

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Tesis Doctoral

**EL PAPEL ONCOGÉNICO DEL CORRECEPTOR CDO EN EL
RABDOMIOSARCOMA:
UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA CONTRA LA VÍA HEDGEHOG
Caracterización preclínica de un nuevo compuesto anti-CDO**

Patricia Zarzosa Martínez

Tutor:

Dr. José Ramón Bayascas Ramírez

Directores:

Dra. Soledad Gallego Melcón

Dr. Josep Roma Castanyer

Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Departamento de Bioquímica i Biología Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

2021

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

El rhabdomioma (RMS) es el sarcoma de partes blandas más común en la infancia. Está constituido por un grupo muy heterogéneo de tumores malignos de origen mesenquimal que recapitulan características fenotípicas y biológicas del músculo esquelético embrionario. Los avances en la caracterización molecular han permitido la estratificación de estos tumores en dos grupos con alta repercusión pronóstica, divididos en función de la presencia –RMS fusión positivos (RMS-FP)– o ausencia –RMS fusión negativos (RMS-FN)– de dos translocaciones específicas entre los genes *PAX3* o *PAX7* y el gen *FOXO1* asociadas a una mayor agresividad. Siendo la variante *PAX3-FOXO1* la de peor pronóstico. El tratamiento actual de los pacientes de alto riesgo incluye una agresiva estrategia multimodal de quimioterapia, cirugía y radioterapia. Sin embargo, las tasas de mortalidad de este grupo no han mejorado durante décadas y se mantienen alrededor del 75%. En consecuencia, el desarrollo de terapias dirigidas podría mejorar no sólo la supervivencia de este grupo, sino también las toxicidades asociadas al tratamiento de todos los pacientes.

La vía de señalización del desarrollo embrionario Hedgehog (Hh) ha sido involucrada tanto en el origen como en la agresividad del RMS, por lo que constituye una atractiva diana molecular en esta neoplasia. Nuestro grupo fue el primero en relacionar la activación aberrante de la vía con la sobreexpresión de los ligandos Hh, estableciendo un modelo de activación de la vía Hh ligando-dependiente en el RMS. La activación de la vía estándar implica la unión del ligando al receptor Patched (PTCH), permitiendo la activación de Smoothed (SMO) y la posterior activación de las proteínas Gli (GLI1-3), los principales efectores de la vía. Sin embargo, existen otros correceptores (BOC y CDO) que también pueden unirse a los ligandos y parecen ser necesarios para la activación completa de la señalización. Los inhibidores Hh desarrollados en la clínica actúan inhibiendo SMO y sólo han demostrado eficacia en tumores con activación de la vía independiente de ligando. El objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de una estrategia de inhibición de la vía Hh con potencial terapéutico en el RMS. Con este propósito, se han desarrollado dos planteamientos diferentes: [1] La inhibición de la unión de los ligandos Hh con el receptor PTCH y [2] La caracterización molecular

RESUMEN

de los correceptores BOC y CDO y su inhibición como posible nueva estrategia terapéutica.

La filosofía general de esta tesis reside en completar el estudio molecular con una perspectiva traslacional, pretendiendo abordar no sólo el impasse en la supervivencia, sino también los inconvenientes asociados a las terapias actuales. Los resultados más relevantes presentados en esta tesis incluyen la identificación de CDO como una nueva diana molecular con un potencial anti-oncogénico excepcional y el desarrollo y la evaluación preclínica de un nuevo compuesto experimental (SLT-0436) –actualmente en fases nacionales en USA, UE y Japón–, como posible terapia dirigida contra el RMS. Concretamente, la inhibición de CDO compromete la viabilidad e induce la apoptosis y la diferenciación de las células de RMS, de manera acentuada en el subtipo de RMS más agresivo, *PAX3-FOXO1*. Adicionalmente, hemos vinculado la inhibición de CDO con el factor de transcripción GLI3, suscitando su posible implicación en la oncogenicidad del RMS y proponiendo su estudio como una nueva diana molecular con potencial terapéutico.

En resumen, en esta tesis se describe por primera vez el papel oncogénico del correceptor CDO en RMS, posicionándolo como una prometedora diana terapéutica contra la vía Hh, no sólo en el RMS, sino también en otros tumores con activación ligando dependiente de esta vía.

ÍNDICE

| <u>Contenido</u> | <u>Páginas</u> |
|--|----------------|
| ABREVIATURAS | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 19 |
| 1. Rabdomyosarcoma (RMS) | 23 |
| 1.1. Clasificación y características histológicas | 23 |
| 1.1.1. RMS embrionario | 26 |
| 1.1.2. RMS alveolar | 26 |
| 1.1.3. RMS fusiforme/esclerosante | 26 |
| 1.1.4. RMS pleomórfico | 27 |
| 1.2. Clasificación y características moleculares | 28 |
| 1.2.1. RMS fusión positivos | 29 |
| 1.2.2. RMS fusión negativos | 34 |
| 1.3. Célula de origen | 37 |
| 1.3.1. Histogénesis del músculo | 37 |
| 1.4. Demografía | 40 |
| 1.5. Etiología | 41 |
| 1.5.1. Predisposición genética | 41 |
| 1.5.2. Factores de riesgo clínico-ambientales | 42 |
| 1.6. Presentación clínica | 43 |
| 1.7. Diagnóstico | 43 |
| 1.8. Estratificación del RMS: estadiaje y factores pronósticos | 45 |
| 1.9. Tratamiento y supervivencia | 49 |
| 2. Vía de señalización Hedgehog | 52 |
| 2.1. Evolución y componentes de la vía en mamíferos | 53 |
| 2.1.1. Ligandos Hh | 54 |
| 2.1.2. Mediadores de la señalización Hh de membrana | 57 |
| 2.1.3. Reguladores citoplasmáticos Hh | 61 |
| 2.1.4. Factores de transcripción Hh | 62 |
| 2.1.5. Genes diana Hh | 65 |
| 2.2. Mecanismo de acción | 67 |

ÍNDICE

| | | |
|-----------------------------|--|-----|
| 2.2.1. | Vía Hh canónica | 67 |
| 2.2.2. | Vía Hh no canónica | 71 |
| 2.3. | Señalización Hh en cáncer | 73 |
| 2.3.1. | Modelos de activación aberrante de la vía Hh en cáncer | 75 |
| 2.3.2. | Los componentes de la vía Hh en cáncer | 81 |
| 2.3.3. | Señalización Hh en el RMS..... | 84 |
| 2.4. | Inhibidores de la señalización Hh | 87 |
| 2.4.1. | Inhibidores de SMO | 88 |
| 2.4.2. | Inhibidores de la interacción HH-PTCH | 89 |
| 2.4.3. | Inhibidores de los factores de transcripción GLI | 90 |
| 2.5. | Inhibición de la vía Hh en el RMS | 92 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | | 95 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | | 101 |
| 1. | Muestras tumorales humanas..... | 103 |
| 2. | Cultivos celulares..... | 103 |
| 2.1. | Subcultivo celular | 104 |
| 2.2. | Criopreservación y descongelación de líneas celulares | 105 |
| 2.3. | Recuento celular | 105 |
| 3. | Tratamientos celulares | 106 |
| 3.1. | Inhibidores peptidomiméticos | 106 |
| 3.2. | Quimioteca privada de IUCT..... | 106 |
| 3.3. | Inhibidores de referencia de la vía Hh..... | 106 |
| 3.4. | Antibióticos de selección | 107 |
| 4. | Inhibición genética mediante shRNA | 107 |
| 4.1. | Transfección y producción lentiviral..... | 109 |
| 4.2. | Infección de las células diana | 111 |
| 5. | Ensayos de proliferación y/o viabilidad celular | 113 |
| 5.1. | WST-1 | 113 |
| 5.2. | Cristal violeta | 113 |
| 5.3. | Recuento de células..... | 114 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6. | Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR | 114 |
| 6.1. | Preparación de las muestras | 114 |
| 6.2. | Extracción y purificación del ARN | 115 |
| 6.3. | Retrotranscripción del ARN | 115 |
| 6.4. | Cuantificación mediante RT-qPCR | 116 |
| 7. | Análisis de bases de datos de pacientes | 117 |
| 8. | Análisis de la expresión proteica por Western blot | 118 |
| 8.1. | Extracción de proteínas | 119 |
| 8.2. | Cuantificación de proteínas | 119 |
| 8.3. | Preparación de las muestras | 120 |
| 8.4. | Electroforesis SDS-PAGE | 120 |
| 8.5. | Electrotransferencia | 121 |
| 8.6. | Detección de proteínas | 121 |
| 9. | Modelos <i>in vivo</i> | 124 |
| 9.1. | Modelo tumoral con infraregulación genética de CDO | 124 |
| 9.2. | Modelo tumoral con tratamiento del compuesto SLT-0463 | 125 |
| 10. | Representación tridimensional de la estructura de CDO | 126 |
| 11. | Cribado <i>in silico</i> de moléculas experimentales | 126 |
| 12. | Representación tridimensional de la estructura del compuesto SLT-0463 | 127 |
| 13. | Análisis del ciclo celular | 128 |
| 13.1. | Fijación de las células | 129 |
| 13.2. | Tinción del ADN | 129 |
| 13.3. | Determinación por citometría de flujo | 129 |
| 14. | Análisis de la apoptosis | 130 |
| 15. | Ensayo de formación de colonias | 132 |
| 16. | Ensayo de invasión celular | 132 |
| 17. | Análisis estadístico | 134 |
| | RESULTADOS | 135 |
| 1. | La estrategia de inhibición peptidomimética no muestra un efecto antioncogénico relevante | 137 |

ÍNDICE

| | | |
|-----------------|--|-----|
| 2. | CDO es el correceptor Hh predominante en líneas celulares y tumores de RMS . | 141 |
| 3. | La depleción genética de BOC tiene un efecto leve en la proliferación de las células de RMS <i>in vitro</i> | 145 |
| 4. | La depleción genética de CDO reduce los niveles de GLI3 y compromete la proliferación de las células de RMS | 146 |
| 4.1. | La inhibición de CDO compromete drásticamente la proliferación celular <i>in vitro</i> | 146 |
| 4.2. | La inhibición de CDO reduce los niveles del efector de la vía Hh más expresado en RMS, GLI3 | 148 |
| 4.3. | La inhibición genética de CDO reduce el crecimiento tumoral del RMS <i>in vivo</i> | 151 |
| 5. | El compuesto priorizado por su probabilidad de interacción con CDO (SLT-0463) mejora la potencia antiproliferativa de los inhibidores de referencia de la vía Hh <i>in vitro</i> | 153 |
| 6. | El tratamiento con el compuesto SLT-0463 recapitula los efectos de la inhibición genética de CDO. | 159 |
| 6.1. | El compuesto SLT-0463 reduce los niveles de proteína de CDO y GLI3 | 159 |
| 6.2. | El compuesto SLT-0463 provoca el arresto del ciclo celular <i>in vitro</i> | 161 |
| 6.3. | El compuesto SLT-0463 induce la muerte celular apoptótica <i>in vitro</i> | 165 |
| 6.4. | El compuesto SLT-0463 induce la diferenciación celular <i>in vitro</i> | 169 |
| 6.5. | El compuesto SLT-0463 reduce la invasión celular <i>in vitro</i> | 173 |
| 6.6. | El compuesto SLT-0463 reduce el crecimiento tumoral ortotópico <i>in vivo</i> .. | 175 |
| 7. | La expresión de CDO es un indicador de mal pronóstico en Sarcoma de Ewing y su inhibición reduce la proliferación <i>in vitro</i> en sarcomas óseos | 177 |
| DISCUSIÓN | | 181 |
| 1. | Evaluación de la estrategia de inhibición de la vía Hh mediante el bloqueo de la interacción entre los ligandos Hh y el receptor PTCH | 183 |
| 2. | Caracterización del papel de los correceptores BOC y CDO en RMS | 184 |
| 2.1. | Determinación del perfil de expresión de BOC y CDO en RMS | 186 |
| 2.2. | El impacto de las inhibiciones genéticas de BOC y CDO en RMS | 187 |
| 3. | La implicación molecular de CDO en el RMS | 188 |
| 3.1. | Vías no canónicas de la señalización de CDO | 191 |

| | | |
|------|---|-----|
| 4. | El posible papel oncogénico de GLI3 en RMS..... | 194 |
| 5. | CDO como diana terapéutica en RMS | 195 |
| 6. | Caracterización preclínica de un nuevo compuesto anti-CDO en RMS..... | 198 |
| 6.1. | El efecto molecular de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en RMS | 199 |
| 6.2. | El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en el ciclo celular | 199 |
| 6.3. | El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en la muerte celular..... | 200 |
| 6.4. | El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en la diferenciación | 202 |
| 6.5. | El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en las capacidades de invasión y auto-renovación del RMS | 204 |
| 6.6. | El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> | 204 |
| 7. | El potencial terapéutico de la inhibición de CDO en cáncer | 206 |
| | CONCLUSIONES..... | 211 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 215 |
| | ANEXO | 269 |
| 1. | Consentimiento informado pacientes..... | 271 |
| 2. | Publicaciones | 272 |
| 3. | Patentes..... | 273 |

ABREVIATURAS

A

| | |
|-------------|---|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN complementario |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| ATO | <i>Arsenic Trioxide</i> |

B

| | |
|------------|-----------------------------|
| BCC | <i>Basal Cell Carcinoma</i> |
| BOC | <i>Brother of CDO</i> |
| BOI | <i>Brother of Ihog</i> |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> |

C

| | |
|-----------------|---|
| CASP9 | Caspasa 9 |
| CCNB1 | Ciclina B1 |
| CDO/CDON | <i>Cell Adhesion Associated, Oncogene Regulated</i> (proteína/ gen) |
| CI | <i>Cubitus Interruptus</i> |
| CK1 | <i>Casein kinase 1</i> |
| COG | <i>Children's Oncology Group</i> |
| COS2 | <i>Costal2</i> |
| CRD | <i>Cystein-Rich Domain</i> |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| Ct | <i>Cycle Threshold</i> |
| D | |
| DBD | <i>DNA-Binding Domain</i> |
| DHH | <i>Desert Hedgehog</i> |
| DISP | <i>Dispatched</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetil Sulfoxido |
| DRAL | <i>Down-Regulated in Rhabdomyosarcoma LIM protein</i> |
| DTT | Ditiotreitol |
| E | |
| EHH | <i>Echidna Hedgehog</i> |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| EpSSG | <i>European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group</i> |
| F | |
| FBS | <i>Fetal Bovine Serum</i> |
| FD | <i>forkhead domain</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FDG-PET | <i>F-fluorodeoxyglucose - Positron Emission Tomography</i> |
| FISH | <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> |
| FNIII | Fibronectina tipo III |
| FU | <i>Fused</i> |

G

| | |
|---------------|---|
| GAS1 | <i>Growth Arrest-Specific 1</i> |
| GDNF | <i>Glial Cell Derived Neurotrophic Factor</i> |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| GLI | <i>Glioma-associated oncogene</i> |
| GLI-A | GLI Activador transcripcional |
| GLI-FL | <i>GLI Full Length</i> |
| GLI-R | GLI Represor transcripcional |
| GPCR | <i>G Protein-Coupled Receptor</i> |
| GPI | <i>Glycosylphosphatidylinositol</i> |
| GSK3B | <i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i> |

H

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| HD | <i>Homeodomain</i> |
| Hh | <i>Hedgehog</i> |
| HHAT | <i>Hedgehog Acyltransferase</i> |
| HHIP | <i>Hedgehog Interacting Protein</i> |
| HPI | <i>Hedgehog Pathway Inhibitor</i> |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |

I

| | |
|---------------|--|
| ICCC-3 | <i>International Classification of Childhood Cancer, Third Edition</i> |
| ICR | <i>International Classification of Rhabdomyosarcoma</i> |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| IHH | <i>Indian Hedgehog</i> |
| IHOG | <i>Interference Hedgehog</i> |
| IMDM | <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> |
| IRSG | <i>Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group</i> |
| IUCT | Instituto Universitario de Ciencia y Tecnología |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| L | |
| LOH | <i>Loss Of Heterozygosity</i> |
| LOI | <i>Loss Of Imprinting</i> |
| M | |
| MB | Meduloblastoma |
| MEM | <i>Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts</i> |
| MMT | <i>Malignant Mesenchymal Tumor Group</i> |
| MSC | <i>Mesenchymal Stem Cells</i> |
| O | |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OS | Osteosarcoma |
| P | |
| PB | <i>Paired Box</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |

| | |
|-------------------|---|
| PDX | <i>Patient-Derived Xenograft</i> |
| PI | <i>Propidium Iodide</i> |
| PKA | <i>Protein Kinase A</i> |
| PTC / PTCH | <i>Patched</i> |
| PVDF | <i>Polyvinylidene Fluoride</i> |
| Q | |
| QHH | <i>Qiqihar Hedgehog</i> |
| R | |
| RETI-SEHOP | Registro Español de Tumores Infantiles - Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas |
| RFP | <i>Red Fluorescent Protein</i> |
| RISC | <i>RNA Induced Silencing Complex</i> |
| RM | Resonancia Magnética |
| RMS | Rabdomiosarcoma |
| RMSa | Rabdomiosarcoma alveolar |
| RMSe | Rabdomiosarcoma embrionario |
| RMS-FP | Rabdomiosarcoma fusión positivo |
| RMS-FN | Rabdomiosarcoma fusión negativo |
| RND | Resistance-Nodulation-Division |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RR | Riesgo Relativo |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| RT-PCR | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| RT-qPCR | <i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| S | |
| SDS-PAGE | <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| SE | Sarcoma de Ewing |
| SEM | <i>Standard Error of the Mean</i> |
| SHH | <i>Sonic Hedgehog</i> |
| shRNA | <i>Short hairpin RNA</i> |
| SIOP | <i>International Society of Pediatric Oncology</i> |
| siRNA | <i>Small interfering RNA</i> |
| SMO | <i>Smoothed</i> |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SNS | Sistema Nervioso Somático |
| SPF | <i>Specific Pathogen Free</i> |
| SSC | Supervivencia Sin Complicaciones |
| SSD | <i>Sterol-Sensing Domain</i> |
| SUFU | <i>Suppressor of Fused</i> |
| T | |
| TAD | <i>Transcriptional Activation Domain</i> |
| TBS-T | <i>Tris-Buffered Saline and Tween-20</i> |
| TC | Tomografía Computarizada |

| | |
|--------------|--|
| TEMED | Tetrametiletilendiamina |
| TNM | Tumor-Nódulos-Metástasis |
| TWHH | <i>Tiggywinkle Hedgehog</i> |
| U | |
| UICC | <i>International Union Against Cancer</i> |
| V | |
| VSVg | <i>Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein</i> |
| W | |
| WB | <i>Western Blot</i> |
| Z | |
| ZPA | <i>Zone of Polarizing Activity</i> |

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades con un denominador común, la presencia de células que proliferan de manera anormal y sin control, en cualquier tejido del cuerpo y que tienen potencial para invadir otros tejidos. Esta malignización de las células está asociada a alteraciones en la estructura y/o regulación genética del ácido desoxirribonucleico (ADN) que pueden ser adquiridas de manera espontánea, o de lo contrario, surgir debido a la exposición a factores carcinogénicos externos. Cuando las alteraciones genéticas ocurren en la línea germinal, éstas pueden heredarse y favorecer –o predisponer– la aparición de la enfermedad en la descendencia. Sin embargo, la mayoría de las mutaciones oncogénicas son somáticas, es decir, sólo se hallan en las células tumorales.

El cáncer infantil (0-14 años) es una enfermedad poco frecuente, representa menos del 1% de todas las neoplasias y, sin embargo, es una de las principales causas de muerte por enfermedad en niños entre 0 y 14 años en todo el mundo, especialmente en los países desarrollados. La Asociación Internacional de Registros de Cáncer, sitúa la incidencia global del cáncer infantil en 141 casos nuevos anuales por millón de niños/as menores de 15 años (1). Sin embargo, considerando las barreras diagnósticas de los sistemas de salud en los países en vías de desarrollo, se advierte que uno de cada dos niños con cáncer nunca será diagnosticado y, por ende, se estima una incidencia global del doble de la registrada en el primer estudio nombrado (2). En España, la tasa de incidencia anual es de 157 casos nuevos anuales por millón de niños/as menores de 15 años, es decir, según el Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP), en nuestro país se diagnostican cada año alrededor de 1100 casos nuevos de cáncer infantil (3).

La clasificación internacional de tumores pediátricos (ICCC-3, por sus siglas en inglés: *International Classification of Childhood Cancer*) distingue, en función de su histología y localización, 12 grupos diagnósticos principales (Ilustración 30) (4). A diferencia del cáncer en adultos, en menores de 15 años predominan los cánceres no epiteliales como las leucemias, los tumores del sistema nervioso central y los linfomas, seguidos de tumores de origen embrionario como los tumores del sistema nervioso periférico (entre

INTRODUCCIÓN

los que destaca el neuroblastoma), los retinoblastomas y los sarcomas de tejidos blandos (destacando el rhabdomyosarcoma) (Ilustración 30) (1).

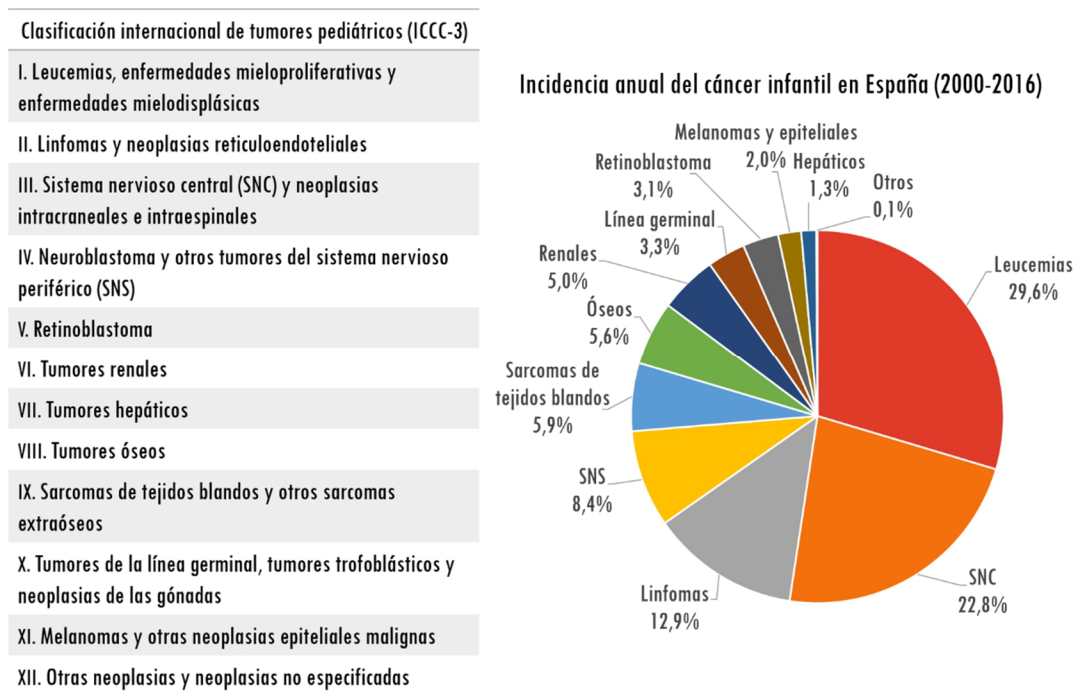


Ilustración 1. Grupos diagnósticos principales según la ICCC-3 y su porcentaje de incidencia registrado en España durante el periodo 2000-2016 en el informe RETI-SEHOP 1980-2017. (3)

Los avances terapéuticos, incluyendo la introducción de la poliquimioterapia y la terapia multimodal, así como, una mejora en la evaluación clínica y estadificación de los tumores infantiles, han permitido un gran aumento de la tasa de supervivencia general en los países desarrollados (5). En España, la supervivencia a 5 años del diagnóstico aumentó un 40% de 1980 a 2004, hasta alcanzar el 80% actual. Desde entonces, a pesar de los grandes esfuerzos clínicos, el valor permanece invariable (3,6).

Existe, también en este aspecto, gran heterogeneidad entre los diferentes subtipos. Los tumores de células germinales, retinoblastomas, tumores renales, y gran parte de las neoplasias hematopoyéticas destacan como los subgrupos más susceptibles a los tratamientos actuales, en contraposición con los tumores del sistema nervioso central

y los sarcomas, que son los grupos diagnósticos con peor pronóstico y menor supervivencia (3).

Otro rasgo relevante, teniendo en cuenta la juventud de los pacientes, es la necesidad de disminuir los efectos adversos ligados a las terapias actuales. Por el momento, la gran mayoría de los supervivientes desarrollarán una condición de salud crónica grave, incapacitante o potencialmente mortal antes de los 50 años (5).

Esta tesis doctoral está dedicada al estudio molecular del rhabdomioma (RMS). Siendo éste, uno de los tumores pediátricos más agresivos y científicamente menos estudiados.

1. Rhabdomioma (RMS)

El rhabdomioma es el sarcoma de partes blandas más común en la infancia (3). Los sarcomas de partes blandas constituyen un grupo de neoplasias malignas procedentes de la mesénquima –tejido conectivo del mesoderma–. Este origen embrionario da lugar a un heterogéneo grupo de tumores que pueden surgir en cualquier zona del cuerpo, afectando a músculos, grasa, tendones, vasos sanguíneos, nervios y, en definitiva, a cualquier tejido derivado de esta capa embrionaria (7). Se trata de un conjunto de cánceres poco frecuentes, representan alrededor del 6% de los cánceres infantiles y menos del 1% de los cánceres en adultos (3).

El RMS es un tumor maligno de origen mesenquimal que recapitula características fenotípicas y biológicas del músculo esquelético embrionario (8). Fue descrito por primera vez en el año 1854 por el doctor alemán C.O. Weber, quien reportó un examen anatómico de una lengua hipertrófica con formación de fibras musculares estriadas. Sin embargo, no fue clasificado como una nueva neoplasia hasta 1946 (9,10).

1.1. Clasificación y características histológicas

Histológicamente, el RMS pertenece al grupo de neoplasias embrionarias de células indiferenciadas, pequeñas, redondas y azules. Es por ello, que debe distinguirse de

INTRODUCCIÓN

otras neoplasias pediátricas que comparten estas características, tales como el neuroblastoma, el sarcoma de Ewing (SE) y el linfoma. Siendo la presencia de diferenciación musculoesquelética su característica definitoria, su diagnóstico preciso reside en la observación mediante microscopía óptica de estriaciones cruzadas y rabdomioblastos, así como en la presencia de un marcaje inmunohistoquímico consistente con el linaje miogénico, en el cual se incluyen las tinciones de miogenina, MyoD1, actina específica del músculo, mioglobina y desmina, entre otras (11).

Del mismo modo que en el resto de neoplasias, una buena clasificación clínico-patológica que permita predecir la evolución clínica del paciente, es primordial para la asignación del tratamiento adecuado y la consecuente mejora de las tasas de supervivencia. Particularmente, los RMS son un grupo de tumores histológicamente muy heterogéneos, dado que exhiben una gran variedad de aspectos morfológicos y moleculares que recapitulan las diferentes fases citológicas de la miogénesis y facilitan una primera estratificación fenotípica (12).

La primera clasificación histológica del RMS fue propuesta en 1958 por Robert C. Horn y Horatio T. Enterline y distinguía cuatro subtipos de rabdomiosarcomas: embrionario, alveolar, botrioide y de células fusiformes (13). No obstante, el elevado grado de similitud existente entre los diferentes subtipos y la presencia de áreas con características histopatológicas correspondientes a más de un subtipo en un mismo tumor, supusieron un gran desafío en la caracterización morfológica de esta neoplasia (13,14). No fue hasta 1995, cuando la Clasificación Internacional del RMS (ICR, por sus siglas en inglés: *International Classification of Rhabdomyosarcoma*) estableció las bases de un sistema de clasificación relevante para el pronóstico. Este sistema distinguía como rabdomiosarcomas de buen pronóstico los subtipos botrioide y de células fusiformes, como rabdomiosarcomas de pronóstico intermedio, el subtipo embrionario y como rabdomiosarcomas de mal pronóstico, el subtipo alveolar. El análisis de la evolución clínica de los subtipos histológicos en diferentes ensayos clínicos ha permitido la adaptación de la ICR para una mejor estratificación de los tumores en función del riesgo. La última clasificación de tumores de tejidos blandos y huesos de la

Organización Mundial de la Salud (OMS) publicada en 2013 define el actual sistema de clasificación. Las modificaciones introducidas por la OMS radican, por un lado, en la distinción de la variante embrionaria esclerosante junto con el subtipo de células fusiformes como un nuevo grupo diagnóstico y, por otro lado, en la eliminación del subtipo botrioide, quedando éste englobado dentro del subtipo embrionario. En consecuencia, la actual categorización histológica contempla los subtipos de RMS embrionario, alveolar, fusiforme/esclerosante y pleomórfico (Ilustración 31) (15).

Los dos subtipos histológicos principales diagnosticados en la población pediátrica son los RMS embrionarios y alveolares, mientras que el resto de los subtipos tienen mayor incidencia en la población adulta (16).

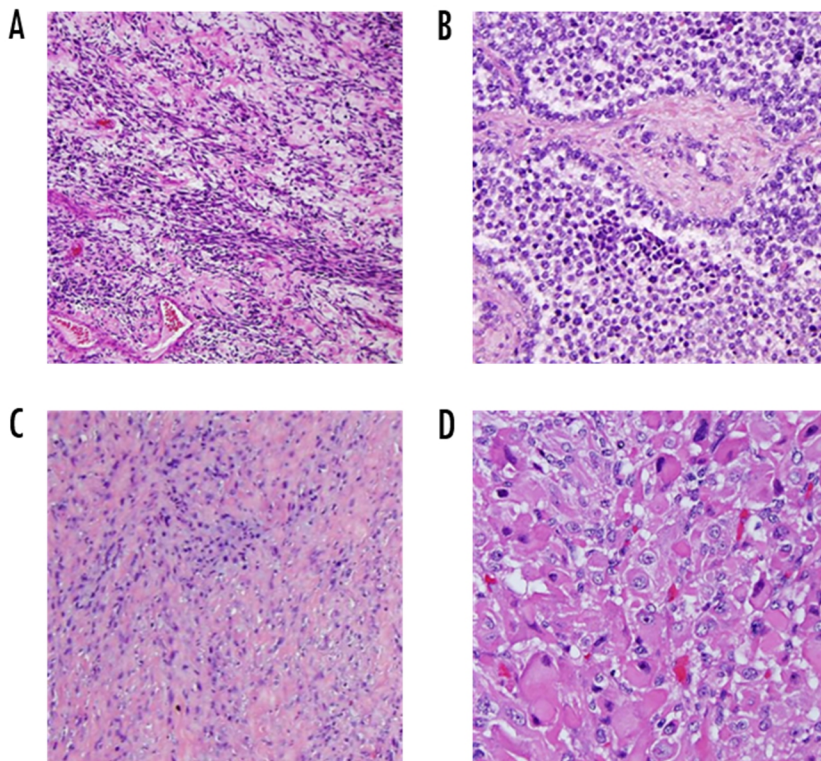


Ilustración 2. Patrones histológicos representativos de los diferentes subtipos de RMS. A. Embrionario, **B.** Alveolar, **C.** Fusiforme/Esclerosante, **D.** Pleomórfico. Imágenes de tinciones de hematoxilina-eosina obtenidas de Parham DM and Barr FG, 2013.

INTRODUCCIÓN

1.1.1.RMS embrionario

El RMS embrionario (RMSe) es el subtipo más frecuente, aparece a edades tempranas y tiene un pronóstico favorable (Tabla 1). Histológicamente, estos tumores están formados por una combinación de células redondas y ahusadas con núcleos hipercromáticos y abundante citoplasma eosinófilo, condensadas o aisladas, dentro de un estroma mixoide laxo, que recuerdan a rhabdomioblastos en diferentes fases de la miogénesis (11,12). La variante botrioide aparece prácticamente de manera exclusiva en órganos huecos, donde forma particulares masas poliploides en forma de uva, con gran condensación celular subepitelial y abundante estroma mixoide, que protruyen dentro de la cavidad del órgano (17).

1.1.2.RMS alveolar

Los tumores alveolares conforman el subtipo menos diferenciado y más agresivo. A nivel histológico, se caracterizan por la presencia de agregados de células tumorales redondas con núcleos hipercromáticos y nucleolos prominentes separadas alrededor de estructuras septales fibrosas, que recuerdan a los alveolos pulmonares. No obstante, también existe una variante sólida de RMS alveolar (RMSa) que carece de septos fibrosos, pero mantiene las características citológicas y el pronóstico de la variante alveolar clásica (11,12). El actual criterio de clasificación histológico del RMSa requiere que más del 50% del tumor muestre una histología alveolar (18).

1.1.3.RMS fusiforme/esclerosante

El subtipo fusiforme/esclerosante comprende lesiones causadas por células fusiformes separadas por fibras de colágeno. Ambos subtipos fueron previamente considerados variantes embrionarias y se asocian a un mejor pronóstico en la población pediátrica. Por un lado, el RMS de células fusiformes tiene predilección por la región paratesticular de hombres jóvenes. Morfológicamente, se caracteriza por la presencia de células fusiformes dispuestas en fascículos y separadas por un estroma con un grado variable de enriquecimiento de colágeno. Frecuentemente, es posible distinguir una población minoritaria de rhabdomioblastos inmaduros con estrías cruzadas citoplasmáticas (19).

En cambio, la variante esclerosante fue descrita por primera vez en adultos y tiende a aparecer en la región de cabeza y cuello. Microscópicamente, se caracteriza por un denso y abundante estroma de colágeno que confiere un patrón pseudovasculoso con una prominente esclerosis hialina (20).

1.1.4.RMS pleomórfico

Los tumores con histología pleomórfica representan alrededor del 10% de todos los RMS y surgen en la edad adulta. Se caracterizan por la presencia de células fusiformes irregulares con grandes núcleos atípicos y abundante citoplasma eosinófilo, que muestran focos de diferenciación miogénica (21,22).

Las características histológicas definitorias de cada subtipo pueden ser difusas en algunos casos y, por ende, el diagnóstico diferencial se complementa con otros factores como la edad y el sitio de presentación (Tabla 1). Asimismo, la inmunohistoquímica representa una herramienta esencial no sólo en el diagnóstico diferencial con otros tumores de células redondas, sino también en la propia clasificación del RMS. Ciertamente, las tinciones nucleares de MyoD1 y miogenina fueron finalmente incorporadas al panel diagnóstico de marcadores musculares, donde destacan por su alta sensibilidad y especificidad. Si bien la mayoría de las muestras de RMS expresan MyoD1 y miogenina, existen patrones de expresión diferenciales que facilitan la distinción de los diferentes subtipos. Específicamente, ambos marcadores muestran una expresión más amplia y fuerte en el subtipo alveolar, en comparación con el subtipo embrionario, donde presentan un patrón de tinción heterogéneo y poco uniforme (23,24). Los RMS esclerosantes, en cambio, manifiestan un débil marcaje de miogenina, que se contrarresta con una fuerte tinción de MyoD (25). El perfil de tinción pleomórfico, aunque débil para ambos marcajes, es de gran utilidad en la distinción con otros sarcomas del adulto (22,26).

INTRODUCCIÓN

| Subtipo | Embrionario | Alveolar | Fusiforمة/Esclerosante | Pleomórfico |
|---------------------------|--|---|---|---|
| Histología | Células redondas y/o ahusadas con estroma mixoide laxo | Células primitivas redondas separadas por septos fibrosos | Células fusiformes con un estroma enriquecido en colágeno | Células fusiformes e irregulares con grandes núcleos atípicos |
| Localización | Cabeza y cuello Tracto genitourinario | Extremidades | Región paratesticular Cabeza y cuello | Extremidades |
| Inmunohistoquímica | MyoD: Focal Miogenina: Focal | MyoD: Difusa Miogenina: Difusa | MyoD: Difusa Miogenina: focal | MyoD: Focal Miogenina: Focal |
| Edad (años) | <10 | 10-25 | <10 >40 | 60-80 |
| % del total de RMS | 60% | 20% | 10% | 10% |
| Pronóstico | Favorable | Desfavorable | Favorable (niños) Desfavorable (adultos) | Desfavorable |

Tabla 1. Características relevantes para la tipificación de los subtipos histológicos de RMS.
(11,12,17,19,20,22–28)

1.2. Clasificación y características moleculares

Los avances realizados en la caracterización molecular de las enfermedades constituyeron una nueva fuente de información con grandes expectativas de mejora en la categorización de los pacientes y las terapias dirigidas. En esta línea, los últimos estudios publicados por el *Children's Oncology Group* (COG) y el *European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group* (EpSSG) apuntan por la caracterización molecular del RMS como herramienta de clasificación y factor pronóstico (29,30). Las principales características genéticas observadas entre los subtipos de RMS incluyen la presencia de translocaciones y amplificaciones en los tumores alveolares y las ganancias cromosómicas, pérdidas alélicas y mutaciones puntuales, generalmente asociadas al subtipo embrionario (Ilustración 32 3) (Tabla 2, Tabla 3) (12).

Los estudios citogenéticos demostraron la existencia de dos translocaciones cromosómicas específicas presentes en aproximadamente un 80% de los tumores alveolares (31). La presencia o ausencia de translocación, permite la distinción molecular entre RMS fusión positivos (RMS-FP) y RMS fusión negativos (RMS-FN). La

mejora respecto a la clasificación histológica reside en la subcategorización del subtipo alveolar, dada la evidencia de un perfil genético y pronóstico de los RMSa fusión negativos indistinguible del subtipo embrionario y significativamente diferente al de los RMS-FP (Ilustración 32) (32,33).

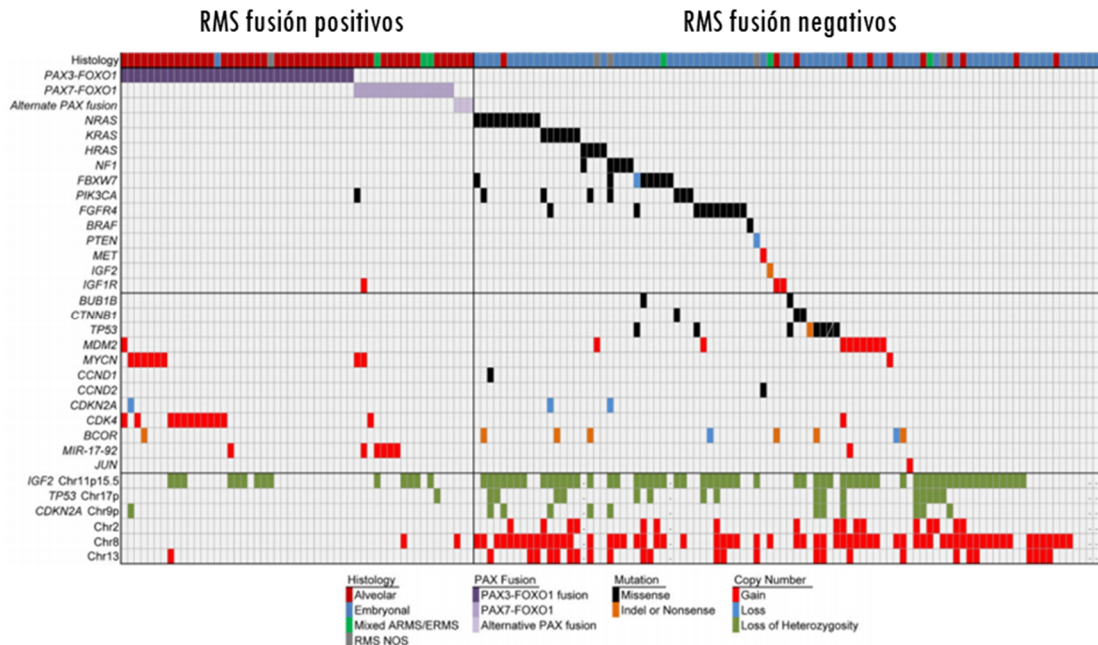


Ilustración 3. Panorama genómico del RMS pediátrico según el estatus de fusión. Imagen adaptada de Shern JF et al. 2014.

Recientemente, tanto el EpSSG como el COG han confirmado la importancia pronóstica del estatus de fusión y, en consecuencia, la caracterización genética se incluyó en el actual ensayo clínico del COG (NCT02567435) iniciado en 2015 y se ha incluido recientemente en el nuevo estudio del EpSSG, iniciado en Noviembre de 2020 y denominado FaR-RMS (NCT04625907), como herramienta para la estratificación de riesgo y la asignación del tratamiento (29,30,34).

1.2.1. RMS fusión positivos

La translocación más frecuente, $t(2;13)(q35;q14)$, afecta al 70% de los RMSa y fue descrita por primera vez en 1986 (34,35). Posteriormente, en 1991, se identificó una

INTRODUCCIÓN

variante minoritaria de esta translocación, t(1;13)(p36;q14), presente en un 10% de los pacientes con RMSa (36). Estudios de mapeo físico y clonación determinaron cómo estas translocaciones yuxtaponen el gen FKHR (*FOXO1*) del cromosoma 13 con los genes *PAX3* o *PAX7* de los cromosomas 2 y 1, respectivamente (Ilustración 33) (37,38).

FOXO1 pertenece a la familia de los factores de transcripción FoxO (del inglés *Forkhead box protein O*), encargados del control de numerosos procesos clave en la homeostasis celular, tales como, el metabolismo energético, la resistencia al estrés oxidativo y la proliferación y viabilidad celular. La característica estructural de esta familia es la presencia de un dominio de unión al ADN *Forkhead* (FD) altamente conservado (39). Entre las diversas funciones descritas, *FOXO1* desarrolla un papel crítico en la diferenciación del músculo esquelético y la especificación de las fibras musculares (40).

PAX3 y *PAX7* son miembros de la familia de factores de transcripción PAX, reguladores transcripcionales esenciales durante la embriogénesis. Ambos presentan un dominio de unión al ADN característico y altamente conservado en los genes del desarrollo, formado por un motivo *Paired Box* (PB), un *octapeptide* y un *Homeodomain* (HD) completo (41). A nivel funcional, *PAX3* y *PAX7* desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso y del músculo esquelético (42). Concretamente, durante el desarrollo del músculo esquelético han sido relacionados con la supervivencia y proliferación celular de los progenitores miogénicos, así como, con la entrada de éstos en el proceso de diferenciación muscular. Cabe destacar, la estrecha relación de ambos aspectos con el presunto origen del RMS (Ver apartado INTRODUCCIÓN 1.3.) (43).

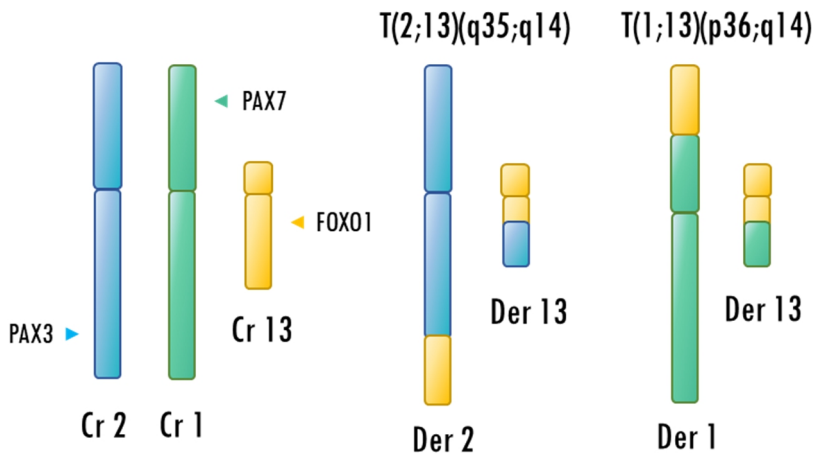


Ilustración 4. Representación esquemática de la translocación cromosómica entre los genes *PAX3* o *PAX7* y *FOXO1*. Ilustración basada en Barr F. G. 2001.

Los puntos de corte de $t(2;13)$ y $t(1;13)$, afectan consistentemente al séptimo exón de los genes *PAX*, separando el dominio de unión al ADN de éstos –localizado en los exones 2-6– del dominio transactivador –codificado por los exones 6-8–. En cuanto al gen *FOXO1*, el punto de ruptura de ambas translocaciones disocia el dominio FH situado entre los exones 1 y 2 del dominio transactivador, codificado íntegramente en el exón 2. La recombinación del exón 7 de *PAX3/PAX7* y el exón 2 de *FOXO1* mantiene el marco de lectura y genera dos factores de transcripción quiméricos funcionales, *PAX3-FOXO1* y *PAX7-FOXO1*, formados por la fusión del dominio N-terminal de unión al ADN de *PAX3/PAX7* y el dominio transactivador C-terminal de *FOXO1* (Ilustración 34). Por ende, las nuevas proteínas de fusión conservan los genes diana naturales de *PAX3/PAX7* y la potencia transactivadora de *FOXO1* (41,42). Esta fusión incrementa la actividad biológica de los factores de transcripción *PAX*, no solo a nivel funcional, elevando su potencia transactivadora, sino también a nivel transcripcional, aumentando sus niveles de expresión. En consecuencia, se produce una expresión descontrolada de los genes regulados por *PAX3/PAX7*, que estimula procesos celulares como el crecimiento y la motilidad celular e inhibe mecanismos como la apoptosis y la diferenciación miogénica, contribuyendo notablemente a la progresión tumoral del RMS (12,41).

INTRODUCCIÓN

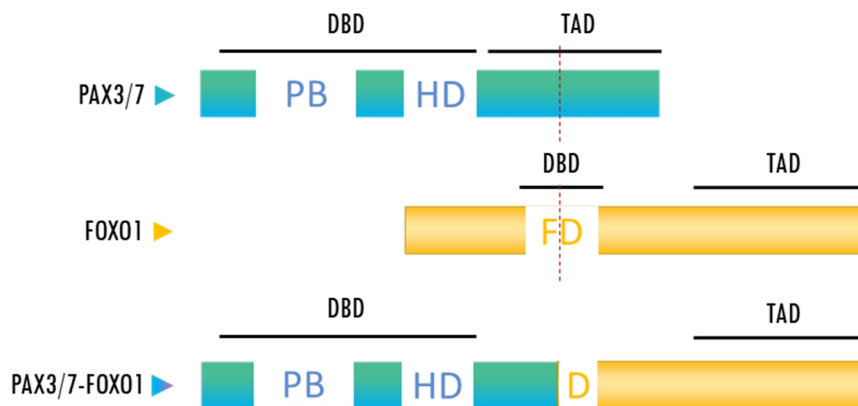


Ilustración 5. Representación esquemática de la fusión entre los dominios proteicos de unión al ADN de PAX3 o PAX7 y el dominio transactivador de FOXO1. DBD, por sus siglas en inglés: *DNA-Binding Domain*, TAD, por sus siglas en inglés: *Transcriptional Activation Domain*. Imagen basada en Barr F. G. 2001.

La extremada baja carga mutacional presente en los RMS-FP (0,1 cambios en la codificación de proteínas por megabase), evidencia la importancia de la fusión de los genes *PAX* como impulsores oncogénicos principales de este subgrupo (33). Estudios de expresión génica han permitido la identificación de diversas dianas de la translocación con un importante papel en la patogénesis del RMS, tales como *MYOD*, *ALK*, *FGFR4*, *IGF1R* y *MYCN* (44,45). Sin embargo, múltiples modelos genéticos han demostrado que la fusión por sí sola, es incapaz de causar RMS sin ayuda de un evento genético cooperante. Las alteraciones genéticas cooperantes más frecuentes son las amplificaciones genéticas de *MYCN*, la región 12q13-15 cuyos genes más relevantes son *GLI1/SAS/MDM2/CDK4* y *MIR-17-92* o la delección de *CDKN2A/B* (Tabla 2) (33,46–50).

Además de la translocación ya conocida con el gen *FOXO1*, recientemente se han observado otros reordenamientos poco frecuentes del gen *PAX3* en tumores con histología alveolar, que, por sus perfiles genéticos, han sido incluidos en el subgrupo de RMS-FP (51). En primer lugar, Frederic G. Barr identificó en 2002 una nueva variante de translocación, $t(2;X)(q35;q13)$, que fusionaba el gen *PAX3* con el también factor de transcripción *forkhead*, *FOXO4* (52). En 2004, Marco Wachtel *et al.*

descubrieron la translocación t(2;2)(q35;p23), que fusiona el gen *PAX3* y el receptor coactivador nuclear *NCOA1* (53). Años más tarde, Shern *et al.* reportaron 2 nuevos casos de tumores *PAX3-NCOA1* positivos y una nueva translocación producto de múltiples reordenamientos en el cromosoma 2, que causa la fusión de *PAX3* con la subunidad del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP, *INO80D* (33). Análogamente, todos los nuevos productos quiméricos conservan el DBD de *PAX3* y el TAD del nuevo gen de fusión, incrementando la capacidad de transactivación de *PAX3* del mismo modo que en la fusión *PAX3-FOXO1*(51). Sin embargo, debido al pequeño número de casos detectados hasta el momento, su valor clínico es aún desconocido (34). A diferencia de las dos translocaciones principales, cuyo estudio durante las últimas décadas ha permitido concluir que la mera presencia de translocación *PAX3/7-FOXO1* se asocia a un peor pronóstico y mayor agresividad, siendo la variante *PAX3-FOXO1* la de peor pronóstico (31,54,55).

| Gen | Alteración | Cromosoma/Locus | Frecuencia aproximada |
|------------------------|---------------|-----------------|-----------------------|
| PAX3-FOXO1 | Translocación | (2;13)(q35;q14) | 60% |
| PAX7-FOXO1 | Translocación | (1;13)(p36;q14) | 20% |
| PAX3-FOXO4 | Translocación | (2;X)(q35;q13), | Un caso |
| PAX3-NCOA1 | Translocación | (2;2)(q35;p23) | Rara |
| PAX3-INO80D | Translocación | (2;2)(q35;q33) | Un caso |
| GLI1/SAS/MDM2/ CDK4 | Amplificación | 12q13-15 | 32% |
| MYCN | Amplificación | 2p24 | 28% |
| miR-17-92 | Amplificación | 13q31 | 23% |
| CDKN2A | Delección | 9p21 | 25% |

Tabla 2. Alteraciones genéticas más frecuentes en RMS-FP (33,35,36,47–49,52,53).

INTRODUCCIÓN

1.2.2.RMS fusión negativos

Los RMS desprovistos de reordenamientos cromosómicos en los genes *PAX* carecen de un marcador genético específico para su diagnóstico (11). Sin embargo, presentan un mayor grado de inestabilidad genética manifiesto en aneuploidías cromosómicas y mutaciones puntuales, que facilitan su caracterización molecular (51).

El evento genético más frecuente en los RMS-FN es la pérdida de heterocigosidad (LOH, por sus siglas en inglés: *Loss Of Heterozygosity*) del locus 11p15.5 materno. Generalmente, esta pérdida es compensada por una duplicación del alelo paterno, causando una disomía uniparental. Aunque no es específico, este evento es característico de los tumores fusión negativos, pues ocurre en mayor porcentaje en este subtipo (cerca del 80%) en comparación con el subtipo fusión positivo (alrededor del 20%) (56,57). El principal interés de esta región reside en el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (*IGF2*), un gen normalmente regulado por impronta genética que, gracias a la coexistencia de la LOH y la disomía paterna, se encuentra ampliamente sobreexpresado en los RMS-FN, donde, al igual que en otros sarcomas, se asocia con la progresión tumoral (58–60). La evidencia del papel de *IGF2* en el desarrollo del RMS se patentiza con la consistencia de su sobreexpresión. En el caso de los RMS-FP, donde la LOH es menos común, el incremento se asocia a diferentes mecanismos, tales como la pérdida de impronta genética (LOI, por sus siglas en inglés: *Loss Of Imprinting*) o la inducción transcripcional mediada por PAX3-FOXO1 (51,60).

Las siguientes aberraciones cromosómicas más comunes son polisomías en el cromosoma 8, pequeñas ganancias en los cromosomas 2, 7, 11, 12, 13 y 20 y pérdidas en los cromosomas 1, 9 y 16 (12,33,61,62).

Por lo que respecta a las mutaciones puntuales, éstas son significativamente más frecuentes en los tumores fusión negativos. Las más recurrentes afectan a genes de la vía de señalización RAS (*NRAS*, *KRAS*, *HRAS*, *NF1*, *PIK3CA*, *FGFR4*), causando una activación constitutiva de esta vía en aproximadamente un tercio de los RMS-FN (33,34,63). En efecto, el estatus mutacional de la vía RAS es específico de los RMS-FN

y se asocia de manera significativa con la estratificación por riesgo de estos tumores. Concretamente, las mutaciones en esta vía son exclusivas de los tumores de riesgo intermedio-alto –con una presencia del 45-75%, respectivamente– (64). Otras mutaciones comunes conciernen genes relacionados con el ciclo celular como *FBXW7*, *BCOR*, *CTNNB1* y *TP53* (33,65). Recientemente, se ha descrito una mutación somática en el factor de transcripción miogénico *MYOD1* (Leu122Arg) asociada a un mal pronóstico, que podría convertirse en un importante biomarcador en los RMS-FN (34,66).

El estudio de Chen L *et al.*, mediante *deep whole-genome sequencing* ha permitido identificar la combinación de pérdida de heterocigosidad del cromosoma 11p15.5 y las mutaciones puntuales en la vía RAS, como los eventos genéticos iniciadores en la mayoría de los RMS-FN (58).

A pesar de que en primera instancia las aberraciones cromosómicas características de los RMS-FN no fueron relacionadas con el pronóstico de los pacientes, el estudio molecular profundo de los RMS-FN ha permitido la identificación de nuevas características genéticas con posible valor pronóstico. Cabe destacar la expresión de un perfil similar a otros sarcomas no diferenciados –caracterizado por una baja expresión de los marcadores miogénicos característicos del RMS (*MYOD* y *MYOG*)–, así como, una elevada expresión de la firma MG5 (expresión de mRNA ponderada de los genes *EPHA*, *EED*, *NELF*, *CBS* y *EPB41L4B*), pues ambos rasgos han sido asociados a un peor pronóstico en los RMS fusión negativos (34,67). Adicionalmente, se ha propuesto una posible relación entre la presencia de nuevas translocaciones que afectan a los genes *NCOA2* y/o *VGLL2* y un pronóstico favorable en el subtipo histológico de células fusiformes. Sin embargo, debido al pequeño número de casos detectados, su valor clínico es aún incierto (12,27,34).

Pese a la remarcable heterogeneidad genética y molecular expuesta en este apartado, e independientemente de su clasificación, más del 90% de los RMSs presentan alteraciones en el eje genético receptor tirosina quinasa/*RAS/PIK3CA* (33).

INTRODUCCIÓN

| Gen | Alteración | Cromosoma/Locus | Frecuencia aproximada |
|--------|--------------------------|--|-----------------------|
| NRAS | Mutación puntual | Chr1:115256530 Chr1:115258745 | 12% |
| KRAS | Mutación puntual | Chr12:25398284 Chr12:25398281 | 6% |
| HRAS | Mutación puntual | Chr11:534289 | 4% |
| NF1 | Mutación puntual | Multiple | 5% |
| PIK3CA | Mutación puntual | Chr3:178952084-5 Chr3:178936094-6 | 7% |
| FGFR4 | Mutación puntual | Chr5:176455020-22 Chr5:176455157-8 | 10% |
| FBXW7 | Mutación puntual | Chr4:153247287 Chr4:153249456 Chr4:153251905 | 7% |
| BCOR | Mutación puntual/indel | Multiple | 7% |
| CTNNB1 | Mutación puntual | Chr3:41266101 Chr3:41266124 | 3% |
| TP53 | Mutación puntual | chr17: exons 5-8 | 5% |
| MYOD1 | Mutación puntual | p.Leu122Arg | 10% |
| IGF2 | Pérdida de heterocigosis | 11p15.5 | 80% |
| | Ganancias cromosómicas | Chr:2,7,8,11,12,13,20 | >30% |
| | Pérdidas cromosómicas | Chr:1p,6,9,14,16,17 | >25% |

Tabla 3. Alteraciones genéticas más frecuentes en RMS-FN. (12,33,34,57,61,62,65,66,68,69)

1.3. Célula de origen

Dadas las características clínicas y moleculares que presentan estos tumores, destacando la morfología (similar a la de los rhabdomioblastos), la localización (generalmente en el músculo estriado) y la expresión de diversos factores miogénicos (*PAX3/7*, miogenina, *MyoD*, etc.), el origen del RMS ha sido generalmente asociado a una disrupción del crecimiento y la diferenciación de las células precursoras del músculo esquelético. Por este motivo, es importante conocer este proceso embrionario para entender la carcinogénesis del RMS.

1.3.1. Histogénesis del músculo

El desarrollo del músculo comienza en una etapa muy temprana del desarrollo embrionario, la gastrulación. El músculo esquelético deriva de segmentaciones epiteliales repetitivas formadas en el mesodermo paraxial, conocidas como somitas. La formación de estas estructuras se regula mediante la expresión cíclica de genes relacionados con las vías Notch y Wnt y la creación de gradientes de los morfógenos WNT y FGF. Una vez formadas las somitas, la mayoría de las células pierden su multipotencialidad y restringen su linaje. La expresión de genes como *Sonic hedgehog (SHH)* y *WNT-1* por el notocordo y el tubo neural, modula el posicionamiento axial, la expresión de factores de transcripción específicos y diferencia dos nuevos compartimentos dorsoventrales en las somitas; el esclerótomo, formado por células mesenquimales precursoras de cartílago y hueso, y el dermomiótomo, la región dorsal de las somitas que permanece epitelial y dará lugar a la formación del músculo esquelético y la dermis (21,70–72). En el miótomo, la estructura muscular más primitiva, se diferencian dos poblaciones celulares distintas destinadas a formar el músculo esquelético. Una población migratoria que se convierte predominantemente en el músculo esquelético de las extremidades, y una segunda población no migrante, que forma la musculatura axial del tronco (71).

Las células del dermomiótomo se caracterizan por la expresión de los factores de transcripción linaje-específicos *PAX3* y *PAX7*, claros reguladores miogénicos que

INTRODUCCIÓN

controlan la proliferación y la supervivencia de las células progenitoras (Ilustración 35) (73). Ambos factores de transcripción parecen tener un alto grado de redundancia funcional. Sin embargo, existen momentos específicos en los que se expresan con cierta disparidad. Por ejemplo, la expresión de *PAX3* desaparece durante la primera etapa de especificación, mientras que la expresión de *PAX7* se mantiene hasta el inicio de la diferenciación. Sin embargo, este orden no ocurre en la población migrante del dermomiótomo, que pierde la expresión de *PAX7* y sólo mantiene la expresión de *PAX3* hasta que llega a su destino e inicia el proceso de diferenciación (74). Las células miogénicas que escapan de la diferenciación terminal y retienen la expresión de *PAX3* y *PAX7* en el músculo, se llaman células satélite y son células progenitoras encargadas del crecimiento postnatal y la regeneración muscular. El resto de las células que finalizan la especificación del linaje muscular son conocidas como mioblastos y se caracterizan por la expresión de dos genes clave en la determinación miogénica, *MYF5* y *MYOD*. En un primer momento, la expresión de *MYF5* y *MYOD* mantiene a los mioblastos en un estado proliferativo. Sin embargo, más adelante, *MYOD* también colabora con otros factores de transcripción miogénica como *MYF6* y *MYOG*, para promover la diferenciación y especialización muscular de los miocitos. El proceso finaliza con la fusión de los miocitos en miotubos multinucleados maduros, que finalmente formarán las miofibras del músculo esquelético (72,75).

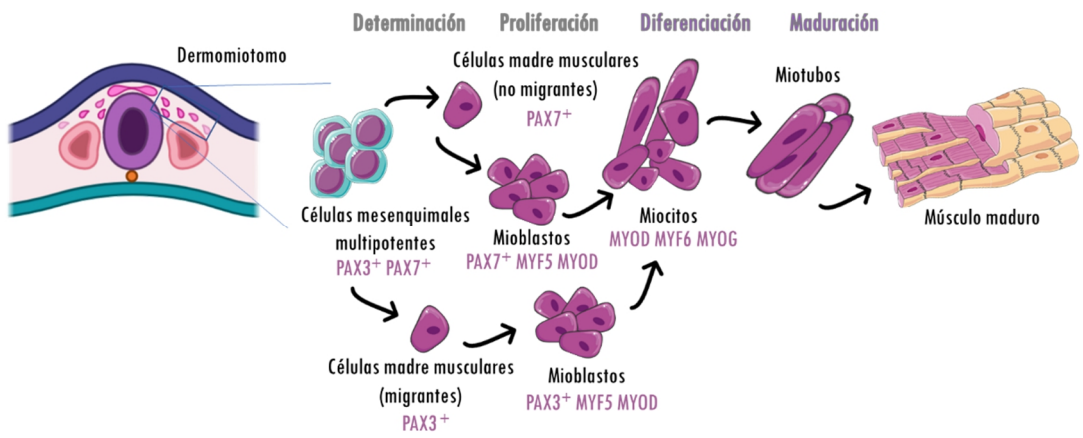


Ilustración 6. Histogénesis muscular. Imagen propia creada con Smart Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

En efecto, la mayoría de las vías y factores de transcripción reguladores de este proceso aquí mencionados, se expresan en las células del RMS. Sin embargo, la definición del RMS como tumor del músculo esquelético genera gran controversia, debido, en parte, a la gran heterogeneidad fenotípica y anatómica de estos tumores, no siempre asociados al sistema musculoesquelético (76).

Dado el amplio espectro fenotípico, clínico y molecular existente entre los diferentes subtipos de RMS, se postulan diversos orígenes para cada uno de ellos (76). En el caso del subtipo embrionario, su origen se asocia a células del linaje muscular, más o menos diferenciadas. La teoría más aceptada, basándose tanto en la concordancia transcripcional –destacando la elevada expresión de Pax7– como en la histología celular –evidenciando un alto grado de diferenciación muscular–, propone a las células madre musculares (células satélite) como las células de origen (74,76,77). Sin embargo, Brian P Rubin demostró en modelos murinos la capacidad de mioblastos más diferenciados de formar eRMS con aproximadamente la misma latencia que las células satélite, extendiendo, de este modo, el posible origen del RMS a otras poblaciones celulares más diferenciadas que participan durante el desarrollo muscular (78). Respecto a la célula de origen de los RMSa, la principal teoría señala a los progenitores mesenquimales primitivos, aunque no se descarta que células del linaje miogénico puedan desempeñar un papel importante en su formación. El origen mesenquimal explicaría la incipiente diferenciación miogénica observada en estos tumores, así como la existencia de ciertos casos de RMS alveolares cuya presentación clínica, con infiltración tumoral de amplia diseminación en médula ósea, diverge de un origen meramente muscular (45,76,79). Del mismo modo, esta teoría también explicaría el origen de los RMS embrionarios que ocurren en localizaciones desprovistas de músculo estriado como la próstata, la vejiga urinaria y el árbol biliar (80). Finalmente, también podría explicar estudios recientes que describen la posibilidad de inducir la aparición de RMS a partir de células de origen adiposo y endotelial, mediante la transdiferenciación de células progenitoras mesenquimales a través de la modulación de la vía del desarrollo embrionario Hedgehog (Hh) (80,81).

INTRODUCCIÓN

Además de la gran controversia existente respecto al origen celular del RMS, también se desconoce hasta qué punto el entorno tisular del tumor primario, el estado de diferenciación de las células iniciadoras, los eventos oncogénicos específicos adquiridos durante la transformación o las combinaciones de estos factores, determinan los diferentes fenotipos tumorales del RMS (16).

1.4. Demografía

Aunque globalmente se considera una enfermedad rara, el RMS es una forma común de cáncer infantil, siendo el tercer tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia. Presenta una incidencia anual de 5,3 casos por millón de niños menores de 15 años, es decir, en nuestro país se diagnostican alrededor de 35 nuevos casos anuales (82).

La incidencia del RMS se ve afectada por diversos factores. Entre ellos cabe mencionar la edad, el sexo y la histología del tumor. De esta manera, el RMS puede presentarse en cualquier grupo etario, siendo muy infrecuente en adultos (menos del 1% de todos los tumores del adulto) y predominante en varones, con una proporción hombre:mujer de 1,4 (83,84). Histológicamente, mientras que el subtipo embrionario (60-70%), predomina en varones y presenta su incidencia máxima en menores de 5 años, la incidencia del subtipo alveolar (20-30%), no varía en función del sexo y es constante en la totalidad del grupo etario que nos ocupa (84).

La distribución anatómica comprende cualquier lugar del organismo (Ilustración **367**). No obstante, las localizaciones más frecuentes dependen del subtipo histológico: El subtipo embrionario tiende a surgir en la órbita, cabeza y cuello y la región genitourinaria, mientras que el subtipo alveolar afecta principalmente a las extremidades (82,84).

| Región Anatómica | Incidencia (%) |
|------------------|---------------------------------------|
| Genitourinaria | 24 |
| Cabeza y cuello | Parmeníneos: 16 No parmeníneos: 10 |
| Órbita | 9 |
| Extremidades | 19 |
| Otras | 22 |

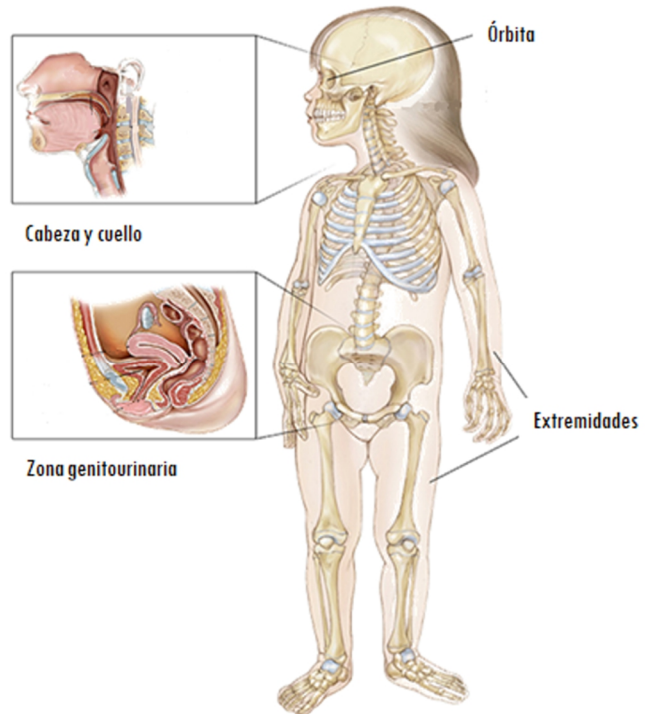


Ilustración 7. Principales localizaciones anatómicas y porcentajes de incidencia de los RMS.
Imagen adaptada de la *American Society of Clinical Oncology*.

1.5. Etiología

Definir los factores de riesgo asociados a una enfermedad rara, como es el rabdomiosarcoma, sigue siendo un gran reto. A pesar de que la etiología del RMS es en gran parte desconocida, existen algunas publicaciones que relacionan su aparición con la susceptibilidad genética y la exposición a determinados factores externos.

1.5.1. Predisposición genética

Se cree que la mayoría de los casos de RMS ocurren de manera esporádica, es decir, son atribuidos a mutaciones somáticas. Sin embargo, numerosos estudios destacan una mayor predisposición a padecer RMS en pacientes con ciertos síndromes familiares. Destacan la relación con el síndrome de Li-Fraumeni –mutaciones en el gen supresor de tumor *TP53*– (85), el síndrome de Wiedemann-Beckwith –mutaciones en genes

INTRODUCCIÓN

reguladores del crecimiento localizados en el cromosoma 11– (86), el síndrome de Costello –mutaciones en *HRAS*– (87), el síndrome de Gorlin –mutaciones en genes de la vía de señalización Hedgehog– (88) y la neurofibromatosis tipo I –deleciones en el gen *NF1*– (89), entre otros, así como, con diversas anomalías congénitas del desarrollo (90). Todas estas evidencias sugieren una notable contribución genética en, aproximadamente, un 10-33% de los pacientes con RMS (8,91). Curiosamente, los síndromes de predisposición a cáncer parecen ser más frecuentes en el subtipo embrionario que en el alveolar.

1.5.2. Factores de riesgo clínico-ambientales

Dado que la mayoría de los casos de RMS son de naturaleza esporádica, es muy probable que los factores clínico-ambientales durante los primeros años de vida puedan desempeñar un papel importante en las alteraciones genómicas y epigenéticas que causan estos tumores.

Gran parte de las hipótesis etiológicas sobre factores ambientales se basan en un estudio epidemiológico caso-control desarrollado entre 1982 y 1988 por el *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group* (IRSG) y el actual COG, con 322 pacientes y 322 controles. Entre los hallazgos, destacan los riesgos asociados al consumo de marihuana y cocaína de los padres (92) y la exposición prenatal a rayos X (93). Por otro lado, también se establece una posible asociación inversa con el desarrollo del sistema inmunitario (94,95). Otro gran estudio realizado en 359 pacientes diagnosticados en California entre 1988 y 2008, plantea la importancia del ambiente prenatal, aunque desestima el riesgo relacionado con el sobrepeso del bebé al nacer, propuesto en 2010 por S. Ognjanovic (96,97). Finalmente, un pequeño estudio realizado en 33 familias, por Grufferman S en 1982, señala un elevado Riesgo Relativo (RR) asociado al consumo de tabaco por los padres (RR = 3.9; p valor = 0.003), pero no por las madres. Adicionalmente, revela RRs significativos asociados a la exposición a químicos (RR = 3.2; p valor = 0.03) y el consumo de vísceras (RR = 3.7; p valor = 0.004) por los pacientes. Por último, este estudio también apunta una mayor tendencia asociada a

madres mayores de 30 años, que hayan tomado antibióticos antes o durante el embarazo y que hayan tenido partos tardíos o asistidos, así como, a familias de bajo nivel socioeconómico (98).

1.6. Presentación clínica

Los síntomas del RMS son variados e inespecíficos. Aparecen cuando el tumor crece y oprime las estructuras adyacentes, por lo que dependen de la localización anatómica y de la presencia o no de diseminación tumoral (91). A menudo, el primer signo clínico suele ser la aparición de una masa asintomática, de rápido crecimiento, localizada en partes blandas. Algunos de los posibles síntomas anatómico-específicos se describen en la Tabla 22 (82,99).

| Región Anatómica | Localización | Manifestación Clínica |
|------------------|-------------------|---|
| Genito-urinaria | Vejiga y próstata | Obstrucción o frecuencia urinaria / Hematuria / Estreñimiento |
| | Vagina y útero | Sangrado vaginal / Tumor vulva |
| Cabeza y cuello | Parmeníngeos | Epistaxis / Masa fosa nasal |
| | No parameníngeos | Masa palpable o visible |
| Órbita | Órbita | Exoftalmos / Oftalmoplejia |
| Extremidades | Extremidades | Masa palpable dolorosa o hinchazón visible con o sin eritema |
| Otras | Vía biliar | Masa abdominal e ictericia |
| | Pared torácica | Masa torácica / Derrame pleural |

Tabla 4. Manifestaciones clínicas más relevantes en función de la localización del tumor primario. (82,99).

Menos del 25% de los pacientes presentan diseminación metastásica al momento del diagnóstico. Los lugares más frecuentes son pulmones, huesos, médula ósea y nódulos linfáticos (99). Los pacientes con enfermedad metastásica tienden a presentar síntomas generales, como son cansancio, pérdida de peso y anemia (91).

1.7. Diagnóstico

Los pacientes con sospecha de RMS requieren un examen clínico completo previo al tratamiento que permita conocer tanto la clasificación, localización y extensión del tumor primario, como la presencia o ausencia de enfermedad metastásica. En primer

INTRODUCCIÓN

lugar, se realizan pruebas rutinarias de laboratorio como el conteo sanguíneo completo, los análisis de electrolitos en suero y de orina y las pruebas de función renal y hepática (82).

Los estudios de imagen del tumor primario se realizan mediante resonancia magnética (RM) o tomografía computarizada (TC) (100). La RM proporciona mejor definición del tumor primario y las estructuras adyacentes en lesiones pélvicas, paraespinales y de extremidades, mientras que la TC es ventajosa en la evaluación de la erosión ósea, la adenopatía abdominal y la enfermedad distante (101). Paralelamente, se debe realizar una evaluación clínica y radiológica de la diseminación linfática, incluyendo una evaluación quirúrgica en los tumores con evidencia de afectación ganglionar y en los tumores de extremidades sin evidencia, ya que estos presentan una elevada incidencia de propagación regional.

La evaluación de la enfermedad metastásica incluye aspirado bilateral y biopsia medular, escáner óseo, TC cerebral, pulmonar y hepático y, en el caso de lesiones parameningeas, el análisis del líquido cefalorraquídeo (100). Las técnicas de imagen metabólicas, como la tomografía por emisión de positrones con F- fluorodesoxiglucosa (FDG-PET, por sus siglas en inglés: *F-fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography*), aunque con limitada experiencia en la población pediátrica, se proponen, cada vez más, como posibles nuevas técnicas de imagen diagnóstica (102,103).

El diagnóstico definitivo del RMS requiere el estudio histológico y molecular del tumor, mediante muestra de biopsia incisional o, preferiblemente, tru-cut (82). En la evaluación histológica, se debe diferenciar al RMS de otros tumores pertenecientes al grupo de tumores pediátricos de células pequeñas, redondas y azules. Para ello, se emplean técnicas inmunohistoquímicas y microscópicas que corroboran la presencia de las características miogénicas asociadas al RMS (ver apartado INTRODUCCIÓN 1.1.) (99). Cabe destacar que, debido a la gran heterogeneidad del tumor, es posible realizar el diagnóstico con la presencia de sólo una pequeña minoría de células positivas para los marcadores musculares (104). El estudio molecular permite la

clasificación del tumor en función de la presencia o ausencia de translocación (ver apartado INTRODUCCIÓN 1.2.), mediante las técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés: *Fluorescence In Situ Hybridization*) y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) (105).

1.8. Estratificación del RMS: estadiaje y factores pronósticos

Los esfuerzos realizados, por grandes grupos cooperativos norteamericanos (principalmente el IRSG, actual COG) y europeos (principalmente la *International Society of Pediatric Oncology* (SIOP) y el *Malignant Mesenchymal Tumor Group* (MMT) actualmente englobados en el *European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group* (EpSSG)), para llevar a cabo grandes ensayos clínicos en pacientes con RMS, han permitido la evaluación pronóstica de numerosas variables clínico-biológicas y protocolos terapéuticos. El objetivo común de estos estudios es la mejora de las estrategias de tratamiento. En el caso de los pacientes con peor pronóstico, esta mejora radica en la búsqueda de terapias más eficaces, mientras que en los pacientes de pronóstico más favorable, el propósito es la reducción de la toxicidad y de los efectos adversos asociados a los tratamientos actuales, sin comprometer la supervivencia (67).

Los principales factores pronósticos conocidos son la histología, el estadio, la localización, la edad y el tamaño tumoral al diagnóstico. El estadio es un fuerte factor pronóstico, por lo que se han desarrollado numerosas metodologías dedicadas a su correcta determinación. Las más usadas son el modelo Tumor-Nódulos-Metástasis (TNM) creado por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *International Union Against Cancer* (UICC), de uso estandarizado en la evaluación de numerosos tipos de cáncer (Tabla 5) y el sistema de agrupación clínica postquirúrgica desarrollado por el IRSG (Tabla 6) (82). Por un lado, la clasificación TNM es previa al tratamiento y se basa en la localización y el tamaño del tumor primario, el grado de

INTRODUCCIÓN

invasión tumoral, la afectación ganglionar y la presencia o ausencia de enfermedad metastásica (106).

| Clasificación TNM | | |
|---------------------|---------------|---|
| Factor | Clasificación | Descripción |
| Tumor | T0 | Sin evidencia de tumor |
| | T1 | Tumor confinado al órgano o tejido de origen |
| | T1a | Tumor ≤ 5 cm en su mayor dimensión |
| | T1b | Tumor > 5 en su mayor dimensión |
| | T2 | Tumor no confinado en el tejido u órgano de origen |
| | T2a | Tumor ≤ 5 cm en su mayor dimensión |
| | T2b | Tumor > 5 en su mayor dimensión |
| | TX | Sin información sobre el tamaño o la extensión |
| Ganglios Linfáticos | N0 | Sin afectación |
| | N1 | Afectación de ganglios regionales |
| | NX | Sin información |
| Metástasis | M0 | Sin evidencia de metástasis o de afectación de ganglios no regionales |
| | M1 | Metástasis o afectación de ganglios no regionales |
| | MX | Sin información |

Tabla 5. Sistema de estadiaje TNM pretratamiento. (82).

Por otro lado, el protocolo de clasificación del IRSG permite la agrupación de los pacientes en 4 categorías en función del remanente tumoral después de la cirugía inicial, teniendo en cuenta también la diseminación de la enfermedad en el momento del diagnóstico (107).

| Grupos IRSG |
|--|
| <p>GRUPO I</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad localizada, completamente reseçada • Enfermedad confinada al músculo u órgano de origen • Afectación contigua-infiltración más allá del músculo u órgano de origen |
| <p>GRUPO II</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resección macroscópica con evidencia de diseminación regional • Tumor reseçado con restos microscópicos • Enfermedad regional con afectación ganglionar, completamente reseçada sin microscópicos • Enfermedad regional con afectación ganglionar, completamente reseçada, pero con evidencia de restos microscópicos y/o evidencia histológica de afectación ganglionar a distancia |
| <p>GRUPO III</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resección incompleta • Restos macroscópicos • Biopsia solo después de la resección del primario |
| <p>GRUPO IV</p> <ul style="list-style-type: none"> • Metástasis a distancia |

Tabla 6. Clasificación postquirúrgica según el IRSG. (82).

Finalmente, todos estos factores se usan para la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y la posterior asignación de un tratamiento adecuado. La estrategia de estratificación adoptada en el último ensayo clínico realizado por el EpSSG para RMS no metastásicos (RMS2005 - NCT00379457) identificaba 4 grupos de riesgo (bajo, estándar, alto y muy alto) con un total de 8 subgrupos (A-H), definidos según la edad, el tamaño del tumor, la histología, el estadio posquirúrgico del IRSG y la afectación ganglionar, de la siguiente manera (108):

Histología:

- Favorable: subtipo embrionario, de células fusiformes y botrioide
- Desfavorable: subtipo alveolar

INTRODUCCIÓN

Estadio Post-quirúrgico (Clasificación IRSG):

- Grupo I: resección primaria completa
- Grupo II: residuo microscópico o resección primaria completa con afectación ganglionar
- Grupo III: residuo macroscópico
- Grupo IV: tumor con metástasis a distancia

Localización:

- Favorable: órbita, cabeza y cuello no parameningeos y región genitourinaria excepto vejiga y próstata
- Desfavorable: resto de localizaciones (parameningea, extremidades, vejiga y próstata y otras)

Estadio ganglionar (Clasificación TNM):

- N0 = sin afectación ganglionar clínica ni histológica
- N1 = con afectación ganglionar clínica o histológica

Tamaño y edad:

- Favorable: tamaño del tumor ≤ 5 cm y edad < 10 años
- Desfavorable: todos los demás (tamaño > 5 cm o edad ≥ 10 años)

El análisis reciente de los datos de este estudio clínico ha confirmado una discriminación eficaz de la supervivencia de estos subgrupos. No obstante, el nuevo ensayo clínico vigente desde noviembre de 2020, denominado FaR-RMS (NCT04625907) y dirigido a niños y adultos con RMS de primera línea y recidivante, estudiará el uso del estatus de fusión versus la subtipificación histopatológica en los criterios de estratificación (Tabla 23). Adicionalmente, otros cambios añadidos respecto al protocolo RMS2005 incluyen la tipificación de las localizaciones genitourinarias (vejiga y próstata) y biliares como sitios favorables y la incorporación de los pacientes con enfermedad metastásica en el grupo de muy alto riesgo (109).

| Grupos de Riesgo del FaR-RMS | | | | | | |
|------------------------------|----------|-------------------|------------|--------------|--------------------|---------------|
| Grupo de Riesgo | Subgrupo | Estatus de Fusión | Grupo IRS | Localización | Estadio Ganglionar | Tamaño y Edad |
| Bajo Riesgo | A | Negativo | I | Cualquiera | N0 | Favorable |
| Riesgo estándar | B | Negativo | I | Cualquiera | N0 | Desfavorable |
| | C | Negativo | II, III | Favorable | N0 | Cualquiera |
| Alto Riesgo | D | Negativo | II, III | Desfavorable | N0 | Cualquiera |
| | E | Negativo | II, III | Cualquiera | N1 | Cualquiera |
| | F | Positivo | I, II, III | Cualquiera | N0 | Cualquiera |
| Muy Alto Riesgo | G | Positivo | II, III | Cualquiera | N1 | Cualquiera |
| | H | Cualquiera | IV | Cualquiera | Cualquiera | Cualquiera |

Tabla 7. Grupos de riesgo del FaR-RMS. (Protocolo FaR-RMS - NCT04625907).

En el caso de los pacientes con RMS metastásico, los principales factores de riesgo descritos son la localización del tumor primario en las extremidades y otros sitios poco frecuentes, la edad (pacientes menores de 1 año y mayores de 9 años), la presencia de metástasis en hueso o médula ósea y la presencia de múltiples metástasis o múltiples lugares de metastatización (110,111). Actualmente, tanto en Europa como en Estados Unidos, se utiliza la puntuación de *Oberlin* para su estratificación por riesgo. Esta puntuación distingue dos subgrupos de pacientes con pronósticos claramente diferenciados: los pacientes con menos de dos factores de riesgo desfavorables, que presentan una supervivencia sin complicaciones (SSC) a 5 años del 40% y los pacientes con dos o más factores desfavorables, que tienen una SSC a 5 años de menos del 10% (112,113).

1.9. Tratamiento y supervivencia

El tratamiento de primera línea actual para el RMS consiste en una estrategia multimodal que combina cirugía, radioterapia y quimioterapia con el fin de controlar el avance local y sistémico de la enfermedad. El momento adecuado y la intensidad de cada una de estas modalidades terapéuticas varían en función de la estratificación por riesgo del paciente y de los posibles efectos adversos del tratamiento, que van desde

INTRODUCCIÓN

la infertilidad y cardiotoxicidad debida a los agentes alquilantes y antraciclinas, hasta el retraso en el desarrollo de los tejidos irradiados o la aparición de segundas neoplasias (67,82).

La aproximación terapéutica fundamental para todos los grupos de riesgo de RMS es la quimioterapia. Los regímenes más comúnmente administrados incluyen Vincristina, Actinomicina D y Ciclofosfamida (VAC) en Norteamérica, e Isofosfamida, Vincristina y Actinomicina D (IVA) en Europa (112). El control local se realiza mediante cirugía y/o radioterapia. La necesidad y la intensidad del tratamiento local se determinan en función de la reducción tumoral lograda por la quimioterapia. No obstante, un tratamiento local óptimo sigue siendo esencial en el tratamiento del RMS, pues la progresión local o la recurrencia siguen siendo las causas principales del fracaso del tratamiento (67).

La instauración de esta estrategia terapéutica multimodal durante la década de los 70 revolucionó el cuidado de los pacientes con RMS pediátrico e incrementó significativamente la supervivencia global tras cinco años hasta el 70% actual (Ilustración 378), con unas tasas de supervivencia libre de enfermedad a los 3 años del 86%, el 80%, el 68% y el 25% para los pacientes en los estadios I, II, III y IV, respectivamente (16,91,112,114). Desde entonces, los esfuerzos de los ensayos pediátricos colaborativos han permitido el aumento de las tasas de supervivencia hasta el 90% y la reducción de los efectos adversos del tratamiento en los pacientes de bajo riesgo. Sin embargo, el tratamiento para los pacientes con RMS de alto riesgo no ha experimentado avances significativos y las tasas de supervivencia para los pacientes con enfermedad recurrente o metastásica permanecen alrededor del 25% (112).

La caracterización molecular no solo supone una mejora de precisión en la estratificación por riesgo de los pacientes, sino que abre la ventana a la identificación de nuevas dianas moleculares y, por lo tanto, al empleo de nuevas terapias dirigidas que permitan incrementar las tasas de supervivencia actuales, especialmente, en los pacientes de alto riesgo (115). Las principales dianas terapéuticas estudiadas para el

tratamiento del RMS se basan en las dependencias moleculares de estos tumores. Siendo, el factor de transcripción quimérico PAX-FOXO1 la principal diana específica para los RMS-FP, el eje RTK/RAS/PI3K para los RMS-FN y la vía del desarrollo embrionario Hedgehog, los reguladores del ciclo celular, la apoptosis y la respuesta al daño en el ADN, estrategias plausibles en ambos subtipos (112,116).

Desgraciadamente, la aplicación de este conocimiento se ha visto limitada debido a la falta de recursos en el desarrollo de fármacos para enfermedades raras, como es el caso del cáncer infantil y más concretamente, del RMS. Hasta el momento, la mayoría de los ensayos clínicos abiertos para el RMS exploran medicamentos desarrollados para otros cánceres con mayor prevalencia (112).

Dadas las particularidades de los cánceres infantiles respecto a los cánceres comunes en adultos y el impasse evidente en las tasas de supervivencia, las esperanzas terapéuticas actuales residen en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas mediante la identificación de las vías responsables de la aparición y progresión de estas neoplasias (117).

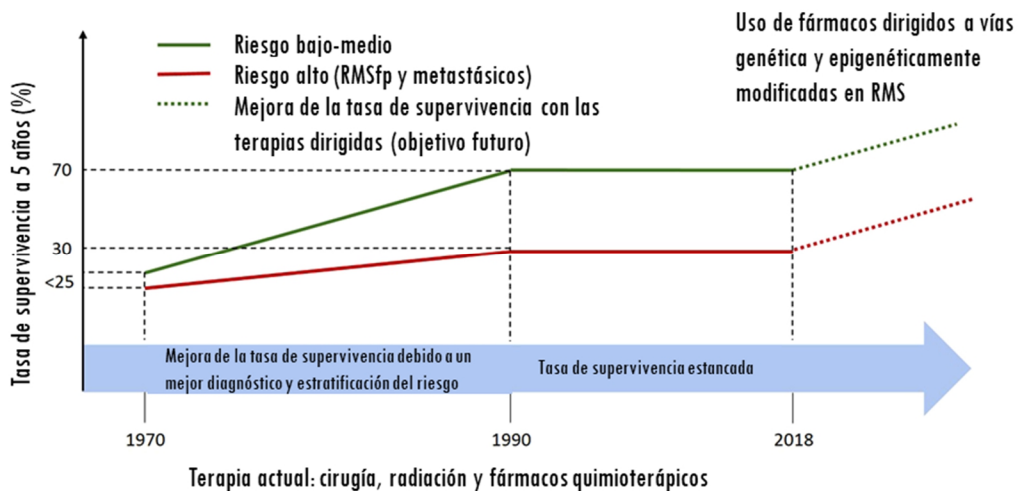


Ilustración 8.- Evolución de la tasa de supervivencia a 5 años del RMS desde 1970 hasta 2018. Imagen adaptada de Pal A, et al. 2019.

INTRODUCCIÓN

La filosofía general de esta tesis doctoral, enmarcada dentro de este contexto de necesidad, es la generación de conocimiento biológico-molecular que permita el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el RMS. En concreto, el proyecto se centra en el estudio de la vía del desarrollo Hh, citada previamente por su importancia en el posible origen del RMS (ver apartados INTRODUCCIÓN 1.3. y 1.5.1.) y como posible diana terapéutica en este mismo apartado.

La realización de esta tesis incluye la identificación de una nueva diana molecular con un potencial anti-oncogénico excepcional y el desarrollo y evaluación preclínica de un nuevo compuesto experimental –actualmente en fases nacionales en USA, UE y Japón–, como posible terapia dirigida contra el RMS. Complementando, de esta manera, el estudio molecular con una perspectiva más traslacional, que pretende abordar, no sólo el impasse en la supervivencia, sino también los inconvenientes asociados a las terapias actuales.

2. Vía de señalización Hedgehog

La señalización Hh fue descrita por primera vez en 1980 como una vía crucial para la regulación de la morfogénesis embrionaria en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. El origen del nombre Hedgehog (erizo) derivó del fenotipo puntiagudo –similar a las púas de un erizo– presente en la cutícula de las larvas con mutaciones en un nuevo locus identificado por Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus (118). Estudios posteriores caracterizaron molecularmente el gen *Hh*, y revelaron una sorprendente conservación evolutiva de este gen, considerado por Michael J. Fietz como el primer factor de señalización que regula procesos análogos en especies de diferentes filos (119–124). Este descubrimiento supuso un hito en la biología del desarrollo e inauguró un nuevo campo de investigación que permanece vigente.

Actualmente, la señalización Hh se estima como una vía fundamental en la regulación, no sólo de procesos del desarrollo embrionario como el patrón, la proliferación y la diferenciación de numerosos tejidos, sino también en el mantenimiento de las células madre, la reparación y la regeneración de los tejidos adultos en una multitud de

organismos (125). Dada la importancia de todos estos procesos, no es sorprendente que una señalización Hh aberrante sea la base de una gran variedad de enfermedades que van desde trastornos del desarrollo hasta múltiples tipos de cáncer. Sin embargo, a pesar del evidente potencial terapéutico, siguen existiendo brechas sustanciales en nuestra comprensión de los mecanismos que median su señalización (126,127).

La gran cantidad de funciones diversas asociadas a la señalización Hh y su elevada conservación evolutiva insinúan la alta complejidad de la vía. Uno de los principales impedimentos en su comprensión, además del alto grado de interacción habitual entre las vías del desarrollo embrionario, es su capacidad para modular las señales y transducirlas en respuestas distintas dependiendo tanto de la ubicación espacial y el tipo de célula receptora, como del gradiente y la duración de la exposición al ligando. El mecanismo de respuesta celular, a su vez, incorpora múltiples ciclos de retroalimentación que ajustan el nivel de señal en las células receptoras, complicando aún más el entendimiento de esta señalización (126,128–131).

Como la mayoría de las señalizaciones moleculares, la vía Hh puede descomponerse en sus componentes principales –inicialmente identificados en *Drosophila*–, incluyendo el ligando *hedgehog* (HH), el receptor transmembrana inhibidor *Patched* (PTC), el receptor transmembrana *Smoothed* (SMO) y el factor de transcripción *Cubitus interruptus* (CI). Brevemente, la señalización comienza con la unión de HH a su receptor PTC, activando una cascada de señalización que origina la activación de SMO y finaliza con la translocación de CI al núcleo y la posterior activación transcripcional de sus genes diana (132–134).

2.1. Evolución y componentes de la vía en mamíferos

En general, el mecanismo de señalización de la vía Hh se conserva entre las especies metazoarias, desde la mosca al mamífero. Sin embargo, existen algunos aspectos claramente divergentes. En primer lugar, cabe destacar la expansión de diferentes genes de la vía debido al fenómeno evolutivo de duplicación del genoma acaecido en los vertebrados. De este modo, los mamíferos presentan múltiples genes ortólogos de

INTRODUCCIÓN

varios componentes, incluidos tres genes homólogos del ligando *Hh*: *Sonic (SHH)*, *Desert (DHH)* e *Indian (IHH) Hedgehog*, dos receptores: *PTCH1* y *PTCH2* y tres ortólogos del factor de transcripción *Ci*: *GLI1*, *GLI2* y *GLI3*. En segundo lugar, existen genes homólogos con funciones discordantes no conservadas en mamíferos como, por ejemplo, la proteína quinasa *Fused (FU)*. Finalmente, además de genes homólogos a los descritos en *Drosophila*, los mamíferos presentan componentes específicos como *GAS1* y *HHIP*, no presentes en invertebrados (128,135–137).

Para entender mejor el funcionamiento de esta compleja señalización, introduciremos en primer lugar las bases estructurales y funcionales de sus componentes principales (resumidos en la Tabla 24) y sus genes diana.

2.1.1. Ligandos Hh

La existencia de los genes *Hh* en vertebrados fue descrita por primera vez en 1993 en ratón (*Mus musculus*), pez cebra (*Danio rerio*) y pollo (*Gallus gallus*) (123,138,139). Posteriormente, en 1995, su presencia fue reportada en humanos (124).

Aves y mamíferos poseen tres genes parálogos: *Sonic*, *Desert* e *Indian*, los cuales representan tres subfamilias diferentes que en algunas especies han vuelto a expandirse de nuevo. Como es el caso del pez cebra, que posee tres genes Hh extra: un miembro divergente de la subfamilia *Shh* llamado *Tiggywinkle (Twhh)* y dos miembros pertenecientes a la subfamilia *Ihh*, *Echidna (Ehh)* y *Qiqihar (Qhh)* (140). Existe un alto grado de homología entre todos ellos, conservado incluso entre las diferentes especies. Sin embargo, las subfamilias *Shh* e *Ihh* tienen una relación filogenética más estrecha, mientras que la subfamilia *Dhh* es más cercana al gen *Hh* inicialmente descrito en *Drosophila* (121,141).

A nivel funcional, las proteínas Hh actúan como morfógenos controlando múltiples procesos del desarrollo. Dado el alto grado de identidad de secuencia, se cree que todas ellas poseen efectos fisiológicos similares, siendo las diferencias funcionales, el resultado de diversos patrones de expresión. De este modo, SHH es la proteína Hh más ampliamente expresada y estudiada. Controla el patrón de los ejes izquierdo-

derecho y dorso-ventral del embrión mediante su expresión en tejidos de la línea media como el nodo, la notocorda y la placa del suelo del tubo neural, participa en el patrón de los ejes distales de las extremidades gracias a su expresión en la zona de actividad polarizante (ZPA, por sus siglas en inglés: *Zone of Polarizing Activity*) y finalmente, se expresa y afecta al desarrollo de la mayoría de los tejidos epiteliales. IHH regula el desarrollo de huesos y cartílagos mediante su expresión –en ocasiones parcialmente redundante con SHH– en el endodermo primitivo, el intestino y los condrocitos prehipertróficos de las placas de crecimiento de los huesos. DHH, cuya expresión se limita en gran medida a las gónadas –incluidas las células de Sertoli de los testículos y las células de la granulosa de los ovarios–, es esencial para el desarrollo de las células germinales y la formación de la vaina nerviosa periférica (126,128).

A nivel estructural, los ligandos Hh son sintetizados como péptidos precursores no funcionales (~45kDa) (Ilustración 38). Contienen dos dominios: un dominio amino-terminal (~19 kDa) con actividad de señal biológica y un dominio autocatalítico carboxi-terminal (~25kDa), que escinde la proteína en dos y permite una serie de modificaciones postraduccionales del fragmento funcional amino-terminal –contenedor de la señal biológica–, necesarias para su correcta actividad, secreción, distribución y recepción en los tejidos deseados. Estas modificaciones, incluyen la adición de un resto de colesterol al extremo carboxilo catalizada por el dominio autocatalítico y la palmitoilación de su extremo amino por la aciltransferasa Hedgehog (HHAT, del inglés: “*Hedgehog Acyltransferase*”) (141–145).

INTRODUCCIÓN

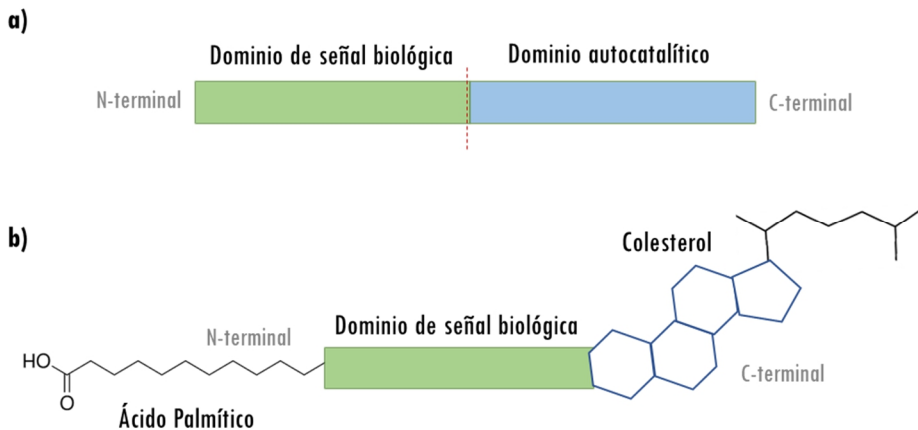


Ilustración 9. Características estructurales de las proteínas HH. a) Péptido Hh precursor no funcional. b) Péptido Hh funcional bilipidado. Imagen basada en Varjosalo M, et al. 2008.

El primer componente en interactuar con los ligandos Hh funcionales es la proteína transmembrana multipaso de la familia de transportadores RND (*Resistance-Nodulation-Division*) denominada *Dispatched (Disp)*. Su existencia fue reportada en 1999 en las células de *Drosophila* emisoras de señal Hh, donde su expresión era requerida para la correcta secreción de las proteínas Hh lipidadas y su correspondiente señalización a larga distancia (146). Se han descrito 3 homólogos en humanos: *Disp1*, *Disp2* y *Disp3*, siendo *Disp1* el más estudiado (147,148). A nivel estructural, es una proteína transmembrana que consta de un dominio intracelular N-terminal; 12 hélices transmembrana, entre las que se encuentra un dominio sensor de esterol (SSD, por sus siglas en inglés: *Sterol-Sensing Domain*) implicado en la homeostasis del colesterol; dos dominios extracelulares abiertos y un dominio intracelular carboxi-terminal (145,149). La reciente caracterización de DISP1 con microscopía crioelectrónica ha revelado la unión del ligando Hh bilipidado a los dominios extracelulares de DISP1, así como la presencia de restos de colesterol en su dominio transmembrana, confirmando así, su función como transportador Hh y remarcando la importancia de la modificación lipídica de los ligandos en este proceso (145).

Otra proteína cooperante con DISP en la secreción y el tráfico de los ligandos Hh es una glicoproteína presente en la superficie celular, SCUBE. Existen tres genes *SCUBE*

en humanos, siendo *SCUBE2* el más estudiado. A nivel estructural, *SCUBE2* consta de nueve repeticiones similares a EGF, tres dominios ricos en cisteína y un dominio CUB, el cual se requiere para la unión al colesterol del extremo carboxilo de los ligandos Hh. Es importante destacar que *DISP* y *SCUBE* reconocen diferentes aspectos estructurales del colesterol, hecho que apoya el modelo actual de secreción de los ligandos Hh dependiente de la interacción entre *DISP* y *SCUBE* (127,149).

2.1.2. Mediadores de la señalización Hh de membrana

Antes de introducir las principales moléculas involucradas en mediar la señalización Hh a nivel de membrana, es preciso introducir el cilio primario, estructura requerida para la correcta interacción de muchas de ellas.

La señalización Hh en mamíferos –a diferencia de la señalización en *Drosophila*– depende notablemente del cilio primario; un compartimento celular especializado con alta capacidad sensorial, debido al tráfico y la co-localización dinámica de muchos de los componentes de la vía, entre los que destacan *PTCH* y *SMO*. Estructuralmente, los cilios primarios son estructuras no móviles basadas en microtúbulos que se proyectan desde la superficie en la mayoría de las células de los vertebrados (143,150). Su importancia en el desarrollo fue revelada mediante experimentos genéticos de cilios mutantes que evidenciaron una función indispensable para la supervivencia y el patrón de los embriones de ratón. El análisis fenotípico, genético y bioquímico de estos mutantes demostró que la causa fenotípica real era la interrupción de la señalización Hh (151). Actualmente se postula una posible co-evolución de la señalización Hh y el cilio primario con el fin de concentrar los componentes de la señalización y permitir, de este modo, respuestas más eficientes con niveles de ligando menores (152).

Una vez secretados, el receptor principal de los ligandos Hh es Patched (*Ptc* en *Drosophila* y *PTCH1-2* en humanos) (136,153). Ingham *et al.* fueron los primeros en describir el inusual mecanismo de inhibición dependiente de ligando que ejercen las proteínas HH en el receptor *PTCH*, quien, a su vez, es un regulador negativo de la vía (129). *PTCH* ejerce su antagonismo de dos maneras: la primera es ligando

INTRODUCCIÓN

independiente, pues en ausencia de ligando, PTCH inhibe la actividad de SMO, un efector clave de la vía que introduciremos más adelante; la segunda es ligando dependiente y ocurre debido a la regulación positiva de la expresión de PTCH por la señalización Hh, tras lo cual las altas cantidades de PTCH secuestran el ligando y median su internalización endosomal (154,155).

Estructuralmente, PTCH1 es una proteína con doce segmentos transmembrana, dos dominios extracelulares que interactúan entre sí y un dominio C-terminal. La región transmembrana contiene un SSD –topológicamente similar al de DISP y otros transportadores RND–, lo cual permite anticipar su capacidad de interacción con esteroides como el colesterol (127,156). En efecto, estructuras derivadas de la microscopía crioelectrónica confirman la interacción esteroide-dependiente entre los ligandos Hh y el sitio de unión del SSD de PTCH y, adicionalmente, describen un nuevo sitio de acoplamiento –formado por la aproximación de los dos dominios extracelulares– encargado de la recepción del ligando (157). Por el contrario, se ha descrito que los dominios citoplasmáticos de PTCH1 facilitan la interacción con otras proteínas involucradas tanto en la señalización canónica, como no canónica, de la vía Hh. En concreto, destaca el dominio C-terminal, el cual es necesario para la correcta e indispensable localización de PTCH1 en el cilio primario y la consecuente inhibición de SMO (156,158,159).

PTCH2 conserva una homología del 54% con PTCH1. Siendo las diferencias más obvias la pérdida de parte del dominio C-terminal citoplasmático y la divergencia en el dominio N-terminal y algunas regiones del dominio transmembrana (156,160–162). A nivel funcional, existe gran discusión entre ambos homólogos. Si bien estudios bioquímicos han demostrado la capacidad de ambos de unirse a los ligandos Hh con una afinidad similar y de regular la localización y actividad de SMO, existe una gran disparidad en el patrón de actividad y de expresión de ambos genes. Mientras *PTCH1* tiene una amplia expresión en todo el embrión, la expresión de *PTCH2* es menos ubicua –sólo abundante en la piel y los espermatocitos– y, además, podría estar limitada a las células secretoras de las proteínas HH. Estos resultados restringirían la función de

PTCH2 a tejidos concretos e incluso, a la regulación de la señalización autocrina, sugiriendo a *PTCH1* como el mediador principal de la señalización Hh (141,161). En cuanto a la disparidad funcional, ésta es claramente remarcable en los estudios de deficiencia genética, en los cuales los ratones deficientes en *PTCH2* tienen un desarrollo normal, en contraposición al fenotipo letal de los ratones que carecen de *PTCH1*. Estos estudios revelan un papel soslayable de *PTCH2* en el desarrollo embrionario, así como, su incapacidad para compensar las funciones de *PTCH1* (156). Sin embargo, varios artículos demuestran que en ausencia de *PTCH1*, *PTCH2* juega un papel crítico en la regulación de SMO, reivindicando de esta manera, el papel de *PTCH2* como un receptor funcional de los ligandos Hh que coopera con *PTCH1* en la regulación de las respuestas celulares adyacentes (163,164).

En vertebrados existe un antagonista de la señalización Hh de membrana adicional, denominado *Hedgehog Interacting Protein (HHIP)*. HHIP es una glicoproteína que se une a los ligandos HH con una afinidad comparable a la de *PTCH* (165). Su mecanismo de inhibición es ligando dependiente, pues secuestra físicamente el ligando en la superficie celular (154,166). Estructuralmente, se ha descrito la superposición de los lugares de unión a ligando de HHIP y *PTCH*, indicando una competición entre ambas moléculas por la unión de ligando (137).

En contraposición con los efectos inhibitorios de *PTCH* y HHIP, existen tres proteínas de membrana que funcionan como receptores accesorios o correceptores de los ligandos HH y promueven su señalización. Estos correceptores incluyen los genes *Interference Hedgehog (Ihog)* y *Brother of Ihog (Boi)* en *Drosophila melanogaster* y sus respectivos ortólogos en vertebrados: *Cell Adhesion Associated*, *Oncogene Regulated (CDO* o *CDON*, según se refiera a la proteína o el gen) y *Brother of CDO (BOC)*, así como el gen *Growth Arrest Specific 1 (GAS1)*, el cual carece de equivalente en *Drosophila* (126,167–170).

CDO y *BOC*, junto con sus ortólogos en *Drosophila*, constituyen una nueva familia de glicoproteínas de membrana conservadas, pertenecientes a la superfamilia de las

INTRODUCCIÓN

inmunoglobulinas. Ambas son proteínas de membrana de un solo paso y contienen una región extracelular que consta de cuatro (BOC) o cinco (CDO) repeticiones de inmunoglobulina y tres repeticiones de fibronectina tipo III (FNIII). Curiosamente, el modo de unión a los ligandos Hh no se ha conservado entre especies, difiriendo tanto en el dominio de unión –el primer dominio FNIII de IHOG y el tercer dominio FNIII de CDO–, como en la dependencia a diferentes cofactores –la interacción HH-IHOG requiere heparina, mientras la interacción HH-CDO es calcio-dependiente (171).

GAS1 es una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol (*GPI*, del inglés: *Glycosylphosphatidylinositol*) con un dominio extracelular homólogo a los receptores del *Glial Cell Derived Neurotrophic Factor* (GDNF) (126,170). A pesar de las diferencias estructurales con CDO y BOC, GAS1 recapitula sus propiedades de unión a los ligandos HH y optimiza su señalización (172). Además, todos ellos forman complejos homo- y heteroméricos con PTCH (173).

A nivel funcional, estudios recientes han demostrado que tanto *BOC*, *CDO* y *GAS1*, como sus homólogos en *Drosophila*, *Ihog* y *Boi*, son componentes necesarios para la transducción de la señal HH durante la embriogénesis (167,174). Sin embargo, en vertebrados existen diferencias entre las dependencias de cada tejido, por ejemplo; BOC y GAS1 parecen tener un papel redundante durante el desarrollo del cerebelo; BOC, GAS1 y CDO desempeñan papeles esenciales y superpuestos durante el patrón del tubo neural y la especificación de diferentes progenitores neuronales; CDO y BOC regulan conjuntamente la especificación y diferenciación de los miocitos esqueléticos y, de manera individual, BOC media la guía de los axones de las células ganglionares de la retina y CDO tiene un papel fundamental durante la formación de los ojos (167,173,175).

Finalmente, el último paso de la señalización HH de membrana es la activación de *Smoothened* (SMO), una proteína transmembrana de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés: *G Protein-Coupled Receptor*). A nivel estructural, contiene un dominio extracelular rico en cisteínas (CRD, del inglés:

Cystein-Rich Domain), un dominio transmembrana de 7 hélices y un dominio intracelular carboxi-terminal (176). A pesar de los primeros estudios realizados en *Drosophila* y de su papel esencial en la señalización Hh, SMO es incapaz de unirse a los ligandos HH y su regulación depende de PTCH (133,153). Sin embargo, el mecanismo de inhibición y posterior activación de SMO permanece sin dilucidar. Actualmente se diferencian dos requerimientos para su completa activación: el primero es su localización y acumulación en el cilio primario, hecho que, de la misma manera que en el caso de PTCH, depende del dominio C-terminal citoplasmático; el segundo, propuesto por analogía con los modelos cinéticos de los GPCR, podría consistir en una activación alostérica dependiente de la unión a pequeñas moléculas endógenas mediada por PTCH (159,177,178). La hipótesis principal sobre el mecanismo de regulación de SMO mediado por PTCH rechaza una posible interacción física – propuesta en artículos previos– y propone una regulación catalítica, en la cual PTCH– dada su homología con las bombas de expulsión de la familia RND– actuaría como un transportador a través de la membrana citoplasmática de pequeñas moléculas activadoras (oxiesteroles, colesterol) o represoras (Vitamina D3), que se unirían al dominio CRD de SMO induciendo cambios conformacionales que activarían o inactivarían su función (178–182). La activación de SMO desencadena una cascada de transducción de señales intracelulares que, en última instancia, promueven el tráfico y el procesamiento de los factores de transcripción GLI en el cilio primario (182).

2.1.3.Reguladores citoplasmáticos Hh

Los estudios genéticos en *Drosophila* permitieron la identificación de varias moléculas reguladoras del factor de transcripción CI, entre las cuales se encuentran *Costal2* (*Cos2*), *Fused* (*Fu*) y *Suppressor of Fused* (*Sufu*) (136).

FU es una serina/treonina kinasa indispensable en la señalización Hh en *Drosophila*, donde media la fosforilación de COS2 y SUFU y es esencial para la activación de CI en respuesta a los ligandos HH. Sin embargo, su relevancia funcional no ha sido conservada en la señalización Hh en mamíferos (151).

INTRODUCCIÓN

SUFU es uno de los principales reguladores negativos de la señalización Hh. Se trata de una proteína con dominio PEST, que impide la translocación nuclear y activación transcripcional de GLI mediante la formación de complejos inhibitorios en el citoplasma, la prevención de las modificaciones postraduccionales requeridas para la activación de GLI y el reclutamiento de la maquinaria de ubiquitinación responsable tanto del procesamiento de la forma represora de GLI, como de su completa degradación (183–185).

COS2 (KIF7 en vertebrados) es una proteína relacionada con las quinesinas –aunque carente de un dominio motor funcional– esencial para la señalización Hh en *Drosophila*. Presenta funciones duales: en ausencia de ligando participa en el procesamiento proteolítico de CI en su forma represora mediante el reclutamiento de múltiples quinasas, tales como la Proteína Quinasa A (PKA, por sus siglas en inglés: *Protein Kinase A*), la Caseína Quinasa 1 (CK1, por sus siglas en inglés: *Casein Kinase 1*) y la Glucógeno Sintasa Quinasa 3 Beta (GSK3B, por sus siglas en inglés: *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*); mientras que en presencia de ligando favorece la señalización Hh mediante la inhibición de SUFU. KIF7 conserva ambas funciones duales. Sin embargo, a pesar de las similitudes funcionales, existen diferencias en sus mecanismos de acción. Por un lado, COS2, a diferencia de KIF7, interacciona directamente con SMO y FU. Por otro lado, KIF7, quien a diferencia de COS2 conserva el dominio motor funcional, ha sido relacionado con el tráfico específico de la señalización HH en el cilio primario (151,186).

2.1.4. Factores de transcripción Hh

La activación transcripcional de los genes diana de la señalización Hh está mediada directamente por la familia de proteínas de unión al ADN con dedos de zinc, GLI, formada por los genes *GLI1*, *GLI2* y *GLI3* en mamíferos y su homólogo ancestral en *Drosophila*, *Cubitus interruptus* (*Ci*). Los genes *GLI* fueron hallados por primera vez debido a la amplificación de *GLI1* en glioblastoma –hecho del cual deriva su nombre,

Glioma-associated oncogene–y, posteriormente, fueron relacionados con la señalización Hh (187,188).

Todos presentan una estructura similar (Ilustración 39): comparten diferentes dominios C-terminal transactivadores; un dominio de unión al ADN formado por cinco dedos de zinc C2H2 en tándem que reconoce la secuencia consenso 5'-GACCACCCA-3' en el promotor de los genes diana, un dominio que contiene la señal de localización nuclear y, todos excepto *GLI1*, contienen un dominio represor N-terminal (126,182,189,190). Debido a esta diferencia estructural, los factores de transcripción Ci, GLI2 y GLI3 pueden funcionar como activadores o represores de la señalización, mientras que GLI1 funciona exclusivamente como un activador transcripcional (143,191,192). Varios estudios genéticos en ratones definieron como indispensables las funciones de GLI2 y GLI3 durante la embriogénesis y, en consecuencia, actualmente son considerados los mediadores principales de la señalización HH. Sin embargo, la expresión de GLI1, controlada directamente por GLI2 y GLI3, es prescindible durante el desarrollo, y por ello se postula como mero autorregulador de la señalización (191,193–196).

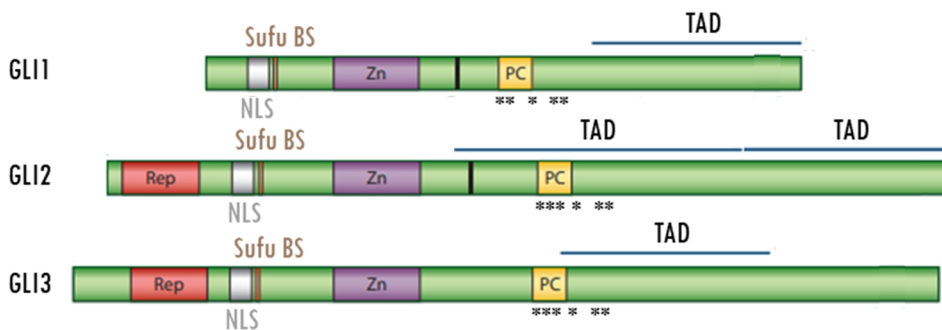


Ilustración 10. Estructura de los factores de transcripción GLI. Rep, Dominio represor; NLS, Señal de localización nuclear (del inglés: Nuclear Localization Sequence); Sufu BS, Sitio de unión a Sufu (del inglés Sufu Binding Site); Zn, Dominio de unión al ADN de dedos Zinc; PC, Lugar de fosforilación (del inglés Phosphorylation Cluster); *, lugar de fosforilación de PKA; TAD, Dominio transactivador (del inglés Transcription Activacion Domain). Imagen adaptada de Niewiadomski P et al. 2019.

De este modo, las proteínas GLI2 y GLI3 (denominadas conjuntamente GLI2/3) pueden existir en tres estados funcionales: represores transcripcionales procesados proteolíticamente (GLI2/3-R), factores de transcripción de longitud completa inactivos

INTRODUCCIÓN

(GLI2/3-FL) (FL, del inglés: *Full-length*) y factores de transcripción de longitud completa activos (GLI2/3-A) (192). La transición entre estos estados depende de las modificaciones postraduccionales y la localización celular de estas moléculas (Ilustración 40) (126,190).

La activación de los factores de transcripción GLI tiene lugar en el cilio primario (197). En ausencia de ligando, la forma inactiva GLI2/3-FL es fosforilada de manera secuencial, en primer lugar, por PKA y consiguientemente por GSK3B y CK1. Esta hiperfosforilación de GLI2/3-FL es reconocida por el complejo E3 ubiquitina ligasa Cul1/ β TrCP, comportando la ubiquitinación y degradación proteosomal del dominio transactivador C-terminal y dando lugar a la forma represora GLI2/3-R. Sin embargo, este procesamiento es extremadamente ineficiente en GLI2, donde la hiperfosforilación tiende a inducir la degradación completa, y no parcial, de la proteína. En consecuencia, GLI2 actúa principalmente como activador transcripcional, mientras que GLI3 constituye el represor fundamental de la vía (143,198,199). Cuando la vía se activa, las formas GLI-FL son liberadas del complejo represor formado por SUFU, permitiendo la translocación de las formas GLI2/3-A al núcleo y la consiguiente activación de su actividad transcripcional. Las formas transcripcionalmente activas, GLI2/3-A y GLI2/3-R, son menos estables y una vez en el núcleo, su degradación depende del complejo E3 ubiquitina ligasa Cul3/Spop. En definitiva, el equilibrio entre las formas GLI2/3-A y GLI2/3-R determina el programa transcripcional de la señalización HH de manera gradual (190,200,201).

A pesar de la evidente divergencia evolutiva, la actividad transcripcional de GLI1 también está regulada por diferentes modificaciones postraduccionales asociadas a la señalización HH, como la fosforilación inhibitoria, aunque no proteolítica, de PKA y las fosforilaciones activadoras de aPKC y DYRK1A, entre otras (126,202–204). Paralelamente, la activación transcripcional de GLI1 también puede ser independiente de Hh y estar regulada por numerosas vías de señalización (199). Finalmente, en discordancia con GLI2/3, la degradación proteosomal de GLI1 está mediada por NUMB y la E3 ubiquitina ligasa, ITCH (205).

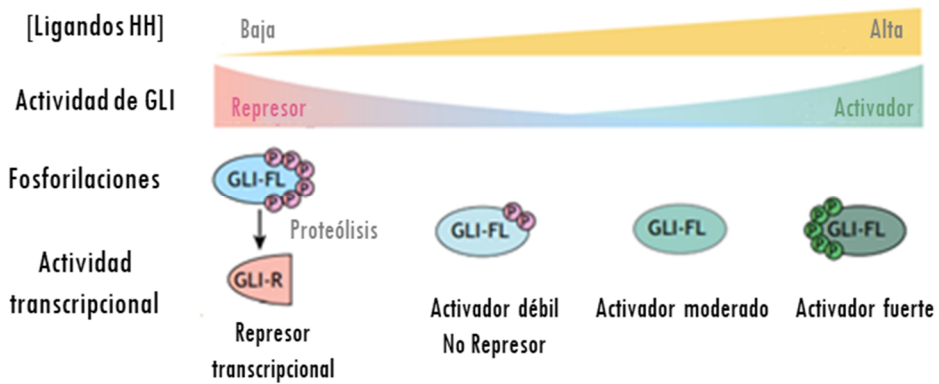


Ilustración 11. Modulación de la actividad transcripcional de GLI2/3. Imagen adaptada de Kong JH, et al. 2019.

2.1.5. Genes diana Hh

Los genes diana de la señalización Hh varían en función del contexto celular y el organismo (135,140). Para facilitar su identificación, se han llevado a cabo diferentes análisis genómicos que han revelado numerosos posibles genes diana directos de GLI (206–208).

Los genes diana más documentados son componentes propios de la vía, encargados de la retroalimentación positiva o negativa de la señalización en la mayoría de células, como es el caso de *GLI1*, *PTCH* y *HHIP*. Mientras el incremento de expresión de *PTCH* y *HHIP* proporciona una retroalimentación negativa, la activación de *GLI1* genera un bucle de regulación positivo (136,209,210).

Posteriormente, se han identificado también como dianas de la vía otros genes relacionados con funciones celulares tan diversas como la proliferación y diferenciación (*CCND1*, *CCND2*, *CCNE1*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *MYCN*, *WNT*, *SFRP1*, *NEUROG1*, *NEUROD*, *ASCL1*, *PDGFRA*, *IGF2*, *FOXM1*, *FOXA2*, *NKX2-2*, *FOXF1*, *PAX6*, *PAX7*, *PAX9*, *RUNX2*, *MYF5*, *HES1*, *IGFBP3*, *E2F1*, *CDC45*, *TGFB1*), la supervivencia (*BCL2*, *CFLAR*), la angiogénesis (*VEGF*, *ANGPT2*), la transición epitelio-mesénquima (*BMI1*, *NANOG*, *SOX2*, *SNAIL*, *SIP1*, *ELK1* y *MSX2*, *ZEB1*) y la invasión (*SPP1*, *NCAM*, *CDH1*) en diferentes tejidos (209,211–214).

INTRODUCCIÓN

| Componentes | Función | Gen | Tipo de Proteína |
|-----------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------|
| Ligandos | Iniciadores de la señalización | SHH | Péptidos bilipidados secretados |
| | | IHH | |
| | | DHH | |
| Reguladores de ligando | Palmitoilación | HHAT | Aciltransferasa |
| | Tráfico y secreción | DISP 1-3 | Transmembrana (12 TMD) |
| | Tráfico y secreción | SCUBE 1-3 | Glicoproteína (superficie) |
| Mediadores de membrana | Receptor principal | PTCH 1-2 | Transmembrana (12 TMD) |
| | Correceptores | BOC | Glicoproteína (membrana) |
| | | CDO | Glicoproteína (membrana) |
| | | GAST | Anclada a GPI |
| | Receptor antagonista | HHIP | Glicoproteína (membrana) |
| Iniciador de la transducción | SMO | Receptor acoplado a proteína G (7TMD) | |
| Reguladores citoplasmáticos | Complejo represor | SUFU | Proteína con dominio PEST |
| | Activador de transcripción dual | KIF7 | Quinesina |
| Factores de transcripción | Activador transcripcional | GLI1 | Factor de transcripción |
| | Represor y principal activador transcripcional | GLI2 | Factor de transcripción |
| | Activador y principal represor transcripcional | GLI3 | Factor de transcripción |
| Modificadores post-traduccionales | fosforilación | PKA | Quinesina |
| | fosforilación | GS3KB | Quinesina |
| | fosforilación | CK1 | Quinesina |
| | Ubiquitinación citoplasmática GLI2/3 | CUL1/ βTrCP | Complejo E3 ubiquitina-ligasa |
| | Ubiquitinación nuclear GLI2/3 | CUL3/SPOP | Complejo E3 ubiquitina-ligasa |
| | Ubiquitinación GLI1 | NUMB/ITCH | Complejo E3 ubiquitina-ligasa |

2.2. Mecanismo de acción

La activación de la vía Hh puede ocurrir de manera canónica, mediante la activación ligando-dependiente de sus receptores, o no canónica, a través de mecanismos alternativos de algunos de sus componentes.

2.2.1. Vía Hh canónica

El primer paso de la señalización canónica de la vía Hh es la síntesis y maduración de los ligandos. Después de la traducción, las proteínas Hh entran en la vía secretora y experimentan una escisión autoproteolítica y dos modificaciones lipídicas –la adición de un resto de colesterol en el extremo carboxilo y la palmitoilación del extremo amino-terminal– (Ilustración 389), que originan la liberación de un péptido de señalización bilipídico de 19kDa (127,212). Ambas modificaciones lipídicas, confieren una alta hidrofobicidad a los ligandos HH, provocando su retención en la membrana plasmática (141,215). Una vez en la membrana, DISP interacciona con la fracción de colesterol del ligando HH y, a través de un mecanismo de desplazamiento de la unión del colesterol, transfiere los ligandos Hh a la proteína SCUBE secretada en el espacio extracelular, quien, posteriormente, solubiliza y libera los ligandos Hh (145,149,215). En el espacio extracelular, las distancias a recorrer por estos ligandos hasta las células receptoras de la señal difieren entre los tejidos, pero pueden llegar hasta 300µm. Durante estos largos recorridos, las modificaciones lipídicas son esenciales para la estabilidad y movilidad de las proteínas HH solubles (128,210).

El tráfico de los ligandos hasta el receptor de membrana PTCH de la célula destinataria es un mecanismo poco clarificado, en el que participan varias proteínas de membrana involucradas en la recepción de HH, como CDO, BOC, GAS1 y HHIP. Particularmente, los correceptores CDO, BOC y GAS1 interactúan con el ligando mediando su unión a PTCH de una manera esencial para la señalización (127,143,215). Por el contrario, HHIP funciona como un mero antagonista de PTCH, compitiendo con éste por la unión a los ligandos.

INTRODUCCIÓN

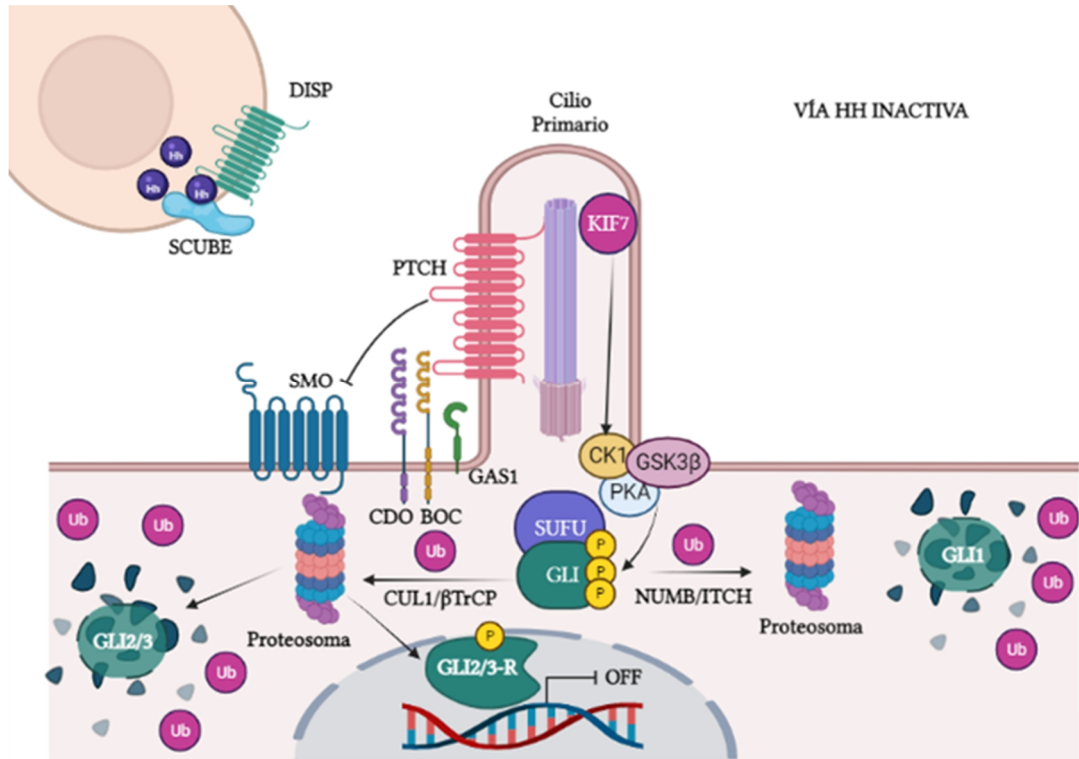


Ilustración 12. Señalización Hedgehog inactiva. En ausencia de ligando, PTCH bloquea la localización ciliar de SMO. Los factores de transcripción GLI se encuentran en la base del cilio primario, inhibidos por el complejo represor formado por SUFU. Finalmente, KIF7 atrae a las quinasas PKA, CK1 y GSK3B, quienes fosforilan las formas inactivas de GLI y median su degradación proteosómica. GLI1 es completamente degradado por el proteosoma gracias a la ubiquitinación mediada por NUMB e ITCH. GLI2 y GLI3 son ubiquitinados por el complejo CUL1/βTrCP pueden ser degradados completa o incompletamente por el proteosoma. La degradación incompleta de GLI2/3 da lugar a las formas GLI-R, las cuales son translocadas al núcleo e inhiben la transcripción de los genes diana. Imagen propia creada con Biorender (BioRender.com).

PTCH es un inhibidor constitutivo de la vía dado que en ausencia de ligando bloquea la actividad de SMO (Ilustración 41). La unión de los ligandos Hh a PTCH, conlleva su traslado del cilio primario a la membrana plasmática y su posterior degradación endosomal. La inhibición funcional de PTCH permite la activación de SMO y su acumulación en el cilio primario, dando comienzo a la transducción de la señalización HH en la célula receptora, la cual finaliza con la transcripción de los genes diana de la vía (Ilustración 42). La actividad transcripcional de la señalización HH está mediada por el equilibrio entre las formas represoras (GLI-R) y activadoras (GLI-A), de los factores de transcripción GLI (Ilustración 40). De este modo, en ausencia de ligando

GLI-FL y SUFU forman un complejo represor que viaja hasta la punta del cilio primario. Allí, KIF7 promueve la hiperfosforilación secuencial de GLI-FL por PKA, CK1 y GSK3B, provocando la degradación proteosómica de su dominio transactivador y permitiendo la liberación de la forma represora GLI-R, la cual es rápidamente translocada al núcleo para reprimir la expresión de los genes diana de la vía (Ilustración 12). En cambio, la activación y translocación de SMO al cilio primario tras la recepción de los ligandos Hh, modula el papel de KIF7, quien en lugar de promover la proteólisis de GLI-FL, causa su disociación del complejo represor formado por SUFU y permite su translocación a núcleo y la consiguiente activación transcripcional de los genes diana Hh (Ilustración 42) (143,152,209,216,217).

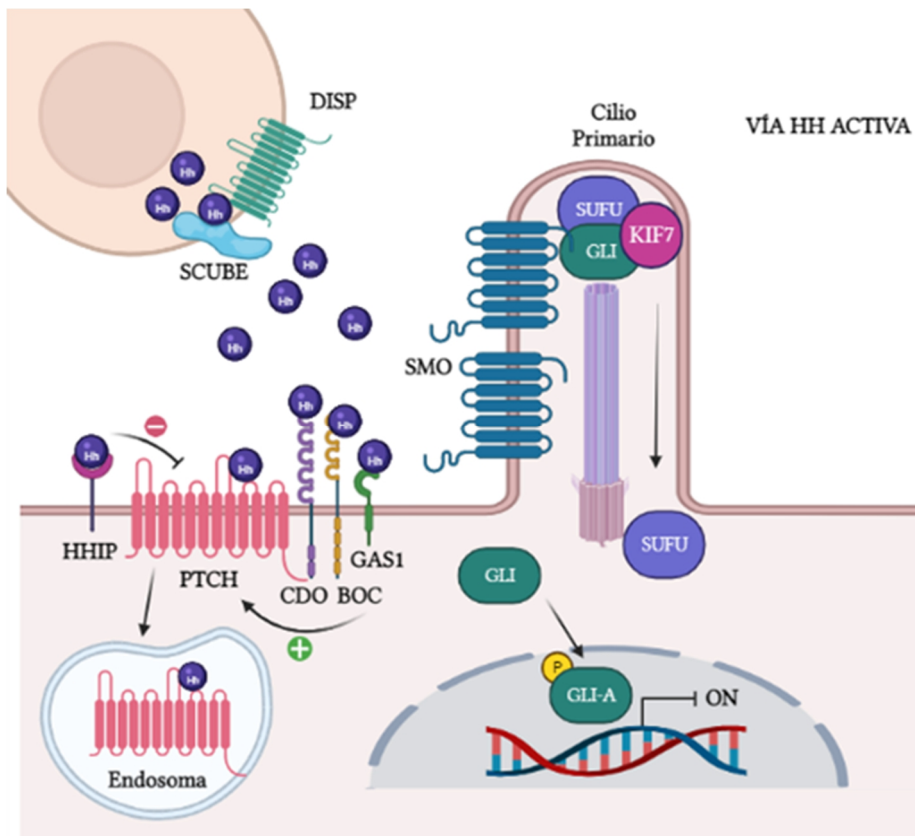


Ilustración 13. Señalización Hh activa. La unión de los ligandos HH (esfera morada) a PTCH, provoca la translocación de PTCH fuera del cilio primario y la internalización y posterior degradación endosomal de ambos. SMO se traslada y acumula en el cilio primario, donde libera a la familia de factores de transcripción GLI del complejo represor, permitiendo su activación y translocación a núcleo, donde estimulan la transcripción de los genes diana de la vía. Imagen propia creada con Biorender (BioRender.com).

INTRODUCCIÓN

Finalmente, la fuerza y duración de la señalización Hh se regula a través de un complejo mecanismo de retroalimentación que actúa a nivel de ligando y que depende de gradientes espacio-temporales (Ilustración 43). El modelo propuesto, describe que las células cercanas a una fuente de ligandos Hh expresan los correceptores GAS1, CDO y BOC, encargados de estimular y amplificar la señalización, para garantizar la transmisión de la señal incluso a bajas concentraciones de ligando. A medida que aumentan las concentraciones de HH, la activación de la vía induce la expresión de PTCH y HHIP, los cuales secuestran los ligandos HH y restringen la continuación de la señalización. Por el contrario, la expresión de GAS1, CDO y BOC, generalmente está regulada negativamente por la señalización HH. Por lo tanto, el mecanismo de retroalimentación reside en el aumento de la concentración de proteínas de unión a ligando inhibitoras y la reducción de las proteínas de unión a ligando estimulantes tras una activación prolongada de la vía, modulando así, las posibles respuestas celulares posteriores (166,170,175).

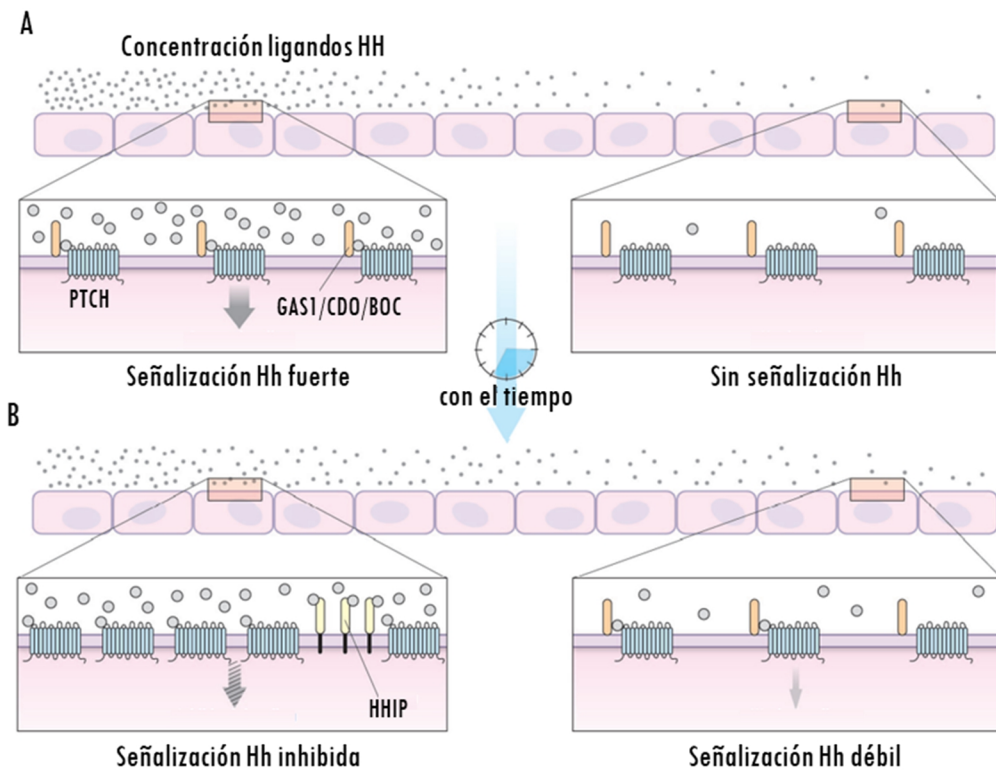


Ilustración 14. Regulación de la señalización Hh mediante el gradiente espacio-temporal de los ligandos y la expresión controlada de las proteínas reguladoras de unión a ligando. **A** Antes de que comience la señalización, tanto las células cercanas (izquierda), como las distantes (derecha) a la fuente de ligandos, expresan el receptor PTCH1 y los correceptores GAS1, CDO y BOC en la membrana. La acumulación de los ligandos provoca una fuerte señalización Hh en las zonas cercanas, mientras las células distantes no disponen de suficiente ligando como para iniciar la señalización. **B** Con el tiempo, la fuerte señalización experimentada en las células cercanas provoca la pérdida de expresión de los correceptores GAS1, CDO y BOC y aumenta la expresión de los inhibidores de ligando PTCH1 y HHIP, inhibiendo la señalización. Por el contrario, las células distantes, mantienen la expresión de los correceptores, los cuales permiten la detección de pequeñas cantidades de ligando y desencadenan la señalización Hh. Imagen adaptada de Kang JS, et al. 2007.

2.2.2. Vía Hh no canónica

Recientemente, se han descrito diferentes mecanismos de señalización Hh, denominados no canónicos, que involucran funciones alternativas de los componentes principales de la vía y que clasificaremos en tres grupos (218):

1. Grupo 1: Mecanismos dependientes de PTCH
2. Grupo 2: Mecanismos dependientes de SMO
3. Grupo 3: Mecanismos dependientes de GLI

2.2.2.1. Mecanismos dependientes de PTCH

El primer grupo incluye funciones de PTCH alternativas a la inhibición de SMO. Por un lado, PTCH puede actuar como receptor de dependencia, desencadenando respuestas apoptóticas en ausencia de ligando Hh (219). Concretamente, el mecanismo de muerte celular propuesto depende de la activación de la Caspasa 9 (CASP9) a través de la interacción de PTCH con un complejo de proteínas, entre las cuales se encuentra la proteína adaptadora DRAL (*Down-regulated in rhabdomyosarcoma LIM protein*) (220). Por otro lado, PTCH también es capaz de regular el ciclo celular. En este caso, en ausencia de ligando, PTCH interacciona con la Ciclina B1 (CCNB1) fosforilada, impidiendo su translocación nuclear y, por ende, reduciendo el índice mitótico (221).

2.2.2.2. Mecanismos dependientes de SMO

El segundo grupo comprende las actividades mediadas por SMO independientes de GLI. La mayoría de estas funciones alternativas se asocian a su condición de GPCR. Entre ellas, destaca la capacidad de remodelación citoesquelética a través de la

INTRODUCCIÓN

activación de las GTPasas RhoA y Rac1 o de la familia de quinasas Src. Ambos mecanismos son esenciales durante el desarrollo embrionario, pues permiten la regulación de la migración celular en fibroblastos y la guía de axones en neuronas, respectivamente (222). Otra de las funciones no canónicas de SMO ampliamente descrita, es la regulación del flujo de calcio durante el desarrollo de la médula espinal. Concretamente, la activación de SMO dependiente de ligando produce un pico de acumulación de este ion, encargado de la regulación de una cantidad de procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la migración neuronal (223). De hecho, curiosamente, la elevación de los niveles de calcio intracelular ha sido asociada a un aumento de expresión de los ligandos Hh, por lo que este mecanismo no canónico podría incluso contribuir positivamente a la señalización canónica (221).

2.2.2.3. Mecanismos dependientes de GLI

Finalmente, el tercer grupo hace referencia a los mecanismos de activación de GLI ligando-independientes y, por lo tanto, también independientes de PTCH y SMO. Este tipo de señalización Hh no canónica se investiga principalmente en el contexto de neoplasias y enfermedades malignas (ver apartado INTRODUCCIÓN 2.3.1.4.) (224). Las principales moléculas y/o vías de señalización capaces de eludir el eje de activación ligando-dependiente de Hh descritas son RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K, TGFB y PKC (224–226).

Brevemente, el primer indicio de una regulación positiva de la vía HH por la señalización RAS-RAF-MEK-ERK provino de un estudio que demostró que la expresión constitutiva de MEK1 induce la expresión y actividad de GLI1. Adicionalmente, se describió el mismo efecto tras la expresión constitutiva del mutante KRAS oncogénico, así como, un aumento de la estabilización de GLI2 mediado por la activación del eje EGF-ERK1/2. La vía PI3K-AKT también promueve la estabilización de GLI2, evitando las fosforilaciones por PKA y GSK3B que median la degradación proteosomal. Respecto a TGFB, diferentes estudios describen una rápida inducción transcripcional

de GLI2 y posterior activación de GLI1, mediada por la cooperación de SMAD3 y B-Catenina con el promotor de GLI2. Paralelamente, dado que TFGF es uno de los genes diana de GLI3-R, recientemente se ha planteado la hipótesis de una posible retroalimentación negativa entre la activación de GLI1 y GLI2 dependiente de TGF β y la regulación negativa de éste, mediada por GLI3-R. Finalmente, existe cierta controversia respecto al control que ejercen las isoformas PKC α y PKC δ sobre la actividad transcripcional de GLI1, pues, en ambos casos existen estudios contradictorios que defienden tanto una regulación positiva como negativa de GLI1(225–227).

El motivo por el cual todas las evidencias previamente descritas regulan únicamente la activación de GLI1 y GLI2, y no GLI3, es que la mayoría de los estudios realizados han centrado sus investigaciones en los entonces considerados como principales activadores transcripcionales de la vía, GLI1 y GLI2, obviando el posible papel de GLI3 (225,226). Sin embargo, recientemente se han descrito posibles mecanismos de regulación de la actividad transcripcional de GLI3 independientes de HH como, por ejemplo, el que tiene lugar en las células de cáncer de próstata, donde la unión de GLI3 a receptores de andrógenos reprime el procesamiento proteolítico necesario para la formación de GLI3-R y, por lo tanto, favorece la señalización de GLI3-A (226,228).

2.3. Señalización Hh en cáncer

La importancia de la vía Hh en el desarrollo es notoria dadas las consecuencias fenotípicas de su desregulación. La inactivación de la vía provoca deficiencias cerebrales, faciales y distales de las extremidades, tales como, holoprosencefalia, microcefalia, ciclopía y polidactilia, así como, varias malformaciones congénitas, entre las que se incluyen el síndrome de cefalopolisindactilia de Greig, el síndrome de Gorlin y el síndrome acrocalloso (199,218).

Los avances de la biología del desarrollo permitieron identificar numerosas similitudes, biológicas y moleculares, entre el desarrollo embrionario temprano y la tumorigénesis con respecto a la coordinación de los comportamientos celulares proliferativos,

INTRODUCCIÓN

invasivos y transformativos. Esta visión favoreció la intersección entre la biología del desarrollo y la biología del cáncer, proporcionando una nueva perspectiva en la investigación oncológica (229).

Una de las vías del desarrollo embrionario convertida posteriormente en una importante diana terapéutica de interés contra el cáncer, es la vía Hh (182). Concretamente, la activación aberrante de la señalización Hh puede promover la tumorigénesis regulando mecanismos tan importantes como la transformación y progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a fármacos (218). El primer indicio que relacionó la vía Hh y el cáncer fue la asociación entre el síndrome de Gorlin y el carcinoma de células basales esporádico (BCC, por sus siglas en inglés: *Basal Cell Carcinoma*) con mutaciones en el gen *PTCH1*. El síndrome de Gorlin, también conocido como síndrome de carcinoma nevoide de células basales, es un trastorno autosómico dominante que predispone tanto al cáncer como a defectos en el desarrollo. Los pacientes afectados de este síndrome presentan una alta incidencia de BCCs y meduloblastomas (MB), así como, un mayor riesgo de padecer otros tumores como RMSs, fibrosarcomas, fibromas ováricos y cardíacos, etc. (230,231). Desde entonces, la vía Hh ha sido relacionada con numerosos tipos de cáncer, incluyendo tumores cerebrales, cáncer de páncreas, mama, colon, ovario, cánceres hematológicos y carcinoma de pulmón de células pequeñas, entre otros. De hecho, según las últimas estimaciones, la vía Hh contribuye al desarrollo de al menos un tercio de todos los tumores malignos (209,214).

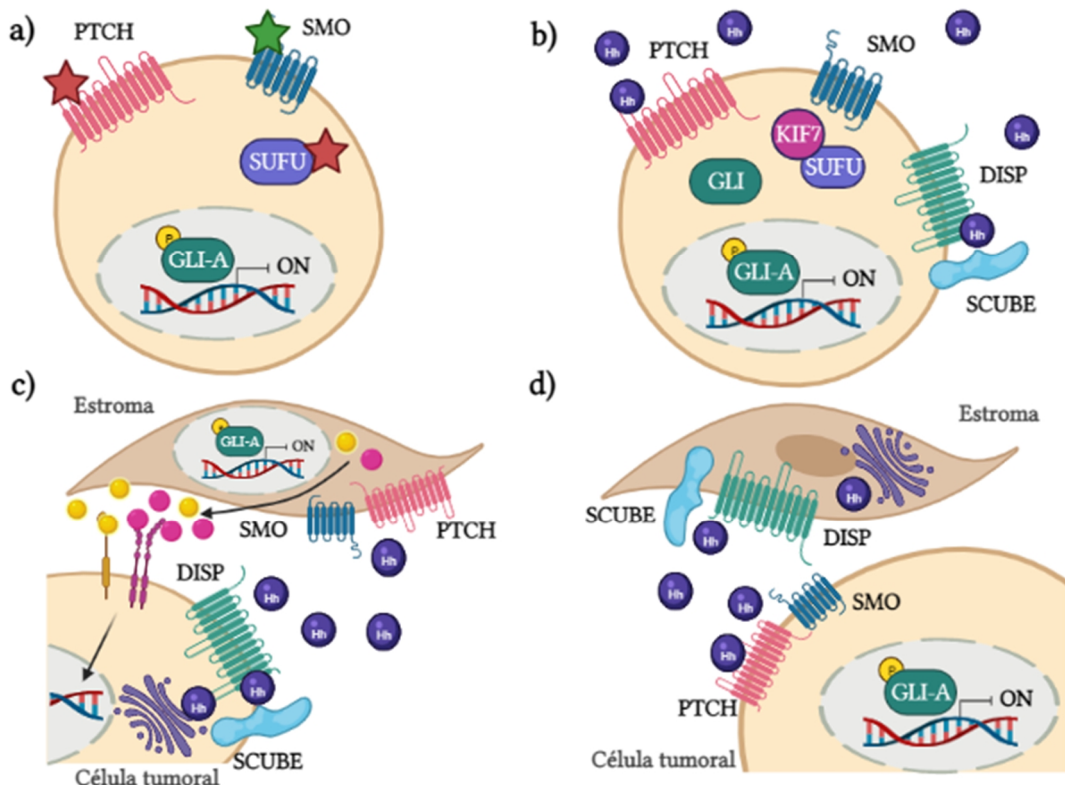
En concreto, se han descrito tres funciones principales de la vía Hh durante el desarrollo del cáncer: iniciadora del desarrollo tumoral, promotora oncogénica y factor de resistencia al tratamiento. De este modo, la desregulación de la vía Hh por sí sola, puede impulsar la aparición de BCC, MB, RMS y tumores del estroma gastrointestinal, actuando, por lo tanto, como iniciadora del desarrollo tumoral. Sin embargo, en el cáncer de pulmón de células pequeñas, la activación de la vía Hh aumenta la agresividad del tumor, pero no es capaz de originar su aparición, por lo que, en este caso, la vía tiene un papel pro-oncogénico. Finalmente, en otros tumores como la

leucemia mieloide aguda, la vía Hh está involucrada en la supervivencia de las células tumorales residuales, responsables de la recurrencia del cáncer después de la terapia (224).

2.3.1. Modelos de activación aberrante de la vía Hh en cáncer

La desregulación de cualquier componente de la vía puede desencadenar su activación aberrante, promoviendo la transformación maligna en diferentes tipos de cánceres. En concreto, se han propuesto tres mecanismos de activación aberrante de la señalización Hh en cáncer (Ilustración 4415) (209,214,218):

- Tipo I: Activación independiente de ligando (Ilustración 44 a)
- Tipo II: Activación autocrina/yuxtacrina dependiente de ligando (Ilustración 15 b)
- Tipo III: Activación paracrina dependiente de ligando (Ilustración 15 c-d)



INTRODUCCIÓN

Ilustración 15. Mecanismos de activación aberrante de la vía Hh. **a)** Activación de tipo I: activación constitutiva de la vía independiente de ligando, causada por la presencia de mutaciones inactivadoras (estrella roja) o activadoras (estrella verde) en diferentes componentes de la vía. **b)** Activación de tipo II: activación autónoma de las células mediante la secreción autocrina de ligando. **c)** Activación de tipo III: activación paracrina de las células del estroma dependiente de la secreción de ligando por las células tumorales y la consiguiente reestimulación tumoral mediante el envío desde el estroma al tumor de otras señales de crecimiento o supervivencia dianas de la vía Hh. **d)** Activación de tipo IIIb: activación paracrina inversa, en la cual las células del estroma secretan el ligando Hh y activan la señalización en el tumor. Imagen propia creada con Biorender.

2.3.1.1. Tipo I: Activación independiente de ligando

El modelo de activación tipo I está causado por mutaciones en componentes principales de la señalización Hh que suscitan una activación constitutiva de la vía independiente de ligando (Tabla 25). Esta activación aumenta la actividad transcripcional de *GLI*, incrementando la expresión de los genes diana de la vía Hh y promoviendo la tumorigénesis (Ilustración 44 a) (232).

Los desencadenantes más frecuentes de este tipo de activación son mutaciones inactivadoras de *PTCH1* o mutaciones activadoras de *SMO*. También se han descrito mutaciones de pérdida de función en *SUFU* y amplificaciones y ganancias de función de los factores de transcripción *GLI* (88,187,209,230,233–235).

Los principales tumores asociados a este tipo de activación aberrante son los BCC y MB. De hecho, cerca del 90% de los BCC y más del 30% de los MB esporádicos presentan una activación aberrante de la vía Hh causada principalmente por mutaciones en *PTCH1* o, en menor medida, por mutaciones en *SMO* (214,218). Curiosamente, en MB se ha reportado una gran heterogeneidad molecular dependiente de la edad. Siendo la pérdida de *PTCH1* común en todas las edades, la de *SMO* en adultos y la de *SUFU* más común en niños (236,237). El papel de *SUFU* en cáncer se ha vuelto cada vez más claro gracias a las nuevas publicaciones que describen el impacto de las mutaciones de este gen en la salud. Recientemente, alrededor del 5% de los casos de Síndrome de Gorlin han sido asociados a mutaciones en *SUFU* (232,238). Sin embargo, su implicación como desencadenante en algunos tumores, incluyendo MB y RMS, es compartida, dado que los ratones heterocigotos (*SUFU*^{+/-}), al contrario que lo ratones (*PTCH*^{+/-}), requieren otra mutación cooperadora, como la

pérdida de P53 (P53^{-/-}), para iniciar el desarrollo tumoral (239). Finalmente, en cuanto a los factores de transcripción GLI, desde la identificación de GLI1 en glioblastoma, la implicación de GLI1 en cáncer ha sido la más estudiada (187). Se han descrito amplificaciones, aunque poco frecuentes, en diversos tipos de sarcomas y tumores cerebrales infantiles (240,241). Las amplificaciones en GLI2 han sido principalmente descritas en el carcinoma de células escamosas (242). Sin embargo, dado que estas amplificaciones involucran otros posibles oncogenes, es difícil confirmar un papel oncogénico directo de las amplificaciones en GLI (243). Posteriormente, estudios genéticos han permitido la identificación de nuevas mutaciones en los genes GLI1 y GLI3, probablemente asociadas con ganancias de función en cáncer de mama y páncreas, así como polimorfismos en GLI3 que predisponen a la aparición de cáncer colorrectal (244–246). Adicionalmente, se ha reportado la presencia de una nueva variante de *splicing* de GLI1, asociada con una mayor motilidad y capacidad invasiva en glioblastoma y cáncer de mama (247,248). Una lista más completa de las mutaciones en estos genes asociadas a cáncer puede encontrarse en bases de datos como por ejemplo COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

INTRODUCCIÓN

| Gen | Tipo de Mutación | Tumores afectados | Referencias |
|--------------------------|------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| PTCH1 | Pérdida de función | BCC | Han H et al. 1996 |
| | | MB | Wolter M 1997 |
| | | RMS | Han H et al. 1998 |
| | | Gástricos | Wang X et al. 2013 |
| | | Leucemia | Burns MA et al. 2018 |
| PTCH2 | Pérdida de función | Leucemia | Dagklis a et al. 2015 |
| SMO | Ganancia de función | BCC | Reifenberger J et al. 1998 |
| | | MB | Reifenberger et al. J 1998 |
| SUFU | Pérdida de función | BCC | Reifenberger J et al. 2005 |
| | | MB | Taylor MD et al. 2002 |
| | | Próstata | Sheng T et al. 2004 |
| | | RMS | Tostar U et al. 2006 |
| | | Leucemia | Burns MA et al. 2018 |
| | Metilación | Glioblastoma | Liu X et al. 2014 |
| GLI1 | Amplificación | Glioblastoma | Kinzler KW et al. 1988 |
| | | RMS y Osteosarcoma | Roberts WM et al. 1989 |
| | Mutación sin sentido * | MB | Wasson JC et al. 1990 |
| | | Mama | Sjoblom T et al. 2006 |
| | | Páncreas | Jones S et al. 2008 |
| Variante <i>splicing</i> | Glioblastoma | Lo HW et al. 2009 | |
| | Mama | Cao X et al. 2012 | |
| GLI2 | Amplificación | Carcinoma de células escamosas | Snijders AM et al. 2005 |
| | | MB | Kool M et al. 2014 |
| GLI3 | Mutación sin sentido * | Páncreas | Jones S et al. 2008 |
| | Polimorfismo | Colorrectal | Lascorz J et al. 2010 |
| | Ganancia de función | Leucemia | Burns MA et al. 2018 |

2.3.1.2. Tipo II: Activación autocrina dependiente de ligando

El mecanismo de activación aberrante tipo II se basa en la sobreexpresión de los ligandos HH en las células tumorales (Ilustración 44 b). Una vez secretado, el ligando es captado en la misma célula tumoral (activación autocrina) o en las células tumorales cercanas (activación yuxtacrina). Este tipo de activación es común en cáncer de próstata, de colon, de páncreas, de ovario, de mama, de pulmón de células no pequeñas y en carcinomas hepatocelulares, melanomas y gliomas. Además de la sobreexpresión de los ligandos HH, la mayoría de estos tumores se caracterizan por mostrar una expresión ectópica de PTCH1 y GLI (214,232).

2.3.1.3. Tipo III: Activación paracrina dependiente de ligando

Finalmente, en el modelo de activación tipo III las células tumorales secretan los ligandos para estimular la activación de la vía en las células del estroma. Esta activación en el estroma desencadena la expresión de los genes diana Hh y el envío de señales y factores pro-oncogénicos a las células tumorales, para promover su crecimiento o supervivencia (Ilustración 44 c) (232,249).

Los cánceres con este tipo de activación muestran altos niveles de expresión de los ligandos Hh, pero, sin embargo, no presentan expresión de los genes diana de la vía (GLI1, GLI2 y PTCH1), cuya expresión sólo es detectable en las células del estroma. Entre los tumores con este tipo de activación destacan los cánceres de próstata, páncreas y colon (214,250).

Existe una nueva variante de este mecanismo de activación, conocida como la señalización paracrina inversa de tipo IIIb (Ilustración 44 d). En este caso, el estroma secreta los ligandos HH y activa la señalización en las células tumorales. Este mecanismo sólo ha sido descrito en neoplasias hematológicas, como linfomas de células B, mielomas múltiples y leucemias, en los que los tumores reciben el ligando

INTRODUCCIÓN

HH secretado directamente por las células del estroma de la médula ósea o de los ganglios linfáticos (214,250).

Los tres tipos de activación aberrante de la vía Hh descritos previamente involucran la señalización canónica de la vía. Sin embargo, la activación no canónica de los factores de transcripción GLI (ver apartado INTRODUCCIÓN 2.2.2.3.) también ha sido descrita como mecanismo de activación aberrante en muchos cánceres (232).

2.3.1.4. Activación Hh no canónica en cáncer

De este modo, la interacción de la vía Hh con otras vías, es capaz de promover la tumorigénesis. Por ejemplo, en cáncer de mama, la activación de GLI2 mediada por TGFB provoca la aparición de metástasis óseas (251). Adicionalmente, la activación de la vía Hh mediada por TGFB es notoria en cáncer de páncreas, cáncer gástrico y cáncer de colon (232). En el caso concreto del cáncer de páncreas, la activación no canónica de GLI1 y GLI2 a través de TGFB y KRAS promueve la transformación maligna y la supervivencia celular (252). Además de contribuir al cáncer de páncreas, la activación no canónica dependiente de KRAS también ha sido observada en melanoma, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón y mielomas múltiples, entre muchos otros (232).

La vía PI3K-AKT induce un aumento de expresión de GLI1 y GLI2 asociado con el crecimiento y la progresión tumoral en el cáncer renal y la leucemia linfocítica crónica. Asimismo, la interacción entre la vía PI3K y la señalización HH se ha relacionado con la resistencia terapéutica en cáncer de mama (225). Por el contrario, en neuroblastoma la vía PI3K/AKT2 inhibe la actividad transcripcional de GLI1 (227).

Por último, destaca el *crossalking* existente entre las otras dos vías principales del desarrollo embrionario, Notch y Wnt. Del mismo modo que Hh, Notch y Wnt tienen un papel fundamental en el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia en multitud de tejidos. Estudios recientes muestran un complejo mecanismo de regulación entre estas vías, a diferentes niveles, que afecta la regulación transcripcional en función del contexto celular y que, en algunos casos, se han descrito como mecanismos pro-

oncogénicos (253,254). Por ejemplo, se ha descrito la capacidad del factor de transcripción de la vía Notch, HES1, de promover la resistencia terapéutica en Glioblastoma, mediante la modulación de GLI1 (253). Adicionalmente, también se ha descrito un papel significativo de la interacción entre Hh y Notch en la biología del cáncer y la resistencia a la quimioterapia de las células madre tumorales, en cáncer de próstata y en adenomas pituitarios (254). Finalmente, la activación aberrante de la vía Hh dependiente de la vía Wnt/ β -Catenina, ha sido descrita en diversos tumores, destacando el BCC, el cáncer intestinal, de colon, leucemias, tumores cerebrales y el cáncer de ovario (232).

2.3.2. Los componentes de la vía Hh en cáncer

Dada la relevancia de la vía en cáncer, se ha descrito un papel para prácticamente todos los componentes principales de la vía como supresores tumorales o protooncogenes. De esta manera, los reguladores positivos de la vía tales como los ligandos HH, SMO y los factores de transcripción GLI, son habitualmente considerados protooncogenes, mientras que los inhibidores de la vía, PTCH y SUFU, frecuentemente son contemplados como supresores tumorales (230,232,239,255). Sin embargo, la regulación de estos componentes varía en función del tipo de cáncer, tal y como podemos apreciar en los resultados del metaanálisis de perfiles de expresión génica de la señalización Hh realizado por S Fattahi et al. (Tabla 26) (256).

Inesperadamente, a pesar de que la mayoría de tumores se asocian a una activación ligando dependiente de la vía, la mayoría de investigaciones oncológicas han desestimado el papel de los interactores directos de los ligandos, a excepción de PTCH, en la progresión tumoral. Recientemente, se ha revelado un gran potencial antioncogénico tras la sobreexpresión de HHIP en cáncer gástrico y de pulmón, reafirmando la posible función de este inhibidor de la vía como supresor tumoral (257,258). El papel de GAS1 en cáncer sí ha sido relativamente estudiado, aunque existe cierta controversia en la literatura. Mientras la mayoría de los estudios relacionan GAS1 con funciones de supresor tumoral, como la detención de la

INTRODUCCIÓN

proliferación y la inducción de la apoptosis, otros autores han reportado su actuación como represor de la apoptosis y, por lo tanto, impulsor de la supervivencia celular. Finalmente, todos estos estudios han promovido la consideración de GAS1 como una proteína pleiotrópica, que puede ejercer diferentes funciones e interactuar con diferentes efectores moleculares dependiendo del contexto celular (259). Los correceptores CDO y BOC son los menos estudiados. Por un lado, en 2014 se publicaron dos artículos que relacionaron la expresión de BOC con la progresión del meduloblastoma. Concretamente, ambos defienden que la señalización Hh mediada por BOC causa altos niveles de daño en el ADN, lo cual promueve la pérdida de heterocigosidad de PTCH1 y, en consecuencia, la progresión del meduloblastoma (260,261). Adicionalmente, Mille *et al.* reportaron la presencia de altos niveles de expresión de BOC en estos tumores, así como una marcada reducción de la proliferación de las células iniciadoras del tumor tras su inactivación (260). Por otro lado, el primer indicio que relacionó la expresión de CDO con la progresión tumoral fue publicado en 2011. Hayashi T *et al.* identificaron la sobreexpresión de CDO en un 83% de las muestras analizadas de cáncer de próstata. Además, la inhibición de CDO *in vitro* indujo la apoptosis y redujo la capacidad de invasión de la línea celular DU145, sugiriendo un gran potencial terapéutico de CDO en cáncer de próstata (262). Posteriormente, Leem *et al.* asociaron la sobreexpresión de CDO a cánceres de pulmón de alto grado y reportaron una reducción de la proliferación y tumorigenicidad tras el silenciamiento genético de CDO mediante siRNA (263). Finalmente, Mathew *et al.*, reportaron la expresión de los tres correceptores GAS1, CDO y BOC, en los fibroblastos asociados al cáncer de páncreas, siendo éste un modelo de gran interés en el estudio de la vía Hh, dado el fallo clínico de los inhibidores actuales. Adicionalmente, descubrieron una sorprendente dependencia de los niveles Hh en el crecimiento y la angiogénesis de estos tumores. Mientras la reducción de la señalización Hh mediante la delección simultánea de los correceptores GAS1 y BOC provoca una mayor vascularización y crecimiento tumoral *in vivo*, la abrogación casi completa de la vía

mediante la delección de los tres correceptores (GAS1, BOC y CDO) ocasiona una reducción de la tumorigénesis del cáncer de páncreas (264).

| Componentes | Tipo de regulación | Cáncer |
|-------------|--------------------|------------------------------|
| SHH | Sobreexpresado | Ovario, Cerebral |
| | Infraexpresado | Renal, Pulmón |
| IHH | Sobreexpresado | Suprarrenal |
| | Infraexpresado | Cabeza y cuello, Pulmón |
| DHH | Sobreexpresado | Ovario |
| | Infraexpresado | Renal, Páncreas |
| DISP1 | Sobreexpresado | Cerebral |
| | Infraexpresado | Ovario, Pulmón |
| SCUBE2 | Sobreexpresado | Ovario, Cerebral |
| | Infraexpresado | Colorrectal, Cabeza y cuello |
| PTCH1 | Sobreexpresado | Ovario |
| | Infraexpresado | Renal |
| GAS1 | Sobreexpresado | Cerebral |
| | Infraexpresado | Mama, Renal, Próstata |
| GSK3B | Sobreexpresado | Leucemia |
| GLI1 | Sobreexpresado | Próstata |
| | Infraexpresado | Renal |
| GLI2 | Sobreexpresado | Cerebral |
| GLI3 | Sobreexpresado | Páncreas |
| | Infraexpresado | Colorrectal, Mama, Pulmón |

Tabla 8. Metaanálisis de perfiles de expresión génica de los componentes de la señalización Hh realizado mediante CancerMA. Tabla basada en Fattahi S, et al. 2018.

INTRODUCCIÓN

2.3.3. Señalización Hh en el RMS

Volviendo la atención al cáncer que nos ocupa, tal y como hemos comentado al principio de este apartado, la desregulación de la vía Hh por sí sola puede impulsar la aparición de RMS (224). Concretamente, se cree que los RMS-FN muestran una mayor activación de la vía en comparación con los RMS-FP y, además, esta hiperactivación se correlaciona con un peor pronóstico (265).

El primer indicio sobre esta relación fue el aumento de la incidencia de RMS en los pacientes afectados del síndrome de Gorlin, siendo a su vez, uno de los primeros indicios que asentaron el papel de la vía Hh en cáncer (230,231). En 1998, Hahn *et al.* estableció el primer modelo murino de RMS dependiente de la vía Hh. Los autores demostraron que los ratones haplodeficientes en *Ptch1* recapitulan la incidencia de RMS observada en los pacientes con síndrome de Gorlin (88). En consecuencia, todos los RMS derivados de los ratones *Ptch*^{+/-} mostraron una sobreexpresión de *Gli1* y de *Igf2*—siendo este último un gen sumamente relevante en RMS, cuya importancia fue descrita previamente (ver apartado INTRODUCCIÓN 1.2.) y cuya epistasis con *Ptch* ha sido confirmada en estudios posteriores— (265). Desde entonces, se han reportado numerosos modelos murinos diseñados genéticamente para el estudio de la relación entre el RMS y la vía Hh (266). Por ejemplo, la eliminación genética de *Tp53* en ratones *Ptch*^{+/-} aumenta la incidencia de RMS observada en los ratones *Ptch*^{+/-}, en contraposición con la combinación de la pérdida heterocigota de *Sufu*, tras la cual no se observa un efecto significativo en la frecuencia de RMS, hecho que descarta una participación genética cooperante entre *Sufu* y *Ptch*. Por si sola, la pérdida alélica de *Sufu* provoca la aparición de lesiones cutáneas microscópicas. Sin embargo, la pérdida de *Tp53* favorece la capacidad tumorigénica de *Sufu*, ocasionando que los ratones *Tp53*^{-/-} *Sufu*^{+/-} desarrollen RMS con una frecuencia similar a la de los ratones *Ptch*^{+/-} (209,239,265). Otro componente de la vía cuya haploinsuficiencia genética en ratones ha sido relacionada con una baja frecuencia de RMS, es el inhibidor de la vía, *Hhip* (267). Finalmente, el modelo murino de RMS esporádico más eficiente es el propuesto por Mao *et al.*, en el cual la expresión ubicua de una forma constitutivamente activa de

Smo, denominada SmoM2, genera la aparición de RMS en ratones con una penetrancia del 100%. De manera similar a los RMSe, los tumores derivados de la expresión de SmoM2 mostraron un marcado aumento de la expresión de MyoD, Myogenina y, de nuevo, Igf2. Adicionalmente, los autores analizaron el efecto de la regulación positiva de la señalización Hh en el músculo posnatal mediante el marcaje de Ki67, como indicador proliferativo, y de miogenina, como marcador de diferenciación. Sin embargo, a diferencia de las células tumorales, las células musculares analizadas no expresaron ninguno de los dos marcadores, sugiriendo que la activación constitutiva de *Smo* en células musculares más diferenciadas no es suficiente para generar un fenotipo proliferativo, ni para revertir el nivel de diferenciación celular (268). En concordancia, recientemente Rajurkar *et al.* proporcionaron información similar referente al vínculo entre la activación aberrante de la vía Hh y el contexto celular responsable de la tumorigénesis del RMS. En este estudio, los autores concluyeron que los RMSe inducidos por la vía Hh surgen de poblaciones no miogénicas. Esta conclusión concuerda con el estudio de Mark E. Hatley *et al.*, en el cual la expresión de SmoM2 en células progenitoras de adipocitos desencadena el desarrollo de RMSe y con el resto de los indicios que apoyan el origen mesenquimal del RMS expuestos en el apartado INTRODUCCIÓN 1.3. (80,265,269). Tal y como comentamos previamente en ese apartado, en contraposición con estos estudios, Rubin *et al.* demostraron que la inactivación de *Ptch1* junto con la pérdida de *Tp53* origina la aparición de RMS en una amplia gama de células del linaje muscular, incluyendo células satélite, mioblastos tempranos y mioblastos más diferenciados (78,265). En conjunto, a pesar de las discrepancias expuestas respecto al contexto celular, todos estos hallazgos revelan la trascendencia de la vía Hh en la tumorigénesis del RMS.

Sin embargo, a pesar de ser uno de los primeros tumores asociados con la vía Hh y de la consistencia del papel de esta vía en el RMS, existen pocos estudios y grandes controversias respecto al mecanismo de activación aberrante de la vía en RMS (209,270). Apoyados en el modelo murino de Hahn *et al.*, diversos estudios defienden una activación de la vía de tipo I, es decir, ligando independiente, destacando la

INTRODUCCIÓN

pérdida de la región cromosómica de *PTCH* (chr9) común en los RMS-FN (Tabla 21), la pérdida de *SUFU* en un 18% de los RMSe, la detección de pequeñas amplificaciones en *GLI2* en un gran porcentaje de RMSs, así como la identificación de la amplificación en la región 12q13-15, contenedora de *GLI1*, como una de las alteraciones genéticas cooperantes más frecuentes en los RMS-FP (Tabla 2) y también presente en los RMS-FN (61,62,88,271,272). Sin embargo, estas alteraciones sólo representan a un pequeño subgrupo de RMS y numerosos estudios rechazan la implicación de mutaciones en los componentes de la vía. En concreto, los estudios discrepantes con esta teoría describen que la mayoría de los casos de RMS esporádicos carecen de eventos mutacionales, pero, sin embargo, presentan altos niveles de expresión de *GLI1* y *PTCH*, descartando así, una activación de la vía Hh de tipo I (209,273,274). Del mismo modo, la activación autocrina, o de tipo II, fue rechazada tras el análisis de expresión de *SHH*, indetectable en la mayoría de los pacientes analizados (271,274). No obstante, nuestro grupo fue el primero en confrontar esos estudios y confirmar una activación de la vía ligando dependiente, enmascarada hasta el momento por la subestimación de los ligandos Hh alternativos, *IHH* y *DHH*. De esta manera, fuimos los primeros en reportar una expresión preponderante de los ligandos *DHH* e *IHH*, tanto en líneas celulares como en tumores de pacientes de RMS (Ilustración 45). Además, también confirmamos su papel oncogénico, mostrando una clara reducción del crecimiento tumoral en xenoinjertos murinos tras el silenciamiento genético de cada uno de los ligandos.

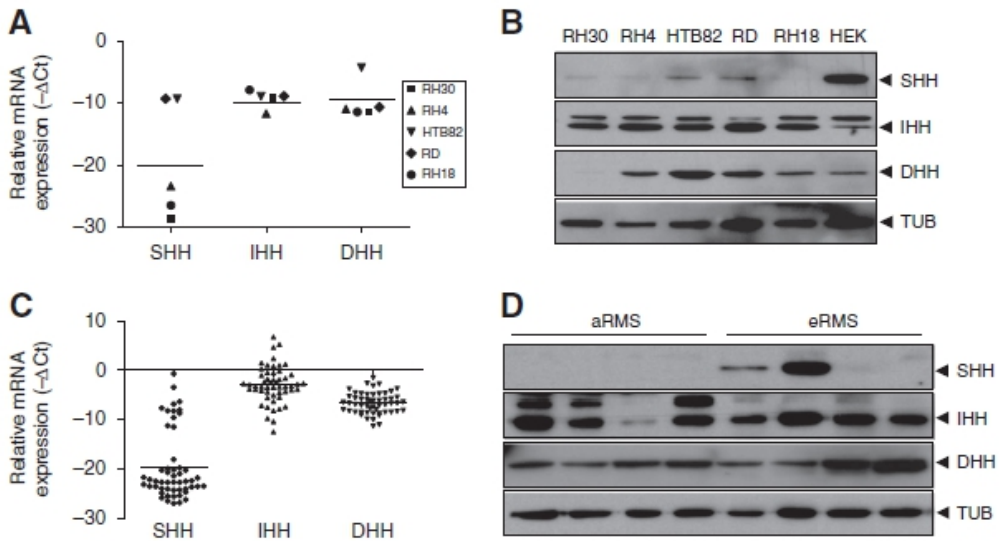


Ilustración 16. Expresión de los ligandos Hh en líneas y pacientes de RMS. **A** y **C**: Expresión relativa de ARNm mediante RT-qPCR en líneas celulares y tumores de pacientes, respectivamente. **B** y **D**: Expresión de proteína mediante Western Blot en líneas celulares y tumores de pacientes, respectivamente. Figura de Almazán-Moga A, et al. 2017.

2.4. Inhibidores de la señalización Hh

La importancia de la vía Hh en la biología tumoral ha convertido a esta vía del desarrollo embrionario en un atractivo objetivo para el diseño terapéutico, desencadenando el desarrollo de numerosos inhibidores para el tratamiento del cáncer (275). Sin embargo, a pesar de los numerosos esfuerzos, actualmente sólo existen 3 inhibidores de Hh aprobados tanto por la Agencia europea de medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés *European Medicines Agency*) como por la Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*), el Vismodegib, el Sonidegib y el Glasdegib (276,277).

Los inhibidores de la vía Hh existentes actualmente pueden clasificarse en tres grupos en función de su nivel de actuación en la vía (227):

1. Inhibidores de SMO
2. Inhibidores de la interacción HH-PTCH
3. Inhibidores de los factores de transcripción GLI

INTRODUCCIÓN

Esta clasificación, junto con el conocimiento del mecanismo de activación aberrante de la señalización Hh del tumor (ver apartado INTRODUCCIÓN 2.3.1.), es de extrema importancia en la asignación del tratamiento. De esta manera, podemos predecir que los fármacos inhibidores de SMO no serán eficaces en los tumores con activación de la cascada de señalización por debajo de SMO (209). Un claro ejemplo que refleja esta predicción es el caso de los meduloblastomas. Mientras la mayoría de los pacientes adultos albergan mutaciones en PTCH1 y SMO (alrededor del 80%) y muestran una gran sensibilidad a los inhibidores de SMO, los MB infantiles con frecuencia presentan mutaciones en componentes que actúan por debajo de SMO (alrededor del 40%), provocando la resistencia intrínseca de estos pacientes a los fármacos dirigidos contra SMO (237). A parte de esta evidencia, se ha observado que los cánceres dependientes de ligando tienen requisitos diferentes de los cánceres de tipo I. Por lo tanto, durante la evaluación preclínica de estos inhibidores, en primer lugar, es importante seleccionar el modelo de tumor adecuado para realizar los experimentos. Por ejemplo, la naturaleza paracrina de las líneas colorrectales provoca una clara respuesta a los antagonistas de Hh *in vivo*, indetectable, sin embargo, en los experimentos *in vitro*. Adicionalmente, también se ha detectado una mayor sensibilidad de los antagonistas de Hh en tumores con activación de tipo I respecto a los tumores ligando dependientes, para los cuales se plantea una estrategia terapéutica combinada con otros fármacos como herramienta más eficaz (250).

2.4.1. Inhibidores de SMO

Actualmente, la mayoría de las terapias dirigidas contra la vía Hh se han centrado en el desarrollo de inhibidores de SMO (278). De hecho, el primer inhibidor de la vía HH fue descubierto mucho antes que la propia vía. En 1968 identificaron la ciclopamina, un compuesto alcaloide presente en la planta *Veratrum californicum* que causaba un fenotipo muy severo de holoprosencefalia, denominado ciclopía, en la descendencia de las ovejas que ingerían esta planta. Casi tres décadas después, se descubrió que la ciclopamina es un inhibidor de SMO, asociando la ciclopía observada en los corderos con la infra-regulación de la señalización HH (279).

Desde entonces, la ciclopamina ha sido usada ampliamente en el estudio de la vía Hh en cáncer, mostrando una inhibición del crecimiento tumoral en múltiples modelos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la ciclopamina no es adecuada para la aplicación clínica debido a su escasa solubilidad oral y baja especificidad y potencia farmacológica (227). Este hecho ha potenciado el desarrollo de numerosos compuestos inhibidores de SMO con mejores propiedades farmacológicas. Destacan el Vismodegib (GDC-0449) y el Sonidegib (LDE225), ambos aprobados por la EMA y la FDA para el tratamiento del BCC recurrente, localizado avanzado o metastásico y el Glasdegib (PF-04449913), recientemente aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (276,280–282). Vismodegib y Sonidegib también han demostrado cierta eficacia terapéutica en ensayos clínicos del subtipo SHH-MB y de otros tumores sólidos avanzados (283,284). Siguiendo la lógica usada en la asignación del tratamiento en función del mecanismo de activación aberrante de la vía en el tumor, los inhibidores de SMO han sido empleados en tumores con una activación canónica ligando-dependiente de la vía, tales como el cáncer de páncreas, de ovario y el cáncer colorrectal. Sin embargo, a pesar de las grandes esperanzas depositadas en estos inhibidores, los ensayos clínicos realizados en estos tumores han fracasado, en algunos casos, incluso empeorando la respuesta del placebo (285–288). Además, gran parte de los tumores sensibles a los inhibidores de SMO adquieren resistencia al tratamiento. Los principales mecanismos de resistencia descritos son: la mutación D473H en SMO –la cual impide la unión de SMO a Vismodegib–, la amplificación de genes diana de la vía Hh como *GLI2*, *MYCN* y *CCND1*, la pérdida de *SUFU* y la sobreexpresión de otras señalizaciones oncogénicas, como la vía PI3K/AKT (237,289).

2.4.2. Inhibidores de la interacción HH-PTCH

Diversos modelos preclínicos han demostrado la inhibición de la señalización Hh mediante la privación de interacción entre los ligandos HH y el receptor PTCH. A pesar de que este tipo de inhibidores aún no han alcanzado el interés suficiente para su

INTRODUCCIÓN

desarrollo clínico, cabe mencionar la existencia de dos anticuerpos monoclonales, 5E1 y MEDI-5304, capaces de bloquear esta unión con baja afinidad (nano y picomolar, respectivamente). El anticuerpo E51 ha demostrado capacidad antitumoral en modelos de ratón de cáncer de mama y de páncreas, disminuyendo el tamaño del tumor primario y de las metástasis. Adicionalmente, también fue eficaz como monoterapia en un modelo murino de meduloblastoma, inhibiendo el crecimiento tumoral y prolongando la supervivencia, así como en combinación con radiación y quimioterapia en modelos derivados de pacientes (PDX, por sus siglas en inglés *Patient-Derived Xenograft*) de cánceres esofágicos y de cuello uterino. El MEDI-5304, aunque desarrollado más recientemente, también ha manifestado cierta actividad antitumoral mediante la inhibición paracrina de la señalización Hh en modelos de ratón (227,250,290,291). Recientemente, se ha desarrollado la caracterización preclínica de un nuevo anticuerpo Ab 1C11-2G4, dirigido contra el extremo C-terminal de SHH, que ha manifestado una reducción de la viabilidad en 7 líneas de cáncer y una inhibición significativa del crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de cáncer de pulmón (292).

Adicionalmente, también se han desarrollado dos moléculas pequeñas; un inhibidor del ligando SHH, denominado robotnikinin y RU-SKI, un inhibidor de la HHAT que dificulta la palmitoilación de los ligandos, impidiendo su correcta maduración. Aún no se ha descrito ningún efecto antitumoral del robotnikinin en modelos preclínicos. Sin embargo, algunos estudios han evidenciado una reducción de la proliferación celular y el crecimiento en suspensión de células de cáncer de mama y del crecimiento tumoral de tumores pancreáticos tras el tratamiento con el inhibidor RU-SKI (227,290).

2.4.3. Inhibidores de los factores de transcripción GLI

Los primeros inhibidores de GLI desarrollados, GANT58 y GANT61, son capaces de bloquear la unión al ADN de GLI1 –y GLI2, en el caso de GANT61–, exhibiendo una reducción de la proliferación y el crecimiento tumoral (293). A pesar de la multitud de modelos preclínicos que demuestran un claro efecto antitumoral de GANT61, ninguna de estas moléculas ha entrado en un ensayo clínico (290).

Posteriormente, se identificó la Glabresciona B (GlaB), una isoflavona naturalmente presente en las semillas de *Derris glabrescens* (Leguminosae), con capacidad de inhibir la interacción de GLI1 con el DNA. El fuerte efecto inhibitor de GlaB sobre la actividad de GLI1, conllevó a la inhibición del crecimiento tumoral de tumores dependientes de Hh y redujo la capacidad de autorrenovación y clonogenicidad de células madre tumorales en estudios *in vitro* e *in vivo* (294).

Otro compuesto natural capaz de inhibir la actividad de GLI1 es la Genisteína. La Genisteína es también, al igual que GlaB, una isoflavona aislada de *Genista tinctoria* que se encuentra ampliamente disponible en legumbres y vegetales. A pesar de que se desconoce el mecanismo de inhibición que ejerce sobre GLI1, muchas de sus propiedades antitumorales han sido atribuidas a la supresión de la vía Hh. Su efecto antitumoral ha sido, y está siendo, evaluado en varios ensayos clínicos de fase I y II. Hasta ahora, el tratamiento con Genisteína ha mostrado eficacia en cáncer de próstata y ha tenido resultados mixtos en cáncer de páncreas. Sin embargo, como suele ser el caso de los compuestos naturales, frecuentemente se evalúa como un agente de prevención (290).

Otros inhibidores preclínicos de GLI son los Inhibidores de la Vía Hedgehog 1-4 (HPI1-4, por sus siglas en inglés *Hedgehog Pathway Inhibitors*), los cuales afectan, mediante diferentes mecanismos, el procesamiento o activación de GLI. HPI1 inhibe la actividad endógena y exógena de GLI1 y GLI2. HPI2 y HPI3 bloquean la capacidad de conversión de GLI2-FL en GLI2-A y HPI4 impide la ciliogénesis necesaria para el tráfico y la señalización Hh (232).

Por último, recientemente se ha demostrado la capacidad del trióxido de arsénico (ATO, del inglés *Arsenic Trioxide*), un compuesto aprobado para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, de inhibir la actividad transcripcional de GLI1 en el núcleo y reducir la capacidad de tránsito y acumulación de GLI2 en el cilio primario. En consecuencia, varios estudios han demostrado su capacidad de incrementar la apoptosis, reducir el crecimiento tumoral y disminuir los genes diana Hh *in vitro* e *in*

INTRODUCCIÓN

vivo en diversos tumores asociados a Hh (227,295). Sin embargo, ATO no es un inhibidor específico de la vía Hh y presenta algunas contraindicaciones graves, como es el caso de la prolongación del intervalo QT (parámetro visible en el electrocardiograma que representa la duración total de las fases de despolarización y repolarización del corazón y es usado como índice marcador de arritmias ventriculares) (290,296).

Por lo tanto, a pesar de las grandes expectativas y recursos dedicados a la inhibición de la vía Hedgehog como tratamiento antitumoral, por el momento, sólo los inhibidores de SMO están aprobados para su uso clínico. Sin embargo, tanto la rápida aparición de resistencia terapéutica asociada a estos inhibidores, como la falta de eficacia en los tumores ligando-dependientes o con mutaciones por debajo de SMO, evidencian la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de inhibición de la vía Hh que consigan reproducir los efectos preclínicos antioncogénicos observados y esperados tras la inhibición de la vía (232,270).

2.5. Inhibición de la vía Hh en el RMS

Numerosos grupos han descrito estudios preclínicos con inhibidores de Hh en RMS, sin embargo, estos trabajos han resultado ser desafiantes dada la heterogeneidad de las respuestas observadas.

Un estudio realizado por Ridzewski *et al.* compararon el grado de inhibición de la vía Hh y el potencial de inhibición de la proliferación, la inducción de apoptosis y la modulación de la diferenciación, de cuatro inhibidores Hh a nivel de SMO (Vismodegib, Sonidegib, Hhantag y ciclopamina) en cuatro líneas de RMS (dos RMSe y dos RMSa). Los resultados demostraron un efecto antitumoral de los inhibidores de SMO muy diverso e independiente del grado de inhibición de la vía Hh. Paradójicamente, algunas de las concentraciones testadas del Vismodegib y la ciclopamina, aun siendo muy superiores a las concentraciones requeridas para la inhibición de SMO, aumentaron la proliferación celular y los niveles de expresión de GLI1 (270,297). Nuestro grupo también estudió el efecto del tratamiento con

Vismodegib en líneas de RMS *in vitro* e *in vivo*. Sorprendentemente, el Vismodegib promovió la invasión celular de manera independiente de Hh (Ilustración 17), suscitando un posible efecto adverso inespecífico asociado a este inhibidor, compatible con la posterior asociación de efectos no específicos a altas concentraciones de ciclopamina y de otras moléculas relacionadas, supuestamente también dirigidas contra SMO (292,298).

En conjunto, estos datos casan con la falta de eficacia de los inhibidores de SMO observada en los tumores ligando-dependientes. Sin embargo, el consenso emergente de los estudios realizados con el inhibidor de GLI1, GANT61, impulsa el análisis clínico de este tipo de inhibidores en el RMS (299,300).

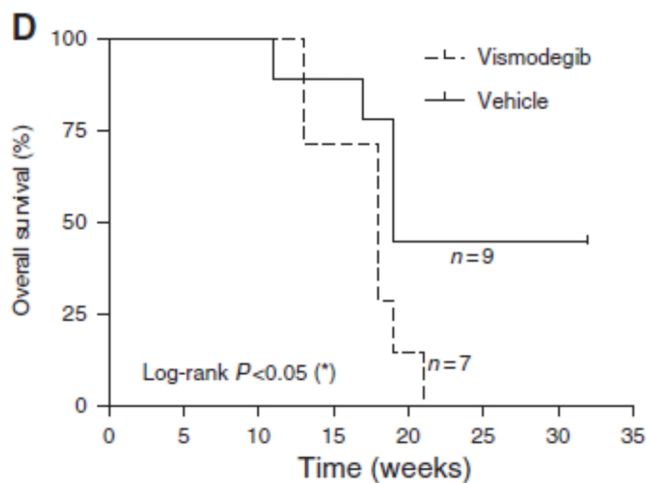


Ilustración 17.- Efecto del tratamiento con Vismodegib en la invasividad de las células de RMS en un modelo murino de metástasis. Figura obtenida de Almazán-Moga et al. 2017.

A pesar de los poco alentadores antecedentes previos, pacientes con RMS han sido reclutados en varios estudios clínicos de inhibidores de SMO: un estudio de seguridad y determinación de dosis fase I del Sonidegib combinado con un estudio fase II para evaluar la eficacia preliminar en MB recurrentes o refractarios (NCT01125800) y un ensayo clínico de fase I/II del Vismodegib en combinación con el inhibidor de la vía de señalización Gamma-secretasa/Notch, RO4929097 en pacientes con sarcoma avanzado o metastásico (NCT01154452) (301).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las tasas de supervivencia de las neoplasias pediátricas han mejorado considerablemente en las últimas décadas con una supervivencia global cercana al 80% en los países desarrollados (3,5). Sin embargo, algunos de los tumores sólidos más frecuentes, como el Rbdomiosarcoma, muestran todavía un pronóstico adverso en un elevado porcentaje de pacientes. De hecho, a pesar de la aplicación de las terapias más agresivas, la tasa de supervivencia del grupo de alto riesgo no ha mejorado durante décadas y se mantienen alrededor del 25% (112).

Actualmente, la mayoría de los cánceres pediátricos son tratados con quimioterapia convencional. De modo que, la investigación para mejorar la eficacia o reducir la toxicidad de estos compuestos es un área con alta probabilidad de éxito (302). No obstante, por el momento, sólo los cánceres del adulto se han beneficiado de los avances punteros en el desarrollo de nuevos tratamientos molecularmente dirigidos, a excepción de muy pocos ejemplos exitosos en el cáncer infantil (302,303). Los principales obstáculos en el desarrollo de fármacos oncológicos pediátricos son la gran heterogeneidad existente entre los diferentes subtipos y la baja incidencia del cáncer infantil, aspectos que en la industria farmacéutica se traducen en una mayor necesidad de inversión en la investigación molecular previa y en una menor rentabilidad económica del producto, respectivamente. Adicionalmente, la baja incidencia también dificulta la caracterización molecular y la disponibilidad de modelos preclínicos adecuados para su estudio, así como el reclutamiento de pacientes para la realización de los ensayos clínicos. En conjunto, estas limitaciones han propiciado que la aprobación de nuevos medicamentos contra el cáncer infantil dependa de la investigación molecular y aprobación previas en cánceres del adulto, incentivando, aún más, la falta de terapias específicamente diseñadas para los diversos tipos de cánceres en la infancia (304,305).

Dadas las particularidades de los cánceres infantiles, las esperanzas terapéuticas actuales residen principalmente en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas mediante la identificación de las moléculas responsables de la aparición y progresión de estas neoplasias. El desarrollo de estas terapias específicas podría mejorar no solo la

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

supervivencia del grupo de alto riesgo, sino también las toxicidades asociadas al tratamiento de todos los pacientes. Sin embargo, tanto el origen como los mecanismos moleculares encargados de la progresión tumoral del RMS son temas controversiales, que aún no han sido del todo clarificados.

Nuestro grupo, creyendo firmemente que una mejor caracterización molecular sorteará los desafíos asociados a la investigación oncológica pediátrica y consciente de las diferencias abismales entre la biología molecular de los cánceres del adulto y los cánceres pediátricos, se ha centrado en el estudio del papel de las tres vías del desarrollo embrionario principales, Notch, Hedgehog (Hh) y Wnt, como dianas terapéuticas potenciales en el RMS. La contribución de estas vías en la tumorigénesis del rhabdomyosarcoma y de otros tumores del desarrollo, puede no ser casualidad, y estar estrechamente relacionada con el posible origen de este tipo de tumores, entendidos según algunos autores, como una consecuencia infrecuente y desafortunada del proceso de desarrollo normalmente controlado por estas vías (306,307).

Las hipótesis planteadas en esta tesis parten de un trabajo previo de caracterización molecular de los ligandos Hh en el RMS, en el que confirmamos por primera vez una activación ligando dependiente de la vía en estos tumores (298). Concretamente, la primera hipótesis se basa en la elevada expresión de los ligandos IHH y DHH y en el efecto oncogénico asociado a su depleción genética para plantear el desarrollo de una nueva estrategia de inhibición peptidomimética que impida la interacción entre estos ligandos y su receptor principal, PTCH. La segunda hipótesis propone la continuación de la caracterización molecular de la vía Hh a nivel de ligando como herramienta de búsqueda de nuevas dianas moleculares en el RMS y, por ende, de nuevas estrategias terapéuticas plausibles. Particularmente, dados el gran desconocimiento sobre el papel de los correceptores Hh, BOC y CDO, en cáncer, su implicación en la activación ligando-dependiente de la vía y su alta relación con la correcta diferenciación muscular, planteamos un posible papel oncogénico de estos correceptores en el RMS.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Siendo nuestro objetivo principal el desarrollo de nuevas estrategias de inhibición de la vía Hh con potencial terapéutico en RMS, nuestras hipótesis serán evaluadas a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Codesarrollo y evaluación preclínica de nuevos compuestos peptidomiméticos diseñados para inhibir la unión de los ligandos Hh al receptor PTCH.
2. Análisis de la expresión de los correceptores BOC y CDO en tumores de pacientes y líneas celulares de RMS.
3. Estudio funcional y molecular de la depleción genética de BOC y CDO en RMS *in vitro* e *in vivo*.
4. Codesarrollo y evaluación de la capacidad antiproliferativa *in vitro* de nuevos compuestos inhibidores del correceptor CDO.
5. Estudio funcional y molecular del mejor compuesto evaluado previamente *in vitro* e *in vivo*.
6. Estimación de la relevancia de CDO en sarcomas óseos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras tumorales humanas

Las muestras tumorales de 58 pacientes diagnosticados de RMS fueron obtenidas de nuestra colección privada (ISCH C.0002311) inscrita en el Registro Nacional de Biobancos para fines de investigación biomédica. Todas ellas fueron recogidas tras la cirugía e inmediatamente criopreservadas a -80°C hasta su procesamiento.

Acorde a la declaración de Helsinki, se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes o de sus tutores legales (ANEXO 1.). Consecuentemente, su estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón.

2. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo (Tabla 11) y sus condiciones de cultivo se detallan a continuación. Todas las líneas de RMS, la línea de Sarcoma de Ewing (SE) SKES1, y la línea de osteosarcoma (OS) MG63, fueron cultivadas en *Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts* (MEM, Biowest). Las líneas de SE TC71 y CADOES1 fueron cultivadas en *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM, Gibco) y *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Gibco), respectivamente. La línea de OS U2OS fue cultivada en McCoy's 5a (LGC Standards) y finalmente, la línea inmortalizada de riñón embrionario, HEK293T fue cultivada en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Biowest). Todos los medios fueron suplementados con suero fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich) al 10%, 100U/mL de penicilina y 0.1mg de estreptomina (Biowest). Adicionalmente, los medios MEM, IMDM, RPMI y McCoy's 5a fueron suplementados con 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 1x de aminoácidos no esenciales (todos de Biowest). Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO_2 en incubadores de camisa de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

| Líneas Celulares | | | | |
|-----------------------|---------|-------------|---------------|---------------------|
| Tipo | Nombre | Histología | Translocación | Adquisición |
| RMS | RH4 | Alveolar | PAX3-FOXO1 | ATCC |
| | RH30 | Alveolar | PAX3-FOXO1 | ATCC |
| | CW9019 | Alveolar | PAX7-FOXO1 | Dr. Jaclyn Biegel |
| | RH28 | Alveolar | PAX3-FOXO1 | Dr. Oscar M. Tirado |
| | RH18 | Alveolar | - | Dr. Beat Schäfer |
| | RD | Embrionario | - | Dr. Beat Schäfer |
| | RH36 | Embrionario | - | Dr. Oscar M. Tirado |
| | RUCH2 | Embrionario | - | ATCC |
| SE | SKE51 | - | EWS-FL11 | Dr. Javier Alonso |
| | TC71 | - | EWS-FL11 | Dr. Javier Alonso |
| | CADOES1 | - | EWS-ERG | Dr. Javier Alonso |
| OS | MG63 | - | - | Dr. René Rodríguez |
| | U2OS | - | - | Dr. René Rodríguez |
| Embrionarias de riñón | HEK293T | - | - | ATCC |

Tabla 9. Características de las líneas celulares usadas.

2.1. Subcultivo celular

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en adherencia, realizando subcultivos al alcanzar una confluencia del 80%. La disgregación celular se realizó mediante la incubación con tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco) a 37°C durante 5 minutos. La actividad enzimática de la tripsina fue bloqueada mediante la adición de medio de cultivo y la suspensión celular fue centrifugada durante 5 minutos a 1500rpm. El pellet celular fue resuspendido en el medio de cultivo correspondiente y sembrado a la dilución deseada en un nuevo soporte de plástico para la continuación de su cultivo.

2.2. Criopreservación y descongelación de líneas celulares

Todas las líneas celulares fueron amplificadas y criopreservadas para mantener un stock continuo de células. La criopreservación es el proceso en el cual las células son congeladas a muy bajas temperaturas (entre -80°C y -196°C) para reducir las funciones vitales y, de este modo, mantener la viabilidad durante largos periodos de tiempo, evitando el deterioro celular debido a fenómenos osmóticos o a la formación de hielo intracelular. Para asegurar la integridad celular, la conservación de las líneas celulares se realizó por congelación progresiva ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), mediante el uso de un contenedor Nalgene Mr. Frosty Freezing (Thermo Fisher Scientific) relleno de isopropanol (Fisher Scientific). Adicionalmente, tras la disgregación y posterior centrifugación de las células en cultivo, el pellet fue resuspendido en medio de cultivo suplementado con el agente crioprotector Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 10% y dividido en crioviales (1mL/criovial). Los crioviales permanecieron en el frosty a -80°C durante 24h y posteriormente fueron trasladados a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento a largo plazo.

En el momento de su uso, las células fueron descongeladas rápidamente y diluidas 1:6 en solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés: *Phosphate Buffered Saline*), para evitar daños asociados a la toxicidad del DMSO a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1500rpm y sembradas en un nuevo frasco con medio de cultivo.

2.3. Recuento celular

La determinación del número de células en cultivo fue realizada mediante el contador celular automático EVE (NanoEntek). Tras su disgregación y centrifugación, las células fueron resuspendidas en un volumen de medio de cultivo conocido. 10 μL de la suspensión celular fueron mezclados con 10 μL de azul de tripano al 0.4% (Fisher Scientific). El azul de tripano es un colorante azoico empleado para evaluar la viabilidad celular por exclusión de captación, ya que no es capaz de penetrar y teñir las células vivas con membranas íntegras, pero sí las células muertas. Finalmente, 10 μL de la

MATERIALES Y MÉTODOS

mezcla fueron añadidos en la cámara de conteo e introducidos en el aparato. Los datos proporcionados por el contador celular fueron: el n° de células totales/mL, el n° de células vivas/mL, el n° de células muertas/mL y el % de viabilidad. Se realizaron dos recuentos por cada suspensión celular.

3. Tratamientos celulares

La mayoría de los compuestos empleados en este trabajo son experimentales, por lo que no pueden ser adquiridos comercialmente. En todos ellos, el DMSO fue usado como disolvente, por lo que las células de las condiciones control fueron tratadas con volúmenes de DMSO equivalentes a los respectivos tratamientos.

3.1. Inhibidores peptidomiméticos

Los inhibidores peptidomiméticos de la unión de los ligandos HH a PTCH fueron cedidos por Iproteos. Las concentraciones usadas fueron: 100, 500 y 1000nM, en el caso de los dos primeros péptidos testados (IP3 e IP4) y 1000nM, en el resto (IP5-IP16).

3.2. Quimioteca privada de IUCT

Las moléculas priorizadas en el cribado virtual de compuestos capaces de interactuar con componentes de la vía Hh fueron cedidas por IUCT para su validación *in vitro*. Todas ellas fueron testadas a la concentración de 10µM. Adicionalmente, el compuesto seleccionado, SLT-0463, fue empleado a 1, 2, 5, 10 y 50µM, para la realización de curvas dosis-respuesta. El resto de los experimentos se realizaron a la concentración de 10µM, excepto en el estudio de apoptosis de la línea RD, en el cual la concentración del compuesto usada fue 20µM. Adicionalmente, en el estudio de apoptosis se empleó el quimioterapéutico Cisplatino (Sigma-Aldrich) a 50µM durante 24h para la inducción de apoptosis en la condición de referencia de muerte.

3.3. Inhibidores de referencia de la vía Hh

Empleamos los inhibidores de SMO, Vismodegib y Sonidegib, ambos adquiridos en Selleckchem y empleados en el estudio de curvas dosis-respuesta del compuesto SLT-

0463, como inhibidores de referencia de la vía Hh. Las concentraciones testadas fueron: 1, 2, 5, 10 y 50 μ M.

3.4. Antibióticos de selección

Para la selección de las células transducidas correctamente con los diferentes vectores empleados se usaron los antibióticos de selección puromicina (Sigma-Aldrich) y blasticidina (Thermo Fisher Scientific). Las concentraciones de selección fueron 1 μ g/mL y 10 μ g/mL, respectivamente.

4. Inhibición genética mediante shRNA

La infra-regulación genética de *BOC* y *CDO* fue ejercida por interferencia de su ácido ribonucleico (ARN) mediante *short hairpin RNA* (shRNA). Los shRNA son moléculas artificiales de ARN bicatenario con una longitud típica de 80 pares de bases, cuyo diseño contiene una región interna de hibridación que crea una estructura de horquilla y una secuencia complementaria al ARN mensajero (ARNm) del gen diana, que impide su traducción por complementariedad de secuencia. Concretamente, generamos líneas celulares con infra-regulación genética estable mediante la integración de los shRNA en su genoma. Una vez integrados, los shRNA son transcritos en el núcleo y posteriormente exportados al citoplasma de las células transducidas, donde son procesados por la ribonucleasa DICER, la cual degrada la estructura de horquilla del shRNA y genera un ARN pequeño de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés: *Small interfering RNA*) de doble cadena. El siRNA es capaz de unirse al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés: *RNA Induced Silencing Complex*), el cual degrada la hebra codificante del siRNA y usa la cadena antisentido como molde para la detección e inactivación del ARNm diana. Dependiendo de la zona y el modo de unión entre ambos, la inhibición se produce mediante la degradación o el bloqueo de la transcripción del ARNm diana (Ilustración 47).

MATERIALES Y MÉTODOS

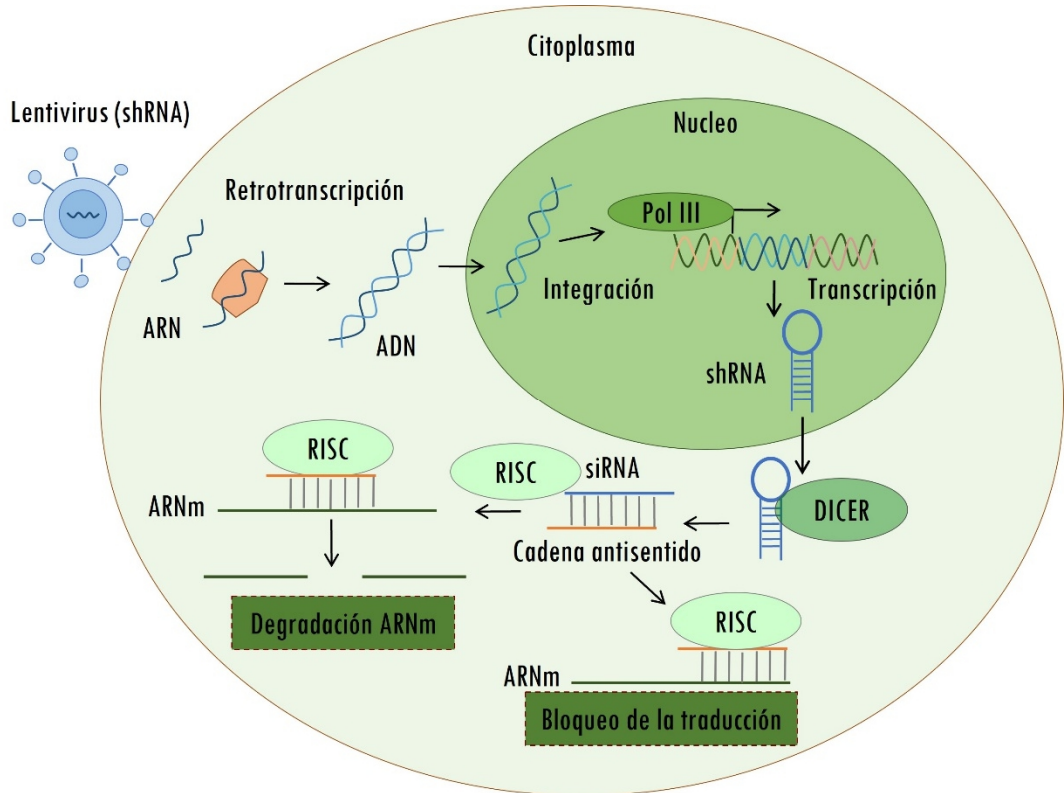


Ilustración 18. Mecanismo de infra-regulación génica mediante integración lentiviral de shRNA. Los shRNA son integrados en el genoma de la célula diana mediante partículas víricas lentivirales. Una vez transcritos gracias a la polimerasa III (Pol III), los shRNA son exportados del núcleo al citoplasma. En el citoplasma son procesados por DICER, generando los siRNA. Finalmente, el complejo RISC degrada la hebra del siRNA codificante y utiliza la cadena antisentido para la detección y degradación o bloqueo de la transcripción del ARNm diana.

La integración de los shRNA utilizados en este trabajo fue llevada a cabo mediante dos vectores de transferencia lentivirales: pGIPZ (GE Healthcare Dharmacon) y pRFP (OriGene), de segunda y tercera generación, respectivamente (Tabla 10). En ambos casos empleamos la misma metodología para la generación de las partículas víricas: ambos vectores fueron co-transfectados con dos vectores adicionales (psPAX2 y pMD2G) –que proporcionan los componentes víricos ausentes en los vectores de transferencia–, en una línea celular capaz de producir las partículas lentivirales (HEK 293T).

| shRNA | | |
|------------|------------------|--------------------------|
| Vector | Aplicación | Adquisición |
| pGIPZ | Control shBOC | Dharmacon - RHS4531 |
| pGIPZ-sh19 | shRNA contra BOC | Dharmacon - V3LHS_405219 |
| pGIPZ-sh64 | shRNA contra BOC | Dharmacon - V3LHS_337564 |
| pGIPZ-sh65 | shRNA contra BOC | Dharmacon - V3LHS_337565 |
| pRFP | Control shCDO | OriGene - TR30032 |
| pRFP-shA | shRNA contra CDO | OriGene - HC107992A |
| pRFP-shB | shRNA contra CDO | OriGene - HC107992B |

Tabla 10. Aplicación e identificación de los vectores shRNA empleados.

4.1. Transfección y producción lentiviral

Los componentes usados para la transfección fueron:

1. El vector de transferencia (Ilustración 48): contiene el shRNA de interés y diferentes elementos necesarios para la infección viral y la transferencia del shRNA (Tabla 29).
2. El vector psPAX2: codifica las secuencias Gag, Pol, Rev y Tat, necesarias para el empaquetamiento de las partículas víricas, así como para la retrotranscripción e integración del ARN.
3. El vector pMD2G: codifica la secuencia de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSVg, por sus siglas en inglés: *Vesicular Stomatitis Virus glycoprotein*) para la envoltura del virus. La proteína VSVg presenta un amplio tropismo que permite la transducción de una gran variedad de células.
4. Células productoras: La línea celular usada, HEK 293T, se trata de una variante de las células embrionarias de riñón HEK 293 que expresa de manera constitutiva el antígeno T largo del virus SV40. Elemento que activa la

MATERIALES Y MÉTODOS

replicación episomal de los plásmidos que contienen el origen de replicación de dicho virus, permitiendo la expresión de las proteínas recombinantes previamente mencionadas y finalmente, produciendo las partículas lentivirales capaces de infectar las células de interés.

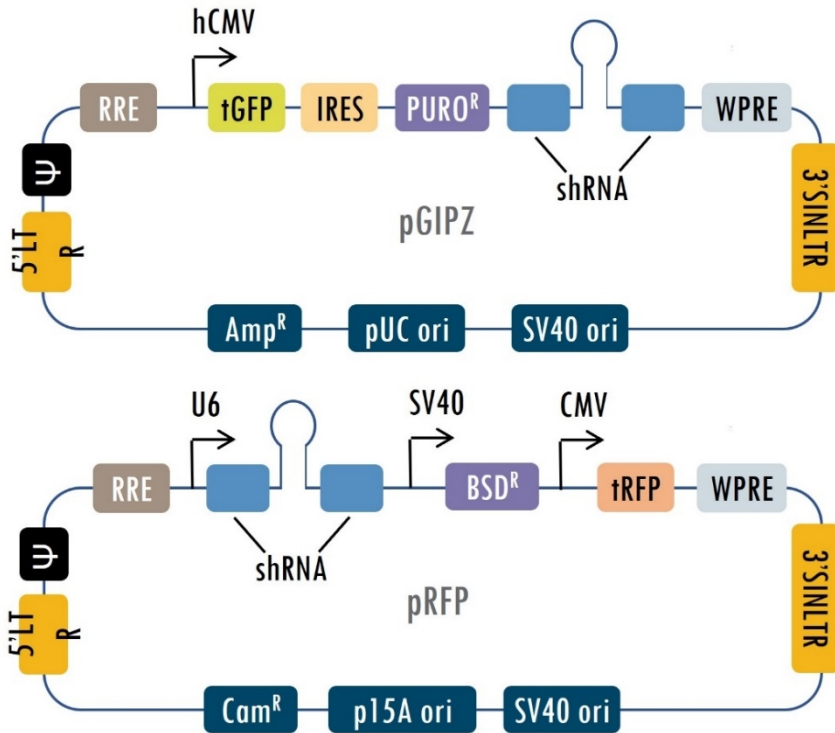


Ilustración 19. Representación esquemática de los vectores de transferencia pGIPZ y pRFP.
Imágenes adaptadas de <https://horizondiscovery.com> y <https://www.sanpgene.com>, respectivamente.

A continuación, se detalla el protocolo empleado para la generación de las partículas lentivirales de cada uno de los shRNA utilizados. Se sembraron 4 millones de células HEK293T en placas de cultivo de 100mm recubiertas con gelatina al 0.1%. A las 24 horas, las placas con una confluencia celular del 70% fueron transfectadas con los vectores gracias al reactivo Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). La Lipofectamina es un agente soluble catiónico lipídico capaz de formar liposomas cargados positivamente y de albergar los ácidos nucleicos en su interior, ocultando su carga negativa y permitiendo la interacción con la membrana celular y la endocitosis del material genético. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se diluyeron 12µg

del vector de transferencia, 8µg de psPAX2 y 4µg de pMD2G con medio Opti-MEM (Gibco). Posteriormente, la mezcla de plásmidos fue incubada con la Lipofectamina 2000 durante 20 minutos con tal de permitir la formación de los complejos liposoma-ADN y añadida a las HEK293T en cultivo, junto con medio Opti-MEM suplementado con FBS al 5%. 4 horas después de la transfección, el Opti-MEM fue retirado y reemplazado por el medio de cultivo de las futuras células diana, en este caso MEM sin antibiótico. Tras 36 horas de incubación, las partículas víricas producidas fueron recogidas junto con el medio y centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos para eliminar los desechos y restos celulares. El sobrenadante, que contenía las partículas víricas, fue filtrado con un filtro de 0.45µm (VWR). En este punto, el sobrenadante fue usado para realizar la infección de las células diana o fue conservado a -80°C.

4.2. Infección de las células diana

Para la infección, las células diana fueron sembradas en placas de cultivo de 60mm (2×10^5 células/placa). Al día siguiente, con una confluencia celular del 40%, se reemplazó el medio de cultivo por una dilución 1/2 del sobrenadante con las partículas víricas en medio MEM sin antibiótico. Tras 24 horas, se retiró el medio con los virus y se añadió medio de cultivo fresco sin antibiótico. 72 horas después de la infección, las células transducidas con el vector fueron seleccionadas según la resistencia aportada por el vector de transferencia: puomicina (1µg/mL) en el caso del vector pGIPZ y blasticidina (10µg/mL) en el caso del vector pRFP. Adicionalmente, la eficiencia de la transducción fue comprobada bajo el microscopio (Nikon eclipse TE2000-S) mediante la expresión de la proteína fluorescente contenida en cada vector: GFP (*Green Fluorescent Protein*) o RFP (*Red Fluorescent Protein*).

MATERIALES Y MÉTODOS

| Elementos comunes | | |
|-------------------|---|---|
| Elemento | Descripción | Función |
| RRE | <i>Rev response elements</i> | Aumenta la eficiencia de empaquetamiento del genoma viral |
| CMV | Promotor citomegalovirus | Permite una fuerte expresión del transgen |
| shRNA | <i>Short hairpin RNA</i> | Permite la infra-regulación del gen diana |
| WPRE | <i>Woodchuck hepatitis Posttranscriptional regulatory element</i> | Incrementa la expresión del transgén en las células diana |
| 3'SINLTR | <i>3' self-inactivating long terminal repeat</i> | Impide la transcripción completa del virus en las células diana |
| 5'LTR | <i>5' long terminal repeat</i> | Permite la integración y transcripción del genoma retroviral |
| Ψ | Secuencia de empaquetamiento <i>psi</i> | Permite el empaquetamiento del genoma retroviral |
| Elementos pGIPZ | | |
| Elemento | Descripción | Función |
| tGFP | <i>TurboGFP</i> | Permite la visualización de las células transducidas |
| IRES | <i>Internal ribosomal entry site</i> | Permite la expresión de tGFP y PURO ^R en un único transcrito |
| PURO ^R | Resistencia a la puomicina | Permite la selección de las células transducidas |
| Elementos pRFP | | |
| Elemento | Descripción | Función |
| U6 | Promotor U6 | Permite la síntesis del shRNA mediante la Pol III |
| SV40 | Promotor del virus simio 40 | Permite la expresión de BSD ^R |
| BSD ^R | Resistencia a la blastidina | Permite la selección de las células transducidas |
| tRFP | <i>TurboRFP</i> | Permite la selección de las células transducidas |

Tabla 11. Elementos presentes en los plásmidos pGIPZ y pRFP y su función en la producción lentiviral.

5. Ensayos de proliferación y/o viabilidad celular

5.1. WST-1

El reactivo WST-1 (Sigma-Aldrich) fue usado para la evaluación de la viabilidad celular de las líneas de RMS tras el tratamiento con peptidomiméticos. El ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrazolio WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene sulfonate) a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales implicadas en la producción glicolítica de NADPH. Por lo tanto, la generación de formazán tras la adición del reactivo WST-1 está directamente relacionada con el número de células metabólicamente activas. La cantidad de formazán, de color amarillo oscuro, es fácilmente detectable mediante espectrofotometría a 440nm.

Las células fueron sembradas a baja densidad (1×10^3 – 2×10^3 células/pocillo) en placas de 96 pocillos a diferentes concentraciones de los peptidomiméticos. El medio fue renovado cada dos días. Para cada una de las condiciones, el efecto en la viabilidad celular se determinó tras tres tiempos de incubación diferentes. Para ello, se añadieron 10 μ L del reactivo WST-1 (dilución 1:10) en cada pocillo y tras 3 horas de incubación se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro Epoch Microplate (Biotek) a 440nm, para la detección del formazán y a 690nm, como control de referencia. Los resultados se muestran como la diferencia entre ambas lecturas. Cada ensayo contenía 5 réplicas por condición y fue repetido al menos tres veces.

5.2. Cristal violeta

El efecto sobre la proliferación celular de los diferentes compuestos inhibidores de la vía Hh se testó mediante la tinción de las células con cristal violeta (Sigma-Aldrich). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a baja densidad (1×10^3 – 2×10^3 células/pocillo) durante 24 horas para asegurar su adhesión. A continuación, el medio fue aspirado y renovado con los respectivos tratamientos de las diferentes condiciones a comparar. Durante el experimento, el medio de cada condición fue renovado cada dos días. Tras 5 días de incubación, se realizó un lavado con PBS y se agregó cristal

MATERIALES Y MÉTODOS

violeta al 0.5% durante 15 minutos. El exceso de tinte fue eliminado de las placas mediante continuos lavados con agua destilada. Una vez secos, los cristales fueron disueltos mediante ácido acético (Sigma-Aldrich) al 10% y se midió la densidad óptica de cada pocillo a 570nm en el espectrofotómetro Epoch Microplate. Cada ensayo contenía 5 réplicas por condición y fue repetido al menos tres veces.

5.3. Recuento de células

Las cinéticas de crecimiento de las líneas celulares transducidas con los diferentes shRNAs fueron medidas mediante el recuento de células bajo el microscopio. 2.5×10^4 células pertenecientes a cada condición fueron sembradas por triplicado en placas de 6 pocillos durante 5 días. Se realizaron fotos bajo el microscopio con la cámara digital DXM1200P (Nikon) a 10 aumentos, los días 0, 3 y 5 posteriores a la siembra. Se tomaron fotos de 5 campos por pocillo. Finalmente, las células vivas de cada foto fueron contadas mediante el programa Image J y representadas como el porcentaje de células respecto al recuento del día 0 de cada condición.

6. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

La expresión génica fue evaluada en líneas celulares y muestras de tumores de RMS mediante la cuantificación del ARNm por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés: *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*). La metodología empleada consta de las siguientes etapas:

6.1. Preparación de las muestras

Para la evaluación de la expresión génica en líneas celulares, las células en cultivo de las diferentes condiciones fueron recogidas, lavadas con PBS y centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos. Los pellets fueron conservados a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN. En el caso de las muestras de tumores de pacientes, el día de la extracción una pequeña porción del tumor fue disgregada manualmente en un mortero colocado sobre nieve carbónica, para evitar la degradación del ARN.

6.2. Extracción y purificación del ARN

La extracción del ARN total se realizó mediante el kit RNeasy Mini (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en la combinación de un proceso de lisis y homogenización de las muestras tras la adición de isotiocianato de guanidina y la posterior purificación del ARN mediante columnas con membrana de sílice. La elución del ARN total se realizó con agua libre de RNAsas. Finalmente, el ARN extraído fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) y conservado a -80°C .

6.3. Retrotranscripción del ARN

La retrotranscripción consiste en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN monocatenario, catalizada por la enzima retrotranscriptasa. Para ello, se incubaron $2\mu\text{g}$ del ARN extraído y purificado previamente, con $1\mu\text{g}$ de *random primers* (Invitrogen) durante 5 minutos a 70°C . Los *random primers* son una mezcla de oligonucleótidos, generalmente formados por 6 nucleótidos, capaces de unirse de manera aleatoria a lo largo de la secuencia de ARN y permitir el inicio de la retrotranscripción. Esta primera incubación permitió la desnaturalización del ARN y la hibridación de los *random primers*. Rápidamente, las muestras fueron puestas en hielo, para evitar la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, se añadieron los reactivos necesarios para la retrotranscripción: 200U de la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV, por sus siglas en inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) (Promega), $5\mu\text{L}$ del Buffer de reacción 5x (Promega) y $1.25\mu\text{L}$ de desoxirribonucleótidos trifosfato 10mM (dNTPs) (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, la elongación del ADNc tuvo lugar tras la incubación de todos los componentes durante 1 hora a 37°C . El ADNc fue conservado a -20°C . Ambas incubaciones fueron realizadas en el termociclador 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

6.4. Cuantificación mediante RT-qPCR

La RT-qPCR es una PCR que permite la amplificación y cuantificación de una secuencia de ADN específica, de manera simultánea. Para ello utilizamos la metodología TaqMan (Applied Biosystems), basada en la adición de sondas diseñadas específicamente para hibridarse con una región concreta de cada gen (Tabla 12), marcadas con un fluoróforo (en adelante referido como *reporter*) en el extremo 5' y un inhibidor de la fluorescencia (en adelante referido como *quencher*) en el extremo 3' (Ilustración 20). De este modo, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* y no puede ser detectada. No obstante, durante la amplificación del ADN, la Taq polimerasa es capaz de hidrolizar el extremo 5' de la sonda, liberando el *reporter* de la inhibición ejercida por el *quencher* y permitiendo la detección de la fluorescencia de manera proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Por lo tanto, el ciclo de amplificación en el que es posible detectar la fluorescencia (Ct, por sus siglas en inglés: *Cycle Threshold*), es un valor inversamente proporcional a la concentración inicial del ADN diana presente en la muestra.

| Sondas TaqMan | |
|---------------|---------------|
| Gen | Sonda |
| GLI1 | Hs01110766_m1 |
| GLI2 | Hs01119974_m1 |
| PTCH1 | Hs00181117_m1 |
| BOC | Hs00949520_m1 |
| CDO | Hs00610901_m1 |
| TBP | Hs00172424_m1 |

Tabla 12. Ensayos TaqMan utilizados para la cuantificación de la expresión génica.

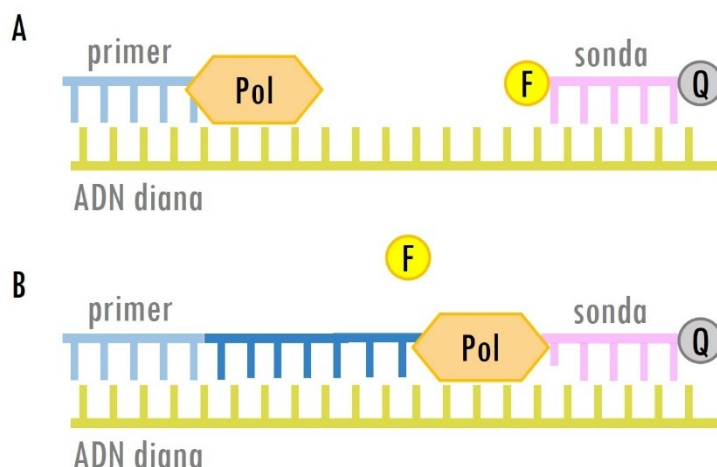


Ilustración 20. Representación de la metodología TaqMan. **A.** La sonda TaqMan unida a un fluoróforo (F) y a un *quencher* (Q) se hibrida en el extremo 5' de la cadena de ADN diana. En el extremo 3' se hibridan un primer y la Taq polimerasa (Pol). **B.** La Taq polimerasa inicia la síntesis de la nueva cadena de ADN hasta alcanzar la sonda. Entonces, gracias a su actividad exonucleasa hidroliza la sonda, liberando el fluoróforo del *quencher* y permitiendo la emisión de fluorescencia.

La reacción se realizó en placas de 384 pocillos (Applied Biosystems), realizando triplicados para cada sonda y muestra, en un volumen final de 10µL por pocillo. En cada pocillo se añadieron 0.5µL de ADNc, 5µL de TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.5µL de la sonda TaqMan correspondiente y 4µL de H₂O DEPC (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron 40 ciclos de amplificación en el termociclador con detección de fluorescencia ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). El gen TATA-binding protein (*TBP*) fue usado como control interno para la normalización de la expresión. Los datos fueron analizados mediante los softwares 7900HT Sequence Detection System 2.3 y RQ Manager 2.2 y expresados como niveles relativos de expresión, mediante el método comparativo $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ descrito por K.J. Livak y T.D. Schmittgen (308).

7. Análisis de bases de datos de pacientes

Analizamos el perfil de expresión de CDO, GLI1, GLI2 y GLI3 mediante la plataforma de visualización y análisis genómico R2 (<http://r2.amc.nl>), en diferentes bases de datos de microarrays públicas (Tabla 13).

MATERIALES Y MÉTODOS

| Bases de Datos | | | |
|------------------|---------------------------------------|----------------------|--|
| Muestras | Identificador R2 | Autor (año) | Análisis |
| RMS | ps_avgpres_rmstriche147_u133a | Daviccioni E. (2000) | Expresión ARNm |
| | ps_avgpres_gse92689geo186_u133a | Heiskanen M. (2016) | |
| | ps_avgpres_gse66533geo58_u133p2 | Barr FG. (2016) | |
| | ps_avgpres_rmsschafer30_u133a | Schafer B.W. (2008) | |
| | ps_avgpres_gse114621geo101_huex10t | Skapek S.X. (2018) | |
| Músculo sano | ps_avgpres_xtmusclehofman121_u133a | Hofman E.P. (2005) | |
| | ps_avgpres_dmdmuscle36_u133a | Pescatori M. (2006) | |
| SE y tejido sano | ps_avgpres_gse17679geo117_u133p2 | Savola S. (2011) | Expresión ARNm y Análisis de supervivencia |
| OS y tejido sano | ps_avgpres_osteosarcoma127_ilmnhwg6v2 | Kuijjer M.L. (2012) | |

Tabla 13. Bases de datos de *microarrays* utilizadas para el estudio de los perfiles de expresión de varios genes de interés en muestras de pacientes.

El perfil de expresión de CDO en las bases de datos de RMS publicadas por E. Daviccioni y M. Heiskanen fue comparado con la expresión de las bases de datos de músculo sano publicadas por E.P. Hofman y M. Pescatori. En cambio, la expresión de CDO en las muestras tumorales de SE y OS publicadas por S. Savola y M.L. Kuijjer, respectivamente, fue comparada con muestras sanas de referencia incluidas en las susodichas bases de datos. De manera adicional, además de estudiar el perfil de expresión de las muestras de SE y OS, también realizamos el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en función de los niveles de expresión de CDO.

La expresión de GLI1, GLI2 y GLI3, fue analizada y comparada en todas las bases de datos de RMS disponibles en la plataforma R2.

8. Análisis de la expresión proteica por Western blot

El Western blot (WB) es una técnica que permite la identificación y cuantificación de proteínas específicas presentes en una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células. Para ello, las proteínas son separadas en función de su peso molecular

mediante electroforesis, transferidas a una membrana y finalmente, las proteínas de interés son detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos. La metodología empleada consta de las siguientes etapas:

8.1. Extracción de proteínas

Los extractos proteicos se obtuvieron de células en cultivo. Se realizó un lavado con PBS y posteriormente, las células fueron recogidas con ayuda de un *scraper* y centrifugadas a 6000 rpm durante 3 minutos. El pellet fue resuspendido en tampón de lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Tablets Mini EASYpack*, Roche) y fosfatasas (*Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail*, Thermo Fisher Scientific) e incubado durante 20 minutos en hielo. Para descartar los restos celulares, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, el extracto proteico contenido en el sobrenadante fue conservado a -20°C.

8.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación proteica se realizó mediante el kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en el método Lowry. Los extractos de proteína fueron diluidos 1/5 o 1/10 en agua para su cuantificación. Adicionalmente, se prepararon muestras patrón con diferentes diluciones de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés: *Bovine Serum Albumin*) en agua (0-2mg/mL). La cuantificación se realizó en placa de 96 pocillos, añadiendo 5µL de cada muestra diluida por pocillo (por triplicado), 25µL de la mezcla de los reactivos S (solución surfactante) y A (solución alcalina de tartrato de cobre) en proporción 1/50 y 200µL del reactivo B (reactivo de Folin). Tras 15 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 750nm en el espectrofotómetro y se determinó la concentración de proteína de cada muestra mediante la extrapolación de los valores de absorbancia en la recta patrón.

8.3. Preparación de las muestras

Tras la cuantificación, entre 20 y 40µg de proteína fueron preparados para la electroforesis mediante la adición del tampón de carga Laemmli (250mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol y 0.5% bromofenol azul) al 10% de ditioneitol 1M (DTT) (Sigma-Aldrich) y la desnaturalización de las proteínas mediante su incubación a 70°C durante 10 minutos. Estas condiciones permiten que las proteínas adquieran una carga global negativa directamente proporcional a su tamaño y garantizan que su movilidad durante la electroforesis sea exclusivamente proporcional al peso molecular.

8.4. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) es una técnica de separación de proteínas contenidas en un soporte sólido (gel) por acción de un campo eléctrico.

La preparación de los geles se basa en la reacción de polimerización de la acrilamida entrecruzada con bisacrilamida, utilizando la tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato amónico (APS) como iniciadores de la polimerización. Adicionalmente, se añade el SDS para garantizar las condiciones desnaturalizantes. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el tamaño de poro del gel, de manera que un menor porcentaje implica un tamaño de poro mayor. El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, normalmente entre el 5 y el 12%, se adecua en función del tamaño de las proteínas de interés, requiriendo un mayor tamaño de poro las proteínas de mayor tamaño. Para aumentar la resolución de la separación, se emplean dos composiciones diferentes en un mismo gel: una región concentradora (*stacking*) y una región separadora (*resolving*). El *stacking* se caracteriza por tener poros de mayor tamaño y un pH más ácido y su función es la concentración de todas las proteínas en una banda, para asegurar que todas entren al mismo tiempo en la región separadora. Un elemento fundamental en este proceso es el tampón de electroforesis (250mM Tris, 1.92M glicina, 1% SDS), el cual permite la conducción eléctrica y contiene dos

componentes fundamentales en la separación: la glicina y los iones Cl⁻. Ambos forman un gradiente electroquímico que migra a diferentes velocidades en función del pH, permitiendo la focalización de las proteínas en el *stacking* gracias al pH ácido de éste, y liberando a las proteínas en el *resolving* para su separación en función del peso molecular.

Las muestras previamente preparadas, fueron cargadas en los pocillos situados en el *stacking*. Para inferir su peso molecular, uno de los pocillos del gel fue cargado con el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo en las cubetas Mini-PROTEAN (Bio-Rad) cubiertas con el tampón de electroforesis, aplicando un amperaje constante de 35mA/gel.

8.5. Electrotransferencia

Para que las proteínas fueran accesibles a la detección por anticuerpos, tras su separación mediante SDS-PAGE, éstas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés: *Polyvinylidene Fluoride*) con poros de 0.45µm (GE Healthcare Life Sciences), previamente activada con metanol (Fischer Scientific). La transferencia se realizó en *cassette*, apilando sucesivamente una esponja plana, 2x papel Whatman (Fisher Scientific), el gel, la membrana de PVDF, 2x papel Whatman y finalmente otra esponja. La transferencia se llevó a cabo en las cubetas Mini Trans-Blot (Bio-Rad) cubiertas con el tampón de transferencia (10% tampón Tris/glicina (25mM Tris y 192mM glicina), 20% metanol y H₂O), aplicando un amperaje constante de 200mA durante 2 horas a 4°C.

8.6. Detección de proteínas

Una vez inmovilizadas en las membranas, las proteínas de interés fueron detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos. En primer lugar, las membranas fueron bloqueadas en BSA o leche, ambas al 5% en tampón Tris salino con Tween-20 (TBS-T, del inglés *Tris-Buffered Saline and Tween-20*) (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl y 0.1% Tween-20) durante 1 hora en agitación. El bloqueo es necesario para evitar la unión

MATERIALES Y MÉTODOS

inespecífica de los anticuerpos. A continuación, las membranas fueron incubadas en agitación a 4°C durante toda la noche con los respectivos anticuerpos primarios según las condiciones especificadas en la Tabla 146. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T en agitación para eliminar el exceso de anticuerpo primario de las membranas y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 157) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios reconocen los anticuerpos primarios y están conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés *Horseradish Peroxidase*). De nuevo, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T en agitación para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente, las membranas fueron incubadas con los dos reactivos del Kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare Life Sciences), constituidos por una solución de peróxido y una solución de luminol. La enzima HRP conjugada al anticuerpo secundario es capaz de oxidar el luminol en presencia de peróxido mediante una reacción quimioluminiscente. La luz emitida durante la reacción fue captada por los SuperRX Fuji Medical X-RAY Films (Fujifilm) y revelada en la Curix 60 (AGFA). Las imágenes obtenidas tras el revelado fueron escaneadas, permitiendo la generación de las figuras de WB. Adicionalmente, se realizó una cuantificación densitométrica relativa mediante el uso del *software* Image J.

| Anticuerpos Primarios | | | | | |
|-----------------------|----------------|---------|-------------------|----------------|------------|
| Proteína | Peso molecular | Especie | Dilución | Casa Comercial | Referencia |
| CDO | 190 KDa | Oveja | 1:1000 (BSA 5%) | R&D Systems | AF4384 |
| BOC | 150 KDa | Cabra | 1:1000 (BSA 5%) | R&D Systems | AF2036 |
| GLI1 | 150 KDa | Conejo | 1:1000 (BSA 5%) | Abcam | ab134906 |
| GLI2 | 220 KDa | Conejo | 1:1000 (BSA 5%) | Cell Signaling | #2585 |
| GLI3 | 150 - 85 KDa | Cabra | 1:200 (BSA 5%) | R&D Systems | AF3690 |
| pRB | 110 KDa | Conejo | 1:1000 (BSA 5%) | Cell Signaling | #8516 |
| CCNB1 | 58 KDa | Ratón | 1:6000 (BSA 5%) | Merck | 05-373 |
| CASP9 | 47-37-35 KDa | Ratón | 1:1000 (BSA 5%) | Cell Signaling | #9508 |
| CASP3 | 33-19-17 KDa | Conejo | 1:3000 (Leche 5%) | Abcam | ab3251 |
| PARP1 | 116-89 KDa | Conejo | 1:2500 (BSA 5%) | Cell Signaling | #9542 |
| MYOD1 | 45 KDa | Ratón | 1:1000 (BSA 5%) | Abcam | ab16148 |
| MYOG | 34 KDa | Ratón | 1:250 (BSA 5%) | BD Pharmigen | 556358 |
| SGCG | 32 KDa | Ratón | 1:1000 (Leche 5%) | Abcam | ab203112 |
| ACTINA | 43 KDa | Ratón | 1:10000 (BSA 5%) | Santa Cruz | sc-47778 |

Tabla 146. Características y condiciones de uso de los anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas.

| Anticuerpos Secundarios | | | |
|-------------------------|----------|----------------|------------|
| Anticuerpo | Dilución | Casa Comercial | Referencia |
| Anti-Ig Oveja | 1:2500 | Sigma-Aldrich | A3415 |
| Anti-Ig Cabra | 1:2000 | Dako | P0449 |
| Anti-Ig Conejo | 1:10000 | Sigma-Aldrich | A0545 |
| Anti-Ig Ratón | 1:2000 | Dako | P0260 |

Tabla 157. Características y condiciones de uso de los anticuerpos secundarios utilizados

9. Modelos *in vivo*

Los modelos de xenoinjerto ortotópico fueron realizados mediante la inyección de la línea celular de RMS humana, RH4, en el músculo gastrocnemio de ratones inmunodeprimidos de entre 4 y 6 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos en Charles River Laboratories y estabulados en condiciones libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés: *Specific Pathogen Free*) con agua y comida *ad libitum*. Todos los protocolos utilizados fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del VHIR (CEEA 39/19).

9.1. Modelo tumoral con infraregulación genética de CDO

La línea celular RH4 fue transducida de forma estable con el vector control pRFP o con el shRNA contra CDO seleccionado en los experimentos *in vitro*, shB. 4 días después de la infección, se inyectaron 3 millones de células viables en el músculo gastrocnemio de la extremidad posterior izquierda de 8 ratones SCID-Beige por condición. Una porción de estas células fue de nuevo cultivada *in vitro* durante 12 días para el análisis de expresión de CDO mediante WB. Los ratones SCID-Beige (CB17-Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg}/Crl) son ratones congénicos que poseen mutaciones autosómicas recesivas en los genes *Prkdc* y *Lyst*. Por un lado, la mutación SCID provoca una inmunodeficiencia combinada grave en linfocitos B y T. Por otro lado, la mutación Beige causa la deficiencia de las células *Natural Killer* (NK). El alto grado de inmunodeficiencia de estos ratones facilita el crecimiento de xenoinjertos. El crecimiento tumoral fue evaluado una o dos veces por semana empleando un pie de rey digital. El volumen tumoral fue calculado aplicando la fórmula del volumen de una esfera: $V = \frac{4}{3}\pi r^3$, donde el radio (r) corresponde a la suma de la longitud y la amplitud del tumor dividida entre 4. El valor resultante de cada medición fue normalizado respecto al volumen promedio de las dos primeras medidas realizadas a cada ratón. El sacrificio de los ratones fue realizado mediante dislocación cervical, cuando el volumen tumoral alcanzó el volumen máximo fijado como criterio de punto final (500mm³). Los tumores fueron reseccionados, pesados y medidos. Finalmente, un fragmento de cada

tumor fue conservado a -80°C y otro fue fijado en formalina y embebido en parafina. Las muestras criopreservadas fueron usadas posteriormente para la evaluación de la expresión de CDO mediante WB.

9.2. Modelo tumoral con tratamiento del compuesto SLT-0463

Para evaluar el efecto del compuesto SLT-0463 en el crecimiento tumoral del RMS, 1 millón de células de la línea RH4 fueron inyectadas en el músculo gastrocnemio de la extremidad posterior derecha de 10 ratones. El crecimiento tumoral fue evaluado una o dos veces por semana mediante palpación y medición con un pie de rey digital. El volumen tumoral fue calculado del mismo modo que en el modelo *in vivo* con infraregulación genética, aplicando la fórmula del volumen de una esfera. Tras 31 días, los ratones con tumores confirmados mediante palpación ($n=9$) fueron aleatorizados en dos grupos de igual volumen tumoral medio para comenzar la administración del tratamiento. Los ratones fueron tratados diariamente con el vehículo (Tabla 16) ($n=4$) o con 20mg/kg del compuesto SLT-0463 ($n=5$) mediante inyección intraperitoneal hasta el final del experimento. El peso de los ratones fue medido diariamente. Todos los ratones, a excepción de un ratón del grupo control que fue sacrificado 6 días antes, fueron eutanasiados tras 31 días de tratamiento. Los tumores fueron reseccionados, pesados y medidos. Finalmente, un fragmento de cada tumor fue conservado a -80°C y otro fue fijado en formalina y embebido en parafina.

| Componentes Vehículo SLT-0463 | | |
|-------------------------------|------------|----------------|
| Compuesto | Porcentaje | Casa Comercial |
| DMSO | 5% | Sigma-Aldrich |
| PEG-400 | 45% | Merck |
| Tween-80 | 4% | Sigma-Aldrich |
| H2O | 46% | Versol |

Tabla 16. Componentes del vehículo usado para diluir el compuesto SLT-0463 para su administración *in vivo*.

10. Representación tridimensional de la estructura de CDO

La predicción de la estructura tridimensional de CDO (AF-Q4KMG0-F1) fue generada mediante un método computacional de *machine learning* que incorpora conocimientos físicos y biológicos para la predicción de la estructura tridimensional de las proteínas a partir de su secuencia aminoacídica, accesible a través de la base de datos AlphaFold (309). Adicionalmente, a través del *Protein Data Bank* (PDB) pudimos acceder a las estructuras cristalinas del complejo cuaternario formadas entre el dominio FNIII de CDO y cada uno de los ligandos Hh (SHH: 3D1M, DHH: 3N1Q e IHH: 3N1F), resueltas mediante difracción de rayos X por J.M. Kavran et al. (310).

11. Cribado *in silico* de moléculas experimentales

La evaluación bioinformática de moléculas candidatas como posibles inhibidores de la vía Hh fue realizada por el Instituto Universitario de Ciencia y Tecnología (IUCT) del grupo InKemia (actual SELABTEC del grupo Leitat). Los componentes de la vía Hh seleccionados como dianas del cribado fueron: los ligandos SHH, DHH, e IHH; el receptor PTCH1 y los correceptores CDO, BOC y GAS1. La búsqueda de las moléculas candidatas para atacar las dianas previamente mencionadas se llevó a cabo en la Quimioteca privada de IUCT y en el repositorio de moléculas aprobadas para su uso farmacológico en Estados Unidos y Canadá, DrugBank (311). La evaluación se realizó mediante el uso de un *software* basado en el estudio de acoplamiento molecular, en adelante referido como *docking*, accesible desde la plataforma Mind the Byte: Itzamma. Brevemente, Itzamma corresponde a un *docking* de alto rendimiento diseñado para la identificación de compuestos activos. En primer lugar, estudia la proteína de interés y determina las tres mejores cavidades. A continuación, analiza la probabilidad de interacción de toda la biblioteca de compuestos contra estas tres cavidades. La puntuación de los compuestos corresponde a la media de las tres energías de interacción. Para poder realizar los experimentos de *docking*, son necesarias las estructuras cristalinas de las proteínas de interés (Tabla 17). Éstas fueron recopiladas a través del PDB, excepto en el caso de PTCH1 y GAS1, cuyas estructuras no estaban

disponibles en esta plataforma y fueron modelizadas a partir de su secuencia primaria mediante Swiss-model. En total se evaluaron más de 12.000 moléculas en cada experimento, realizándose más de 120.000 comparaciones moleculares y más de 150.000 dockings. Finalmente, se priorizaron 33 compuestos procedentes de la quimioteca privada de IUCT para su validación *in vitro*.

| Estructuras Cristalinas | | |
|-------------------------|---------------|------------------|
| Proteína | Base de Datos | Identificador |
| SHH | PDB | 3M1N |
| IHH | PDB | 3K7G |
| | | 3N1O |
| DHH | PDB | 2WFQ |
| | | 2WFR |
| PTCH | Swiss-model | Uniprot (Q13635) |
| CDO-IHH | PDB | 3N1F |
| BOC-IHH | PDB | 3N1M |
| | | 3N1P |
| GAS1 | Swiss-model | Uniprot (P54826) |

Tabla 17. Estructuras cristalinas seleccionadas para realizar los experimentos de *docking*.

12. Representación tridimensional de la estructura del compuesto SLT-0463

El nombre del compuesto SLT-0463 según la nomenclatura química de compuestos orgánicos recomendada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) es: N-[1-[2-Fluoro-4-(2-methoxyphenyl)phenyl]-2-oxopiperidin-3-yl]-5-pyridin-2-ylthiophene-2-sulfonamide. La estructura tridimensional del compuesto SLT-0463 fue generada mediante esta nomenclatura a través de la aplicación web MolView v2.4 (<http://molview.org>). Finalmente, la representación tridimensional de la posible

MATERIALES Y MÉTODOS

interacción entre el dominio FNIII de CDO y el compuesto SLT-0463 fue producida a través de la plataforma de descubrimiento de fármacos mcule (<http://mcule.com>).

13. Análisis del ciclo celular

El análisis del ciclo celular fue determinado mediante la cuantificación del contenido de ADN celular por citometría de flujo. El principio básico de la citometría de flujo es la medición de diversas propiedades individuales de una suspensión de partículas, en nuestro caso células, que se desplazan en un sistema de flujo en un período muy corto de tiempo. La medición de las características celulares reside en la alteración de la longitud de onda emitida por un láser que impacta en cada una de las células de la suspensión al pasar por un punto concreto. Finalmente, las variaciones en la longitud de onda son captadas e interpretadas por un programa informático.

El empleo de la citometría de flujo para el análisis del ciclo celular se basa en la detección de la cantidad de ADN. Concretamente, la variación en la cantidad de ADN celular es uno de los principales parámetros que permite diferenciar fácilmente las principales fases del ciclo: G1, S y G2. Durante la fase G1, las células sólo tienen una copia de cada cromosoma, durante la fase S el material genético se duplica hasta llegar a la fase G2, donde cada cromosoma está duplicado. Por lo tanto, el contenido de ADN en la fase G2 es el doble que en la fase G1 y las cantidades de ADN intermedias corresponden a las células en la fase S. Por otro lado, la cuantificación de ADN mediante citometría de flujo se basa en la tinción con fluorocromos de unión estequiométrica al ADN, los cuales, tras ser excitados por el láser del citómetro, permiten la evaluación proporcional del contenido de ADN mediante la detección de la fluorescencia emitida. En nuestros experimentos, la tinción del ADN fue realizada con yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés: *Propidium Iodide*), colorante impermeable a la membrana celular, que tiñe de manera indiscriminada tanto el ADN como el ARN. Por lo tanto, para poder inferir la cantidad de ADN a partir de la tinción con PI, se requieren la permeabilización de la membrana celular y la degradación del ARN. La metodología empleada en este trabajo consta de las siguientes etapas:

13.1. Fijación de las células

El medio de las células en cultivo fue recogido y éstas fueron desenganchadas, lavadas con PBS y contadas. 1 millón de células de cada condición fueron separadas y resuspendidas en 300µL de PBS. A continuación, las células fueron fijadas mediante la adición, bajo vórtex continuo para evitar agregados, de 700µL de etanol (Fisher Scientific) al 100% previamente enfriado a -20°C. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis en el citómetro. Además de conservar las células, el etanol también permeabiliza la membrana, permitiendo la entrada del PI en el interior de las células.

13.2. Tinción del ADN

Las células previamente fijadas, fueron centrifugadas a 5000rpm durante 5 minutos. Se realizó un lavado con PBS, seguido de un nuevo centrifugado, tras el cual, el sobrenadante fue decantado cuidadosamente. Las células fueron resuspendidas e incubadas durante toda la noche a -4°C en 1mL de la solución de tinción, la cual contenía: 30µL de una solución con PI (Sigma-Aldrich) a 500µg/mL y citrato de sodio (Sigma-Aldrich) a 38mM; 30µL de ARNasa A (Panreac) a 10mg/mL y PBS.

13.3. Determinación por citometría de flujo

El número de células y su contenido de ADN fue determinado mediante el citómetro FACS Calibur (BD Biosciences). Las primeras mediciones realizadas en las células corresponden a la dispersión frontal (*forward scatter*) y la dispersión lateral (*side scatter*) de la luz emitida por el láser. La primera se relaciona con la morfología y el tamaño, mientras que la segunda es proporcional a la granulosidad celular. Ambas fueron usadas para la discriminación de dobletes y otros agregados celulares (Ilustración 50). La detección del PI se realizó mediante la selección del láser de excitación de 488nm (láser azul) y el detector FL2 y fue utilizada para la segregación de las células en las diferentes fases del ciclo celular. Los resultados fueron analizados con el *software FCS Express 4 Flow Cytometry* (De Novo Software).

MATERIALES Y MÉTODOS

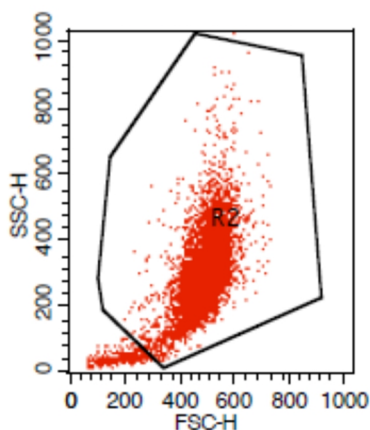


Ilustración 21. Ejemplo de la selección celular a analizar en función del forward scatter (FSC) y del side scatter (SSC).

14. Análisis de la apoptosis

El análisis de la apoptosis fue realizado mediante la detección de Anexina V conjugada con APC por citometría de flujo. Este ensayo se basa en los cambios estructurales de la membrana celular acontecidos en las primeras fases de la apoptosis y previos a la pérdida de integridad completa. La Anexina V es una glucoproteína dependiente de calcio con una elevada afinidad por los residuos de fosfatidilserina. En condiciones normales, la fosfatidilserina se encuentra en la superficie citoplasmática de la membrana celular. La inducción de la apoptosis provoca la pérdida de asimetría de la membrana celular, ocasionando la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular, facilitando así su detección y, por consiguiente, la discriminación entre las células apoptóticas y las sanas. Concretamente, empleamos la Anexina V conjugada con APC para el marcaje de las células apoptóticas y la tinción con Sytox Blue (impermeable a la membrana celular íntegra) para el marcaje de las células muertas. Ambos marcajes nos permiten distinguir entre las diferentes etapas de la apoptosis, siendo las células apoptóticas tempranas, aquellas con marcaje positivo de Anexina V, pero negativas para la tinción con Sytox Blue (Ilustración 22).

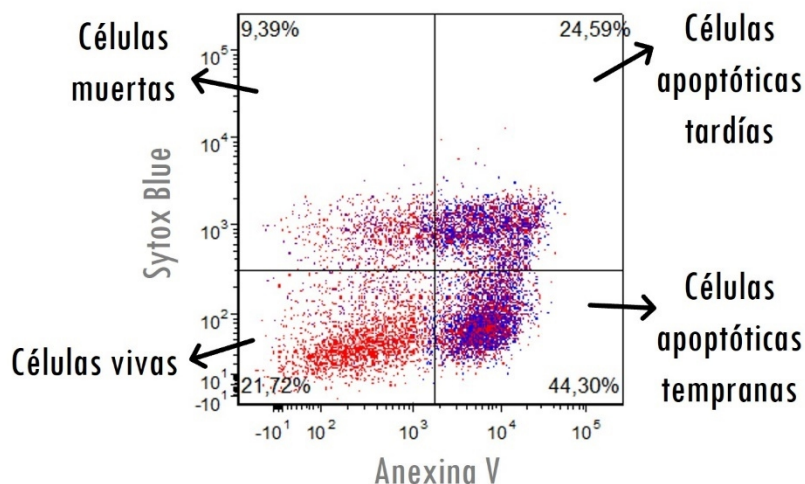


Ilustración 22. Poblaciones celulares distinguidas en función de su tinción con Annexina y Sytox Blue.

Para ello, el medio de las células en cultivo fue recogido y éstas fueron desenganchadas y contadas. 100.000 células de cada condición fueron separadas y resuspendidas en 100 μ L de Binding Buffer 1X (BD Biosciences) e incubadas durante 15 minutos con 5 μ L de Annexina V-APC (BD Biosciences). A continuación, se añadieron 400 μ L de Binding Buffer 1X y 0.5 μ L de Sytox Blue (Thermo Fisher Scientific). Cada condición fue analizada por triplicado. Adicionalmente, se añadieron condiciones extra para el ajuste correcto de las diferentes poblaciones: células sin tinción, células con cada uno de los marcadores por separado y células tratadas con cisplatino a 50 μ M durante 24 horas (teñidas con anexina o con ambos marcadores), como control positivo de apoptosis. Finalmente, las muestras fueron analizadas en el citómetro LSRFortessa (BD Bioscience). De nuevo, el análisis comenzó con la discriminación de dobletes y otros agregados celulares mediante el *forward* y el *side scatter*. La detección del Sytox Blue se realizó mediante la selección del láser de excitación de 405nm (láser violeta) y el detector F-Violet. El APC conjugado a la Annexina-V fue excitado con el láser de 640nm (láser rojo) y detectado con el C-red. Los resultados fueron analizados con el *software FCS Express 4 Flow Cytometry* (De Novo Software).

15. Ensayo de formación de colonias

La capacidad de las células para crecer de manera independiente, es decir, sin los estímulos paracrinos de las células vecinas, fue evaluada mediante su siembra a baja densidad. Para ello, 1.000 células de cada condición fueron sembradas en placas de 100mm e incubadas en medio sin tratamiento durante 11 (RH4 y RD) o 14 días (RH30). A continuación, las células fueron teñidas con cristal violeta al 0.5% durante 15 minutos. El exceso de tinte fue eliminado de las placas mediante continuos lavados con agua destilada. Una vez secas, las placas fueron escaneadas y las colonias fueron contadas mediante el *software* Image J.

16. Ensayo de invasión celular

La capacidad de invasión de las células fue determinada *in vitro* mediante ensayos *Transwell*. Este ensayo pretende simular los pasos previos a la formación de metástasis realizados por las células tumorales *in vivo*: la degradación de la matriz extracelular, la migración y la invasión de otros tejidos. Técnicamente, el *Transwell* consiste en un sistema de 2 cámaras separadas por una membrana porosa recubierta por una capa de Matrigel, mimetizando la matriz extracelular. Las células tumorales son sembradas en la cámara superior. La invasión de estas células hacia la cámara inferior es promovida mediante quimiotaxis, añadiendo FBS en el medio. De este modo, las células capaces de degradar el Matrigel y migrar a través de los poros de la membrana hasta invadir la cámara inferior, podrán ser teñidas y cuantificadas (Ilustración 23).

En nuestros experimentos, utilizamos insertos de *Transwell* con membranas de policarbonato con poros de 8µm en placas de 24 pocillos (Corning). Las membranas fueron recubiertas con 25µL de *Matrigel Growth Factor Reduced* (Corning) diluido 1/3 en medio sin suero. Todo el material empleado en contacto con el Matrigel fue previamente enfriado (líquidos a 4°C y sólidos a -20°C) para evitar la polimerización del matrigel. Una vez dispuesto de manera uniforme en las membranas de los *Transwell*, se mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente para su solidificación. Se añadieron 600µL de medio suplementado con FBS al 10% en las cámaras inferiores y

se sembraron 100.000 células en las cámaras superiores en 100 μ L de medio sin FBS. Los tratamientos correspondientes fueron añadidos en ambos medios. Tras 24 (RH4 y RH30) o 48 horas de incubación en las condiciones normales de cultivo, se aspiraron los medios de ambas cámaras y se fijaron las células con paraformaldehído (Fisher Scientific) al 4%, añadiendo 100 μ L en las cámaras superiores y 600 μ L en las cámaras inferiores. Se realizaron tres lavados con PBS y se eliminaron los restos de Matrigel y de células de la cámara superior con ayuda de un bastoncillo. Las células que habían migrado a la cámara inferior fueron teñidas con Hoechst-33342 (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 5ng/mL durante 10 minutos. Los restos del colorante fueron eliminados mediante tres lavados con PBS. A continuación, se realizaron 5 fotos de cada inserto con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-S) y finalmente, las células de cada foto fueron contadas mediante el software *Image J*. Cada condición fue evaluada por triplicado y se realizaron tres réplicas independientes de cada ensayo.

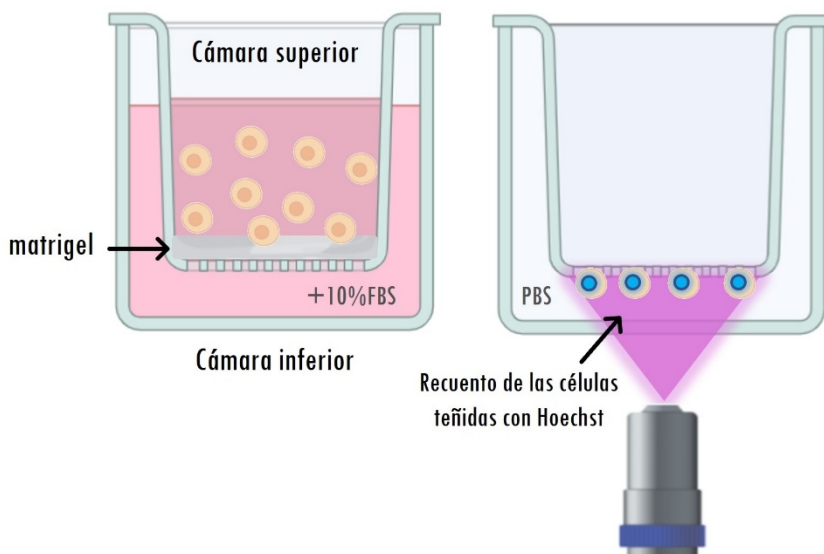


Ilustración 23. Representación del ensayo transwell para la determinación de la invasión celular in vitro. Ilustración creada con Biorender.

17. Análisis estadístico

De manera general, las figuras y los análisis estadísticos fueron generados con el software GraphPad Prism 8. A menos que se indique lo contrario, los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar de las réplicas de un experimento representativo. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student de dos colas en las comparaciones entre dos grupos, o la prueba ANOVA de un factor, en las comparaciones entre más de dos grupos. Adicionalmente, las comparaciones realizadas a lo largo del tiempo, como la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo*, fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de dos factores. La prueba aplicada para las comparaciones múltiples fue el test de Dunnett.

En todos los análisis la significancia estadística empleada siguió el siguiente criterio:

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0.0001$.

RESULTADOS

1. La estrategia de inhibición peptidomimética no muestra un efecto antioncogénico relevante

Alentados por los resultados publicados recientemente en el *British Journal of Cancer*, los cuales enfatizaron por primera vez la importancia de los ligandos Hh en la oncogenicidad del RMS e incluyeron a este tumor dentro del grupo de neoplasias con activación de la vía Hh dependiente de ligando (298), colaboramos con la compañía biotecnológica Iproteos —especializada en la investigación y el desarrollo de fármacos de tercera generación basados en peptidomiméticos— en el desarrollo de nuevos compuestos inhibidores de la activación canónica de la vía Hh.

Los peptidomiméticos son compuestos que recapitulan la estructura 3D de péptidos o proteínas naturales, conservando la capacidad de interactuar con sus dianas biológicas y producir el mismo efecto o inhibirlo (312). En este caso, Iproteos, mediante herramientas de modelaje *in silico*, diseñó y sintetizó una primera batería de 4 compuestos peptidomiméticos (IP-1, IP-2, IP-3 e IP-4) basados en la estructura 3D de los ligandos Hh. Concretamente, con el propósito de provocar una inhibición competitiva de la activación ligando-dependiente de la vía, su diseño se centró en el dominio responsable de la interacción con el receptor PTCH (Figura 1). Los compuestos IP-1 e IP-2 fueron desestimados para los siguientes experimentos debido a que poseían un perfil de solubilidad muy bajo, que habría complicado su posible futura administración *in vivo*.

En primer lugar, se evaluó la capacidad antitumoral *in vitro* de los peptidomiméticos IP-3 e IP-4 mediante estudios de viabilidad WST-1 tras 2, 4 y 8 días de tratamiento a diferentes concentraciones en la línea celular de RMSe, RD, y tras 2, 4 y 7 días en la línea celular de RMSa fusión PAX3-FOXO1 positiva, RH4 (Figura 2). El compuesto IP-3 fue el que mostró una mayor eficacia en ambas líneas celulares, consiguiendo una reducción de la viabilidad celular dosis-dependiente tras 8 y 7 días de tratamiento de hasta el 50% en la dosis más alta testada (1000nM).

RESULTADOS

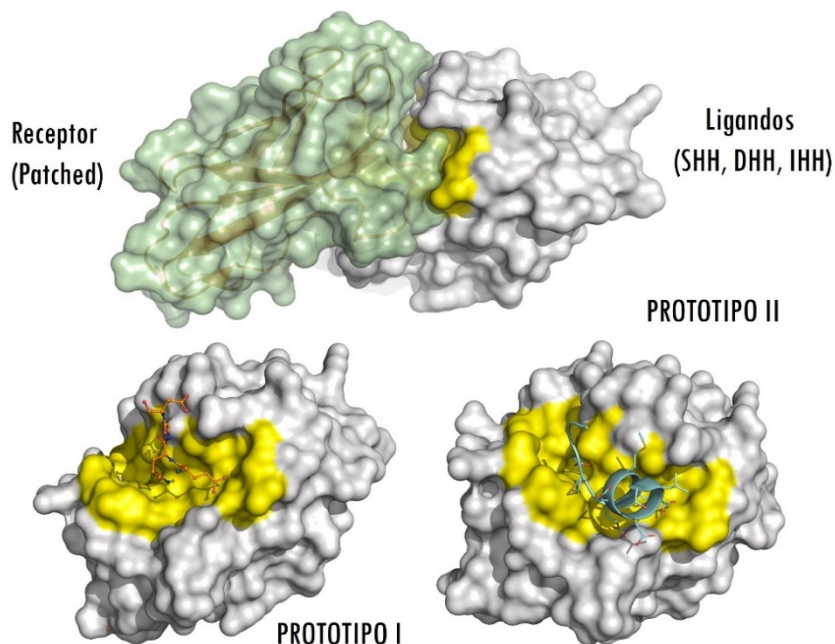


Figura 1. Prototipos 3D de los peptidomiméticos diseñados computacionalmente para inhibir la interacción ligando-receptor de la vía Hh. Imagen cedida por Iproteos.

A continuación, gracias a la información funcional obtenida de los experimentos *in vitro*, se diseñó una nueva batería de péptidos estructuralmente relacionados con el mejor compuesto de la primera fase, el IP-3, hasta diseñar un total de doce nuevos peptidomiméticos. En esta ocasión, la actividad antitumoral se evaluó mediante el ensayo de proliferación celular por tinción con cristal violeta tras 5 días de incubación de las líneas celulares RD y RH4 con los respectivos peptidomiméticos a 1000nM. Sin embargo, ninguno de ellos demostró un efecto consistente sobre la inhibición de la proliferación, motivo por el cual desestimamos la continuación de su caracterización preclínica (Figura 3).

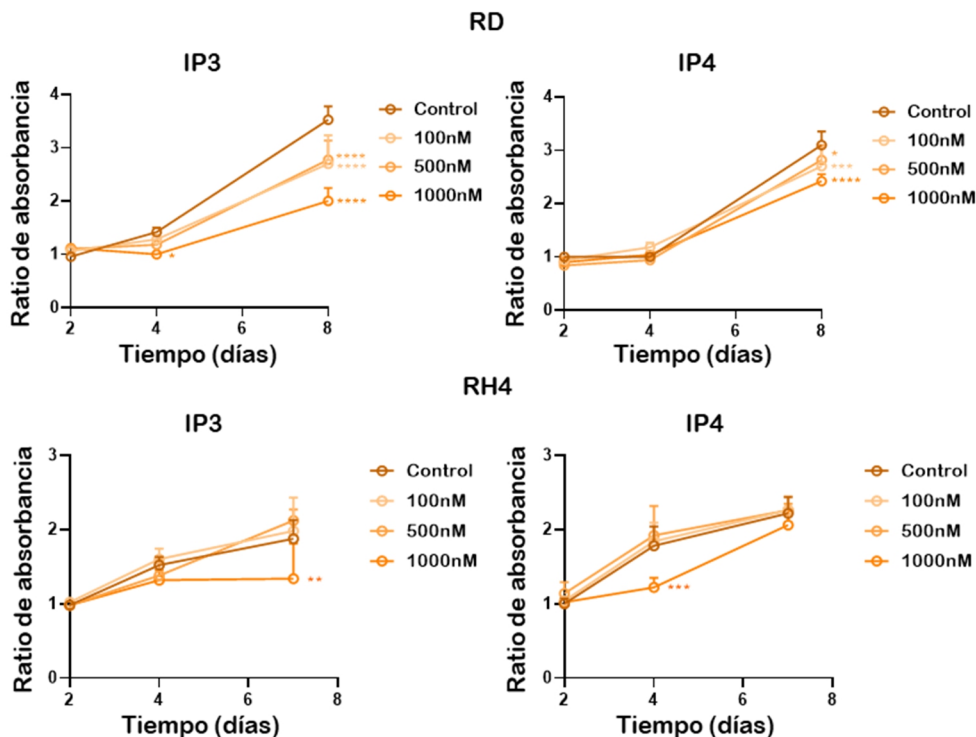


Figura 2. Efecto de los peptidomiméticos IP3 e IP4 sobre la viabilidad celular *in vitro* de dos líneas celulares de RMS. Ensayo de WST-1 en las líneas celulares RD (panel superior) y RH4 (panel inferior) tras 2, 4 y 8 o 7 días, respectivamente, de incubación con los correspondientes compuestos peptidomiméticos, IP3 (izquierda) o IP4 (derecha), a 100, 500 y 1000nM (líneas naranjas). La condición control (línea marrón) fue tratada con la cantidad equivalente de DMSO. El gráfico muestra el incremento de la absorbancia media (SD) de 5 réplicas por condición referidas a la condición control del día 2. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Paralelamente al cribado funcional de los nuevos compuestos y con el fin de determinar la capacidad del compuesto IP3 de modular la activación de la vía, se realizó un estudio de los niveles de transcripción de los componentes y dianas de la vía Hh: *GLI1*, *GLI2* y *PTCH1*, mediante RT-qPCR, en las líneas celulares RD y RH4 tras 3 días de incubación con el compuesto IP3 a 1000nM (Figura 4). En congruencia con los resultados de la Figura 3, no se observó ningún cambio de expresión en los componentes de la vía Hh analizados.

RESULTADOS

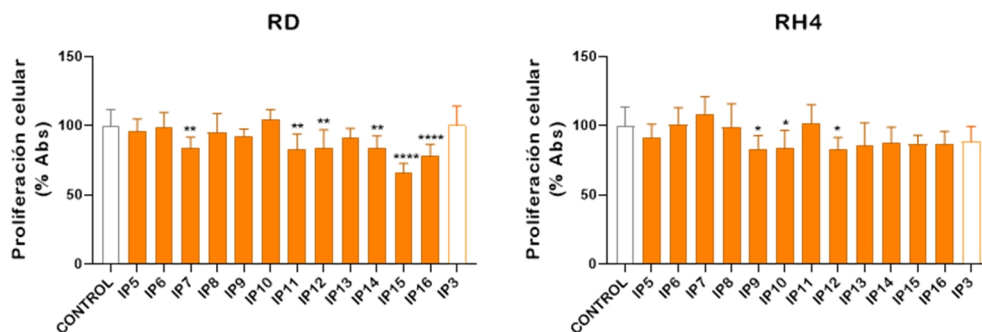


Figura 3. Efecto de los peptidomiméticos basados en el IP3 sobre la proliferación celular *in vitro*.

Ensayo de proliferación en las líneas celulares RD (izquierda) y RH4 (derecha) tras 5 días de incubación con los correspondientes nuevos compuestos peptidomiméticos IP5-16 (barras de color naranja) y con el compuesto de referencia IP3 (barra de color blanco con bordes naranjas) a 1000nM. La condición control (barra de color blanco con bordes grises) fue tratada con la cantidad equivalente de DMSO. Los valores corresponden a la media (SD) de la absorbancia del cristal violeta a 590nm de 8 réplicas por condición referidas a la condición control, tomada como 100%. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de un factor, donde * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

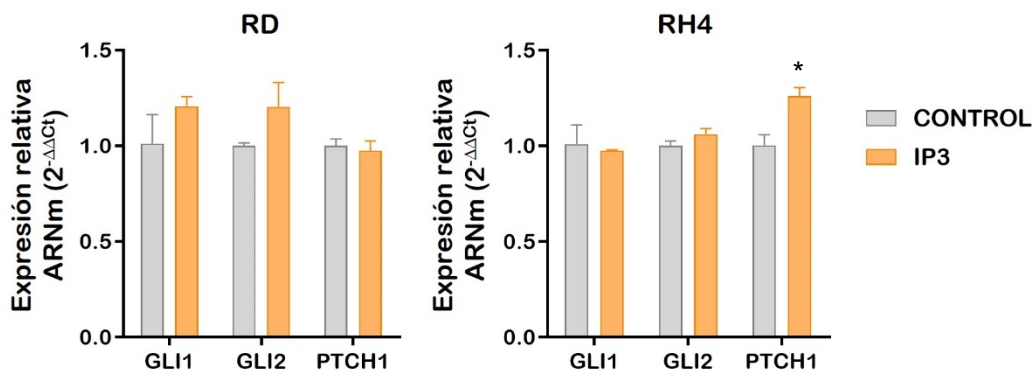


Figura 4. El péptido IP3 no modula la expresión de los componentes y dianas de la vía Hh.

Expresión relativa del ARNm de *GLI1*, *GLI2* y *PTCH1* en las líneas celulares RD y RH4 tras 3 días de incubación con el compuesto IP3 (barras de color naranja). La condición control (barras de color gris) fue tratada con la cantidad equivalente de DMSO. Los datos fueron normalizados con la expresión del gen endógeno *TBP*, referidos a la expresión de la condición control y finalmente, expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los resultados representan la media (SD) de 3 réplicas por condición. La significación estadística fue analizada mediante la prueba t de Student, donde * $p < 0.05$.

2. CDO es el correceptor Hh predominante en líneas celulares y tumores de RMS

Con la intención de caracterizar la implicación de los correceptores de la vía Hh en el desarrollo y la progresión del RMS, analizamos la expresión de BOC y CDO en un amplio panel de líneas celulares y tumores.

Los niveles de expresión génica de *BOC* y *CDO* fueron analizados mediante RT-qPCR en un total de 8 líneas celulares de RMS –tres correspondientes al subtipo alveolar con translocación *PAX3-FOXO1* (RH4, RH30 y RH28), una con translocación *PAX7-FOXO1* (CW9019), una alveolar sin translocación (RH18) y tres del subtipo embrionario (RD, RH36 y RUCH2)– y 58 muestras de tumores de pacientes (Figuras 5 y 6 A-B). Ambas aproximaciones indicaron una expresión de los genes *BOC* y *CDO* mayor en las muestras de RMS que en las muestras no cancerosas usadas como referencia: fibroblastos en el caso de la expresión en líneas celulares y muestras de tejido muscular adulto en el caso del análisis en pacientes. No obstante, la diferencia hallada fue más relevante y significativa en el caso de *CDO*, donde algunos pacientes mostraron una expresión del orden de 150 veces mayor que la del músculo adulto sano (Figura 6 B). Así mismo, el análisis realizado nos permitió escrutar las diferencias de expresión entre los dos subtipos histológicos mayoritarios de RMS, siendo el RMSe el que presentó una expresión preponderante de ambos correceptores. De nuevo, la disparidad observada se acentuó en el estudio de la expresión de *CDO* en muestras de pacientes, donde la diferencia entre ambos subtipos fue estadísticamente significativa (Figura 6 B).

Adicionalmente, complementamos el análisis en pacientes mediante la utilización de perfiles de expresión de *microarrays* públicos. Para ello, exploramos, a través de la aplicación de visualización y análisis genómico R2 (<http://r2.amc.nl>), los perfiles de expresión de las dos bases de datos de RMS que incluían un mayor número de pacientes: *ps_avgpres_rmstriche147_u133a* publicada por Elai Davicioni en el año 2000 y *ps_avgpres_gse92689geo186_u133a* publicada en el año 2016 por Mervi Heiskanen. En ambos estudios la expresión fue estimada mediante la plataforma U133A de Affymetrix

RESULTADOS

y los datos fueron normalizados mediante el método MAS5.0, lo cual permite la comparación de ambas en un mismo análisis. De este modo, nos descargamos y unificamos los datos de expresión de *CDO* (sonda 207230_at) de ambas bases de datos, obteniendo un tamaño muestral de 254 pacientes, y los comparamos con 32 perfiles de expresión de *CDO* de músculo esquelético sano adquiridos de dos bases de datos creadas con las mismas condiciones (plataforma U133A, normalización MAS5.0): *ps_avgpres_xtmusclehofman121_u133a* publicada por Eric P. Hoffman en 2005 y *ps_avgpres_dmdmuscle36_u133a* publicada por Mario Pescatori et al. en 2006 (Figura 6 C). El análisis corroboró las diferencias observadas en las muestras de pacientes analizadas por RT-qPCR entre el músculo sano y los tumores de RMS. Lamentablemente, esta aproximación no pudo ser realizada con la expresión de *BOC*, debido a la falta de una sonda específica para este gen en la plataforma U133A.

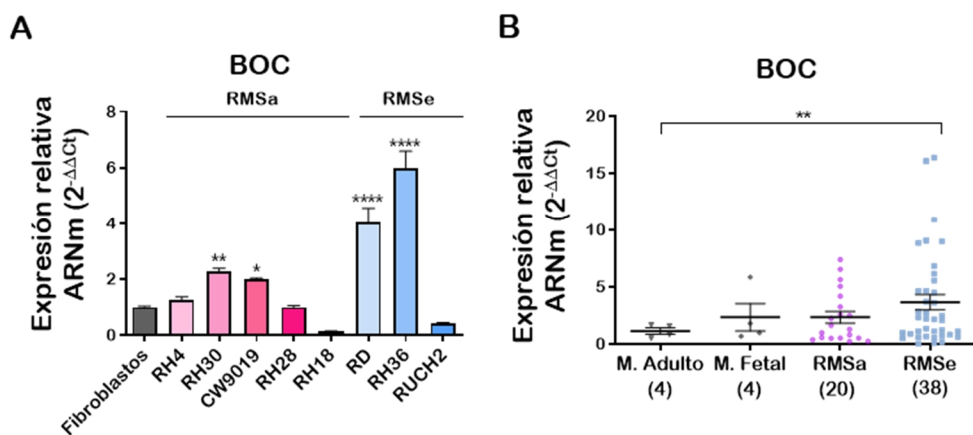


Figura 5. El correceptor *BOC* se expresa ampliamente en líneas celulares y tumores de RMS. A, Expresión relativa del ARNm de *BOC* en un panel de 8 líneas celulares de RMS, 5 RMSa (barras en tonos rosados) y 3 RMSe (barras en tonos azules). Los datos fueron normalizados con la expresión del gen endógeno *TBP*, referidos a la expresión en fibroblastos y finalmente, expresados como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Los resultados representan la media (SD) de 3 réplicas por condición. **B,** Expresión relativa del ARNm de *BOC* en un panel de 58 muestras de tumores de pacientes y en tejido de músculo fetal sano. Los datos fueron normalizados con la expresión del gen endógeno *TBP*, referidos a la expresión promedia de muestras de músculo adulto sano y finalmente, expresados como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Los resultados representan la media (SD) de las muestras analizadas en cada grupo: Músculo Adulto (n=4); Músculo Fetal (n=4); RMSa (n=20); RMSe (n=38). La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de un factor, donde * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

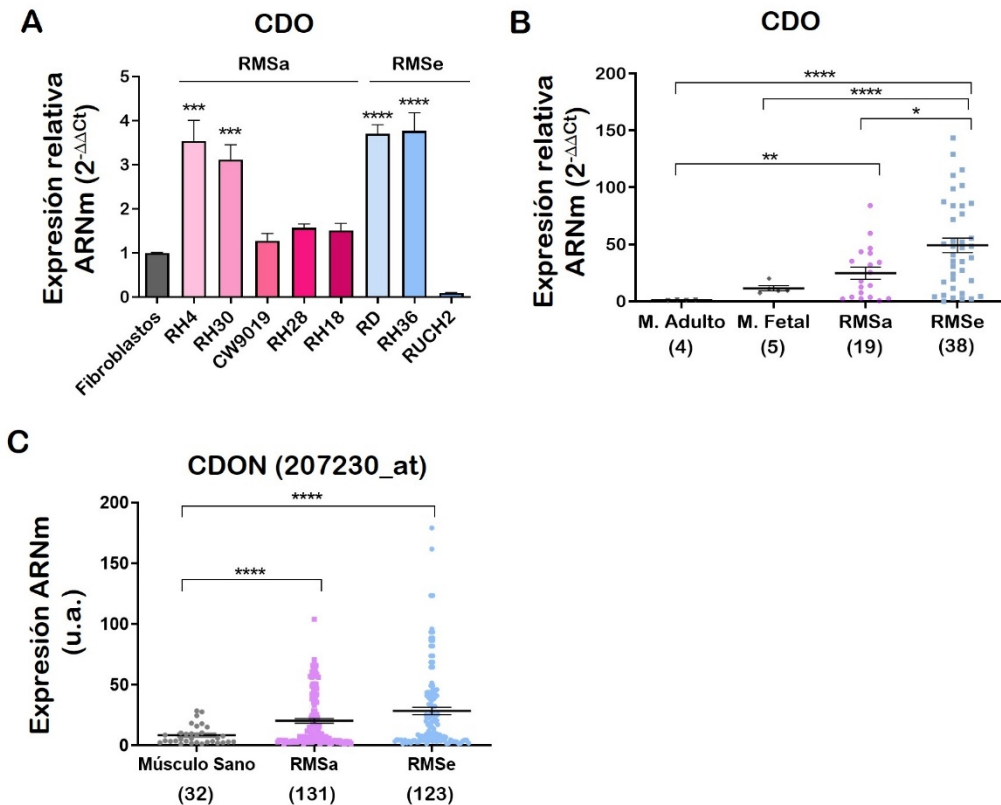


Figura 6. El correceptor CDO está sobreexpresado en líneas celulares y tumores de RMS. A, Expresión relativa del ARNm de *CDO* en un panel de 8 líneas celulares de RMS, 5 RMSa (barras en tonos rosados) y 3 RMSe (barras en tonos azules). Los datos fueron normalizados con la expresión del gen endógeno TBP, referidos a la expresión en fibroblastos y finalmente, expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados representan la media (SD) de 3 réplicas por condición. **B,** Expresión relativa del ARNm de *CDO* en un panel de 57 muestras de tumores de pacientes y en tejido de músculo fetal sano. Los datos fueron normalizados con la expresión del gen endógeno TBP, referidos a la expresión promedio de muestras de músculo adulto sano y finalmente, expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados representan la media (SD) de las muestras analizadas en cada grupo: Músculo Adulto (n=4); Músculo Fetal (n=5); RMSa (n=19); RMSe (n=38). **C,** Los datos de expresión de *CDON* (207230_at) fueron extraídos de la plataforma de análisis de datos genómicos R2 (<http://r2.amc.nl>). En la gráfica se representan la expresión individual y la media (SD) de 32 muestras de músculo esquelético humano sano (puntos en gris) procedentes de la unión de las bases de datos de Hofman y Pescatori, 131 muestras de RMSa (cuadrados morados) y 123 muestras de RMSe (puntos azules) procedentes de la unión de las bases de datos de Davicioni y Heiskanen. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de un factor, donde * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

Finalmente, el análisis de expresión proteica de BOC y CDO por WB en el panel de líneas celulares de RMS (Figura 7), fue concordante con los datos obtenidos mediante el análisis de la expresión génica. La cuantificación de los WB confirmó tanto la expresión preponderante de CDO sobre BOC, como la tendencia a una mayor

RESULTADOS

expresión de ambos correceptores en el subtipo embrionario (Tabla 20). Concretamente, respecto al panel de líneas celulares analizadas, las líneas con mayor expresión de BOC fueron RD y RH36, ambas pertenecientes al subtipo embrionario. Además, estas dos líneas junto con las líneas de RMSa RH4 y RH30, fueron las que presentaron una mayor expresión de CDO.

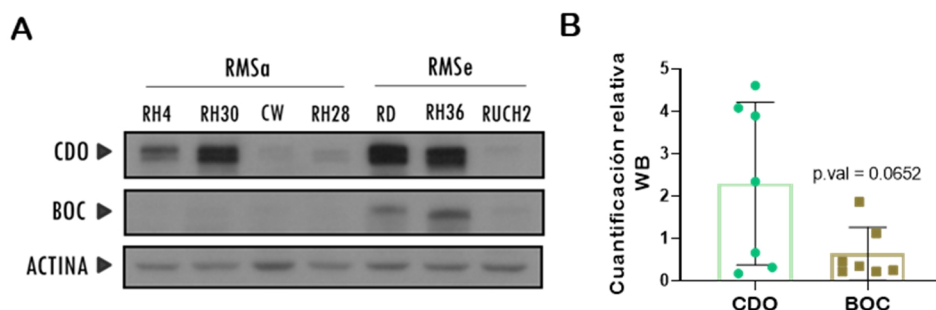


Figura 7. CDO es el correceptor más expresado en líneas celulares de RMS. **A**, Western Blot (WB) mostrando los niveles de proteína de CDO y BOC en un panel de 7 líneas de RMS, 4 líneas del subtipo alveolar y 3 líneas del subtipo embrionario. Leyenda: CW (CW9019). La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas del WB (**A**) de CDO (puntos verdes) y BOC (puntos marrones) de cada línea celular referida a su control de carga. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Las barras del gráfico muestran la media (SD) de la expresión de todas las líneas analizadas. La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student

| Diferencias de expresión entre los subtipos histológicos de RMS | | | | |
|---|---------|--------|----------------------------|---------|
| PROTEINA | SUBTIPO | MEDIA | DIFERENCIA MEDIAS ± SEM | p.valor |
| CDO | RMSa | 1,989 | 0,7310 ± 1,575 | 0,6620 |
| | RMSe | 2,720 | | |
| BOC | RMSa | 0,3214 | 0,7514 ± 0,4787 | 0,2544 |
| | RMSe | 1,073 | | |

Tabla 18. El subtipo embrionario tiende a expresar niveles más altos de los correceptores Hh que el subtipo alveolar. Análisis estadístico (prueba t de Student) de las diferencias de expresión de las proteínas CDO y BOC, usando los valores cuantificados en la Figura 3. Leyenda: SEM (Error Estándar de la Media, por sus siglas en inglés *Standard Error of the Mean*)

3. La depleción genética de BOC tiene un efecto leve en la proliferación de las células de RMS *in vitro*

Con el propósito de determinar las propiedades oncogénicas de BOC en el RMS, generamos dos líneas celulares con infraregulación genética estable de *BOC* mediante shRNA. Para ello, infectamos las líneas celulares RD y RH4 con el vector lentiviral pGIPZ vacío, o con hasta 3 shRNA independientes diseñados específicamente contra *BOC*, denominados sh19, sh64 y sh65. En ambas líneas, los shRNA que mejor inhibieron la expresión de *BOC* tanto a nivel de proteína como de ARNm, fueron el sh19 y el sh65 (Figura 8).

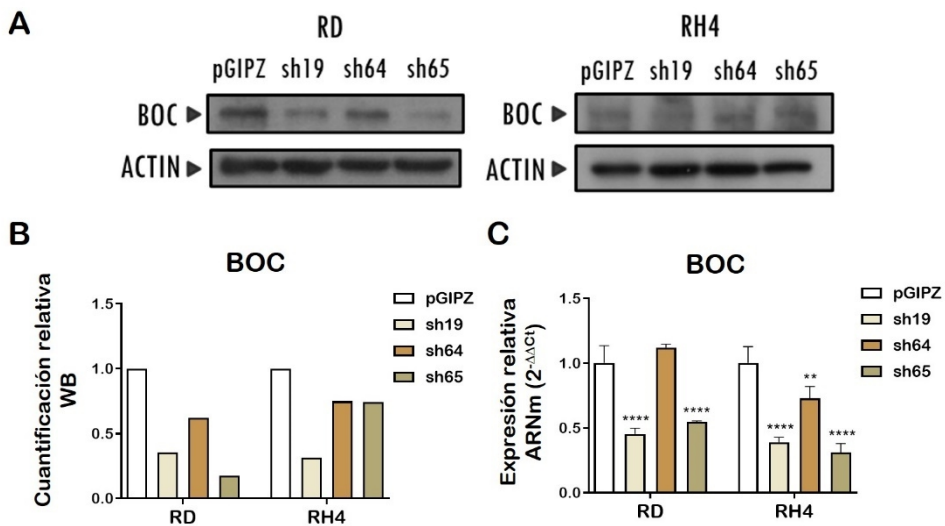


Figura 8. Los shRNA sh19 y sh65 reducen los niveles de ARNm y de proteína de BOC. **A**, Western Blot (WB) mostrando los niveles de proteína de BOC en las líneas celulares RD (izquierda) y RH4 (derecha) transducidas con el vector control pGIPZ y tres shRNAs contra *BOC* (sh19, sh64 y sh65). La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas del WB de BOC (**A**). La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos a la condición control (pGIPZ), en blanco. **C**, Expresión relativa del ARNm de *BOC* en las líneas celulares RD y RH4 transducidas con el vector control pGIPZ y tres shRNAs contra *BOC* (sh19, sh64 y sh65). Los datos fueron normalizados con la expresión del gen endógeno *TBP*, referidos a la expresión de la condición control (pGIPZ) y finalmente, expresados como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Los resultados representan la media (SD) de 3 réplicas por condición. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

RESULTADOS

Una vez generada la herramienta de depleción genética en las líneas celulares de RMS, procedimos a comprobar el efecto de la pérdida de expresión de *BOC* en la proliferación celular (Figura 9). De manera consistente, los shRNA asociados a una mayor disminución de la expresión de *BOC*, el sh19 y el sh65, fueron los más efectivos inhibiendo la proliferación. No obstante, la reducción de la proliferación observada fue moderada, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición control tras 5 días de incubación, que, en el mejor de los casos, supusieron una disminución del incremento de células de menos de la mitad.

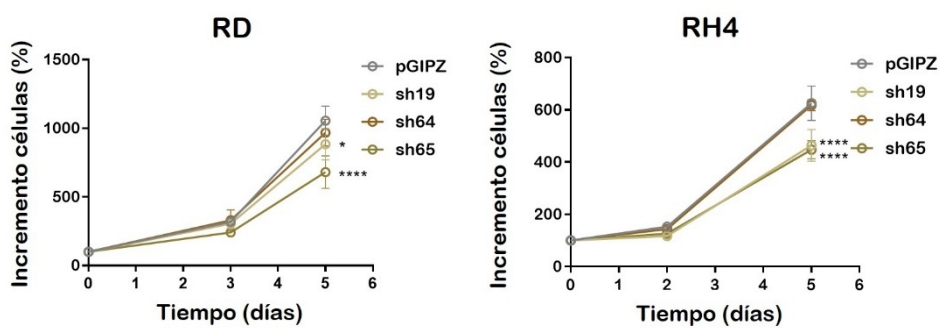


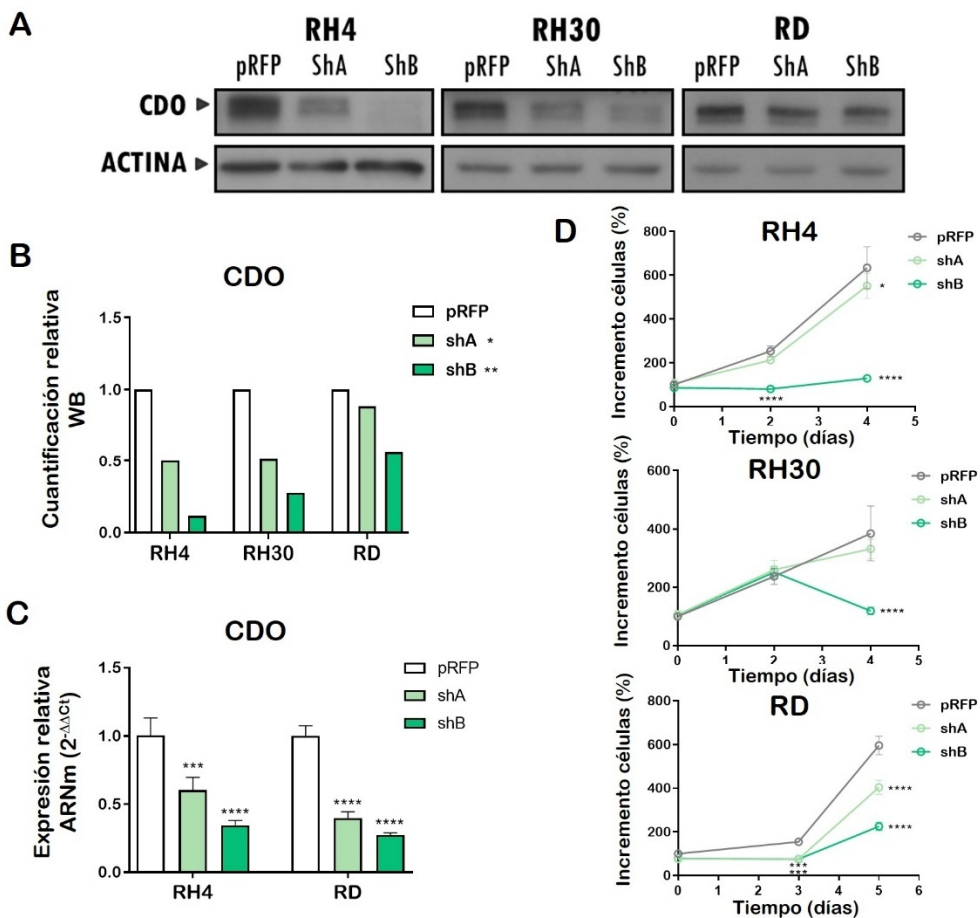
Figura 9. La inhibición genética de BOC tiene un efecto leve sobre la proliferación celular del RMS. Curvas de proliferación celular de las líneas celulares RD (izquierda) y RH4 (derecha) transducidas con el vector control pGIPZ y tres shRNAs contra BOC (sh19, sh64 y sh65). El número de células de cada condición fue evaluado a 0, 3 y 5 días post-siembr en el caso de la línea RD, y a 0, 2 y 5 días en el caso de la línea RH4. Los valores muestran la media (SD) de 3 réplicas por condición. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

4. La depleción genética de CDO reduce los niveles de GLI3 y compromete la proliferación de las células de RMS

4.1. La inhibición de CDO compromete drásticamente la proliferación celular *in vitro*

Del mismo modo que en el estudio realizado sobre BOC, con la intención de determinar las posibles propiedades oncogénicas de CDO en el RMS, generamos líneas celulares con infraregulación genética estable de *CDO* mediante shRNA. En este caso, infectamos tres líneas celulares de RMS (RD, RH4 y RH30) con el vector lentiviral pRFP vacío, o con 2 shRNA independientes diseñados específicamente contra *CDO*,

denominados shA y shB. El vector que redujo de manera más eficiente los niveles de proteína y ARNm de *CDO* en las líneas celulares testadas fue el shB. Consistentemente, la proliferación celular fue comprometida de manera acorde al grado de inhibición de *CDO* (Figura 10). De esta manera, en la línea RH4 donde la privación de *CDO* conseguida fue prácticamente total, el crecimiento celular fue inhibido tan drásticamente que imposibilitó el cultivo celular prolongado de las células transducidas con el vector shB. Consecuentemente, en las líneas RH30 y RD, donde la privación de *CDO* fue parcial, la reducción de la proliferación celular fue menos drástica. Siendo, la línea de mayor expresión de *CDO*, RD (Figura 7), la más resistente a la inhibición genética de *CDO*.



RESULTADOS

Figura 10. La inhibición genética de CDO compromete la proliferación celular del RMS. **A,** Western Blot (WB) mostrando los niveles de proteína de CDO en las líneas celulares de RMSa RH4 y RH30 y la línea de RMSe RD, transducidas con el vector control pRFP y dos shRNAs contra CDO (shA y shB). La actina fue usada como control de carga. **B,** Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas del WB de CDO (**A**). La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos a la condición control (pRFP), en blanco. **C,** Expresión relativa del ARNm de *CDO* en las líneas celulares RH4 y RD transducidas con los vectores pRFP, shA y shB. Los datos fueron normalizados con la expresión del gen endógeno *TBP*, referidos a la expresión de la condición control (pRFP) y finalmente, expresados como $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Los resultados representan la media (SD) de 3 réplicas por condición. **D,** Curvas de proliferación celular de las líneas celulares de RMS transducidas con los vectores pRFP, shA y shB. El número de células de cada condición fue evaluado a 0, 2 y 4 días post-siembra en el caso de la línea RH4 y RH30, y a 0, 3 y 5 días en el caso de la línea RD. Los valores muestran la media (SD) de 3 réplicas por condición. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

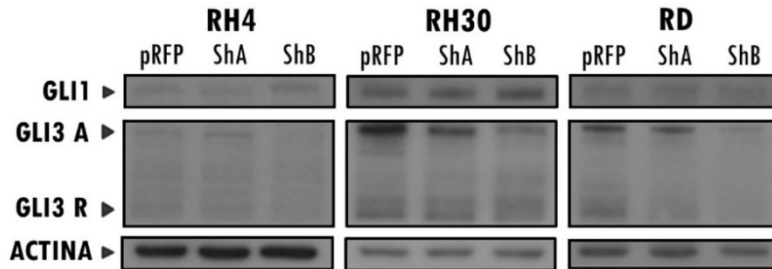
4.2. La inhibición de CDO reduce los niveles del efector de la vía Hh más expresado en RMS, GLI3

A continuación, dada la falta de información sobre la señalización desencadenada por CDO, decidimos comprobar el estado de activación de la vía Hh tras la depleción genética de CDO. En la Figura 11 se muestran los niveles de proteína de los factores de transcripción GLI1 y GLI3. La cuantificación de los WB realizados en las tres líneas celulares nos permitió obtener un valor de expresión y una significación estadística de las diferencias, además de aportar consistencia biológica a los resultados. En resumen, concluimos que la inhibición genética de CDO provoca una disminución del factor de transcripción GLI3, tanto de su forma activa (GLI3-A) como de su forma represora (GLI3-R), consistente en las tres líneas celulares de RMS testadas.

Interesados por el claro efecto observado en GLI3, otro componente de la vía Hh cuyo papel en RMS permanece inexplorado, comparamos los niveles de expresión de los tres factores de transcripción GLI en todas las bases de datos de pacientes con RMS, accesibles desde la plataforma R2. En total, en la Figura 12 se muestra la expresión de GLI1, GLI2 y GLI3 en las siguientes cinco bases de datos de pacientes: *ps_avgpres_gse66533geo58_u133p2* publicada por F.G. Barr en 2016, *ps_avgpres_rmsschafer30_u133a* publicada por B.W. Schafer en 2008, *ps_avgpres_gse114621geot101_huex10t* publicada por S.X. Skapek en 2018 y las

publicadas por E. Davicioni y M. Heiskanen, previamente mencionadas. A pesar de las diferentes plataformas y metodologías de análisis, en todas las bases de datos el factor de transcripción más expresado fue GLI3, seguido de GLI2 y, por último, el menos expresado, GLI1. Sugiriendo un posible papel preponderante de GLI3 en el RMS.

A



B

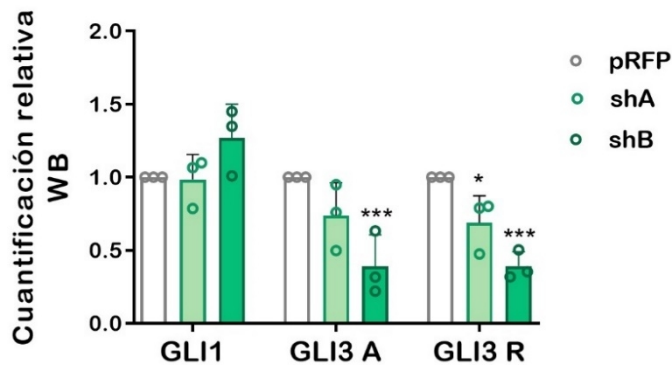


Figura 11. La inhibición genética de *CDO* disminuye los niveles de expresión del factor de transcripción GLI3. **A**, Western Blot (WB) mostrando los niveles de proteína de GLI1 y GLI3 (GLI3-A y GLI3-R) en las líneas celulares RH4, RH30 y RD, transducidas con el vector control pRFP y dos shRNAs contra *CDO* (shA y shB). La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas del WB del apartado **A**. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos a la condición control (pRFP), en blanco. Las barras representan la media (SD) de la cuantificación relativa de las tres líneas celulares analizadas (círculos). La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA, donde * p<0.05; *** p<0,001.

RESULTADOS

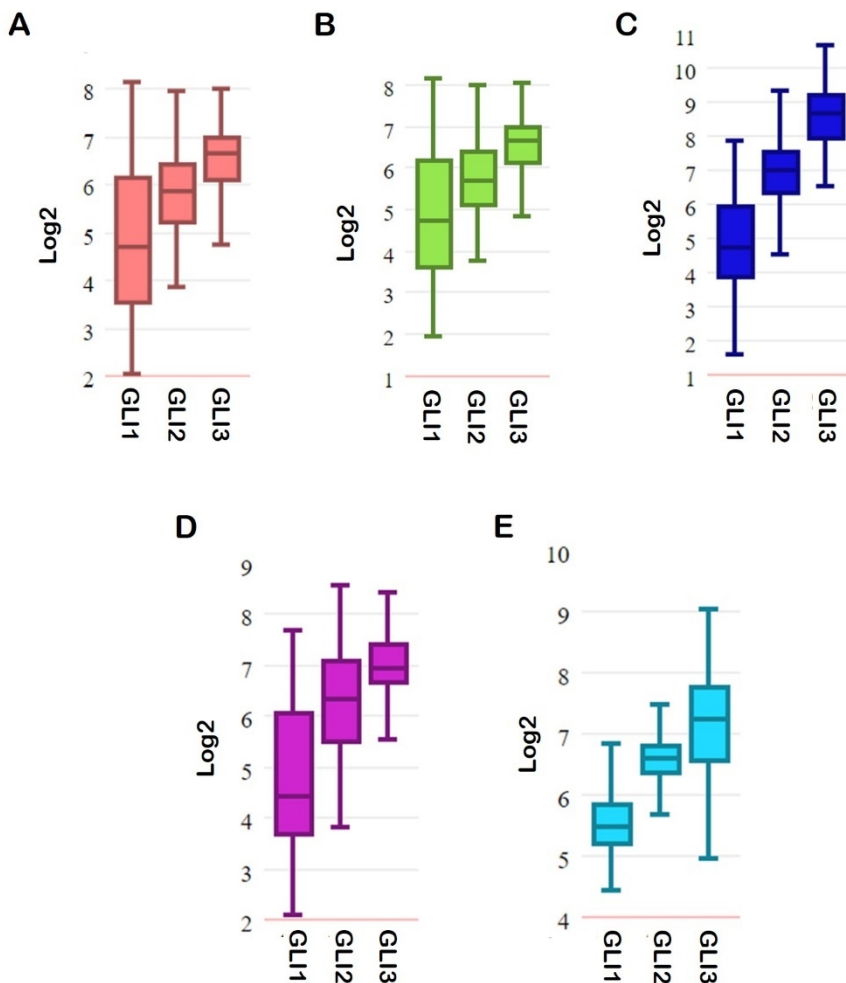


Figura 12. GLI3 es el efector de la vía Hh más expresado en tumores de RMS. Datos de expresión de los factores de transcripción GLI1, GLI2 y GLI3 en tumores de RMS, extraídos de la plataforma de análisis de datos genómicos R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>). Los gráficos representan la expresión (Log2) de cada una de las bases de datos de de RMS disponibles en la plataforma R2: **A**, Gráficos en rojo mostrando los datos obtenidos de la base de datos de Davicioni; **B**, Gráficos en verde mostrando los datos obtenidos de la base de datos de Heiskanen; **C**, Gráficos en azul oscuro mostrando los datos de la base de datos de Barr; **D**, Gráficos en morado mostrando los datos obtenidos de la base de datos de Schafer; **E**, Gráficos en azul claro mostrando los datos obtenidos de la base de datos de Skapek.

4.3. La inhibición genética de CDO reduce el crecimiento tumoral del RMS *in vivo*

Por último, esperando corroborar los resultados anti-proliferativos obtenidos *in vitro*, decidimos comprobar el efecto de la depleción genética de *CDO in vivo* mediante la realización de un modelo de crecimiento tumoral ortotópico (Figura 13). Para ello, la línea celular RH4 fue infectada con el vector control pRFP o con el vector shB. Cuatro días después de la infección, se inyectaron 3 millones de células viables en el músculo gastrocnemio de 8 ratones inmunodeprimidos (SCID-Beige) por grupo. Una porción de estas células fue de nuevo sembrada *in vitro* para la evaluación de la expresión de CDO por WB tras 5 y 12 días después de la inyección. Pudimos comprobar que, en estas células, la expresión de CDO permaneció infra regulada durante, al menos, los 5 primeros días después de la inyección de las células en los ratones. Sin embargo, el análisis por WB mostró como tras 12 días de la inyección, los niveles de proteína de CDO fueron restaurados. Paralelamente, el crecimiento tumoral fue evaluado semanalmente. En la Figura 13 B-C, se muestra la evolución del volumen de los tumores hasta el día 50, día en el que el primer ratón del grupo control fue sacrificado según el criterio de punto final de volumen máximo establecido ($\geq 500\text{mm}^3$). Ambos gráficos confirmaron una reducción estadísticamente significativa del crecimiento tumoral en los ratones del grupo shB. Sin embargo, debido a la restauración de los niveles de CDO observada en las células *in vitro*, decidimos alargar el estudio hasta que todos los tumores alcanzaran el criterio de punto final de volumen máximo. Las diferencias entre los dos grupos se magnificaron en el día 53, momento en el cual más de la mitad de los ratones del grupo control y ningún ratón del grupo con infra regulación de CDO, fueron sacrificados. No obstante, al final del estudio todos los ratones desarrollaron tumores con un volumen igual o superior a 500mm^3 .

RESULTADOS

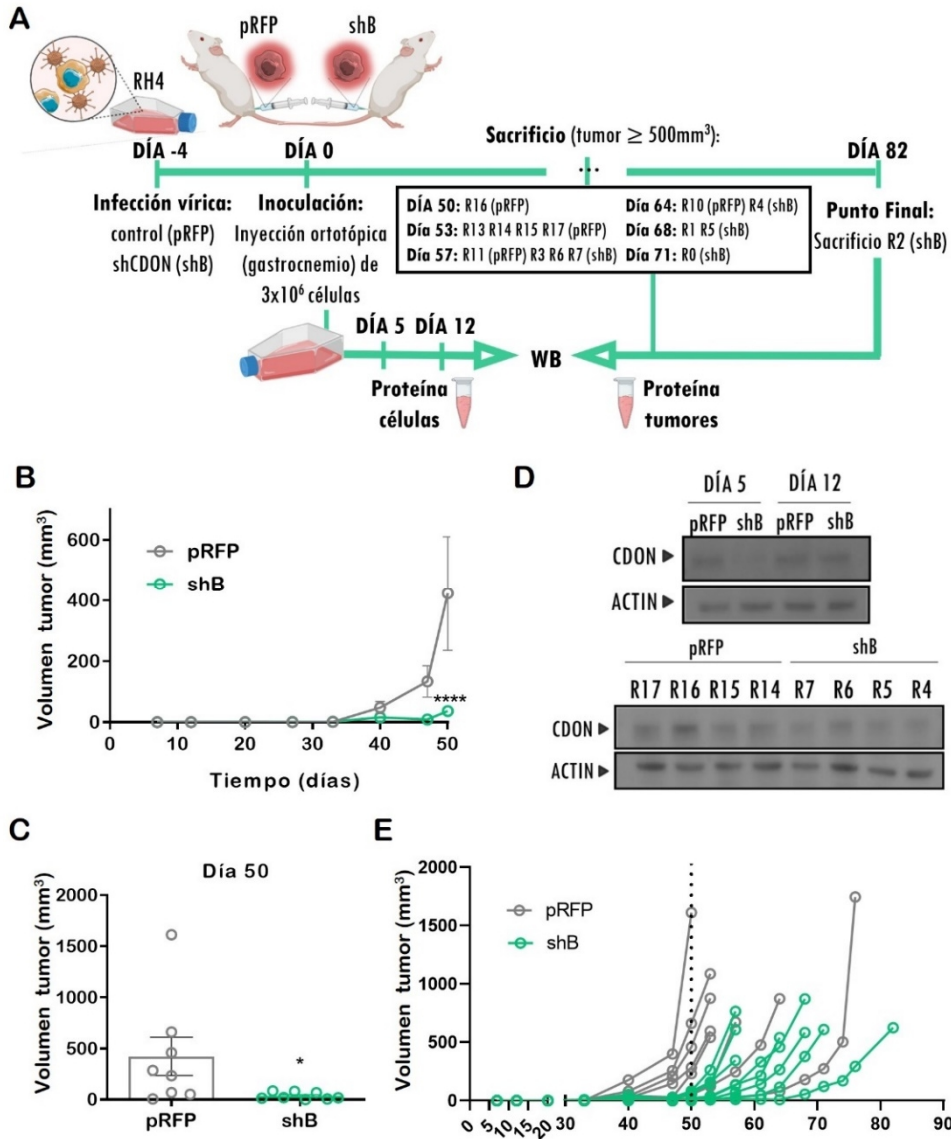


Figura 13. La infra regulación genética de CDO causa una reducción del crecimiento tumoral ortotópico en ratones SCID-Beige. **A**, Esquema del protocolo usado para la realización del modelo de depleción genética de *CDO* *in vivo*. **B**, Cinética del crecimiento tumoral ortotópico de la línea celular RH4 transducida con el vector control pRFP (gris) o el shRNA anti-CDO shB (verde) y posteriormente inoculada en el músculo gastrocnemio posterior izquierdo de los ratones. El gráfico representa el volumen tumoral promedio (media \pm SEM) de 8 ratones SCID-Beige por grupo. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$. **C**, Volúmen de los tumores del grupo pRFP (círculos grises) y del grupo shB (círculos verdes) en el día 50 del estudio. Las barras del gráfico muestran la media \pm SEM de cada grupo. La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student con corrección de Welch, donde * $p < 0.05$. **D**, WB mostrando los niveles de proteína de CDO en las células cultivadas *in vitro* tras la inoculación (panel superior) y en los tumores de 4 ratones de cada grupo. **E**, Cinética de crecimiento tumoral individual de cada ratón del grupo control (círculos grises) y del grupo shB (círculos verdes). El gráfico representa el volumen tumoral de cada ratón, hasta el momento en el que alcanza o excede el volumen determinado como criterio de punto final.

5. El compuesto priorizado por su probabilidad de interacción con CDO (SLT-0463) mejora la potencia antiproliferativa de los inhibidores de referencia de la vía Hh *in vitro*

Una vez postulado el plausible potencial terapéutico de la inhibición de CDO en RMS, focalizamos nuestros esfuerzos en el desarrollo de nuevos compuestos inhibidores que recapitularan el efecto antiproliferativo observado mediante la infra regulación genética.

Uno de los primeros aspectos fundamentales que tuvimos en cuenta para la identificación de posibles nuevos compuestos inhibidores fue la accesibilidad a datos estructurales y funcionales sobre la diana de interés. Gracias a las bases de datos AlphaFold y PDB pudimos conseguir un modelo tridimensional (3D) tanto de la estructura proteica de CDO completa, como de la estructura más específica encargada de interactuar y formar un complejo cuaternario con los ligandos HH (Figura 14) (313,314). Tal como comentamos previamente (INTRODUCCIÓN 2.1.2.) y podemos observar en la Figura 14, el dominio FNIII de CDO es el responsable de interactuar con HH de manera calcio-dependiente. A pesar de que en la figura sólo se muestre la estructura cristalina formada con IHH, las estructuras cristalinas de los otros dos ligandos también han sido resueltas y están disponibles.

A continuación, dada la inexistencia de ningún compuesto inhibidor de CDO en fase clínica ni preclínica, contactamos con IUCT (actual SELABTEC del grupo Leitat) para la identificación de nuevos compuestos antagonistas de CDO. Fruto de esta colaboración, se realizó un cribado virtual de más de 12.000 moléculas pertenecientes tanto a la quimioteca privada de IUCT, como al repositorio público DrugBank, focalizado en la identificación de moléculas capaces de inhibir la vía a nivel de ligando (315) (Figura15). Para ello, con la intención de no ser demasiado restrictivos a pesar de que el objeto de interés era CDO, se seleccionaron como posibles dianas otros componentes de la vía Hh: SHH, DHH, IHH, PTCH, BOC y GAS1. En el cribado se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas de *docking* estructural. En primer

RESULTADOS

lugar, se recopilaron los cristales de las proteínas de interés disponibles en la base de datos PDB y en dos casos, se modelizaron las posibles estructuras proteicas mediante Swiss-model partiendo de la secuencia primaria de las proteínas obtenida a través de Uniprot (316,317). En el caso concreto de CDO, se utilizó el cristal de CDO unido a IHH disponible en el PDB (Identificación PDB: 3N1F) y representado en la Figura 14 B. Los estudios de *docking* proporcionaron una lista de posibles moléculas con gran probabilidad de interacción para cada una de las dianas seleccionadas, que posteriormente fueron testadas *in vitro*. En la Figura 15 B, se muestran las moléculas con mayor probabilidad de interacción con CDO, es decir, cuyas interacciones requieren menos energía, que fueron priorizadas para los experimentos *in vitro*.

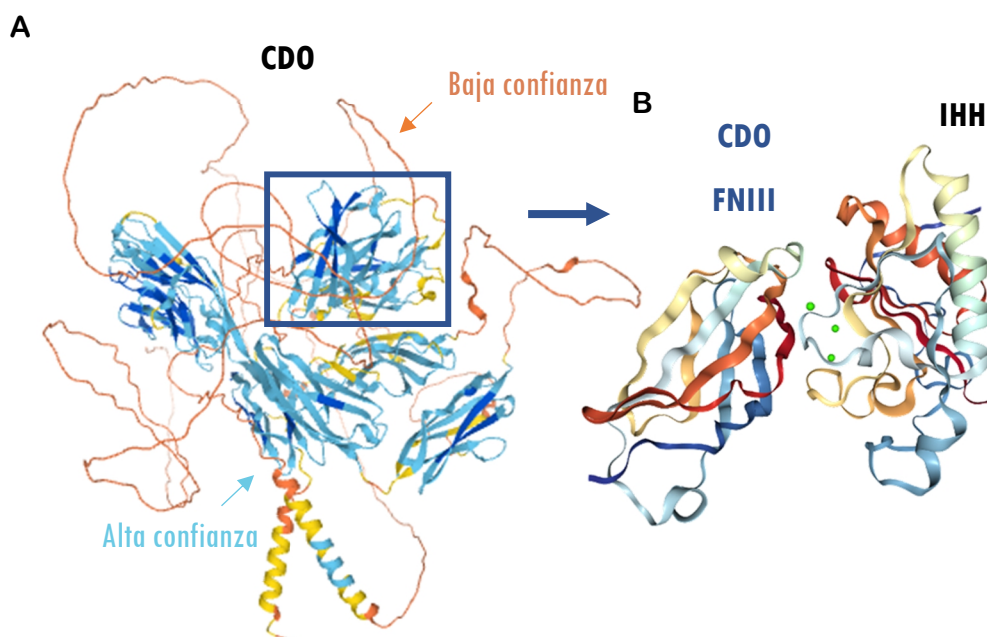


Figura 14. El dominio FNIII de CDO forma un complejo cuaternario con los ligandos Hh. A, Predicción de la estructura proteica 3D de CDO a partir de su secuencia aminoacídica (AF-Q4KMG0-F1) producida por la base de datos de estructuras proteicas AlphaFold. **B,** Estructura cristalina del complejo cuaternario formado entre el dominio FNIII (posiciones 826-924) de CDO y el ligando IHH, obtenida del PDB (Identificación PDB: 3N1F). Las bolas verdes representan moléculas de calcio.

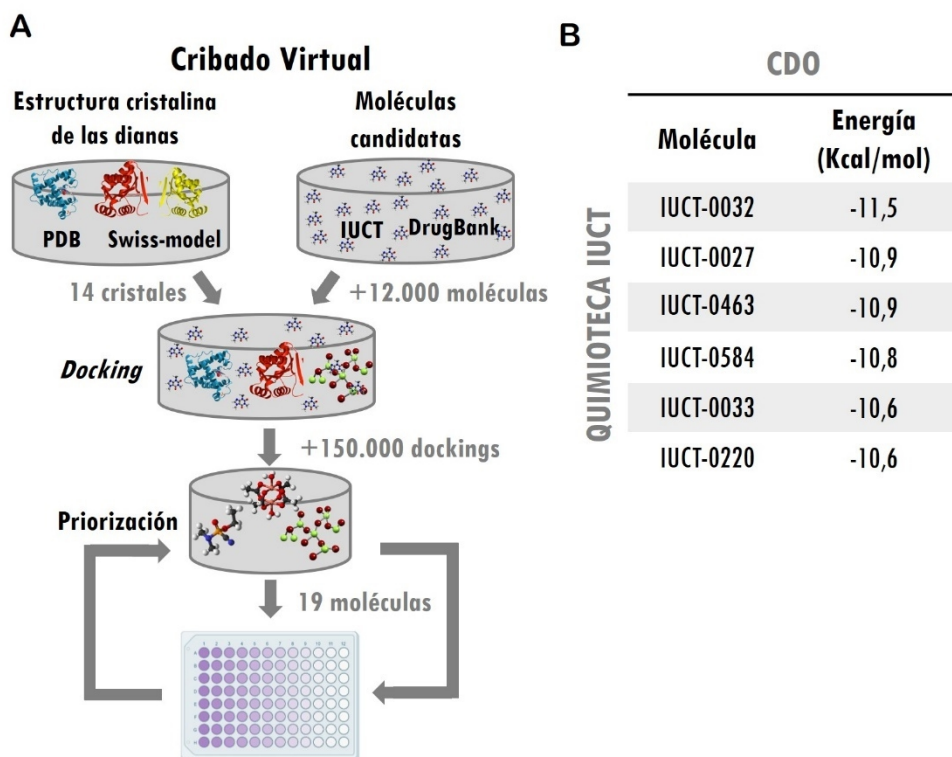


Figura 15. Cribado virtual de moléculas capaces de interactuar con componentes de la vía Hh a nivel de ligando. A, Esquema del protocolo empleado para el cribado virtual de compuestos procedentes de la quimioteca privada de IUCT o de la base de datos DrugBank, con alta probabilidad de interacción con 7 componentes de la vía Hh: SHH, DHH, IHH, PTCH, BOC, CDO y GAS1. **B,** Lista de los compuestos priorizados con mayor probabilidad de interacción (menor energía de interacción predicha) con CDO.

En total, se realizó un cribado de la capacidad antiproliferativa *in vitro* de 33 compuestos priorizados por sus altas probabilidades de interacción con los diferentes componentes de la vía Hh escogidos como dianas (Figura 16). El ensayo de proliferación realizado en las líneas celulares RH4 y RD tras 5 días de incubación con los correspondientes compuestos a 10uM, determinó al compuesto IUCT-0463 (en adelante referido como SLT-0463) –priorizado por su alta probabilidad de interacción con CDO–, como el compuesto más eficaz impidiendo la proliferación *in vitro* de ambas líneas celulares.

RESULTADOS

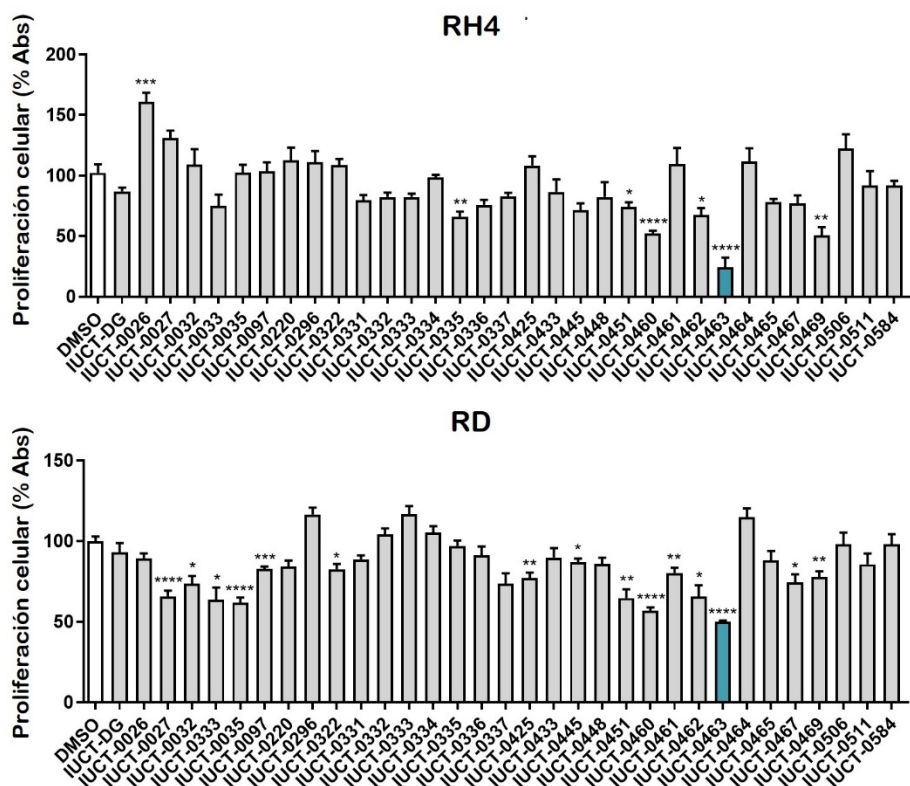


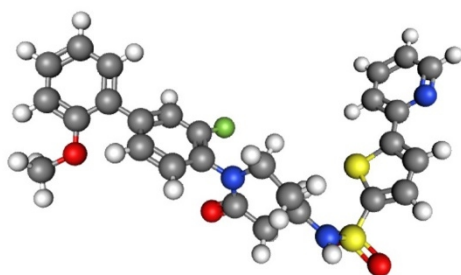
Figura 16. IUCT-0463 es el compuesto que posee mayor capacidad antiproliferativa *in vitro*. Ensayo de proliferación en las líneas celulares RH4 y RD, tras 5 días de incubación con los correspondientes compuestos (barras de color gris) a 10 μ M. El compuesto más efectivo, se muestra en color azul. La condición DMSO fue usada como control (barras de color blanco). Los valores corresponden a la media (SD) de la absorbancia del cristal violeta a 590nm de 8 réplicas por condición referidas a la condición control, tomada como 100%. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de un factor, donde * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

El nombre del compuesto SLT-0463 según la nomenclatura internacional IUPAC es: N-[1-[2-Fluoro-4-(2-methoxyphenyl)phenyl]-2-oxopiperidin-3-yl]-5-pyridin-2ylthiophene-2-sulfonamide. En la Figura 17 se muestra la estructura 3D generada mediante esta nomenclatura a través de la aplicación web MolView v2.4, así como datos químicos relevantes sobre el compuesto SLT-0463 y su número de identificación en la base de datos de moléculas perteneciente a la biblioteca nacional de medicina estadounidense, PubChem. Finalmente, en el apartado B también se muestra una imagen representativa de la posible interacción entre el dominio FNIII de CDO y el compuesto SLT-0463

generada mediante la plataforma de descubrimiento de fármacos mcule, cuyo centro de unión es el ácido aspártico número 874.

A

N-[1-[2-Fluoro-4-(2-methoxyphenyl)phenyl]-2-oxopiperidin-3-yl]-5-pyridin-2-ylthiophene-2-sulfonamide

**SLT-0463**

| | |
|------------------------|--------------------------|
| Formula | $C_{27}H_{24}FN_3O_4S_2$ |
| Peso molecular | 537,6 u |
| Identificación PubChem | 151461574 |

B

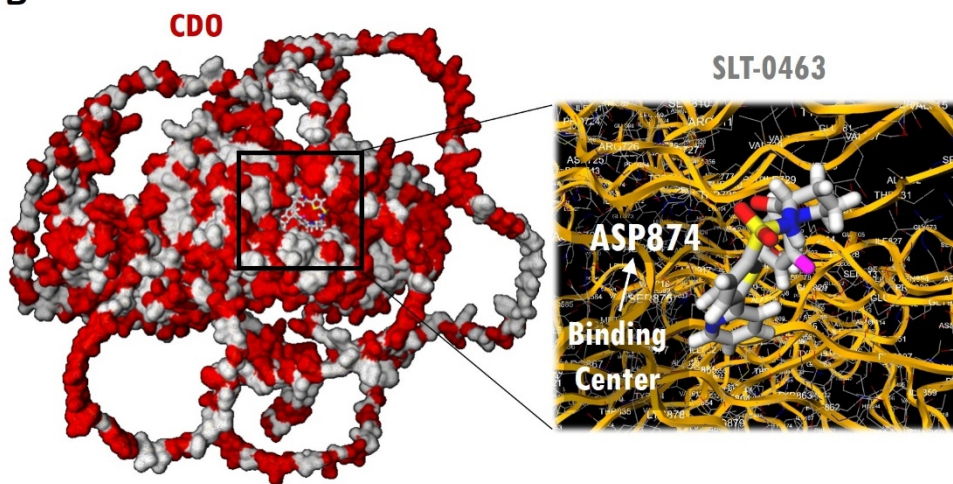


Figura 17. Modelo de interacción virtual entre el compuesto SLT-0463 y el dominio FNIII de CDO. **A**, Estructura e información molecular del compuesto SLT-0463 obtenidas mediante la aplicación web MolView v2.4 (<http://molview.org>). **B**, Imagen de un posible docking representativo de la interacción entre el dominio FNIII de CDO y el compuesto SLT-0463 obtenida mediante la plataforma mcule (<https://mcule.com>).

Posteriormente, evaluamos la sensibilidad de las líneas celulares RH4, RH30 y RD al compuesto SLT-0463 mediante la realización de curvas dosis-respuesta tras 5 días de tratamiento (Figura 18). Ampliamos el experimento añadiendo las curvas dosis-respuesta de los actuales fármacos inhibidores de la vía HH de referencia, el

RESULTADOS

Vismodegib y el Sonidegib. Los resultados concordaron con los obtenidos previamente mediante la depleción genética de CDO, siendo la línea celular más sensible al tratamiento la RH4 y la más resistente la RD. Adicionalmente, comprobamos que el compuesto SLT-0463 demuestra un mayor potencial anti-proliferativo en las tres líneas celulares de RMS, que los dos inhibidores HH de referencia analizados.

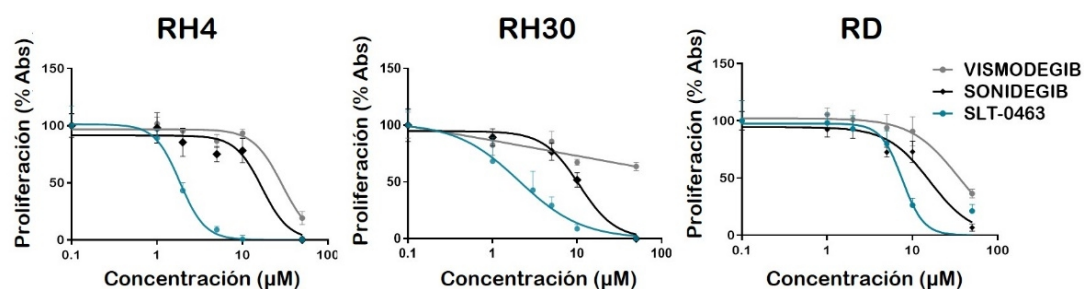


Figura 18. El compuesto SLT-0463 mejora la potencia de contención de la proliferación celular *in vitro* de los inhibidores Hh de referencia. Curvas dosis-respuesta de los compuestos Vismodegib (gris), Sonidegib (negro) y SLT-0463 (azul) en las líneas celulares RH4, RH30 y RD. Se evaluó la proliferación celular tras 5 días de tratamiento de los respectivos compuestos a 0, 1, 2, 5, 10 y 50 uM. Los valores corresponden a la absorbancia media (SD) del cristal violeta a 590nm de 5 réplicas por condición referidas a la concentración 0, tomada como 100%.

Una vez comprobada la capacidad funcional del compuesto SLT-0463 y dada su propiedad quiral, comprobamos si existían diferencias funcionales entre el compuesto SLT-0463 seleccionado (también referido como #463-S) y su enantiómero R (también referido como #463-R). Las dos formas de una molécula quiral denominadas enantiómeros, también llamados isómeros ópticos, son un tipo de estereoisómeros cuyas imágenes son especulares. A pesar de conservar una composición química idéntica, su quiralidad produce diferencias significativas en la interacción con otras moléculas, hecho que puede ser muy relevante en los ámbitos farmacocinéticos y farmacodinámicos (318). En efecto, el análisis de la actividad antiproliferativa de ambos enantiómeros, reveló una mayor efectividad del compuesto SLT-0463-S, a pesar de que el enantiómero R también comprometió el crecimiento celular de manera significativa (Figura 19). Adicionalmente, estudios posteriores realizados por

SELABTEC descartaron la conversión quiral o epimerización del compuesto SLT-0463-S tanto *in vitro* como *in vivo* en rata y ratón (resultados no mostrados).

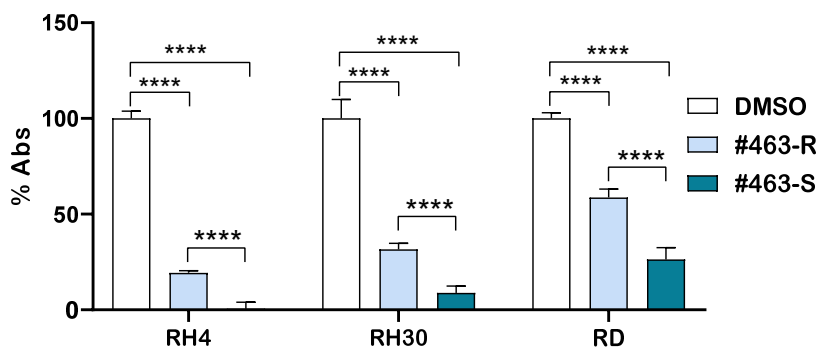


Figura 19. El enantiómero S (#463-S) presenta mayor actividad antiproliferativa que el enantiómero R (#463-R). Ensayo de proliferación celular en las líneas celulares RH4, RH30 y RD, tras 5 días de incubación con el compuesto SLT-0463 (#463-S) o con su isómero óptico (#463-R) a 10 μ M. La condición DMSO fue usada como control. Los valores corresponden a la media (SD) de la absorbancia del cristal violeta a 590nm de 5 réplicas por condición referidas a la condición control, tomada como 100%. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde **** $p < 0.0001$

6. El tratamiento con el compuesto SLT-0463 recapitula los efectos de la inhibición genética de CDO.

6.1. El compuesto SLT-0463 reduce los niveles de proteína de CDO y GLI3

Tras comprobar el efecto antiproliferativo del compuesto SLT-0463 y con la intención de relacionarlo con su alta probabilidad de interacción con CDO, analizamos el estado de activación de la vía Hh mediante WB. En la Figura 20 se muestran los niveles de proteína de los correceptores CDO y BOC y de los factores de transcripción GLI1-3, tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento en las líneas celulares RH4, RH30 y RD. De esta manera, mediante la cuantificación de la intensidad de las correspondientes bandas del WB, comprobamos que el compuesto SLT-0463 provocó una reducción significativa de los niveles de CDO en las tres líneas celulares testadas. Adicionalmente, se observó una ligera tendencia de disminución de los niveles de BOC. Respecto a los efectores finales de la señalización Hh, no se observaron diferencias consistentes en los niveles detectados de GLI1, ni GLI2. No obstante, recapitulando los cambios producidos tras

RESULTADOS

la inhibición genética de *CDO*, el tratamiento con SLT-0463 también produjo un descenso significativo del factor de transcripción *GLI3*, reivindicando de nuevo su relevancia en la señalización de la vía Hh dependiente de *CDO*.

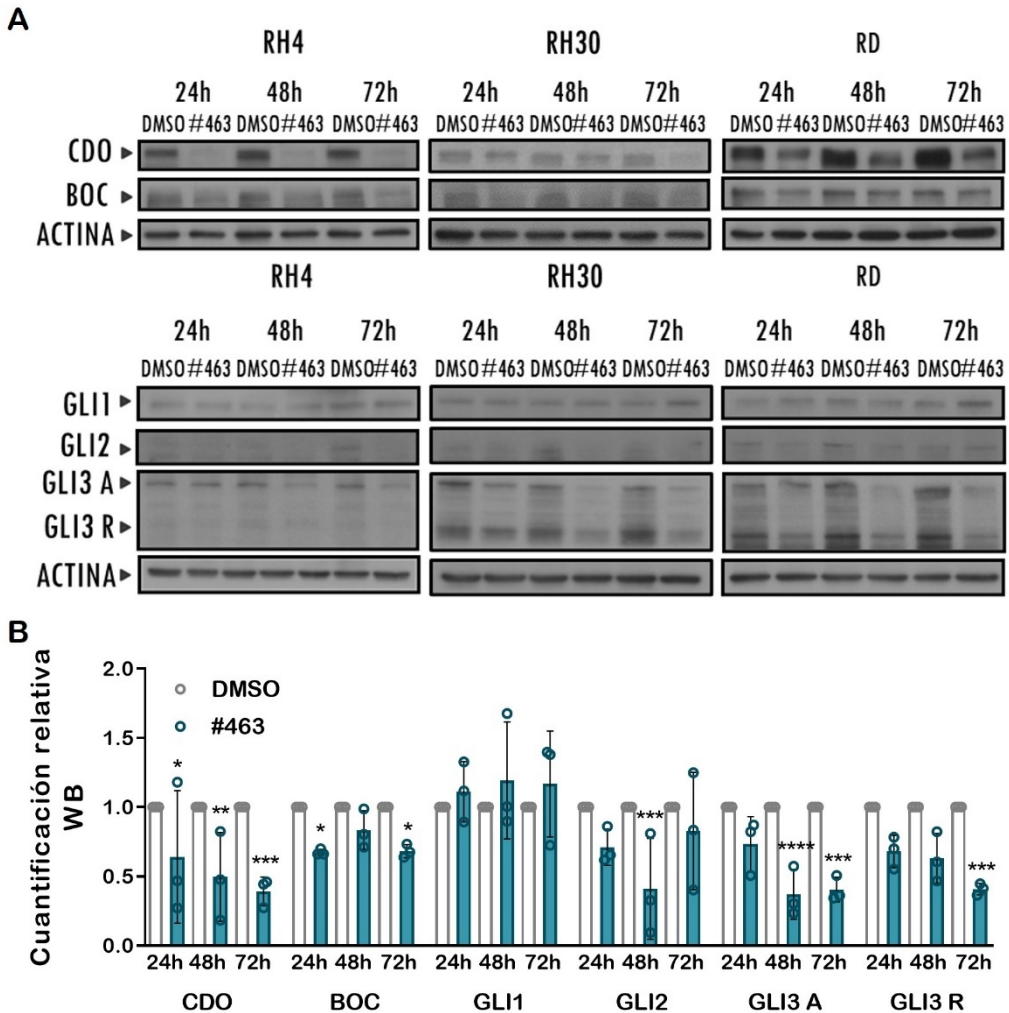


Figura 20. El compuesto SLT-0463 reduce los niveles de proteína de *CDO* y del factor de transcripción *GLI3*. **A**, WB mostrando los niveles de proteína de componentes de la vía Hh en las líneas celulares de RMS RH4, RH30 y RD, tratadas con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) durante 24, 48 y 72 horas. La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas de WB del apartado A. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos a la condición control DMSO del tiempo de tratamiento correspondiente. Las barras representan la media (SD) de la cuantificación relativa de las tres líneas celulares analizadas (círculos). La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA, donde * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Seguidamente, dado el remarcable efecto sobre la proliferación celular, realizamos diferentes ensayos funcionales y moleculares adicionales, para concretar los efectos antioncogénicos del tratamiento con el compuesto SLT-0463. Asimismo, con la intención de comparar las dos estrategias inhibitorias de CDO empleadas, se muestran duplicados de los ensayos moleculares realizados en las células con depleción genética de CDO.

6.2. El compuesto SLT-0463 provoca el arresto del ciclo celular *in vitro*

En primer lugar, determinamos, mediante citometría de flujo, un arresto significativo del ciclo celular en fase G1 tras 24 horas de tratamiento en las líneas RH4 y RH30. Hecho que concuerda con una disminución de las células dispuestas a duplicarse (fases G2 y M) y, por lo tanto, con el efecto antiproliferativo observado previamente (Figura 21). En la línea RD, se produjo una ligera acumulación de células en fase G1 tras 72 horas de tratamiento, que, sin embargo, no resultó significativa. No obstante, sí fue significativa la reducción de células en fase S. Lo cual, del mismo modo que en las otras líneas, denota una disminución de las células que se preparan para la división proliferativa y, por lo tanto, coincide con la reducción moderada de la proliferación observada en esta línea celular.

Reforzando el análisis funcional, se analizaron los niveles de proteína de dos marcadores clave para la progresión del ciclo celular, pRB y CCNB1, tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento con el compuesto SLT-0463 (Figura 22). Brevemente, la proteína retinoblastoma (pRB) es un inhibidor de la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, por lo que el avance del ciclo durante la fase tardía G1, requiere la hiperfosforilación y consecuente inactivación de pRB. La inactivación no regulada de pRB ha sido ampliamente asociada a fenotipos malignos, con un alto grado de proliferación celular (319,320). En efecto, las tres líneas celulares de RMS mostraron niveles muy altos de pRB fosforilada, los cuales, de manera concordante con el arresto del ciclo celular en G1 observado en el ensayo funcional, disminuyeron progresiva y

RESULTADOS

drásticamente tras la incubación con el compuesto SLT-0463. Adicionalmente, la severa reducción observada en los niveles de la ciclina B1 (CCNB1), ciclina encargada de la progresión de G2 a mitosis y cuya expresión se incrementa progresivamente a medida que las células avanzan hacia el proceso de duplicación, de nuevo confirmó a nivel molecular el arresto del ciclo celular de las células tratadas con el compuesto SLT-0463 en su fase más incipiente, G1 (321).

De forma concordante, el análisis de los niveles de CCNB1 en las tres líneas celulares con depleción genética de CDO, mostró cierta tendencia a la reducción de los niveles de esta ciclina, principalmente en las líneas más sensibles a la inhibición de CDO, RH4 y RH30 (Figura 23).

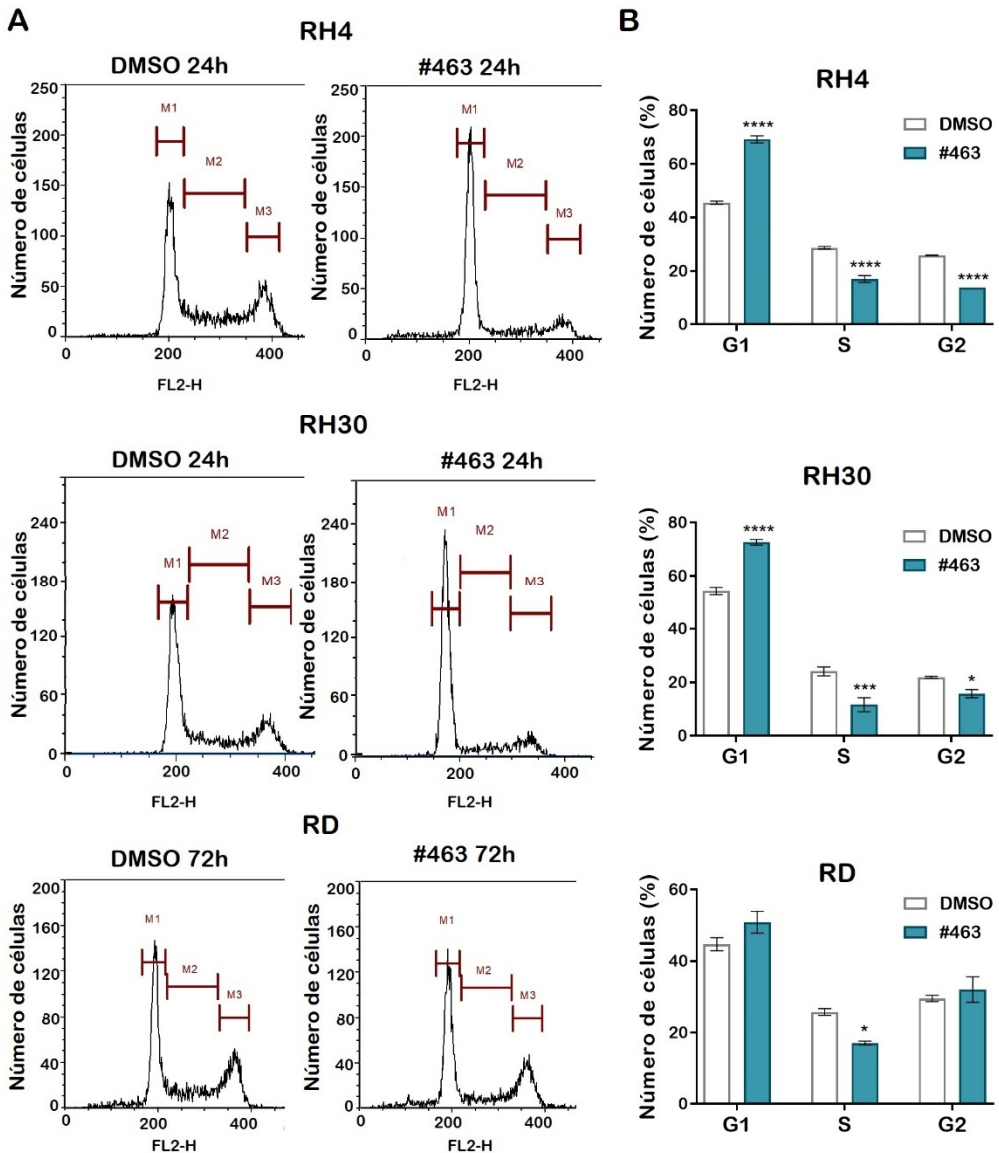


Figura 21. El compuesto SLT-0463 provoca el arresto del ciclo celular *in vitro*. El estudio del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo y tinción de yoduro de propidio. **A**, Histogramas mostrando el número de células en función de la señal de detección de yoduro de propidio (FL2-H), equivalente al contenido de ADN presente en cada célula. Se delimitan como M1 las células en la fase G1, como M2 las células en la fase S y como M3 las células en G2. El análisis se realizó en las líneas RH4, RH30 y RD, tratadas con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) a 10 μ M durante 24 horas, en el caso de RH4 y RH30, y 72 horas en el caso de la línea RD. **B**, Gráficos de barras representando la media (SD) de la proporción de células (referida como porcentaje del total de células de cada condición) en las diferentes fases del ciclo (G1, S y G2), de dos experimentos independientes. La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student, donde * p<0.05; *** p<0,001; **** p<0.0001.

RESULTADOS

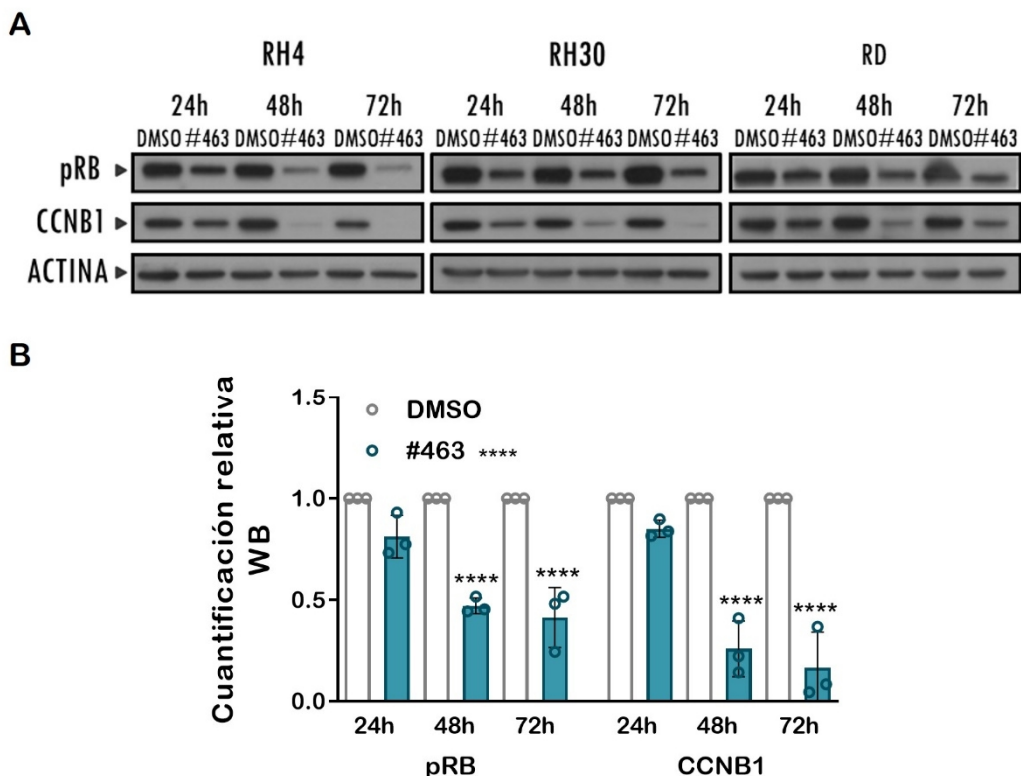
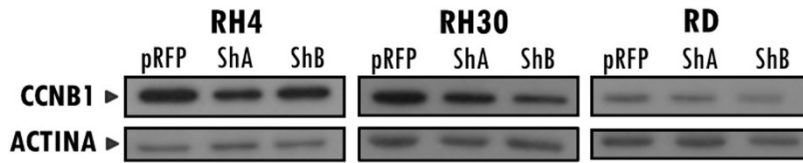


Figura 22. El compuesto SLT-0463 reduce los niveles de proteína de los marcadores de progresión de ciclo pRB y CCNB1. **A**, WB mostrando los niveles de proteína de pRB fosforilada y CCNB1 en las líneas celulares de RMS RH4, RH30 y RD, tratadas con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) durante 24, 48 y 72 horas. La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas de WB del apartado **A**. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos a la condición control DMSO de cada uno de los tiempos de duración del tratamiento (24, 48 y 72 horas). Las barras representan la media (SD) de la cuantificación relativa de las tres líneas celulares analizadas (DMSO en círculos grises y #463 en círculos azules). La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA, donde **** $p < 0.0001$.

A



B

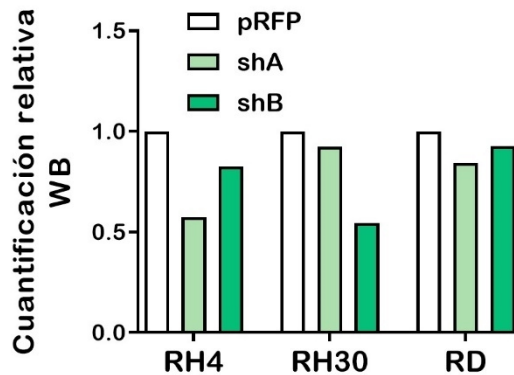


Figura 23. La inhibición genética de CDO reduce los niveles de proteína del marcador de progresión de ciclo y diana de la vía Hh, CCNB1. A, WB mostrando los niveles de proteína de CCNB1 en las líneas celulares de RMS RH4, RH30 y RD, transducidas con el vector control pRFP y dos shRNAs contra CDO (shA y shB). La actina fue usada como control de carga. **B,** Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas de WB del apartado **A**. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos al vector pRFP (barras blancas). Las barras representan la cuantificación relativa de cada condición (pRFP en blanco y shRNAs contra CDO en tonos verdes) para cada línea.

6.3. El compuesto SLT-0463 induce la muerte celular apoptótica *in vitro*

Otro efecto funcional relacionado con una reducción de la proliferación y examinado mediante citometría de flujo, fue la muerte celular por apoptosis. Para ello, las células fueron doblemente teñidas con Anexina V (conjugada con APC) y Sytox Blue tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento Figura 24. La Anexina V se une a la fosfatidilserina presente en las células apoptóticas tanto en etapas tempranas como tardías, mientras que el Sytox Blue, sólo marca las células en etapas tardías de la apoptosis o necrosis,

RESULTADOS

dado que es incapaz de atravesar la membrana celular de las células vivas. La cuantificación del porcentaje de células positivas para Anexina V de cada condición demostró un incremento progresivo de células apoptóticas en las líneas RH4 y RH30 tratadas con el compuesto SLT-0463 a 10uM. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la línea RD, incluso tras doblar la concentración del compuesto SLT-0463 a 20uM.

Los marcadores moleculares analizados por WB para confirmar la apoptosis fueron los niveles de las caspasas 9 y 3 y la escisión proteolítica de PARP. Las caspasas son mediadores cruciales de la apoptosis. Diferentes estímulos extra e intracelulares pueden desencadenar la activación de las caspasas consideradas iniciadoras –como es el caso de la caspasa 9–, cuya activación provoca la activación de las caspasas efectoras, entre las que destaca por su papel determinante, la caspasa 3. Las caspasas efectoras catalizan la escisión específica de varias proteínas claves, que ocasionan los cambios celulares característicos de la apoptosis. Concretamente, PARP es uno de los sustratos más conocidos de las caspasas ejecutoras (322). En la Figura 25 se muestran los niveles de expresión de las proteínas apoptóticas mencionadas. Dadas las diferencias funcionales, los resultados de la línea RD se analizaron de manera independiente. Respecto a las caspasas 9 y 3, a pesar de que no fuimos capaces de detectar las formas activas, sí pudimos comprobar un descenso de las formas inactivas, denominadas pro-caspasas, en las líneas RH4 y RH30. Consecuentemente, en estas líneas, detectamos tanto un descenso de los niveles totales de PARP como un incremento de la forma fragmentada, tras 24 y 48h de tratamiento. Como era de esperar, ninguno de estos cambios fue apreciado en la línea RD, donde el compuesto SLT-0463 no indujo un incremento apoptótico. Sin embargo, el análisis de los marcadores apoptóticos en las células con inhibición genética de CDO mostró cambios en las tres líneas celulares Figura 26. En todas ellas se produjo una bajada consistente, aunque no significativa, de los niveles de las pro-caspasas 9 y 3. En cambio, las alteraciones observadas en PARP difirieron en función de la línea celular. Mientras la línea más sensible a la inhibición genética, la RH4, mostró una drástica disminución de

los niveles de PARP total y unos niveles indetectables de su escisión proteolítica, las líneas RH30 y RD exhibieron un ligero incremento de la forma fragmentada, sin variación en los niveles de la proteína total.

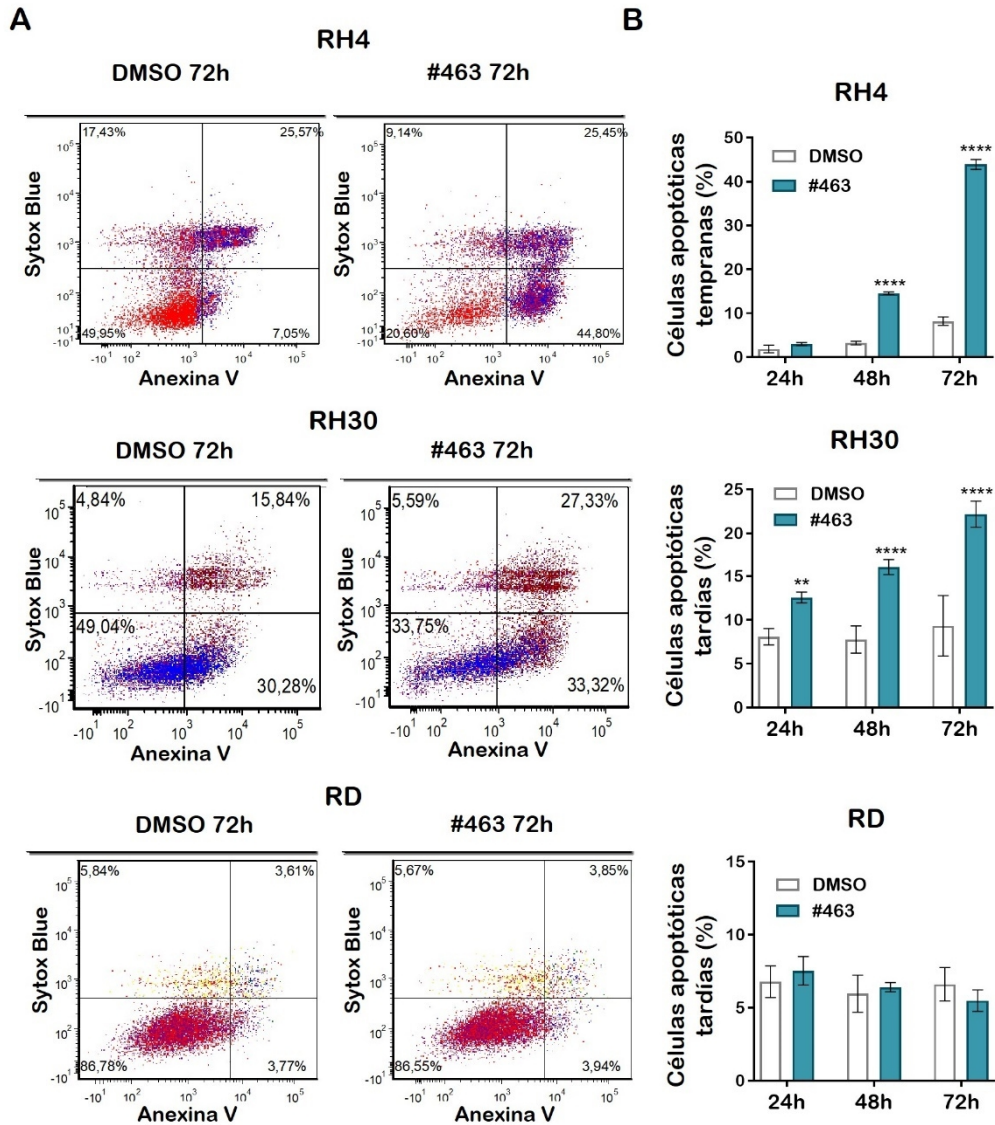


Figura 24. El compuesto SLT-0463 induce la apoptosis in vitro. La apoptosis se determinó mediante citometría de flujo y la doble tinción de Anexina V conjugada con APC y Sytox Blue. **A**, Gráficos representativos que dividen a las células en función de la intensidad de marcaje de Anexina V (eje de abscisas) y de Sytox Blue (eje de ordenadas) tras 72 horas de tratamiento. El análisis se realizó en las líneas RH4, RH30 y RD, tratadas con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) a 10µM en el caso de RH4 y RH30, y 20µM en el caso de la línea RD, durante 24, 48 y 72 horas. **B**, Gráficos de barras representando el porcentaje de células apoptóticas en cada condición. La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student, donde * p<0.05; *** p<0,001; **** p<0.0001.

RESULTADOS

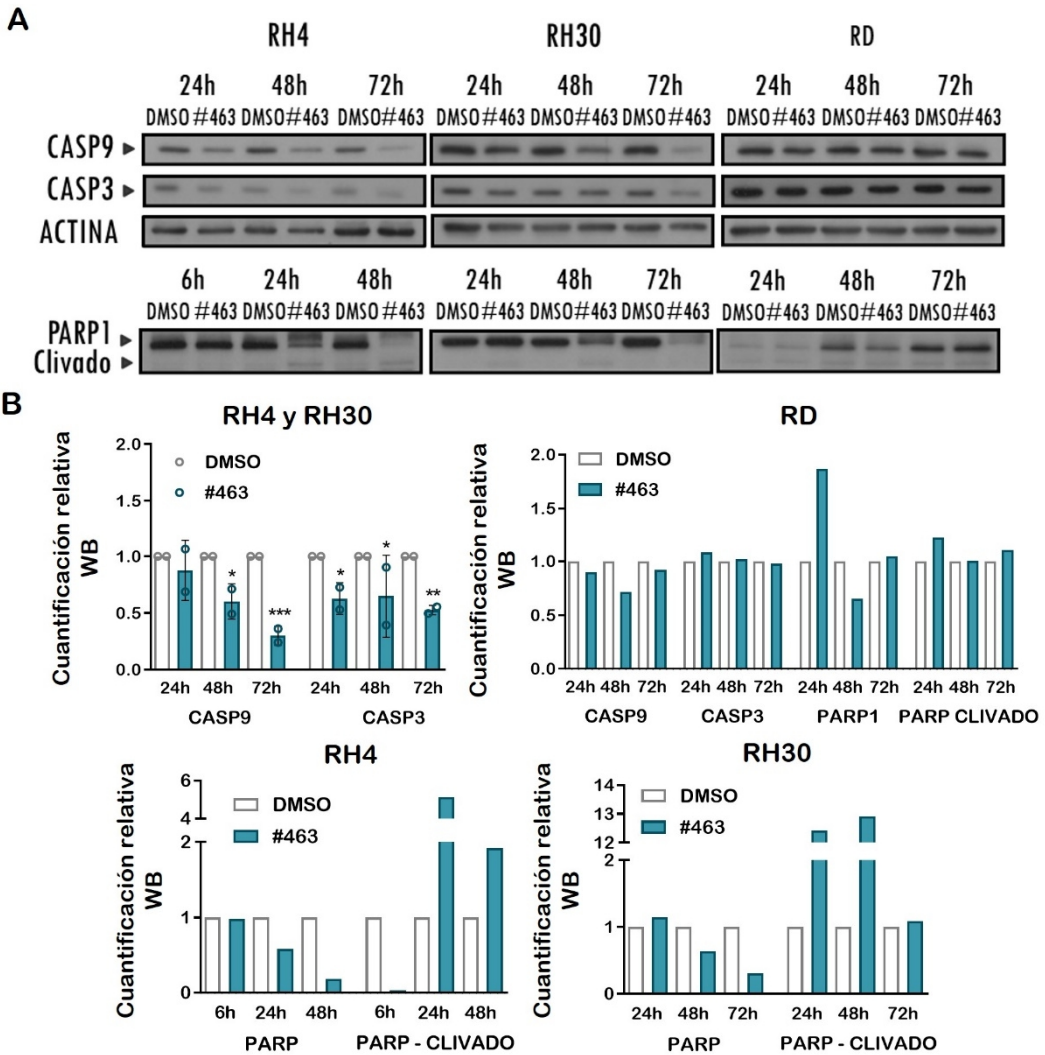


Figura 25. El compuesto SLT-0463 provoca la activación de la cascada de señalización apoptótica. **A**, WB mostrando los niveles de proteína de las formas precursoras de las Caspasas 9 y 3 (panel superior) y de las formas total y clivada de PARP1 (panel inferior), en las líneas celulares de RMS RH4, RH30 y RD, tratadas con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) durante 24, 48 y 72 horas (6, 24 y 48 horas en el caso del WB de PARP en la línea RH4). La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas de WB del apartado **A**. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos a la condición control DMSO respectiva de cada uno de los tiempos de duración del tratamiento. En el primer gráfico (panel superior izquierdo), las barras representan la media (SD) de la cuantificación relativa de las caspasas 3 y 9 en las líneas celulares RH4 y RH30 (DMSO en círculos grises y #463 en círculos azules). El resto de gráficos expresan la cuantificación relativa de manera individual para cada línea de las proteínas CASP9, CASP3, PARP1 y PARP clivado en el caso de la línea RD (panel superior derecho) y PARP1 y PARP clivado en las líneas RH4 (panel inferior izquierdo) y RH30 (panel inferior derecho). La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student, donde ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

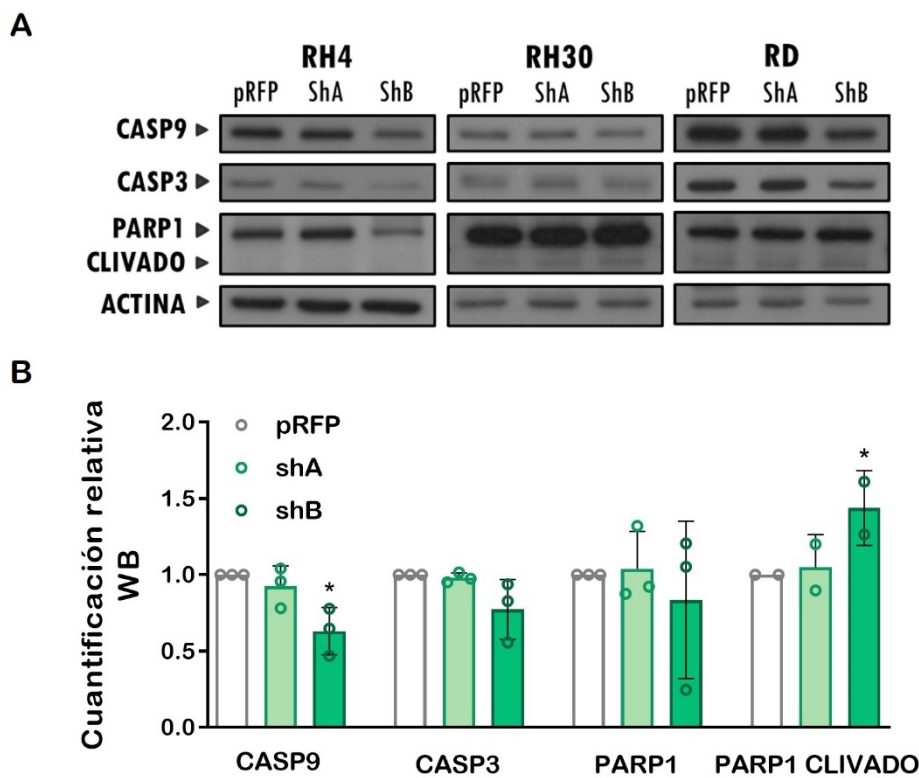


Figura 26. La inhibición genética de CDO provoca la activación de la cascada de señalización apoptótica. **A**, WB mostrando los niveles de proteína de las formas precursoras de las Caspasas 9 y 3 y de las formas total y clivada de PARP1, en las líneas celulares de RMS RH4, RH30 y RD, transducidas con el vector control pRFP y dos shRNAs contra CDO (shA y shB). La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas de WB del apartado **A**. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos al vector pRFP (barras blancas). Las barras representan la media (SD) de la cuantificación relativa de las respectivas proteínas para cada condición (pRFP en blanco y shRNAs contra CDO en tonos verdes) en las tres líneas celulares. La cuantificación de PARP1 clivado en la línea RH4 no se muestra debido a la falta de banda en el WB. Para comprobar la significación estadística de los datos se realizó una prueba ANOVA, donde * $p < 0.05$.

6.4. El compuesto SLT-0463 induce la diferenciación celular *in vitro*

Adicionalmente, el tratamiento con el compuesto SLT-0463 también provocó cambios morfológicos, perceptibles mediante la observación directa bajo el microscopio, que nos instaron a comprobar el efecto del tratamiento sobre la diferenciación celular (Figura 27). En la Figura 27 B se muestran imágenes de microscopía de la línea celular

RESULTADOS

con una histología alveolar más clara, la RH4. Tras tres días de tratamiento, las células exhibieron una morfología ahusada y una tendencia al alineamiento, rememorando a los miocitos en las últimas etapas de diferenciación y maduración de la miogénesis.

Seguidamente, comprobamos la pérdida de capacidad de autorrenovación de estas células –cualidad inversamente asociada al grado de diferenciación celular– mediante un ensayo de formación de colonias. En este caso, para evitar que los efectos antiproliferativos del compuesto SLT-0463 interfirieran en el ensayo, lo llevamos a cabo en ausencia de fármaco, con células pretratadas durante 4 (RH4 y RH30) o 7 días (RD) (Figura 27 A). Pese a ello, las tres líneas celulares sufrieron una reducción significativa del número de colonias formadas.

La confirmación molecular de estos resultados se realizó mediante la comparación por WB de tres marcadores musculares asociados a diferentes etapas de la diferenciación miogénica: MYOD1, MYOG y SGCG (Figura 28). Brevemente, MYOD1 y MYOG son dos factores de transcripción claves durante el proceso de miogénesis a los que hicimos referencia en el apartado INTRODUCCIÓN 1.3.1.. En cambio, el sarcoglicano gamma (SGCG) es un componente del complejo sarcoglicano, cuya expresión es exclusiva del músculo estriado maduro (323). Por lo tanto, para simplificar, asociamos el marcador MYOD1 a los mioblastos de las primeras etapas de la miogénesis, la expresión de MYOG a los miocitos en las últimas etapas de diferenciación y especialización muscular, y, finalmente, la expresión de SGCG al músculo estriado maduro. Tal y como podemos comprobar en la Figura 28, el tratamiento con el compuesto SLT-0463 redujo la expresión de los marcadores de diferenciación muscular iniciales, MYOD1 y MYOG, y, en cambio, incrementó drásticamente los niveles de SGCG, prácticamente indetectable en las células de RMS tratadas con DMSO. No obstante, estos cambios no se produjeron en la línea RD, donde los niveles de SGCG permanecieron indetectables incluso después de 72 horas de incubación con el compuesto SLT-0463. Adicionalmente, el análisis en las líneas celulares con depleción genética de CDO corroboró la tendencia observada con el compuesto SLT-0463. En la Figura 29 se

muestran una reducción leve de los niveles de MYOD1 acompañado de un incremento de la expresión de SGCG en las líneas RH4 y RH30 transducidas con el shB, no así en la línea RD.

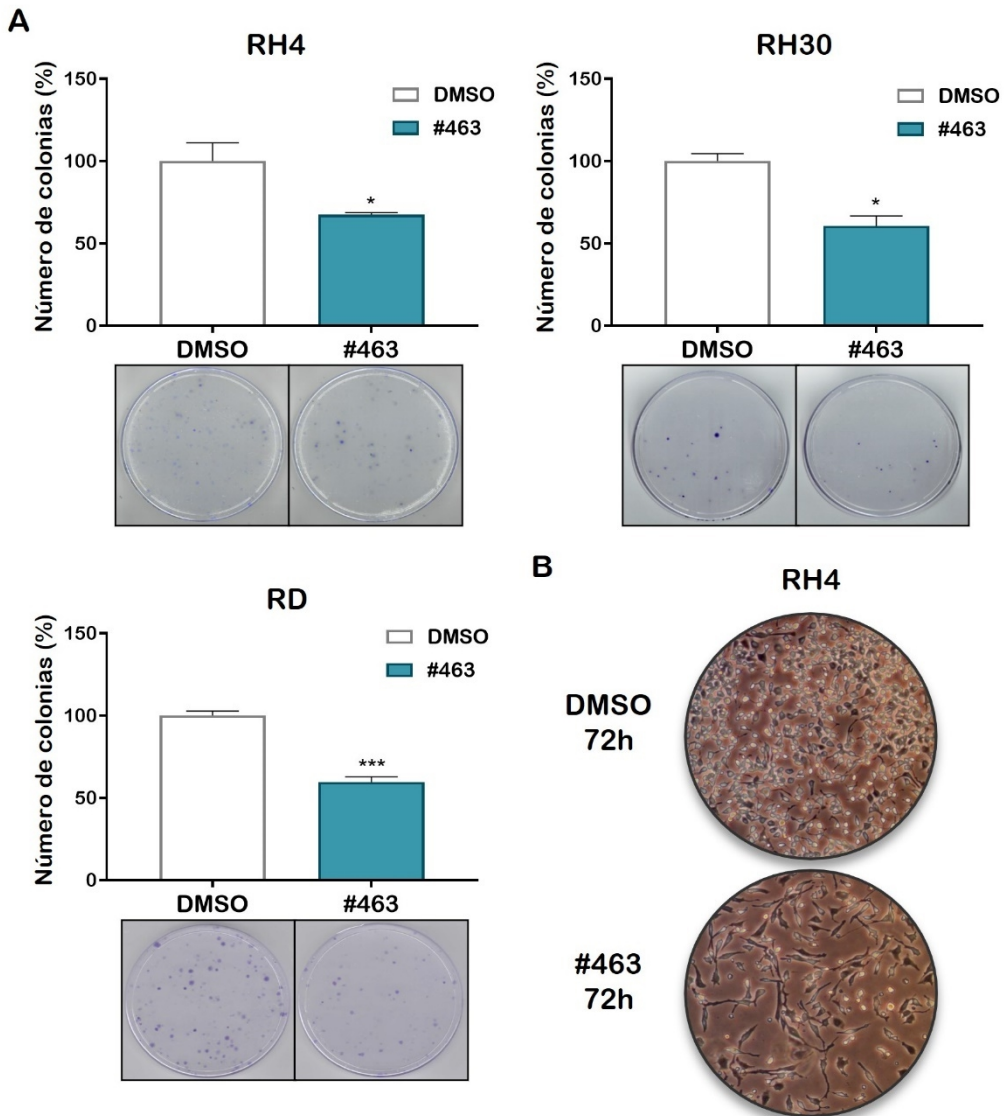


Figura 27. El compuesto SLT-0463 induce la diferenciación celular *in vitro*. **A**, Estudio de formación de colonias. Las células fueron pretratadas con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) a 10uM durante 4 (RH4 y RH30) o 7 (RD) días y posteriormente sembradas a baja densidad en medio sin tratamiento. Los gráficos muestran la media (SD) del recuento de colonias formadas de 3 réplicas/condición, referidas a la condición control DMSO, tomada como 100. La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student, donde * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. **B**, Imágenes de microscopio mostrando el cambio en la morfología y distribución de la línea celular RH4 tras 72 horas de tratamiento con el compuesto SLT-0463 (#463).

RESULTADOS

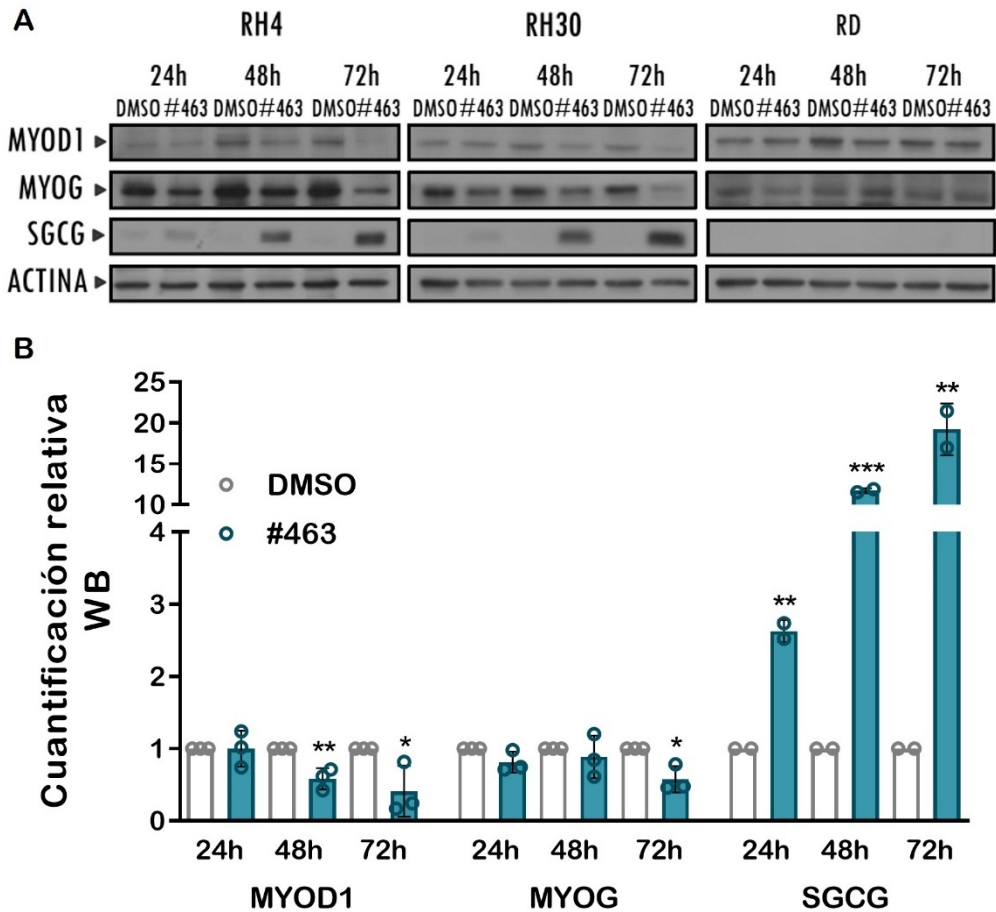


Figura 28. El compuesto SLT-0463 reduce la expresión de marcadores de diferenciación muscular incipientes y aumenta los niveles de marcadores de músculo esquelético adulto. A, WB mostrando los niveles de proteína de los marcadores de músculo en desarrollo, MYOD1 y MYOG, y del marcador de músculo esquelético adulto, SGCC, en las líneas celulares de RMS RH4, RH30 y RD, tratadas con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) durante 24, 48 y 72 horas. La actina fue usada como control de carga. **B,** Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas de WB del apartado **A.** La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos a la condición control DMSO respectiva de cada uno de los tiempos de duración del tratamiento. Las barras representan la media (SD) de la cuantificación relativa de las tres líneas celulares analizadas (DMSO en círculos grises y #463 en círculos azules). La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student, donde * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

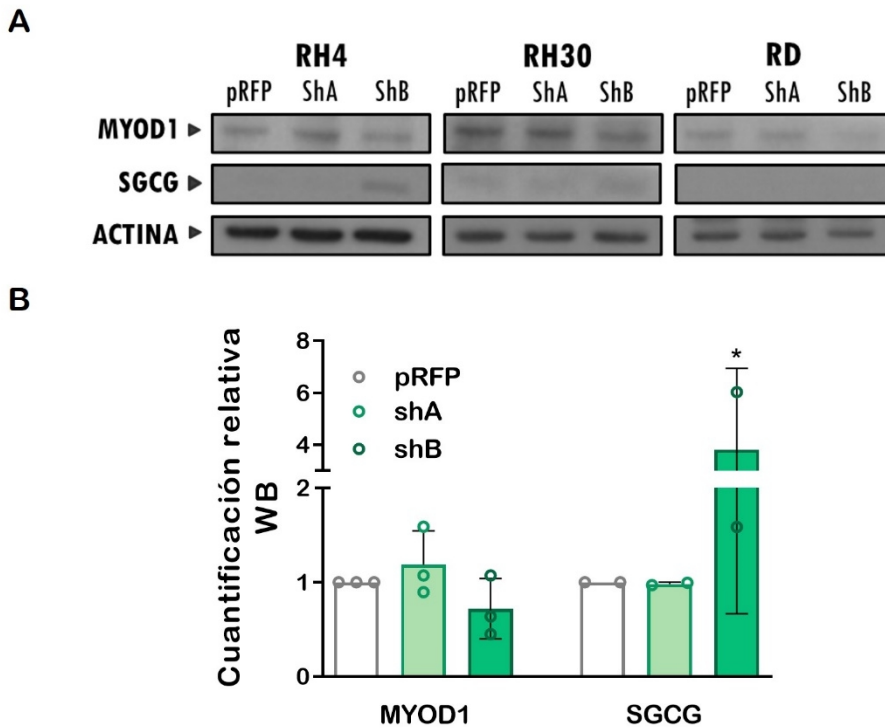


Figura 29. La inhibición genética de CDO provoca la reducción de los niveles de MYOD1 y el incremento de SGCG. **A**, WB mostrando los niveles de proteína de MYOD1 y SGCG en las líneas celulares de RMS RH4, RH30 y RD, transducidas con el vector control pRFP y dos shRNAs contra CDO (shA y shB). La actina fue usada como control de carga. **B**, Cuantificación relativa de la intensidad de las bandas de WB del apartado **A**. La intensidad de cada banda fue medida mediante el programa de procesamiento de imagen, Image J. Los valores de intensidad fueron normalizados con los niveles del control de carga y posteriormente referidos al vector pRFP (barras blancas). Las barras representan la media (SD) de la cuantificación relativa de las respectivas proteínas para cada condición (pRFP en blanco y shRNAs contra CDO en tonos verdes) en las tres líneas celulares. La cuantificación de SGCG en la línea RD no se muestra debido a la falta de banda en el WB. Para comprobar la significación estadística de los datos se realizó una prueba ANOVA, donde * $p < 0.05$.

6.5. El compuesto SLT-0463 reduce la invasión celular *in vitro*

El tratamiento con el compuesto SLT-0463 redujo la capacidad invasiva de las tres líneas celulares de RMS testadas mediante un ensayo Transwell tras 24 (RH4 y RH30) o 48 (RD) horas de incubación (Figura 30).

RESULTADOS

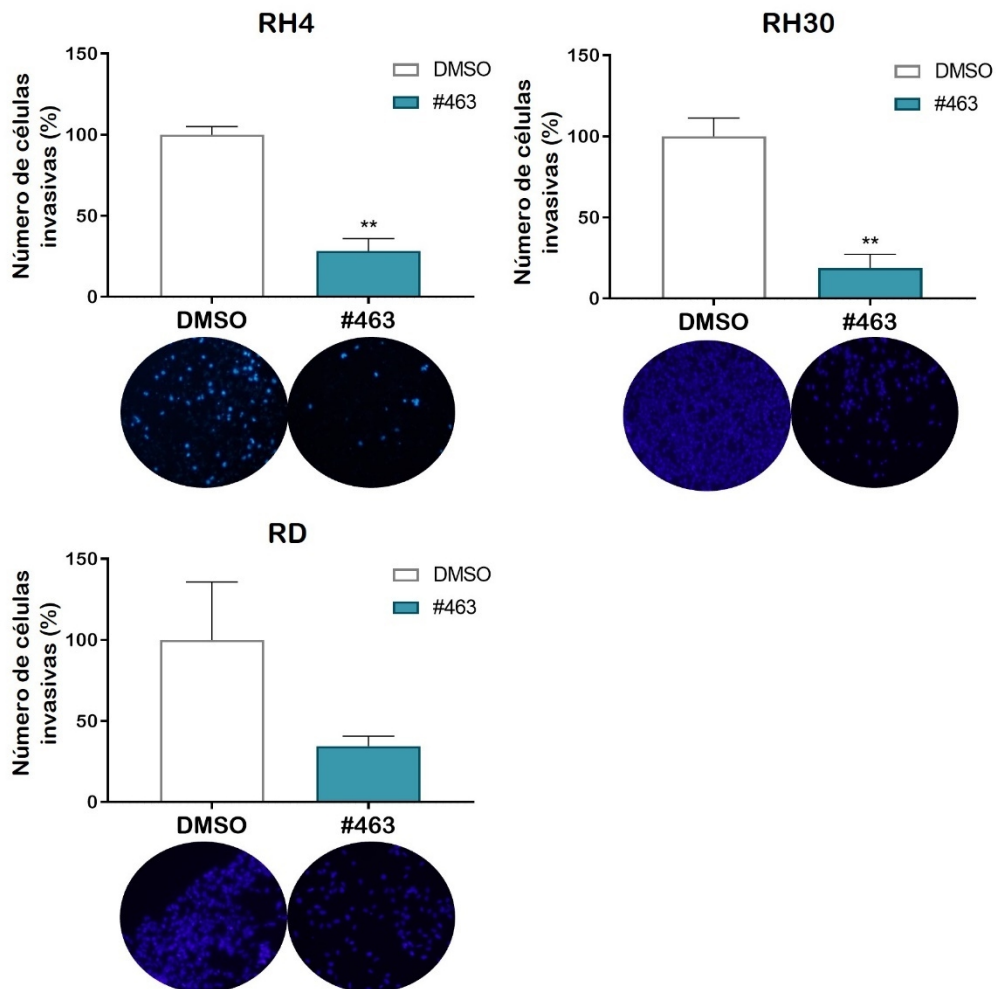


Figura 30. El compuesto SLT-0463 reduce la invasión celular *in vitro*. El análisis de la capacidad invasiva de las células se realizó mediante un ensayo Transwell (TW). Las células fueron sembradas en la cámara superior del TW en medio con DMSO o con el compuesto SLT-0463 (#463) a 10uM durante 24 (RH4 y RH30) o 48 (RD) horas. Las células que migraron e invadieron la superficie inferior de la membrana del TW fueron teñidas con Hoechst-33342 para facilitar el recuento bajo el microscopio (fotos representativas). Los gráficos muestran la media (SD) del recuento de células de la superficie inferior de la membrana del TW de 3 réplicas por condición referidas a la condición control DMSO, tomada como 100%. La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student, donde ** $p < 0.01$.

6.6. El compuesto SLT-0463 reduce el crecimiento tumoral ortotópico *in vivo*

Finalmente, comprobamos la efectividad del compuesto SLT-0463 mediante la realización de un modelo de crecimiento tumoral ortotópico en ratones NOD-SCID (Figura 31). Para ello, inyectamos un millón de células de la línea RH4 en el músculo gastrocnemio de la extremidad posterior derecha de 10 ratones. Tras 31 días, aleatorizamos los ratones con tumor confirmado (n=9) en dos grupos con el mismo volumen tumoral medio y comenzamos la administración del compuesto SLT-0463. El tratamiento se realizó mediante inyección intraperitoneal diaria del vehículo (n=4) o del compuesto #463 (n=5) a una dosis de 20mg/kg, durante un total de 31 días. El peso de los ratones fue monitorizado a lo largo de todo el estudio como medida indicadora de toxicidad y bienestar de los animales. Dado que los ratones tratados mostraron un incremento de peso incluso superior al de los animales control, deducimos que el compuesto SLT-0463 administrado intraperitonealmente a una dosis diaria de 20mg/kg no ocasionó una toxicidad severa. Por otro lado, la efectividad antitumoral del compuesto fue confirmada tras la reducción del volumen y el peso tumoral en los ratones tratados con el compuesto #463. En las medidas *ex vivo* del grupo control se incluyen los datos de un ratón que fue sacrificado 6 días antes del punto final, debido a los criterios éticos de volumen máximo. Hecho que, suponiendo que el volumen y el peso del tumor de ese ratón habrían continuado aumentando, probablemente, haya reducido las diferencias existentes entre el crecimiento tumoral de ambos grupos. A pesar de ello, la reducción media conseguida por el compuesto SLT-0463 tanto en el peso, como en el volumen de los tumores, es de aproximadamente el 50%.

RESULTADOS

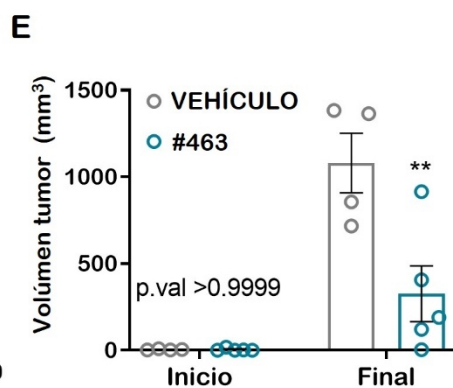
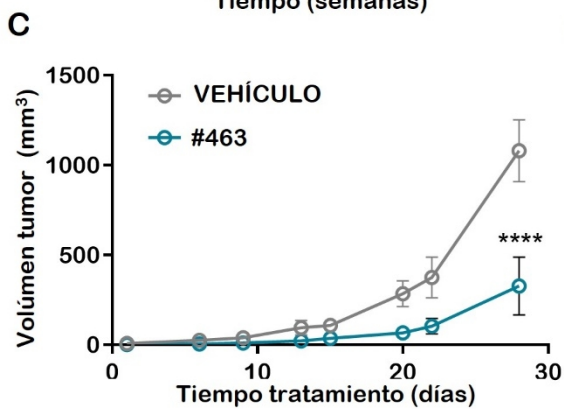
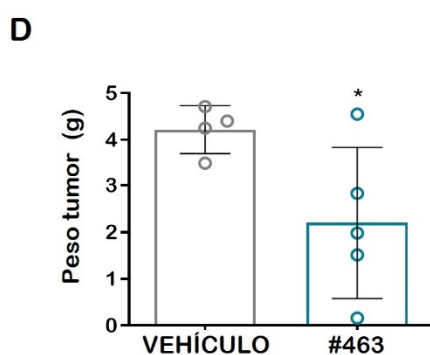
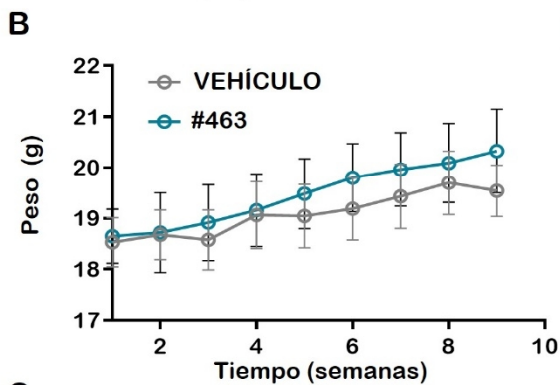
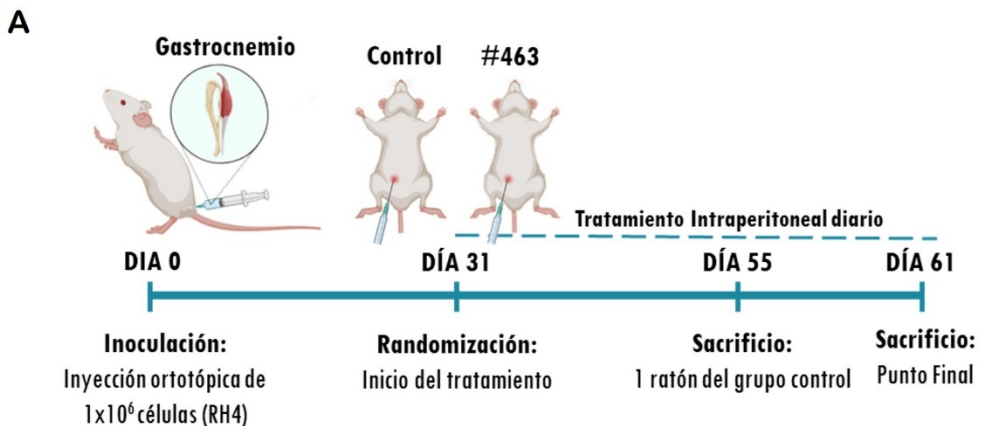


Figura 31. El compuesto SLT-0463 causa una reducción del crecimiento tumoral ortotópico en ratones NOD-SCID. **A**, Esquema del protocolo usado para la validación del efecto antitumoral del compuesto SLT-0463 (#463) *in vivo*, mediante la inyección de 1×10^6 células de la línea RH4 en el músculo gastrocnemio de 10 ratones NOD-SCID. **B**, Evolución del peso medio de los ratones tratados con el vehículo o con el compuesto SLT-0463 (#463). **C**, Cinética del crecimiento tumoral ortotópico desde el inicio hasta el final del tratamiento. El gráfico representa el volumen tumoral promedio (media \pm SEM) de 4 ratones NOD-SCID en el grupo control (VEHÍCULO) y 5 en el grupo tratado con el compuesto #463 a la concentración de 20mg/kg. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde **** $p < 0.0001$. **D**, Peso *ex vivo* de los tumores del grupo VEHÍCULO (círculos grises) y del grupo #463 (círculos verdes) en el punto final del estudio. Las barras del gráfico muestran la media (SD) del peso de los tumores pertenecientes a cada grupo. La significación estadística usada corresponde a la Prueba t de Student, donde * $p < 0.05$. **E**, Comparación del volumen de los tumores del grupo VEHÍCULO (círculos grises) y del grupo #463 (círculos verdes) en el momento de la randomización (inicio) y en el punto final del estudio. Las barras del gráfico muestran la media \pm SEM del volumen de los tumores pertenecientes a cada grupo en ambas etapas del estudio. La significación estadística usada corresponde a la prueba ANOVA de dos factores, donde ** $p < 0.01$.

7. La expresión de CDO es un indicador de mal pronóstico en Sarcoma de Ewing y su inhibición reduce la proliferación *in vitro* en sarcomas óseos

Dada la gran relevancia de CDO en la oncogenicidad del RMS, decidimos evaluar su papel en otros tumores.

Los sarcomas de Ewing, del mismo modo que los RMS, son sarcomas de origen embrionario pertenecientes al grupo de tumores de células pequeñas, redondas y azules, llegando, debido a estas semejanzas, incluso a presentar dificultades en su distinción al diagnóstico. Asimismo, también son neoplasias que afectan principalmente a niños y adolescentes y, aunque aparecen preferentemente en hueso, aproximadamente un 15% de los pacientes presentan afección primaria en tejidos blandos (324,325).

A nivel molecular, la relevancia de la vía Hh en los tumores óseos como el SE o el OS, ha emergido progresivamente a lo largo de la última década. Aunque la literatura es escasa, se ha demostrado una sobreexpresión de GLI1 en muestras de tumores de pacientes y líneas celulares de SE, así como una relación entre la expresión de varios genes de la vía Hh con la aparición de metástasis. Respecto al OS, varios estudios

RESULTADOS

preclínicos han validado la sobreexpresión de diversos componentes de la vía Hh, entre los que se encuentran los ligandos Hh: SHH, DHH e IHH (326).

Tras corroborar a nivel bibliográfico la importancia de la vía Hh en estos tumores y, por lo tanto, el posible interés del estudio de *CDO*, decidimos comenzar su caracterización en los sarcomas óseos.

De la misma manera que en el estudio del RMS, comenzamos por la caracterización de los niveles de expresión. Para ello, analizamos datos de expresión génica de tumores de pacientes de SE y de OS disponibles a través de la plataforma R2 (<http://r2.amc.nl>). En la Figura 32 se muestra el análisis de expresión de *CDO* en muestras de SE y de músculo esquelético disponibles en la base de datos *ps_avgpres_gse17679geo117_u133p2* publicada por Suvi Savola en 2011 y en muestras de OS comparadas con células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés: *Mesenchymal Stem Cells*) y hueso sano, obtenidas de la base de datos *ps_avgpres_osteosarcoma127_ilmnhwg6v2* publicada por Marieke Lydia Kuijjer en 2012. En el estudio del SE, la expresión de la sonda de *CDO* (*227526_at*) fue estimada mediante la plataforma U133p2 de Affymetrix y los datos fueron normalizados mediante el método MAS5.0. En cambio, en el estudio de las muestras de OS se analizó la sonda de *CDO* (*ILMN_1751411*) mediante la plataforma Illumina human-6 v2.0 expression beadchip y los datos fueron normalizados mediante el método VST. A pesar de que la única diferencia significativa observada fue el incremento de la expresión de *CDO* en las muestras de SE versus el músculo esquelético, en ambas neoplasias existe un subgrupo de pacientes con una sobreexpresión de *CDO*. Adicionalmente, a diferencia del RMS, tanto el SE como el OS disponen de datos de supervivencia que permitieron realizar el análisis Kaplan-Meier en función de la expresión de *CDO*. Los pacientes fueron divididos según si su expresión se encontraba por encima o por debajo de la mediana. De nuevo, sólo se apreciaron diferencias significativas en el análisis de las muestras de SE, donde los tumores con mayor expresión de *CDO* se asociaron a peores probabilidades de supervivencia.

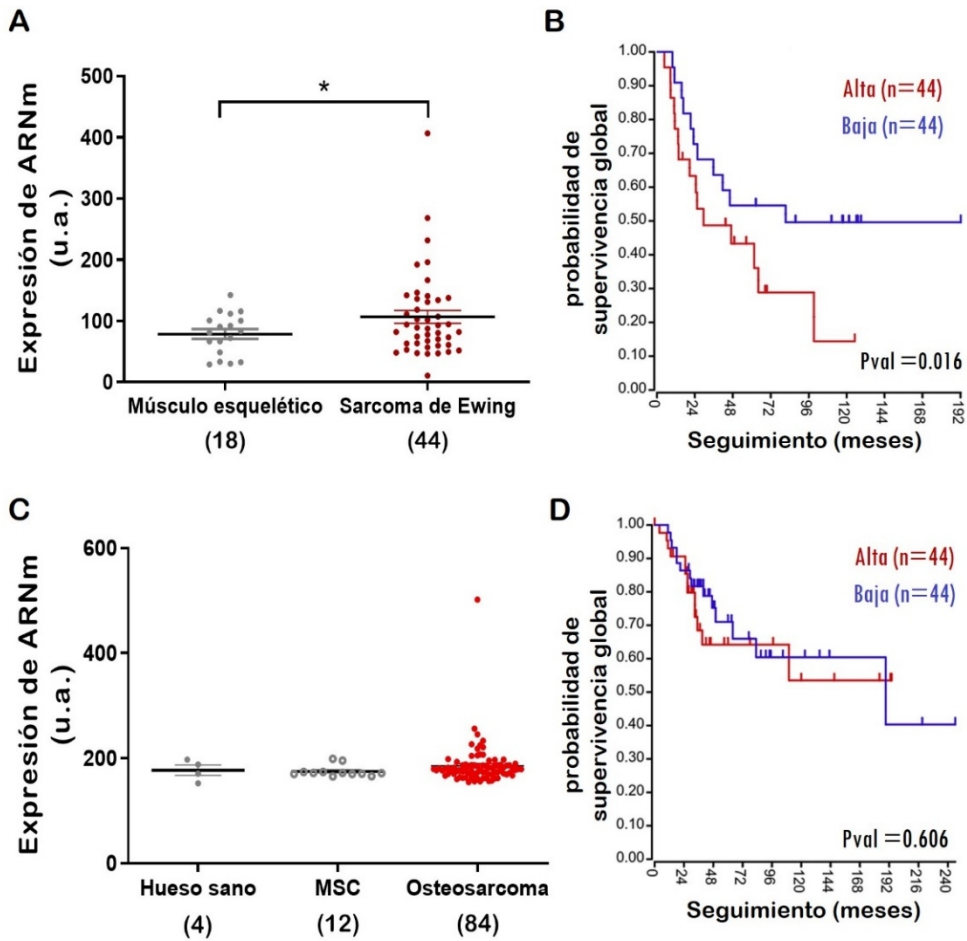


Figura 32. La expresión elevada de *CDO* en tumores de Sarcoma de Ewing se asocia a una menor probabilidad de supervivencia. A y C, Los datos de expresión de *CDO* fueron extraídos de la plataforma de análisis de datos genómicos R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>). En la gráfica **A** se representan la expresión individual y la media (SD) de 18 muestras de músculo esquelético (puntos en gris) y 44 muestras de SE (puntos granates). La gráfica **C** representa la expresión individual y la media (SD) de 4 muestras de hueso sano, 12 de MSC (círculos en gris) y 84 muestras de OS (puntos rojos). La significación estadística usada corresponde a la Prueba t para datos no apareados, donde * $p < 0.05$. **B y D,** Análisis de Kaplan-Meier en función de la expresión de *CDO* realizado a través de la plataforma R2. Los pacientes con SE (**B**) o con OS (**D**) fueron divididos en el grupo de expresión alta, o mayor de la mediana (rojo) y en el grupo de expresión baja, o por debajo de la mediana (azul). Los datos de expresión de la sonda de *CDO* (227526_at) en SE proceden de la base de datos de Savola, cuya expresión fue estimada mediante el array de Affymetrix U133A y normalizada mediante el método MAS5.0. Los datos de expresión de la sonda de *CDO* (ILMN_1751411) en OS proceden de la base de datos de Kuijjer, cuya expresión fue estimada mediante la plataforma Illumina human-6 v2.0 expression beadchip y normalizada mediante el método VST

RESULTADOS

Finalmente, comprobamos el efecto del tratamiento del compuesto SLT-0463 en un panel de tres líneas de SE (SKES1, TC71 y CADOES1) y dos líneas de OS (MG63 y U2OS) (Figura 33). El compuesto SLT-0463 comprometió el crecimiento *in vitro* tras 5 días de incubación a una concentración de 10uM de todas las líneas celulares de sarcomas óseos testadas.

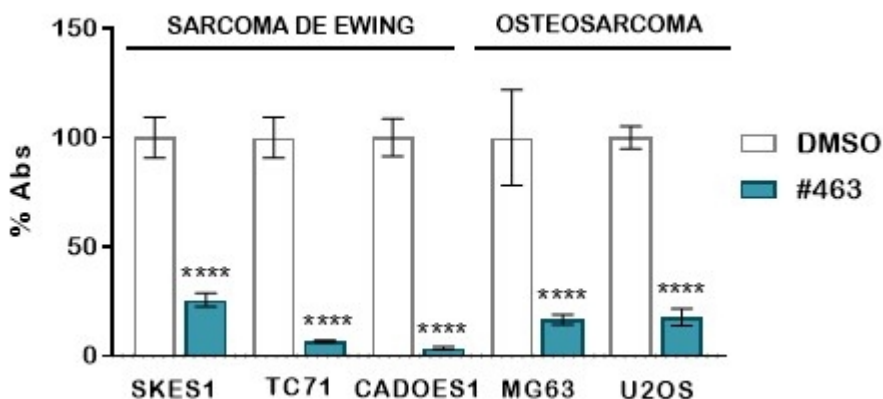


Figura 33. El compuesto SLT-0463 compromete la proliferación *in vitro* de las líneas celulares de sarcoma de Ewing y osteosarcoma. Ensayo de proliferación en las líneas celulares de SE (SKES1, TC71 y CADOES1) y de OS (MG63 y U2OS), tras 5 días de incubación con DMSO (barras de color blanco) o con el compuesto SLT-0463 (#463) (barras de color azul). La condición DMSO fue usada como control. Los valores corresponden a la media (SD) de la absorbancia del cristal violeta a 590nm de 5 réplicas por condición referidas a la condición control, tomada como 100%. La significación estadística usada corresponde a la prueba t de Student, donde **** $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

1. Evaluación de la estrategia de inhibición de la vía Hh mediante el bloqueo de la interacción entre los ligandos Hh y el receptor PTCH

Nuestro grupo fue el primero en describir la implicación oncogénica de los ligandos Hh en el RMS. Además de demostrar la expresión preponderante de los ligandos IHH y DHH en líneas celulares y tumores de RMS, vinculamos su presencia con la regulación de la viabilidad celular. Por otro lado, relacionamos el ligando menos expresado, SHH, con la modulación de la capacidad invasiva de las células de RMS (298). En concordancia, S. Satheesa *et al.* reportaron una correlación positiva entre los niveles de ARNm de IHH y DHH y la expresión de los genes diana de la vía (327). Ambos hallazgos confirman la activación autocrina ligando-dependiente de la vía Hh en el RMS, enmascarada hasta el momento por la subestimación de los ligandos Hh alternativos, IHH y DHH.

La fuerte dependencia de los ligandos descrita en el RMS insinúa el presumible potencial terapéutico de su inhibición. Lamentablemente, la infravaloración de los ligandos IHH y DHH también ha influido en el desarrollo de los inhibidores de la vía a nivel de ligando, todos ellos específicamente diseñados para el bloqueo de SHH, a excepción del anticuerpo MEDI-5304 capaz de inhibir SHH e IHH (290,291). No obstante, las evidencias de la actividad antitumoral del compuesto MEDI-5304 se reducen a una publicación de sus inventores, en la cual confirman su eficacia en cáncer de páncreas a través de la inhibición de la señalización paracrina de Hh (291), y a una publicación de nuestro grupo, en la cual comprobamos un efecto antiproliferativo moderado en las células de RMS *in vitro* (298). Lejos de cumplir las expectativas puestas en la inhibición de los ligandos Hh, quizás, debido a los altos niveles de expresión de DHH y ante la falta de compuestos alternativos adecuados a la casuística de la vía Hh en el RMS, decidimos desarrollar una nueva estrategia de inhibición que bloqueara la interacción de los ligandos con su principal receptor, PTCH. Para ello,

DISCUSIÓN

utilizamos una herramienta indispensable en la inhibición de las interacciones proteína-proteína, los peptidomiméticos (328).

Nuestros resultados descartan la efectividad antitumoral de los peptidomiméticos desarrollados. La falta de actividad se vio reflejada, por un lado, a nivel funcional, mediante la evaluación de la proliferación celular *in vitro* y, por otro lado, a nivel molecular, mediante el estudio de la expresión de varios genes diana de la vía Hh. En controversia, observamos una reducción de la viabilidad celular en la primera etapa de cribado de los compuestos. No obstante, consideramos el ensayo de proliferación celular por tinción con cristal violeta como un indicador más directo que el ensayo de viabilidad WST-1. En concordancia, cabe mencionar la reciente atención que están recibiendo los ensayos de viabilidad celular por su falta de replicabilidad y reproducibilidad (329). Concretamente, existen publicaciones que hacen referencia a la toxicidad engañosa de algunos compuestos observada mediante los ensayos con WST-1 (330,331).

En conclusión, hipotetizamos que la falta de efectividad de los compuestos peptidomiméticos podría deberse a un diseño computacional subóptimo. No obstante, dada la relevancia del correceptor CDO demostrada en este trabajo, la ausencia de actividad antitumoral también podría deberse a la falta de trascendencia de la interacción de los ligandos con PTCH, en la oncogenicidad del RMS.

2. Caracterización del papel de los correceptores BOC y CDO en RMS

Los correceptores BOC y CDO constituyen dos elementos relacionados con la activación de la vía Hh, cuya implicación en cáncer ha permanecido prácticamente inadvertida. Nuestra hipótesis planteaba el posible papel oncogénico de ambos correceptores en el RMS, basándose en la importancia de éstos en dos procesos clave en el presunto origen de esta neoplasia: la activación ligando-dependiente de la vía Hh y la diferenciación muscular durante el desarrollo embrionario.

Atendiendo a la bibliografía publicada al respecto (ver apartado INTRODUCCIÓN 2.3.2.) y en sintonía con nuestra hipótesis, la sobreexpresión de BOC ha sido relacionada con la progresión tumoral del meduloblastoma y con una menor probabilidad de supervivencia de los pacientes afectos de glioblastoma (260,261,332). En el caso de CDO, varios estudios sostienen un papel oncogénico de este correceptor en cáncer de próstata, pulmón y páncreas (262–264). En discrepancia, dos publicaciones hacen referencia a un papel pro-apoptótico de CDO en cáncer colorrectal y en neuroblastoma, donde CDO actuaría como un receptor de dependencia (receptores que inducen la muerte celular programada en ausencia de ligando) (333,334). Por consiguiente, deducimos que CDO podría tener un papel dual como proto-oncogén o supresor tumoral dependiendo del tipo de neoplasia, cuyo marcador predictivo, según las publicaciones mencionadas, podrían ser los niveles de expresión: presentando una sobreexpresión ectópica en los tumores en los que actúa como proto-oncogén y una infraexpresión en los que lo hace como supresor tumoral. Otra deducción posible es que la actuación de CDO como supresor tumoral debida a su condición como receptor de dependencia, sólo podría ocurrir en tumores con baja expresión de los ligandos Hh y, por lo tanto, quedarían excluidos los tumores con activación ligando dependiente de la vía Hh, como el RMS, en los cuales la elevada expresión de los ligandos Hh imposibilitaría la carencia de ligando de CDO y la consiguiente inducción de la apoptosis. Sin embargo, el único estudio publicado sobre BOC y CDO en RMS propone una asociación entre la sobreexpresión de ambos correceptores y la diferenciación de la línea celular de RMSe, RD. M. Wegorzewska et al., confirmaron la inducción de la diferenciación en células RD con sobreexpresión estable de BOC o CDO, mediante el aumento de la expresión de dos marcadores de diferenciación musculares (la Troponina T y la cadena pesada de la miosina) y el incremento en la formación de miotubos en cultivo. Adicionalmente, reportaron un incremento de los niveles de BOC tras la inducción de la diferenciación en la línea RD *wild type* mediante su cultivo con medio condicionado, confirmando el posible papel pro-diferenciador de BOC en RMS. No obstante, de manera inconsistente, la inducción

DISCUSIÓN

de diferenciación en la línea RD *wild type* redujo los niveles de proteína de CDO (335). Dicha observación relaciona niveles de expresión bajos de CDO con la inducción de diferenciación celular y, por ende, permite plantear una posible asociación entre una expresión elevada de CDO y un estado celular proliferativo. Dadas las controversias expuestas, establecer el papel de los correceptores BOC y CDO en el RMS es clave para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas de inhibición de la vía Hh.

2.1. Determinación del perfil de expresión de BOC y CDO en RMS

En este trabajo, se ha caracterizado por primera vez la expresión de los correceptores de la vía Hh, BOC y CDO, en el RMS. Concretamente, hemos demostrado una amplia expresión en la mayoría de líneas celulares y tumores de RMS, significativamente mayor que en las muestras no cancerosas usadas como referencia (fibroblastos y tejido muscular adulto).

La primicia de nuestro análisis impide su comparación con ningún estudio previo. No obstante, cabe resaltar el alcance de nuestra metodología, diseñada específicamente con la intención de reducir las principales limitaciones de la investigación en tumores pediátricos: la alta heterogeneidad y la baja incidencia. De este modo, consideramos que la validación de los datos de expresión mediante diferentes técnicas, así como, el elevado tamaño muestral logrado mediante la inclusión de datos provenientes de dos cohortes de pacientes públicas (sólo disponibles en el caso de CDO) y una propia, aportan la robustez necesaria para generalizar la sobreexpresión de ambos correceptores en el RMS.

A diferencia del papel pro-diferenciador propuesto por M. Wegorzewska et al. (335), la expresión alterada de proteínas en cáncer, en este caso BOC y CDO, sugiere un presumible papel en el desarrollo y la progresión tumoral (336). Especialmente, en el caso de CDO, donde el incremento medio de expresión en pacientes es del orden de 50 veces mayor que en el tejido sano. La sobreexpresión ectópica de CDO detectada

en las muestras de RMS concuerda con las observaciones realizadas en los tumores en los que CDO actúa como proto-oncogén.

2.2. El impacto de las inhibiciones genéticas de BOC y CDO en RMS

La leve reducción de la capacidad proliferativa observada en las líneas de RMS con depleción genética de BOC, lejos de cumplir con las expectativas de nuestra hipótesis, provocó que desestimáramos la aplicabilidad terapéutica de la inhibición de BOC en RMS.

Por el contrario, la inhibición genética de CDO nos permitió confirmar el hallazgo molecular con mayor implicación traslacional de este trabajo: la caracterización de CDO como un componente indispensable en la supervivencia y oncogenicidad del RMS. Gracias a esta aproximación, demostramos que la privación genética de CDO supone un gran impedimento proliferativo en las tres líneas celulares de RMS testadas *in vitro* y ratificamos el efecto antitumoral *in vivo*, mediante un modelo de crecimiento tumoral ortotópico murino. La drástica reducción de la proliferación celular, llegando incluso a imposibilitar el cultivo de las células transducidas con el shRNA anti-CDO, así como el efecto antitumoral *in vivo*, validan nuestra hipótesis y confirman el papel pro-oncogénico de este correceptor en RMS.

A nivel metodológico, cabe mencionar la falta de eficacia *in vivo* del sistema de inhibición utilizado. No obstante, considerando la significativa reducción del volumen tumoral tras 50 días de crecimiento ortotópico y el contundente efecto observado *in vitro*, justificamos el resultado final del estudio *in vivo* con la reexpresión de CDO observada en las células tumorales con depleción genética de CDO.

A pesar de la alta homología descrita entre ambos correceptores y de su asociación formando complejos receptores, otros autores han descrito previamente una dependencia de CDO en la actividad de BOC durante la miogénesis (169). Del mismo modo, el perfil de expresión de ambos correceptores también fundamenta la relevancia de CDO sobre BOC en RMS.

3. La implicación molecular de CDO en el RMS

La función biológica de la proteína CDO es poco conocida. Los resultados de este trabajo indican su alta implicación en la progresión tumoral del RMS mediante el control de numerosos procesos alterados en cáncer: la proliferación, la muerte celular, la diferenciación y la invasión. El equilibrio entre la diferenciación, la proliferación y la muerte celular sustenta todos los aspectos de la biología humana, incluidos dos procesos claves relacionados con la vía Hh: la embriogénesis y la tumorigénesis (337). Por este motivo, hemos centrado la justificación de los diferentes procesos asociados a CDO en la modulación de la vía Hh.

El patrón de expresión de CDO durante el desarrollo, asociado a regiones del embrión que requieren una elevada actividad de la vía Hh incluso a bajas concentraciones de ligando y cuya regulación es altamente dosis-dependiente (338), evidencia la directa implicación de CDO en la activación de la vía Hh. Consecuentemente, diversos estudios relacionan la inhibición de CDO con la reducción de dicha vía de señalización (339,340). Concretamente, un estudio sobre mutaciones en CDO reveló que la eliminación de los dominios FNI y FNII –necesarios para la interacción con PTCH– redujo la activación de la vía Hh dependiente de ligando en un 85% (341). Por lo tanto, dadas la estrecha relación entre CDO y la activación de la vía Hh y las propiedades oncogénicas atribuidas a la vía Hh en el RMS, los efectos anti-tumorales de la inhibición de CDO podrían explicarse a través de la inactivación de esta vía. Concretamente, las publicaciones que describen el papel oncogénico de CDO en páncreas y pulmón asocian los efectos terapéuticos de la inhibición de CDO con la reducción de la transcripción de GLI1 y PTCH1 (263,264). Sin embargo, a diferencia de estas publicaciones, no hemos detectado una reducción de los niveles del factor de transcripción GLI1. En su lugar, identificamos una disminución de las formas activa y represora del factor de transcripción GLI3. Esta observación, confirma la modulación de la vía Hh tras la inhibición de CDO y reivindica el papel de GLI3 como mediador de la respuesta anti-oncogénica en el RMS. Las discrepancias contempladas en la modulación de los diferentes efectores de la vía Hh, podrían deberse a las diferencias

de la señalización asociadas a cada neoplasia. Si bien todos ellos son tumores con una activación aberrante de la vía Hh ligando-dependiente, los tumores de páncreas y pulmón se caracterizan por una expresión preponderante del ligando SHH y del factor de transcripción GLI1 (342,343), mientras que nuestros resultados confirman una expresión preponderante de los ligandos DHH e IHH y del factor de transcripción GLI3 en el RMS. De este modo, deducimos que la inhibición de la vía Hh mediada por CDO podría reducir los niveles de expresión de los componentes de la vía Hh activos en cada neoplasia. No obstante, los niveles de GLI3 no han sido analizados en los estudios de la inhibición de CDO en cáncer de páncreas y pulmón (263,264), por lo que no podemos descartar la relación entre CDO y GLI3 en estas neoplasias. De manera interesante, existe un artículo que demuestra la expresión subordinada de CDO al factor de transcripción GLI3 en la mesénquima de las extremidades (344). Este hecho, junto con la vinculación de la inhibición de CDO y la reducción de GLI3 observada en nuestros experimentos, sugieren un posible nuevo mecanismo de retroalimentación entre ambos componentes de la vía Hh en el RMS, ampliando la extensa lista de componentes de la señalización Hh que están transcripcionalmente regulados por la propia señalización (Ilustración 24). Adicionalmente, ha sido descrita la capacidad de CDO de modular la actividad de los factores de transcripción GLI1 y GLI2 sin alterar sus niveles de proteína (338). Por lo que no podemos rechazar que la inhibición de CDO en RMS repercuta en la actividad transcripcional de GLI1 y GLI2.

Una vez demostrada la implicación de la vía Hh, los diferentes procesos tumorales asociados a CDO pueden ser explicados en consecuencia (Ilustración 25). De este modo, justificamos la reducción de la proliferación de las células de RMS con un arresto del ciclo celular debido a la modulación de las ciclinas descritas como dianas de la señalización Hh, como la CCNB1 y probablemente las CCND asociadas a la regulación de pRB (345–348). A su vez, el arresto del ciclo celular podría fundamentar la inducción de dos procesos claramente relacionados: la apoptosis mediada por las caspasas 9 y 3 (349,350), y la diferenciación celular, justificada con la infraregulación de marcadores

DISCUSIÓN

miogénicos iniciales como MYOD y MYOG (23) y la sobreexpresión de proteínas asociadas al músculo adulto, como SGCG (323).

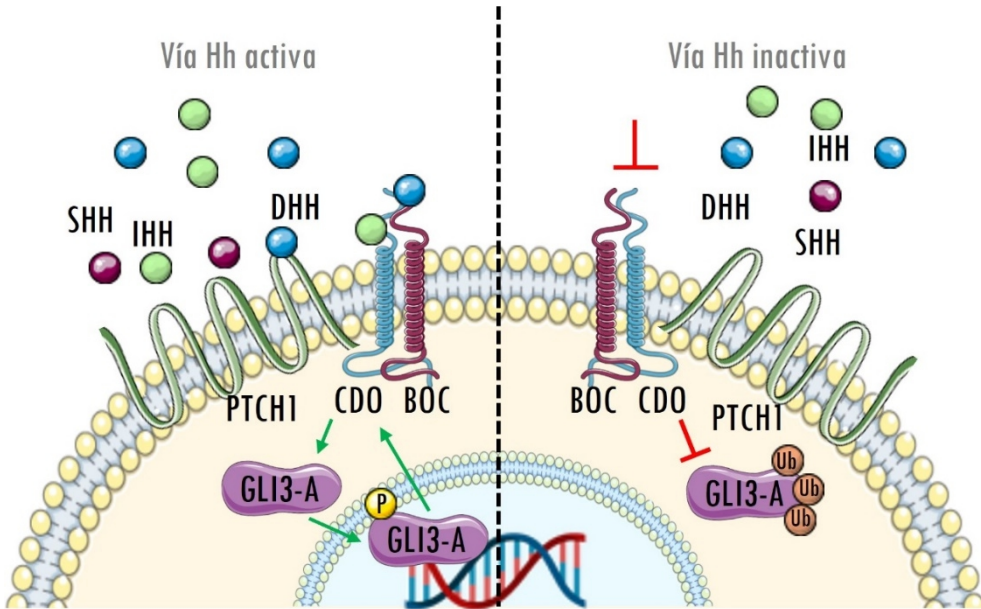


Ilustración 24. Modelo del mecanismo de retroalimentación propuesto entre CDO y GLI3 en RMS. La activación ligando-dependiente de la vía Hh mediada por CDO permite la acumulación de la forma GLI3 activa (GLI3-A). El factor de transcripción GLI3-A es fosforilado y translocado al núcleo, donde activa la transcripción de los genes diana de la vía Hh, entre ellos CDO. En cambio, la inhibición de CDO impide la activación de ligando-dependiente de la vía Hh en el RMS. En consecuencia, el factor de transcripción GLI3 es degradado completamente, deteniendo la transcripción de los genes diana y, por lo tanto, provocando la reducción de los niveles de expresión de CDO.

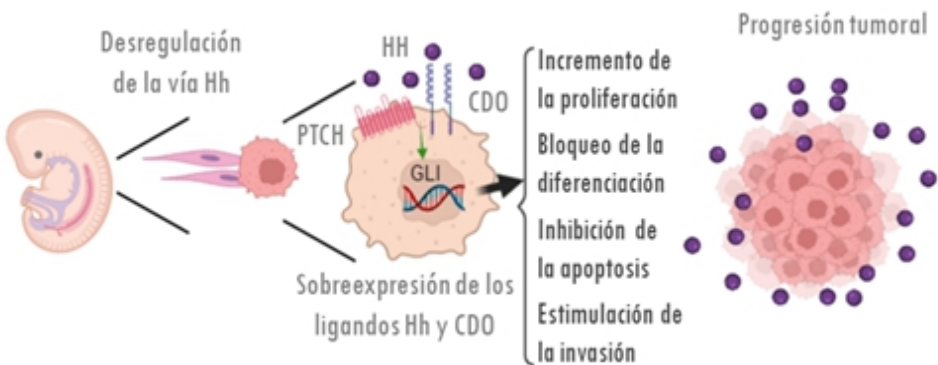


Ilustración 25. Propuesta del mecanismo de progresión tumoral del RMS dependiente de la vía Hh. La desregulación de la vía Hh durante el desarrollo embrionario asociada a una sobreexpresión de los ligandos Hh, CDO y GLI3, provoca la progresión tumoral del RMS mediante el incremento de la proliferación, el bloqueo de la diferenciación y la apoptosis y la estimulación de la invasión celular.

No obstante, actualmente hemos comenzado la caracterización de otras vías no canónicas dependientes de CDO, que podrían contribuir notablemente en todos los procesos mencionados.

3.1. Vías no canónicas de la señalización de CDO

Del mismo modo que otros componentes de la vía de señalización Hh (ver apartado INTRODUCCIÓN 2.2.2.), CDO es capaz de interactuar con otras moléculas ajenas a la vía canónica. A continuación, adjuntamos un gráfico representativo de 12 genes con evidencia de interacción física con CDO (Ilustración 27), disponible en el repositorio de interacciones biomédicas BioGRID (thebiogrid.org) (351). Sorprendentemente, a excepción de la protocadherina PCDHGB1, la cual actualmente no ha sido relacionada con ninguna neoplasia y la citoquina TNFSF8, la cual en función del contexto tumoral puede desarrollar un papel pro o anti-oncogénico (352,353), todas las evidencias científicas publicadas sobre el resto de genes indican un papel pro-oncogénico en una gran variedad de tumores (Tabla 21). Este descubrimiento reafirma la estrecha relación de CDO con la tumorigénesis, ampliando su interés terapéutico.

La clase proteica más representada entre los interactores de CDO corresponde a las moléculas de adhesión celular, destacando diversas cadherinas y proto-cadherinas implicadas en procesos del desarrollo embrionario (354–359), cuya desregulación se ha asociado de forma general con la transformación maligna del RMS. Concretamente, han sido involucradas con la proliferación y la invasión (360,361), dos de los procesos celulares que nuestros resultados vinculan a la inhibición de CDO en RMS. Otro aspecto relevante es la involucración de la vía de Wnt, tanto a través de la interacción directa con la β -catenina (362–364), como a través de la vía no canónica mediada por RYK (365–367). La vía Wnt constituye una vía de señalización del desarrollo embrionario con alto grado de interacción con Hh y cuya implicación en RMS ha sido previamente confirmada. Destacablemente, esta vía ha sido asociada a la diferenciación del RMS (368,369). Otro de los aspectos claves asociados a CDO, la

DISCUSIÓN

supervivencia celular, está en gran medida asociado a las funciones descritas de ABL1 y TNFSF8 (352,370,371). Finalmente, destaca la interacción de CDO con dos componentes asociados a la respuesta inmune, CTLA4 y PVR, cuya inhibición está relacionada con la respuesta a terapias antioncogénicas (372–374)y, por lo tanto, podría tener una gran relevancia clínica.

En conjunto, consideramos que el potencial oncogénico de CDO podría explicarse más allá de la vía Hh, mediante las posibles vías no canónicas derivadas de las interacciones con los diferentes componentes mencionados. Remarcablemente, la relevancia oncogénica descrita para la mayoría de estos interactores, aumenta las posibilidades terapéuticas de CDO.

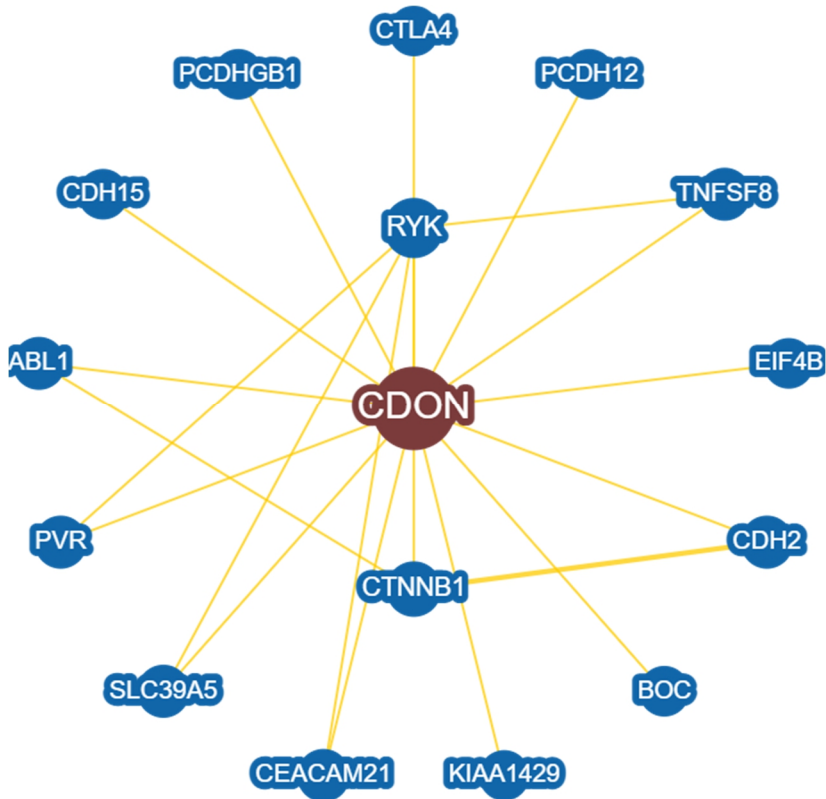


Ilustración 26. Representación gráfica de las proteínas capaces de interactuar con CDO. Las líneas amarillas representan asociaciones con evidencia física. Un mayor grosor indica una mayor evidencia. Gráfico obtenido de BioGRID (thebiogrid.org).

| Gen | Función | Papel | Referencias |
|----------|--|----------------|---|
| ABL1 | Tirosina quinasa - Control crecimiento y supervivencia | Pro-oncogénico | Chiaretti S 2019; Wang F 2020 |
| CDH15 | Cadherina - Diferenciación muscular | Pro-oncogénico | Yamada S 2007 |
| CDH2 | Cadherina - desarrollo del sistema nervioso y formación de cartilago y hueso | Pro-oncogénico | Gao S 2018; Guvakova MA 2020; Ma T 2016 |
| CEACAM21 | Molécula de adhesión celular relacionada con el Antígeno carcinoembrionario | Pro-oncogénico | Xia JH 2018 |
| CTLA4 | Receptor - regulador negativo de células T | Pro-oncogénico | Buchbinder EI 2016 |
| CTNNB1 | Catenina - efector final de la vía Wnt | Pro-oncogénico | Wu H 2019; Ye G 2020; He S 2020 |
| EIF4B | Factor de iniciación de la traducción | Pro-oncogénico | Shahbazian D 2010 |
| KIAA1429 | m6A Metiltransferasa - regulación expresión génica | Pro-oncogénico | Lan T 2019; Zhao W 2021; Qian JY 2019 |
| PCDH12 | Protocadherina - migración e interacción celulares | Pro-oncogénico | Feng X 2020 |
| PCDHGB1 | Protocadherina - conexiones neurales | - | - |
| PVR | Molécula de adhesión celular - Adhesión y activación de las células NK | Pro-oncogénico | Sloan KE 2005; Nishiwada S 2015; Chiu DK 2020 |
| RYK | Receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento - Activación no canónica de la vía Wnt | Pro-oncogénico | Thiele S 2018; Fu Y 2020; Katso RM 2000 |
| SLC39A5 | Transportador de Zinc - homeostasis de Zinc y regulación de la vía de la proteína morfogénica ósea y el factor de crecimiento transformante beta | Pro-oncogénico | Jin J 2015; Liu L 2020; Liu Z 2021 |
| TNFSF8 | Citoquina del factor de necrosis tumoral - proliferación de células T | Dual | Jin D 2019; Watanabe M 2011 |

Tabla 19. Elementos de interacción no-canónica con CDO y su papel en cáncer.

4. El posible papel oncogénico de GLI3 en RMS

El análisis de los niveles de expresión de la familia de factores de transcripción GLI en tumores de RMS confirmó nuestras premisas, demostrando una expresión aventajada de GLI3, no descrita previamente, en todas las bases de datos de RMS analizadas. La preeminencia de GLI3 reivindica su papel como factor de transcripción de la vía Hh, frecuentemente desmeritado frente GLI1 y GLI2. Este hallazgo, junto con la relación observada entre GLI3 y CDO, sugiere su posible implicación en la oncogenicidad asociada a la activación de la vía Hh en el RMS. Actualmente, los dos únicos artículos existentes al respecto están en sintonía con este planteamiento: el primero, incluye la expresión de GLI3 como marcador de activación de la vía Hh y, por ende, de mal pronóstico, en los RMS-FN; el segundo, detalla una reducción de la proliferación tras la infraregulación genética de GLI3 en líneas celulares de RMSe (299,375). Notablemente, el papel de GLI3 en cáncer ha sido recientemente revisado por S.J. Matissek. Mientras varios estudios referencian un aumento de la expresión de GLI3 en las muestras tumorales de pacientes, en comparación con muestras de tejido sano, otros estudios enfatizan en los aspectos funcionales, relacionando a GLI3 con la regulación de procesos tan importantes para la progresión tumoral como la proliferación, la supervivencia, la invasión y la migración celulares (225). De este modo, las evidencias halladas en otros cánceres permitirían explicar los efectos funcionales observados tras la inhibición de CDO, mediante la inactivación de GLI3. De manera interesante, se han descrito evidencias de la capacidad oncogénica de GLI3 en los tumores en los que se ha indicado un papel oncogénico de CDO: próstata, pulmón y páncreas (376–378), reforzando nuestro modelo de retroalimentación positiva propuesto entre ambos elementos (Ilustración 24).

En definitiva, nuestros resultados sugieren una posible señalización oncogénica a través del eje CDO-GLI3 en RMS, presumiblemente ampliable a otros tipos de tumores. Ambos constituyen dos novedosas dianas moleculares con alto potencial terapéutico, que podrían recobrar las esperanzas puestas en el desalentador paradigma de los inhibidores de la vía Hh.

5. CDO como diana terapéutica en RMS

El desatendido papel de los correceptores de la vía Hh en cáncer, convierte a CDO en una diana terapéutica completamente inexplorada, con todas las ventajas y dificultades que ello supone.

El descubrimiento y la evaluación del potencial terapéutico de una diana farmacológica se basan, no solo en estudios experimentales y mecanísticos, sino también en la evaluación teórica de la farmacología molecular y en una evaluación temprana de los posibles efectos secundarios. Según I. Gashaw et al., las propiedades de una diana farmacológica ideal son (379):

1. La diana modifica la enfermedad y/o tiene una función fisiopatológica probada en ella.
2. La modulación de la diana es menos importante en condiciones fisiológicas o en otras enfermedades.
3. Si la capacidad farmacológica no es obvia, se requiere la disponibilidad de su estructura 3D.
4. El estudio de la diana permite un cribado de alto rendimiento.
5. La expresión de la diana no se distribuye de manera uniforme por todo el cuerpo.
6. Existe un biomarcador específico de la diana o la enfermedad, para controlar la eficacia terapéutica.
7. La predicción de los posibles efectos secundarios según datos fenotípicos, como ratones *knockout* o bases de datos de mutaciones genéticas, es favorable.
8. La propiedad intelectual de la diana es favorable.

A continuación, resumiremos la adecuación de CDO a cada uno de estos requisitos, basándonos en nuestros resultados y en la bibliografía disponible. Por un lado, nuestra evaluación de la inhibición genética de CDO demuestra su implicación directa en diversas propiedades oncogénicas del RMS: la proliferación, la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación y la invasión, confirmando así la función

DISCUSIÓN

fisiopatológica de CDO en esta enfermedad. Adicionalmente, la necesidad médica existente en el RMS incrementa el valor de esta diana, que, según nuestras hipótesis, podría ampliar su potencial terapéutico a otros tumores. Por otro lado, la búsqueda bibliográfica limita las funciones de CDO al desarrollo embrionario, de hecho, las únicas mutaciones patogénicas descritas se asocian a dos enfermedades congénitas de la línea media, el síndrome de interrupción del tallo hipofisario y la holoprosencefalia, ambas comúnmente vinculadas a la inactivación de la vía Hh (380,381). En concordancia, nuestros experimentos demuestran una baja expresión de CDO en los tejidos sanos usados como referencia en los análisis de expresión, sugiriendo un papel menos relevante de CDO en condiciones fisiológicas posteriores al desarrollo embrionario. Notablemente, se ha descrito un alto grado de redundancia de CDO con los correceptores BOC y GAS1 en diversos contextos del desarrollo embrionario (382), indicando una menor relevancia de las funciones de CDO en condiciones normales. Respecto al estudio de la diana, tal como detallamos en nuestros resultados, las estructuras 3D de los complejos formados por el dominio FNIII de CDO y cada uno de los ligandos Hh son públicamente accesibles mediante la base de datos PDB (ver apartado MATERIALES Y MÉTODOS 10.). Este hecho, junto con la colaboración multidisciplinar con IUCT (actual SELABTEC) nos permitió abordar el estudio de CDO mediante un cribado de alto rendimiento de las moléculas con alta probabilidad de interacción. Asimismo, la validación posterior fue realizada mediante un sencillo screening de proliferación *in vitro*. Considerando la expresión de la diana, el patrón de expresión de CDO ha sido descrito como altamente dinámico y específico según el tipo celular (168,383). No obstante, J.S. Kang et al. reportaron una expresión máxima del ARNm de CDO en fibroblastos embrionarios de rata, en contraposición con una mínima expresión en la mayoría de los tejidos de ratas adultas (168). Sugiriendo, en consonancia con los datos de su función fisiológica, una expresión diferencial en función de la etapa del desarrollo. Para profundizar en este aspecto, hemos accedido a la base de datos del proteoma humano, ProteomicsDB (<https://www.ProteomicsDB.org>) (384). Los resultados muestran la expresión reducida de CDO en el humor vítreo, los

testículos, los ovarios, la vesícula biliar y la glándula tiroides (Ilustración 27). No obstante, no se ha descrito ninguna función fisiológica de CDO en estos tejidos. Del mismo modo, tampoco se ha descrito ninguna diana molecular específica, pero gracias a los resultados expuestos en esta tesis, proponemos el uso de GLI3 como biomarcador de la eficacia terapéutica en RMS. Referente a los posibles efectos secundarios, todos los datos fenotípicos provienen de estudios durante el desarrollo. El 60% de los ratones *knockout* generados por F. Cole no sobrevivieron más de 21 días post-parto. Además, todos ellos presentaron un retraso en el desarrollo del músculo esquelético y el 50% mostró defectos faciales característicos de la holoprosencefalia microforma (una forma benigna de holoprosencefalia)(385,386). Tales resultados, presuponen la restricción de una posible terapia anti-CDO durante la gestación. Sin embargo, no observamos efectos secundarios tras el tratamiento diario con el compuesto SLT-0463 en ratones jóvenes en edad de crecimiento (5 semanas de edad), sugiriendo la delimitación de los posibles efectos secundarios al desarrollo embrionario. Finalmente, en el inicio de esta tesis, CDO era una diana terapéutica completamente inexplorada, por lo que no tuvimos problemas de competitividad y tuvimos total libertad para patentar el compuesto SLT-0463 (ANEXO 3.).

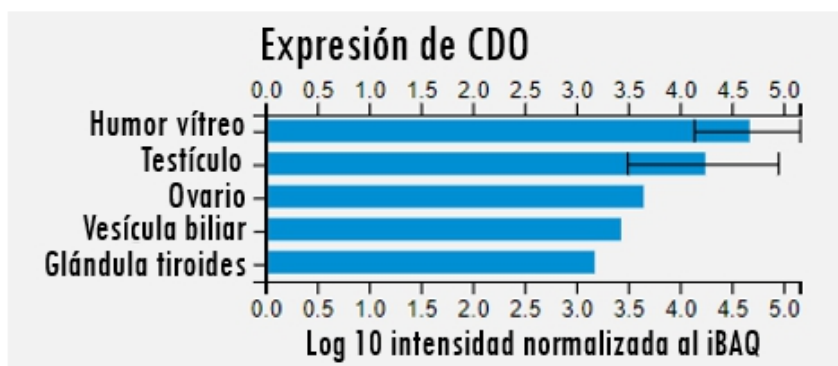


Ilustración 27. Expresión media de CDO en tejidos humanos. Imagen modificada de ProteomicsDB (<https://www.ProteomicsDB.org>). iBAQ: intensity-based absolute quantification

DISCUSIÓN

En conclusión, los experimentos realizados en esta tesis doctoral permiten confirmar las destacables propiedades de CDO como una diana farmacológica ideal, prácticamente inexplorada. La idealidad de la diana en el RMS, junto con la posible ampliación de su potencial terapéutico a otros tumores, son aspectos clave en la captación de interés por la industria farmacéutica que podrían mejorar el impase en el desarrollo de terapias moleculares específicas contra el RMS.

6. Caracterización preclínica de un nuevo compuesto anti-CDO en RMS

La búsqueda de moléculas activas, es decir, moléculas capaces de interactuar con CDO y de ejercer una actividad biológica significativa en el RMS que recapitule los efectos antitumorales observados tras la inhibición genética de CDO, priorizó la selección del compuesto SLT-0463.

Una vez identificado, SELABTEC se encargó de la determinación de la identidad del compuesto SLT-0463 y de la optimización de su síntesis con una pureza >99%, siendo ambos aspectos de gran relevancia en las primeras etapas del descubrimiento de nuevos fármacos (387). Fruto del análisis de identidad del compuesto, constatamos que la molécula presenta actividad quiral. Dado que la quiralidad es una propiedad fisicoquímica que puede afectar directamente a la actividad farmacodinámica y farmacocinética de las moléculas (318), profundizamos en su estudio. En consecuencia, determinamos que el enantiómero S del compuesto SLT-0463 tiene un efecto antiproliferativo *in vitro* mayor que su isómero R y, por lo tanto, priorizamos la síntesis específica de este enantiómero frente a la formulación racémica (mezcla de ambos enantiómeros). Adicionalmente, SELABTEC descartó la posible conversión quiral o epimerización de este compuesto, con tal de asegurar la pureza quiral en la administración *in vivo* y evitar una posible reducción de la potencia o eficacia del compuesto, como ha ocurrido con otras moléculas quirales como, por ejemplo, el pantoprazol (388). Posteriormente, validamos la especificidad del compuesto por su

diana mediante la evaluación de los efectos observados tras la inhibición genética de CDO.

6.1. El efecto molecular de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en RMS

Comprobamos que el compuesto SLT-0463 provoca una reducción de los niveles de CDO. Aunque desconocemos el mecanismo de interacción entre el SLT-0463 y CDO, la reducción de los niveles de proteína demuestra la capacidad del compuesto de modular su diana. Esta modulación, podría ocurrir directamente a nivel de proteína, de modo que la interacción entre ambos provoque la desestabilización y consiguiente degradación de CDO, tal y como ocurre tras la unión de los ligandos Hh al complejo receptor, y/o a nivel de transcripción génica, pues, como hemos visto previamente en la literatura (340,389), CDO participa en complejas redes de retroalimentación que podrían regular su expresión tras la inhibición funcional mediada por el SLT-0463. Reforzando tanto este último planteamiento, como el nuevo mecanismo de retroalimentación propuesto en este trabajo (Ilustración 24), el tratamiento con el compuesto SLT-0463 reduce de manera selectiva los niveles del factor de transcripción GLI3.

En conclusión, podemos confirmar que el compuesto SLT-0463 es capaz de modular la vía Hh a través de la inhibición del correceptor CDO. Los efectos moleculares asociados a los diferentes procesos celulares implicados en el efecto funcional de esta inhibición (Ilustración 25), se discuten a continuación.

6.2. El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en el ciclo celular

El primer proceso celular evaluado tras el tratamiento de las líneas celulares de RMS con el compuesto SLT-0463 fue la proliferación *in vitro*. Remarcablemente, este compuesto demostró una mayor potencia farmacológica *in vitro* que los inhibidores de referencia de la vía Hh aprobados por la EMA, Vismodegib y Sonidegib (276). En la discusión de la implicación molecular de CDO, argumentamos el efecto

DISCUSIÓN

antiproliferativo en base a un arresto del ciclo celular asociado a la vía Hh y justificado mediante la reducción de los niveles de CCNB1 por WB en las líneas de RMS con depleción genética de CDO. Este efecto ha sido confirmado funcional y molecularmente tras el tratamiento con el compuesto SLT-0463. Concretamente, el arresto del ciclo celular tiene lugar en la fase G1.

La relación entre la vía Hh y el control del ciclo celular está ampliamente aceptada. Existen numerosas evidencias que describen cómo la señalización Hh promueve la proliferación celular a través de la regulación del ciclo celular (347,390). Las profundas implicaciones terapéuticas de esta regulación han sido exploradas en multitud de cánceres. En concordancia con nuestros resultados, la mayoría de publicaciones existentes al respecto, asocian la inhibición de la vía Hh con una acumulación de las células en la fase G1 del ciclo celular (391,392). De la misma manera, a nivel molecular, diversos estudios describen la modulación de pRB, uno de los reguladores clave para la transición G1/S del ciclo celular, a través de la regulación de la transcripción de las ciclinas dianas de la vía Hh: *CCND1*, *CCND2* y *CCNE* (345,392). Adicionalmente, se ha descrito como en ausencia de ligando, PTCH1 es capaz de inhibir la transición G2/M mediante la interacción con la ciclina B1 (CCNB1) (221,347).

6.3. El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en la muerte celular

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis fisiológica, altamente desregulado en cáncer. La inhibición de la vía Hh ha sido relacionada con la inducción de apoptosis en números cánceres (391–394). Esta asociación es fácilmente explicable dada la gran cantidad de genes descritos como diana de la vía Hh vinculados con la supervivencia y la inhibición de la muerte celular (395). No obstante, estudios recientes proponen que este efecto antitumoral, generalmente asociado a la inactivación de la vía Hh canónica, se debe principalmente a la actividad proapoptótica de PTCH en ausencia de ligando (ver apartado INTRODUCCIÓN 2.2.2.1.) (218,396). Curiosamente, uno de estos artículos no sólo menciona el interés de CDO como otro receptor de

dependencia asociado a la vía Hh, sino que propone el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos que bloqueen simultáneamente la interacción entre PTCH y CDO con los ligandos Hh y desencadenen la muerte celular inducida por ambos receptores (396). En nuestra opinión, el compuesto SLT-0463 podría ser capaz de cumplir con este enfoque. Por un lado, gracias al uso del dominio de unión de CDO a los ligandos Hh como estructura cristalina diana en el cribado virtual, la unión del compuesto SLT-0463 a CDO ocurre presumiblemente en este dominio y, por lo tanto, este compuesto podría ejercer su inhibición mediante el bloqueo de la unión de los ligandos Hh a CDO, propiciando simultáneamente, la inducción de la apoptosis. Por otro lado, dado el papel de CDO como correceptor indispensable en la correcta señalización de los ligandos Hh a través de PTCH, es altamente probable que la inhibición de CDO mediada por el compuesto SLT-0463 repercuta negativamente en la interacción entre PTCH y los ligandos Hh, pudiendo desencadenar la consiguiente apoptosis mediada por PTCH (264,380).

A nivel molecular, las vías concretas que median la muerte celular inducida por CDO y PTCH aún no han sido completamente aclaradas (396). El mecanismo de muerte celular propuesto en el caso de PTCH implica la formación de un complejo activador de caspasas que incluye a DRAL y a la caspasa 9 (220). Asimismo, también se ha descrito que la actividad proapoptótica de CDO requiere una escisión proteolítica en su dominio intracelular que permite el reclutamiento y la activación de la caspasa 9 y la posterior activación de la caspasa 3 (333,334). Consecuentemente, nuestros resultados muestran una clara disminución de la forma pre-activa de las caspasas 9 y 3 en las líneas celulares en las que confirmamos el incremento de apoptosis mediante citometría de flujo, RH4 y RH30. Debido a las limitaciones asociadas a la detección mediante WB, no hemos sido capaces de detectar las formas activas de estas caspasas, pero sí la escisión proteolítica de uno de sus sustratos más conocidos, PARP.

Es especialmente destacable la refractariedad de la línea RD. Tal como dedujimos mediante la evaluación del perfil de expresión de BOC y CDO, esta línea de RMSe presenta unos niveles de expresión basal de ambos correceptores más elevados que

DISCUSIÓN

las otras dos líneas testadas. En consecuencia, la inhibición de CDO resultante de las dos estrategias empleadas en este trabajo ha sido menos eficiente que en las líneas de RMSa, en las que la expresión de CDO desaparecía prácticamente por completo. En nuestra opinión, la expresión remanente de CDO, junto con la abundante expresión de BOC presente en esta línea, podrían explicar la reducción de la eficacia de las estrategias inhibitorias testadas. Por lo que planteamos la inhibición simultánea de ambos correceptores como estrategia terapéutica en esta línea. De manera concordante, la importancia del grado de activación de la vía Hh en la progresión tumoral ha sido previamente reportada. Concretamente, E. Mathew et al. correlacionaron la reducción parcial de la vía Hh conseguida a través de la inhibición de los correceptores GAS1 y BOC, con un mayor crecimiento tumoral in vivo. Mientras que la abrogación prácticamente parcial de la señalización Hh mediante la delección de los tres correceptores (GAS1, BOC y CDO), redujo la progresión tumoral (219,264).

6.4. El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en la diferenciación

La diferenciación es, del mismo modo que la apoptosis, un proceso fisiológico controlado por la vía Hh durante el desarrollo, altamente desregulado en cáncer (219). Curiosamente, a pesar de las claras diferencias funcionales entre ambos procesos, la apoptosis y la diferenciación celular comparten ciertas similitudes como, por ejemplo, el arresto del ciclo celular y la activación de las caspasas. De hecho, se ha demostrado que, en muchos modelos de diferenciación, la activación de las caspasas está precedida por una despolarización de la membrana mitocondrial y la consiguiente liberación de moléculas apoptógenas. Sugiriendo, por tanto, un proceso intermediario común en ambas respuestas celulares en el que el tiempo, la intensidad y la compartimentación celular podrían determinar si una célula debe morir o diferenciarse (397,398). En consecuencia, el tratamiento SLT-0463 además de incrementar la apoptosis, es capaz de inducir la diferenciación miogénica de las células supervivientes. De hecho, basándonos en el dogma que propone que la inducción de la muerte celular solo puede deberse a la ausencia de la señal adecuada para la diferenciación celular (219),

proponemos que la inhibición de CDO provoca un arresto del ciclo celular, forzando a las células de RMS a diferenciarse o morir.

A nivel molecular, justificamos la diferenciación mediante la reducción de la expresión de dos marcadores de transcripción claves durante el programa miogénico en el que las células de RMS se encuentran estancadas, MYOD y MYOG, juntamente con la expresión del SGCG, un marcador específico de músculo esquelético maduro. Los factores de transcripción MYOD y MYOG son responsables de coordinar la transición de los mioblastos proliferantes hacia la diferenciación terminal (386). En condiciones fisiológicas ambos tienen una función pro-miogénica que, en el RMS, dada la elevada expresión de ambas (23), parece ausente. Interesantemente, se ha descrito un bucle de retroalimentación positiva entre CDO y MYOD, que explicaría la inhibición observada (399). No obstante, existen discrepancias sobre la inducción de la diferenciación en RMS y la modulación de expresión de los marcadores MYOD y MYOG (400,401), motivo por el cual las publicaciones más recientes priorizan el estudio de la actividad transcripcional de ambos marcadores frente al análisis de su expresión (402–404). En nuestro caso, el marcador más relevante que justifica la inducción de la diferenciación es la detección del SGCG, cuya expresión es exclusiva del músculo estriado maduro (323) y, por lo tanto, indetectable en las líneas celulares de RMS.

De nuevo, cabe resaltar la refractariedad de la línea RD. Esta línea, además de la elevada expresión de BOC y CDO comentada previamente, también posee una expresión diferencial de los marcadores miogénicos MYOD y MYOG respecto a las líneas de RMSa. Concretamente, la línea RD posee niveles más altos de MYOD y más bajos de MYOG. Estas divergencias evidencian la heterogeneidad entre los dos subtipos histológicos de RMS y podrían indicar un estadio de diferenciación más primitivo en la línea RD que en las líneas RH4 y RH30. Recientemente, K. Skrzypek et al. han propuesto la necesidad de aplicar diferentes requerimientos moleculares para inducir la diferenciación en las líneas celulares de RMS, en función de la etapa del proceso de diferenciación en el que se han originado los tumores de los que se derivan

DISCUSIÓN

(405). Este hecho, junto con el impase en la inhibición de CDO en esta línea, podría explicar el fallo en la inducción de la diferenciación.

6.5. El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en las capacidades de invasión y auto-renovación del RMS

El control de las capacidades invasivas y de auto-renovación de las células de RMS por la vía Hh ha sido previamente descrito. Por tanto, la reducción de ambos procesos tras el tratamiento con el compuesto SLT-0463 encaja con el fenotipo esperado tras la inhibición de la vía Hh en las líneas de RMS y difiere profundamente del efecto adverso descrito tras el tratamiento con vismodegib (ver apartado INTRODUCCIÓN 2.5.) (298,406). De manera interesante, a pesar de los pocos estudios publicados sobre CDO y cáncer, se ha relacionado el papel de este correceptor con la estimulación de la habilidad invasiva celular en cáncer de próstata (262).

La invasión y la auto-renovación celulares son aspectos claves necesarios en diferentes etapas del proceso metastásico. La metástasis constituye el evento tumoral que más amenaza la vida de los pacientes afectados de tumores sólidos (407). Por ello, aunque tenemos pendiente confirmar estos resultados mediante la realización de un modelo de metástasis *in vivo*, los indicios obtenidos *in vitro* son tremendamente esperanzadores y relevantes, desde un punto de vista clínico.

6.6. El efecto de la inhibición farmacológica de CDO mediante el compuesto SLT-0463 en el crecimiento tumoral *in vivo*

Finalmente, el estudio más decisivo realizado en la caracterización del compuesto SLT-0463 en este trabajo, es la confirmación de su capacidad antitumoral *in vivo*. Dado que los problemas de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad son las principales causas del fracaso de los compuestos experimentales en los ensayos clínicos (408), realizamos un pequeño estudio preliminar en colaboración con la plataforma de toxicología experimental (UTOX). A pesar de que los resultados de dicho

estudio no se muestran en este trabajo, fueron decisivos tanto para la confirmación de la aptitud del compuesto a nivel farmacocinético, como para el planteamiento metodológico de la prueba de eficacia *in vivo* del compuesto SLT-0463. Gracias a ellos, optimizamos el solvente, el modo y la pauta de administración. La reducción observada en el crecimiento tumoral *in vivo* de aproximadamente el 50% en los ratones tratados con el compuesto SLT-0463 frente a los tratados con el vehículo, así como la falta de toxicidad aguda observable, sugieren un elevado potencial terapéutico para este compuesto. No obstante, conscientes del reducido número de ratones empleados en el estudio, nos proponemos corroborar estos resultados con un nuevo estudio en el que aumentaremos tanto el número de ratones, como la dosis del compuesto SLT-0463.

En conclusión, el tratamiento con el compuesto SLT-0463, del mismo modo que la infraregulación genética de CDO, compromete drásticamente la progresión tumoral del RMS mediante la regulación de diversos procesos celulares (Ilustración 28). Concretamente, proponemos que la inhibición de CDO a través del compuesto SLT-0463 reduce la señalización Hh, provocando un arresto del ciclo celular que fuerza a las células de RMS a diferenciarse y, por lo tanto, perder sus capacidades de invasión y autorrenovación, o morir.

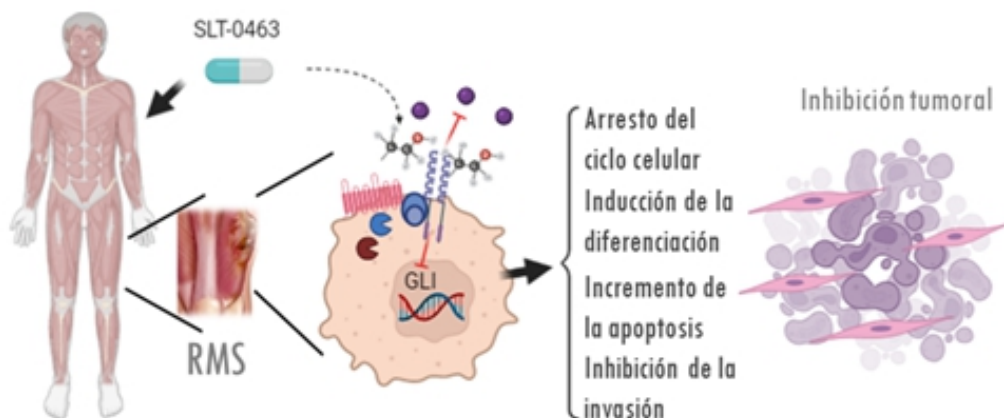


Ilustración 28. Propuesta del mecanismo antioncogénico del compuesto SLT-0463. La administración terapéutica del compuesto SLT-0463 impediría la progresión tumoral gracias a la inhibición específica de CDO y la consiguiente repercusión en los procesos celulares asociados: el ciclo, la diferenciación, la apoptosis y la invasión.

7. El potencial terapéutico de la inhibición de CDO en cáncer

La vía del desarrollo embrionario Hh contribuye al desarrollo de al menos un tercio de todos los tumores malignos (209,214). En concreto, según el tipo tumoral es capaz de actuar como iniciadora del tumor, promotora oncogénica y/o factor de resistencia al tratamiento (224). En consecuencia, su actividad aberrante está relacionada con una plétora de procesos tumorales en multitud de tipos de cáncer (218). De los tres posibles mecanismos de activación aberrante, sólo uno es ligando independiente y éste representa a una pequeña cantidad del total de neoplasias afectadas por la vía Hh (209,214,218), por lo que asumimos una alta implicación oncogénica de la señalización ligando-dependiente. No obstante, a pesar de la relevancia de la vía Hh en la biología tumoral y de los numerosos esfuerzos empleados (275), tan sólo existen 3 inhibidores de Hh aprobados por la EMA, el Vismodegib, el Sonidegib y el Glasdegib (276,277), todos ellos inhibidores de SMO. A pesar de las grandes esperanzas depositadas en estos inhibidores, los ensayos clínicos realizados sólo han demostrado eficacia en el carcinoma de células basales (BCC), el subtipo Hh del meduloblastoma y la leucemia mieloide aguda (276,280–282), fracasando en los tumores con una activación ligando-dependiente de la vía Hh. En los que, incluso se han detectado respuestas pro-tumorales (285–288). Del mismo modo que la indeseada respuesta del Vismodegib en la invasión tumoral del RMS reportada por nuestro grupo (298). Recientemente, Tom Curran ha compartido su opinión sobre el estrepitoso fracaso de los inhibidores de la vía Hh, culpando la influencia de un sesgo inconsciente, fundado en las altas expectativas antitumorales de estos inhibidores, que afectó al diseño experimental (270). No obstante, en nuestra opinión, el mayor culpable es el gran desconocimiento sobre el mecanismo de la vía y el papel de sus componentes. Especialmente, en el caso de los componentes redundantes, como es el caso de los 3 ligandos Hh, los 2 receptores Hh, los 3 correceptores Hh y los 3 factores de transcripción efectores finales de la vía. Precisamente, este motivo es el que confiere la novedad a nuestros resultados. A pesar de que la relación entre la vía Hh y el RMS se estableció a mediados de la década de los 90 (230,231), la preferencia de SHH frente a IHH y DHH, provocó

la inclusión del RMS en el grupo de tumores con una activación independiente de ligando hasta el año 2017, en el que nuestro grupo demostró la sobreexpresión de los ligandos alternativos, IHH y DHH y sus propiedades oncogénicas en esta neoplasia (298). Nuestra hipótesis, generada en base a este descubrimiento, se centró en el estudio de los correceptores Hh, cuyo papel en la activación ligando dependiente de la vía ha pasado inadvertido en virtud del receptor PTCH y la proteína transmembrana SMO. Asimismo, la confirmación del papel oncogénico de CDO en RMS ha manifestado la relevancia del factor de transcripción GLI más inexplorado, GLI3, cuyo papel en la oncogenicidad del RMS evaluaremos próximamente. En definitiva, los resultados de esta tesis enfatizan la importancia de la investigación básica en la calidad de la investigación traslacional.

Respecto a la posible toxicidad asociada a la nueva estrategia terapéutica propuesta, los inhibidores de la vía Hh Vismodegib y Sonidegib, muestran un perfil de toxicidad bajo similar en la población pediátrica y adulta. No obstante, los pacientes suelen experimentar al menos un evento adverso asociado a la inhibición de la vía Hh en el tejido normal, incluyendo alopecia, espasmos musculares, fatiga, vómitos, náuseas y disgeusia. Adicionalmente, se observó afectación en el desarrollo óseo de 3 pacientes prepúberes tratados con Sonidegib que requirieron la interrupción del tratamiento. Sin embargo, tales efectos no fueron observados tras el tratamiento con Vismodegib en pacientes pediátricos (409). Atendiendo a las presuntas funciones fisiológicas de CDO y a su perfil de expresión, hipotetizamos que la inhibición de la vía Hh mediante CDO no afectará a las células normales de un individuo desarrollado puesto que, en general, carecen de su expresión. Un resultado a favor de esta hipótesis es el seguimiento realizado en el peso de los ratones tratados diariamente con el compuesto SLT-0463, los cuales mantuvieron un aspecto saludable durante los 31 días de tratamiento. En nuestra opinión, las terapias dirigidas son la piedra angular de la medicina, pues nos permiten aumentar la especificidad de los tratamientos por las células cancerosas y, por lo tanto, reducir la toxicidad de las terapias convencionales.

DISCUSIÓN

Respecto a la aplicabilidad traslacional de nuestros resultados, remarcablemente, además de proponer una prometedora nueva diana molecular, hemos desarrollado y testado un nuevo compuesto que recapitula de manera específica los efectos de la inhibición genética de CDO. El compuesto SLT-0463 afecta a las principales señas de identidad del cáncer (Ilustración 29), las cuales soportan la progresión tumoral y, por lo tanto, han de ser el principal objetivo de las terapias antitumorales (410). Destacablemente, el compuesto es efectivo de manera excepcional en las dos líneas del subtipo de RMS más agresivo, el RMSa con translocación *PAX3-FOXO1*. Con el fin de aumentar la capacidad de predicción terapéutica entre los diferentes subtipos de RMS en la clínica, además de realizar los experimentos propuestos para explicar la refractariedad de la línea celular RD, ampliaremos el estudio de la inhibición de CDO a otras líneas celulares de RMS cuyos subtipos no han sido representados en nuestros experimentos como, por ejemplo, la línea CW9019 con translocación *PAX7-FOXO1*, la línea alveolar sin translocación RH18 y dos líneas de RMSe con niveles de expresión de CDO muy elevados o reducidos, RH36 y RUCH2, respectivamente.

Finalmente, la amplia ventana terapéutica de los inhibidores de la vía Hh incrementa el potencial traslacional de las terapias dirigidas contra CDO más allá del RMS. Muy probablemente, su implicación será específica en las neoplasias con activación de la vía ligando dependiente, especialmente en los cánceres de pulmón, páncreas y próstata, donde la implicación de CDO como protooncogén ha sido previamente descrita (262–264). En concordancia, otra de las fortalezas de este trabajo reside en la presumible aplicabilidad de la nueva estrategia terapéutica en los sarcomas óseos. A pesar de la escasa literatura, se ha descrito la relación de la vía Hh con propiedades oncogénicas en este tipo de sarcomas. Destacablemente, en el caso de los osteosarcomas (OS), se ha descrito la sobreexpresión de los ligandos Hh(326). Hallazgo que cumple con las características esperadas en los tumores sensibles a la inhibición de CDO. Adicionalmente, el análisis de expresión de CDO en los tumores de pacientes con sarcomas de Ewing (SE) es claramente indicador del papel oncogénico de CDO, dado que la expresión elevada de CDO en estos tumores se correlaciona con una

menor supervivencia. En efecto, la espectacular respuesta antiproliferativa observada *in vitro* en las líneas celulares de sarcomas óseos, reafirma nuestra teoría e impulsa la continuación de la caracterización del papel de CDO en estas neoplasias. Del mismo modo que los RMS, los SE y los OS son tumores con una alta incidencia en la edad pediátrica, con una supervivencia global tras 5 años del 60-70%, que decrece significativamente en el subgrupo de pacientes de alto riesgo hasta el 20-30%, a pesar de la agresividad de las terapias multimodales aplicadas (3,411). Por ello, el hallazgo de nuevas dianas moleculares y el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, como las propuestas en esta tesis doctoral, representan las esperanzas terapéuticas de estos pacientes.



Ilustración 29. Esquema representativo de la influencia del compuesto SLT-0463 en las ocho señales de identidad del cáncer. Imagen adaptada de Kumar V 2011. Píldora SLT-0463: inhibición, Interrogación: no estudiado.

CONCLUSIONES

Primera. Los compuestos peptidomiméticos desarrollados para inhibir la interacción entre los ligandos Hh y el receptor PTCH no modulan la vía Hh, ni reducen la proliferación de las células de RMS *in vitro*. Por lo tanto, descartamos esta estrategia terapéutica.

Segunda. Los correceptores CDO y BOC tienen una expresión preponderante en líneas celulares y tumores de RMS en comparación con los tejidos sanos de referencia. Especialmente, CDO es el correceptor más sobreexpresado en los dos subtipos histológicos analizados, siendo el subtipo embrionario el que presenta una mayor expresión de ambos correceptores.

Tercera. La depleción genética de BOC no tiene un efecto relevante en la proliferación de las células de RMS *in vitro*.

Cuarta. CDO es indispensable para el crecimiento y la viabilidad de las células de RMS *in vitro* e *in vivo*. Primordialmente, las líneas celulares más sensibles a la inhibición de CDO pertenecen al subtipo de RMSa con translocación *PAX3-FOXO1*.

Quinta. A nivel molecular, CDO regula los niveles de expresión del factor de transcripción de la vía Hh, GLI3. Asimismo, la inhibición de CDO modula la expresión de diferentes proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular.

Sexta. GLI3 es el efector de la vía Hh más expresado en tumores de RMS, sugiriendo su implicación en la oncogenicidad asociada a la desregulación de la vía Hh en esta neoplasia.

Séptima. El compuesto experimental SLT-0463, priorizado por su alta probabilidad de interacción con CDO, posee mayor potencia antiproliferativa que los inhibidores Hh de referencia, Vismodegib y Sonidegib.

Octava. El tratamiento con el compuesto SLT-0463 reduce los niveles de proteína de CDO y emula los efectos moleculares observados tras su depleción genética, confirmando la interacción específica entre el compuesto SLT-0463 y su diana, CDO.

CONCLUSIONES

Novena. La inhibición farmacológica de CDO compromete drásticamente la progresión tumoral del RMS *in vitro*. Concretamente, el SLT-0463 causa el arresto del ciclo celular, la inducción de la apoptosis, la diferenciación celular y la reducción de las capacidades invasivas de las células de RMS.

Décima. El tratamiento con el compuesto SLT-0463 reduce el crecimiento tumoral *in vivo* en modelos murinos ortotópicos de RMS.

Undécima. La expresión de CDO es un marcador de mal pronóstico en pacientes con SE. Adicionalmente, la inhibición farmacológica de CDO reduce la proliferación *in vitro* de células de SE y OS, confirmando la relevancia de CDO en los sarcomas óseos y ampliando el interés terapéutico del compuesto SLT-0463 en estas neoplasias.

Duodécima. CDO constituye una nueva diana molecular contra la vía Hh, inexplorada en la mayoría de los tumores con activación de esta vía. En consecuencia, la terapia basada en la inhibición de CDO se posiciona como una interesante estrategia terapéutica alternativa a los inhibidores de Hh existentes, actualmente frustrados en un amplio espectro de tumores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology*. 2017;
2. Ward ZJ, Yeh JM, Bhakta N, Frazier AL, Atun R. Estimating the total incidence of global childhood cancer: a simulation-based analysis. *The Lancet Oncology*. 2019;
3. Pardo Romaguera E, Muñoz López A, Valero Poveda S, Porta Cebolla S, Fernández-Delgado R, Barreda Reines M, et al. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2017. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP). Valencia; 2018.
4. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. International classification of childhood cancer, third edition. *Cancer*. 2005;103(7):1457–67.
5. Robinson LL (St. JCR, Hospital), Hudson MM (St. JCR, Hospital). Survivors of childhood and adolescent cancer: life-long risks and responsibilities. *Nature reviews cancer*. 2014;14(1):61–70.
6. Peris-Bonet R, Pardo Romaguera E, Muñoz López A, Sayas Sánchez N, Valero Poveda S. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980 - 2016. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP). Valencia; 2017.
7. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(9):685–94.
8. Gallego S. Sarcomas de partes blandas. In: Sánchez de Toledo J, Ortega J, editors. *Manual Práctico de Hematología y Oncología Pediátricas*. Madrid: Ergon; 2010. p. 303–8.
9. STOUT AP. Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles. *Annals of surgery*. 1946;123:447–72.

BIBLIOGRAFÍA

10. Weber CO, Virchow R. Anatomische Untersuchung einer hypertrophischen Zunge nebst Bemerkungen über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* [Internet]. 1854;7(1):115–25. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01936232>
11. Breitfeld PP, Meyer WH. Rhabdomyosarcoma: New Windows of Opportunity. *The Oncologist*. 2005;10(7):518–27.
12. Parham DM, Barr FG. Classification of Rhabdomyosarcoma and Its Molecular Basis. *Adv Anat Pathol*. 2013;20(6):387–97.
13. Horn RC, Enterline HT. Rhabdomyosarcoma: A clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer*. 1958;11(1):181–99.
14. Gonzalez-Crussi F, Black-Schaffer S. Rhabdomyosarcoma of infancy and childhood. Problems of morphologic classification. *Am J Surg Pathol*. 1979;3(2):157–71.
15. Rudzinski ER, Anderson JR, Hawkins DS, Stephen X, Parham DM, Teot LA. The World Health Organization Classification of Skeletal Muscle Tumors in Pediatric Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children’s Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(10):1281–7.
16. Hettmer S, Li Z, Billin AN, Barr FG, Cornelison D, Ehrlich AR, et al. Rhabdomyosarcoma: Current challenges and their implications for developing therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014;4(11):1–8.
17. Meyer WH, Cripe T p., Stevens MCG. Soft-Tissue Sarcomas. In: Carroll WL, Finlay JL, editors. *Cancer in Children and Adolescents*. Jones and Bartlett Publishers; 2010. p. 341–53.
18. Rudzinski ER, Teot LA, Anderson JR, Moore J, Ascp HT, Bridge JA, et al. Dense Pattern of Embryonal Rhabdomyosarcoma, a Lesion Easily Confused With

- Alveolar Rhabdomyosarcoma: A Report From the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. 2013;140(1):82–90.
19. Carroll SJ, Nodit L. Spindle cell rhabdomyosarcoma: A brief diagnostic review and differential diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2013;137(8):1155–8.
 20. Mentzel T, Katenkamp D. Sclerosing, pseudovascular rhabdomyosarcoma in adults. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of three cases. *Virchows Archiv*. 2000;436(4):305–11.
 21. Parham DM, Alaggio R, Coffin CM. Myogenic tumors in children and adolescents. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2012;15(SUPPL. 1):211–38.
 22. Furlong MA, Mentzel T, Fanburg-Smith JC. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: A clinicopathologic study of 38 cases with emphasis on morphologic variants and recent skeletal muscle-specific markers. *Modern Pathology*. 2001;14(6):595–603.
 23. Sebire NJ, Malone M. Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *Journal of Clinical Pathology*. 2003;56(6):412–6.
 24. Morotti RA, Nicol KK, Parham DM, Teot LA, Moore J, Hayes J, et al. An immunohistochemical algorithm to facilitate diagnosis and subtyping of rhabdomyosarcoma: The children's oncology group experience. *American Journal of Surgical Pathology*. 2006;30(8):962–8.
 25. Chiles MC, Parham DM, Qualman SJ, Teot LA, Bridge JA, Ullrich F, et al. Sclerosing rhabdomyosarcomas in children and adolescents: A clinicopathologic review of 13 cases from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group and Children's Oncology Group. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2004;7(6):583–94.

BIBLIOGRAFÍA

26. Agaram NP. Update on Myogenic Sarcomas. *Surgical Pathology Clinics* [Internet]. 2018;12(1):51–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.path.2018.10.003>
27. Kashi VP, Hatley ME, Galindo RL. Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems. 2015;15(7):426–39.
28. Parham DM, Alaggio R, Coffin CM. Myogenic tumors in children and adolescents. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2012;15(SUPPL. 1):211–38.
29. Hibbitts E, Chi YY, Hawkins DS, Barr FG, Bradley JA, Dasgupta R, et al. Refinement of risk stratification for childhood rhabdomyosarcoma using FOXO1 fusion status in addition to established clinical outcome predictors: A report from the Children’s Oncology Group. *Cancer Medicine*. 2019;8(14):6437–48.
30. Gallego S, Zanetti I, Orbach D, Ranchère D, Shipley J, Zin A, et al. Fusion status in patients with lymph node-positive (N1) alveolar rhabdomyosarcoma is a powerful predictor of prognosis: Experience of the European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group (EpSSG). *Cancer*. 2018;124(15):3201–9.
31. Skapek SX, Anderson J, Barr FG, Bridge JA, Gastier-Foster JM, Parham DM, et al. PAX-FOXO1 Fusion Status Drives Unfavorable Outcome for Children With Rhabdomyosarcoma: A Children’s Oncology Group Report. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(9):1411–7.
32. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, et al. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(13):2151–8.
33. Shern JF, Chen L, Chmielecki J, Wei JS, Patidar R, Rosenberg M, et al. Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of

- alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discov.* 2014;4(2):216–31.
34. Arnold MA, Barr FG. Molecular diagnostics in the management of rhabdomyosarcoma. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(2):189–94.
 35. Turc-Carel C, Lizard-Nacol S, Justrabo E, Favrot M, Philip T, Tabone E. Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 1986;19(3–4):361–2.
 36. Biegel JA, Meek RS, Parmiter AH, Conard K, Emanuel BS. Chromosomal translocation t(1;13)(p36;q14) in a case of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes and Cancer.* 1991;3(6):483–4.
 37. Barr FG, Galili N, Holick J, Biegel JA, Rovera G, Emanuel BS. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature genetics.* 1993;3(2):113–7.
 38. Davis RJ, D’Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. Fusion of PAX7 to FKHR by the Variant t(1;13)(p36;q14) Translocation in Rhabdomyosarcoma. *Cancer research.* 1994;54(11):2869–72.
 39. Link W. Introduction to FOXO Biology. In: Link W, editor. *FOXO Transcription Factors.* New York: Humana; 2019. p. 1–9.
 40. Xu M, Chen X, Chen D, Yu B, Huang Z. FoxO1: A novel insight into its molecular mechanisms in the regulation of skeletal muscle differentiation and fiber type specification. *Oncotarget.* 2017;8(6):10662–74.
 41. Bennicelli JL, Advani S, Schäfer BW, Barr FG. PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene.* 1999;18(30):4348–56.

BIBLIOGRAFÍA

42. Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2001;20(40 REV. ISS. 4):5736–46.
43. Buckingham M, Relaix F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2015;44:115–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.017>
44. Cao L, Yu Y, Bilke S, Walker RL, Mayeenuddin LH, Azorsa DO, et al. Genome-wide identification of PAX3-FKHR binding sites in rhabdomyosarcoma reveals candidate target genes important for development and cancer. *Cancer Research*. 2010;70(16):6497–508.
45. Davicioni E, Finckenstein FG, Shahbazian V, Buckley JD, Triche TJ, Anderson MJ. Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Research*. 2006;66(14):6936–46.
46. Naini S, Etheridge KT, Adam SJ, Qualman SJ, Bentley RC, Counter CM, et al. Defining the Cooperative Genetic Changes that Temporally Drive Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer research*. 2008;68(23):9583–8.
47. Gordon AT, Brinkschmidt C, Anderson J, Coleman N, Dockhorn-Dworniczak B, Pritchard-Jones K, et al. A novel and consistent amplicon at 13q31 associated with alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2000;28(2):220–6.
48. Reichel JL, Duan F, Smith LM, Gustafson DM, O'Connor RS, Zhang C, et al. Genomic and clinical analysis of amplification of the 13q31 chromosomal region in alveolar rhabdomyosarcoma: A report from the children's oncology group. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(6):1463–73.
49. Iolascon A, Faienza MF, Coppola B, Rosolen A, Basso G, della Ragione F, et al. Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and

- CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes and Cancer*. 1996;15(4):217–22.
50. Brinkschmidt C, Poremba C, Schäfer KL, Simon R, Jürgens H, Böcker W, et al. Evidence of genetic alterations in chromosome 11 in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*. 1998;82:210–4.
51. Shern JF, Yohe ME, Khan J. Pediatric rhabdomyosarcoma. *Crit Rev Oncog*. 2015;20(3–4):227–43.
52. Barr FG, Qualman SJ, Macris MH, Melnyk N, Lawlor ER, Strzelecki DM, et al. Genetic heterogeneity in the alveolar rhabdomyosarcoma subset without typical gene fusions. *Cancer Research*. 2002;62(16):4704–10.
53. Wachtel M, Dettling M, Koscielniak E, Stegmaier S, Treuner J, Simon-Klingenstein K, et al. Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Research*. 2004;64(16):5539–45.
54. Kelly KM, Womer RB, Sorensen PHB, Xiong QB, Barr FG. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1997;15(5):1831–6.
55. Sorensen PHB, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(11):2672–9.
56. Scrabble HJ, Wittet DP, Cavenee WK. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. 1987;12–4.
57. Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, Lynch JC, Qualman SJ, Shimada H, et al. Molecular Classification of Rhabdomyosarcoma — Genotypic and

BIBLIOGRAFÍA

- Phenotypic Determinants of Diagnosis A Report from the Children ' s Oncology Group. 2009;174(2):550–64.
58. Chen L, Shern JF, Wei JS, Yohe ME, Song YK, Hawkins DS, et al. Clonality and Evolutionary History of Rhabdomyosarcoma. 2015;(1):1–25.
59. Xia SJ, Pressey JG, Barr FG, Xia SJ, Pressey JG, Molecular FGB, et al. Molecular Pathogenesis of Rhabdomyosarcoma Molecular Pathogenesis of Rhabdomyosarcoma sc ot fo is tr ib ut. 2002;4047.
60. Rikhof B, Jong S de, Suurmeijer AJH, Meijer C, Graaf WTA van der. The insulin-like growth factor system and sarcomas. 2009;(November 2008):469–82.
61. Bridge JA, Liu J, Weibolt V, Baker KS, Perry D, Kruger R, et al. Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: An intergroup rhabdomyosarcoma study. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2000;27(4):337–44.
62. Paulson V, Chandler G, Rakheja D, Galindo RL, Wilson K, Amatruda JF, et al. High-Resolution Array CGH Identifies Common Mechanisms that Drive Embryonal Rhabdomyosarcoma Pathogenesis. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2011;50(6):397–408.
63. Stratton MR, Cooper CS, Gusterson BA, Fisher C. Detection of Point Mutations in N-ras and K-ras Genes of Human Embryonal Rhabdomyosarcomas Using Oligonucleotide Probes and the Polymerase Chain Reaction. *Cancer Research*. 1989;49(22):6324–7.
64. Zhang M, Linardic CM, Kirsch D. RAS and ROS in Rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*. 2013;24(6):689–91.
65. Shukla N, Ameer N, Yilmaz I, Nafa K, Lau C, Marchetti A, et al. Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of

- embryonal Rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(3):748–57.
66. Kohsaka S, Shukla N, Ameer N, Ito T, Ng CKY, Wang L, et al. A recurrent neomorphic mutation in MYOD1 defines a clinically aggressive subset of embryonal rhabdomyosarcoma associated with PI3K/AKT pathway mutations. 2014;46(6):595–600.
67. Sultan I, Ferrari A. Selecting multimodal therapy for rhabdomyosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2010;10(8):1285–301.
68. Taylor Vi JG, Cheuk AT, Tsang PS, Chung J, Song YK, Desai K, et al. Identification of FGFR4 -activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. 2009;119(11):3395–407.
69. Taylor AC, Shu L, Danks MK, Poquette CA, Shetty S, Thayer MSMJ, et al. p53 Mutation and MDM2 Amplification Frequency in Pediatric Rhabdomyosarcoma Tumors and Cell Lines. 2000;103(October 1999):96–103.
70. Lopez Serna N. Desarrollo de los músculos. In: *Biología del Desarrollo*. McGraw Hill; 2011.
71. Anderson J, Gordon A, Pritchard-jones K, Shipley J. and Rhabdomyosarcoma. 1999;285(April):275–85.
72. Bentzinger C, Wang Y, Rudnicki M. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;
73. Bryson-Richardson RJ, Currie PD. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(8):632–46.
74. Tiffin N, Williams RD, Shipley J, Pritchard-Jones K. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. *British Journal of Cancer*. 2003;89(2):327–32.

BIBLIOGRAFÍA

75. Yu PY, Guttridge DC. Dysregulated Myogenesis in Rhabdomyosarcoma [Internet]. 1st ed. Vol. 126, Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Inc.; 2018. 285–297. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.007>
76. Hettmer S, Wagers AJ. Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nature Medicine*. 2010;16(2):171–3.
77. Langenau DM, Keefe MD, Storer NY, Guyon JR, Kutok JL, Le X, et al. Effects of RAS on the genesis of embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes and Development*. 2007;21(11):1382–95.
78. Rubin BP, Nishijo K, Chen HH, Yi X, Schuetze DP, Pal R, et al. Evidence for an Unanticipated Relationship Between Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma and Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*. 2011;19(2):177–91.
79. Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Matushansky I, Ziman M. Alveolar rhabdomyosarcoma: Is the cell of origin a mesenchymal stem cell? *Cancer Letters* [Internet]. 2009;279(2):126–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.09.039>
80. Hatley ME, Tang W, Garcia MR, Finkelstein D, Millay DP, Liu N, et al. A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage. *Cancer cell* [Internet]. 2012 Oct 16;22(4):536–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079662>
81. Drummond CJ, Hanna JA, Garcia MR, Devine DJ, Heyrana AJ, Finkelstein D, et al. Hedgehog Pathway Drives Fusion-Negative Rhabdomyosarcoma Initiated From Non-myogenic Endothelial Progenitors. *Cancer cell* [Internet]. 2018 Jan 8;33(1):108-124.e5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29316425>

82. Gallego S. Sarcomas de partes blandas. Rbdomiosarcoma. In: Madero L, Lassaletta A, Sevilla J, Muñoz A, editors. Hematología y Oncología Pediátricas. 3rd ed. Madrid: Ergon; 2015. p. 633–9.
83. Sultan I, Qaddoumi I, Yaser S, Rodriguez-Galindo C, Ferrari A. Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: An analysis of 2,600 patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(20):3391–7.
84. Pastore G, Peris-Bonet R, Carli M, Martínez-García C, de Toledo JS, Steliarova-Foucher E, et al. Childhood soft tissue sarcomas incidence and survival in European children (1978-1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer*. 2006;42(13):2136–49.
85. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250(4985):1233–8.
86. Steenman M, Westerveld A, Mannens M. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: Common genetic pathways. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2000;28(1):1–13.
87. Hennekam RCM. Costello syndrome: An overview. *American Journal of Medical Genetics*. 2003;117C(1):42–8.
88. Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A. Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nature Medicine*. 1998;4(5):619–22.
89. Yang P, Grufferman S, Khoury MJ, Schwartz AG, Kowalski J, Ruymann FB, et al. Association of childhood rhabdomyosarcoma with neurofibromatosis type i and birth defects. *Genetic Epidemiology*. 1995;12(5):467–74.

BIBLIOGRAFÍA

90. Ruymann FB, Maddux HR, Ragab A, Soule EH, Palmer N, Beltangady M, et al. Congenital anomalies associated with rhabdomyosarcoma: An autopsy study of 115 cases. A report from the intergroup rhabdomyosarcoma study committee (representing the children's cancer study group, the pediatric oncology group, the United Kingdom children'. *Medical and Pediatric Oncology*. 1988;16(1):33–9.
91. Córdoba Rovira SM, Inarejos Clemente EJ. Rábdomiosarcoma infantil. *Radiologia* [Internet]. 2016;58(6):481–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rx.2016.09.003>
92. Grufferman S, Schwartz AG, Ruymann FB, Maurer HM. Parents' use of cocaine and marijuana and increased risk of rhabdomyosarcoma in their children. *Cancer Causes and Control*. 1993;4(3):217–24.
93. Grufferman S, Ruymann F, Ognjanovic S, Erhardt EB, Maurer HM. Prenatal X-ray exposure and rhabdomyosarcoma in children: A report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009;18(4):1271–6.
94. Lupo PJ, Zhou R, Skapek SX, Hawkins DS, Spector LG, Scheurer ME, et al. Allergies, atopy, immune-related factors and childhood rhabdomyosarcoma: A report from the children's oncology group. *International Journal of Cancer*. 2014;134(2):431–6.
95. Sankaran H, Danysh HE, Scheurer ME, Okcu MF, Skapek SX, Hawkins DS, et al. The Role of Childhood Infections and Immunizations on Childhood Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *Pediatric Blood & Cancer* [Internet]. 2016 Sep;63(9):1557–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pbc.26065>
96. Ognjanovic S, Carozza SE, Chow EJ, Fox EE, Horel S, McLaughlin CC, et al. Birth characteristics and the risk of childhood rhabdomyosarcoma based on

- histological subtype. *British Journal of Cancer* [Internet]. 2010;102(1):227–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605484>
97. Shrestha A, Ritz B, Ognjanovic S, Lombardi CA, Wilhelm M, Heck JE. Early life factors and risk of childhood rhabdomyosarcoma. *Frontiers in Public Health*. 2013;1(MAY):1–8.
 98. Grufferman S, Wang HH, DeLong ER, Kimm SY, Delzell ES, Falletta JM. Environmental Factors in the Etiology of Rhabdomyosarcoma in Childhood. *J Natl Cancer Inst*. 1982;68(1):107–13.
 99. Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: An Overview. *The Oncologist*. 1999;4(1):34–44.
 100. Dasgupta R, Rodeberg D, Rodeberg D. Author ' s Accepted Manuscript. 2016;25:276–83.
 101. Leaphart C, Rodeberg D. Pediatric Surgical Oncology: Management of Rhabdomyosarcoma. *Surgical Oncology*. 2007;16(3):173–85.
 102. Völker T, Denecke T, Steffen I, Misch D, Schönberger S, Plotkin M, et al. Positron emission tomography for staging of pediatric sarcoma patients: Results of a prospective multicenter trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(34):5435–41.
 103. Hawkins DS, Conrad EU, Butrynski JE, Schuetze SM, Eary JF. [F-18]-fluorodeoxy-D-glucose-positron emission tomography response is associated with outcome for extremity osteosarcoma in children and young adults. *Cancer*. 2009;115(15):3519–25.
 104. Skapek SX, Ferrari A, Gupta AA, Lupo PJ, Butler E, Shipley J, et al. Rhabdomyosarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1):14–6.
 105. Thway K, Wang J, Wren D, Dainton M, Gonzalez D, Swansbury J, et al. The comparative utility of fluorescence in situ hybridization and reverse

BIBLIOGRAFÍA

- transcription-polymerase chain reaction in the diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma. *Virchows Archiv*. 2015;467(2):217–24.
106. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(2):93–9.
107. Maurer HM, Crist W, Lawrence W, Ragab AH, Raney RB, Webber B, et al. The intergroup rhabdomyosarcoma study-I. A final report. *Cancer*. 1988;61(2):209–20.
108. Bergeron C, Jenney M, de Corti F, Gallego S, Merks H, Glosli H, et al. Embryonal rhabdomyosarcoma completely resected at diagnosis: The European paediatric Soft tissue sarcoma Study Group RMS2005 experience. *European Journal of Cancer*. 2021;146:21–9.
109. Jenney M. FaR-RMS: An Overarching Study for Children and Adults With Frontline and Relapsed RhabdoMyoSarcoma. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04625907>. 2020.
110. Carli M, Colombatti R, Oberlin O, Bisogno G, Treuner J, Koscielniak E, et al. European intergroup studies (MMT4-89 and MMT4-91) on childhood metastatic rhabdomyosarcoma: Final results and analysis of prognostic factors. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(23):4735–42.
111. Joshi D, Anderson JR, Paidas C, Breneman J, Parham DM, Crist W. Age Is an Independent Prognostic Factor in Rhabdomyosarcoma: A Report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children’s Oncology Group. *Pediatric Blood and Cancer*. 2004;42(1):64–73.
112. Chen C, Dorado Garcia H, Scheer M, Henssen AG. Current and Future Treatment Strategies for Rhabdomyosarcoma. *Frontiers in Oncology*. 2019;9(December):1–18.

113. Oberlin O, Rey A, Lyden E, Bisogno G, Stevens MCG, Meyer WH, et al. Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: Results of a pooled analysis from United States and European Cooperative Groups. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(14):2384–9.
114. Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM, Maurer HM. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1995;13(8):2123–39.
115. Davicioni E, Anderson JR, Buckley JD, Meyer WH, Triche TJ. Gene expression profiling for survival prediction in pediatric rhabdomyosarcomas: A report from the children’s oncology group. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(7):1240–6.
116. van Erp AEM, Versleijen-Jonkers YMH, van der Graaf WTA, Fleuren EDG. Targeted therapy-based combination treatment in rhabdomyosarcoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2018;17(7):1365–80.
117. Pal A, Chiu HY, Taneja R. Genetics, epigenetics and redox homeostasis in rhabdomyosarcoma: Emerging targets and therapeutics. *Redox Biology* [Internet]. 2019;25(November 2018):101124. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101124>
118. Nüsslein-volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*. 1980;287(5785):795–801.
119. Tabata T, Eaton S, Kornberg TB. The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes and Development*. 1992;6(12 B):2635–45.
120. Mohler J, Vani K. Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*. 1992 Aug;115(4):957–71.

BIBLIOGRAFÍA

121. Fietz MJ, Concordet JP, Barbosa R, Johnson R, Krauss S, McMahon AP, et al. The hedgehog gene family in *Drosophila* and vertebrate development. *Development*. 1994;120(SUPPL.):43–51.
122. Chang DT, López A, von Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, et al. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development (Cambridge, England)*. 1994 Nov;120(11):3339–53.
123. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. 1993;75(7):1431–44.
124. Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, et al. Cloning, Expression, and Chromosomal Location of SHH and IHH: Two Human Homologues of the *Drosophila* Segment Polarity Gene Hedgehog. *Genomics*. 1995;28(1):44–51.
125. Lum L, Beachy PA. The hedgehog response network: Sensors, switches, and routers. *Science*. 2004;304(5678):1755–9.
126. Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14(7):418–31.
127. Qi X, Li X. Mechanistic insights into the generation and transduction of Hedgehog Signaling. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(5):397–410.
128. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes and Development*. 2008;22(18):2454–72.
129. Ingham PW, Taylor AM, Nakano Y. Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature*. 1991;353(6340):184–7.

130. Lee JJ, von Kessler DP, Parks S, Beachy PA. Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell*. 1992;71(1):33–50.
131. Ingham PW. Hedgehog signalling. *Current Biology*. 2008;18(6):238–41.
132. Nakano Y, Guerrero I, Hidalgo A, Taylor A, Whittle JRS, Ingham PW. A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched. *Nature*. 1989;341(6242):508–13.
133. Alcedo J, Ayzenzon M, von Ohlen T, Noll M, Hooper JE. The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*. 1996;86(2):221–32.
134. Forbes AJ, Nakano Y, Taylor AM, Ingham PW. Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. *Development*. 1993;119(SUPPL.):115–24.
135. Hooper JE, Scott MP. Communicating with hedgehogs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(4):306–17.
136. Jia Y. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Arch Toxicol*. 2015;89(2):179–91.
137. Beachy PA, Hymowitz SG, Lazarus RA, Leahy DJ, Siebold C. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes and Development*. 2010;24(18):2001–12.
138. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993;75(7):1417–30.
139. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993;75(7):1401–16.

BIBLIOGRAFÍA

140. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling. *Current Topics in Developmental Biology*. 2003;53:1–114.
141. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes and Development*. 2001;15(23):3059–87.
142. Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science*. 1994;266(5190):1528–37.
143. Ryan KE, Chiang C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(22):17905–13.
144. Bürglin TR. The Hedgehog protein family. *Genome biology*. 2008;9(11):241.
145. Chen H, Liu Y, Li X. Structure of human Dispatched-1 provides insights into Hedgehog ligand biogenesis. *Life Science Alliance*. 2020;3(8):1–8.
146. Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, et al. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified Hedgehog from signaling cells. *Cell*. 1999;99(7):803–15.
147. Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, et al. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell*. 2002;111(1):63–75.
148. Katoh Y, Katoh M. Identification and characterization of DISP3 gene in silico. *International Journal of Oncology*. 2005;26:551–6.
149. Tukachinsky H, Kuzmickas RP, Jao CY, Liu J, Salic A. Dispatched and Scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified Hedgehog ligand. *Cell Rep*. 2012;2(2):308–20.

150. Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(4):199–219.
151. Goetz SC, Anderson K v. The Primary Cilium: A Signaling Center During Vertebrate Development. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5):331–44.
152. Bangs F, Anderson K v. Primary cilia and Mammalian Hedgehog signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2017;9(5):1–21.
153. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, et al. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature.* 1996;384(6605):129–34.
154. Jeong J, McMahon AP. Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development.* 2005;132(1):143–54.
155. Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP, Roelink H. Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered sonic hedgehog by patched-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000;97(22):12044–9.
156. Fleet AJ, Hamel PA. The protein-specific activities of the transmembrane modules of Ptch1 and Ptch2 are determined by their adjacent protein domains. *Journal of Biological Chemistry.* 2018;293(43):16583–95.
157. Gong X, Qian H, Cao P, Zhao X, Zhou Q, Lei J, et al. Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human Patched1. *Science.* 2018;361(6402).
158. Harvey MC, Fleet A, Okolowsky N, Hamel PA. Distinct effects of the mesenchymal dysplasia gene variant of murine patched-1 protein on canonical and non-canonical hedgehog signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry.* 2014;289(15):10939–49.

BIBLIOGRAFÍA

159. Kim J, Hsia EYC, Brigui A, Plessis A, Beachy PA, Zheng X. The role of ciliary trafficking in Hedgehog receptor signaling. *Science Signaling*. 2015;8(379):1–20.
160. Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, et al. Isolation and characterization of human Patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Human Molecular Genetics*. 1999;8(2):291–7.
161. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, et al. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(23):13630–4.
162. Motoyama J, Takabatake T, Takeshima K, Hui CC. Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nature Genetics*. 1998;18(2):104–6.
163. Zhulyn O, Nieuwenhuis E, Liu YC, Angers S, Hui C chung. Ptch2 shares overlapping functions with Ptch1 in Smo regulation and limb development. *Developmental Biology* [Internet]. 2015;397(2):191–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.10.023>
164. Alfaro AC, Roberts B, Kwong L, Bijlsma MF, Roelink H. Ptch2 mediates the Shh response in Ptch1^{-/-} cells. *Development (Cambridge)*. 2014;141(17):3331–9.
165. Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a hedgehog-binding protein. *Nature*. 1999;397(6720):617–21.
166. Holtz AM, Peterson KA, Nishi Y, Morin S, Song JY, Charron F, et al. Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 AND HHIP1 during neural patterning. *Development (Cambridge)*. 2013;140(16):3423–34.

167. Izzi L, Lévesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes BC, Mille F, et al. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell*. 2011;20(6):788–801.
168. Kang JS, Gao M, Feinleib JL, Cotter PD, Guadagno SN, Krauss RS. CDO: An oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *Journal of Cell Biology*. 1997;138(1):203–13.
169. Kang JS, Mulieri PJ, Hu Y, Taliana L, Krauss RS. BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *EMBO Journal*. 2002;21(1–2):114–24.
170. Kang JS, Zhang W, Krauss RS. Hedgehog signaling: cooking with Gas1. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. 2007;2007(403):1–4.
171. McLellan JS, Zheng X, Hauk G, Ghirlando R, Beachy PA, Leahy DJ. The mode of Hedgehog binding to Ihog homologs is not conserved across different phyla. *Nature*. 2008;455(7215):979–83.
172. Martinelli DC, Fan CM. Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes and Development*. 2007;21(10):1231–43.
173. Sanchez-Arrones L, Cardozo M, Nieto-Lopez F, Bovolenta P. Cdon and Boc: Two transmembrane proteins implicated in cell-cell communication. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* [Internet]. 2012;44(5):698–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.01.019>
174. Camp D, Currie K, Labbé A, van Meyel DJ, Charron F. Ihog and Boi are essential for Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Neural Development* [Internet]. 2010;5(1):28. Available from: <http://www.neuraldevelopment.com/content/5/1/28>

BIBLIOGRAFÍA

175. Allen BL, Tenzen T, McMahon AP. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes and Development*. 2007;21(10):1244–57.
176. Wang C, Wu H, Katritch V, Han GW, Huang XP, Liu W, et al. Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature*. 2013;497(7449):338–43.
177. Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, Scott MP. Hedgehog signal transduction by Smoothed: Pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(9):3196–201.
178. Myers BR, Sever N, Chong YC, Kim J, Belani JD, Rychnovsky S, et al. Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothed effector of signal response. *Developmental Cell* [Internet]. 2013;26(4):346–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.07.015>
179. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*. 2002;418(6900):892–7.
180. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP. Repression of smoothed by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biology*. 2006;4(8):1397–410.
181. Nedelcu D, Liu J, Xu Y, Jao C, Salic A. Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol*. 2013;9(9):557–64.
182. Wu F, Zhang Y, Sun B, McMahon AP, Wang Y. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell Chemical Biology* [Internet]. 2017;24(3):252–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.02.010>

183. Law KK lo, Makino S, Mo R, Zhang X, Puvindran V, Hui C chung. Antagonistic and Cooperative Actions of Kif7 and Sufu Define Graded Intracellular Gli Activities in Hedgehog Signaling. *PLoS ONE*. 2012;7(11):3–10.
184. Hsu SHC, Zhang X, Yu C, Li ZJ, Wunder JS, Hui CC, et al. Kif7 promotes hedgehog signaling in growth plate chondrocytes by restricting the inhibitory function of Sufu. *Development*. 2011;138(17):3791–801.
185. Stone DM, Murone M, Luoh SM, Ye W, Armanini MP, Gurney A, et al. Characterization of the human Suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *Journal of Cell Science*. 1999;112(23):4437–48.
186. Cheung HOL, Zhang X, Ribeiro A, Mo R, Makino S, Puvindran V, et al. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian Hedgehog signaling. *Science Signaling*. 2009;2(76):16–8.
187. Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B. The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature*. 1988;332(6162):371–4.
188. Alexandre C, Jacinto A, Ingham PW. Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the Cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes and Development*. 1996;10(16):2003–13.
189. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Molecular and Cellular Biology*. 1990;10(2):634–42.
190. Niewiadomski P, Niedziółka SM, Markiewicz Ł, Uspiński T, Baran B, Chojnowska K. Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells*. 2019;8(2):147.

BIBLIOGRAFÍA

191. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui CC, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: Implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*. 1999;126(17):3915–24.
192. Kong JH, Siebold C, Rohatgi R. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development (Cambridge)*. 2019;146(10).
193. Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HHQ, et al. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*. 1997;124(1):113–23.
194. Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nature Genetics*. 1998;20(1):54–7.
195. Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui CC, et al. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development*. 2000;127(8):1593–605.
196. Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*. 2002;129:4753–61.
197. Liu J, Zeng H, Liu A. The loss of Hh responsiveness by a non-ciliary Gli2 variant. *Development (Cambridge)*. 2015;142(9):1651–60.
198. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(9):3365–77.
199. Hui CC, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011;27:513–37.

200. Humke EW, Dorn K v., Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes and Development*. 2010;24(7):670–82.
201. Wilson CW, Chuang PT. Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development*. 2010;137(13):2079–94.
202. Atwood SX, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE. Gli activation by aPKC iota/lambda regulates basal cell carcinoma growth. 2013;494(7438):484–8.
203. Kaesler S, Luscher B, Ruther U. Transcriptional activity of GLI1 is negatively regulated by protein kinase A. *Biological Chemistry*. 2000;381(7):545–51.
204. Mao J, Maye P, Kogerman P, Tejedor FJ, Toftgard R, Xie W, et al. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2002;277(38):35156–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206743200>
205. di Marcotullio L, Greco A, Mazzà D, Canettieri G, Pietrosanti L, Infante P, et al. Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene*. 2011;30(1):65–76.
206. Lee EY, Ji H, Ouyang Z, Zhou B, Ma W, Vokes SA, et al. Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(21):9736–41.
207. Vokes S a, Ji H, Wong WH, McMahan AP. A genome-scale analysis of the. *Genes & Development*. 2008;2651–63.
208. Vokes SA, Ji H, McCuine S, Tenzen T, Giles S, Zhong S, et al. Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Development*. 2007;134(10):1977–89.

BIBLIOGRAFÍA

209. Teglund S, Toftgård R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* [Internet]. 2010;1805(2):181–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.003>
210. Sasai N, Toriyama M, Kondo T. Hedgehog Signal and Genetic Disorders. *Frontiers in Genetics*. 2019;10(November).
211. Gulino A, di Marcotullio L, Canettieri G, de Smaele E, Screpanti I. Hedgehog/Gli Control by Ubiquitination/Acetylation Interplay [Internet]. Vol. 88, *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc.; 2012. 211–227. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394622-5.00009-2>
212. Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene*. 2010;29(4):469–81.
213. McCleary-Wheeler AL. From normal development to disease: The biochemistry and regulation of GLI2. *Medical Epigenetics*. 2014;2(1):1–19.
214. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2018;18(1):8–20.
215. Lee RTH, Zhao Z, Ingham PW. Hedgehog signalling. *Development* (Cambridge). 2016;143(3):367–72.
216. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* [Internet]. 2010;18(18):6613–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.038>
217. Matisse MP, Wang H. Sonic Hedgehog Signaling in the Developing CNS. Where It Has Been and Where It Is Going [Internet]. 1st ed. Vol. 97, *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Inc.; 2011. 75–117. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385975-4.00010-3>

218. Doheny D, Manore SG, Wong GL, Lo HW. Hedgehog Signaling and Truncated GLI1 in Cancer. *Cells*. 2020;9(9).
219. Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, le Douarin NM, Mehlen P. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by Sonic hedgehog. *Science*. 2003;301(5634):843–6.
220. Mille F, Thibert C, Fombonne J, Rama N, Guix C, Hayashi H, et al. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nature Cell Biology*. 2009;11(6):739–46.
221. Brennan D, Chen X, Cheng L, Mahoney M, Riobo NA. Noncanonical Hedgehog Signaling. *Vitamins and Hormones*. 2012;88:55–72.
222. Pandit T, Ogden SK. Contributions of noncanonical smoothed signaling during embryonic development. *Journal of Developmental Biology*. 2017;5(4).
223. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog Signal Transduction Network. *Science Signaling*. 2012;5(246).
224. Gu D, Xie J. Non-canonical Hh signaling in cancer—Current understanding and future directions. *Cancers*. 2015;7(3):1684–98.
225. Matissek SJ, Elsawa SF. GLI3: A mediator of genetic diseases, development and cancer. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18(1):1–20.
226. Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical hedgehog signaling pathway in cancer: Activation of GLI transcription factors beyond smoothed. *Frontiers in Genetics*. 2019;10(JUN):1–20.
227. Pandolfi S, Stecca B. Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: Implications for cancer therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2015;17:1–36.

BIBLIOGRAFÍA

228. Li N, Truong S, Nouri M, Moore J, al Nakouzi N, Lubik AA, et al. Non-canonical activation of hedgehog in prostate cancer cells mediated by the interaction of transcriptionally active androgen receptor proteins with Gli3. *Oncogene*. 2018;37(17):2313–25.
229. Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang Z, Qin H. The relationship between early embryo development and tumourigenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(12):2697–701.
230. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996;85(6):841–51.
231. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich L v., Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996;272(5268):1668–71.
232. Sigafos AN, Paradise BD, Fernandez-Zapico ME. Hedgehog/GLI Signaling Pathway: Transduction, Regulation, and Implications for Disease. *Cancers*. 2021;13(3410).
233. Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, et al. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Research*. 1998;58(9):1798–803.
234. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui C chung, Mainprize TG, Zhang X, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature Genetics*. 2002;31(3):306–10.
235. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *British Journal of Dermatology*. 2005;152(1):43–51.

236. Northcott PA, Hielscher T, Dubuc A, MacK S, Shih D, Remke M, et al. Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathologica*. 2011;122(2):231–40.
237. Kool M, Jones DTW, Jäger N, Northcott PA, Pugh TJ, Hovestadt V, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. *Cancer Cell*. 2014;25(3):393–405.
238. Huq AJ, Walsh M, Rajagopalan B, Finlay M, Trainer AH, Bonnet F, et al. Mutations in SUFU and PTCH1 genes may cause different cutaneous cancer predisposition syndromes: similar, but not the same. *Familial Cancer* [Internet]. 2018;17(4):601–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-018-0073-7>
239. Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T, et al. Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene*. 2007;26(44):6442–7.
240. Roberts WM, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ, Look AT. Amplification of the gli Gene in Childhood Sarcomas. *Cancer Research*. 1989;49(19):5407–13.
241. Wasson JC, Saylor RL, Zeltzer P, Friedman HS, Bigner SH, Burger PC, et al. Oncogene Amplification in Pediatric Brain Tumors. *Cancer Research*. 1990;50(10):2987–90.
242. Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RCK, et al. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2005;24(26):4232–42.
243. Raju GP, Pham D. Hedgehog Inhibition as an Anti-Cancer Strategy [Internet]. 1st ed. Vol. 88, Vitamins and Hormones. Elsevier Inc.; 2012. 507–522. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394622-5.00023-7>

BIBLIOGRAFÍA

244. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314(5797):268–74.
245. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 2008;321(5897):1801–6.
246. Lascorz J, Försti A, Chen B, Buch S, Steinke V, Rahner N, et al. Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility. *Carcinogenesis*. 2010;31(9):1612–9.
247. Cao X, Geradts J, Dewhirst M, Lo HW. Upregulation of VEGF-A and CD24 Gene Expression by the tGLI1 Transcription Factor Contributes to the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. *Oncogene*. 2012;31(1):104–15.
248. Lo HW, Zhu H, Cao X, Aldrich A, Ali-Osman F. A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion. 2009;69(17):6790–8.
249. Tian H, Callahan CA, Dupree KJ, Darbonne WC, Ahn CP, Scales SJ, et al. Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4254–9.
250. Scales SJ, de Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009;30(6):303–12.
251. Johnson RW, Nguyen MP, Padalecki SS, Grubbs BG, Merkel AR, Oyajobi BO, et al. TGF- β promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. 2011;71(3):822–31.

252. Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, Chu GC, Hebrok M, Fernández-Zapico ME, et al. GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes and Development*. 2009;23(1):24–36.
253. Kumar V, Vashishta M, Kong L, Wu X, Lu JJ, Guha C, et al. The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9(April):1–24.
254. Pelullo M, Zema S, Nardoza F, Checquolo S, Screpanti I, Bellavia D. Wnt, Notch, and TGF- β pathways impinge on hedgehog signaling complexity: An open window on cancer. *Frontiers in Genetics*. 2019;10(JUL):1–16.
255. Niyaz M, Khan MS, Mudassar S. Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. *Translational Oncology* [Internet]. 2019;12(10):1334–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.07.004>
256. Fattahi S, Pilehchian Langroudi M, Akhavan-Niaki H. Hedgehog signaling pathway: Epigenetic regulation and role in disease and cancer development. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(8):5726–35.
257. Song Y, Tu J, Cheng Y, Zhou F, Liu P, Zhou S, et al. HHIP Overexpression Suppresses Human Gastric Cancer Progression and Metastasis by Reducing Its CpG Island Methylation. *Frontiers in Oncology*. 2020;10(December):1–7.
258. Zhao JG, Wang JF, Feng JF, Jin XY, Ye WL. HHIP overexpression inhibits the proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*. 2019;14(11):1–10.
259. Domínguez-Monzón G, Benítez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2009;27(4):305–13.

BIBLIOGRAFÍA

260. Mille F, Tamayo-Orrego L, Lévesque M, Remke M, Korshunov A, Cardin J, et al. The Shh receptor Boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors. *Developmental Cell*. 2014;31(1):34–47.
261. Lauth M, Toftgard R. Think inside the BOCs: A mechanism underlying medulloblastoma progression. *Developmental Cell* [Internet]. 2014;31(1):1–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.017>
262. Hayashi T, Oue N, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Sentani K, et al. Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the escherichia coli ampicillin secretion trap: Expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion. *Pathobiology*. 2011;78(5):277–84.
263. Leem YE, Ha HL, Bae JH, Baek KH, Kang JS. CDO, an Hh-Coreceptor, Mediates Lung Cancer Cell Proliferation and Tumorigenicity through Hedgehog Signaling. *PLoS ONE*. 2014;9(11).
264. Mathew E, Zhang Y, Holtz AM, Kane KT, Song JY, Allen BL, et al. Dosage-Dependent Regulation of Pancreatic Cancer Growth and Angiogenesis by Hedgehog Signaling. 2014;9(2):484–94.
265. Manzella G, W. Schäfer B. Interfering with Hedgehog Pathway: New Avenues for Targeted Therapy in Rhabdomyosarcoma. *Current Drug Targets*. 2016;17(11):1228–34.
266. Imle R, Kommos FKF, Banito A. Preclinical in vivo modeling of pediatric sarcoma—promises and limitations. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(8).
267. Gerber AN, Wilson CW, Li YJ, Chuang PT. The hedgehog regulated oncogenes Gli1 and Gli2 block myoblast differentiation by inhibiting MyoD-mediated transcriptional activation. *Oncogene*. 2007;26(8):1122–36.

268. Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, Thayer SP, Bronson RT, Rowitch D, et al. A Novel Somatic Mouse Model to Survey Tumorigenic Potential Applied to the Hedgehog Pathway. *Cancer research*. 2006;66(20):10171–8.
269. Rajurkar M, Huang H, Cotton JL, Brooks JK, Sicklick J, McMahon AP, et al. Hedgehog-Gli activation during rhabdomyosarcoma genesis in postnatal mice. *Oncogene*. 2014;33(46):5370–8.
270. Curran T. Reproducibility of academic preclinical translational research: Lessons from the development of Hedgehog pathway inhibitors to treat cancer. *Open Biology*. 2018;8(8).
271. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgård R, Undén AB. Deregulation of the hedgehog signalling pathway: A possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *Journal of Pathology*. 2006;208(1):17–25.
272. Bridge JA, Liu J, Qualman SJ, Suijkerbuijk R, Wenger G, Zhang J, et al. Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2002;33(3):310–21.
273. Calzada-Wack J, Schnitzbauer U, Walch A, Wurster KH, Kappler R, Nathrath M, et al. Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma. *Human mutation*. 2002;20(3):233–4.
274. Pressey JG, Anderson JR, Crossman DK, Lynch JC, Barr FG. Hedgehog pathway activity in pediatric embryonal rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma: A report from the Children’s Oncology Group. *Pediatric Blood and Cancer*. 2011;57(6):930–8.
275. Bonn-Breach R, Gu Y, Jenkins J, Fasan R, Wedekind J. Structure of Sonic Hedgehog protein in complex with zinc(II) and magnesium(II) reveals ion-

BIBLIOGRAFÍA

- coordination plasticity relevant to peptide drug design. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*. 2019;75(Ii):969–79.
276. European Medicines Agency [Internet]. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en>
277. Food and Drug Administration [Internet]. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <https://www.fda.gov/>
278. Chahal KK, Parle M, Abagyan R. Hedgehog pathway and smoothed inhibitors in cancer therapies. *Anti-Cancer Drugs*. 2018;29(5):387–401.
279. Guha M. Hedgehog inhibitor gets landmark skin cancer approval, but questions remain for wider potential. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012;11(4):257–8.
280. Axelson M, Liu K, Jiang X, He K, Wang J, Zhao H, et al. U.S. Food and Drug Administration approval: Vismodegib for recurrent, locally advanced, or metastatic basal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(9):2289–93.
281. Casey D, Demko S, Shord S, Zhao H, Chen H, He K, et al. FDA approval summary: Sonidegib for locally advanced basal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(10):2377–81.
282. Norsworthy KJ, By K, Subramaniam S, Zhuang L, del Valle PL, Przepiorka D, et al. FDA approval summary: Glasdegib for newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(20):6021–5.
283. Robinson GW, Orr BA, Wu G, Gururangan S, Lin T, Qaddoumi I, et al. Vismodegib exerts targeted efficacy against recurrent sonic hedgehog - Subgroup medulloblastoma: Results from phase II Pediatric Brain Tumor Consortium studies PBTC-025B and PBTC-032. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(24):2646–54.
284. Rodon J, Tawbi HA, Thomas AL, Stoller RG, Turtschi CP, Baselga J, et al. A phase I, multicenter, open-label, first-in-human, dose-escalation study of the oral

- smoothened inhibitor sonidegib (LDE225) in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(7):1900–9.
285. Berlin J, Bendell JC, Hart LL, Firdaus I, Gore I, Hermann RC, et al. A randomized phase II trial of vismodegib versus placebo with FOLFOX or FOLFIRI and bevacizumab in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(1):258–67.
286. de Jesus-Acosta A, Sugar EA, O'Dwyer PJ, Ramanathan RK, von Hoff DD, Rasheed Z, et al. Phase 2 study of vismodegib, a hedgehog inhibitor, combined with gemcitabine and nab-paclitaxel in patients with untreated metastatic pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* [Internet]. 2020;122(4):498–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-019-0683-3>
287. Kaye SB, Fehrenbacher L, Holloway R, Amit A, Karlan B, Slomovitz B, et al. A phase II, randomized, placebo-controlled study of vismodegib as maintenance therapy in patients with ovarian cancer in second or third complete remission. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(23):6509–18.
288. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Medicine*. 2013;19(11):1410–22.
289. Atwood SX, Sarin KY, Whitson RJ, Li JR, Kim G, Rezaee M, et al. Smoothened Variants Explain the Majority of Drug Resistance in Basal Cell Carcinoma. *Cancer Cell*. 2015;27(3):342–53.
290. Carpenter RL, Ray H. Efficacy and safety of sonic hedgehog pathway inhibitors in cancer. *Drug Safety*. 2020;42(2):263–79.
291. Michaud NR, Wang Y, McEachern KA, Jordan JJ, Mazzola AM, Hernandez A, et al. Novel neutralizing hedgehog antibody medi-5304 exhibits antitumor activity by inhibiting paracrine hedgehog signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(2):386–98.

BIBLIOGRAFÍA

292. Tolani B, Hoang NT, Acevedo LA, Leprieur EG, Li H, He B, et al. Preclinical characterization of therapeutic antibodies targeted at the carboxy-terminus of Sonic hedgehog. *Oncotarget*. 2018;9(18):14311–23.
293. Lauth M, Bergström Å, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(20):8455–60.
294. Infante P, Mori M, Alfonsi R, Ghirga F, Aiello F, Toscano S, et al. Gli1/ DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors . *The EMBO Journal*. 2015;34(2):200–17.
295. You M, Varona-Santos J, Singh S, Robbins DJ, Savaraj N, Nguyen DM. Targeting of the Hedgehog signal transduction pathway suppresses survival of malignant pleural mesothelioma cells in vitro. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [Internet]. 2014;147(1):508–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.08.035>
296. Lanza G. Fórmulas para el QT corregido y consideraciones clínicas. *Gaceta Médica de Caracas* [Internet]. 2008;116(3):224–34. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-47622008000300006&lng=es
297. Ridzewski R, Rettberg D, Dittmann K, Cuvelier N, Fulda S, Hahn H. Hedgehog inhibitors in rhabdomyosarcoma: A comparison of four compounds and responsiveness of four cell lines. *Frontiers in Oncology*. 2015;5(JUN):1–10.
298. Almazán-Moga A, Zarzosa P, Molist C, Velasco P, Pyczek J, Simon-Keller K, et al. Ligand-dependent hedgehog pathway activation in rhabdomyosarcoma: The oncogenic role of the ligands. *British Journal of Cancer*. 2017;117(9):1314–25.

299. Tostar U, Toftgård R, Zaphiropoulos PG, Shimokawa T. Reduction of human embryonal rhabdomyosarcoma tumor growth by inhibition of the hedgehog signaling pathway. *Genes and Cancer*. 2010;1(9):941–51.
300. Bachiashvili K, Horton JA, Damron TA. Hedgehog Pathway as the Target in Rhabdomyosarcoma with Gli1 Gene Amplification. ORS 2012 Annual Meeting [Internet]. 2012;37(0267). Available from: <https://www.ors.org/Transactions/58/0267.pdf>
301. Clinical Trials [Internet]. [cited 2021 Oct 15]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>
302. Moreno L, DuBois SG, Marshall L v., Fox E, Carceller F, Pearson AD. How to address challenges and opportunities in pediatric cancer drug development? Expert Opinion on Drug Discovery [Internet]. 2020;15(8):869–72. Available from: <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1767064>
303. Nishiwaki S, Ando Y. Gap between pediatric and adult approvals of molecular targeted drugs. *Scientific Reports* [Internet]. 2020;10(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73028-w>
304. Boklan J. Little patients, losing patience: Pediatric cancer drug development. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006;5(8):1905–8.
305. Barry E, Walsh JA, Weinrich SL, Beaupre D, Blasi E, Arenson DR, et al. Navigating the Regulatory Landscape to Develop Pediatric Oncology Drugs: Expert Opinion Recommendations. *Pediatric Drugs* [Internet]. 2021;23(4):381–94. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40272-021-00455-1>
306. Gallego S, Roma J. Embryonic Signaling Pathways as Potential Targets for the Treatment of Rhabdomyosarcoma. *Current Drug Targets*. 2016;17(11):1226–7.
307. Maris JM, Denny CT. Focus on embryonal malignancies. 2002;2(December):447–50.

BIBLIOGRAFÍA

308. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
309. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021 Aug 26;596(7873):583–9.
310. Kavran JM, Ward MD, Oladosu OO, Mulepati S, Leahy DJ. All mammalian hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Aug 6;285(32):24584–90.
311. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*. 2018 Jan 1;46(D1):D1074–82.
312. Perez JJ. Designing Peptidomimetics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2018;18(7):566–90.
313. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* [Internet]. 2021;596(7873):583–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
314. Kavran JM, Ward MD, Oladosu OO, Mulepati S, Leahy DJ. All mammalian hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(32):24584–90.
315. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(D1):D1074–82.

316. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(W1):W296–303.
317. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*. 2021;49(D1):D480–9.
318. Brooks WH, Guida WC, Daniel KG. The Significance of Chirality in Drug Design and Development. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(7):760–770.
319. Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW. ROLE OF pRB DEPHOSPHORYLATION IN CELL CYCLE REGULATION. *Frontiers in Bioscience*. 2000;5:121–37.
320. Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Progress in cell cycle research*. 1995;1:9–19.
321. Li B, Zhu HB, Song GD, Cheng JH, Li CZ, Zhang YZ, et al. Regulating the CCNB1 gene can affect cell proliferation and apoptosis in pituitary adenomas and activate epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncology Letters*. 2019;18(5):4651–8.
322. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation* [Internet]. 2015;22(4):526–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
323. Anastasi G, Cutroneo G, Sidoti A, Rinaldi C, Bruschetta D, Rizzo G, et al. Sarcoglycan subcomplex expression in normal human smooth muscle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2007;55(8):831–43.
324. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, et al. Ewing's Sarcoma Family of Tumors: Current Management. *The Oncologist*. 2006;11(5):503–19.

BIBLIOGRAFÍA

325. Lewis TB, Coffin CM, Bernard PS. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Modern Pathology*. 2007;20(3):397–404.
326. Lézot F, Corre I, Morice S, Rédini F, Verrecchia F. SHH Signaling Pathway Drives Pediatric Bone Sarcoma Progression. *Cells*. 2020;9(3):1–17.
327. Satheesha S, Manzella G, Bovay A, Casanova EA, Bode PK, Belle R, et al. Targeting hedgehog signaling reduces self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2016 Apr 21;35(16):2020–30.
328. Mabonga L, Kappo AP. Peptidomimetics: A Synthetic Tool for Inhibiting Protein–Protein Interactions in Cancer. Vol. 26, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. Springer; 2020. p. 225–41.
329. Larsson P, Engqvist H, Biermann J, Werner Rönnerman E, Forssell-Aronsson E, Kovács A, et al. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Scientific Reports*. 2020 Dec 1;10(1).
330. Scarcello E, Lambremont A, Vanbever R, Jacques PJ, Lison D. Mind your assays: Misleading cytotoxicity with the WST-1 assay in the presence of manganese. *PLoS ONE*. 2020 Apr 1;15(4).
331. Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009 Jan 15;234(2):222–35.
332. Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current challenges and opportunities in treating glioblastomas. *Pharmacological Reviews*. 2018 Jul 1;70(3):412–45.
333. Gibert B, Delloye-Bourgeois C, Gattolliat CH, Meurette O, le Guernevel S, Fombonne J, et al. Regulation by mir181 family of the dependence receptor

- CDON tumor suppressive activity in neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014 Nov 1;106(11).
334. Delloye-Bourgeois C, Gibert B, Rama N, Delcros JG, Gadot N, Scoazec JY, et al. Sonic Hedgehog Promotes Tumor Cell Survival by Inhibiting CDON Pro-Apoptotic Activity. *PLoS Biology*. 2013 Aug;11(8).
335. Wegorzewska M, Krauss RS, Kang JS. Overexpression of the immunoglobulin superfamily members CDO and BOC enhances differentiation of the human rhabdomyosarcoma cell line RD. *Molecular Carcinogenesis*. 2003 May 1;37(1):1–4.
336. Altered Gene Expression in Cancer [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 31]. Available from: <https://bio.libretexts.org/@go/page/13377>.
337. Shlomovitz I, Speir M, Gerlic M. Flipping the dogma - Phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. Vol. 17, *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd.; 2019.
338. Zhang W, Kang JS, Cole F, Yi MJ, Krauss RS. Cdo Functions at Multiple Points in the Sonic Hedgehog Pathway, and Cdo-Deficient Mice Accurately Model Human Holoprosencephaly. *Developmental Cell*. 2006 May;10(5):657–65.
339. Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Kessler D von, Nirenberg M, et al. Identification of Hedgehog Pathway Components by RNAi in *Drosophila* Cultured Cells [Internet]. Available from: www.sciencemag.org
340. Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, McMahon AP. The Cell Surface Membrane Proteins Cdo and Boc Are Components and Targets of the Hedgehog Signaling Pathway and Feedback Network in Mice. *Developmental Cell*. 2006 May;10(5):647–56.
341. Bae GU, Domené S, Roessler E, Schachter K, Kang JS, Muenke M, et al. Mutations in CDON, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly

BIBLIOGRAFÍA

- and defective interactions with other hedgehog receptors. *American Journal of Human Genetics*. 2011 Aug 12;89(2):231–40.
342. Klieser E, Swierczynski S, Mayr C, Jäger T, Schmidt J, Neureiter D, et al. Differential role of Hedgehog signaling in human pancreatic (patho-) physiology: An up to date review. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2016;7(2):199.
343. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer [Internet]. 2003. Available from: www.nature.com/nature
344. McGlinn E, van Bueren KL, Fiorenza S, Mo R, Poh AM, Forrest A, et al. Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development. *Mechanisms of Development*. 2005 Nov;122(11):1218–33.
345. Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog Promotes G 1 Cyclin Expression and Sustained Cell Cycle Progression in Mammalian Neuronal Precursors. Vol. 20. 2000.
346. Chen YJ, Sims-Mourtada J, Izzo J, Chao KSC. Targeting the hedgehog pathway to mitigate treatment resistance. Vol. 6, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2007. p. 1826–30.
347. Agathocleous M, Locker M, Harris WA, Perron M. A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. Vol. 6, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2007. p. 156–9.
348. Brennan D, Chen X, Cheng L, Mahoney M, Riobo NA. Noncanonical Hedgehog Signaling. In: *Vitamins and Hormones*. Academic Press Inc.; 2012. p. 55–72.
349. Kanda S, Mitsuyasu T, Nakao Y, Kawano S, Goto Y, Matsubara R, et al. Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma. *International Journal of Oncology*. 2013 Sep;43(3):695–702.

350. Song Z, Du Y, Tao Y. Blockade of sonic hedgehog signaling decreases viability and induces apoptosis in retinoblastoma cells: The key role of the Pi3K/Akt pathway. *Oncology Letters*. 2017;14(4):4099–105.
351. Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitkreutz BJ, Stark C, Willems A, et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Science*. 2021 Jan 1;30(1):187–200.
352. Watanabe M, Nakano K, Togano T, Nakashima M, Higashihara M, Kadin ME, et al. Targeted Repression of Overexpressed CD30 Downregulates NF- κ B and ERK1/2 Pathway in Hodgkin Lymphoma Cell Lines. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2011 Oct 1;19(10):463–9.
353. Duan J, Gao Y, Zhang X, Wang X, Wang B, Meng X, et al. CD30 ligand deficiency accelerates glioma progression by promoting the formation of tumor immune microenvironment. *International Immunopharmacology*. 2019 Jun 1;71:350–60.
354. Yamada S, Nomoto S, Fujii T, Takeda S, Kanazumi N, Sugimoto H, et al. Frequent Promoter Methylation of M-cadherin in Hepatocellular Carcinoma is Associated with Poor Prognosis. *ANTICANCER RESEARCH*. 2007;27(4B):2269–74.
355. Gao S, Zhao Z, Wu R, Wu L, Tian X, Zhang Z. microRNA-194 regulates cell viability and apoptosis by targeting CDH2 in prostatic cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2018;11:4837–44.
356. Guvakova MA, Prabakaran I, Wu Z, Hoffman DI, Huang Y, Tchou J, et al. CDH2/N-cadherin and early diagnosis of invasion in patients with ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2020 Sep 1;183(2):333–46.

BIBLIOGRAFÍA

357. Ma T, Zhao Y, Wei K, Yao G, Pan C, Liu B, et al. MicroRNA-124 functions as a tumor suppressor by regulating CDH2 and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016 Apr 1;38(4):1563–74.
358. Xia JH, Wei GH. Oncogenic regulatory circuits driven by 19q13 rs11672691 underlies prostate cancer aggressiveness. *Molecular and Cellular Oncology*. 2018 Nov 2;5(6).
359. Feng X, Zhang M, Meng J, Wang Y, Liu Y, Liang C, et al. Correlating transcriptional networks to papillary renal cell carcinoma survival: A large-scale coexpression analysis and clinical validation. *Oncology Research*. 2020;28(3):285–97.
360. Charrasse S, Comunale F, Gilbert E, Delattre O, Gauthier-Rouvière C. Variation in cadherins and catenins expression is linked to both proliferation and transformation of Rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2004 Mar 25;23(13):2420–30.
361. Thuault S, Hayashi S, Lagirand-Cantaloube J, Plutoni C, Comunale F, Delattre O, et al. P-cadherin is a direct PAX3-FOXO1A target involved in alveolar rhabdomyosarcoma aggressiveness. *Oncogene*. 2013 Apr 11;32(15):1876–87.
362. Wu H, Lu XX, Wang JR, Yang TY, Li XM, He XS, et al. TRAF6 inhibits colorectal cancer metastasis through regulating selective autophagic CTNNB1/ β -catenin degradation and is targeted for GSK3B/GSK3 β -mediated phosphorylation and degradation. *Autophagy*. 2019 Sep 2;15(9):1506–22.
363. Ye G, Yang Q, Lei X, Zhu X, Li F, He J, et al. Nuclear MYH9-induced CTNNB1 transcription, targeted by staurosporin, promotes gastric cancer cell anoikis resistance and metastasis. *Theranostics*. 2020;10(17):7545–60.
364. He S, Tang S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. Vol. 132, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2020.

365. Thiele S, Zimmer A, Göbel A, Rachner TD, Rother S, Fuessel S, et al. Role of WNT5A receptors FZD5 and RYK in prostate cancer cells [Internet]. Vol. 9, *Oncotarget*. 2018. Available from: www.oncotarget.com
366. Fu Y, Chen Y, Huang J, Cai Z, Wang Y, Ryk WY. RYK, a receptor of noncanonical Wnt ligand Wnt5a, is positively correlated with gastric cancer tumorigenesis and potential of liver metastasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2020;318:352–60. Available from: <http://www.ajpgi.org>
367. Katso RMT, Manek S, Ganjavi H, Biddolph S, Charnock MFL, Bradburn M, et al. Overexpression of H-Ryk in Epithelial Ovarian Cancer: Prognostic Significance of Receptor Expression 1. 2000.
368. 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. Vol. 2012, *Sarcoma*. 2012.
369. Giralt I, Gallo-oller G, Navarro N, Zarzosa P, Pons G, Magdaleno A, et al. Dickkopf-1 inhibition reactivates Wnt/ β -catenin signaling in rhabdomyosarcoma, induces myogenic markers in vitro and impairs tumor cell survival in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Dec 1;22(23).
370. Chiaretti S, Messina M, Foà R. BCR/ABL1-like acute lymphoblastic leukemia: How to diagnose and treat? Vol. 125, *Cancer*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 194–204.
371. Wang F, Hou W, Chitsike L, Xu Y, Bettler C, Perera A, et al. ABL1, Overexpressed in Hepatocellular Carcinomas, Regulates Expression of NOTCH1 and Promotes Development of Liver Tumors in Mice. *Gastroenterology*. 2020 Jul 1;159(1):289-305.e16.
372. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. Vol. 39, *American Journal of Clinical*

BIBLIOGRAFÍA

- Oncology: Cancer Clinical Trials. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 98–106.
373. Sho M, Nishiwada S, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, et al. Clinical Significance of CD155 Expression in Human Pancreatic Cancer.
374. Chiu DKC, Yuen VWH, Cheu JWS, Wei LL, Ting V, Fehlings M, et al. Hepatocellular Carcinoma Cells Up-regulate PVRL1, Stabilizing PVR and Inhibiting the Cytotoxic T-Cell Response via TIGIT to Mediate Tumor Resistance to PD1 Inhibitors in Mice. *Gastroenterology*. 2020 Aug 1;159(2):609–23.
375. Zibat A, Missiaglia E, Rosenberger A, Pritchard-Jones K, Shipley J, Hahn H, et al. Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2010 Dec 2;29(48):6323–30.
376. Li N, Truong S, Nouri M, Moore J, al Nakouzi N, Lubik AA, et al. Non-canonical activation of hedgehog in prostate cancer cells mediated by the interaction of transcriptionally active androgen receptor proteins with Gli3. *Oncogene*. 2018 Apr 1;37(17):2313–25.
377. Bai XY, Lin JY, Zhang XC, Xie Z, Yan HH, Chen ZH, et al. High expression of truncated GLI3 is associated with poor overall survival in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biomarkers*. 2013;13(1):37–47.
378. Steg A, Amm HM, Novak Z, Frost AR, Johnson MR. Gli3 mediates cell survival and sensitivity to cyclopamine in pancreatic cancer. *Cancer Biology and Therapy*. 2010 Nov 1;10(9):893–902.
379. Gashaw I, Ellinghaus P, Sommer A, Asadullah K. What makes a good drug target? Vol. 16, *Drug Discovery Today*. 2011. p. 1037–43.

380. Bae GU, Domené S, Roessler E, Schachter K, Kang JS, Muenke M, et al. Mutations in CDON, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *American Journal of Human Genetics*. 2011 Aug 12;89(2):231–40.
381. Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Rouba H, McElreavey K, Brauner R. A nonsense mutation in the hedgehog receptor CDON associated with pituitary stalk interruption syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016 Jan 1;101(1):12–5.
382. Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, et al. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Developmental Cell*. 2011 Jun 14;20(6):775–87.
383. Mulieri PJ, Okada A, Sassoon DA, McConnell SK, Krauss RS. Developmental Expression Pattern of the cdo Gene. 2000.
384. Samaras P, Schmidt T, Frejno M, Gessulat S, Reinecke M, Jarzab A, et al. ProteomicsDB: A multi-omics and multi-organism resource for life science research. *Nucleic Acids Research*. 2020 Jan 1;48(D1):D1153–63.
385. Cole F, Krauss RS. Microform Holoprosencephaly in Mice that Lack the Ig Superfamily Member Cdon. Vol. 13, *Current Biology*. 2003.
386. Cole F, Zhang W, Geyra A, Kang JS, Krauss RS. Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO. *Developmental Cell*. 2004 Dec;7(6):843–54.
387. Strovel J, Sittampalam S, Coussens N, Hughes M, Inglese J, Kurtz A, et al. Early Drug Discovery and Development Guidelines: For Academic Researchers, Collaborators, and Start-up Companies. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, A.I E, editors. *Assay Guidance Manual*. [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2016.

BIBLIOGRAFÍA

388. Remes-Troche JM, García García FD, Rojas-Loureiro G, Rivera-Gutiérrez X, Reyes-Huerta J, Amieva-Balmori M. Intra-gastric pH effect of 20 mg of levo-pantoprazole versus 40 mg of racemic pantoprazole the first seven days of treatment in patients with gastroesophageal reflux disease. *Revista de Gastroenterología de México* [Internet]. 2020;85(1):48–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.02.006>
389. Grobe K. Hedgehog Signaling in Chondrocytes. In: Grässel S, Aszódi A, editors. *Cartilage: Volume 1: Physiology and Development* [Internet]. ilustrada. Springer International Publishing; 2016. p. 215–29. Available from: <https://books.google.es/books?id=6z4GDAAAQBAJ>
390. Roy S, Ingham PW. Hedgehogs tryst with the cell cycle. Vol. 115, *Journal of Cell Science*. 2002. p. 4393–7.
391. Duan F, Lin M, Li C, Ding X, Qian G, Zhang H, et al. Effects of inhibition of hedgehog signaling on cell growth and migration of uveal melanoma cells. *Cancer Biology and Therapy*. 2014;15(5):544–59.
392. Chen YJ, Sims-Mourtada J, Izzo J, Chao KSC. Targeting the hedgehog pathway to mitigate treatment resistance. Vol. 6, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2007. p. 1826–30.
393. Deng H, Huang L, Liao Z, Liu M, Li Q, Xu R. Itraconazole inhibits the Hedgehog signaling pathway thereby inducing autophagy-mediated apoptosis of colon cancer cells. *Cell Death and Disease*. 2020 Jul 1;11(7).
394. Athar M, Li C, Tang X, Chi S, Zhang X, Kim AL, et al. Inhibition of Smoothed Signaling Prevents Ultraviolet B-Induced Basal Cell Carcinomas through Regulation of Fas Expression and Apoptosis. Vol. 64, *CANCER RESEARCH*. 2004.
395. Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, Majewski RR, Konicek BA, Nobrega MA, et al. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target

- genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Feb 15;277(7):5548–55.
396. Bissey PA, Mathot P, Guix C, Jasmin M, Goddard I, Costechareyre C, et al. Blocking SHH/Patched interaction triggers tumor growth inhibition through patched-induced apoptosis. *Cancer Research*. 2020 May 1;80(10):1970–80.
397. Fernando P, Megeney LA. Is caspase-dependent apoptosis only cell differentiation taken to the extreme? *The FASEB Journal*. 2007 Jan;21(1):8–17.
398. Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. Apoptosis Versus Cell Differentiation Role of Heat Shock Proteins HSP90, HSP70 and HSP27 [Internet]. Available from: <http://www.landesbioscience.com/journals/Prion/abstract.php?id=4059>
399. Kang JS, Mulieri PJ, Miller C, Sassoon DA, Krauss RS. CDO, a Robo-related cell surface protein that mediates myogenic differentiation. *Journal of Cell Biology*. 1998;143(2):403–13.
400. Thulasi R, Dias P, Houghton PJ, Houghton3 JA. Cell Growth & Differentiation a2a-Interleukin-induced Differentiation of Human Alveolar Rhabdomyosarcoma Cells: Correlation with Down-Regulation of the Insulin-like Growth Factor Type I Receptor'. Vol. 7. 1996.
401. Miekus K, Lukasiewicz E, Jarocho D, Sekula M, Drabik G, Majka M. The decreased metastatic potential of rhabdomyosarcoma cells obtained through MET receptor downregulation and the induction of differentiation. *Cell Death and Disease*. 2013 Jan;4(1).
402. Skrzypek K, Kusienicka A, Trzyna E, Szewczyk B, Ulman A, Konieczny P, et al. SNAIL is a key regulator of alveolar rhabdomyosarcoma tumor growth and differentiation through repression of MYF5 and MYOD function. *Cell Death and Disease*. 2018 Jun 1;9(6).

BIBLIOGRAFÍA

403. Liu Z, Zhang X, Lei H, Lam N, Carter S, Yockey O, et al. CASZ1 induces skeletal muscle and rhabdomyosarcoma differentiation through a feed-forward loop with MYOD and MYOG. *Nature Communications*. 2020 Dec 1;11(1).
404. Pomella S, Sreenivas P, Gryder BE, Wang L, Milewski D, Cassandri M, et al. Interaction between SNAI2 and MYOD enhances oncogenesis and suppresses differentiation in Fusion Negative Rhabdomyosarcoma. *Nature Communications*. 2021 Dec 1;12(1).
405. Skrzypek K, Adamek G, Kot M, Badyra B, Majka M. Progression and differentiation of alveolar rhabdomyosarcoma is regulated by PAX7 transcription factor—Significance of tumor subclones. *Cells*. 2021 Aug 1;10(8).
406. Ramadan F, Fahs A, Ghayad SE, Saab R. Signaling pathways in Rhabdomyosarcoma invasion and metastasis. Vol. 39, *Cancer and Metastasis Reviews*. Springer; 2020. p. 287–301.
407. Jiang WG, Ablin RJ. Cancer metastasis, challenges, progress and the opportunities. Vol. 3, *Frontiers in Bioscience*. 2011.
408. Ferreira LLG, Andricopulo AD. ADMET modeling approaches in drug discovery. Vol. 24, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2019. p. 1157–65.
409. Cortes JE, Gutzmer R, Kieran MW, Solomon JA. Hedgehog signaling inhibitors in solid and hematological cancers. Vol. 76, *Cancer Treatment Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2019. p. 41–50.
410. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74.
411. Hernandez Tejada FN, Zamudio A, Marques-Piubelli ML, Cuglievan B, Harrison D. Advances in the Management of Pediatric Sarcomas. Vol. 23, *Current Oncology Reports*. Springer; 2021.

412. Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T, Reifenberger G. Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Research*. 1997;57(13):2581–5.
413. Wang X de, Inzunza H, Chang H, Qi Z, Hu B, Malone D, et al. Mutations in the Hedgehog Pathway Genes SMO and PTCH1 in Human Gastric Tumors. *PLoS ONE*. 2013;8(1):1–8.
414. Burns MA, Liao ZW, Yamagata N, Pouliot GP, Stevenson KE, Neuberg DS, et al. Hedgehog pathway mutations drive oncogenic transformation in high-risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(10):2126–37.
415. Dagklis A, Pauwels D, Lahortiga I, Geerdens E, Bittoun E, Cauwelier B, et al. Hedgehog pathway mutations in t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(3):e102–5.
416. Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, et al. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Molecular Cancer*. 2004;3:1–13.
417. Liu X, Wang X, Du W, Chen L, Wang G, Cui Y, et al. Suppressor of fused (Sufu) represses Gli1 transcription and nuclear accumulation, inhibits glioma cell proliferation, invasion and vasculogenic mimicry, improving glioma chemosensitivity and prognosis. *Oncotarget*. 2014;5(22):11655–68.

ANEXO

1. Consentimiento informado pacientes

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN ESTUDIOS BIOLÓGICOS DE TUMORES MALIGNOS INFANTILES

El abajo firmante confirmo que, una vez informado verbalmente y leído el consentimiento informado, he tenido tiempo para valorar dicha información y para poder realizar las preguntas y aclaraciones pertinentes sobre el mismo.

Comprendo que la participación en el estudio es voluntaria y que soy libre de retirarme del mismo, o retirar a mi hijo del mismo sin necesidad de ofrecer una razón para ello y sin que los derechos médicos o legales que le pertenecen se vean afectados.

Comprendo que los datos médicos deben ser vigilados por los individuos responsables de este estudio y de todos los organismos autorizados relevantes para mi participación en este estudio y por lo tanto doy el permiso para que se tenga acceso a la información.

Estoy de acuerdo en participar en los estudios biológicos y

DOY NO DOY

mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra se almacene para utilizarla en otros estudios sobre factores relacionados con la enfermedad de mi hijo/a. Mis muestras se identificarán con un número codificado, y mi identidad se mantendrá en secreto. Las muestras obtenidas se almacenarán en el laboratorio de Investigación Traslacional del cáncer en la Infancia y la Adolescencia, y el responsable de las mismas será la Dra Soledad Gallego del Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas del Hospital Vall d'Hebron.

| | | |
|------------------------------|----------------|---|
| ----- Nombre del paciente | ----- Fecha | ----- Firma (si es mayor de 12 años) |
|------------------------------|----------------|---|

| | | |
|---------------------------------------|----------------|----------------|
| ----- Nombre del Padre/madre/tutor | ----- Fecha | ----- Firma |
|---------------------------------------|----------------|----------------|

| | | |
|---|----------------|----------------|
| ----- Testigo diferente del investigador | ----- Fecha | ----- Firma |
|---|----------------|----------------|

| | | |
|-----------------------|----------------|----------------|
| ----- Investigador | ----- Fecha | ----- Firma |
|-----------------------|----------------|----------------|

2. Publicaciones

Paralelamente a la realización de esta tesis doctoral, he podido contribuir en otros proyectos de interés científico, algunos de los cuales ya han sido publicados y se reflejan a continuación:

1. **Zarzosa P**, Navarro N, Giralt I, Molist C, Almazán-Moga A, Vidal I, Soriano A, Segura MF, Hladun R, Villanueva A, Roma J, Gallego S. Patient-derived xenografts for childhood solid tumors: a valuable tool to test new drugs and personalize treatments. *Clinical and translational oncology*. 2016;19(1):44-50. doi: 10.1007/s12094-016-1557-2. **Impact Factor (2021): 3.405**.
2. Almazán-Moga A, **Zarzosa P**, Vidal I, Molist C, Giralt I, Navarro N, Soriano A, Segura MF, Alfranca A, Garcia-Castro J, Sánchez de Toledo J, Roma J, Gallego S. Hedgehog Pathway Inhibition Hampers Sphere and Holoclone Formation in Rhabdomyosarcoma. *Stem Cells International*. 2017;2017:7507380. doi: 10.1155/2017/7507380. **Impact Factor (2021): 5.443**.
3. Almazán-Moga A, **Zarzosa P**, Molist C, Velasco P, Pyczek J, Simon-Keller K, Giralt I, Vidal I, Navarro N, Segura MF, Soriano A, Navarro S, Tirado OM, Ferreres JC, Santamaria A, Rota R, Hahn H, Sánchez de Toledo J, Roma J, Gallego S. Ligand-dependent hedgehog pathway activation in Rhabdomyosarcoma: The oncogenic role of the ligands. *British Journal of Cancer*. 2017;117(9):1314–25. doi: 10.1038/bjc.2017.305. **Impact Factor (2021): 7.640**.
4. Molist C¹, Navarro N¹, Giralt I, **Zarzosa P**, Gallo-Oller G, Pons G, Magdaleno A, Moreno L, Guillén G, Hladun R, Garrido M, Soriano A, Segura MF, Sánchez de Toledo J, Gallego S, Roma J. miRNA-7 and miRNA-324-5p regulate alpha9-Integrin expression and exert anti-oncogenic effects in rhabdomyosarcoma. *Cancer Letters*. 2020;477:49-59. doi: 10.1016/j.canlet.2020.02.035. **Impact Factor (2021): 8.679**.

5. Giralt I¹, Gallo-Oller G¹, Navarro N, **Zarzosa P**, Pons G, Magdaleno A, Segura MF, Sánchez de Toledo J, Moreno L, Gallego S, Roma J. Dickkopf Proteins and Their Role in Cancer: A Family of Wnt Antagonists with a Dual Role. **Pharmaceuticals**. 2021;14(8):810. doi: 10.3390/ph14080810. **Impact Factor (2021): 5.863**.
6. Giralt I¹, Gallo-Oller G¹, Navarro N, **Zarzosa P**, Pons G, Magdaleno A, Segura MF, Sábado C, Hladun R, Arango D, Sánchez de Toledo J, Moreno L, Gallego S, Roma J. Dickkopf-1 inhibition reactivates Wnt/ β -catenin signaling in rhabdomyosarcoma and promotes anti-oncogenic effects in vitro and in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021;22:12921. doi: 10.3390/ijms222312921. **Impact Factor (2021): 5.923**.
7. Navarro N¹, Molist C¹, **Zarzosa P**, Gallo-Oller G, Pons G, Magdaleno A, Guillén G, Hladun R, Garrido M, Segura MF, Hontecillas L, de Álava E, Ponsati B, Fernández-Carneado J, Almazán-Moga A, Vallès-Miret M, Farrera-Sinfreu J, Sánchez de Toledo J, Moreno L, Gallego S, Roma J. Alpha9-integrin emerges as a key therapeutic target to reduce metastasis in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma. Manuscrito en revisión en **The Journal of Experimental Medicine**. **Impact Factor (2021): 14.307**.

¹ Autores con misma contribución.

3. Patentes

El compuesto experimental desarrollado y caracterizado en esta tesis doctoral, denominado #463, ha sido patentado en Europa (1) y Estados Unidos (2):

1. Josep Roma Castanyer, Marta Pascual Gilabert, José Sánchez de Toledo Codina, Soledad Gallego Melcón, **Patricia Zarzosa Martínez**, Javier Alonso Fernández, Sergio Pérez Ozcáriz, Cristina López Gómez, Josep Castells Boliart. (2020) *Compounds for use in preventing or treating cancer*. EP3586847. European Patent Office.

ANEXO

2. Josep Roma Castanyer, Marta Pascual Gilabert, José Sánchez de Toledo Codina, Soledad Gallego Melcón, **Patricia Zarzosa Martínez**, Javier Alonso Fernández, Sergio Pérez Ozcáriz, Cristina López Gómez, Josep Castells Boliart. (2021) *Compounds for use in preventing or treating cancer*. US 2021/0230150. United States Patent and Trademark Office.

