



ASOCIACIÓN  
PABLO UGARTE  
contra el cáncer infantil



## INFORME ANUAL 2013 DE LA ACTIVIDAD INVESTIGADORA REALIZADA

**TÍTULO DEL PROYECTO: ESTUDIO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA NEUROBLASTOMAS CON DELECIÓN EN 11q**

**CENTRO DE EJECUCIÓN:** IIS LA FE. GICT. Oncología Pediátrica.  
Investigadores responsables: Dra. Adela Cañete. Dr. Jaime Font De Mora.

### INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma es el tumor extracraneal más frecuente en niños [1]. Pese a los avances quirúrgicos y terapéuticos, los neuroblastomas con amplificación del gen MYCN, con delección de la región cromosómica 11q o con índice de ploidía próximo a diploidía o tetraploidía siguen teniendo muy mal pronóstico [2]. Por tanto, el encontrar dianas terapéuticas eficaces para cualquiera de estas tres alteraciones genéticas sigue siendo prioritario en la lucha contra esta enfermedad.

La delección alélica en 11q23.3 se ha descrito como una alteración cromosómica muy frecuente en neuroblastomas de alto riesgo, correlacionándose inversamente con la amplificación de MYCN [3-5]. Un posterior análisis mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) reveló que las alteraciones cromosómicas en 11q, junto con 3p, 1p y amplificación de MYCN, permiten clasificar a los neuroblastomas en diferentes subgrupos [6]. En esta clasificación destacan las alteraciones en 11q y amplificación en MYCN por ser las más importantes como factores de mal pronóstico y de progresión de la enfermedad. Estos resultados sugieren que la región cromosómica 11q contiene genes supresores relevantes para controlar, de manera independiente a la amplificación de MYCN, la progresión tumoral del neuroblastoma. Alternativamente, también se ha descrito en 11q la expresión de proteínas híbridas con el factor de transcripción FOXR1, como consecuencia de pequeñas delecciones intersticiales de su gen y la fusión con otros genes próximos en el cromosoma [7].

La hipótesis de genes en 11q implicados en neuroblastoma ha dado pie a varios estudios relativos a las anomalías genéticas derivadas de la delección en esta región cromosómica. Así, el estudio del patrón de expresión de genes en neuroblastomas con y sin pérdida de 11q, ha revelado alteraciones en la



ASOCIACIÓN  
PABLO UGARTE  
contra el cáncer infantil



expresión de genes implicados en metabolismo, citoesqueleto y algunos otros desconocidos [8]. Sin embargo, ninguno de estos genes está ubicado en 11q. Además, estos resultados no pueden explicar la relevancia de la deleción de 11q en la evolución de los neuroblastomas. De hecho, las alteraciones en 11q están estrechamente correlacionadas con alto riesgo de relapso y metástasis [9].

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

La región 11q23.3 es una región muy rica en genes que está delecionada en el 33% de todos los neuroblastomas. De entre todos los genes contenidos en esta región cromosómica, creemos que el gen de la Ataxia Telangiectasia Mutado (ATM) es un gen primordial en el evento tumorigénico de estos neuroblastomas. ATM pertenece a una familia de genes implicados en la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad genómica. Al igual que ATM, los supresores tumorales BRCA1 y BRCA2 son también estabilizadores de la integridad cromosómica ya que están implicados en la reparación de roturas de doble cadena en el DNA mediante procesos de recombinación homóloga [10]. Las polimerasas de poli ADP-ribosa (PARP) también juegan un papel importante en la reparación del DNA, pero a diferencia de ATM y BRCA, PARP lo hace a través de un mecanismo que implica roturas de una sola hebra del DNA. Se ha demostrado que, en presencia de mutaciones inactivantes de BRCA, la inhibición farmacológica de PARP induce muerte celular. Este novedoso mecanismo se ha empleado como terapia en tumores que tienen mutaciones en BRCA, aumentando también la sensibilidad a otras terapias causantes de daño al DNA [11]. Creemos que la función reparadora del DNA de los genes ATM y BRCA, cuando es defectuosa, puede infligir en la célula cancerosa características similares, de modo que los inhibidores de PARP también podrían ser efectivos en neuroblastomas con alteraciones en 11q. Con todo ello, nuestra **hipótesis de trabajo** es que los neuroblastomas con deleción en 11q van a mostrar alta sensibilidad a quimioterapia y/o radioterapia cuando son previamente tratados con inhibidores de PARP.

## OBJETIVOS

Este proyecto se enmarca como un proyecto traslacional y de medicina personalizada por explorar el potencial beneficio de fármacos, actualmente usados en ensayos clínicos de tumores de adultos, en niños con



ASOCIACIÓN  
PABLO UGARTE  
contra el cáncer infantil



neuroblastoma que cumplan específicamente el tener deleciónado la región cromosómica 11q. El **objetivo fundamental** de este proyecto de investigación es el encontrar las pruebas experimentales suficientes que apoyen la terapia con inhibidores de PARP en neuroblastomas con deleción en 11q.

Los **objetivos específicos** del proyecto son:

1. Comprobar *in vitro* la eficacia de olaparib en neuroblastomas de alto riesgo que tienen deleción en 11q.
  - i) Análisis del tratamiento con olaparib en cultivos de líneas celulares establecidas.
  - ii) Análisis del tratamiento con olaparib en cultivos primarios procedentes de aspirados medulares de pacientes.
    - a) Cariotipado molecular de pacientes con neuroblastoma para detectar la deleción cromosómica en 11q.
    - b) Establecimiento de cultivos primarios a partir de los aspirados medulares.
2. Análisis por inmunotransferencia de la expresión de ATM y otros marcadores relevantes (DNA-PK, TP53, TP73, etc) en las líneas celulares y cultivos primarios de pacientes.
3. Análisis mediante citometría de flujo de la muerte celular controlada (apoptosis) y efectos sobre el ciclo celular inducidos por olaparib.
4. Estudio *in vivo* de la eficacia de los inhibidores de PARP xenografts de las líneas celulares y cultivos primarios de neuroblastoma en ratones SCID inmunodeprimidos.

## RESULTADOS GENERADOS DURANTE 2013

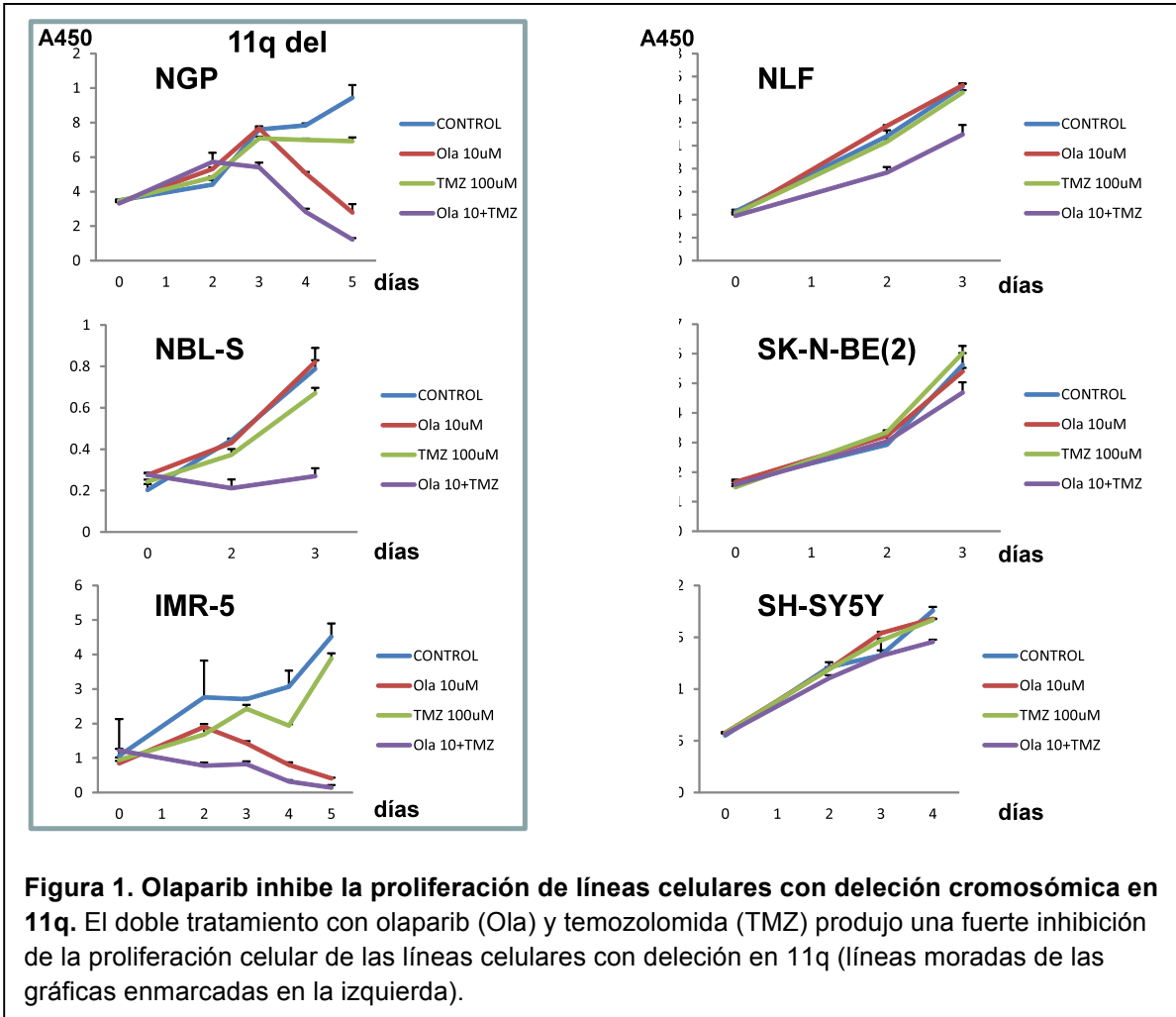
Durante el **primer año** hemos realizado el **objetivo 1** del proyecto. En la actualidad hay 6 fármacos inhibidores de PARP que están siendo estudiados en ensayos clínicos de cánceres de mama con mutaciones en BRCA1 o BRCA2 (ABT-888, AG014699, AZD2281 (olaparib), BSI-201, CEP-8983/CEP-9722, MK-4827). Hemos decidido emplear olaparib en nuestro proyecto de neuroblastoma por ser tanto un inhibidor de PARP1 como de PARP2, así como por tener una gran capacidad de inhibición (IC50= 5 nM PARP1; IC50= 1 nM PARP2). Durante los primeros meses del año hemos contactado con la compañía farmacéutica Astra Zeneca y les hemos presentado nuestro razonamiento científico para obtener de ellos olaparib.

Hemos obtenido 8 líneas celulares de neuroblastoma, 4 de ellas con deleción en 11q (NGP, NBL-S, IMR-5, SK-N-AS, NLF, SK-N-BE(2), SH-SY5Y,

LA-N-1). También hemos generado 4 cultivos primarios procedentes de pacientes con neuroblastoma, 2 de ellos con deleción en 11q (PACA, 840, 901, MOD). Hemos expandido cada uno de estos linajes celulares y los hemos preservado por congelación con objeto de poder disponer de ellos en el futuro.

En una primera fase del estudio *in vitro* tuvimos que poner a punto las condiciones y duración del tratamiento con olaparib. Cada línea celular se creció en 4 condiciones distintas y cada condición en triplicado: un control tratado solo con sulfóxido de dimetilo (DMSO, disolvente del olaparib y de la tomozolamida), un cultivo tratado con olaparib (1, 3 y 10  $\mu$ M), un cultivo tratado con temozolomida (TMZ, 100  $\mu$ M) y un cultivo tratado con olaparib y TMZ a las dosis indicadas. El grado de proliferación celular se determinó con la reacción colorimétrica XTT (Roche) durante 3-5 días, tiempo variable que dependió según el grado de tolerancia de cada línea celular a las condiciones del tratamiento. De las tres concentraciones de olaparib estudiadas, los resultados más significativos se obtuvieron con 10  $\mu$ M y se muestran a continuación en el presente informe.

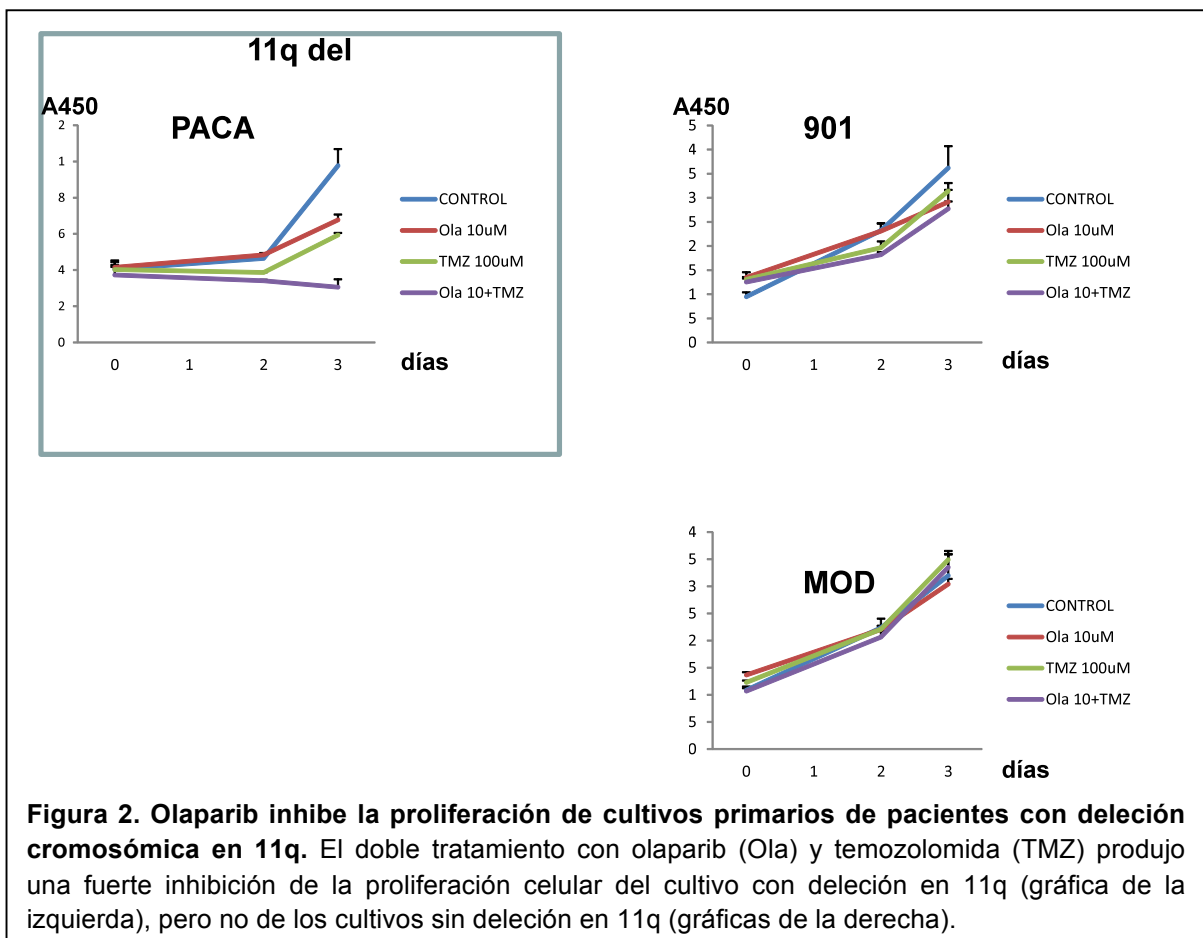
Hemos realizado el cariotipo molecular de los cuatro tumores cuyos cultivos primarios hemos establecido. Esto nos ha permitido confirmar la deleción de 11q en 2 de los 4 casos (PACA y 840) así como identificar las alteraciones segmentarias que los acompañan y el índice de ploidía, características que pudieran resultar importantes en la evaluación final de los resultados.



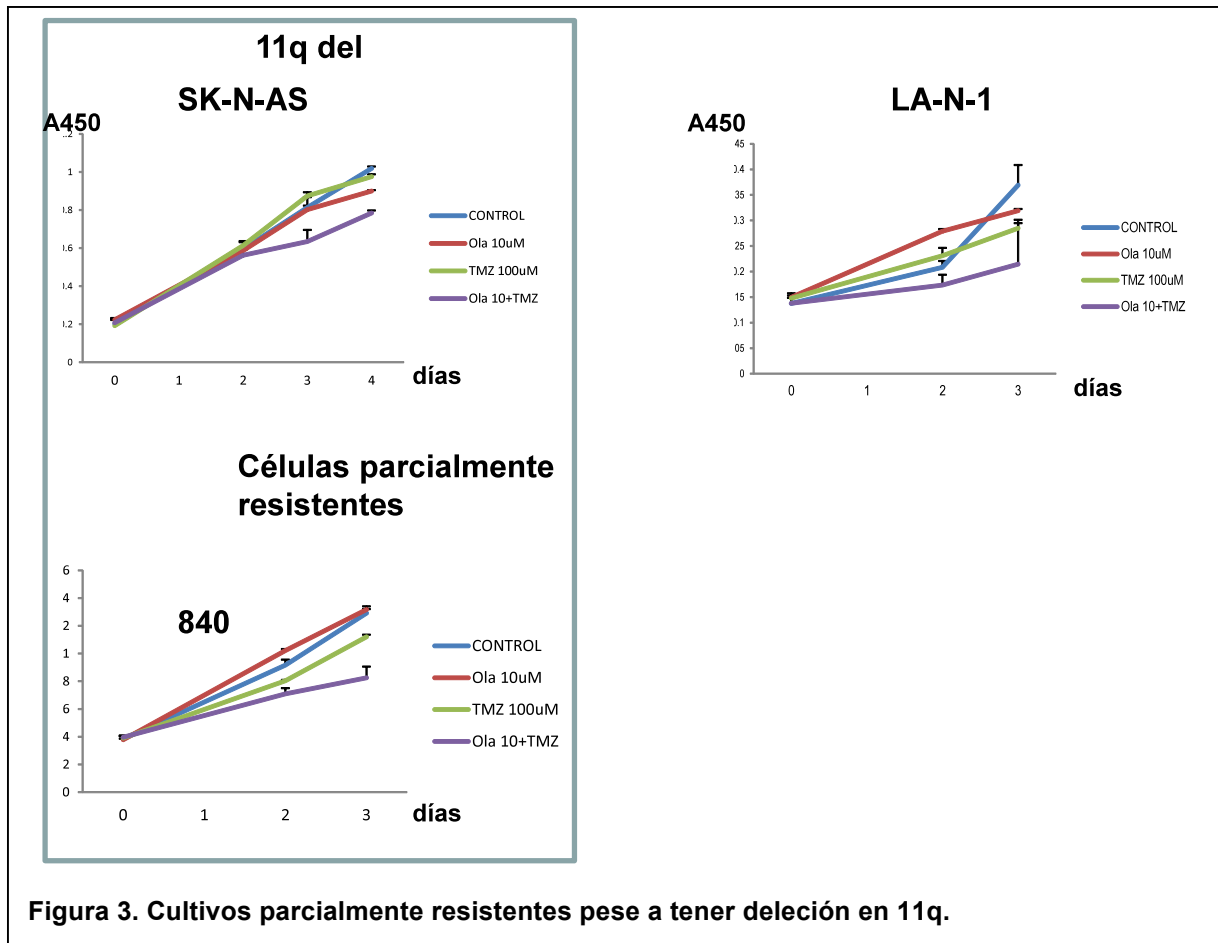
El tratamiento de las líneas celulares y cultivos primarios con sólo TMZ (líneas verdes, Figuras 1 y 2), no produjo inhibición significativa de la proliferación. Esta resistencia a TMZ puede explicarse por tratarse de cultivos procedentes de pacientes previamente tratados con TMZ u otras drogas que afectan a la integridad del DNA, de modo que los tumores han desarrollado mecanismos robustos de reparación del DNA. Sin embargo, el tratamiento concomitante de olaparib y TMZ resultó en una fuerte inhibición de la proliferación de las líneas celulares con deleción en 11q (comparar las líneas moradas vs. líneas azules control de la Figura 1, gráficas de la izquierda) pero apenas produjo cambios en la proliferación de las líneas celulares sin deleción (Figura 1, gráficas de la derecha). De igual modo, el cultivo primario PACA con deleción en 11q mostró alta sensibilidad al doble tratamiento (Figura 2, gráfica de la izquierda) pero los cultivos primarios sin deleción se mostraron resistentes (Figura 2, gráficas de la derecha). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis sobre la eficacia del tratamiento con olaparib y agentes que dañan el DNA. El tratamiento exclusivo con olaparib resultó parcialmente inhibitorio en la

línea NBL-S y en el cultivo primario PACA. Una posibilidad es que estas células expresan elevados niveles de transportadores multidroga, frecuentemente sobreexpresados en tumores agresivos. Alternativamente, también pueden tener niveles altos de expresión de PARP, haciéndoles más insensibles a la concentración usada de olaparib.

Aunque la mayoría de los cultivos celulares se comportaron según la

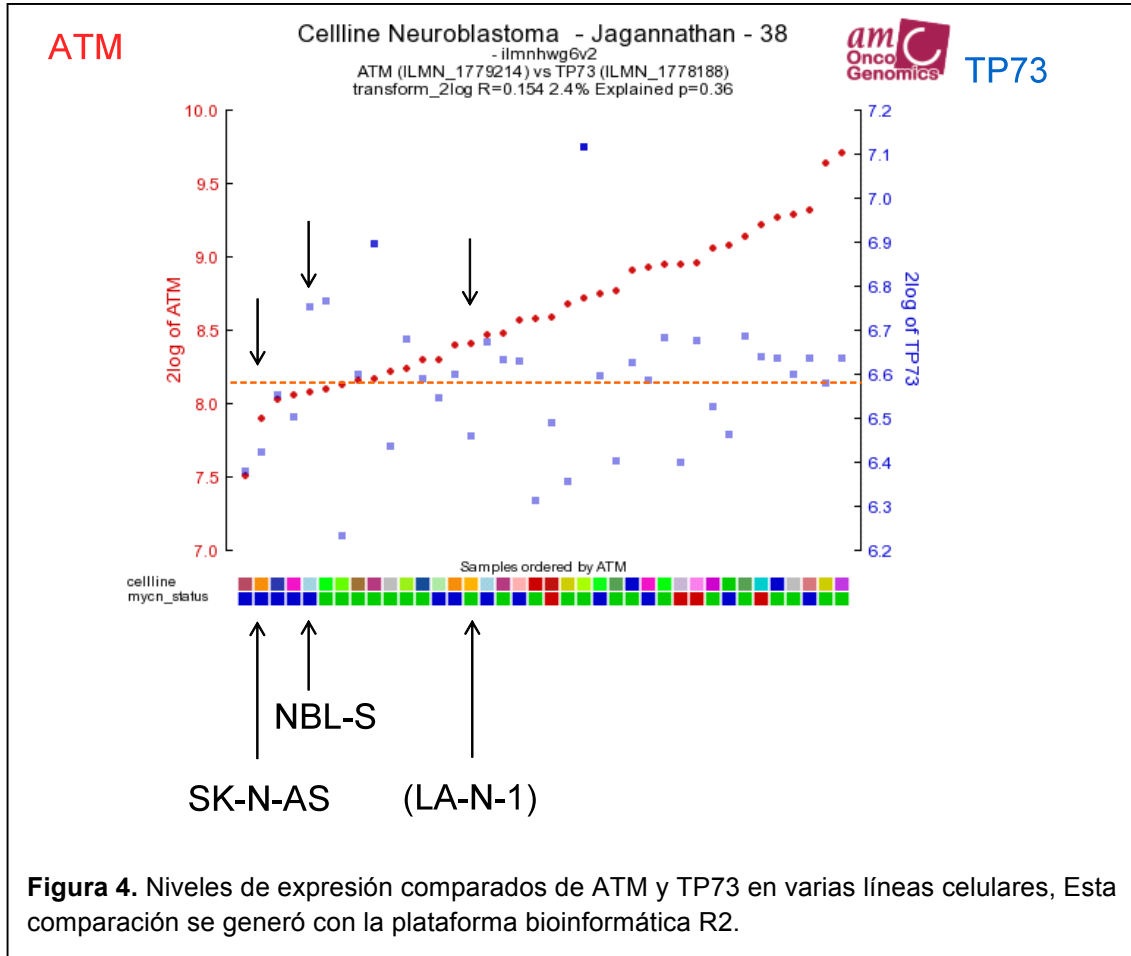


hipótesis prevista, la línea SK-N-AS y el cultivo primario 840 mostraron resistencia parcial al tratamiento con olaparib y TMZ, pese a tener delección de 11q (Figura 3, gráficas de la izquierda). Este es un resultado en cierta medida previsible, ya que es frecuente en cáncer que las rutas de muerte celular estén alteradas. Es decir, el motivo por el que estas células no se mueren con el tratamiento es porque su maquinaria de señalización de muerte está dañada.



Con objeto de identificar las alteraciones en la ruta de apoptosis que hacen que estos cultivos no respondan adecuadamente al tratamiento, hemos iniciado un estudio de expresión de genes mediante microarrays y su posterior confirmación mediante inmunotransferencia (objetivo 2). Los resultados preliminares sugieren que la insensibilidad al tratamiento con olaparib y TMZ es posiblemente debido a la pérdida de expresión de TP73, un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 1p. Por ejemplo, la línea celular NBL-S no expresa ATM por tener delección de 11q, pero sí expresa TP73 (Figura 4), permitiendo la apoptosis en presencia de olaparib y TMZ (Figura 1). Sin embargo, la línea celular SK-N-AS no expresa ni ATM ni TP73 (Figura 4), no pudiendo activar la ruta de apoptosis en presencia de los dos fármacos (Figura 3). La pérdida de heterocigosidad de 1p y la delección de 1p son eventos genéticos que ocurren frecuentemente en neuroblastomas y que también puede acontecer junto con la delección de 11q, dando lugar a su insensibilidad al doble tratamiento.

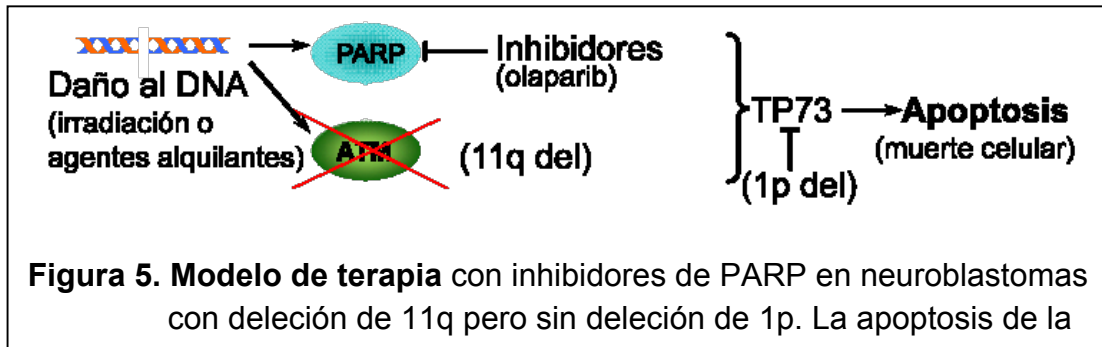




## CONCLUSIÓN

Las líneas celulares y cultivos primarios con delección en 11q son sensibles a olaparib en presencia de temozolomida si no tienen dañada la ruta de apoptosis, es decir, si expresan TP73. TP73 se encuentra localizado en la región cromosómica 1p, frecuentemente deleccionado o con pérdida de heterocigosidad en neuroblastomas. Por tanto, nuestra hipótesis actual de trabajo es que los neuroblastomas de alto riesgo con delección en 11q van a ser sensibles a la terapia conjunta de inhibidores de PARP y radioterapia o agentes alquilantes del DNA si no tienen deleccionado 1p (Figura 5).





## OBJETIVOS PARA 2014

Durante el **segundo año** nos proponemos realizar los **objetivos 2 y 3** y empezar con el **objetivo 4**, centrado en los experimentos *in vivo* con xenografts en ratones inmunodeprimidos. También queremos estudiar la función y requerimientos de TP73 en neuroblastomas sensibles a olaparib. Por ejemplo, la dependencia o no de otras proteínas implicadas en la reparación del DNA y de la apoptosis como DNA-PK, Chk1 y Chk2. Este estudio es altamente relevante para delimitar cuales son los requerimientos genéticos de cada tumor que le otorgaría sensibilidad o no a la terapia en estudio. De este modo, conociendo las características genéticas del tumor podríamos pronosticar si esta terapia sería la adecuada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Canete, A., et al., *Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience*. J Clin Oncol, 2009. **27**(7): p. 1014-9.
2. Mueller, S. and K.K. Matthay, *Neuroblastoma: biology and staging*. Curr Oncol Rep, 2009. **11**(6): p. 431-8.
3. Guo, C., et al., *Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas*. Med Pediatr Oncol, 2000. **35**(6): p. 544-6.
4. Guo, C., et al., *Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas*. Oncogene, 1999. **18**(35): p. 4948-57.
5. Vandesompele, J., et al., *Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there?* Med Pediatr Oncol, 2001. **36**(1): p. 5-10.
6. Spitz, R., et al., *FISH analyses for alterations in chromosomes 1, 2, 3, and 11 define high-risk groups in neuroblastoma*. Med Pediatr Oncol, 2003. **41**(1): p. 30-5.
7. Santo, E.E., et al., *Oncogenic activation of FOXR1 by 11q23 intrachromosomal deletion-fusions in neuroblastoma*. Oncogene, 2011.



ASOCIACIÓN  
PABLO UGARTE  
contra el cáncer infantil



8. McArdle, L., et al., *Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1599-609.
9. Spitz, R., et al., *Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3368-73.
10. Murphy, C.G. and M.E. Moynahan, *BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective*. Cancer J, 2010. **16**(1): p. 39-47.
11. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings*. Mol Oncol, 2011. **5**(4): p. 387-93.