAAGAAGCCGGGAGA
CACTCTAGGTCAGTGGGGGAGCCTGAGGTACAGAGAAGAGTGAGGACTGACTCAAGGTCACACAGTG
ATCCGGGATCCCAGAACTCTGGTCTCCAAATTACAGCCCAGGACACCTTTCTCTGCCGCCTGCTGCATCA
GTGGGTGACCCCCTTCCCGGGCTGCACTTTGGGTCCAGCTGTGGAAGCCAGAAGTTGGGCGGTTTCAG

GGACAGCCGAGAATAATGTTGACCTGTCAGATCAACAAATCTTCACTGAGCATGTATTTTGTGCCACAC
CCTGCTCTGGGCACTGGGAATGCTGGGAAATGAGATACATTCCCGCCCTCAAGAATCTCCCAGTCTGGT
AGGAGAGAGTGCTGCAGAGCCACGTGGCCGCCACGCAGTGTGCTTAGGGCCTGAGGTGTGAAAGCCC
AGGGCTCCAGAGCTCGGCAGGCCCCGCTGGTTTGGTGCGGTGAGTCCTGCCCCGGCTGTGCCAGGGT
GAGGGAGGGCCAAGCCCAGGAGGATTTGTCTGAGACATTTCCAAGCAGACTGTTTGTCACGTCTTCTG
AGAATGACTTTCAGTCTCTCTGAAAATGAAAAGCTTAGGACCAGAAGAGAGAATTGGAGCTGTACGAG
TGTGTCTCGGATCTGGTGTTGTTAGGTGGGCCACGGCGGCTCCAGCAGGGTCTGGTTAAGGGGTCCAG
CCCAGCACTGGACCATTCCGTCTCCTGCTCTGGACTTGCCCTCTCCCTTCCTGGCACTCTCATGTTGCATA
CCCTGACCCCAGTGCTGCTCTAAGCACCGTCCCTGCCCAGCCCCACTTCTCCATCGCAGCCCCACCTTGG
CTGCTGAGCCAGGAGCTAAAACCTTAGATATCTGGTTCTGTTTTGCACCCAGCTTGGCAGATGTGGATT
TGAATCCAAGCCTTGTGTCTGCCCCTATGTGACAGCTCTATATTTTATCCCCGTTTTATAAAAGAGGAAA
CTGAAGTTCTGAAAATCTCCTTCCAGGGCCCCAGCTAACTAATGCCATAGGTGAGATTCAAACCTTCATC
CTTCTGTCTCCAGGGCCTGATCTTTACCACTGCAGGGGCTGCAGGCCGTTAAGTGGACAGGAAGTGGC
CCCACATAGCCCGAGCAGGGTCTGGAAGCATCCTGTGCTGTGCACACCTGCTCTCTCCTCTCTCCCAGG
CAGGCAGCTGCAGGCGCTCTCCTCCTTCTCTGCCTGTTTCCCTCCTCCCTTCCTTTCCACCCTGGTGTGGG
TTCTCCTGTTCTCTCTGTGCTCTTGCATTCTCTCATTCCCTTTTCCTCTATTGAGCAGAGCCTGGAGTTTGA
GACTATGGAATCCAACCTCCCCATTGCACAGATGGGGAAACTGAGGCTTAGGAAGAGAATGAAACTTG
TGGAGAGCTTATACAGAGCCTCTGGGGGAAAAAAGAGCCCTTATTTGTGGGGTGAGATTGGGGGTTG
GACCAGAGTGATGTCCTCTCTCAGCTATCACATCACAAGATAATGCTGGCTCCAAACTTCCTTTCTGTGC
CTCATCATGCAAGGATCTTTTTTCCCTCTTACAAAAACAGGTAAAAAGCCTCACCCAGATGACCCCCATC
CCTCATACCATGGAGTCATGAGCTGTCTGGGAAGAATGGACGTGCTGGGACCAACTCAAGACCTTGTTT
TGCTGTCTTCATCATCTTACCTGTGCTTGGCCCACAGTCTGGCTCATGATGTGGGCTCAGTAATGTGCGA
GAAAGTGAAAATGCCACTCTCTCCACCCCATTTTACAGAGGAGAACACCAAGGCCCAGAGGAAGTTAA
GGGAGAGTCAATGGGCAGAGCCAGGGCTAGGCCCTGGTGGTGTGTGGAGCACCCAGGCAGACCCAG
TCCTGGTTGGGATCACACCCACGGGTGCTACTGCACGTAACACTCCTCCTTAGGCCTGGAGGCCAAGGT
GTGGGTCCCCACGCCTGATCTTTGAAAACACTACACAGGGCTGCTGTCACTTCCCAGGGCCCAGGCCTC
AGCCCAGGCCTCGGGACCAACTCTTTGTATAACCTACCTGAATGTATTAAAAACTAATTTTGGAGAAGC
A

SEQ ID NO: 2

MATALSAGGLGPLPRVTSLDLSGNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTRLTRHTF
RDMPALEQLDLHSNVLMDIEDGAFEGLPRLTHLNLSRNSLTCISDFSLQQLRVLDLSC
NSIEAFQTASQPQAEFQLTWLDLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQD
SKGIHAPSEGWSALPLSAPSGNASGRPLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNL
SRNCLRTFEARRLGSLPCLMLLDLSHNALETLELGARALGSLRTLLLQGNALRDLPPY
TFANLASLQRLNLQGNRVSPCGGPDEPGPSGCVAFSGITSLRSLSLVDNEIELLRAGA
FLHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVLALQGNGLMVLQVDLPCFICLKRLNL
AENRLSHLPAWTQAVSLEVLDLRNNSFSLLPGSAMGGLETSLRRLYLQGNPLSCCGN
GWLAAQLHQGRVDVDATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEKGGLKNINLIIILTFILVS
AILLTTLAACCCVRRQKFNQQYKA

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el tratamiento es quimioterápico y/o radioterapia. Preferiblemente el tratamiento quimioterápico se selecciona de entre un inhibidor de la topoisomerasa, un antibiótico antitumoral, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente el inhibidor de la topoisomerasa se selecciona de entre topotecán, irinotecán (CPT-11), Etopósido (VP-16), tenipósido, o mitoxantrona. En otra realización preferida el antibiótico antitumoral se selecciona de la lista que consiste en: Daunorubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, Idarubicina, Actinomicina D, Bleomicina, Mitomicina C, Mitoxantrona, o cualquiera de sus combinaciones. En una relación particular, el tratamiento quimioterápico es etopósido y/o doxorrubicina.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: leucemia, sarcoma, cáncer de vejiga, de mama, cerebro, colon, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, mieloma múltiple. Más preferiblemente el cáncer es sarcoma. Aún más preferiblemente el sarcoma se selecciona de la lista que consiste en condrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma pleomórfico y sarcoma sinovial. Mucho más preferiblemente es el osteosarcoma. En otra realización particular es el sarcoma de Ewing.

MÉTODOS PARA PREDECIR O PRONOSTRICAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE LA INVENCIÓN

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento del cáncer en un individuo, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende medir en una muestra biológica aislada el producto de expresión de GARP. Más preferiblemente, el primer método de la invención además comprende comparar las cantidades obtenidas con una cantidad de referencia.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento del cáncer en un individuo, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende medir en una muestra biológica aislada el producto de expresión de GARP, comparar las cantidades obtenidas con una cantidad de referencia, e incluir al individuo en el grupo de individuos con una menor probabilidad de respuesta al tratamiento, cuando la expresión de GARP es significativamente mayor ($p < 0.05$) que la de la muestra de referencia.

Además hay ensayos *in vivo*. En una serie de 11 de pacientes de sarcomas de la que se disponen de datos de respuesta a diferentes tratamientos de primera línea (A), los

autores de la presente invención encontraron que las dos únicas respuestas completas ocurrieron en 2 de los 4 pacientes que presentaban bajos niveles de GARP. Por otra parte el único caso en el que tratamiento no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor (PD) corresponde con un paciente con altos niveles de GARP. A pesar del pequeño número de pacientes incluidos en este análisis, encontramos diferencias significativas **(p=0.039)** entre los pacientes con altos y bajos niveles de GARP al hacer un análisis dicotómico de las respuestas completas versus el resto de opciones de respuesta (respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva) (B). Por tanto, estos datos sugieren que los sarcomas que expresan altos niveles de GARP responden peor a los tratamientos antitumorales.

En los estudios de inmunohistoquímica, la expresión de GARP se valoró mediante un sistema semicuantitativo en el que se asignan los siguientes valores dependiendo del porcentaje de células que expresan GARP: 1: 0%; 2: <10%; 3: 10-50%; and 4: >50%. Según este sistema, los tumores de los pacientes que respondieron peor (enfermedad progresiva + enfermedad estable + respuesta parcial) a los tratamientos presentan valores de expresión de GARP **3,6 veces** más elevados que los tumores de los pacientes que presentaron una respuesta completa.

Por tanto, preferiblemente, se incluye al individuo en el grupo de individuos con una menor probabilidad de respuesta al tratamiento, cuando el producto de expresión de GARP es de, al menos, 1,5 veces, más preferiblemente de, al menos, 2 veces, más preferiblemente, de al menos 2,5 veces, 2,6 veces, 2,7 veces, 2,8 veces, 2,9 veces, 3 veces, 3,1 veces, 3,2 veces, 3,3 veces, 3,4 veces, o 3,5 veces el producto de expresión de la muestra de referencia. En una realización particular, se incluye al individuo en el grupo de individuos con una menor probabilidad de respuesta al tratamiento, cuando el producto de expresión de GARP es de, al menos 3,6 veces el producto de expresión de la muestra de referencia.

En una realización preferida, los pasos de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados y/o computerizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico de dispensación de líquidos, un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad o producto de expresión, o la comparación computerizada.

La comparación descrita de los métodos de la invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “producto de expresión”, también denominado “producto génico” se refiere al material bioquímico, ya sea ARN (por ejemplo microARN) o proteína, resultante de la

expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen.

La expresión de un biomarcador de la invención se puede evaluar mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos por el experto en la materia para detectar la expresión de una molécula transcrita o su proteína correspondiente. Si los biomarcadores son moléculas de ácido nucleico, la expresión se puede detectar y/o cuantificar usando métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos, métodos de amplificación de ácidos nucleicos y similares.

Asi, la cuantificación puede realizarse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una técnica que incluya la PCR, y más preferiblemente mediante PCT a tiempo real (Q-RT-PCR).

La medida de los niveles de expresión de un gen, preferiblemente de manera cuantitativa, está basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes (ARNm, microARN, etc.), y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de ARN producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. Por otro lado, se podría realizar mediante medida indirecta que se refiere a la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

Así, en una forma de realización preferida, la expresión de un gen marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) de una muestra, y mediante la hibridación del ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es complementario a un polinucleótido que comprende el gen marcador, y/o fragmentos del mismo. El ADNc se puede, opcionalmente, amplificar usando cualquiera de varios métodos de la reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia.

Preferiblemente, la determinación de los niveles del producto de expresión de GARP se realiza mediante un inmunoensayo o inmunohistoquímica. Más preferiblemente la determinación de los niveles de GARP se realiza mediante una técnica que se selecciona de entre: *inmunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluoresecencia, x-map o

chips de proteína. EN una realización aún mucho más preferida, la determinación del producto de expresión de GARP se realiza mediante inmunohistoquímica.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el tratamiento es quimioterápico y/o radioterapia. Preferiblemente el tratamiento quimioterápico se selecciona de entre un inhibidor de la topoisomerasa, un antibiótico antitumoral, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente el inhibidor de la topoisomerasa se selecciona de entre topotecán, irinotecán (CPT-11), Etopósido (VP-16), tenipósido, o mitoxantrona. En otra realización preferida el antibiótico antitumoral se selecciona de la lista que consiste en: Daunorubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, Idarubicina, Actinomicina D, Bleomicina, Mitomicina C, Mitoxantrona, o cualquiera de sus combinaciones. En una relación particular, el tratamiento quimioterápico es etopósido y/o doxorrubicina.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: leucemia, sarcoma, cáncer de vejiga, de mama, cerebro, colon, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, mieloma múltiple. Más preferiblemente el cáncer es sarcoma. Aún más preferiblemente el sarcoma se selecciona de la lista que consiste en condrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma pleomórfico y sarcoma sinovial. Mucho más preferiblemente es el osteosarcoma. En otra realización particular es el sarcoma de Ewing.

Un "*método pronóstico*" (o "*método de pronóstico*") se refiere a un procedimiento donde, a partir de análisis clínicos, se identifica la enfermedad o dolencia, como un cáncer, preferiblemente un sarcoma, que sufre la persona y, a partir de las experiencias con otros pacientes aquejados por la misma enfermedad o dolencia, como un cáncer, preferiblemente un sarcoma, se predice cómo será el estado de salud del individuo en el futuro; es decir, la evolución de la enfermedad o dolencia en el tiempo. El término "*pronóstico*" en la presente invención también se refiere a la capacidad de detectar pacientes o sujetos asintomáticos que presentan una alta probabilidad de padecer una enfermedad o dolencia, como de un cáncer, preferiblemente un sarcoma, aun cuando en el momento del diagnóstico no presenten dichas patologías o manifestaciones evidentes de las mismas. Como entenderán los expertos en la materia, tal valoración, aunque se prefiere que sea, normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a pronosticar. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que padecen la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa se puede determinar sin más por el experto en la materia usando varias

herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba *t* de *Student*, prueba de *Mann-Whitney*, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente pero sin limitarse, 0,2, 0,1, 0,05.

El grado de identidad existente entre dos secuencias se puede determinar por métodos convencionales, por ejemplo, por medio de algoritmos estándar de alineamiento de secuencias que son conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10).

Una "muestra biológica", como se define aquí, es una pequeña parte de un sujeto, representativa del conjunto y puede estar constituido por una biopsia o una muestra de fluido corporal. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijas, como fijada con formalina y embebidas en parafina (*formalin- fixed and paraffin embedded* FFPE). Muestras de fluidos corporales puede ser sangre, plasma, suero, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, leche o muestras de fluido ductal y pueden asimismo ser frescos, congelados o fijadas. Las muestras se pueden extirpar quirúrgicamente, mediante extracción es decir, por agujas hipodérmicas o de otro tipo, por microdisección o captura láser. La muestra debe contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador o biomarcadores deseado/s, por lo tanto, dicha muestra debe, comprender ventajosamente material de las células del sujeto.

Una “*muestra tisular*”, “*muestra de tejido*” o “*muestra tisular/de tejido aislada*” incluye, pero sin limitarse, células y/o tejidos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. La muestra de tejido puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia o un aspirado por aguja fina. Preferiblemente, las células son células tumorales.

En otra realización preferida, la muestra es una muestra de fluido corporal tal como una muestra de plasma, suero y/o sangre.

Los términos “*individuo*”, “*paciente*” o “*sujeto*” se usan de manera intercambiable en la presente descripción, y no pretenden ser limitativos en ningún aspecto, pudiendo ser el “*individuo*”, “*paciente*” o “*sujeto*” de cualquier edad, sexo y condición física.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de

manera directa o indirecta, tal y como se ha señalado anteriormente en la presente descripción. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de los productos de expresión, basada en una señal que se obtiene directamente de los productos de expresión, y que está correlacionada con el número de moléculas de dichos productos de expresión. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

Una “*muestra de referencia*” se refiere a una muestra similar obtenida de un sujeto o individuo (paciente) control que no presente la enfermedad o dolencia, tal y como un cáncer, preferiblemente un sarcoma, que se pretende diagnosticar o pronosticar. La “*cantidad de referencia*” o “*nivel de referencia”* se refiere a la cantidad (o a los niveles) absoluta obtenida de la muestra de referencia. Una “*muestra de referencia*” puede también referirse a una muestra similar obtenida del mismo sujeto o individuo en un punto anterior en el tiempo.

Un “*valor de referencia*” se refiere al conjunto de valores que se emplean interpretar los resultados de las pruebas diagnósticas, pronósticas y/o de seguimiento en un sujeto o individuo (paciente). Por ejemplo, los valore de referencia para una prueba determinada se basan en los resultados de esa misma prueba en el 95% de la población sana. Los valores de referencia de una prueba pueden ser diferentes en distintos grupos de personas (por ejemplo, entre mujeres y hombres, o entre niños y adultos). También se puede denominar “*intervalo de referencia*”, “*límite de referencia*”, y “*límite normal*”.

En el contexto de la presente invención, "Respuesta" se refiere al resultado clínico del sujeto, "Respuesta" puede expresarse como supervivencia global o supervivencia libre de progresión. La supervivencia de los pacientes con cáncer generalmente se expresa adecuadamente mediante las curvas de Kaplan-Meier, nombradas en honor a Edward L. Kaplan y Paul Meier, quienes la describieron por primera vez (Kaplan, Meier: J. Amer. Statist. Assn. 53: 457-481). El estimador de Kaplan-Meier también se conoce como el estimador de límite de producto. Sirve para estimar la función de supervivencia a partir de datos de por vida. Una gráfica de la estimación de Kaplan-Meier de la función de supervivencia es una serie de pasos horizontales de magnitud decreciente que, cuando se toma una muestra lo suficientemente grande, se acerca a la verdadera función de supervivencia para esa población. Se supone que el valor de la función de supervivencia

entre observaciones muestreadas distintas sucesivas es constante. Con respecto a la presente invención, el estimador de Kaplan-Meier puede usarse para medir la fracción de pacientes que viven durante un cierto período de tiempo después del comienzo de la quimioterapia y/o radioterapia. El resultado clínico predicho puede ser la supervivencia (general/libre de progresión) en meses/años desde el momento de tomar la muestra. Puede ser la supervivencia durante un cierto período a partir de la toma de la muestra, como seis meses o más, un año o más, dos años o más, tres años o más, cuatro años o más, cinco años o más, seis años o más. En cada caso, "supervivencia" puede referirse a "supervivencia general" o "supervivencia libre de progresión".

Por lo tanto, en una realización, la respuesta es el resultado clínico, que es la "supervivencia global" (SG). La "supervivencia general" denota las posibilidades de que un paciente se mantenga con vida para un grupo de personas que padecen un cáncer. La pregunta decisiva es si el individuo está vivo o muerto en un momento dado.

KIT Y DISPOSITIVOS DE LA INVENCIÓN

Un **quinto aspecto** de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos y/o reactivos necesarios para cuantificar el producto de expresión de GARP.

En otra realización preferida el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de GARP, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de la secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 150 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más 25 preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1,

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los cebadores o sondas están modificados, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante un marcaje radiactivo o inmunológico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente 32P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo. Preferiblemente, el flurocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, aloficocianina, o cualquiera de sus combinaciones.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el tratamiento es quimioterápico y/o radioterapia. Preferiblemente el tratamiento quimioterápico se selecciona de entre un inhibidor de la topoisomerasa, un antibiótico antitumora, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente el inhibidor de la topoisomerasa se selecciona de entre topotecán, irinotecán (CPT-11), Etopósido (VP-16), tenipósido, o mitoxantrona. En otra realización preferida el antibiótico antitumoral se selecciona de la lista que consiste en: Daunorubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, Idarubicina, Actinomicina D, Bleomicina, Mitomicina C, Mitoxantrona, o cualquiera de sus combinaciones. En una relación particular, el tratamiento quimioterápico es etopósido y/o doxorrubicina.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: leucemia, sarcoma, cáncer de vejiga, de mama, cerebro, colon, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, mieloma múltiple. Más preferiblemente el cáncer es sarcoma. Aún más preferiblemente el sarcoma se selecciona de la lista que consiste en condrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma pleomórfico y sarcoma sinovial. Mucho más preferiblemente es el osteosarcoma. En otra realización particular es el sarcoma de Ewing.

Un **séxto aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención, la micromatriz, o el microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento del cáncer en un individuo.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el tratamiento es quimioterápico y/o radioterapia. Preferiblemente el tratamiento quimioterápico se selecciona de entre un inhibidor de la topoisomerasa, un antibiótico antitumora, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente el inhibidor de la topoisomerasa se selecciona de entre topotecán, irinotecán (CPT-11), Etopósido (VP-16), tenipósido, o mitoxantrona. En otra realización preferida el antibiótico antitumoral se selecciona de la lista que consiste en: Daunorubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, Idarubicina, Actinomicina D, Bleomicina, Mitomicina C, Mitoxantrona, o cualquiera de sus combinaciones. En una relación particular, el tratamiento quimioterápico es etopósido y/o doxorrubicina.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: leucemia, sarcoma, cáncer de vejiga, de mama, cerebro, colon, estómago, pulmón, ovarios, tiroides, mieloma múltiple. Más preferiblemente el cáncer es sarcoma. Aún más preferiblemente el sarcoma se selecciona de la lista que consiste en condrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma pleomórfico y sarcoma sinovial. Mucho más preferiblemente es el osteosarcoma.

MÉTODO AUTOMATIZADO DE LA INVENCIÓN

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede

estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN o RNA) como desoxirribonucleótidos (ADN o DNA).

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados,

incluyendo, pero sin limitarse a, N6-metil-adenina, N6-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5- (carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5- carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo,beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6- isopenteniladenina,1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5 metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-

metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pesudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5- propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Varias líneas celulares de sarcoma expresan GARP y su silenciamiento bloquea la proliferación de estas líneas. (A) Datos de expresión de GARP en mARN en varias líneas celulares cancerígenas recuperados de la base de datos CCLE. Se muestran valores de expresión de mRNA RMA log2 como diagramas de caja y se separan en orden ascendente de la mediana. Los valores atípicos se muestran como

círculos llenos. (B) Expresión de GARP en mARN en BM-MSCs primarias y varias líneas celulares de cáncer. Los datos se muestran como la media (SD), relativa a la expresión de GARP en BM-MSCs. (C) Resumen de la expresión de GARP (% en relación al control de isotipo) en BM-MSC primarias y las líneas celulares de sarcoma óseo seleccionadas. Los datos se muestran como la media (SD) de tres tinciones individuales. (D) El silenciamiento de GARP en BM-MSCs y en las líneas celulares de osteosarcoma G292, T1-73 y SAOS-2 inhibe su proliferación. La proliferación (índice celular) de células sin transducir (NT), LV-CTRL, $GARP^{KO1}$ y $GARP^{KO2}$ se midió en tiempo real durante 7 días. Los datos se muestran como la media (SD) de duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de 3. (E) Gráficas de tres experimentos individuales mostrando la media (SD) de proliferación como índice celular a las 160 horas dividido por el índice celular correspondiente a las 10 horas. *=P<0.05; ***=P<0.001. (F) El silenciamiento de GARP en líneas celulares de osteosarcoma induce muerte celular por apoptosis. Se midió la apoptosis en células G292 NT, LV-CTRL, $GARP^{KO1}$ y $GARP^{KO2}$ (gráfico izquierdo), T1-73 (gráfico central) y SA0S-2 (gráfico derecho) mediante la tinción de las células con 7AAD/Anexina V y se analizaron las células por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media (SD) de tres experimentos independientes. *=P<0.05.

Figura 2. GARP promueve la proliferación de líneas celulares de sarcoma óseo a través de la activación de TGF-β. (A) Sobreexpresión de GARP en líneas celulares de sarcoma óseo. Gráficos de puntos representativos de G292 sin transducir (NT) y sobreexpresando GARP ($GARP^{++}$) (panel superior), SAOS-2 (panel central) y RD-ES (panel inferior). Se representa con líneas verticales en todos los gráficos la tinción del correspondiente isotipo. (B) La sobreexpresión de GARP incrementa la proliferación de líneas celulares de sarcoma óseo. Se generaron curvas de crecimiento de células G292, SAOS-2 y RD-ES NT, $GARP^{++}$ y sobreexpresando EGFP ($EGFP^{++}$) mediante la representación del número de células acumuladas frente al tiempo. Los datos se muestran como la media (SD) de tres experimentos individuales. *=P<0.05. (C) Se muestra el incremento en el número de células $EGFP^{++}$ y $GARP^{++}$ en relación con las células NT al final de cada experimento como la media (SD) de tres experimentos individuales. *=P<0.01. (D) Las células de sarcoma $GARP^{++}$ producen más TGF-β activo comparadas con las células NT. Se co-cultivaron células G292, SAOS-2 y RD-ES NT y $GARP^{++}$ con células SBE-HEK293 durante 24 horas y después se analizó la actividad de la luciferasa. El incremento en la actividad de TGF-β de las células $GARPP^{++}$ es relativizado a las NT para cada línea celular.

Los datos se representan como la media (SD) de tres experimentos independientes. *=P<0.05, **=P<0.01. (E) El aumento en la proliferación de las células de sarcoma GARP^{++} depende de TGF-β. Se cultivaron células G292, SAOS-2 y RD-ES NT y GARP^{++} en presencia o ausencia de SB431542 o el anticuerpo anti-TGF-β1/2/3 (11D1) durante 3 días y después se contaron las células. El incremento en el número de células es relativizado a las NT para cada línea celular. Los datos se muestran como la media (SD) de tres experimentos independientes. *=P<0.05; **=P<0.01.

Figura 3. GARP aumenta el crecimiento de los tumores provenientes de células G292 *in vivo*. (A) Se inyectaron células G292 NT (n=10), LV-CTRL (n=6), GARP^{KO2} (n=10) y GARP^{++} (n=10) de forma subcutánea en ratones NSG y se siguió el crecimiento tumoral durante 70 días. El peso y la anchura del tumor se midió semanalmente utilizando un calibrador automático y el volumen del tumor se calculó como se describe en materiales y métodos. Los datos se muestran como la media (SD). *=P<0.05 GARP^{++} vs NT. (B) Imagen representativa de tumores aislados NT y GARP^{++} al final del experimento (panel superior). Se midieron los volúmenes (gráfico izquierdo) y pesos (gráfico derecho) de los tumores aislados como se describe en materiales y métodos. Los datos se muestran como la media (SD) con círculos blancos (NT) y naranjas (GARP^{++}) que representan tumores individuales. (C) Imagen representativa de tumores aislados LV-CTRL y GARP^{KO} al final del experimento (panel superior). Se midieron los volúmenes (gráfico izquierdo) y pesos (gráfico derecho) de tumores aislados como se describe en materiales y métodos. Los datos se muestran como la media (SD) con círculos negros (LV-GARP) y azules (GARP^{KO2}) que representan tumores individuales. La proliferación de las células tumorales se analizó mediante la tinción inmunohistoquímica de Ki67 en tumores NT (n=10) y GARP^{++} (n=10). Los datos se muestran como la media (SD) con círculos blancos (NT) y naranjas (GARP^{++}) que representan tumores individuales. *=P<0.05. (E) Tinción de Ki67 en tumores LV-CTRL (n=6) y GARP^{KO2} (n=3). Los datos se muestran como la media (SD) con círculos negros (LV-CTRL) y azules (GARP^{KO2}) que representan tumores individuales. (F) Se analizó la activación de la ruta de señalización de TGF-β mediante una inmunohistoquímica de fosfo-SMAD3 en tumores NT y GARP^{++}. Los datos se muestran como la media (SD) con círculos blancos (NT) y naranjas (GARP^{++}) que representan tumores individuales. *=P<0.05.

Figura 4. La sobreexpresión de GARP en líneas celulares de sarcoma óseo las hace más resistentes a la muerte inducida por etopósido y doxorrubicina. Se sometieron células G292, SAOS-2 y RD-ES sin transducir (NT), sobreexpresando GARP (GARP^{++}) y sobreexpresando EGFP (EGFP^{++}) a diferentes concentraciones de

etopósido *in vitro*. (A) Se midió la viabilidad celular utilizando CelltiterBlue y se representó como % de control (células sin etopósido). Los datos se muestran como la media (SD) de tres experimentos individuales. *=P<0.05; **=P<0.01; ***=P<0.001. (B) Se sometieron células G292, SAOS-2 y RD-ES NT y GARP^{++} a 80 µM (G292) o 10 µM (SAOS-2 y RD-ES) de etopósido, con o sin SB431542 o el anticuerpo anti-TGF-β1/2/3 (11D1). Se analizó la viabilidad celular utilizando CelltiterBlue y se representó como % de control (células sin etopósido). Los datos se muestran como la media (SD) de tres experimentos individuales. *=P<0.05. (C) Se sometieron células G292, SAOS-2 y RD-ES NT y GARP^{++}a 2.5 µM de doxorrubicina con o sin SB431542. La viabilidad celular se analizó utilizando CelltiterBlue y se representó como % de control (células sin doxorrubicina). Los datos se muestran como la media (SD) de tres experimentos individuales. *=P<0.05.

Figura 5. La sobrexpresión de GARP en líneas celulares de sarcoma óseo las hace más resistentes a muerte inducida por irradiación y a daño en el ADN.

La susceptibilidad a la irradiación se analizó mediante un ensayo de clonogenicidad. Se sembraron células SAOS-2 (A) y RD-ES (B) NT y GARP^{++} a baja densidad en placas de 6 pocillos y se cultivaron con o sin SB431542 como se describe en materiales y métodos. Las células se irradiaron a 2, 4 y 8 Gy. Después de 2 semanas, las colonias se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y se contaron cómo se describe en materiales y métodos. Los datos se representan como la fracción de supervivencia (en relación a células no irradiadas) y se muestran como la media (SD) de tres experimentos independientes. *=P<0.05; ***=P<0.001 GARP^{++} vs. NT, #=P<0.05; ##=P<0.01; ###=P<0.001 GARP^{++} + SB431542 vs. GARP^{++}. (C, D) Se cultivaron células SAOS-2 (C) y RD-ES (D) NT y GARP^{++} con o sin SB431542, se irradiaron a 4 Gy y se analizaron para γ-H2AX por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. (E,F)Se cultivaron células SAOS-2 (E) y RD-ES (F) NT y GARP^{++} con o sin SB431542, se irradiaron a 4 Gy y se analizaron para γ-H2AX utilizando el citómetro de flujo Imagestream. El número defoci γ-H2AX positivos por núcleo se muestra como la media (SD). Se muestra un experimento representativo de 3.

Figura 6. Las líneas celulares derivadas de tumores de pacientes con osteosarcoma y condrosarcoma expresan GARP. (A) Se extrajeron células tumorales derivadas de pacientes de dos tumores de osteosarcoma (OST-3 y OST-4) y de un tumor de condrosarcoma (T-CDS17). Estas líneas celulares se tiñeron para la expresión de GARP en superficie y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra una tinción representativa. (B) Se analizó la proliferación de células OST-4 NT, LV-CTRL y

GARP^{KO2} utilizando el sistema analizador de proliferación en tiempo real xCelligence. Los datos se muestran como la media (SD) de duplicados experimentales. Se representa un experimento representativo de dos.

Figura 7. Análisis inmunohistoquímico e impacto en la supervivencia del paciente de la expresión de GARP en muestras de tejido de sarcoma. (A) Ejemplos representativos de los tipos de sarcoma indicados que muestran tinción alta y baja de GARP. Barras de escala: 500 µm (rojo) o 100 µm (negro). (B) Distribución de los casos de sarcoma (N=89) de acuerdo con su nivel de expresión de GARP en las categorías de las características indicadas del paciente y los parámetros clinicopatológicos del tumor (una descripción más exhaustiva se muestra en la Tabla S2). Se muestran los P valores. (C) Curvas de supervivencia acumulada de Kaplan-Meier clasificadas por la expresión de la proteína GARP en la cohorte de pacientes con sarcoma. Los valores de P se estimaron utilizando el test de log-rank.

Figura 8. Expresión de GARP y respuesta al tratamiento – Estudio piloto. (A) Información respecto al tipo de tumor, tratamiento recibido y respuesta correspondiente. RC: respuesta completa, EE: enfermedad estable, RP: respuesta parcial, PD: enfermedad progresiva, GIST: Tumor estromal gastrointestinal, S. Ewing: sarcoma de Ewing. (B) Análisis dicotómico de pacientes con respuesta completa vs. RC + RP + PD + EE.

Figura 9. Silenciamiento de GARP en líneas celulares de sarcoma óseo. Se transdujeron las líneas celulares G292, T1-73 y SAOS-2 con LV-CTRL, LV-GARP^{KO1} y LV-GARP^{KO2} como se describe en materiales y métodos. Cuatro días después, se midió la expresión de GARP por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media (SD) de dos (T1-73) o tres (G292, SAOS-2) experimentos independientes.

Figura 10. La sobreexpresión de GARP en células G-292, SAOS-2 y RD-ES las hace más resistentes a la apoptosis inducida por etopósido en comparación con las células NT. Se expusieron células G292, SAOS-2 y RD-ES NT y GARP^{++} a diferentes concentraciones de etopósido durante 24 horas, se tiñeron para Anexina V/7AAD, como se describe en materiales y métodos suplementarios, y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media (SD) de al menos tres experimentos individuales. *=P<0.05, **=P<0.01.

Tabla S1. Distribución de casos de sarcoma (N=89) según sus niveles de expresión de GARP en las categorías de las características indicadas del paciente y los parámetros clinicopatológicos. Se muestran los P valores.

Tabla S2. Análisis Cox univariado y multivariado de la expresión de GARP y los parámetros clinicopatológicos, incluida la necrosis tumoral, el grado tumoral, el recuento tumoral y el tipo de tumor.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

Este es el primer estudio que analiza la expresión de GARP en muestras de sarcoma humano. Los autores de la invención encontraron que el 100% (8/8) de los osteosarcomas y el 73% (8/11) de los condrosarcomas expresaron altos niveles de GARP. Esto está de acuerdo con la expresión de GARP en BM-MSC y la expresión de GARP relativamente más alta en las líneas celulares de cáncer de osteo y condrosarcoma mostradas en el estudio.

El tratamiento actual del sarcoma óseo es la cirugía y la quimioterapia multimodal y, en algunos casos, la radioterapia cuando el tumor no se puede extirpar quirúrgicamente. En general, la doxorrubicina, el cisplatino y la iphosfamida representan fármacos de primera línea para el tratamiento del sarcoma óseo localizado, mientras que la ciclofosfamida en combinación con el etopósido son importantes para el tratamiento del osteosarcoma recurrente y el sarcoma de Ewing. La combinación de procedimientos quirúrgicos mejorados con quimioterapia eficiente (CT) y radioterapia (ET) ha aumentado sustancialmente la tasa de supervivencia de los pacientes con sarcoma óseo. Sin embargo, durante los últimos 30 años no se han logrado mejoras adicionales y los pacientes con enfermedades metastásicas o recurrentes todavía tienen una probabilidad <20% de supervivencia a largo plazo a pesar de las terapias agresivas. Una explicación para esta falta de progreso es la frecuente radiorresistencia exhibida por los tumores de osteo y condrosarcoma.

Materiales y métodos

Animales

Se obtuvieron ratones NOD scid gamma (NSG) del stock interno del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM, Granada, España). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las Directrices institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio en investigación, con la aprobación del Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de Granada (Granada, España).

Culturas celulares

Las líneas celulares de osteosarcoma G292, T1-73 y SAOS-2 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en DMEM avanzado (Invitrogen) con 10% de FBS (Biowest), 1% de Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y 100 U / ml de penicilina / estreptomicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific). La línea celular de sarcoma de Ewing RD-ES se cultivó en RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de FBS y 100 U / ml de penicilina / estreptomicina. Las líneas celulares primarias OST-3 y OST-4 se generaron a partir de muestras tumorales resecadas quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España). OST-3 deriva de un osteosarcoma osteoblástico convencional resecado de una paciente de 10 años y OST-4 corresponde a un osteosarcoma desdiferenciado de una mujer de 69 años. La línea celular de condrosarcoma T-CDS17 se informó previamente (Rey, V *et al*., 2019. J Clin Med 8(4): 455). Las líneas celulares anteriores se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (Gibco, Thermo Fisher Scientific) con FBS al 10% y penicilina / estreptomicina 100 U / ml. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 ° C con niveles de presión parcial de 21% de O2 y 5% de CO2. Los niveles de ARNm de GARP en líneas celulares se midieron por RT-PCR como se describe en materiales y métodos complementarios.

Producción de vectores lentivirales (LV) y transducción de células.

Se usaron LV que codifican shRNA específicos de GARP humanos (ADN de plásmido de shARN MISSION®, RefSeq: SHCLND-NM_005512; Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.), Referidos en el manuscrito como GARPKO1 (TRCN0000005218) y GARPKO2 (TRCN0000005219). Se usó como control un plásmido de control de shARN no mamífero de pLKO.1-MISSION® (Sigma-Aldrich), denominado en el texto LV-CTRL. Se usó un LV que codifica el ADNc de GARP optimizado con codón humano, LV-GARP, (Carrillo-Gálvez et al., Presentado) para sobreexpresar GARP y el LV-CEWP se usó como control. Los LV se produjeron co-transfectando células 293T con: 1) LV-CTRL / GARPKO1 / GARPKO2 / LV-GARP / LV-CEWP plásmido, 2) plásmido de empaque pCMVΔR8.91 y 3) plásmido de envoltura pMD.G como se describió previamente (Carillo-Gálvez AB *et al*., 2015. *Stem Cell.* 33**:**183-195). Los LV se concentraron posteriormente (x30) utilizando dispositivos de filtro centrífugo (Amicon Ultra-15, 100 kD, Merck). GARP fue silenciado en células BM-MSC, G292, T1-73, SAOS-2 y OST-4 como se describió previamente (Carrillo-Gálvez et al., Stem Cells 2015). Para sobreexpresar GARP (GARP++), las células RD-ES y SAOS-2 se transdujeron una vez con LV-GARP concentrado (30x), durante 5 horas y posteriormente se expandieron, mientras que las células G292 se transdujeron dos veces en días consecutivos con LV-GARP (x30). Las células fueron transducidas con LV-CEWP como control. La expresión de GARP se

analizó por citometría de flujo 4 días después de la transducción como se describe en materiales y métodos complementarios.

Análisis de la proliferación celular in vitro.

La proliferación de BM-MSC y células tumorales se analizó utilizando el sistema analizador de células en tiempo real xCelligence de Roche (Roche Applied System, Penzberg, Alemania) como se describió anteriormente (Carillo-Gálvez AB *et al*., 2015. *Stem Cell.* 33:183-195) . Las placas E se colocaron en la estación del dispositivo en la incubadora (21% de O2 / 5% de CO2 a 37 ° C) para el registro continuo de la impedancia, tal como se refleja en el índice celular. En algunos experimentos, la proliferación se midió de la siguiente manera: 50,000 células / pocillo de NT y GARP++ G292, células SAOS-2 y RD-ES se colocaron en una placa de 12 pocillos. Cuando los cultivos celulares alcanzaron un 80-90% de confluencia, las células se cosecharon, se contaron y se volvieron a sembrar a la misma concentración. En algunos casos, 5 horas después del enchapado celular, las células se trataron con 10 µM de SB431542 (Sigma-Aldrich) o 2,5 µg / ml de anti-TGF-β1 / 2/3 Ab (11D1, R&D Systems, Minneapolis, MN).

Análisis del crecimiento tumoral in vivo.

Las células NT, LV-CTRL, GARPKO2 y GARP++ G292 (4 x 106) se inyectaron por vía subcutánea en ratones NSG y el crecimiento tumoral se midió cada 6-7 días. El volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula: (π / 6) x (a2 x b) donde a y b son los valores para el diámetro del tumor más pequeño y más grande, respectivamente. Después de 2-3 meses, se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores y se midieron los volúmenes y los pesos del tumor. La inmunohistoquímica se realizó en secciones de tejido embebido en parafina con anticuerpo monoclonal contra Ki-67 humano (MIB-1, DAKO) y un anticuerpo anti-Smad3 (fosfo S423 + S425) (EP823Y, Abcam) como se describe en materiales y métodos complementarios.

Viabilidad celular en respuesta a etopósido y doxorrubicina

La viabilidad celular se midió usando el reactivo CellTiter-Blue (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante. 10.000 placas / pocillo de NT y GARP++ G292, SAOS-2 y RD-ES se colocaron en placas de 96 pocillos. 5 horas después, las células se trataron con 10 µM de SB431542 o 2,5 µg / ml de anti-TGF-β1/2/3 Ab. CellTiter-Blue se añadió al cultivo RD-ES después de 24 horas y a los cultivos G292 y SA0S-2 después de 48 horas. Las células se incubaron con el reactivo durante 4 horas y se midió la fluorescencia a 560 nm en un sistema de detección múltiple Glomax (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este experimento también se realizó en

células tratadas con etopósido y doxorrubicina. Para esto, se colocaron en placa 10.000 células / pocillo de NT y GARP++ G292, SAOS-2 y RD-ES en placas de 96 pocillos y 24 horas después se añadieron a las placas 2,5 µM de doxorrubicina o diferentes concentraciones de etopósido: 2, 5 µM, 5 µM, 10 µM y 20 µM para las células tumorales RD-ES y SAOS-2 y 10 µM, 20 µM, 40 µM y 80 µM para las células tumorales G292. La adición y análisis de CellTiter-Blue se realizó como se explicó anteriormente. Además, la apoptosis se midió como se describe en materiales y métodos complementarios.

Medición de TGF-β activo

Las células NT y GARP++ G292, SAOS-2 y RD-ES (40,000 células / pocillo) se cultivaron conjuntamente con células de elemento de unión a SMAD (SBE) -HEK293 (40,000 células / pocillo; BPS Bioscience) en placas de ensayo de 96 pocillos (Sigma-Aldrich) usando DMEM suplementado con 0.5% de FBS. Después de 18 horas, la actividad SBE se analizó utilizando el sistema de ensayo de luciferasa de un paso (BPS Bioscience) en un sistema de detección múltiple Glomax (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo de clonogenicidad

.Las células NT,GARP++ SAOS-2 y RD-ES fueron sembradas en places de 6 pocillos a las siguientes densidades: 2000, 4000, 8000 y 160000 células/pocillo (NT) y 1000, 2000, 4000, 8000 células/pocillo (GARP++), y fueron irradiadas con 0, 2, 4 y 8 Gy, respectivamente, usando una dosis de 1.66 Gy min-1 en un irradiador gamma L. Shepherd & associates MARK-I model 30 en la Unidad de Radiología Experimental de la Universidad de Granada (España). En algunos experimentos, 10 µM de SB431542 fue añadido 24 horas antes de la irradiación. Las células fueron posteriormente mantenidas en cultivo hasta la aparición de colonias que pudieron ser contadas (7-9 días tras la irradiación). Las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta y las colonias se contaron (>50 células/colonia fueron consideradas para supervivencia). La fracción de supervivencia fue calculada como se ha descrito anteriormente (Franken NAP, Rodermond HM, et al., 2006, Nature protocols).

Análisis de la fosforilación de H2AX

Para la detección de roturas de ADN de doble cadena (DSB), se midió H2AX fosforilada (γ-H2AX) mediante citometría de flujo utilizando el kit de ensayo de fosforilación de histona H2AX FlowCellect® (Millipore, MA, EE. UU.). Para inducir DSB, se sembraron células tumorales NT y GARP++ SAOS-2 y RD-ES en placas de 12 pocillos (50.000 células / pocillo), con o sin SB431542 10 µM y al día siguiente expuestos a una dosis de

irradiación de 4 Gy. Después de 2 horas, las células se cosecharon y se tiñeron para γ-H2AX según las instrucciones del fabricante. Para analizar el número de focos / células γ-H2AX, las células se irradiaron y se tiñeron para γ-H2AX como se describió anteriormente y posteriormente se adquirieron en un citómetro de flujo de imágenes ImageStream X Mark II (Millipore) y se analizaron usando el software IDEAS (Spot Wizard).

Pacientes y muestras de tejido.

Se estudiaron tejidos embebidos en parafina de 89 pacientes con sarcoma que se sometieron a resección de sus tumores en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Las muestras y los datos de los donantes incluidos en este estudio fueron proporcionados por el Biobanco del Principado de Asturias (PT17 / 0015/0023), integrado en la Red Nacional de Biobancos de España, y se procesaron siguiendo los procedimientos operativos estándar con la aprobación apropiada de los Comités Ético y Científico. . Todas las muestras de origen humano se obtuvieron con el consentimiento informado firmado. El sesenta por ciento de los casos eran hombres; la edad media al diagnóstico fue de 49 años (rango 2 - 89 años). Veintiocho (31%) pacientes tenían antecedentes de consumo de tabaco (15 fumadores actuales y 13 exfumadores). El grado del tumor se evaluó en preparaciones teñidas con H y E utilizando el sistema de clasificación de la Federación Francesa de Centros Integrales de Cáncer (Torin, J *et al*. 2018. *Neoplasia* 20:44-56). Las características clinicopatológicas de los pacientes se incluyen en la Tabla S1. La forma en que se construyó el microarray de tejidos se detalla en los materiales y métodos complementarios.

Inmunohistoquímica

Los tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina se cortaron en secciones de 3 µm y se secaron sobre portaobjetos de microscopio Flex IHC (Dako, Glostrup, Dinamarca). Las secciones se desparafinaron con xileno estándar y se hidrataron a través de alcoholes graduados en agua. La recuperación del antígeno se realizó utilizando la solución Envision Flex Target Retrieval, pH bajo (Dako, Glostrup, Dinamarca). La tinción se realizó a temperatura ambiente en una estación de trabajo de tinción automática (Dako Autostainer Plus) con un anticuerpo anti-LRRC32 / GARP (Abcam # ab231214) a una dilución 1: 300 usando el sistema de visualización Dako EnVision Flex + (Dako Autostainer, Dinamarca). La contratinción con hematoxilina fue el paso final. Dos observadores independientes calificaron la inmunotinción cegada a los datos clínicos utilizando un sistema de puntuación semicuantitativo basado en el porcentaje de células teñidas (1: 0%; 2: <10%; 3: 10-50%; y 4:> 50%) y la intensidad

de tinción (0: sin expresión; 1: baja intensidad; y 2: alta intensidad). Cada muestra recibió un valor de puntuación resultante de la multiplicación de ambas puntuaciones, y el valor medio en la distribución resultante se usó para discriminar muestras de baja y alta expresión.

Análisis estadístico

Para los experimentos in vitro y el experimento de crecimiento tumoral in vivo, el análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). Todos los datos se representan como media (DE) de al menos tres experimentos independientes a menos que se indique lo contrario en la leyenda de la figura. Se realizaron comparaciones múltiples de los datos utilizando el ANOVA unidireccional, seguido de la prueba posterior de Bonferroni. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo. Los resultados experimentales distribuidos entre los diferentes grupos clínicos de tumores se evaluaron para determinar su importancia empleando la prueba $\chi 2$ (con corrección de Yates, cuando sea apropiado). Para fines estadísticos, las variables continuas (edad, tamaño del tumor) se dicotomizaron, tomando el valor medio como punto de corte. Las curvas de supervivencia se calcularon utilizando la estimación del límite de producto de Kaplan-Meier. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia se analizaron mediante el método de log-rank y el Hazard Ratio se calculó mediante un análisis de regresión de Cox univariado. Se utilizaron modelos multivariados de riesgos proporcionales de Cox (método de Wald avanzado) para examinar el impacto relativo de esas variables estadísticamente significativas en el análisis univariado. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete de software SPSS 24 (SPSS, IBM corp.). Todas las pruebas fueron bilaterales y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Tabla S1. Distribución de los casos de sarcoma (n=89) de acuerdo con su nivel de expresión de GARP entre las categorías del paciente indicado y los parámetros clínico-patológicos del tumor. Se muestran los valores P.

	GARP bajo (%)	GARP alto (%)	Total	P (Chi-Cuadrado)
Diagnóstico				
Osteosarcoma	0 (0)	8 (100)	8	0.0001
Sarcoma de Ewing	5 (83)	1 (17)	6	
Liposarcoma mixoide	10 (71)	4 (29)	14	
Liposarcoma	6 (75)	2 (25)	8	
Condrosarcoma	3 (27)	8 (73)	11	
Sarcoma sinovial	7 (78)	2 (22)	9	
Sarcoma pleomórfico	0 (0)	10 (100)	10	
Encondroma	5 (56)	4 (44)	9	

Dermatofibrosarcoma	9 (100)	0 (0)	9	
GIST	1 (20)	4 (80)	5	
Total	46	43	89	
Tamaño del Tumor				
< 9,65 cm	20 (55)	16 (45)	36	0.407
>9,65 cm	16 (46)	19 (54)	35	
Total	36	35	71	
Perdidos	10	8	18	
Grado				
1	10 (63)	6 (37)	16	0.15
2	9 (45)	11 (55)	20	
3	6 (30)	14 (70)	20	
Total	25	31	56	
Perdidos	21	12	33	
Grado de diferenciación				
Bueno	7 (70)	3 (30)	10	0.217
Moderado	2 (40)	3 (60)	5	
Pobre	12 (39)	19 (61)	31	
Total	21	25	46	
Perdidos	18	25	43	
Recuento mitótico				
0	0 (0)	2 (100)	2	0.068
1	20 (49)	14 (51)	34	
2	3 (25)	9 (75)	12	
3	3 (30)	7 (70)	10	
Total	26	32	58	
Perdidos	20	11	31	
Necrosis tumoral				
No	16 (47)	18 (53)	34	0.342
<50%	7 (50)	7 (50)	14	
>50%	1 (17)	5 (83)	6	
Total	24	30	54	
Perdidos	22	13	35	
Invasión vascular				
No	22 (44)	28 (56)	50	0.954
Sí	3 (43)	4 (57)	7	
Total	25	32	57	
Perdidos	21	11	32	
Invasión linfática				
No	24 (45)	29 (55)	53	0.431
Sí	1 (25)	3(75)	4	
Total	25	32	57	
Perdidos	21	11	32	
Invasión neural				
No	21 (43)	28 (57)	49	0.842
Sí	1 (50)	1 (50)	2	
Total	22	29	51	
Perdidos	24	14	38	

Tabla S2. Análisis univariante y multivariante de Cox.

Variable	p valor análisis univariante	p valor análisis multivariante
Necrosis tumoral	0.041	0.024
Expresión de GARP	0.000	0.056
Grado del tumor	0.012	0.42
Recuento mitótico	0.055	0.693
Tipo de tumor	0.263	0.955

RESULTADOS

GARP se expresa en varias líneas celulares de cáncer de sarcoma óseo y su silenciamiento bloquea su proliferación

Un análisis de la base de datos de la Enciclopedia de líneas celulares de cáncer (CCLE) reveló que la expresión de ARNm de GARP se encontró predominantemente en varias líneas celulares de cáncer de sarcoma, incluidos tumores de células gigantes, osteosarcoma y condrosarcoma, pero también en líneas celulares de linfoma de Hodgkin y de células B (Figura 1A) . Seleccionamos tres líneas celulares de osteosarcoma con niveles variables de GARP (G292, T1-73 y SAOS-2), una línea celular de sarcoma de Ewing bajo GARP (RD-ES), dos líneas celulares de glioblastoma (U87, U251) y dos células de carcinoma líneas (HT-29, MCF-7) y compararon su expresión de GARP con MSC derivadas de médula ósea (BM) humana. Nuestros datos mostraron que las líneas celulares de osteosarcoma G292 y T1-73 expresaron niveles similares de GARP en comparación con las BM-MSC primarias, mientras que las líneas celulares de glioma y carcinoma expresaron niveles relativamente bajos de ARNm de GARP (Figura 1B). También analizamos la expresión de GARP superficial por citometría de flujo que corroboró los niveles relativos de expresión de ARNm de GARP (G292> BM-MSC> T1-73> SAOS-2> RD-ES) (Figura 1C). Es importante destacar que, como se demostró previamente en ASC humanos [25], encontramos que el silenciamiento de GARP (Fig. 1 suplementaria) en BM-MSC, usando vectores lentivirales que codifican dos shRNA específicos de GARP (GARPKO1 y GARPKO2), disminuyó sustancialmente su capacidad proliferativa en comparación a BM-MSC no transducidas (NT) y transducidas por control (LV-CTRL) (Figura 1D). Del mismo modo, el silenciamiento de GARP en las líneas celulares G292, T1-73 y SAOS-2 redujo su capacidad proliferativa en comparación con las células NT y LV-CTRL (Figura 1D y E) y dio lugar a un aumento de la muerte celular por apoptosis (Figura 1F).

GARP promueve la proliferación de líneas celulares de sarcoma óseo a través de la activación de TGF-β.

A continuación, quisimos analizar el efecto de la sobreexpresión de GARP en la proliferación de las células de sarcoma óseo. Con este fin, sobreexpresamos GARP (GARP++) en las líneas celulares de sarcoma de Ewing G292, SAOS-2 y RD-ES utilizando un LV que codifica un ADNc de GARP humano optimizado por codón bajo el control del promotor CMV (Figura 2A). Paralelamente, las células de control se transdujeron con un LV que codifica la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP ++). La sobreexpresión de GARP aumentó significativamente la capacidad proliferativa de todas las líneas celulares en comparación con las células NT y EGFP ++ (Figura 2B y C). Dado que TGF-β es un factor de crecimiento para las células de osteosarcoma [28] y se ha demostrado que GARP promueve la activación de TGF-β [29], evaluamos si la sobreexpresión de GARP podría aumentar la activación de TGF-β. Con este fin, cocultivamos células de sarcoma óseo NT y GARP++ con una línea celular de indicador de actividad de elemento de unión a SMAD (SBE)-HEK293 TGF-β. Encontramos que la sobreexpresión de GARP aumentó significativamente la activación de TGF-β por las células G292, SAOS-2 y RD-ES (Figura 2D). El bloqueo de la señalización de TGF-β con SB431542 o la neutralización de TGF-β usando un anticuerpo anti-TGF-β1/2/3, redujo significativamente la proliferación de las células GARP++ (Figura 2F). En resumen, estos datos muestran que GARP promueve la proliferación de las líneas celulares de sarcoma óseo al promover la activación de TGF-β.

GARP aumenta el crecimiento de tumores G292 in vivo

Para analizar si los niveles de expresión de GARP también son importantes para el crecimiento tumoral in vivo, inyectamos células NT, GARP++, LV-CTRL y GARPKO2 G292 por vía subcutánea en ratones NSG y seguimos el crecimiento tumoral con el tiempo. De acuerdo con los datos in vitro, GARP++ G292 exhibió un crecimiento in vivo significativamente mayor en comparación con NT G292, mientras que se encontraron tumores más pequeños en solo 3 de 8 ratones inyectados con células GARPKO2 G292 (Figura 3A, B y C). Además, tanto los volúmenes como los pesos de los tumores GARP++ aislados de los ratones sacrificados aumentaron significativamente en comparación con los tumores NT (Figura 3B). En contraste, los pesos y volúmenes de los tumores GARPKO fueron significativamente menores en comparación con los tumores LV-CTRL (Figura 3C). Realizamos una inmunohistoquímica Ki67 para analizar la tasa de proliferación celular en los diferentes tumores y descubrimos que los tumores GARP++ contenían un porcentaje significativamente mayor de células Ki67+ en comparación con los tumores NT. Se observó una tendencia opuesta entre los tumores GARPKO y LV-CTRL, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Esto podría deberse al hecho de que solo tres ratones NSG inyectados con células GARPKO

G292 mostraron la presencia de un tumor, posiblemente con una mayor capacidad proliferativa. Finalmente, analizamos la activación de SMAD3 en los tumores GARP++ y NT por inmunohistoquímica y observamos una mayor fracción de células con alta fosforilación de SMAD3 en tumores GARP++ en comparación con los tumores NT (Figura 3F). En resumen, nuestros datos muestran que la modulación de la expresión de GARP en el G292 tiene profundos efectos sobre su crecimiento in vivo, corroborando nuestros datos in vitro.

Las líneas celulares de sarcoma óseo que sobreexpresan GARP son más resistentes a la muerte celular inducida por etopósido y doxorrubicina, que dependen de TGF-β

Estudios previos sobre GARP en el contexto del cáncer se han centrado en la inhibición de la respuesta inmune a través de la mayor activación de TGF-β, especialmente la inducción de foxp3 + Tregs [18-20]. Sin embargo, ningún estudio ha analizado el efecto de la expresión de GARP sobre la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos o la irradiación. Con este fin, agregamos diferentes concentraciones del etopósido del agente que daña el ADN a las líneas celulares NT, EGFP y GARP++ G292, SAOS-2 y RD-ES y analizamos la supervivencia celular (CelltiterBlue) y la apoptosis (7AAD / Annexin V) después de 24 horas. Encontramos que la sobreexpresión de GARP aumentó la supervivencia celular (Figura 4A) y redujo la apoptosis (Figura complementaria S2) de todas las líneas celulares tumorales en respuesta al etopósido. La inhibición de la señalización de TGF-β (SB431542) o la neutralización de TGF-β (1D11) revirtieron significativamente la supervivencia de las células que sobreexpresan GARP, lo que sugiere un mecanismo dependiente de TGF-β (Figura 4B). Del mismo modo, las células GARP++ fueron más resistentes a la muerte celular inducida por la doxorrubicina, aunque en menor medida en comparación con el etopósido. Nuevamente, la inhibición de la señalización de TGF-β revirtió el efecto protector conferido por GARP (Figura 4C).

Las células de sarcoma que sobreexpresan GARP muestran una sensibilidad reducida a la muerte celular inducida por la radiación y al daño del ADN

Luego realizamos un ensayo clonogénico para evaluar la resistencia relativa de las células de sarcoma NT y GARP++ a la muerte celular inducida por radiación. Los experimentos piloto mostraron que G292 no formaba colonias contables, por lo tanto, los experimentos se realizaron solo con las líneas celulares SAOS-2 y RD-ES. Las líneas celulares SAOS-2 y RD-ES NT y GARP++ se sometieron a diferentes dosis de irradiación (2, 4 y 8 Gy), en presencia o ausencia de SB431542, y se siguió la capacidad

de formación de colonias durante aproximadamente dos semanas. Encontramos que las células GARP++ SAOS-2 y RD-ES eran significativamente más resistentes a la muerte celular inducida por la irradiación en comparación con las células NT. La inhibición de la señalización de TGF-β redujo la radiorresistencia conferida por GARP en ambas líneas celulares (Figura 5A y B). Se ha demostrado que el TGF-β protege a las células contra el daño del ADN inducido por la irradiación a través de su efecto sobre la reparación del ADN [30]. Por lo tanto, irradiamos células NT y GARP++ SAOS-2 y RD-ES, cultivadas con o sin SB431542 durante 24 horas, con 4 Gy y analizamos la inducción de daño en el ADN tal como se visualiza por la fosforilación de H2AX antes y dos horas después de la irradiación. Encontramos que la irradiación indujo niveles significativamente más bajos de γ-H2AX en las células GARP++ en comparación con las células NT. Curiosamente, encontramos que el bloqueo de la señalización de TGF-β aumentó la cantidad de daño de ADN en las células GARP++ SAOS-2 y RD-ES a la de las células NT, lo que implica que TGF-β en la resistencia al daño de ADN inducido por irradiación (Figura 5C y RE). Finalmente, para visualizar mejor el daño del ADN en los núcleos, repetimos la irradiación de las células GARP++ y NT SAOS-2 y RD-ES, como se describió anteriormente, y analizamos la activación de H2AX usando un citómetro de flujo Imagestream. Como antes, observamos que las células GARP++ eran más resistentes al daño del ADN inducido por la irradiación, que dependía de la señalización de TGF-β (Figura 5E y F). En resumen, estos datos muestran que GARP, a través de su activación de TGF-β, puede proteger las células tumorales contra la muerte celular inducida por la irradiación y el daño del ADN, lo que sugiere que GARP podría representar un objetivo terapéutico y posiblemente un biomarcador predictivo de quimio / radiorresistencia de sarcomas óseos.

GARP está altamente expresado en los sarcomas osteo, condro y pleiomórficos humanos y está asociado con una pobre supervivencia / pronóstico.

Se desconoce la relevancia clínica de la expresión de GARP en los sarcomas. Por lo tanto, estudiamos la expresión de GARP en sarcomas óseos humanos primarios y su correlación con los datos clínicos. Primero analizamos la expresión de GARP en líneas celulares derivadas de pacientes primarios de dos osteosarcomas (OST-3, OST-4) y un condrosarcoma (T-CDS17) [26]. Curiosamente, encontramos que todas las líneas celulares expresaron GARP, aunque en niveles variables (Figura 6A). Las líneas celulares OST-4 expresaron GARP a un nivel alto y el silenciamiento de GARP en esta línea celular redujo su capacidad proliferativa, similar a lo que observamos usando las líneas celulares primarias BM-MSC y cáncer de sarcoma óseo (Figura 6B).

Luego nos propusimos analizar la expresión de GARP en una colección de microarrays de tejidos, incluidas muestras de 89 pacientes de 10 tipos de sarcomas, por inmunohistoquímica. Encontramos que GARP se expresó en niveles altos en 43 (48%) de las muestras de sarcoma, incluidos todos los casos de osteosarcoma y sarcoma pleomórfico indiferenciado (Figura 7A y B). Ninguna de las variables clinicopatológicas analizadas mostró una correlación significativa con el nivel de expresión de GARP (Tabla S1), aunque se observó una tendencia a un mayor grado (p = 0,15) y puntuación de conteo mitótico (P = 0.068) en tumores que muestran una alta expresión de GARP (Figura 7B). Curiosamente, los casos que expresaron niveles bajos de GARP tuvieron un tiempo de supervivencia significativamente mayor que aquellos con alta expresión (94 meses (IC 87-100) frente a 41 meses (IC 28-54), respectivamente; HR 19; p = 0,0001). La tasa de supervivencia a 5 años fue del 95,5% para los casos de baja expresión y del 35,3% para los casos de alta expresión (Fig. 7C). Grado de tumor, tipo de tumor, recuento mitótico, necrosis y nivel de expresión GARP se incluyeron en el análisis de supervivencia multivariante. La necrosis tumoral mostró un valor pronóstico independiente (p = 0.024, HR 2,643). Es importante destacar que se observó una tendencia hacia la expresión de GARP que tiene un valor pronóstico independiente (p = 0,056) (Tabla S2).

Finalmente, en una serie de 11 pacientes con sarcoma donde tenemos las respuestas a varios tratamientos de primera línea (Figura 8A), observamos que los únicos dos respondedores completos (RC) ocurrieron en dos de cada cuatro pacientes con niveles bajos de GARP. Por otro lado, el único caso en el que el tratamiento no tuvo ningún efecto correspondió a un paciente con altos niveles de GARP. A pesar del bajo número de pacientes, detectamos una diferencia significativa (p = 0,039) entre pacientes con expresión de GARP alta y baja que realiza un análisis dicotómico de la respuesta completa versus las otras opciones de respuesta (respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva (Figura 8B) Por lo tanto, estos resultados sugieren que los sarcomas que expresan altos niveles de GARP tienen respuestas más pobres a los tratamientos antitumorales.

REIVINDICACIONES

1.- Un método *in vitro* para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento de un sarcoma en un individuo, caracterizado por que el método comprende medir en una muestra biológica aislada el producto de expresión de GARP.

2.- El método *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado porque además comprende comparar las cantidades obtenidas con una cantidad de referencia.

3.- Un método *in vitro* para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento de un sarcoma en un individuo que comprende:

a) medir en una muestra biológica aislada el producto de expresión de GARP;

b) comparar las cantidades obtenidas con una cantidad de referencia; y

c) incluir al individuo en el grupo de individuos con una menor probabilidad de respuesta al tratamiento, cuando el producto de expresión de GARP es significativamente mayor ($p < 0.05$) que la de la muestra de referencia.

4.- El método *in vitro* según la reivindicación 3, caracterizado porque se incluye al individuo en el grupo de individuos con una menor probabilidad de respuesta al tratamiento, cuando el producto de expresión de GARP es de al menos 1,3 veces la expresión de la muestra de referencia.

5.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el producto de expresión de GARP es de al menos 1,5 veces la expresión de la muestra de referencia.

6.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el producto de expresión de GARP es de al menos 2 veces la expresión de la muestra de referencia.

7.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el producto de expresión de GARP es de al menos 2,5 veces la expresión de la muestra de referencia.

8.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el producto de expresión de GARP es de al menos 3 veces la expresión de la muestra de referencia.

9.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el producto de expresión de GARP es de al menos 3,5 veces la expresión de la muestra de referencia.

10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque la determinación del producto de expresión de GARP se realiza mediante un inmunoensayo o inmunohistoquímica.

11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado la determinación de los niveles de GARP se realiza mediante una técnica que se selecciona de entre: *inmunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluoresecencia, x-map o *chips* de proteína.

12.- El método según la reivindicación 11, caracterizado porque la determinación del producto de expresión de GARP se realiza mediante inmunohistoquímica.

13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque el tratamiento es quimioterápico (etopóxido y doxorubicina) y/o radioterapia.

14.- El método para para predecir o pronosticar la respuesta al tratamiento de un sarcoma de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que la etapa (a)comprende los elementos y/o reactivos necesarios para cuantificar los niveles de GARP en una muestra biológica aislada.

15.- El método según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión de GARP, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases que presentan una identidad de al menos un 80% con un fragmento de la secuencia complementaria a la SEQ ID NO: 1

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases que presentan una identidad de al menos un 80% con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1,

- los anticuerpos son capaces de unirse específicamente a una región formada por la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

16.- El método según la reivindicación 15, caracterizado porque los cebadores o primers tienen una secuencia de polinucleótidos de entre 15 y 25 pares de bases.

17.- El método según la reivindicación 15, caracterizado porque los cebadores o primers tienen una secuencia de polinucleótidos de entre 18 y 22 pares de bases.

18.- El método según la reivindicación 15, caracterizado porque los cebadores o primers tienen una secuencia de polinucleótidos de alrededor de 20 pares de bases.

19.- El método según las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque los cebadores o primers presentan una identidad de al menos un 90 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

20.- El método según las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque los cebadores o primers presentan una identidad de al menos un 95 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

21.- El método según las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque los cebadores o primers presentan una identidad de al menos un 98 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

22.- El método según las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque los cebadores o primers presentan una identidad del 100 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

23.- El método según las reivindicaciones 15 a 22, caracterizado porque las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 100 y 1000 pares de bases.

24.- El método según las reivindicaciones 15 a 22, caracterizado porque las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 150 y 500 pares de bases.

25.- El método según las reivindicaciones 15 a 24, caracterizado porque las sondas presentan una identidad de al menos un 90 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

26.- El método según las reivindicaciones 15 a 24, caracterizado porque las sondas presentan una identidad de al menos un 95 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

27.- El método según las reivindicaciones 15 a 24, caracterizado porque las sondas presentan una identidad de al menos un 98 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

28.- El método según las reivindicaciones 15 a 24, caracterizado porque las sondas presentan una identidad del 100 % con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID NO: 1.

29.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 14-25, donde el anticuerpo tiene la secuencia SEQ ID NO:3.

30.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 14-25, donde la etapa (a) además comprende:

a) un soporte sólido que lleva unido un anticuerpo primario
b) una solución del anticuerpo de detección, marcado con un marcador enzimático; y
c) un reactivo.

Figura 1.

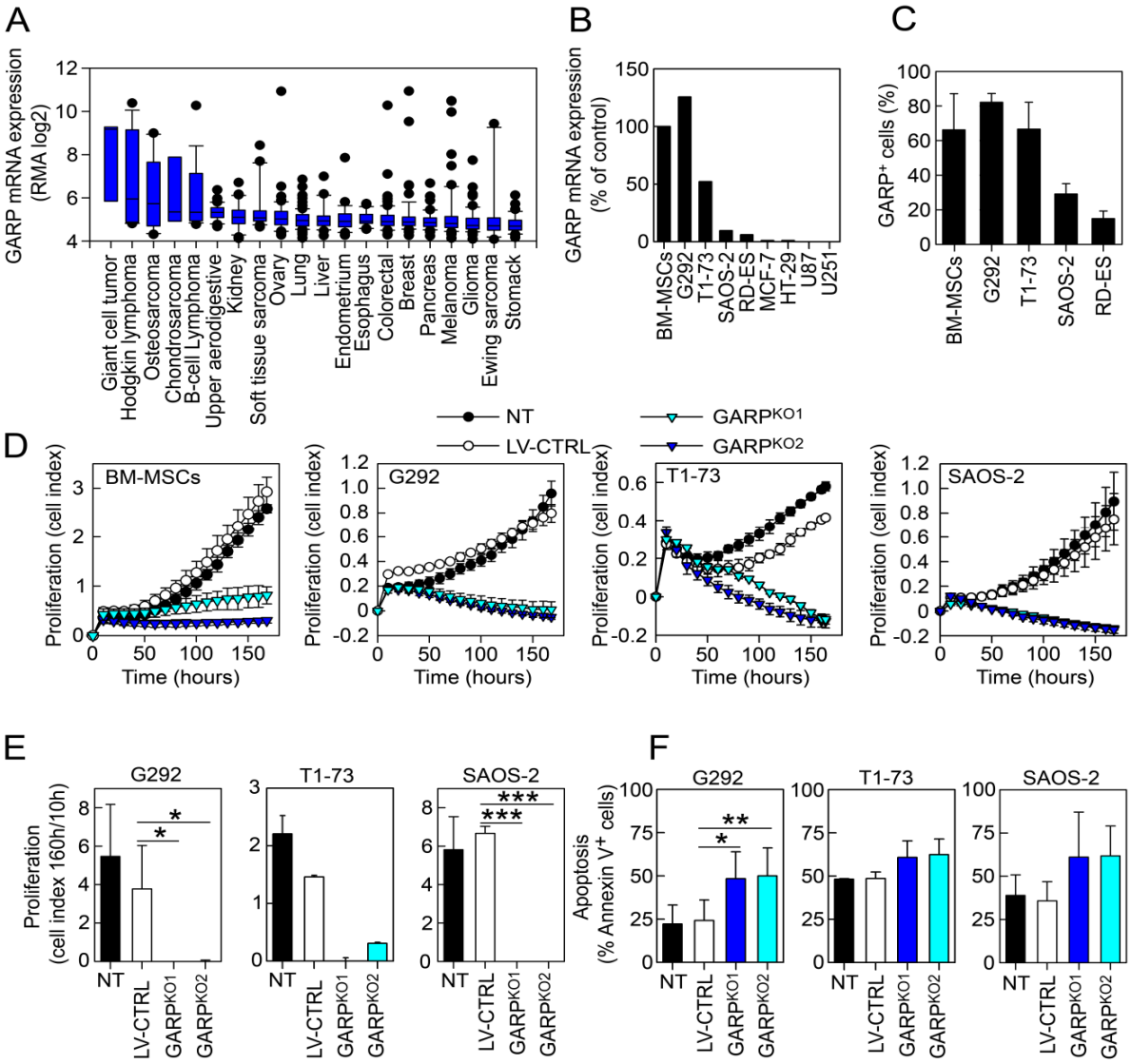

A
GARP mRNA expression (RMA log2)
Giant cell tumor
Hodgkin lymphoma
Osteosarcoma
Chondrosarcoma
B-cell Lymphoma
Upper aerodigestive
Kidney
Soft tissue sarcoma
Ovary
Lung
Liver
Endometrium
Esophagus
Colorectal
Breast
Pancreas
Melanoma
Glioma
Ewing sarcoma
Stomack
B
GARP mRNA expression (% of control)
BM-MSCs
G292
T1-73
SAOS-2
RD-ES
MCF-7
HT-29
U87
U251
C
GARP+ cells (%)
BM-MSCs
G292
T1-73
SAOS-2
RD-ES
D
NT
LV-CTRL
GARPKO1
GARPKO2
BM-MSCs
G292
T1-73
SAOS-2
Proliferation (cell index)
Time (hours)
E
G292
T1-73
SAOS-2
Proliferation (cell index 160h/10h)
NT
LV-CTRL
GARPKO1
GARPKO2
F
G292
T1-73
SAOS-2
Apoptosis (% Annexin V+ cells)
NT
LV-CTRL
GARPKO1
GARPKO2

Figura 2.

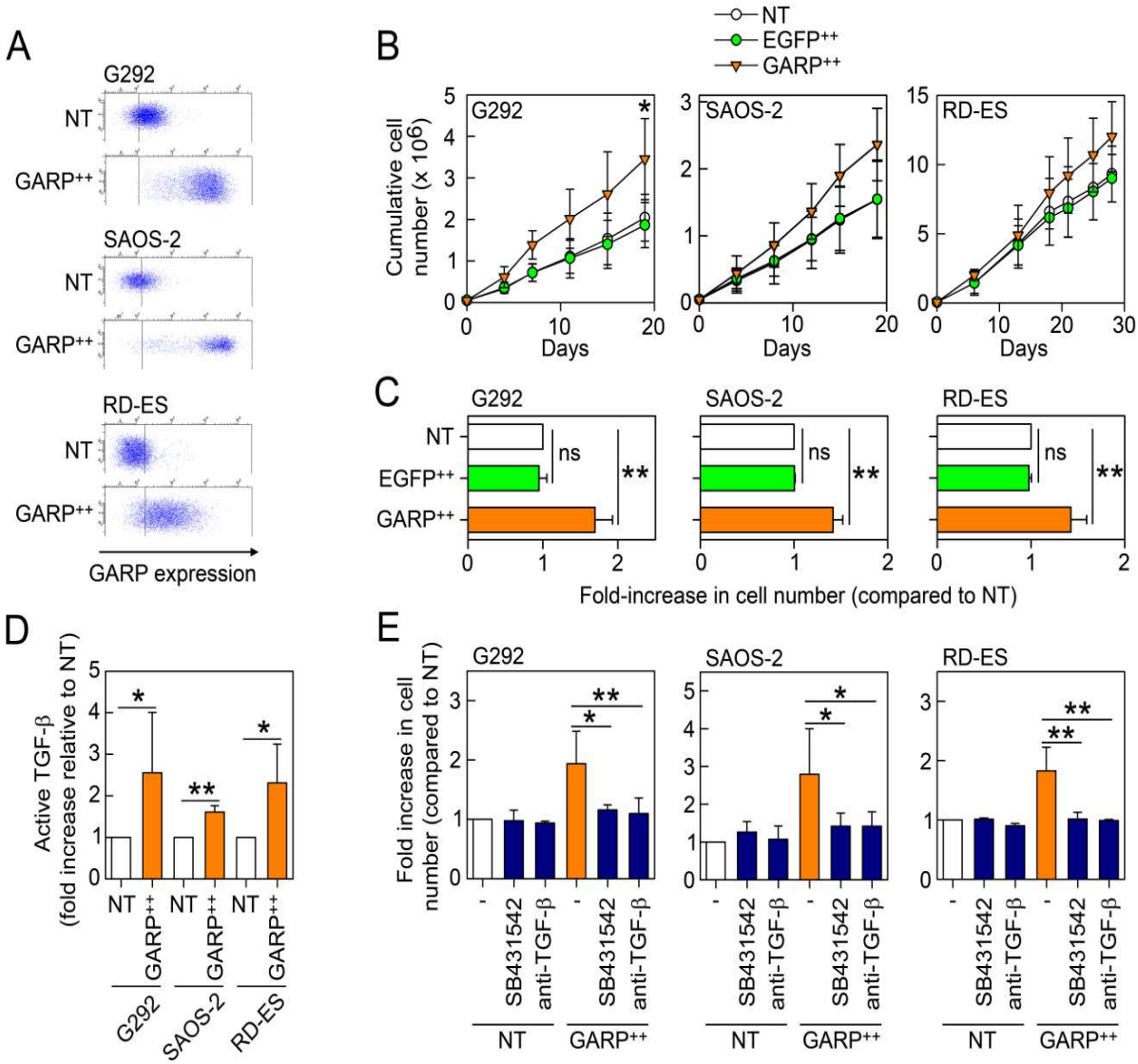

A
G292
NT
GARP++
SAOS-2
NT
GARP++
RD-ES
NT
GARP++
GARP expression
B
NT
EGFP++
GARP++
G292
SAOS-2
RD-ES
Cumulative cell number (x 10^6)
Days
C
G292
SAOS-2
RD-ES
NT
EGFP++
GARP++
ns
**
Fold-increase in cell number (compared to NT)
D
Active TGF-β (fold increase relative to NT)
NT
GARP++
G292
SAOS-2
RD-ES
E
G292
SAOS-2
RD-ES
Fold increase in cell number (compared to NT)
-
SB431542
anti-TGF-β
NT
GARP++

Figura 3.

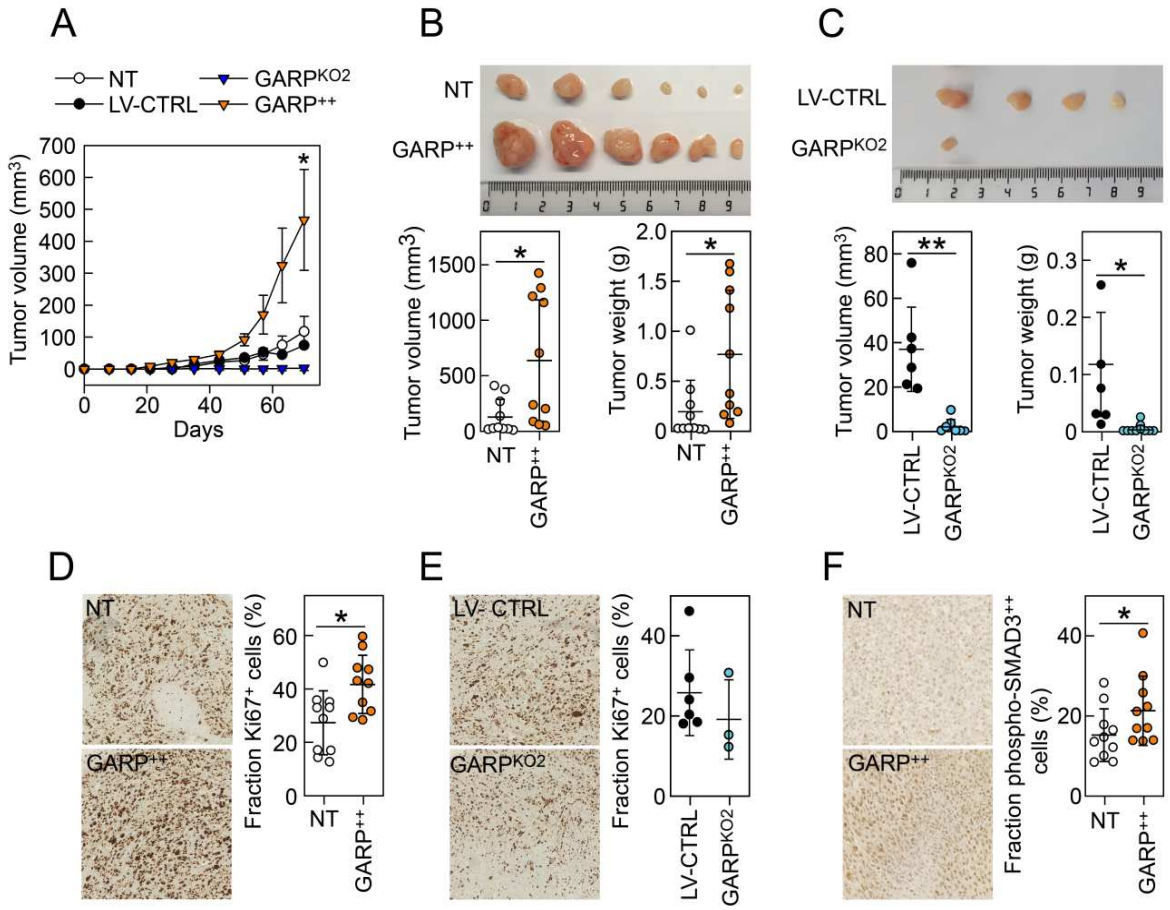

A
NT
LV-CTRL
GARPKO2
GARP++
Tumor volume (mm3)
Days
B
NT
GARP++
Tumor volume (mm3)
Tumor weight (g)
C
LV-CTRL
GARPKO2
Tumor volume (mm3)
Tumor weight (g)
D
NT
GARP++
Fraction Ki67+ cells (%)
E
LV- CTRL
GARPKO2
Fraction Ki67+ cells (%)
F
NT
GARP++
Fraction phospho-SMAD3++ cells (%)

Figura 4.

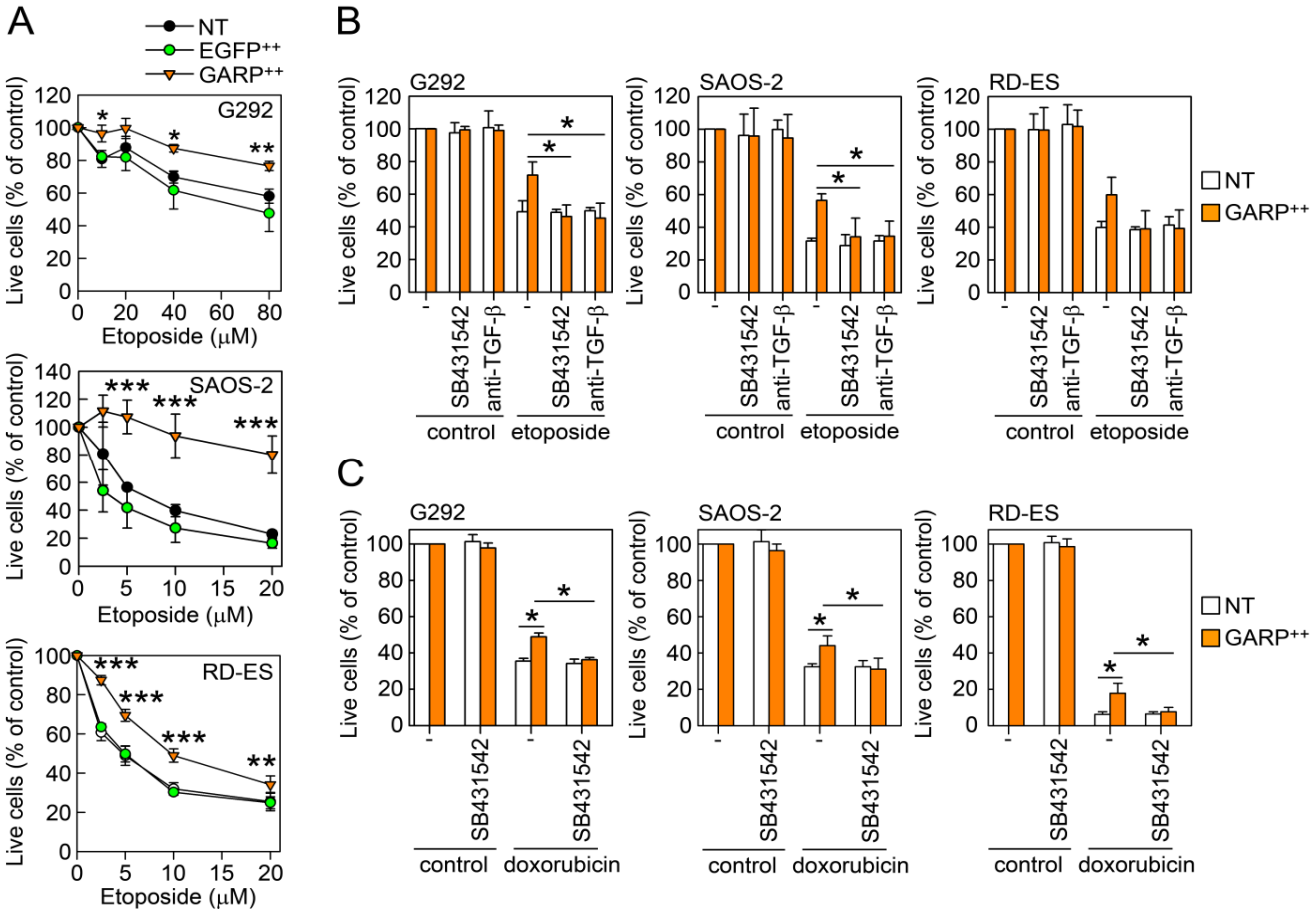

A
NT
EGFP++
GARP++
G292
SAOS-2
RD-ES
Live cells (% of control)
Etoposide (μM)
B
G292
SAOS-2
RD-ES
Live cells (% of control)
-
SB431542
anti-TGF-β
control
etoposide
NT
GARP++
C
G292
SAOS-2
RD-ES
Live cells (% of control)
SB431542
control
doxorubicin
NT
GARP++

Figura 5.

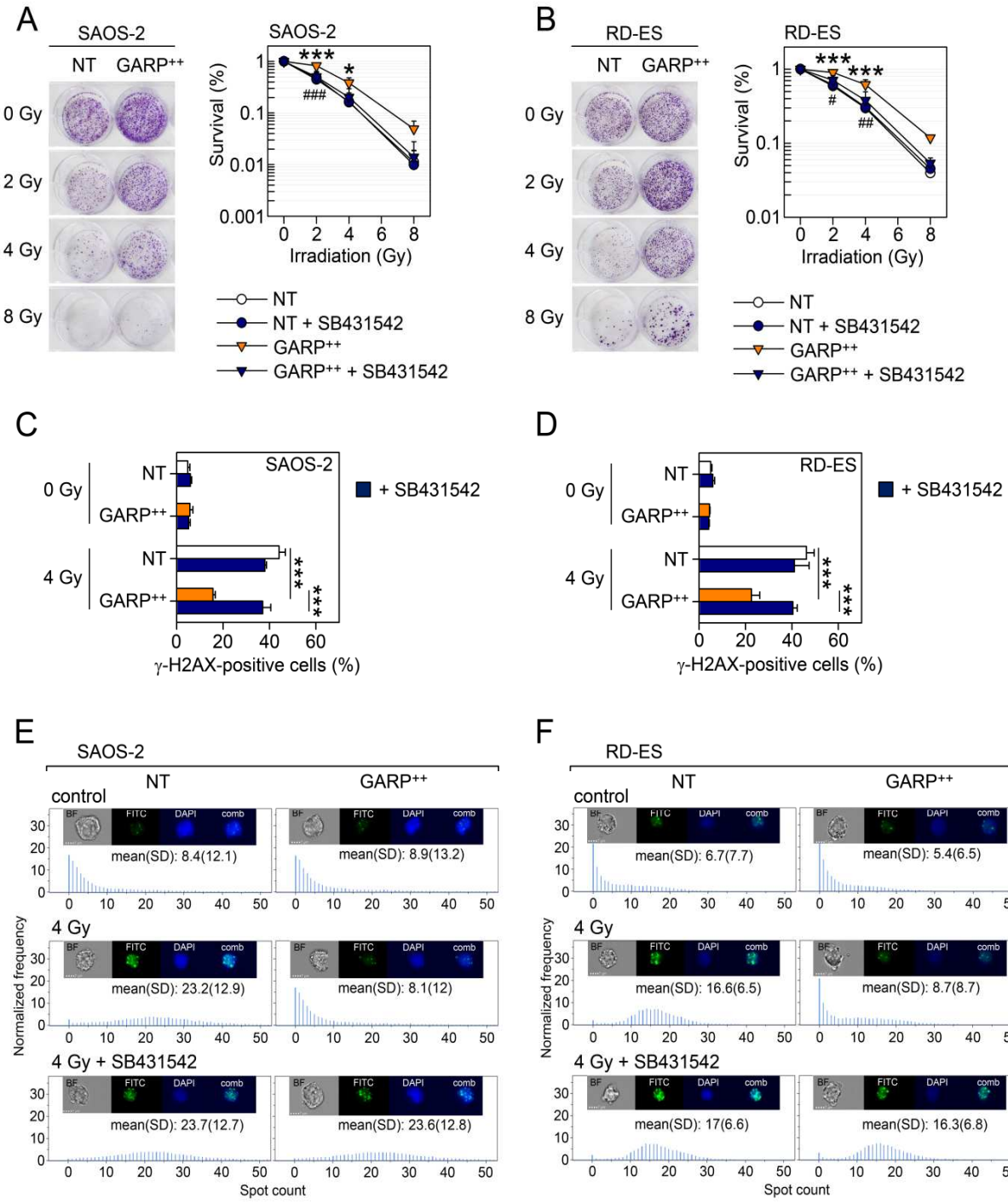

A
SAOS-2
NT
GARP++
0 Gy
2 Gy
4 Gy
8 Gy
SAOS-2
Survival (%)
Irradiation (Gy)
NT
NT + SB431542
GARP++
GARP++ + SB431542
B
RD-ES
RD-ES
C
SAOS-2
+ SB431542
γ-H2AX-positive cells (%)
D
RD-ES
E
SAOS-2
control
4 Gy
4 Gy + SB431542
BF
FITC
DAPI
comb
mean(SD): 8.4(12.1)
mean(SD): 8.9(13.2)
mean(SD): 23.2(12.9)
mean(SD): 8.1(12)
mean(SD): 23.7(12.7)
mean(SD): 23.6(12.8)
Normalized frequency
Spot count
F
RD-ES
mean(SD): 6.7(7.7)
mean(SD): 5.4(6.5)
mean(SD): 16.6(6.5)
mean(SD): 8.7(8.7)
mean(SD): 17(6.6)
mean(SD): 16.3(6.8)

Figura 6.

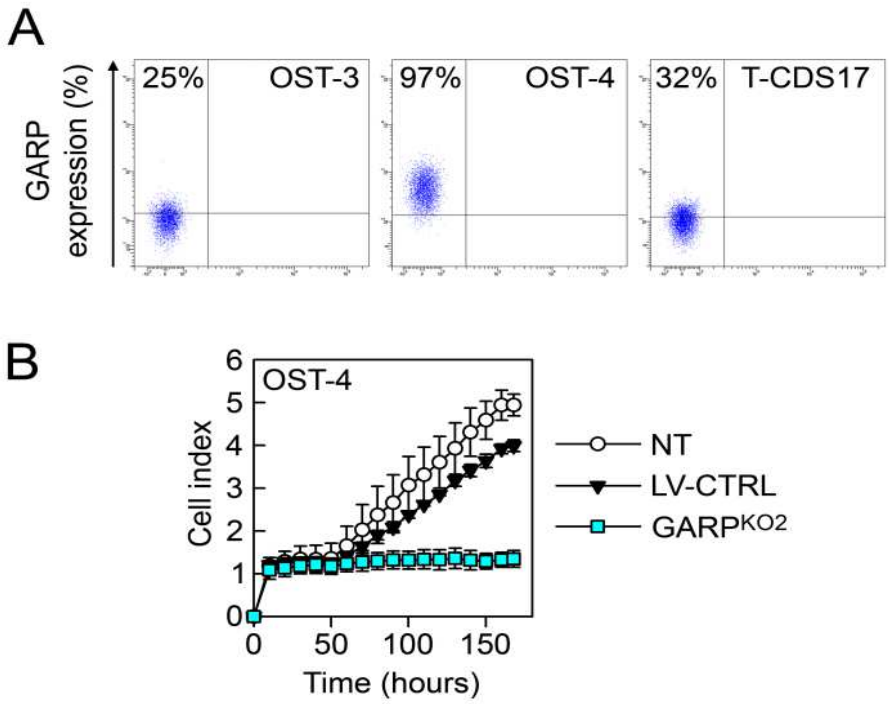
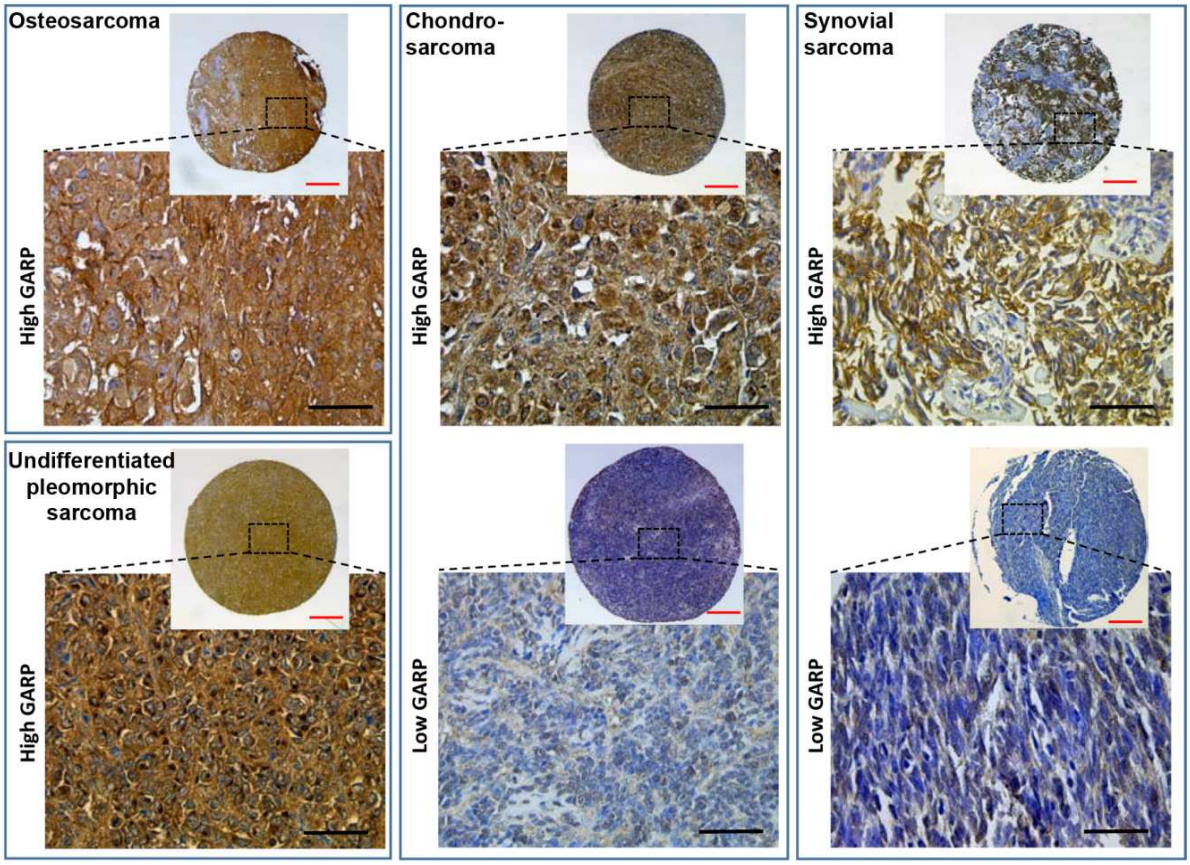

A
GARP expression (%)
25%
OST-3
97%
OST-4
32%
T-CDS17
B
OST-4
Cell index
Time (hours)
NT
LV-CTRL
GARPKO2

Figura 7.

A



B

	Low GARP (%)	High GARP (%)	Total	*P* (Chi-Square)
Diagnosis				
Osteosarcoma	0 (0)	8 (100)	8	0.0001
Ewing Sarcoma	5 (83)	1 (17)	6	
Myxoid Liposarcoma	10 (71)	4 (29)	14	
Liposarcoma	6 (75)	2 (25)	8	
Chondrosarcoma	3 (27)	8 (73)	11	
Synovial Sarcoma	7 (78)	2 (22)	9	
Und. Pleomorphic Sarcoma	0 (0)	10 (100)	10	
Enchondroma	5 (56)	4 (44)	9	
Dermatofibrosarcoma	9 (100)	0 (0)	9	
GIST	1 (20)	4 (80)	5	
Total	46	43	89	
Grade				
1	10 (63)	6 (37)	16	0.15
2	9 (45)	11 (55)	20	
3	6 (30)	14 (70)	20	
Total	25	31	56	
Missing	21	12	33	
Mitotic count				
0	0 (0)	2 (100)	2	0.068
1	20 (49)	14 (51)	34	
2	3 (25)	9 (75)	12	
3	3 (30)	7 (70)	10	
Total	26	32	58	
Missing	20	11	31	

C

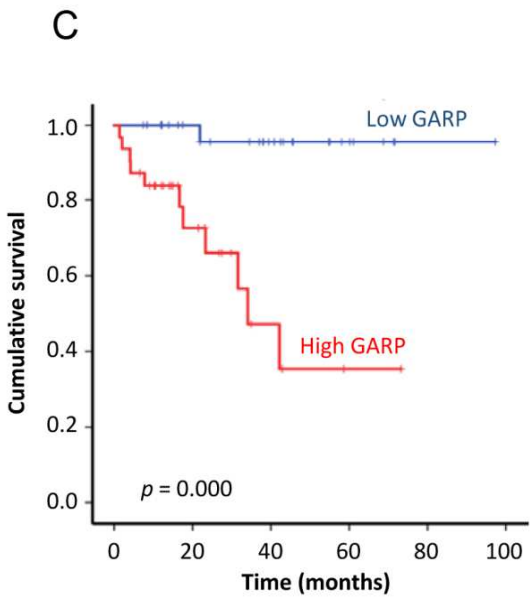


Figura 8.

A

Tipo sarcoma	QTP1	Respuesta
S. Ewing	vincristina-ifosfamida-doxorrubicina-etopósido	RC
sarcoma sinovial bifásico	ifosfamida-doxorrubicina	EE
sarcoma pleomórfico	ifosfamida-doxorrubicina liposomal	RP
liposarcoma mixoide	ifosfamida-doxorubicina (x7) e ifosfamida monoterapia (x4)	RP
sarcoma sinovial monofásico	ifosfamida-doxorrubicina	RC
PNET	Ifosfamida-Etopósido-Vincristina-Doxorubicin-Ciclofosfamida	PD
GIST	Imatinib	RP
GIST	Imatinib	RP
GIST	Imatinib	RP
GIST	Imatinib	RP
GIST	Imatinib	RP

B

Respuesta a terapias:

RC	Respuesta Completa
RP	Respuesta Parcial
PD	Progression Disease
EE	Enfermedad Estable

0.039	RespQTP1		
GARP	**RC**	**RP+EE+PD**	Total
Low	2	2	4
High	0	7	7
Total	2	9	11

Figura 9.

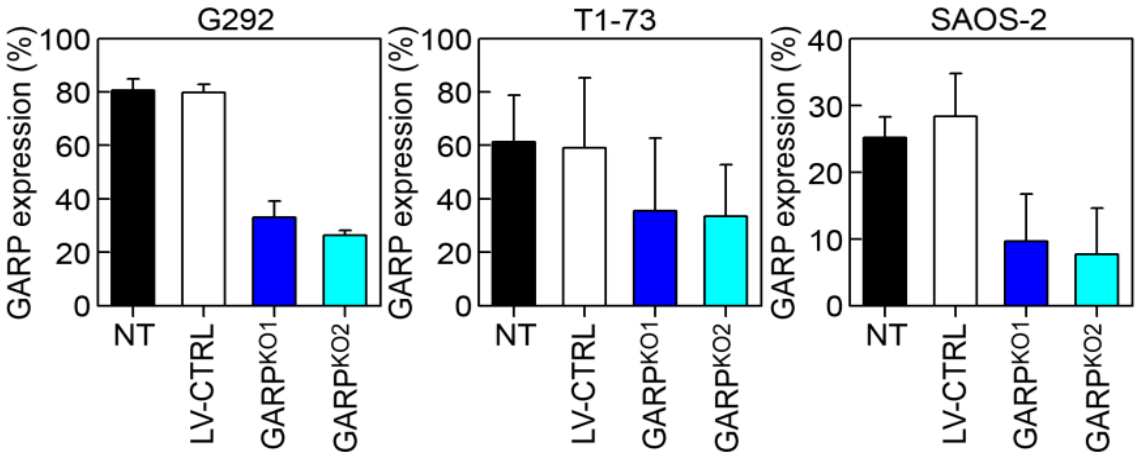


Figura 10.

