

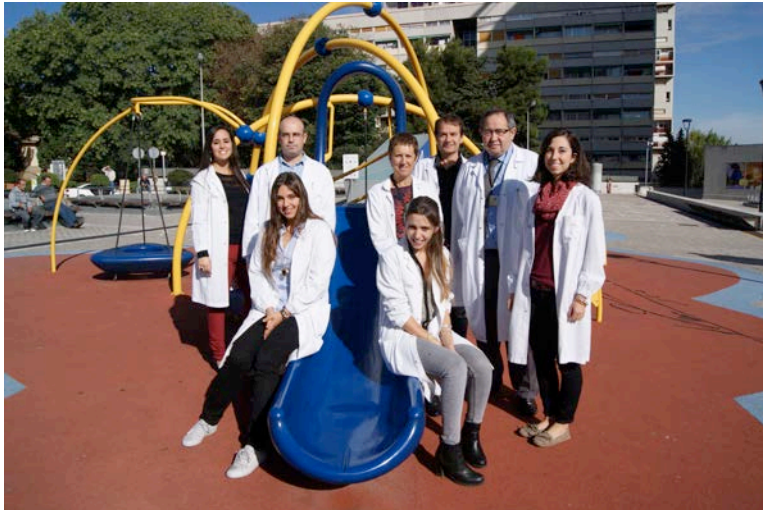


**Fundació**  
La Marató de TV3  
XVI SIMPOSIUM  
Enfermedades minoritarias

## Inhibición de la vía de Notch como diana terapéutica en el rhabdomioma

**Dra. Soledad Gallego**

Fundació Hospital Universitari Vall d'Hebron-Institut de Recerca



## 1. Resumen del proyecto

### Marco teórico

El rabdomiosarcoma (RMS) es un tumor maligno derivado de los precursores mioblásticos del músculo esquelético. Es una enfermedad rara, con una incidencia de 5,3 casos/millón/año, afectando principalmente a niños menores de 15 años. Con los tratamientos actuales la supervivencia global a los 5 años es del 60-65%. Nuestros estudios *in vitro* sugieren que la inhibición de la vía de Notch produce una disminución significativa de la invasión en líneas celulares de RMS. Además, la activación de la vía de Notch parece tener un papel crucial en el mantenimiento de las células iniciadoras del tumor (CIT) en otras neoplasias y recientemente se ha demostrado que las células de RMS positivas para el receptor del factor de crecimiento fibroblástico-3 (FGFR3+) tienen características de CIT.

### Objetivo principal

Analizar los efectos de la inhibición de la vía de Notch mediante un modelo de xenotrasplante murino de RMS para identificar nuevas dianas terapéuticas en esta neoplasia.

### Objetivos específicos

1. Analizar el efecto antioncogénico de la regulación a la baja de la vía de Notch, mediante los inhibidores de alfa- y gamma-secretasa en células de rabdomiosarcoma *in vitro*.
2. Probar el efecto de los inhibidores de alfa- y gamma-secretasa *in vivo* en un modelo murino de rabdomiosarcoma.
3. Caracterización de los perfiles de expresión de la vía de Notch y testar el efecto de la inhibición de la vía en las células progenitoras de rabdomiosarcoma (FGFR3+) como posible diana terapéutica para superar la quimiorresistencia y reducir o anular su potencial metastásico.

4. Determinación del perfil proteómico en xenoinjertos en ratones SCID tratados o sin tratar, con el fin de identificar y cuantificar proteínas pertenecientes o relacionadas con la vía de Notch como nuevas dianas terapéuticas o diagnósticas.

## 2. Resultados

**Apartado 1.** Se ha analizado el efecto antioncogénico de la regulación a la baja de la vía de Notch, mediante los inhibidores de alfa y gamma-secretasa en células de rhabdomiosarcoma *in vitro*. Estos resultados han permitido seleccionar los inhibidores de gamma-secretasa como los más efectivos, que han sido utilizados en las fases posteriores del proyecto.

**Apartado 2.** Se han llevado a cabo dos estudios de inhibición de la vía de Notch *in vivo*, en tumores primarios generados en ratones inmunodeprimidos. Se han utilizados dos drogas diferentes, el GSI-XXI y el DAPT. Con el DAPT se ha logrado reducir de forma significativa el crecimiento del tumor, aunque no bloquear su crecimiento por completo. Durante la segunda anualidad se ha completado la tarea de desarrollar un modelo de metástasis y se ha realizado el tratamiento con inhibidores de gamma-secretasa en este modelo. Los resultados han mostrado una disminución relevante en la aparición de metástasis en los ratones tratados. Paralelamente se ha podido estudiar la importancia de la inhibición de la vía Hedgehog, que posee un efecto compensatorio muy importante. Estos resultados han permitido alcanzar el objetivo, o incluso en este caso superarlo con creces, pues se ha podido complementar con el estudio de la vía Hedgehog, muy relacionada con la vía Notch y con efectos sinérgicos sobre la tumorigenicidad.

**Apartado 3.** Se ha optimizado el marcaje citométrico de las células iniciadoras de tumor con diversos marcadores en células en cultivo de RMS, así como en tumores procedentes de xenoinjertos en ratones SCID y humanos. Durante la tercera anualidad del proyecto el marcador FGFR3 ha sido descartado por no ofrecer

buenos resultados respecto a clonogenicidad y capacidad de diferenciación. Por este motivo se han incorporado nuevos marcadores, ya que el avance en el conocimiento de las células madre tumorales nos ha sugerido otros marcadores (como los CD133 y C-met) que han permitido avanzar con mayor solidez hacia el objetivo final que es aislar y caracterizar las células madre tumorales en el RMS.

Además, se ha desarrollado un nuevo método para la detección de las células tumorales circulantes que va a permitir analizar de forma muy específica la presencia de células madre circulantes en sangre periférica y médula ósea (publicado en *Cytometry A*).

### **3. Relevancia y posibles implicaciones**

El rabdomiosarcoma es el sarcoma de tejidos blandos más común en niños. La supervivencia global a esta neoplasia se sitúa alrededor del 65%. Sin embargo, los pacientes con metástasis o progresión de la enfermedad durante o después de la terapia presentan mal pronóstico. Para estos pacientes, la búsqueda de nuevas terapias que afectaran directamente a dianas moleculares resultaría en medios más eficaces para superar la resistencia al tratamiento, mejorando así sus posibilidades de curación.

Antes de iniciar este proyecto, la posible función biológica de la vía de Notch en el rabdomiosarcoma era totalmente desconocida. Los resultados obtenidos gracias al apoyo de este proyecto han demostrado que esta vía es muy importante para la movilidad y la capacidad de invasión de las células de rabdomiosarcoma *in vitro*, lo que podría resultar en un aumento del potencial metastásico *in vivo*. Este proyecto ha permitido aclarar el papel de la vía en la progresión tumoral y la capacidad metastásica en modelos animales inmunodeprimidos.

Este proyecto ha permitido demostrar el efecto antioncogénico de los inhibidores de la vía de Notch *in vitro* al aplicarlos a un modelo de ratón. Hemos demostrado así su potencial como terapia contra el cáncer. Esto permitirá no solo una mejor comprensión de la función de esta vía de señalización en RMS, sino que también abre la posibilidad de utilizar estos inhibidores en un futuro próximo como terapia dirigida contra los RMS de alto riesgo, recurrentes o refractarios.

El proyecto ha descrito por primera vez varios conceptos muy novedosos y con gran implicación clínica para el RMS:

1. La vía de Notch como diana terapéutica potencial. También se sugiere el co-tratamiento con inhibidores de la vía Hedgehog. Un cotratamiento con ambos inhibidores podría ser muy potente de cara a tratar los casos que en la actualidad no responden a la terapia.

2. La presencia de células madre tumorales en los dos principales tipos de rhabdomyosarcoma y la diferenciación de las mismas que se promueve cuando se tratan con inhibidores de Notch y Hedgehog, sugiere que pueden ser unas dianas terapéuticas muy importantes también para esta subpoblación específica. Un posible tratamiento que fuera efectivo contra esta población celular tan quimiorresistente podría abrir la puerta a nuevos tratamientos que podrían contribuir a una mejora de las tasas de supervivencia.

3. Se ha desarrollado un nuevo método basado en la citometría de flujo para determinar la presencia de células tumorales en sangre en pacientes de rhabdomyosarcoma. Esta detección precoz no está bien resuelta actualmente y puede ayudar a una detección precoz y a mejorar las tasas de supervivencia. Además, el proyecto ha permitido establecer las bases para consolidar colaboraciones con dos empresas biotecnológicas para desarrollar nuevos compuestos con potencial aplicabilidad clínica (inhibidores de ITGA9 y ligandos de Hedgehog), así como estudiar la aplicabilidad de compuestos ya existentes, como

los inhibidores de Notch (DAPT y GSI-XXI). Se han firmado dos contratos de colaboración con dos empresas (BCN-peptides e Iproteos) para desarrollar estos compuestos de cara a una posible patente y desarrollo de los productos a corto plazo. Los contratos están depositados en el Institut de Recerca Vall d'Hebron y a disposición de quien desee consultarlos. El interés demostrado por parte de la empresa privada en estos hallazgos constituye una buena prueba del potencial que pueden entrañar los descubrimientos derivados de este proyecto y nos anima a seguir con estas líneas de investigación, con nuevas líneas de financiación que ya hemos podido obtener y que esperamos poder aumentar en el futuro, en buena medida gracias a la ayuda que recibimos de la Fundació La Marató de TV3 hace tan solo 3 años.

#### 4. Bibliografía científica generada

##### **Publicaciones directamente derivadas**

Roma J, Almazán-Moga A, Sánchez de Toledo J, Gallego S.

*Notch, Wnt and Hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network.*

Sarcoma. 2012;695603.

Masià A, Almazán-Moga A, Velasco P, Reventós J, Torán N, Sánchez de Toledo J, Roma J, Gallego S.

*Notch-mediated induction of N-cadherin and  $\alpha 9$ -integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells.*

Br J Cancer. 2012 Oct 9;107(8):1374-83.

Almazán-Moga A, Roma J, Molist C, Vidal I, Jubierre L, Soriano A, Segura MF, de Toledo JS, Gallego S.

*Optimization of rhabdomyosarcoma disseminated disease assessment by flow cytometry.* Cytometry Part A. 2014 Dec;85(12):1020-9.

Manuscrito en preparaci3n:

Almaz3n-Moga A, Nitzki F, Velasco P, Molist C, Giralt I, Vidal I, Segura MF, Soriano A, Jubierre L, Navarro S, Martinez-Tirado O, Ferreres JC, Santamaría A, Rota R, Hahn H, Sánchez de Toledo J, Roma J, Gallego S.

*Ligand-dependent Hedgehog pathway activation in RMS: the oncogenic role of the ligands.*

Para ser sometida a Dev Cell.

En los tres casos, en el apartado de agradecimientos se menciona explícitamente a la Fundaci3 Marató de TV3 como "grant support".

### *Review Article*

## **Notch, Wnt, and Hedgehog Pathways in Rhabdomyosarcoma: From Single Pathways to an Integrated Network**

**Josep Roma,<sup>1</sup> Anna Almaz3n-Moga,<sup>1</sup> Josep Sánchez de Toledo,<sup>1,2</sup> and Soledad Gallego<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratori de Recerca Translacional en el Càncer Pediàtric, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg Vall d'Hebron 119-129 08035, Spain*

<sup>2</sup> *Departament d'Oncologia i Hematologia Pediàtriques, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg Vall d'Hebron 119-129 08035, Spain*

Correspondence should be addressed to Soledad Gallego, sgallego@vhebron.net

Received 14 October 2011; Revised 23 December 2011; Accepted 3 January 2012

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Christine O'Hara for help with the English version of this manuscript. This work was supported in part by grants from the Institut Català d'Oncologia, **Fundaci3 Marató de TV3**, the Instituto de Salud Carlos III, the Asociaci3n Espaõola contra el Càncer, FADAM, and the Rotary Club Cerdanyola.



Full Paper

Notch-mediated induction of N-cadherin and  $\alpha 9$ -integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells

A Masià<sup>1</sup>, A Almazán-Moga<sup>1</sup>, P Velasco<sup>2</sup>, J Reventós<sup>1</sup>, N Torán<sup>3</sup>, J Sánchez de Toledo<sup>2</sup>, J Roma<sup>3,1</sup> and S Gallego<sup>3,1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Unit in Biomedicine and Translational and Pediatric Oncology, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119, Barcelona 08035, Spain; <sup>2</sup>Pediatric Oncology and Hematology Unit, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Department of Pathology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ms Marta Rebull and Mr Isaac Vidal for laboratory technical support, Ms Marta Valeri for technical support with the *in vivo* wound-healing assay and confocal microscopy, Ms Paqui Gallego for technical support with the real-time PCR assays, Mr Ricardo Gonzalo for cDNA microarrays hybridisation and Ms Christine O'Hara for help with the English version of this manuscript. This work was supported by grants from Institut Català d'Oncologia (ICO), Instituto de Salud Carlos III (RD06/0020/1021 and PI11/00740), Fundació la Marató de TV3, Asociación Española Contra el Cáncer, Fundació SMALL and Fundació A. BOSCH.



Optimization of Rhabdomyosarcoma Disseminated Disease Assessment by Flow Cytometry

Ana Almazán-Moga,<sup>1†</sup> Josep Roma,<sup>1†\*</sup> Carla Molist,<sup>1</sup> Isaac Vidal,<sup>1</sup> Luz Jubierre,<sup>1</sup> Aroa Soriano,<sup>1</sup> Miguel Francisco Segura,<sup>1</sup> Anna Llorc,<sup>2</sup> Josep Sánchez de Toledo,<sup>1,2</sup> Soledad Gallego<sup>1,2\*</sup>

<sup>†</sup>Laboratory of Translational Research in Pediatric Cancer, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

<sup>†</sup>Pediatric Oncology and Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 14 April 2014; Revised 16 June 2014; Accepted 8 July 2014

Grant sponsor: Institut Català d'Oncologia (ICO), Instituto de Salud Carlos III (RTIC); Grant number: RD12/0038/0016; Grant sponsor: Fondo de Investigación Sanitaria FIS; Grant number: PI11/00740; Grant sponsors: Fundació la Marató de TV3, Asociación Española Contra el Cáncer, Fundació Amics Joan petit.

• Abstract

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common type of soft tissue sarcoma in children. Circulating tumor cells in peripheral blood or disseminated to bone marrow, a concept commonly referred to as minimal residual disease (MRD), are thought to be key to the prediction of metastasis and treatment efficacy. To date, two MRD markers, MYOD and MYOGENIN, have been tested; however, MRD detection continues to be challenging mainly owing to the closeness of the detection limit and the discordance of both markers in some samples. Therefore, the addition of a third marker could be useful for more accurate MRD assessment. The PAX3 gene is expressed during embryo development in all myogenic precursor cells in the dermomyotome. As RMS cells are thought to originate from these muscle precursor cells, they are expected to be positive for PAX3. In this study, PAX3 expression was characterized in cancer cell lines and tumors, showing wide expression in RMS. Detection sensitivities by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) of the previously proposed markers, MYOD and MYOGENIN, were similar to that of PAX3, thereby indicating the feasibility of its detection. Interestingly, the flow cytometry experiments supported the usefulness of this technique in the quantification of MRD in RMS using PAX3 as a marker. These results indicate that flow cytometry, albeit in some cases slightly less sensitive, can be considered a good approach for MRD assessment in RMS and more consistent than qPCR, especially owing to its greater specificity. Further-

Otras publicaciones relacionadas

Gallego S, Roma J, Sánchez de Toledo J.

*Molecular genetics of rhabdomyosarcoma. Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John

Wiley & Sons, Ltd: Chichester. (February 2012).



Soriano A, Jubierre L, Almazán-Moga A, Molist C, Roma J, de Toledo JS, Gallego S, Segura MF.

*microRNAs as pharmacological targets in cancer.*

Pharmacological Research.

Huertas-Martínez J, Rello-Varona S, Barrau I, Herrero- Martín D, García-Monclús S, Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Núñez-Álvarez Y, Mateo-Lozano S, Mora J, Roma J, Toran N, Moran S, López-Alemanly R, Gallego S, Esteller M, Peinado MA, Garca del Muro X, Tirado OM.

*Caveolin-1 is down-regulated in alveolar rhabdomyosarcomas and negatively regulates tumor growth.*

Oncotarget. 2014 Oct 30;5(20):9744-55.