



Evaluación de las adhesiones focales como nueva diana terapéutica en leucemia mieloide aguda

Dr. Jordi Sierra Gil

IRHSP Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Dr. Miguel Ángel Sanz Alonso

Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe
Hospital Universitari La Fe. València

Dr. Marcos González Díaz

Hospital Universitario de Salamanca (SACYL)





1. Introducción

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una proliferación neoplásica de células inmaduras (mieloblastos) que proceden de un progenitor hematopoyético lesionado con capacidad de maduración alterada. Debido a su proliferación excesiva, los mieloblastos desplazan las células hematopoyéticas normales y generan insuficiencia medular. Adicionalmente, las células leucémicas pueden infiltrar tejidos extramedulares.

En las dos últimas décadas se ha profundizado en el conocimiento de las características biológicas de la LMA, particularmente en aspectos citogenéticos y moleculares. A pesar de ello, el tratamiento, a excepción del de la leucemia promielocítica aguda, no ha cambiado de forma sustancial y la mayoría de pacientes acaban muriendo a causa de su enfermedad. Aproximadamente un 70-80% de los pacientes entran en remisión completa con quimioterapia intensiva de inducción. Lamentablemente, entre el 30% y 80%, dependiendo de la edad y la citogenética, presentan recidivas leucémicas casi siempre en médula ósea. El nivel de toxicidad aceptable en la poliquimioterapia actual ha llegado a su umbral, por lo que son necesarias nuevas estrategias terapéuticas menos tóxicas que permitan mejorar la supervivencia de los pacientes.

En la LMA, los hallazgos en la caracterización molecular cuentan con un creciente significado pronóstico. A pesar de que se han detectado diferentes alteraciones que se asocian a diferente comportamiento evolutivo, la capacidad de predicción es todavía insuficiente. Por este motivo, el conocimiento más profundo sobre la fisiopatología molecular de la LMA puede identificar nuevos marcadores y descubrir nuevas dianas terapéuticas. En la LMA, la señalización a través de integrinas y receptores de citocinas es esencial para la supervivencia de las células leucémicas y su sobreexpresión se relaciona con mal pronóstico.

La activación de ambos tipos de receptores induce la señalización a través de la vía de las adhesiones focales. Los objetivos principales de este proyecto son la evaluación del valor pronóstico de la expresión de las proteínas de las adhesiones focales en LMA y el desarrollo preclínico de un nuevo inhibidor de la señalización a través de las adhesiones focales, el compuesto E7123.

Objetivos

1. Evaluar el efecto y el mecanismo de acción del E7123, un nuevo derivado pirazolónico, *in vitro* e *in vivo*, en un nuevo modelo murino de leucemia mieloide aguda (LMA).
 - a) Evaluar la alteración de la señalización a través de las adhesiones focales producido por el E7123 *in vitro* en células humanas de LMA.
 - b) Determinar el efecto antitumoral *in vitro* de la exposición de células de LMA al E7123 con Ara-C, Daunorrubicina e Idarubicina o a la combinación de estos fármacos.
 - c) Analizar el efecto de la sobreexpresión de proteínas de las adhesiones focales en el efecto antitumoral del E7123.
 - d) Establecer un nuevo modelo animal de LMA en ratones NOD/SCID y evaluar el efecto antitumoral y la toxicidad del E7123 *in vivo*.
 - e) Evaluación del efecto de la sobreexpresión de las proteínas de las adhesiones focales en el efecto antitumoral del E7123 *in vivo*.
2. Determinar el valor pronóstico de la expresión de las proteínas de las adhesiones focales FAK, Pyk2, p130Cas, Hef-1, Src y Lyn en muestras de médula ósea de pacientes de LMA.

2. Resultados

Evaluación del efecto y mecanismo de acción del compuesto E7123 en líneas celulares de LMA. Hemos demostrado la implicación de las adhesiones focales en

el mecanismo de acción antitumoral del E7123, un nuevo compuesto pirazolónico patentado por nuestro grupo. Este compuesto induce la muerte de las células de LMA a través de la inhibición de las adhesiones focales (FAK, p130Cas, Lyn, Paxillin). También hemos demostrado que el E7123 induce la proteólisis de p130Cas, generando un fragmento de 31kDa que es translocado al núcleo, donde se ha descrito que regula la transcripción génica. Por otro lado, hemos evaluado el efecto antitumoral del E7123 en combinación con distintos fármacos quimioterápicos utilizados actualmente en clínica (Ara-C, Idarubicina y Daunorrubicina), observando que todas las combinaciones tienen efecto aditivo. Esto implica que el E7123 y los compuestos con los que lo hemos combinado actúan por vías de señalización distintas y que, por tanto, su combinación *in vivo* podría mejorar la actividad antitumoral.

Efecto de la sobreexpresión de las proteínas de las adhesiones focales. En este proyecto hemos generado diferentes líneas celulares que sobreexpresan las proteínas FAK o p130Cas y hemos evaluado su papel en el comportamiento celular. Hemos podido demostrar que la sobreexpresión de FAK y p130Cas aumenta la proliferación celular en líneas de LMA. Además, la sobreexpresión de FAK también revierte en parte el efecto antitumoral *in vitro* del Ara-C. Por otro lado, en ensayos *in vivo* también hemos podido observar que la sobreexpresión de FAK aumenta significativamente la diseminación de las células leucémicas, en médula ósea y bazo, tal como demuestra el aumento de los niveles de bioluminiscencia. A pesar de ello, este aumento no se traduce en una alteración del tiempo de supervivencia de los animales.

Resultados con modelos animales. Durante este proyecto hemos puesto a punto un nuevo modelo animal de LMA para la evaluación de nuevos fármacos antitumorales. Se han realizado diferentes experimentos utilizando diversas líneas celulares, técnicas de inyección y cepas de ratón. Finalmente, hemos concluido que la inyección en médula ósea de ratones inmunodeprimidos NSG de la línea de LMA THP-1 genera un modelo animal con el patrón de diseminación similar al que se

observa en pacientes (figura 1A). Este modelo produce un 100% de tasa de injerto y un tiempo de supervivencia muy similar en todos los animales. Además, las líneas inyectadas tienen bioluminiscencia y, por tanto, es posible el seguimiento *in vivo* de la diseminación de las células leucémicas, facilitando así el estudio del efecto de compuestos antitumorales. Se ha demostrado que en este modelo el tratamiento con Ara-C disminuye la diseminación de las células y aumenta significativamente la supervivencia de los animales (figura 1B). Una vez puesto a punto el modelo, se realizaron diferentes ensayos *in vivo* para evaluar el efecto antitumoral del nuevo compuesto E7123. En todos los experimentos realizados pudo observarse cómo el compuesto disminuía significativamente la diseminación de las células leucémicas mediante el seguimiento de la bioluminiscencia (figura 1B). A pesar de ello, no observamos un aumento significativo de la supervivencia de los animales. Creemos que esto puede ser debido a que el modelo utilizado es muy agresivo, siendo el tiempo de supervivencia de los animales demasiado corto, circunstancia que no permite administrarles un número suficiente de dosis para poder tener un impacto en su supervivencia. Actualmente estamos poniendo a punto nuevos modelos animales con un mayor tiempo de supervivencia, con los que esperamos demostrar un efecto del compuesto E7123 en la supervivencia a parte del ya observado en relación con la inhibición de la diseminación leucémica.

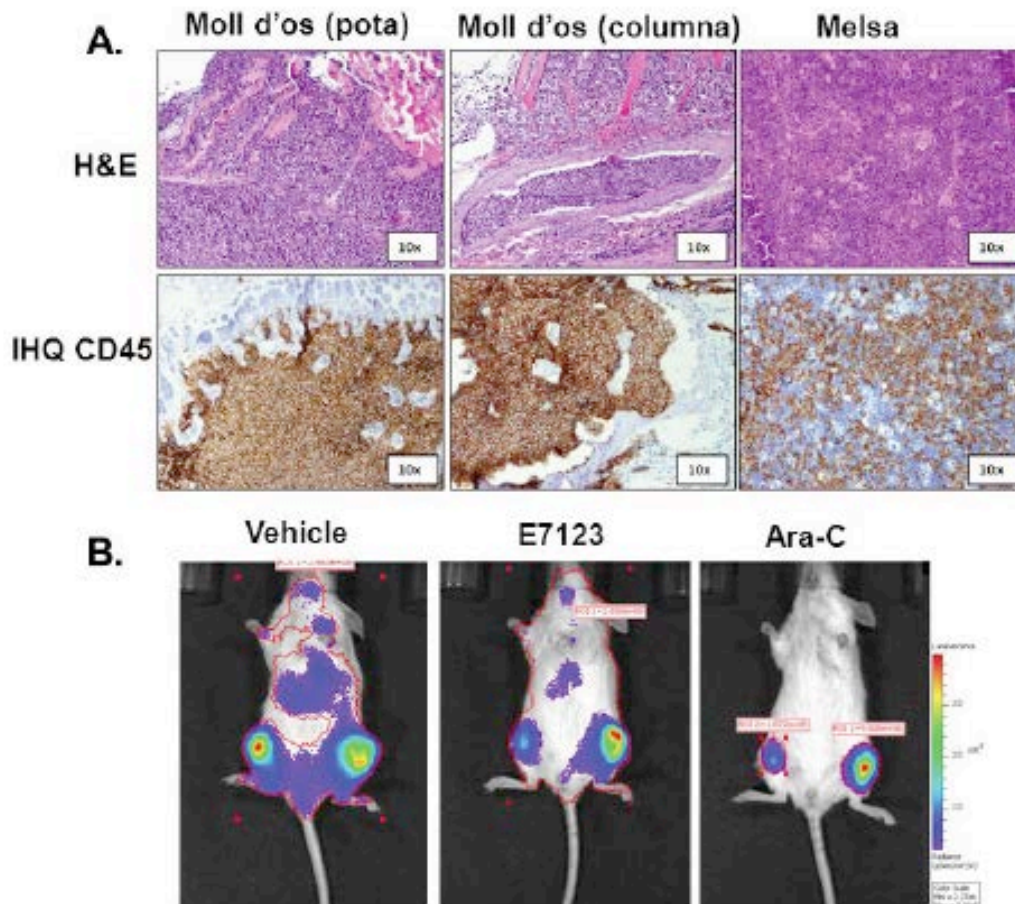


Figura 1. Modelo animal de LMA. **A)** Imagen de H&E e IHQ de CD45 de médula ósea y bazo mostrando la infiltración de células leucémicas. **B)** Imagen representativa de los niveles de bioluminiscencia de los ratones del grupo control, E7123 y Ara-C, tras 9 días de iniciarse el tratamiento. Pude observarse que el tratamiento con E7123 o con Ara-C disminuye la diseminación de células leucémicas.

Evaluación de la expresión de los genes de las adhesiones focales en muestras de médula ósea de pacientes de LMA. Esta parte del proyecto se ha llevado a cabo en tres hospitales: Hospital de Sant Pau (Barcelona), Hospital La Fe (Valencia) y Hospital Universitario (Salamanca). Entre los tres centros se han evaluado un total de 365 muestras de pacientes de LMA de pronóstico intermedio. El estudio se ha centrado en este subgrupo de pacientes, ya que es donde resulta más necesario el establecimiento de nuevos factores pronósticos, debido a que incluye pacientes con una evolución clínica muy diversa. En todos ellos se ha evaluado la expresión de los siguientes genes implicados en la señalización a través de las adhesiones focales: FAK, Pyk2, p130Cas, Hef-1, Src y Lyn. Con los

resultados obtenidos se ha calculado el valor pronóstico de todos ellos respecto a la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad y la tasa de recidiva (figura 2). Tanto las curvas de supervivencia (Kaplan Meier) como otros análisis univariante muestran que la sobreexpresión de Pyk2, Hef-1 o Lyn aumenta significativamente la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes de LMA de pronóstico intermedio. Además, los pacientes con sobreexpresión de Pyk2 o Hef-1 presentan una menor tasa de recidiva. Se realizaron también análisis univariante de las principales variables de evolución clínica de los pacientes y se observó que en todos los casos (supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y tasa de recidiva) la edad (<50 años vs. >50 años) y las mutaciones de FLT3+NPM (FLT3wt+NPMmut vs. otras combinaciones) fueron características significativas. Al realizar los análisis multivariante, incluyendo las variables significativas en los análisis univariante, pudimos concluir que tanto para la supervivencia global como para la supervivencia libre de enfermedad, las variables edad, mutaciones FLT3+NPM (FLT3wt+NPMmut vs. otras combinaciones) y la sobreexpresión de Hef-1 se mantenían como factores pronósticos independientes. En cambio, en el análisis multivariante de la tasa de recidiva, fueron valores pronóstico independientes la edad, la mutación FLT3+NPM y la sobreexpresión de Pyk2. Es interesante señalar que de las tres familias de proteínas de las adhesiones focales estudiadas (FAK, Cas y Src), hemos identificado un miembro de cada una de ellas como nuevo factor de buen pronóstico en los pacientes de LMA de pronóstico intermedio. Así, de los dos miembros de la familia FAK estudiados (FAK y Pyk2), solo Pyk2 es factor pronóstico en los pacientes de LMA, mientras que FAK no lo es. De la familia Cas, hemos evaluado los genes p130Cas y Hef-1 y hemos visto que solo Hef-1 posee valor pronóstico. Finalmente, de la familia Src, se han evaluado los genes Src y Lyn y solo Lyn cuenta con valor pronóstico. Así, podemos concluir que mientras que las tres familias tienen valor pronóstico, solo un miembro de cada familia se identifica como marcador pronóstico.

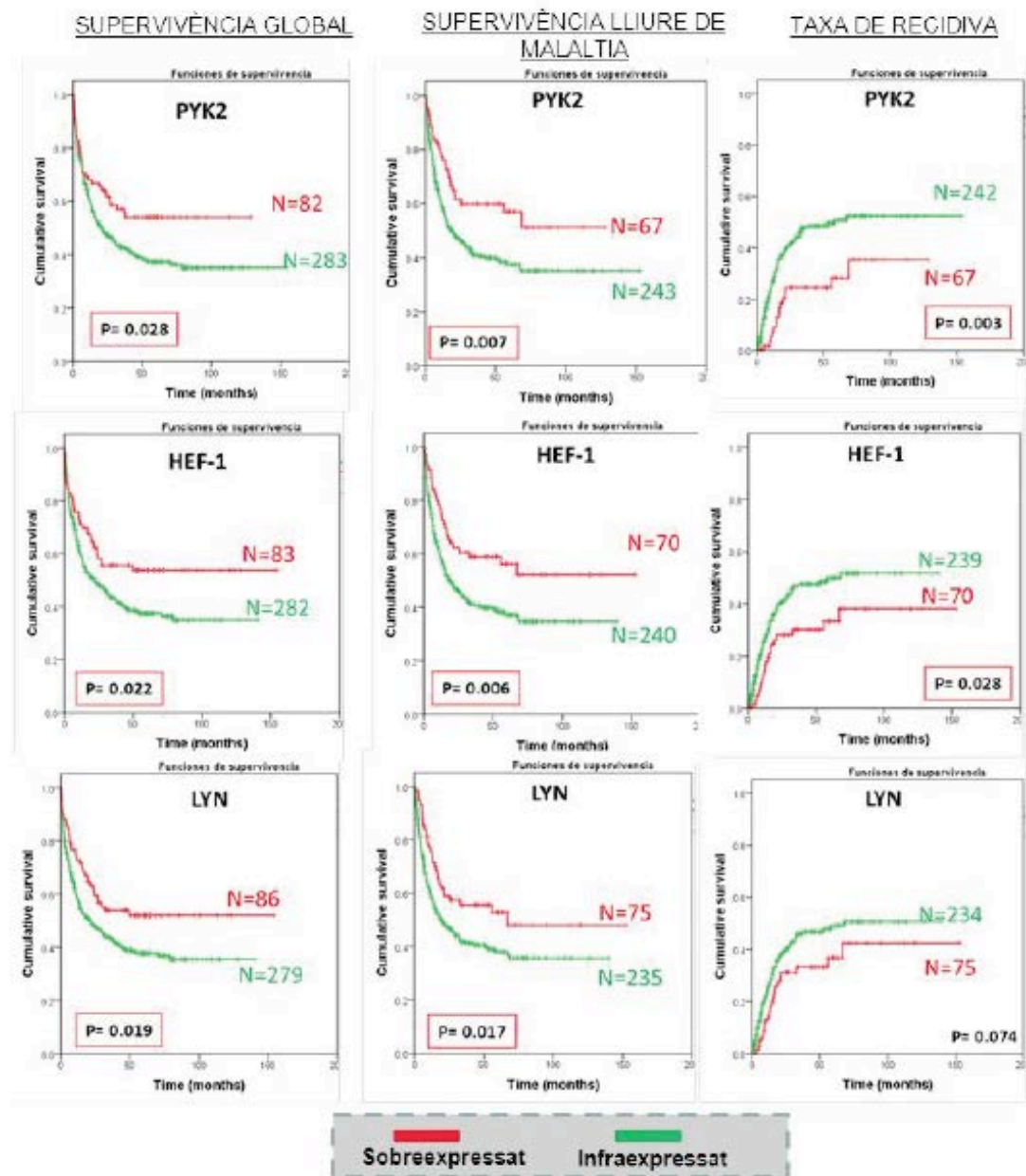


Figura 2. Curvas de supervivència (Kaplan Meier) para la supervivència global, supervivència lliure de enfermedad y tasa de recidiva para algunos genes que han mostrado valor pronóstico (Pyk2, Hef-1 y Lyn). Los valores de p se han calculado con el test de Log Rank.

3. Relevancia y posibles implicaciones

Los resultados obtenidos pueden tener repercusiones clínicas principalmente por dos motivos:

a) Demostración de la actividad antitumoral del E7123. Con los resultados obtenidos hasta el momento en el presente proyecto todavía no podemos concluir si el nuevo compuesto E7123 podría en un futuro utilizarse en clínica. Existen dos datos que nos indican que puede haber interés en seguir estudiando este compuesto. Por una parte, se ha demostrado que la combinación del E7123 con algunos de los compuestos que se utilizan actualmente en clínica tendría un efecto aditivo y que, por tanto, podría mejorar la respuesta de los pacientes. A pesar de ello, los datos obtenidos *in vitro* deberían validarse *in vivo* para poder valorar la relevancia clínica de estas observaciones.

Que hayamos observado un efecto aditivo nos indica que el E7123 tiene un mecanismo de acción diferente al de los quimioterápicos clásicos (Ara-C, Idarubicina, Daunorrubicina) y que, por tanto, actuaría sobre vías de señalización alternativas.

Por otra parte, de todos los ensayos realizados para evaluar el efecto antitumoral del E7123 *in vivo*, hemos podido concluir que este compuesto es capaz de disminuir la diseminación de las células leucémicas, tal y como se ha observado en el seguimiento por bioluminiscencia. Por el contrario, no hemos podido demostrar todavía que este compuesto pueda aumentar significativamente la supervivencia *in vivo*, que es lo que sería necesario para seguir desarrollando el compuesto. Creemos que uno de los posibles motivos podría ser que el modelo animal utilizado es demasiado agresivo, ya que la supervivencia de los animales es solo de aproximadamente dos semanas. Estamos considerando en estos momentos la evaluación de este compuesto en nuevos modelos que estamos desarrollando con otras líneas celulares menos agresivas que permitan administrar el fármaco durante más tiempo para observar si tiene o no efecto sobre la supervivencia. Se precisan más resultados para poder valorar la relevancia clínica de este estudio y las posibilidades de que el compuesto E7123 pueda acabar entrando en ensayos clínicos.

b) Identificación de nuevos factores pronósticos en pacientes de LMA de pronóstico intermedio. Los resultados obtenidos en la evaluación de la expresión de los 6 genes de las adhesiones focales podrían tener una repercusión clínica relevante. Hemos analizado el valor pronóstico de los genes FAK, Pyk2, p130Cas, Hef-1, Src y Lyn en pacientes de LMA de pronóstico intermedio. Este subgrupo de pacientes no se identifica por tener ninguna alteración molecular concreta, sino que incluye a todos aquellos pacientes sin los marcadores que identifican a los pacientes de buen y mal pronóstico. Por tanto, a pesar de que se han identificado algunos marcadores moleculares pronósticos, el grupo de pacientes de pronóstico intermedio todavía incluye a pacientes muy diversos, con distintas características clínicas y que a nivel individual presentan una respuesta y supervivencia muy distinta. Por este motivo, existe una importante necesidad clínica de encontrar nuevos marcadores que ayuden a diferenciar a aquellos pacientes que necesitan una terapia más agresiva de los que poseen mejor pronóstico y pueden responder con un tratamiento menos intensivo. En este estudio hemos identificado un grupo de pacientes que tendrían un pronóstico más favorable: son aquellos que presentan sobreexpresión de los genes Pyk2, Hef-1 o Lyn. La sobreexpresión de estos tres genes se asocia a una mayor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad. La sobreexpresión de Pyk2 o Hef-1 también está asociada a una menor tasa de recidiva. Estos factores podrían ayudar a mejorar el pronóstico de los pacientes de LMA identificando aquellos de pronóstico intermedio que mejor vayan a responder a la terapia.

Los resultados obtenidos concuerdan con que estas tres proteínas (Pyk2, Hef-1 y Lyn) están implicadas en la regulación de la migración y adhesión de las células hematopoyéticas normales. En estos momentos es necesario validar los resultados obtenidos en una serie independiente de pacientes de LMA para confirmar tales conclusiones. Por este motivo uno de nuestros próximos objetivos es conseguir muestras de pacientes de otro centro para realizar esta validación independiente.

4. Bibliografía científica generada

Hoyos M, Nomdedeu JF, Esteve J, Duarte R, Ribera JM, Llorente A, Escoda L, Bueno J, Tormo M, Gallardo D, de Llano MP, Martí JM, Aventín A, Mangués R, Brunet S, Sierra J.

Core binding factor acute myeloid leukemia: the impact of age, leukocyte count, molecular findings, and minimal residual disease.

Eur J Haematol. 2013 Sep;91(3):209-18.

doi: 10.1111/ejh.12130. Epub 2013 Jul 25. PubMed PMID: 23646898.

Nomdedéu JF, Hoyos M, Carricondo M, Bussaglia E, Estivill C, Esteve J, Tormo M, Duarte R, Salamero O, de Llano MP, García A, Bargay J, Heras I, Martí-Tutusa JM, Llorente A, Ribera JM, Gallardo D, Aventin A, Brunet S, Sierra J; CETLAM Group.

Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML.

Leukemia. 2013 Nov;27(11):2157-64.

doi: 10.1038/leu.2013.111. Epub 2013 Apr 15. PubMed PMID: 23584566.

Nomdedéu J, Hoyos M, Carricondo M, Esteve J, Bussaglia E, Estivill C, Ribera JM, Duarte R, Salamero O, Gallardo D, Pedro C, Aventin A, Brunet S, Sierra J.

Adverse impact of IDH1 and IDH2 mutations in primary AML: experience of the Spanish CETLAM group.

Leuk Res. 2012 Aug;36(8):990-7.

doi: 10.1016/j.leukres.2012.03.019. Epub 2012 Apr 19. PubMed PMID: 22520341.