



Universitat Autònoma de Barcelona

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:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

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:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA
HEDGEHOG EN EL RABDOMIOSARCOMA:
EL PAPEL ONCOGÉNICO DE LOS LIGANDOS**

Ana Almazán Moga

Universitat Autònoma de Barcelona

2016

Tesis doctoral

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA
HEDGEHOG EN EL RABDOMIOSARCOMA:
EL PAPEL ONCOGÉNICO DE LOS LIGANDOS**

Memoria presentada por

Ana Almazán Moga

Para optar al grado de

Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Tutor: Dr. José Ramón Bayascas Ramírez

Directores:

Dra. Soledad Gallego Melcón

Dr. Josep Roma Castanyer

Doctoranda: Ana Almazán Moga

Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

2016

[“No me vendas la moto que nos conocemos. Sé que tengo errores. Y sesgos cognitivos. Muchos sesgos cognitivos. Sé que soy débil delante de alguna realidad; pero déjame intentarlo. Ayúdame a no rechazar las oportunidades de refutar evidencias. No quiero basar mi existencia en la ilusión de comprobar hechos, solamente. Ayúdame a no caer en el pozo del dogma y las falsas creencias. Ayúdame a salir y vivir, dejando atrás la mentira. Ciencia, ayúdame.” –Dijo la neurona.]

Albert Baqué

Neurocápsula, 7 octubre 2014

El Periódico

A la memoria de J.J. Almazán López, mi padre.

A mi madre

A mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Dicen que de bien nacido es ser agradecido, y echando la vista atrás, recordando todos los momentos vividos a lo largo de estos últimos años, son muchas las personas a las que quiero darle las gracias.

Primeramente, agradecer al Dr. Josep Sánchez de Toledo, a la Dra. Soledad Gallego y al Dr. Josep Roma la oportunidad que me dieron de realizar la tesis en su grupo de investigación y su apoyo y ayuda a lo largo de estos años. Pero también quiero dar las gracias a las personas que hay detrás de estos cargos. Pepe, moltes gràcies pel teu suport incondicional, per apostar per mi quan més ho necessitava, un gest que mai oblidaré. Gràcies per la teva proximitat i per donar-nos l'oportunitat de viure moments especials, en els quals sempre has volgut comptar amb la nostra companyia. Sole, gracias por todo lo que aprendido a tu lado. Gracias por la confianza que siempre has depositado en mí y por hacer que siempre diera lo mejor de mí. Pep, encara recordo el primer dia que et vaig veure entrar a la universitat, qui m'havia de dir que series el meu director de tesi? Gràcies per confiar en mi des del primer dia, per fer-me sentir valorada i tenir sempre en compte la meva opinió, t'agraeixo molt que m'hagis ensenyat a portar les rendes del meu projecte i que m'hagis donat l'oportunitat de fer-ho. Gràcies per estar sempre disposat a ajudar-me, des de posar-te a fer *poiata* amb mi quan era *novata* a les hores escoltant les meves dèries i els meus dubtes, donant-me el teu punt de vista i consells. Gràcies pels farts de riure, gràcies per ser més que un *jefe*.

Gràcies Lide, Neus i germans Cuadro per acollir-me durant els meus primers mesos al lab fent les meves pràctiques d'estiu. Gràcies Toni per les visites i els cafès d'aquell estiu i pels bons moments al llarg d'aquests anys.

Una vez en el edificio Collserola (aprovecho para dar las gracias a la cuestecita por mantener en forma...) poco a poco fueron incorporándose todos mis compañeros de OP:

Isaac, el meu *iogu*, has estat pràcticament des dels inicis de la meva tesi. Ja saps que ben aviat vas aconseguir estovar-me i em vas conquistar amb el teu enginy. Moltes gràcies per tots els moments que hem compartit i per estar sempre disposat a ajudar-me. Ep ep ep se m'oblidava, gràcies per enriquir el meu vocabulari amb els teu termes i expressions com disgustos, celets, tot en ordre o ben vist. Molta sort amb la carrera i recorda que per molt que passi el temps, sempre seràs el meu *iogu*!

Carla, *my little pony*, gràcies per ser la meva deixeble, la meva companya, la meva mà dreta i, sobretot, la meva amiga. No m'imagino aquesta tesi sense tu. Gràcies pels nostres mano a mano a la *poiata*, a cultius i a l'estabulari, pel teu suport, per estar sempre disposada a ajudar-me, per les hores i hores parlant dels nostres experiments i resultats i per fer-me costat en els mals moments. Gràcies per fer agradable el dia a dia, pels riures, per les nostres històries i *cotilleos*, aah i pels nostres "assajos de proliferació". No te preu tenir una còmplice i confident com tu. Gràcies també pels grans moments viscuts fora del lab. En definitiva gràcies per fer veritat les paraules d'en Sabina: "Tenemos más de cien palabras, más de cien motivos para no cortarse de un tajo las venas, más de cien pupilas donde vernos vivos, más de cien mentiras que valen la pena".

Irina, la meva vespa, gràcies per ser l'alegria del lab, per ser la tercera pota del "nucli dur", per ser amiga. Gràcies per tots els bons moments que hem compartit dins i fora del lab. Gràcies pels "zum-zum de vespa" i pels moments al despatx, des del repàs de les fotos de l'Era dels dimarts fins a les nostres compres compulsives passant per tots

els nostres *cotilleos*. Gràcies per estar sempre disposada a ajudar-me o acompanyar-me quan t'ho demanava, pels teus "Almazancyto com vas?" i els teus *apretujones* al coll per animar-me. Gràcies també per les teves visites a Vic, apa que no ens ho hem passat bé, eh? Gràcies per confiar en mi, per tenir sempre en consideració la meva opinió i per les nostres confessions. Em sap greu no poder estar amb tu fins al final de la teva tesi però ja saps que tens a l'Almazancyto pel què necessitis.

Alba, mi prima mayor, gràcies pels mesos que vàrem compartir. Malgrat va ser poc temps, vàrem connectar molt ràpid i vàrem compartir molts bons moments. Gràcies per la teva innocència i bondat però també per la teva *xispa*. Gràcies per ser un exemple de superació. Molta sort en la teva nova etapa com a veterinària!

Patri, mi heredera de proyecto, gracias por tu energía, por nuestras conversaciones y risas en el metro. No nos ha dado tiempo a compartir muchos momentos fuera del lab, pero no olvidaré la celebración de mi cumple y el "hemos matado a Patri". Espero que los *hedgehogs* no lo consigan, tú sigue resistiendo. ¡Muchos ánimos con esta nueva etapa que acabas de empezar!

Natàlia, la última incorporació d'OP, molta sort i molts ànims per la tesi!

Pablo, gracias por tu alegría, por estar siempre de buen humor y por tu sonrisa pícara. Gracias por enseñarme a hacer las *inmunos* mientras compartíamos nuestras batallitas, creo que es de las veces que mejor me lo he pasado haciendo poyata. Gracias por tu apoyo y admiración, tus alabanzas después de las reuniones de grupo siempre me animaron. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme.

Anna, gràcies per venir a les reunions, per interessar-te i valorar sempre els nostres projectes.

Al año aproximadamente de iniciar la tesis, se formó OP2:

Miquel, moltes gràcies per transmetre'm la teva passió per la ciència i per estar sempre disposat a explicar-me aquelles tècniques noves per a mi i per resoldre el meus dubtes. Gràcies pels teus consells i per preocupar-te per mi. Gràcies pels farts de riure que m'he fet amb els teus comentaris jocosos i amb els teus atacs de riure.

Aroa, mi Aroa Aroa, gràcies per fer-me de *mami*, no per edat sino per ser tan *carinyosa*, per estar sempre pendent de com estava i pels teus *piropos*. Gràcies per saber escoltar i, sobretot, per tenir sempre un somriure als llavis. Gràcies pels bons moments que hem passat juntes explicant-nos els nostres *findes*. Desitjo molts èxits a la "cantautora Aroa Soriano" i espero continuar al corrent de tots ells!

Luz, gracias por tu alegría y espontaneidad. Gracias por todos los buenos momentos que hemos compartido. Gracias por conseguir que siempre acabara riendo con una de tus salidas. Gracias por hacer de ladrillito y de pequinés como nadie. Ya sabes que, aunque siempre me he hecho la dura contigo, eres mi maña preferida!

Laia, la meva Laiuski, gràcies per la teva innocència mesclada amb el teu *salero andalú* de "St Q" que et fan única. Gràcies per les nostres converses, confessions, riures i càntics a cultius, el teu hàbitat natural, sempre has fet que els "passes" fossin molt més amens. Gràcies també pel teu esperit *fiestero* amb el qual ens ho hem passat bomba en les farres OP i, com no, gràcies per ensenyar-me la tècnica coala.

Ariadna, desafortunadament no hem pogut compartir gaire temps, però gràcies per la bondat i tranquil·litat que desprens, s'agraeix dins del caos del laboratori.

Marc, gràcies per ser sempre tan rialler i per la teva espontaneïtat, no oblidaré les teves traduccions al català dels *hits* de l'estiu mentre fèiem cultius.

Carlos, molta sort i molts ànims per la tesi!

Gràcies família OP, he treballat molt i molt a gust amb vosaltres, heu fet que aquests anys hagin sigut meravellosos!

Quiero agradecer también a todos mis vecinos del VHIR:

Gràcies Maite i Maria Antonia pel temps que hem conviscut al mateix laboratori, per les converses a les taquilles i, sobretot, gràcies per ser tan atentes, per preocupar-vos sempre per com estava i com m'anava tot.

Gracias Rosanna por querer formar parte de mi comisión de seguimiento y tus consejos a lo largo de estos años. Gracias Vero por tu simpatía y por introducirme en la cultura murciana. Yolanda, gràcies per la teva alegria i per les nostres petades de xerrada i riures allà per on ens anàvem trobant. Carlos, gracias por tu ironía, por nuestros piques tan graciosos por el pasillo y por tus visitas al despacho. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme, por tus consejos y por preocuparte por mi (aí si en el fondo, muy en el fondo, eres un buenazo!).

Gràcies Anna Santamaria per la teva ajuda amb les ciclins. Gràcies Mireia per les comissions, gràcies per la teva alegria i *xispa*. Blanca, gràcies per tots els moments que hem compartit des de que les dues vàrem entrar al VHIR per fer les nostres pràctiques, apa que no n'hem passat de coses... aah i gràcies pels teus deliciosos brownies! Tati, la meva bruixa, ets la única persona a qui deixo que em digui *fea*. Mira que som diferents però vàrem connectar molt ràpid. Gràcies pels nostres riures i confessions, i pels teus "fit-fiu" quan em veies passar pel passadís que sempre em despertaven un somriure. Laura, gracias por tu dulzura y por ser tan buena gente. Lucía, Irene, Elena i Júlia,

gràcies pels nostres riures i paliqueos pels passadissos. Eli, gràcies per les nostres converses a la cua del bus i el nostres riures comentant la fauna i flora. Gabriel, gràcies per ser tan xinxeta i els nostres piques pel passadís. Gràcies també per les teves visites al despatx, aah i espero que després de tots els meus esforços t'hagi quedat clar que Vic és una ciutat, petita, però una ciutat. Christian, gracias por tus saludos y sonrisas por el pasillo y por estar siempre dispuesto a cederme tus horas reservadas en el estabulario.

Elena, mi canaria, gracias por tu alegría y buen humor. Gracias por hacerme reír, nadie imita tan bien mis andares por el pasillo como tú. Gracias por confiar en mí en tus momentos más difíciles. Seguimos teniendo pendiente unos bailoteos, eh? Gracias Mileidys por tu simpatía y por nuestras conversaciones en la cámara oscura.

Gràcies als Comella's pels bons moments a cultius. Especialment, gràcies als meus coetanis Jorge, Laura y Koen. Gracias Jorge por nuestros cafés, desde que te fuiste nadie me ha vuelto a llamar Lady Alma... Laura, gràcies per ser tan riallera i pels bons moments que hem passat juntes tan al VHIR com en els congressos que hem tingut l'oportunitat de coincidir. Koen gracias por tus excentricidades, por el buen rollo que desprendes y por lo mucho que me reído contigo.

Gràcies també als Villena's. Gràcies Jaime per les teves picades d'ullet. Rosi gracias por tu simpatía y por tu iniciativa, conjuntamente con Natalia, de organizar "l'amic invisible" para hacer que nos conociéramos todos un poco más. Gràcies Patri per l'alegria que desprendis i gràcies per preocupar-te sempre per com m'anava la tesi.

Quiero agradecer también el apoyo y la ayuda de todo el personal de coordinación, de limpieza y celadores del edificio Collserola por hacer más fácil el día a día. Gràcies Eulàlia i Rosa per escoltar les nostres queixes i problemes i posar-hi sempre remei.

Gràcies Rai, Pili, Tao i Xavi per gestionar els nostres paquets. Gracias Rai por ser tan manitas y por ayudarme siempre que lo necesitaba, eres imprescindible en el VHIR! Núria gràcies per la teva simpatia i la teva eficiència. Radgira gracias por tus “hola guapa”, por tu sonrisa y amabilidad y por nuestras conversaciones de pasillo.

Y bajando del edificio Collserola:

Gràcies Edu i Jordi Romero pel vostre esperit de Peter Pan.

Gràcies a tot el personal de la UAT per la seva ajuda. Gràcies Paqui, Àlex, Ricardo, les Roses i Irene. Amb tu Irene he après molt més que citometria. Gràcies pels nostres riures, converses i confessions mentre passàvem les mostres. Gràcies pels teus consells i per donar-me un altre punt de vista de les coses.

Gràcies Jordi Temprana per ser el meu patòleg de capçalera. Gràcies per estar sempre disposat a ajudar-me i a resoldre els meus dubtes. Però sobretot gràcies per tots els “dia bo” i per les nostres converses.

Meri, mi *alter ego*, gràcies per la teva amistat. Gràcies per la teva alegria i el teu *salero*. Gràcies pels mil moments que hem compartit, pels *door to door* amb els quals m’has regalat moltes hores de la meva vida (com podíem parlar tant i partir-nos de riure a les 6 del matí?), pels viatges amb Sagalés tant quan coincidíem com quan ens fèiem companyia via *whats*, per les birres, sopars i esmorzars, per les nits a Barcelona, moments tots ells plens d’anècdotes, records, confessions, riures, refranys i *gracejo andaluz*. Xevi, àlies “Xevi de pàdel”, has sigut un gran descobriment. Llàstima que vàrem coincidir poc temps fent la va-i-bé. Gràcies per tots els *afterworks* i sopars plens

de riures i converses en les que sempre he après coses i m'has regalat frases que sovint cito. Gràcies als dos per cuidar-me tant!

Para la realización de esta tesis también ha sido imprescindible el apoyo de mis amigos y familia:

Gracias Lucía Fernández por ser imprescindible en Pultusk, no sé qué hubiera hecho sin ti. Gracias por la amistad que nos une desde entonces a pesar de la distancia.

Gràcies Adri, Aina i Marc, el meu *gerupi*, per tot el que hem viscut al llarg d'aquests 10 anys... Gràcies per la vostra amistat sincera que roman malgrat la distància. Gràcies pels vostres missatges, pel vostre suport i les vostres visites a Vic, és genial comprovar que quan ens veiem sembla que no hagi passat el temps.

Núria, la meva Gavilana, gràcies per ser vital al llarg d'aquests anys. Gràcies per estar al meu costat tant en els bons com en els mals moments. Gràcies per les nostres teràpies al Manubri (aprofito per donar les gràcies a la família Manubri per fer-nos sentir sempre com a casa) i com no a l'Era, gràcies per les mil aventures viscudes. Gràcies per la teva alegria, la teva innocència, la teva tendresa i el teu suport incondicional. Gràcies per donar-li sentit a la paraula amiga. Permet-me que recorri a la lletra dels Catarres, ells varen resumir millor que jo la nostra amistat: "Junts cavalcant per mil deserts com *bandidus* a l'oest, descobrint nous continents tot fent història. Com si fóssim Bonnie and Clyde o un parell de samurais no ens farem enrere mai fidels al repte. Amb tu no hi ha dues nits iguals, no hi ha dubtes ni temors, no hi ha principis ni finals. Invencibles!".

Gràcies Peke i Marta per la vostra amistat, pels vostres bons dies i bones nits, pels vostres missatges inspiradors i d'ànims, per obrir-me les portes de casa vostra i pels sopars tan espectaculars fets amb tan *carinyo* i acompanyats d'interessants converses, *cotilleos* i riures.

Diuen que *quien tiene un amigo, tiene un tesoro*; gràcies a tots vosaltres per fer-me tan rica!

Gracias familia (desde mi tía, primos, tíos abuelos y tíos y primos segundos, que honor tener una familia tan unida) por vuestro apoyo incondicional, por estar siempre a nuestro lado en los malos momentos, por compartir nuestras alegrías y por valorarme tanto. En especial quiero dar las gracias a mi tía Isabel. Tía, gracias por estar siempre tan cerca a pesar de la distancia, por tu amor incondicional a las 3, por no dejarnos nunca solas en los malos momentos. Gracias por ser un ejemplo de valentía y de superación. Gracias por tus “que linda eres sobrina, vales mucho”, gracias por creer en mí.

Abuelo, que pena que te fuiste sin ver acabar aquello que hacia tu nieta en Vall d'Hebron, por lo que siempre me mostraste tu admiración. Gracias por sentirme siempre tan orgulloso de mí, gracias por creer que soy completa. Gracias por ser un ejemplo de vida, de valentía y positividad. Te echo mucho de menos.

Rocío, mi Ro, mi Taat, mi Uxi... eres mi polo opuesto pero no me imagino la vida sin ti. Gracias por tu apoyo y enseñanzas de hermana mayor, por tu fe en mí, por tu bondad. Gracias por tu ironía y tu sorna, que aunque a veces me desesperen, siempre consigues

hacerme reír. Ah y gracias por los madrugones para acompañarme a la estación de autobús, eso sí que es amor de hermana. ¡Te quiero Ro!

Mama, gracias por ser mi norte y mi guía, por ser mi todo. Gracias por ser un ejemplo de bondad y de entrega. Siempre me dices que suerte que has tenido de tenerme, la suerte es mía de tener una madre como tú. Gracias por la fe que tienes en mí y por dármelo todo sin pedir nunca nada a cambio. ¡Te adoro! Papa, no hay día que no piense en ti. Lo que daría porque estuvieras el día de la defensa de mi tesis, por volver a hablar contigo y explicarte todo lo que me ha pasado y he aprendido a lo largo de estos años, por volver a ver el brillo y la intensidad de tu mirada, por volver a escuchar tu acento sevillano. Gracias por creer en mi potencial pero haciendo siempre que diera lo mejor de mí, por ser el responsable de mi carácter inconformista y perfeccionista. Espero que estés donde estés te sientas orgulloso de tu hija “la xica”. Gracias a los dos por hacer que nunca me faltara de nada, por inculcarme la importancia de formarme y ser autosuficiente. Estoy muy orgullosa de mis orígenes. Os lo debo todo. ¡Esta tesis va por vosotros!

Gracias también a todas aquellas personas que no hago referencia pero que me han arrancado una sonrisa a lo largo de estos años.

Gracias a todos vosotros/as!!

P.D.: Gràcies al Sagalés per portar-me sana i estàlvia cada dia. Per les mil històries i anècdotes viscudes en l'autobús!

RESUMEN

El rhabdomiocarcinoma (RMS) es el sarcoma de partes blandas más común en la infancia y se considera que se origina en células embrionarias destinadas a la formación de músculo esquelético. Histológicamente, el RMS se divide en 2 grupos principales: embrionario (RMSe) y alveolar (RMSa), los cuales difieren tanto en su presentación clínica, respuesta a terapia y pronóstico, siendo el subtipo alveolar el que presenta un pronóstico más desfavorable.

La vía de señalización Hedgehog (HH) tiene un papel clave en el desarrollo y la progresión de muchos tipos de cáncer, incluyendo el RMS. Aunque esté ampliamente aceptada la activación de esta vía de señalización así como su papel oncogénico en el RMS, se desconoce el mecanismo molecular que impulsa su activación. En esta tesis se describe por primera vez en el RMS la contribución de los ligandos HH (*Sonic*, *Indian* y *Desert*) en la activación de la vía HH así como su implicación en la oncogénesis, apuntando a la existencia de una activación autocrina de esta vía de señalización. En este trabajo también se muestra el efecto de la inhibición farmacológica de la vía HH con inhibidores de *Smoothed* (Sonidegib y Vismodegib) y de los ligandos HH (MEDI-5304). De manera interesante, se describe por primera vez el efecto deletéreo de Vismodegib, provocando la inducción indeseada de la invasividad celular mediante la activación *off-target* de la vía *Unfolded protein response* (UPR). En conjunto, los resultados incluidos en esta tesis establecen el mecanismo de activación de la vía HH y esclarecen el papel oncogénico de esta vía de señalización y, en particular, el de los ligandos HH.

Asimismo, un número creciente de publicaciones describen el papel clave de la vía HH en el mantenimiento de las células madre tumorales en una amplia variedad de neoplasias. La heterogeneidad celular observada en los tumores puede ser explicada por la existencia de las células madre tumorales, una pequeña subpoblación celular considerada la responsable de la iniciación, progresión y propagación de los tumores. En el caso del RMS, ha sido reportada la existencia de células madre tumorales en el subtipo embrionario pero no en el alveolar, el subtipo más agresivo de RMS. Debido a la falta de marcadores adecuados para el aislamiento de esta subpoblación celular, en este trabajo se realizaron ensayos basados en la formación de estructuras celulares (holoclones y esferas) enriquecidas en células madre tumorales para su selección y

posterior estudio. La capacidad de las células de RMS para formar estas estructuras nos ha permitido demostrar la existencia de un subgrupo de células con capacidad de auto-renovación, por primera vez también en el subtipo alveolar. Además, en este trabajo se muestra la implicación de la vía HH en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS. Tanto los holoclones como las esferas mostraron una sobre-activación de esta vía de señalización; su inhibición farmacológica mediante el tratamiento con Sonidegib y MEDI-5304 resultó en una reducción en la formación de ambas estructuras celulares, mostrando por primera vez el papel clave de los ligandos HH para el mantenimiento de esta subpoblación celular. Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a que la vía HH tiene un papel clave en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS y que su inhibición tendría un gran potencial terapéutico para prevenir recidivas locales y metástasis.

En resumen, en esta tesis se describe la implicación de los ligandos HH en la oncogenicidad del RMS así como su papel en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS, posicionándolos como nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de futuras terapias contra el RMS.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
I. INTRODUCCIÓN	19
1. Cáncer infantil	21
1.1. Sarcomas	23
1.1.1. Rabdomiosarcoma	24
1.1.1.1. Historia	24
1.1.1.2. Epidemiología	25
1.1.1.3. Presentación clínica	25
1.1.1.4. Histopatología y alteraciones genéticas	26
1.1.1.5. Etiología y evolución molecular	33
1.1.1.6. Factores pronóstico y estadiaje	34
1.1.1.7. Factores de riesgo	36
1.1.1.8. Tratamiento	37
2. Vía de señalización Hedgehog	38
2.1. Historia	39
2.2. Vía Hedgehog canónica	39
2.2.1. Cilio primario	39
2.2.2. Ligandos Hedgehog	42
2.2.3. Receptores Hedgehog	44
2.2.4. Smoothened	45
2.2.5. Factores de transcripción GLI	46
2.3. Vía Hedgehog no canónica	47
2.3.1. Vía Hedgehog no canónica de tipo I	47
2.3.2. Vía Hedgehog no canónica de tipo II	48
2.4. El papel de la vía Hedgehog en cáncer	48
2.4.1. Modelos de activación de la vía Hedgehog en cáncer	49
2.4.1.1. Activación de tipo I: independiente de ligando	49
2.4.1.2. Activación de tipo II: autocrina dependiente de ligando	51

2.4.1.3. Activación de tipo III: paracrina dependiente de ligando	52
2.4.2. Vía Hedgehog no canónica en cáncer	53
2.4.3. Inhibidores de la vía Hedgehog	54
2.4.3.1. Descubrimiento de la ciclopamina	54
2.4.3.2. Inhibidores de Smoothened	56
2.4.3.3. Inhibidores de los ligandos Hedgehog	60
2.4.3.4. Inhibidores de GLI	61
2.4.4. El papel de la vía HH en el Rabdomiosarcoma	61
3. Células iniciadoras de tumor	64
3.1. Modelos de heterogeneidad tumoral	64
3.1.1. Modelo de evolución clonal	64
3.1.2. Modelo de células madre tumorales	64
3.2. Marcadores moleculares de las células iniciadoras de tumor	65
3.3. Ensayos funcionales para evaluar las células iniciadoras de tumor	67
3.4. El papel de la vía Hedgehog en el mantenimiento de las células iniciadoras de tumor	69
3.5. Células iniciadoras de Rabdomiosarcoma	70
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. Muestras tumorales humanas	79
2. Cultivos celulares	79
2.1. Líneas celulares	79
2.2. Subcultivo celular	80
2.3. Contaje de células	81
2.4. Criopreservación y descongelación	81
3. Tratamiento farmacológico	83
4. Plásmidos, transfección, producción lentiviral e infección	83
4.1. Plásmidos	84
4.2. Transfección y producción lentiviral	85

4.3. Infección	85
5. Análisis de la expresión génica	88
5.1. Extracción del ARN total	88
5.2. Retrotranscripción	88
5.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	89
5.4. Microarray de cDNA	91
5.5. Base de datos	92
6. Extracción y detección de proteínas	93
6.1. Extracción de proteínas	93
6.2. Cuantificación de proteínas	93
6.3. Preparación de las muestras	94
6.4. SDS-PAGE	95
6.5. Western blot	96
7. Inmunohistoquímica	98
8. Ensayos de proliferación celular	101
8.1. Recuento celular	101
8.2. Ensayo WST-1	101
9. Ensayo de invasión Transwell	101
10. Citometría de flujo	103
10.1. Ensayo de viabilidad celular	105
10.2. Análisis de la apoptosis	106
11. Ensayos de enriquecimiento de células madre	107
11.1. Ensayo de formación y selección de colonias	107
11.2. Ensayo de formación de esferas	108
12. Modelos animales	108
12.1. Modelo ortotópico	109
12.2. Modelo murino de metástasis	109
13. Análisis estadístico	110
IV. RESULTADOS	113
1. Mecanismo de activación de la vía Hedgehog en el Rabdomiosarcoma: el	

papel de los ligandos	115
1.1. IHH y DHH son los ligandos HH predominantes en líneas celulares y tumores de RMS	115
1.1.1. Líneas celulares de RMS	115
1.1.2. Tumores de RMS	115
1.2. La presencia de los ligandos HH correlaciona con la activación de la vía, sugiriendo un mecanismo autocrino	118
1.2.1. Correlación de los niveles de expresión de los ligandos HH y GLI1 en muestras de tumores de RMS	118
1.2.2. La infra-regulación genética de los ligandos <i>SHH</i> , <i>IHH</i> y <i>DHH</i> en líneas celulares de RMS provoca la reducción de los genes diana de la vía HH	119
1.3. La inhibición de la vía HH reduce la proliferación de las células de RMS <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	120
1.3.1. Únicamente la infra-regulación de los ligandos <i>IHH</i> y <i>DHH</i> provoca una reducción en la proliferación celular	120
1.3.2. El tratamiento con los inhibidores de la vía HH – Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 – causa efectos anti-proliferativos	123
1.4. La depleción genética de los ligandos HH produce una reducción severa del crecimiento tumoral en ratones SCID	127
1.5. SHH tiene un papel crucial en el fenotipo invasivo de las células de RMS	127
1.5.1. La depleción genética de <i>SHH</i> impide la invasividad celular	127
1.5.2. La infra-expresión de <i>SHH</i> reduce la formación de metástasis <i>in vivo</i>	129
1.6. Efecto paradójico de Vismodegib sobre la invasividad celular	129
1.6.1. Sonidegib inhibe la capacidad invasiva de las células de RMS, mientras que Vismodegib la incrementa de forma paradójica	129
1.6.2. Vismodegib induce de formación de metástasis <i>in vivo</i>	131
1.6.3. El efecto paradójico de Vismodegib sobre la capacidad invasiva de las células de RMS es mediado por la activación <i>off-target</i> de la vía	

<i>Unfolded protein response (UPR)</i>	133
1.6.4. La expresión del componente de la vía UPR – <i>TRIB3</i> – correlaciona con marcadores de mal pronóstico en pacientes con RMS	134
2. El papel de la vía hedgehog en el mantenimiento de las células iniciadoras de rhabdomyosarcoma	137
2.1. Las células de RMS contenidas en holoclones y esferas presentan características de células madre	137
2.1.1. Las células de RMS son capaces de formar holoclones y esferas	137
2.1.2. Las células de RMS contenidas en holoclones y esferas poseen la capacidad de auto-renovación	139
2.2. La vía de señalización HH tiene un papel clave en el mantenimiento de holoclones y esferas de RMS	141
2.2.1. El principal efector de la vía HH está sobre-expresado en holoclones y esferas de RMS	141
2.2.2. La inhibición de la vía HH impide la formación de holoclones y esferas de RMS	143
2.2.2.1. La inhibición genética de <i>IHH</i> , <i>DHH</i> y <i>GLI1</i> bloquea la formación de holoclones y frena el crecimiento de las esferas	143
2.2.2.2. Los inhibidores farmacológicos de la vía HH, Sonidegib y MEDI-5304, inhiben selectivamente la formación de holoclones y esferas de RMS	145
V. DISCUSIÓN	149
1. El mecanismo de activación de la vía Hedgehog en el Rhabdomyosarcoma: una oportunidad terapéutica	151
1.1. Activación autocrina de la vía HH en el RMS	151
1.2. Los ligandos HH no presentan funciones equivalentes en el RMS	153
1.2.1. El papel de los ligandos HH en la proliferación de las células de RMS	154
1.2.2. El papel de los ligandos HH en la capacidad invasiva de las células	

de RMS	156
1.3. El efecto de la inhibición farmacológica de los ligandos HH y de SMO en las células de RMS	159
1.3.1. El efecto <i>off-target</i> de Vismodegib sobre la capacidad invasiva de las células de RMS es mediada por la activación de la vía UPR	161
1.3.2. TRIB3, posible marcador de mal pronóstico en el RMS	163
1.4. Implicaciones terapéuticas	165
2. El papel de la vía Hedgehog en el mantenimiento de las células iniciadoras de Rbdomiosarcoma: los ligandos Hedgehog como nuevas dianas terapéuticas contra esta subpoblación celular	166
2.1. La formación de holoclonos y esferas como método de enriquecimiento de células iniciadoras de RMS	166
2.2. La activación de la vía HH en las células iniciadoras de RMS	168
2.3. El efecto de la inhibición de la vía HH sobre la capacidad de formación de holoclonos y esferas de RMS	169
2.4. Implicaciones terapéuticas	172
VI. CONCLUSIONES	175
VII. REFERENCIAS	179
VIII. ANEXOS	205
ANEXO1. Autenticación de las líneas celulares de RMS	207
ANEXO2. Publicaciones	213

ABREVIATURAS

°C	grado centígrado
µg	microgramo
µL	microlitro
µm	micrómetro
µM	micromolar
ABCG	ATP binding cassette subfamily G
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1 family
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
APC	Adenomatous polyposis coli
APC	Allophycocyanin
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASNS	Asparagine synthetase
ATCC	American Type Culture Collection
ATF	Activating transcription factor
ATO	Arsenic trioxide
BCC	Basal cell carcinoma
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR	Breakpoint cluster region
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BOC	Brother of CDO
BUB1B	Mitotic checkpoint serine/threonine kinase BUB1 beta
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2

cDNA	Complementary DNA
CDO	Cysteine dioxygenase type 1
CHAC1	Glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1
CHOP	C/EBP homologous protein
CIT	Célula iniciadora de tumor
CK1	Casein kinase 1
cm	centímetro
c-MET	Hepatocyte growth factor receptor
Ct	Threshold cycle
DAB	Diaminobencidina
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DHH	Desert Hedgehog
DISP	Dispatched
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphates
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EpSSG	European pediatric Soft Tissue Sarcoma Group
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor

FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FKHR	Forkhead
FOXO1	Forkhead box protein O1
FSC	Forward scatter
g	gramo
GAS1	Growth arrest-specific protein 1
GLI	Glioma-Associated Oncogene
GRK2	G protein-coupled receptor kinase 2
GSK3 β	Glycogen synthase kinase-3 beta
GTP	Guanosine triphosphate
h	hora
HD	Homodomain
HH	Hedgehog
HHIP	Hedgehog-Interacting Protein
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP	Horseradish peroxidase
ICCC-3	International classification of childhood cancer third edition
ICR	International classification of rhabdomyosarcoma
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Insulin-like factor
IGFII	Insulin-like growth factor II
IGFIR	Insulin-like growth factor 1 receptor
IHH	Indian Hedgehog
IP	Ioduro de propidio
IRE1 α	Inositol-requiring enzyme 1 α
IRS	Intergroup Rhabdomyosarcoma Study

kDa	kiloDalton
kg	kilogramo
KIF7	Kinesin family member 7
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Loss of heterozygosity
LOI	Loss of imprinting
M	molar
mA	miliAmperio
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MB	Medulloblastoma
MDM2	Murine doble minute 2
MEM	Minimum essential medium
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MMP	Matrix metalloproteinase
MRFs	Myogenic regulators factors
MSC	Mesenchymal stem cells
MYCN	N-myc proto-oncogene protein
MYF	Myogenic factor
MYOD	Myoblast determination protein
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCOA1	Nuclear receptor coactivator 1
NF1	Neurofibromin 1

ng	nanogramo
NK	Natural killer
nM	nanomolar
nm	nanómetro
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
OMS	Organización mundial de la salud
p	p-valor
P53	Cellular tumor antigen p53
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PAX	Paired box protein
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Paired domain
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PRKDC	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide
PTCH	Patched
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
PVDF	Polyvinylidene fluoride
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RB1	Retinoblastoma 1
RHOA	Ras homolog family member A
RISC	RNA-induced silencing complex
RMS	Rabdomiosarcoma

ABREVIATURAS

RMSa	Rabdomiosarcoma alveolar
RMSe	Rabdomiosarcoma embrionario
RNA	Ribonucleic acid
RND	Resistance-nodulation-division
RNTI	Registro nacional de tumores infantiles
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCUB2	Scube2
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEHOP	Sociedad española de hematología y oncología pediátricas
seg	segundo
SEM	Standard error of the mean
SESN2	Sestrin-2
SHH	Sonic Hedgehog
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
SMO	Smoothened
SNAI1	Snail
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOX2	Sex determining region Y-box 2
SP	Side population
SPF	Specific-pathogen-free
SSC	Side scatter

ABREVIATURAS

SUFU	Suppressor of fused homolog
SV40	Simian virus 40
TBP	TATA binding protein
TBS-T	Tris-buffered saline and Tween 20
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
TGF β	Transforming growth factor beta
TP53	Cellular tumor antigen p53
TRIB3	Tribbles homolog 3
U	unidad
UA	unidad arbitraria
UPR	Unfolded protein response
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHIR	Vall d'Hebron Institut de Recerca
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLDLR	Very low-density lipoprotein receptor
VSV-G	Vesicular stomatitis virus envelope G protein
W	Vatio

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer infantil

El cáncer es una enfermedad relativamente infrecuente en la infancia. Aproximadamente, entre 10000 y 15000 niños menores de 15 años son anualmente diagnosticados de cáncer en Europa y entre 900 y 950 de niños en España, 200 de los cuales en Cataluña (Peris-Bonet, 2010; Peris-Bonet, 2013).

La supervivencia a los 5 años tras el diagnóstico de los niños con cáncer es de aproximadamente el 80% (Gatta, 2014). Sin embargo, el cáncer infantil es la primera causa de muerte por enfermedad en niños de entre 1-14 años de vida (Fernández-Plaza, 2014; Ramis, 2015).

El cáncer infantil no es una entidad singular sino que engloba un conjunto de neoplasias. Los cánceres se clasifican en base a su localización anatómica. Los cánceres hematológicos son cánceres de la sangre, de la médula ósea y del sistema linfóide. Los tumores cerebrales son cánceres intracraneales del sistema nervioso central y los tumores sólidos son cánceres extracraneales no hematológicos. A diferencia de los cánceres hematológicos o cerebrales, los tumores sólidos pueden originarse en cualquiera de las 3 capas germinales que forman el embrión: mesodermo, endodermo o ectodermo (**Figura I1**) (Chen, 2015).

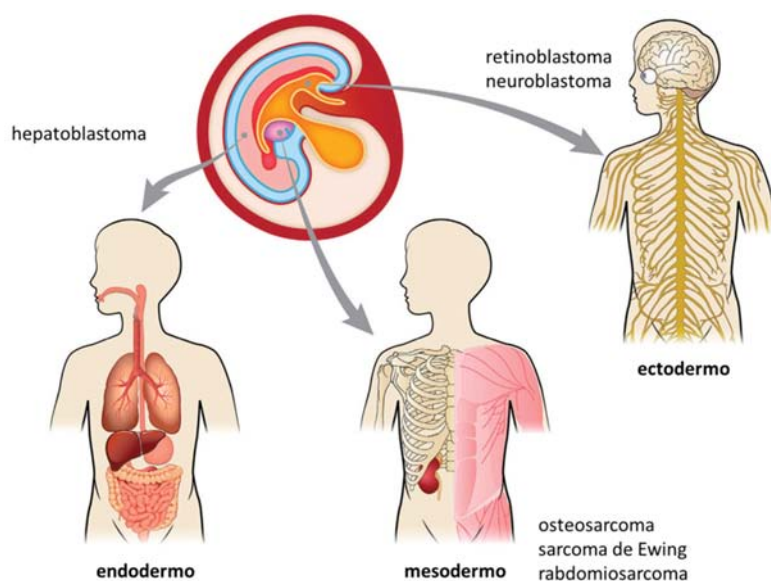


Figura I1. Los tumores sólidos pediátricos presentan orígenes diversos. A diferencia de las neoplasias hematológicas y de los tumores cerebrales, los tumores sólidos pediátricos pueden surgir de cualquiera de las 3 capas germinales del embrión. Imagen modificada de Chen (2015).

Los cánceres de la infancia poseen características específicas que los definen como entidades diferentes a los cánceres del adulto; difieren en su etiología, biología, respuesta a tratamiento y supervivencia. En adultos, son los cánceres epiteliales los más frecuentes y a menudo están asociados a la exposición a agentes cancerígenos. En cambio, los tumores pediátricos tienen un origen hematológico, mesenquimal o del sistema nervioso y su etiología es a menudo desconocida. A diferencia del cáncer del adulto, tan sólo 2 mutaciones son suficientes para el desarrollo y progresión del cáncer infantil (Pritchard-Jones, 1996).

La *International Classification of Childhood Cancer third edition* (ICCC-3) clasifica los cánceres infantiles en 12 categorías principales (**Tabla I1**) (Steliarova-Foucher, 2005). El cáncer infantil más frecuente es la leucemia aguda (23%). Le siguen en frecuencia los tumores del sistema nervioso central (SNC) (21%), linfomas (13%), tumores del sistema nervioso simpático (SNS) (10%), tumores óseos (7%) y sarcomas de partes blandas (7%) (**Figura I2**) (Fernández-Plaza, 2004; Ramis, 2015). Los tipos con menor índice de supervivencia son: leucemia mieloide aguda, ependimoma y sarcomas de hueso y de partes blandas (Gatta, 2014).

Tabla I1. Clasificación principal del cáncer infantil (ICCC-3):

Grupos diagnósticos	
I.	Leucemias, enfermedades mieloproliferativas y enfermedades mieloplásticas
II.	Linfomas y neoplasias reticuloendoteliales
III.	SNC y neoplasias intracraneales e intraespinales
IV.	Neuroblastoma y otros tumores del SNP
V.	Retinoblastoma
VI.	Tumores renales
VII.	Tumores hepáticos
VIII.	Tumores óseos malignos
IX.	Sarcomas de partes blandas y sarcomas extra óseos
X.	Tumores de la línea germinal, tumores trofoblásticos y neoplasias de las gónadas
XI.	Otras neoplasias epiteliales malignas y melanomas malignos
XII.	Otras e inespecíficas neoplasias malignas

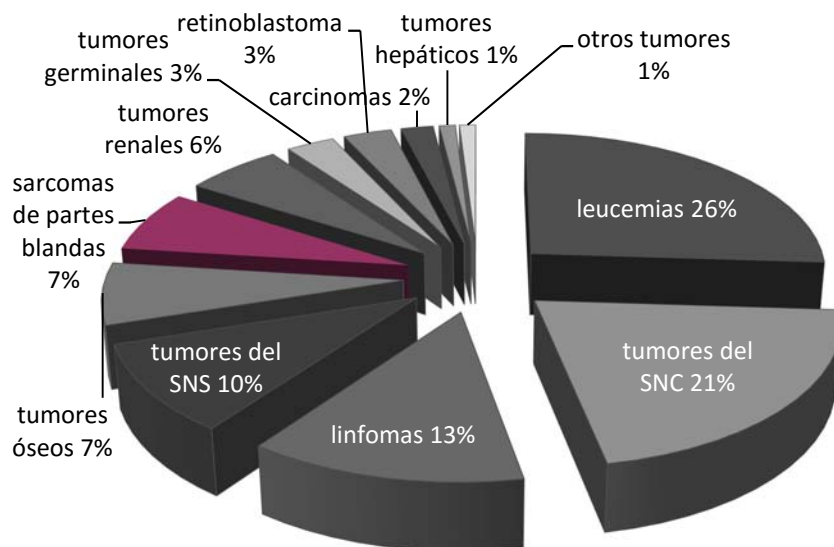


Figura 12. Porcentajes de casos registrados en el Registro Nacional de Tumores Infantiles (RNTI-SEHOP) por grupo diagnóstico entre 1980-2013. Imagen basada en Peris-Bonet (2013).

1.1. Sarcomas

Los sarcomas son un conjunto de tumores malignos que se originan en el tejido conectivo, formado por tejidos encargados del sostén de los órganos y tejidos que componen el sistema músculo-esquelético, tales como: hueso, cartílago, grasa, músculo o vasos sanguíneos. Son considerados tumores raros, representando menos del 1% de los tumores sólidos del adulto y aproximadamente el 20% de los tumores sólidos pediátricos (Burningham, 2012). Debido a que el origen de los sarcomas reside en el mesodermo, no están restringidos a una localización específica y pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo (Lahat, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido más de 50 tipos diferentes de sarcomas, clasificados en 2 categorías principales: sarcomas óseos y sarcomas de partes blandas (Lahat, 2008). Los sarcomas óseos son tumores muy infrecuentes y afectan sobre todo a niños y adolescentes. Su incidencia anual se estima en 1 paciente por cada

100000 personas. En estos pacientes, algo más de la mitad de los sarcomas óseos son osteosarcomas, una tercera parte son sarcomas de Ewing y menos del 10% son condrosarcomas. El sarcoma de Ewing es muy poco frecuente en adultos. Sin embargo, el osteosarcoma tiene una distribución por edades con dos momentos de mayor frecuencia: uno entre los 13 y 16 años y otro por encima de los 65 años (López-Martín, 2013). La incidencia anual de los sarcomas de partes blandas es de aproximadamente 6 casos por cada 100000 personas, representando el 1.5% de los tumores del adulto y el 7.4% de los tumores infantiles (Pappo, 1997; Ferrari, 2011). Dichos tumores son clasificados en función de su célula de origen o su morfología y su patrón difiere significativamente entre adultos y niños: el rabdomiosarcoma es característico de edades pediátricas, el liposarcoma y el leiomasarcoma de adultos y ciertos tipos de sarcoma sinovial y sarcoma alveolar de ambos grupos (Ferrari, 2011).

1.1.1. Rabdomiosarcoma

El rabdomiosarcoma (del griego *rhabdo*: en forma de varilla; *mys*: músculo; *sarko*: carne) (RMS) es un tumor maligno embrionario derivado de células mesenquimales primitivas, denominadas rabdomioblastos, cuya diferenciación a células del músculo esquelético maduro es incompleta (Gallego, 2010).

1.1.1.1. Historia

El RMS fue descrito por primera vez en 1854 por C.O. Weber, en una lesión en la lengua de un joven de 21 años. El primer informe exhaustivo sobre tumores de origen miogénico fue realizado por Teevan en 1863. En 1900, Genevet introdujo el término rabdomioma para todos los tumores derivados del músculo estriado. La primera serie de RMS fue reportada por Rakov en 1937. No obstante, la primera definición histológica del RMS fue realizada por Stout en 1946, uno de los primeros patólogos de tejidos blandos del siglo XX (Stout, 1946; Rothenberg, 1966).

1.1.1.2. Epidemiología

El RMS es el sarcoma de partes blandas más común en la infancia, siendo después del neuroblastoma y el tumor de Wilms el tercer tumor sólido extra craneal más común en niños (Dasgupta, 2012). Este sarcoma representa aproximadamente el 5% de todos los tumores malignos de niños y adolescentes y su incidencia anual es de 5.3 casos por millón de niños menores de 15 años (Gallego, 2010). Aproximadamente, el 65% de los casos de RMS son diagnosticados en niños menores de 6 años, con una incidencia baja entre los 10 y 14 años y un incremento en el número de casos en adolescentes de entre 15 a 19 años (Welxer, 1997; McDowell, 2002); existiendo una mayor incidencia en niños y adolescentes del sexo masculino (1.4 veces más frecuente en el sexo masculino que en el femenino) (Welxer, 1997; Sun, 2015).

El RMS es un tumor altamente maligno e invasivo, pero con los tratamientos actuales el pronóstico de los pacientes con RMS ha mejorado notablemente en las tres últimas décadas. En los primeros estudios realizados por el IRS (*Intergroup Rhabdomyosarcoma Study –I*, 1972 al 1978) la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes de RMS a los 5 años del diagnóstico era del 55% (Maurer, 1988). En cambio, actualmente se sitúa entre el 70-75% (Missiaglia, 2012). No obstante, la causa principal de muerte es la presencia de metástasis. Los pacientes con RMS metastático tienen una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del 20-29% (Davicioni, 2009; Gallego, 2010).

1.1.1.3. Presentación clínica

El RMS se origina en células mesenquimales primitivas. Por este motivo, puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, incluyendo zonas donde no existe musculatura esquelética (McDowell, 2002). Así pues, la presentación clínica y la sintomatología del RMS son variables y dependen de la localización del tumor primario (Dagher, 1999). Las localizaciones más frecuentes son: tracto genitourinario, cabeza y cuello, extremidades y órbita (**Figura I3-A**) (Dagher, 1999; Gallego, 2010). En la **Tabla I2** se detalla la sintomatología asociada a las localizaciones más comunes del RMS. Los lugares de diseminación metastática más habituales del RMS son: médula ósea, nodos linfáticos y hueso (**Figura I3-B**) (De Giovanni, 2009).



Figura 13. Localizaciones del RMS. A: Imagen de un RMS naso-orbital obtenida mediante tomografía axial computarizada (Morón, 2004). **B:** Imagen de lesiones distales de RMS en los fémures obtenidas mediante resonancia magnética (Kellenberger, 2004).

Tabla 12. Sintomatología más común del RMS en función de su localización*

Región anatómica y frecuencia	Localización	Manifestación clínica
Genitourinaria (25%)	Vejiga y próstata (15%) Vagina/útero	Obstrucción urinaria Sangrado vaginal/tumor vulva
Cabeza y cuello (25%)	Parameníngeos (15%) No parameníngeos	Epistaxis/masa fosa nasal Masa palpable
Extremidades (20%)	Extremidades	Masa palpable
Órbita (10%)	Órbita	Exoftalmos
Otras localizaciones (20%)	Vía biliar Pared torácica	Masa abdominal e ictericia Masa torácica/derrame pleural

*(Gallego, 2010)

1.1.1.4. Histopatología y alteraciones genéticas

El RMS pertenece al grupo de tumores de células pequeñas redondas y azules, un conjunto de neoplasias de aspecto primitivo o embrionario altamente celular que con la tinción de hematoxilina-eosina presentan grandes áreas de núcleos azul oscuro con escaso citoplasma, entre las que se incluyen el sarcoma de Ewing, el neuroblastoma o el linfoma no-Hodgkin (Paz-Gómez, 2004). La clave del diagnóstico del RMS es la presencia de diferenciación en músculo esquelético, características identificadas mediante microscopía, inmunohistoquímica y técnicas de diagnóstico molecular. Para su diagnóstico se requiere la positividad de marcadores inmunohistoquímicos musculares, tales como: miogenina, MyoD, alfa-actina, miosina, desmina y mioglobina (Dagher,

1999; Wachtel, 2006; Gallego, 2010). Microscópicamente, el RMS se caracteriza por la presencia de estriaciones cruzadas típicas del músculo esquelético (Dagher, 1999) y su morfología recuerda el músculo esquelético fetal pre-inervado (Tiffin, 2003). La aplicación del diagnóstico molecular permite el diagnóstico de determinados subtipos de RMS, los cuales se caracterizan por la presencia de translocaciones específicas (Dagher, 1999).

En 1995, se desarrolló la Clasificación Internacional del RMS (ICR, del inglés *International Classification of Rhabdomyosarcoma*), en la cual fueron establecidos 4 subtipos de RMS en base a criterios histológicos y de riesgo (Rudzinski, 2015):

- Buen pronóstico: RMS botrioide y de células fusiformes.
- Pronóstico intermedio: RMS embrionario.
- Mal pronóstico: RMS alveolar y RMS pleomórfico.

En la última revisión de la OMS realizada en 2013 – *Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* – se eliminó el subtipo botrioide como subtipo de diagnóstico independiente y se incluyó dentro del subtipo embrionario. Por consiguiente, la actual clasificación del RMS establece los siguientes subtipos principales de RMS: alveolar, embrionario, esclerosante/de células fusiformes y pleomórfico (**Tabla 13**) (Figueroa-Carbajal, 2010; Jo, 2014; Rudzinski, 2015; Sun, 2015).

Tabla 13. Subtipos principales de RMS: pronóstico, edad, frecuencia y localización principal

Subtipo	Pronóstico	Edad	Frecuencia*	Localización
Alveolar	Malo	Adolescentes y adultos jóvenes	20%	Extremidades
Embrionario	Intermedio	Niños menores de 10 años	70%	Cabeza y cuello
Esclerosante/de células fusiformes	Bueno	Adultos jóvenes	10%	Región paratesticular, cabeza y cuello
Pleomórfico	Malo	Adultos	-	Extremidades

*en RMS infantil

Los subtipos menos frecuentes de RMS son el RMS esclerosante/de células fusiformes y el RMS pleomórfico (**Tabla 13**). El RMS de células fusiformes es el subtipo con mejor pronóstico, con una supervivencia tras 5 años del diagnóstico del 88-95.5% (Carroll, 2013). Presenta una mayor incidencia en hombres jóvenes, siendo la región paratesticular, cuello y cabeza sus localizaciones principales. En la reciente clasificación de la OMS, el RMS esclerosante es considerado como una variante del subtipo de RMS de células fusiformes. Es más común en adultos y se origina en las extremidades, cabeza y cuello (Rudzinski, 2015). Dicho subtipo se caracteriza por un elevado grado de hialinización y formación de matriz, comparte características clínico-patológicas con los subtipos alveolar y embrionario y no existe ningún marcador genético característico (**Figura 14-C**). Asimismo, la literatura referente a su comportamiento clínico y evolución es parcheada (Chiles, 2004; Kumar, 2014). El RMS pleomórfico ocurre predominantemente en hombres de mediana edad siendo su localización principal las extremidades inferiores. Presenta una evolución clínica muy agresiva con muy mal pronóstico, entre el 50-60% de los pacientes presentan metástasis y la supervivencia global es inferior al 30%. Histológicamente, está compuesto por células tumorales pleomórficas y a menudo multinucleadas con un abundante citoplasma eosinofílico y núcleos pleomórficos mezcladas con rabiomioblastos pleomórficos positivos para marcadores miogénicos (**Figura 14-D**) (Mentzel, 2006).

Los subtipos alveolar y embrionario son los subtipos principales de RMS (**Tabla 13**). Ambos se diferencian en su presentación clínica, respuesta a terapia y pronóstico, siendo el subtipo alveolar el más agresivo y con peor pronóstico. La supervivencia de los pacientes con RMS alveolar (RMSa) a los 5 años del diagnóstico es del 52% y la de los pacientes con RMS embrionario (RMSe) es del 80% (Belyea, 2012). El RMSa presenta células pequeñas, redondas y densamente situadas en la región donde están confinadas, recordando a los alvéolos pulmonares (**Figura 14-A**) y se localiza mayoritariamente en las extremidades, con una gran predisposición de formación de metástasis. En cambio, el RMSe normalmente son tumores localizados, situados en el tracto genitourinario o en cabeza y cuello. Histopatológicamente es poco denso con células situadas en el estroma (**Figura 14-B**) (Walterhouse, 2007).

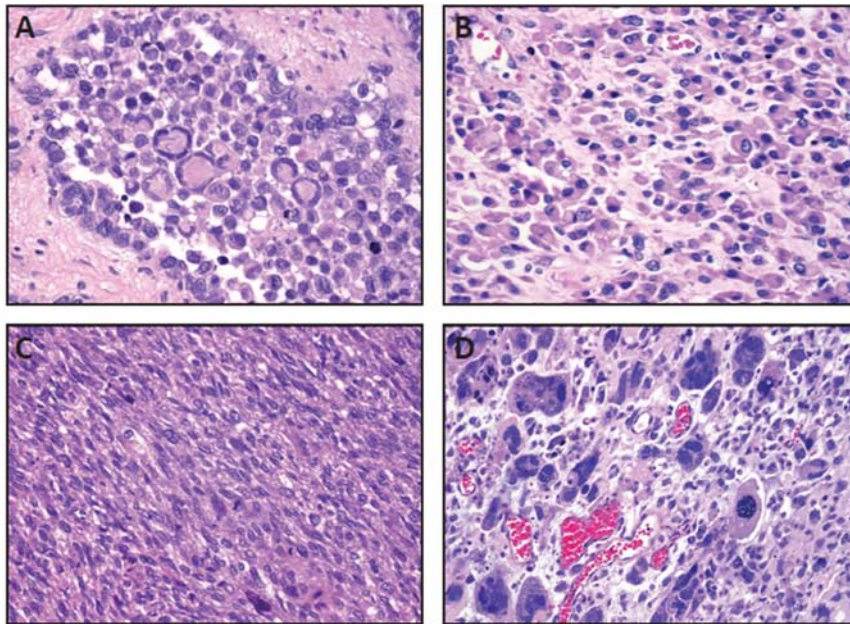


Figura 14. Tinción de hematoxilina-eosina de cortes histológicos de tumores de RMS de los subtipos: alveolar (A), embrionario (B), esclerosante (C) y pleomórfico (D). Imágenes obtenidas en www.webpathology.com.

Aproximadamente el 80% de los RMSa se caracterizan por la presencia de translocaciones cromosómicas recíprocas entre los cromosomas 2 y 13 ($t(2;13)(q35;p14)$) en aproximadamente el 55% de los casos y entre los cromosomas 1 y 13 ($t(1;13)(q36;p14)$) en un 23% de los casos (Barr, 1993; Davis, 1994; Sorensen, 2002; Dasgupta, 2012). Estas translocaciones involucran los genes *PAX3*, *PAX7* y *FOXO1* (también denominado *FKHR*), situados en los cromosomas 2, 1 y 13, respectivamente. En ambos casos, se crea un factor de transcripción quimérico que conserva el dominio de unión a ADN de los genes *PAX* (extremo 5') y el dominio transactivador del gen *FOXO1* (extremo 3') (**Figura 15**). La proteína quimérica resultante (*PAX3-FOXO1* o *PAX7-FOXO1*) se une a las dianas correctas de los genes *PAX*, pero su potencia de transactivación es excesiva y no corresponde a una regulación normal (Roma, 2011), convirtiéndose en un factor de transcripción oncogénico.

Los factores de transcripción FOXO pertenecen a la familia de proteínas *forkhead*. Son factores de transcripción de expresión ubicua y ejercen funciones claves como

diferenciación, metabolismo, proliferación y supervivencia en diversos tipos celulares. Las propiedades específicas de FOXO1 son la resistencia a estrés oxidativo (Accili, 2004).

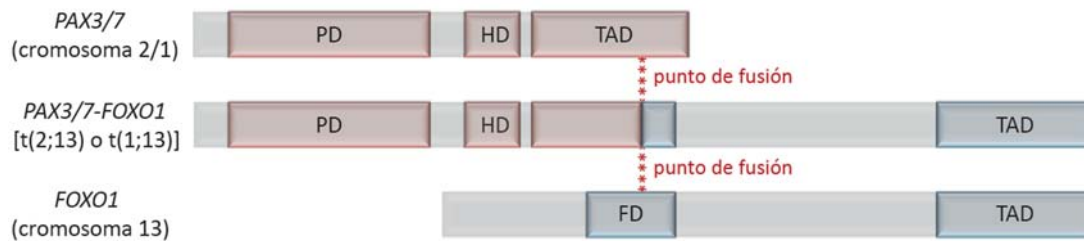


Figura I5. Diagrama de la translocación PAX-FOXO1. La translocación *PAX-FOXO1* involucra el gen *FOXO1* (cromosoma 13) y los genes *PAX3* o *PAX7* (cromosomas 2 y 1, respectivamente). El producto de fusión contiene el dominio de unión a ADN de PAX con el dominio transactivador de FOXO1. PD: *paired box*, HD: *homeodomain*, TAD: *transactivation domain* y FD: *forkhead domain*. Figura basada en Mahajan (2015).

La familia de factores de transcripción PAX está formada por 9 miembros que actúan como reguladores principales de la organogénesis. El motivo estructural que define a esta familia de factores de transcripción es un dominio evolutivamente conservado, denominado *paired domain* (PD). Este dominio, de 128 aminoácidos, es un motivo de unión a ADN que reconoce la secuencia TCACGC/G. 7 de las 9 moléculas PAX poseen un segundo motivo de unión a ADN, denominado *homeodomain* (HD), que reconoce la secuencia TAAT-ATTA (**Figura I5**). Dependiendo del contexto y de los cofactores, los factores de transcripción PAX pueden ejercer tanto como activadores o represores de la transcripción (Apuzzo, 2007; Mahajan, 2015).

El factor de transcripción PAX3 se expresa durante el desarrollo embrionario en los precursores mioblásticos situados en el dermomiótomo. La expresión de PAX3 cesa gradualmente a medida que avanza la miogénesis, permitiendo la diferenciación de los precursores miogénicos en mioblastos y, su posterior fusión para formar las fibras del músculo esquelético (Yusuf, 2006). Cuando las células del dermomiótomo están destinadas a abandonar su estado epitelial, sufren una transición epitelio-mesénquima y empiezan a migrar hasta su destino final en el mesénquima. Estos precursores miogénicos expresan PAX3, cuya expresión es esencial para retener sus capacidades

proliferativas y migratorias. Cuando alcanzan su localización final, los niveles de PAX3 cesan, permitiendo la expresión de los factores de regulación miogénica (MRFs, del inglés *myogenic regulators factors*) MYF5-6, MYOD y Miogenina, entre otros. Estos factores promueven la conversión de los precursores miogénicos en mioblastos, los cuales son capaces de fusionarse entre ellos y diferenciarse, a su vez, en fibras del músculo esquelético (**Figura I6**) (Yokoyama, 2011). La expresión de PAX7 en los mioblastos es simultánea a la de PAX3 en el dermomiótomo (Tiffin, 2003) y es necesaria para el mantenimiento de las células satélite (células madre del músculo) (Oustanina, 2004; DeGiovani 2009).

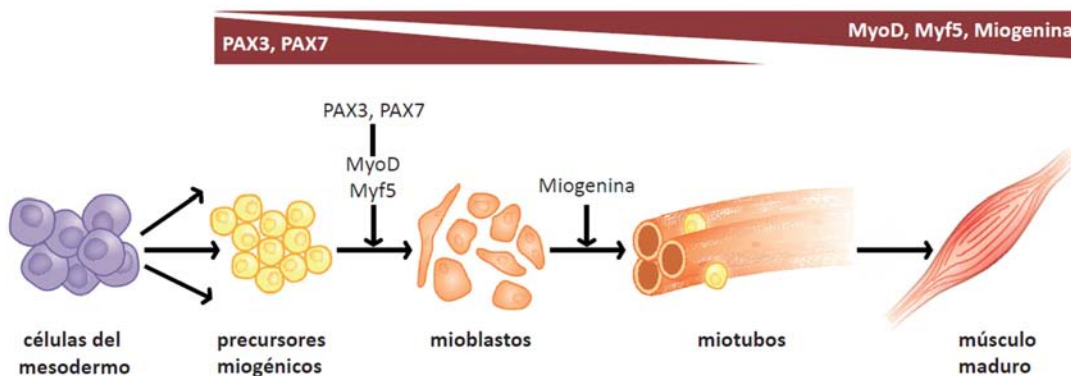


Figura I6. Modelo de la miogénesis esquelética. La especificación de las células del mesodermo a músculo maduro depende de los factores de transcripción miogénicos (PAX3, PAX7, MYOD, MYF5 y Miogenina). Figura modificada de Hettmer (2010).

Se considera que el RMS se origina en dichos precursores miogénicos que expresan PAX3 y es sabido que la mayoría de RMS presentan una elevada expresión de PAX3 y/o PAX7 (Frascella, 1998; Barr, 1999; Almazán-Moga, 2014). Varios trabajos han descrito que la expresión descontrolada de los genes PAX y/o de sus dianas provoca la dediferenciación y proliferación de las células miogénicas, sugiriendo que estos factores de transcripción están involucrados en la tumorigénesis del RMS (Tiffin, 2003; Dasgupta 2012). Se ha demostrado que PAX3 exhibe su potencial oncogénico mediante la modulación del receptor c-MET en líneas celulares de RMS con la translocación t(2;13). Además, análisis genómicos de tumores de RMS con la translocación PAX3-FOXO1 posicionan a los oncogenes *ALK*, *FGFR4*, *MYCN* e *IGFIR* como dianas directas de la

proteína de fusión (Cao, 2010). No obstante, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la translocación PAX-FOXO1 por sí sola no es tumorigénica y requiere lesiones genéticas adicionales, tales como mutaciones en *TP53*, *RB1* o *RAS* (Nani, 2008; Ren, 2008).

Estudios genéticos han identificados nuevas e infrecuentes proteínas de fusión en el RMSa. Wachtel *et al.* identificaron la translocación t(2;2)(q35;p23), la cual genera una proteína de fusión compuesta por PAX3 y NCOA1, que presenta propiedades transactivadoras similares a PAX3-FOXO1 (Wachtel, 2004). Shern *et al.* reportaron una nueva translocación PAX3-NCOA1 en RMS y una nueva fusión de PAX3 con INO80D (Shern, 2014). No obstante, aún se desconoce la influencia que ejercen estas translocaciones sobre el comportamiento clínico de estas variantes de RMSa.

Existe por lo menos un 20% de RMSa negativos para la translocación PAX-FOXO1, los cuales son un reto diagnóstico debido a que presentan una falta consistente de reordenamientos cromosómicos. Este subgrupo de RMSa presenta una evolución clínica similar al RMSe, hecho que sugiere que la translocación provee una información más precisa sobre la evolución del paciente que el subtipo histológico (Davicioni, 2009; Sun, 2015). La presencia de la translocación PAX-FOXO1 es un factor pronóstico adverso; estos pacientes presentan una supervivencia significativamente menor, con mayor frecuencia de metástasis y localizaciones desfavorables (Williamson, 2010). Asimismo, varios estudios apuntan a que la translocación PAX3-FOXO1 está asociada generalmente a un fenotipo más agresivo. En cambio, la translocación PAX7-FOXO1 tiende a darse en individuos más jóvenes, frecuentemente en las extremidades, en forma de tumores localizados y asociados a una mayor supervivencia (Kelly, 1997; Sorensen, 2002; Missaglia, 2012). No obstante, existe cierta controversia sobre la relevancia pronóstica de la translocación PAX7-FOXO1, hecho por el cual aún no es considerado un factor pronóstico en los protocolos actuales de tratamiento (Davicioni, 2009; Skapek, 2013).

El RMSe representa dos terceras partes de todos los RMS y afecta principalmente a niños de 0 a 4 años (Tost, 2010). Este subtipo no se caracteriza por la presencia de ninguna translocación, pero presenta la pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *loss of heterozygosity*) del locus 11p15 con pérdida de información genética materna y

duplicación de información genética paterna (Anderson, 1999). En esta región se localiza el gen *IGFII*, cuya función es estimular el crecimiento celular. *IGFII* está regulado por impronta materna, hecho por el cual sólo se expresa la copia heredada del padre. (Wexler, 1994). También se ha demostrado que el RMSe tiene pérdida de impronta (LOI, del inglés *loss of imprinting*), con una reexpresión del alelo materno silenciado del gen *IGFII* (Zhan, 1994). Así pues, la pérdida de heterocigosidad con disomía parental o la pérdida de impronta con expresión bialélica resultan en la sobre-expresión del gen *IGFII*. Los tumores de RMSe se caracterizan por presentar cariotipos complejos con contenidos de ADN que van de la diploidía a la hiperdiploidía. Además, en el RMSe se han observado otras aberraciones cromosómicas con ganancias y pérdidas de cromosomas. Las ganancias de material genético se dan principalmente en los cromosomas 2, 7, 8, 11, 12, 13 y 17, y las pérdidas en los cromosomas 1, 6, 9, 10, 14, 15 y 16 (Bridge, 2000). El RMS botrioide es un subtipo de RMSe que a menudo se localiza en las vísceras revestidas de epitelio, como por ejemplo la vejiga o la vagina, y presentan un pronóstico superior (Rudzinski, 2015).

Tanto el subtipo alveolar como el embrionario presentan la inactivación del gen supresor de tumor *P53* y la sobre-expresión de *MDM2* (regulador de la degradación de *P53*) (De Giovanni, 2009).

1.1.1.5. Etiología y evolución molecular

El RMS es un tumor maligno de origen mesenquimal y se considera que su origen reside en la miogénesis aberrante del músculo esquelético (Hetmer, 2010; Dasgupta, 2012). Células madre mesenquimales (MSC, del inglés *mesenchymal stem cells*) y otros tipos de células madre están presentes en el músculo esquelético y contribuyen en su proceso de diferenciación.

Varios estudios sugieren fuertemente que el origen del RMSe reside en las células satélite (Sharp, 2002; Tiffin, 2003). Estas células son precursores mioblásticos responsables del crecimiento postnatal, reparación y mantenimiento del músculo esquelético, para la especificación y mantenimiento de las cuales es esencial la

expresión de PAX7 (Seale, 2000). Sharp *et al.* reportaron que el modelo murino de RMS HGF/SF Ink4A/Arf^{-/-}, que desarrolla tumores que se asemejan a tumores humanos del subtipo embrionario, expresaban elevados niveles de PAX7 y c-MET. También describieron la aparición temprana de células satélite hiperplásicas en el músculo esquelético de estos ratones, sugiriendo que estos precursores son la fuente de los tumores de RMSe. Estos autores proponen que la activación aberrante de la vía PAX7/c-MET puede inducir la formación de músculo esquelético ectópico mediante el fomento de la especificación de células satélite (Sharp, 2002). Posteriormente, Tiffin *et al.* confirmaron la elevada expresión de PAX7 y c-MET en tumores humanos de RMSe. Tomados en conjunto, estos trabajos sugieren que el RMSe se origina en las células satélite (Tiffin, 2003).

En cambio, Keller *et al.* demostraron mediante un modelo murino condicional que la expresión de la translocación PAX3-FOXO1 en células satélite no provoca la formación de RMS del subtipo alveolar (Keller, 2004a). Posteriormente, Ren *et al.* presentaron resultados que situaban el origen del RMSa en las MSC. La transfección de los genes de fusión PAX-FOXO1 dirigió las MSC a un linaje miogénico mediante la expresión de MYOD y Miogenina, pero mostraron una inhibición en su diferenciación terminal. Estos resultados son similares a los obtenidos en muestras humanas de RMSa, las cuales presentan elevados niveles de MYOD y Miogenina pero niveles negligibles de MYF5, marcador de diferenciación muscular terminal (Ren, 2008; Charytonowicz, 2009). No obstante, la formación de tumores de RMSa a partir de MSC requiere la inactivación de TP53, demostrando que la fusión PAX-FOXO1 no es suficiente para la transformación (Ren, 2008).

1.1.1.6. Factores pronóstico y estadiaje

Los factores pronósticos más importantes en el RMS son (Gallego, 2010):

- **Histología.** Favorable: embrionario. Desfavorable: alveolar.
- **Estadio** (clasificación IRS). Favorable: grupo I. Desfavorable: grupos II-III.
- **Metástasis y afectación ganglionar.** Favorable: no afectación. Desfavorable: afectación ganglionar, enfermedad metastática al diagnóstico.

- **Localización.** Favorable: órbita, cabeza y cuello no parameningeo, tracto genitourinario no vejiga-próstata y tracto biliar. Desfavorable: las otras localizaciones.
- **Tamaño.** Favorable: ≤ 5 cm. Desfavorable: > 5 cm.
- **Edad.** Favorable: <10 años. Desfavorables: ≥ 10 años.

El sistema más ampliamente utilizado en el estadiaje del RMS es la clasificación postoperatoria en grupos clínicos realizada por el IRS (*Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*) en el año 1972 (**Tabla I4**) (Gallego, 2010). Este sistema de estadificación clínico-quirúrgico evalúa la resección completa del tumor, la presencia o no de enfermedad residual microscópica o macroscópica, la extensión local o la distancia del tumor así como la evidencia de metástasis (Maurer, 1988).

Tabla I4. Sistema de clasificación en grupos clínicos del IRS-I*

Grupo	Descripción
I	Enfermedad localizada completamente extirpada
A	Confinada en el músculo u órgano de origen
B	Afectación por contigüidad, infiltración fuera del músculo u órgano de origen
II	Extirpación macroscópica total con evidencia de extensión
A	Tumor con resección macroscópica total y residuo microscópico
B	Enfermedad regional con afectación ganglionar extirpada completamente sin residuo microscópico
C	Enfermedad regional con afectación ganglionar y con extirpación macroscópica total pero con evidencia de enfermedad microscópica residual y/o afectación del ganglio más distal de la resección
III	Extirpación incumplida con enfermedad residual macroscópica
A	Después de biopsia solamente
B	Después de resección del tumor con $> 50\%$ restante
IV	Enfermedad metastática presente al diagnóstico (pulmones, hígado, huesos, médula ósea, cerebro, músculos y ganglios a distancia)

*(Gallego, 2010)

Otro sistema de estadiaje es el TNM (T: tumor; N: nódulos; M: metástasis), con base en la evaluación preoperatoria del tamaño tumoral, la afectación o no de ganglios así como la presencia de metástasis (**Tabla I5**). Este sistema ha demostrado un gran valor

predictivo de la evolución de los pacientes (Pedrick, 1986; Lawrence, 1987). Por estas razones, el IRS IV y V han empleado ambos sistemas de estadiaje a partir del 1992 (Figueroa-Carbajal, 2010).

Tabla 15. Estadiaje TNM del RMS*

Estadio	Localización	T-invasividad	T-mida	N	M
I	Órbita	T ₁ y T ₂	a ó b	N ₀ N ₁ ó N _x	M ₀
	Cabeza/cuello	T ₁ y T ₂	a ó b	N ₀ N ₁ ó N _x	M ₀
	Genitourinaria	T ₁ y T ₂	a ó b	N ₀ N ₁ ó N _x	M ₀
II	Vejiga/próstata	T ₁ y T ₂	a	N ₀ ó N _x	M ₀
	Extremidades	T ₁ y T ₂	a	N ₀ ó N _x	M ₀
	Parameningea	T ₁ y T ₂	a	N ₀ ó N _x	M ₀
	Otras	T ₁ y T ₂	a	N ₀ ó N _x	M ₀
III	Vejiga/próstata	T ₁ y T ₂	b	N ₁	M ₀
	Extremidades	T ₁ y T ₂	b	N ₀ N ₁ ó N _x	M ₀
	Parameningea	T ₁ y T ₂	b	N ₀ N ₁ ó N _x	M ₀
	Otras	T ₁ y T ₂	b	N ₀ N ₁ ó N _x	M ₀
IV	Todas	T ₁ y T ₂	a ó b	N ₀ ó N ₁	M ₁
T: tumor T ₁ : confinado T ₂ : extendido a: ≤5cm Ø b: >5cm Ø		N: nódulos N ₀ : no afectados N ₁ : afectados N _x : desconocido		M: metástasis M ₀ : no metástasis M ₁ : metástasis	

*(Dagher, 1999)

1.1.1.7. Factores de riesgo

La mayoría de RMS se desarrollan de forma espontánea sin que existan factores predisponentes conocidos. No obstante, un bajo porcentaje de casos están asociados a trastornos genéticos o síndromes con diferentes mutaciones o aberraciones genéticas. Los ejemplos más reportados de RMS asociados a síndromes han sido del subtipo embrionario y alveolar sin translocación (Parham, 2013). Más concretamente, pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Gorlin, neurofibromatosis de tipo 1, síndrome de Costello o síndrome de Li-Fraumeni, entre otros, tienen una mayor incidencia de RMS (Coffin, 2014).

Algunos de estos síndromes asociados a la predisposición a RMS presentan mutaciones inactivadoras en genes supresores de tumor, siendo el incremento del riesgo de cáncer su único fenotipo. Ejemplos de esta categoría son el síndrome de Li-Fraumeni (mutaciones germinales en *TP53*), el retinoblastoma (mutaciones germinales en *RB1*), el blastoma pleuropulmonar (mutaciones en *DICER1*) o pacientes con mutaciones en *APC* (Crucis, 2015).

Otros síndromes asociados a RMS causan malformaciones en el individuo. Entre los menos frecuentes están el síndrome de aneuploidía en mosaico variegada (mutaciones en *BUB1B*) o el síndrome de cáncer por no reparación de los errores de emparejamiento. Pocos casos han sido reportados de aparición de RMS asociado al síndrome de Beckwith-Wiedemann (deleción y LOH en el cromosoma 11p15) o al síndrome de Gorlin (mutaciones en *PTCH1*). Los síndromes con mayor riesgo de aparición de RMS son aquellos relacionados con mutaciones germinales en la vía de señalización RAS. Entre ellos se encuentran el síndrome de Noonan (mutaciones en *PTPN11*), la neurofibromatosis de tipo 1 (mutaciones en *NF1*) y el síndrome de Costello (mutaciones en *HRAS*), siendo este último el síndrome con mayor riesgo al desarrollo de RMS (Pinto, 2016).

1.1.1.8. Tratamiento

El tratamiento actual del RMS consiste en una estrategia multimodal que incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia. La radioterapia es utilizada para el control de enfermedad residual local microscópica o macroscópica, mientras que la quimioterapia es utilizada para la citorreducción primaria y para la erradicación de enfermedad metastática (Dagher, 1994). Los principios generales del tratamiento son (Gallego, 2010):

- **Quimioterapia:** todos los pacientes diagnosticados de RMS deben recibir quimioterapia. Los regímenes más ampliamente utilizados son VAC: vincristina, actinomicina D y ciclofosfamida; IVA: similar a VAC pero con ifosfamida en lugar de ciclofosfamida; VACA: VAC más adriamicina alternando con actinomicina D, y VAIA: IVA con adriamicina alternando con actinomicina D.

- **Cirugía:** es recomendable la extirpación quirúrgica inicial del tumor en pacientes con tumores resecables con el objetivo de obtener una extirpación con márgenes libres de enfermedad (Grupo I IRS). En caso de que la cirugía no sea posible o se prevea que será mutilante, se recomienda iniciar quimioterapia y realizar la cirugía después de ciclos iniciales de quimioterapia.
- **Radioterapia:** se recomienda radioterapia para todos los pacientes en los que la cirugía radical no sea posible y para aquellos pacientes que tras la cirugía presentan restos microscópicos o macroscópicos del tumor.

2. Vía de señalización Hedgehog

La vía señalización Hedgehog (HH) es considerada una de las reguladoras principales del desarrollo embrionario, ejerciendo papeles claves en la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y el patrón tisular. En insectos, las proteínas HH controlan la correcta segmentación y el desarrollo de las alas; en vertebrados inducen la asimetría izquierda-derecha y la correcta formación de las extremidades, el esqueleto, los músculos, la piel, los ojos, los pulmones, los dientes, el sistema nervioso, los intestinos y la diferenciación del esperma y el cartílago. En organismos adultos, esta vía de señalización ejerce funciones importantes en el mantenimiento de células madre, la reparación tisular y la regeneración de tejidos dañados (Heretsch, 2010). Los papeles específicos de la vía HH en estos procesos son diversos debido a su función como morfógeno, mitógeno o factor de supervivencia, dependiendo del contexto (Ingham, 2001). Dada la implicación de la vía HH en procesos biológicos tan importantes, no es sorprendente que la pérdida o reducción de esta vía de señalización esté asociada a numerosos déficits del desarrollo y malformaciones (Taipale, 2001) y que su activación aberrante tenga una papel causativo en la tumorigénesis (McMahon, 2003).

En general, las 3 proteínas HH presentes en mamíferos – llamadas *Sonic* (SHH), *Indian* (IHH) y *Desert* (DHH) – son los ligandos de los receptores transmembrana *Patched* (PTCH1 y PTCH2). En ausencia de ligando, PTCH inhibe la proteína transmembrana *Smoothed* (SMO), la cual es la transductora crucial de la señalización de la vía HH, controlando la función de la familia de factores de transcripción *Glioma-associated*

oncogen (GLI1, GLI2 y GLI3). Bajo la inhibición de SMO, las proteínas GLI formando un complejo con *Suppressor of fused homolog* (SUFU) son post-transcripcionalmente procesadas para generar represores transcripcionales de los genes diana de HH. La unión del ligando a PTCH produce la activación de SMO, que resulta en la activación y translocación de GLI2 y GLI3 al núcleo, donde actúan como activadores transcripcionales de los genes diana de HH. Las 3 dianas mejor conocidas de la vía son: *GLI1*, *PTCH1* y *HHIP* (*Hedgehog-interaction protein*), genes propios de la vía (**Figura I7**) (Roma, 2012; Pettigrew, 2014). Otros genes diana específicos del contexto celular son: *CCND1*, *MYC*, *BMI1*, *BCL2*, *VEGF* y *SNAI1* (Gupta, 2010).

2.1. Historia

La proteína HH fue identificada por C. Nüsslein-Volhard y E.F. Wieschaus a finales de 1970. Estos investigadores realizaron un cribaje genético para identificar los genes implicados en el patrón del cuerpo de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y describieron más de 50 genes diferentes con efecto directo en el desarrollo embrionario. La mutación en uno de estos genes causaba el crecimiento de una capa de espinas en el extremo inferior de las larvas. La similitud en apariencia entre estas larvas y un erizo (*hedgehog*, en inglés) llevó a denominar a este gen como gen *Hedgehog* (Nüsslein-Volhard, 1980). En 1993, los 3 genes parálogos en vertebrados al gen HH fueron identificados y denominados: *Sonic* (SHH), recibiendo el nombre del protagonista del videojuego de Sega Sonic, *Indian* (IHH) y *Desert* (DHH), ambos dos especies existentes de erizos (Echelard, 1993). Por este hito en la investigación en el campo de la genética del desarrollo embrionario, C. Nüsslein-Volhard y E.F. Wieschaus recibieron el premio Nobel de Medicina en 1995.

2.2. Vía Hedgehog canónica

2.2.1. Cilio primario

La vía HH requiere la presencia de una estructura ciliar para su activación (**Figura I7**) (Oro, 2007). La mayoría de células eucariotas contienen un cilio no motil, los cuales son

proyecciones de la membrana celular situadas en la zona apical de las células polarizadas. Están involucrados en la detección de señales mecánicas y químicas, actúan como centros de comunicación y controlan la diferenciación celular y la polarización (Goetz, 2010). El tráfico de proteínas por el cilio primario es dependiente de microtúbulos y está regulado por complejos multiproteicos. El tráfico de estos complejos, desde la base hasta la punta del cilio y viceversa, está regulado por motores moleculares anterógrados y retrógrados (Robbins, 2009).

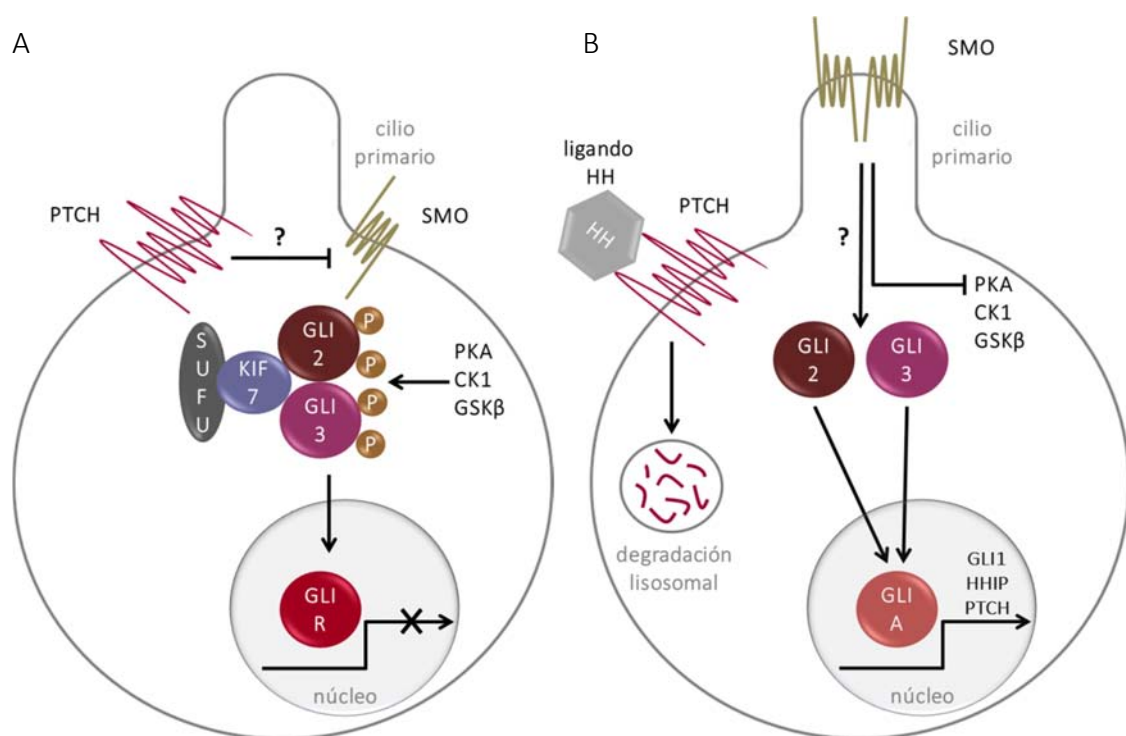


Figura 17. Representación de la vía de señalización HH. **A:** En ausencia de ligando HH, PTCH inhibe la formación de la forma activa de SMO mediante un mecanismo desconocido. Los factores de transcripción GLI2/3 son fosforilados por las quinazas PKA, CK1 y GSK3β, y ubiquitinizados para su degradación en el proteosoma; GLI2 es totalmente degradado y GLI3 es parcialmente degradado para generar su forma represora (GLI-R). GLI-R es translocado al núcleo donde inhibe la transcripción de los genes diana de HH. **B:** En presencia de ligando HH, este se une a PTCH, el cual es internalizado y degradado por el lisosoma. En ausencia de PTCH, se genera la forma activa de SMO en el cilio primario, dimeriza e inhibe las quinazas PKA, CK1 y GSK3β. Los factores de transcripción GLI2/3 son procesados en sus formas activas y transportados en el núcleo, donde activan la transcripción de los genes diana de HH: *GLI1*, *HHIP* y *PTCH*, entre otros. Imágenes basadas en Rubin (2006) y Heretsch (2010).

Tanto PTCH como SMO presentan un tráfico dinámico en el cilio primario de forma dependiente de HH (Rohatgi, 2007). En ausencia de ligando, PTCH se encuentra en la base del cilio primario y SMO no está asociado a él, el transporte intraflagelar evita la acumulación de SMO en el cilio (Corbit, 2005). Las formas completas de las proteínas GLI2 y GLI3 asociadas a SUFU, un importante regulador negativo de la vía HH, presentan un tráfico basal por el cilio, permitiendo que las proteínas GLIs sean hiperfosforiladas. Estas fosforilaciones están reguladas por KIF7 (*Kinesin family member 7*), que actúa como adaptador para las quinasas: PKA (*Protein kinase A*), GSK3 β (*Glycogen synthase kinase-3 beta*) y CK1 (*Casein kinase 1*) (Wang, 2000). Después de la ubiquitinización, GLI3 es parcialmente degradado por el proteosoma para generar su forma represora (GLI3-R) y GLI2 sufre una degradación completa (Heretsch, 2010). Posteriormente, GLI3-R abandona el cilio primario y se transloca al núcleo, donde reprime la transcripción de los genes diana de HH.

En respuesta a ligando, PTCH es translocado fuera del cilio primario y es degradado en los lisosomas. La forma activa de SMO se moviliza hacia el cilio. También se ha observado una acumulación de las formas completas de GLI2 y GLI3 asociadas a SUFU en la punta del cilio (Chen, 2009; Humke, 2010; Kim, 2009). Aunque se desconoce el mecanismo de interacción entre SMO y las proteínas GLI, diversas líneas de evidencia proponen que la forma activa de SMO inhibe a PKA, evitando así la degradación de GLI en el proteosoma (Niewiadomski, 2014). La estructura ciliar es imprescindible para que las formas completas de GLI2 y GLI3 sean diferencialmente fosforiladas y desasociadas de SUFU. Estas modificaciones permiten generar las formas activadoras de GLI2 y GLI3 (GLI-A), las cuales son translocadas al núcleo donde activan la expresión de los genes diana de HH. Se desconoce si coinciden el conjunto de genes diana de GLI-R y GLI-A. Las formas GLI-A son muy lábiles y rápidamente degradadas por el proteosoma (Humke, 2010; Robbins, 2013). Los genes diana de HH – *GLI1*, *PTCH1* y *HHIP* – son reguladores positivos y negativos de la propia vía, que provocan la retroalimentación de la misma, aumentando o reprimiendo la respuesta a ligando. Dependiendo del tipo celular, otros genes diana de HH son *CCND1*, *MYC*, *BMI1*, *BCL2*, *VEGF* y *SNAI1*, los cuales regulan la diferenciación, la proliferación y la supervivencia celular (Gupta, 2010).

Estas observaciones sugieren que la principal función del cilio primario en la vía HH es atenuar la función de SUFU. También se ha propuesto que SUFU se podría asociar a GLI1, atribuyendo al cilio primario un nivel adicional de control de la sobre-activación de GLI1 (Humke, 2010).

2.2.2. Ligandos Hedgehog

Los múltiples genes HH de los vertebrados han surgido presumiblemente por duplicación y subsecuente divergencia de un único gen HH ancestral. Aunque los 3 ligandos presentes en mamíferos presentan una elevada homología, SHH es más cercano a IHH que a DHH en identidad de secuencias (**Figura 18**). Su elevada homología sugiere que podrían tener actividades idénticas o superpuestas. No obstante, han sido descritas diferencias en su capacidad de provocar respuestas funcionales específicas (Pathi, 2001; Hoppe, 2005). Pathi et al. demostraron que el orden de potencia es SHH > IHH > DHH, con SHH y IHH más estrechamente relacionados en términos de potencia de activación de sus genes diana y función (Pathi, 2001). Estas diferencias reflejan mecanismos desconocidos de modulación de la vía HH durante el desarrollo y sugieren que las diferentes isoformas tienen capacidades funcionales específicas e individuales. Ha sido postulado que SHH mantiene roles ancestrales en el desarrollo embrionario, dejando a los genes *IHH* y *DHH* libres para divergir y adquirir nuevos roles (Kumar, 1996).

SHH, el ligando más estudiado, está implicado en el establecimiento del eje izquierdo-derecho en embriones, la regulación del destino de las células ventrales en el sistema nervioso central y en la especificación del eje anterior-posterior en las extremidades, entre otros procesos (Pathi, 2001). IHH tiene un papel esencial en la formación y mantenimiento del hueso y cartílago, modulando la condrogénesis y actuando como regulador negativo de la diferenciación de los condrocitos proliferantes y de las células del pericondrio (Vortkamp, 1996). También ha sido descrita su función en el desarrollo de las células T, la implantación del embrión y la diferenciación de los enterocitos (Kakanj, 2013). DHH está implicado en la proliferación de las células germinales, en el desarrollo de estas células hacia los estadios tardíos de la espermatogénesis, en la

interacción nervio-células de Shann y en la señalización de los nervios periféricos (Pettigrew, 2013).

```

* **** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Shh  C24GPGRGF-G- KRRHPKK-LTP LAYKQFIPNV AEKTLGASGR YEGKISRNSE
Ihh  C28GPGRV-VGS RRRPPRK-LVP LAYKQFSPNV PEKTLGASGR YEGKIARSSE
Dhh  C23GPGRGPVG- RRRYARKQLVP LLYKQFVPGV PERTLGASGP AEGRVARGSE

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Shh  RFKELTPNYN PDIIFKDEEN TGADRLMTQR CKDKLNALAI SVMNQWPGVK
Ihh  RFKELTPNYN PDIIFKDEEN TGADRLMTQR CKDRLNSLAI SVMNQWPGVK
Dhh  RFRDLVPNYN PDIIFKDEEN SGADRLMTER CKERVNALAI AVMMNWPGVR

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Shh  LRVTEGWDED GHHSEESLHY EGRAVDITTS DRDRSKYGML ARLAVEAGFD
Ihh  LRVTEGWDED GHHSEESLHY EGRAVDITTS DRDRNKYGLL ARLAVEAGFD
Dhh  LRVTEGWDED GHHAQDSLHY EGRALDITTS DRDRNKYGLL ARLAVEAGFD

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Shh  WVYYESKAHI HCSVKAENSV AAKSGG197
Ihh  WVYYESKAHV HCSVKSEHSA AAKTGG202
Dhh  WVYYESRNVH HVSVKADNSL AVRAGG198

```

Figura 18. Alineamiento de las secuencias del extremo N-terminal de las proteínas humanas SHH, IHH y DHH. Los guiones representan los espacios introducidos para facilitar el alineamiento. Los residuos conservados en las 3 secuencias están indicados con un asterisco. SHH e IHH tienen un 91% de identidad, SHH y DHH un 76% e IHH y DHH un 80%. Imagen y texto obtenidos de Pathi (2001).

La actividad de los ligandos HH está íntimamente relacionada a una compleja secuencia de modificaciones post-traduccionales. Los ligandos HH son expresados como preproteínas que son sometidas a procesamientos auto-catalíticos (**Figura 19**). Estas proteínas son sintetizadas como precursores de aproximadamente 45 kDa y están compuestas por un péptido señal con una secuencia de direccionamiento al retículo endoplasmático, un dominio señalizador N-terminal y un dominio auto-procesador C-terminal con actividad auto-proteolítica y colesterol transferasa. Tras la traducción de la preproteína, ésta es translocada al retículo endoplasmático donde el péptido señal es escindido y el fragmento N-terminal es cortado auto-catalíticamente entre los residuos glicina-cisteína del extremo C-terminal. Una molécula de colesterol es añadida al nuevo extremo C-terminal del fragmento señalizador de 19 kDa. Subsecuentemente, un grupo palmitol es añadido al extremo N-terminal por la enzima HHAT (*HH acyl transferase*) para producir una molécula doblemente lipidada con elevada capacidad señalizadora (Mann, 2012). Las moléculas procedas son retenidas en las células por su cola de colesterol o secretadas de forma activa gracias a las proteínas *Dispatched* (DISP)

y *Scube2* (SCUB2) (Pettigrew, 2013). Mutaciones que interrumpen el procesamiento de los ligandos HH han sido relacionadas con desordenes en el desarrollo, como por ejemplo, la holoprosencefalia (Ryan, 2012).

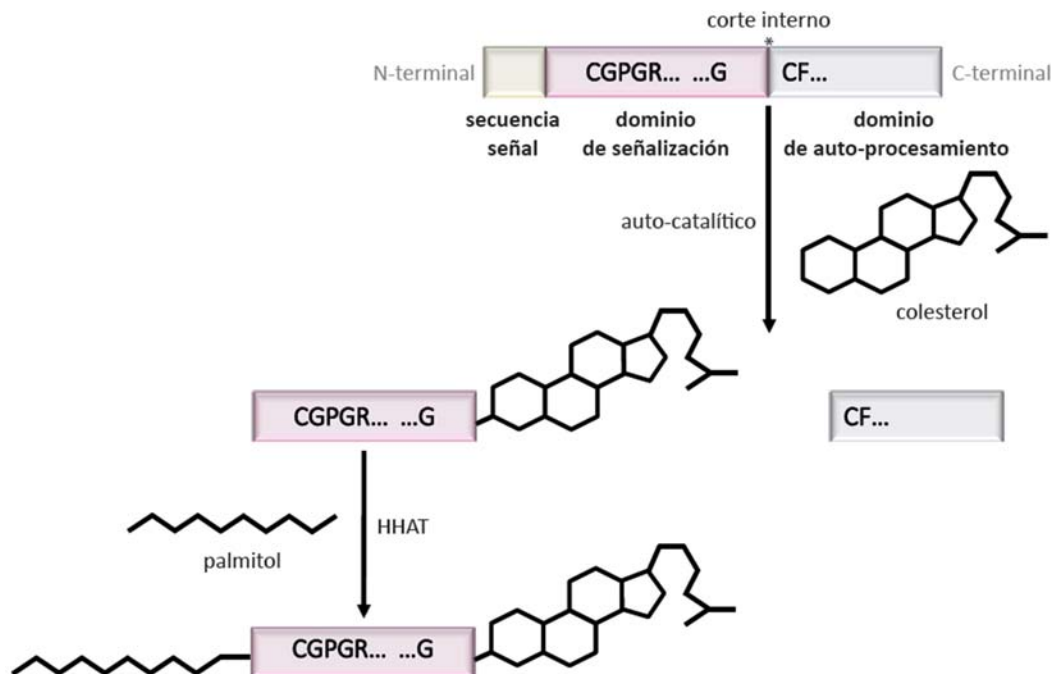


Figura I9. Maduración de las proteínas HH. Los genes HH codifican por unos precursores de 45 kDa que sufren una proteólisis interna en una secuencia conservada glicina-cisteína-fenilalanina (GCF). Este corte endocatalítico está catalizado por el dominio C-terminal. El fragmento N-terminal (dominio señalizador) es modificado en su extremo C-terminal por un colesterol y en su extremo N-terminal es palmitoiloado por la enzima HHAT (*Hedgehog acyltransferase*). Imagen basada en Heretsch (2010).

2.2.3. Receptores Hedgehog

Patched (PTCH) es el receptor de los ligandos HH, uniéndose a ellos con una afinidad del rango nanomolar. PTCH presenta 12 dominios transmembrana con 2 grandes *loops* extracelulares (**Figura I7**). En base a su topología, PTCH presenta una elevada homología a la familia de transportadores bacterianos RND (*resistance-nodulation-division*) (Taipale, 2002). También contiene un dominio de detección de esteroides, motivo presente en proteínas que se unen a colesterol. Las mutaciones en este dominio afectan la habilidad de PTCH de regular la expresión de los genes diana de HH, sin

afectar su habilidad de unirse a los ligandos (Chen, 1996). En mamíferos, existe un segundo gen *PTCH* – *PTCH2* – que codifica para una proteína ligeramente menor que *PTCH1* pero con una topología similar. La transcripción de los genes *PTCH* está directamente regulada por los factores de transcripción *GLI* y son sobre-expresados en respuesta a los ligandos *HH* (Goodrich, 1996).

Existen otras moléculas *HH* situadas en la membrana celular que actúan como co-receptores de los ligandos *HH*, potenciando su unión a *PTCH*. Los co-receptores *HH* son *GAS1* (*Growth arrest-specific protein 1*) y las moléculas de adhesión *CDO* (*Cysteine dioxygenase type 1*) y *BOC* (*Brother of CDO*). En cambio, *HHIP* (*Hedgehog-interaction protein*) es un regulador negativo que compite con *PTCH* por la unión de los ligandos (Heretsch, 2010).

2.2.4. Smoothened

Smoothened (*SMO*) es una proteína formada por 7 dominios transmembrana que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (**Figura 17**) (Kristiansen, 2004). *SMO* es considerada la reguladora clave de la señalización de la vía *HH*. Varios estudios han demostrado que la estimulación de *HH* está asociada a cambios en el estado de fosforilación y la localización subcelular de *SMO*. Existen 3 diferentes estados de *SMO*: una forma inactiva internalizada (*SMO A*), la cual está en equilibrio con la forma inactiva unida al cilio (*SMO B*) y una forma activa (*SMO C*) (Zhao, 2007; Rohatgi, 2009). Zhao *et al.* demostraron que *SMO* forma dímeros, los cuales sufren cambios conformacionales entre la forma abierta y activa (*SMO C*) y la forma cerrada e inactiva (*SMO B*). Estos cambios conformacionales son atribuidos a fosforilaciones en la región intracelular de *SMO* producidas por *CK1* y *GRK2* (*G protein-coupled receptor kinase 2*) (Zhao, 2007; Chen 2013). No obstante, los mecanismos de regulación de la activación de *SMO* y de los componentes subyacentes no están bien establecidos.

En ausencia de ligando, *PTCH* inhibe a *SMO*. Más concretamente, *PTCH* inhibe la activación de *SMO* (de la forma B a C) mediante un mecanismo aún desconocido (Chen, 2002; Heretsch, 2010). Los estudios realizados sugieren que *PTCH* inhibe a *SMO* de

forma catalítica debido a que una molécula de PTCH es suficiente para inhibir varias moléculas de SMO. La idea de un modelo estequiométrico, en el que PTCH se une a SMO, ha sido abandonada. Se ha propuesto que PTCH podría modular la función de SMO mediando su interacción con pequeñas moléculas endógenas (por ejemplo esteroides), aunque no ha sido identificada aún ninguna molécula (Chen, 2002; Rohatgi, 2007).

2.2.5. Factores de transcripción GLI

La actividad combinatoria de GLI1, GLI2 y GLI3 regula la expresión de los genes diana de HH. GLI2 es el principal activador de la vía HH y GLI3 el principal represor. La actividad de ambas proteínas está regulada por diversas modificaciones post-traduccionales (Robbins, 2013). En cambio, GLI1 no sufre este tipo de modificaciones. GLI1 funciona principalmente como un activador de la respuesta transcripcional de HH (Abbasi, 2009).

En ausencia de ligando, la forma completa de GLI3 es parcialmente proteolizada de forma que se degrada su dominio de activación situado en el extremo C-terminal, convirtiéndola en su forma represora (GLI3-R). En cambio, la forma completa de GLI2 es totalmente degradada. En presencia de ligando, el procesamiento proteolítico es bloqueado, permitiendo que las formas completas de GLI2 y GLI3 se acumulen y sean subsecuentemente convertidas en activadores transcripcionales (GLI-A). En respuesta a HH, la transcripción de GLI1 aumenta. Este incremento en los niveles de GLI1 es ampliamente utilizado como biomarcador para determinar la activación de la vía HH (Scales, 2009).

Las fosforilaciones en las proteínas GLI2 y GLI3 son las modificaciones que regulan la conversión en sus formas activadoras o represoras en respuesta a HH. La quinasa PKA puede fosforilar GLI2 y GLI3 en 6 residuos serina conservados (P1-6) localizados en el extremo C-terminal del dominio *zinc finger* de unión a ADN. La fosforilación de los 4 primeros residuos (P1-4) por parte de PKA inicia el proceso que conlleva el procesamiento de las formas completas de GLI2 y 3 en el proteosoma; se desconoce la función de los dos residuos restantes (P5,6). Tras la unión del ligando a PTCH, la activación de SMO reduce la fosforilación de los residuos P1-6. Esta desfosforilación

permite la fosforilación en otro *cluster* y la subsecuente formación de las formas activadoras de GLI (Niewiadomski, 2013).

2.3. Vía Hedgehog no canónica

Existen 2 tipos de vía HH no canónicas (Brennan, 2012):

- **Tipo I:** funciones de PTCH1 independientes a su actividad inhibitoria sobre SMO.
- **Tipo II:** opera mediante funciones de SMO más allá de la regulación de GLI.

2.3.1. Vía Hedgehog no canónica de tipo I

La vía HH no canónica de tipo I está mediada exclusivamente por PTCH y está implicada en la regulación de la apoptosis y del ciclo celular (Robbins, 2013).

Diversos estudios sugieren que PTCH1 puede inducir apoptosis de forma independiente de la vía canónica, posicionando a esta proteína transmembrana como receptor de dependencia. Como otros receptores de este tipo, PTCH1 contiene un motivo C-terminal citoplasmático que es sustrato de las caspasas -3, -7 y -8 (Thibert, 2003). PTCH1 se asocia a un complejo proteico esencial para la inducción de la apoptosis, el cual es quebrantado en presencia de ligando (Mille, 2009). No obstante, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual PTCH1 induce apoptosis en ausencia de ligando HH.

La vía HH no canónica regula el ciclo celular al nivel de la *Ciclina B1*. Esta ciclina está involucrada en el punto de control G2/M y su activación es esencial para la progresión mitótica (Brennan, 2012). Más concretamente, se ha descrito que PTCH1 interacciona con la forma fosforilada de *Ciclina B1*, impidiendo su translocación nuclear. La unión de ligando a PTCH1 bloquea esta interacción y permite la progresión del ciclo celular (Barnes, 2001).

2.3.2. Vía Hedgehog no canónica de tipo II

La vía HH no canónica de tipo II está mediada exclusivamente por SMO y está implicada en la remodelación del citoesqueleto, el crecimiento axonal y la regulación de iones de calcio (Robbins, 2013).

Numerosos estudios han implicado la vía HH no canónica en la regulación del citoesqueleto de actina, activando la familia Rho de GTPasas, como por ejemplo RHOA y RAC1. En células endoteliales, los ligandos HH promueven la formación de fibras de actina y la tubulogénesis mediante la activación de RHOA dependiente de SMO (Renault, 2010). También se ha demostrado que SHH estimula la migración de fibroblastos mediante la activación de Rho GTPasas (Polizio, 2011).

También se ha descrito el control de la orientación axonal dependiente de SMO. SHH actúa como quimiotáxico, las neuronas proyectan sus axones hacia la fuente de SHH en minutos, respuesta para la cual es necesaria la presencia de SMO (Robbins, 2013).

SMO puede actuar como un receptor acoplado a proteína G, en la estimulación de los cuales implica un segundo mensajero como son los iones de calcio. Se ha demostrado que SHH induce de forma dosis dependiente el incremento de iones de calcio en la médula espinal (Belgacem, 2011). Por otra parte, ha sido reportada la capacidad de los iones de calcio de inducir la expresión de los ligandos HH (Brennan, 2012).

2.4. El papel de la vía Hedgehog en cáncer

En los últimos años se ha demostrado que la activación aberrante de la vía HH conduce a la tumorigénesis en una amplia variedad de tejidos. Más concretamente, se ha descrito la desregulación de esta vía en muchos tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma de células basales (BCC, de inglés *basal cell carcinoma*), meduloblastoma (MB), cáncer de pulmón de células pequeñas y tumores del tracto digestivo, entre muchos otros, en los cuales promueve la proliferación celular, la progresión del tumor, la metástasis y la resistencia a terapia (Teglund, 2010).

El primer indicio de la implicación de la vía HH en cáncer fue la identificación de mutaciones inactivadoras de *PTCH1* en pacientes afectados del síndrome de Gorlin. Los pacientes con este síndrome hereditario presentan una mayor incidencia de BCC, MB y RMS. Por consiguiente, el origen de este síndrome es la activación constitutiva de la vía HH debido a mutaciones inactivadoras del gen supresor tumoral *PTCH1* (Hahn, 1996; Johnson, 1996).

2.4.1. Modelos de activación de la vía Hedgehog en cáncer

Se han propuesto 3 modelos de activación de la vía HH en cáncer. El tipo I, que fue el primero que se descubrió, incluye cánceres con mutaciones en componentes de la vía HH y que por ende son cánceres independientes de ligando. El tipo II corresponde a cánceres con activación dependiente de ligando de forma autocrina, significando que los ligandos HH son producidos por las propias células tumorales y actúan sobre ellas. Los cánceres de tipo III también son dependientes de ligando pero de forma paracrina, los ligandos son secretados por las células tumorales y recibidos por las células del estroma, en las cuales inducen la expresión de factores de crecimiento y supervivencia que son retornados a las células tumorales. Existe una versión del tipo III, denominada paracrina reversa, en la que los ligandos HH son secretados por las células del estroma y recibidos por las células tumorales (**Figura I10**) (Scales, 2009).

2.4.1.1. Activación de tipo I: independiente de ligando

Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, los pacientes con síndrome de Gorlin presentan una mayor incidencia de BCC, MB y RMS debido a mutaciones inactivadoras o pérdida de heterocigosidad del gen *PTCH1* en la línea germinal. Asimismo, se han identificado mutaciones somáticas de *PTCH1* en más del 90% de BCC esporádicos, en el 20% de MB y el 33% de tumor odontogénico queratoquístico (Vorechovský, 1997; Epstein, 2008; Sun, 2008). La inactivación de *PTCH1* conlleva a la activación constitutiva de la vía HH aún en ausencia de ligando. También se han identificado mutaciones activadoras de *SMO* en BCC, MB y meningiomas (Reifenberger,

1998; Lam, 1999; Brastianos, 2013). Se ha demostrado que estas mutaciones en *SMO*, que provocan la activación aberrante de la vía HH, promueven la tumorigénesis (Mao, 2006). También ha sido reportada la pérdida de heterocigosidad de *SUFU* en el 10% de MB (Brugieres, 2012). Asimismo, han sido identificadas pérdidas de heterocigosidad de *PTCH1* y *SUFU* en casos esporádicos de RMS (Tostar, 2006). Estas pérdidas de heterocigosidad de *SUFU* también provocan la activación de la vía HH en ausencia de ligando. Adicionalmente, la amplificación génica de componentes de la vía, como por ejemplo *GLI1*, también conlleva la activación aberrante de HH (**Figura 110-A**) (Heretsch, 2010). Los análisis actuales de secuenciación del genoma de tumores han permitido corroborar las mutaciones de *PTCH1* en MB y detectar mutaciones somáticas de este gen en otros tipos de cáncer, tales como el cáncer de ovario y el cáncer de endometrio. No obstante, estas mutaciones son mutaciones puntuales no sinónimas, y a diferencia del BCC y el MB, se desconoce su relevancia en el proceso de tumorigénesis (Amakye, 2013).

La relevancia funcional de las alteraciones genéticas en la vía HH ha sido estudiada en modelos murinos. Mientras la pérdida en homocigosis de *PTCH1* es letal, su pérdida en heterocigosis resulta en fenotipos parecidos al síndrome de Gorlin, con una elevada tendencia a desarrollar MB (Hahn, 1998). También ha sido demostrado el papel crucial de la señalización de *GLI1* para la tumorigénesis, la inactivación de *GLI1* en ratones heterocigotos de *PTCH* redujo de forma significativa el crecimiento de tumores de MB (Kimura, 2005). Además, la expresión transgénica de *GLI1* en la piel de ratones inducía la formación de tumores en este tejido, incluyendo BCC (Nilsson, 2000). Por lo tanto, la activación canónica de la vía HH mediante la pérdida de *PTCH* o *SUFU* o la activación de *SMO* o *GLI1* demuestra el papel de esta vía en el desarrollo tumoral (Amakye, 2013).

Las terapias inhibitoras de la vía HH en los cánceres de tipo I solo serán exitosas si están dirigidas a componentes situados debajo de la mutación adquirida (Heretsch, 2010).

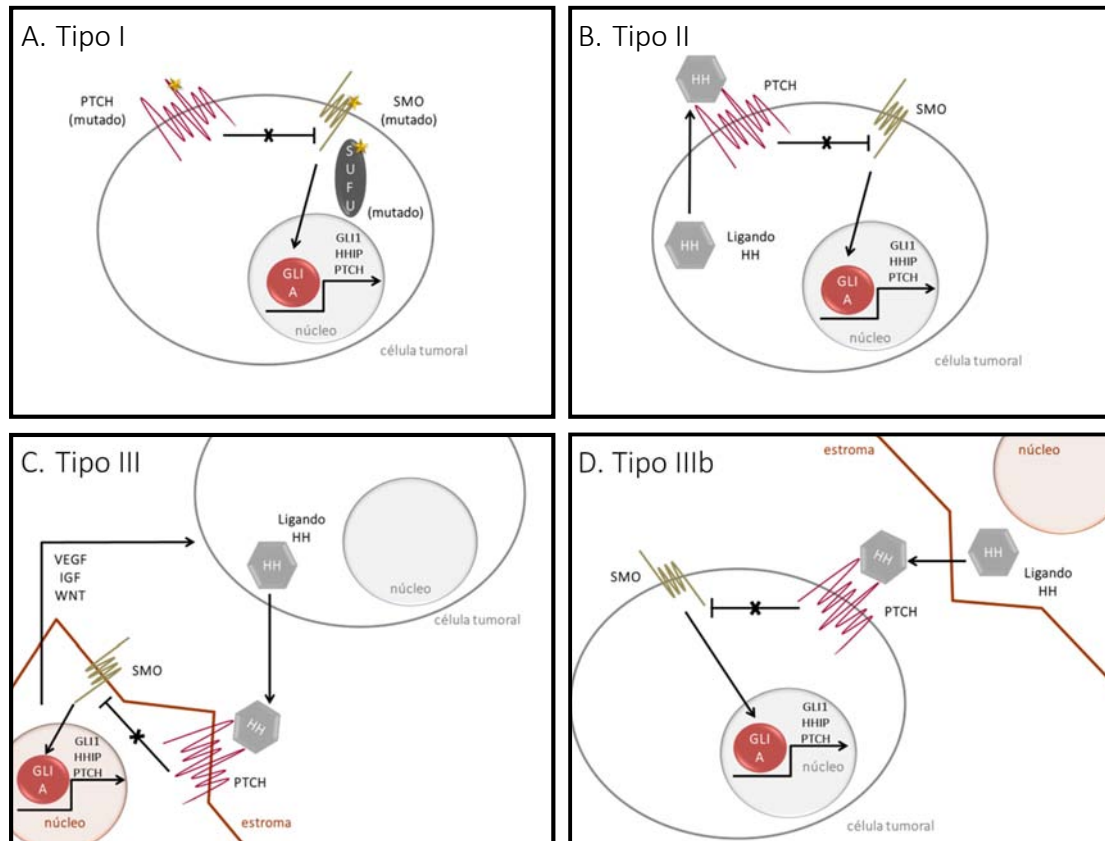


Figura I10. Modelos de activación de la vía HH en cáncer. **A:** Los tumores de tipo I son independientes de ligando. La vía HH está sobre-activada debido a mutaciones activadoras de SMO o inactivadoras de *PTCH* o *SUFU*. **B:** Los tumores de tipo II presentan una activación autocrina de la vía HH, las propias células tumorales producen y responden a los ligandos HH. **C:** Los tumores de tipo III presentan una activación paracrina de la vía HH. Las células tumorales secretan los ligandos HH al estroma, el cual responde creando un ambiente que promueve el crecimiento tumoral. **D:** Los tumores del tipo IIIb corresponden a un activación de la vía HH paracrina reversa. Los ligandos HH son secretados por las células del estroma y promueven el crecimiento de las células tumorales. Figura basada en Heretsch (2010).

2.4.1.2. Activación de tipo II: autocrina dependiente de ligando

En una amplia variedad de tumores ha sido detectada la activación constitutiva de la vía HH, entre ellos tumores cerebrales, de pulmón, estómago, esófago, páncreas, próstata, mama e hígado (Rubin, 2006). Estos tumores, a diferencia del BCC o del MB, no presentan mutaciones en los componentes de la vía HH sino que presentan una activación autocrina, dependiente de ligando (**Figura I10-B**). La mayoría de estos tumores presentan una elevada expresión de ligandos HH y/o una expresión ectópica de PTCH1 y GLI1 en el compartimento epitelial. Los ligandos HH, producidos por las propias células tumorales, pueden actuar sobre ellas mismas (activación autocrina) o

sobre las células tumorales vecinas (activación juxtacrina) para promover el crecimiento tumoral y la supervivencia (Gupta, 2010).

Estos tumores con activación autocrina de la vía HH pueden responder a moléculas neutralizantes de ligandos e inhibidores de SMO.

2.4.1.3. Activación de tipo III: paracrina dependiente de ligando

En los mecanismos de activación paracrina de la vía HH dependiente de ligando, los ligandos HH son secretados por las células tumorales para regular positivamente la vía en el estroma que envuelve el tumor. En respuesta a esta activación, las células del estroma secretan factores de crecimiento que estimulan el crecimiento tumoral (**Figura 110-C**) (Scales, 2009). Múltiples evidencias, obtenidas en estudios con xenotrasplantes de tumores humanos de cáncer de páncreas y colon en modelos murinos, apoyan la existencia de la activación paracrina de HH. Mientras que los tumores expresaban elevados niveles de los ligandos, tan sólo en las células del estroma murino fueron detectados elevados niveles de los genes diana de HH. El uso de inhibidores de la vía HH en estos modelos suprimieron el crecimiento celular y redujeron los niveles de expresión de los genes diana de HH en el estroma (Yauch, 2008). Asimismo, en muestras de tumores humanos de páncreas, próstata y metástasis de cáncer de colon se detectaron los ligandos HH en las células epiteliales y GLI1 en estroma, sugiriendo que el mecanismo de activación paracrina observado en modelos murinos es válido en humanos (Scales, 2009).

El mecanismo preciso mediante el cual la estimulación de la vía HH regula positivamente el crecimiento tumoral es desconocido. No obstante, se ha propuesto que los ligandos HH regulan la expresión de IGF, WNT o VEGF en las células del estroma, que a su vez provocan el crecimiento tumoral (Gupta, 2010).

La inhibición de la señalización paracrina puede tener valor terapéutico debido a los resultados obtenidos en experimentos en los que la inhibición de la vía HH en el estroma resultó en la reducción de tumores xenotransplantados (Yauch, 2008). No obstante, la estrategia más efectiva para tratar estos tumores con activación paracrina

sería posiblemente la combinación de inhibidores de la vía HH para el estroma y otros fármacos específicos para las células tumorales (Gupta, 2010).

Una variante de este tipo de activación de la vía HH recibe el nombre de señalización paracrina reversa, en la cual los ligandos HH son secretados por las células del estroma y recibidos por las células del tumor (**Figura I10-D**) (Heretsch, 2010). Hasta la actualidad, este subtipo de activación sólo ha sido identificado en linfomas y en el mieloma múltiple, en los cuales los ligandos son secretados por el estroma de la médula ósea (Dierks, 2007; Amakye, 2013).

2.4.2. Vía Hedgehog no canónica en cáncer

La señalización de la vía HH no canónica presenta una amplia variedad de funciones fisiológicas, tal y como se ha detallado anteriormente (*vide supra* apartado 2.3). No obstante, pocos casos han sido observados en modelos de cáncer (Marini, 2011).

En líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas ha sido descrito que *KRAS* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) activa los factores de transcripción GLI de forma independiente de SMO. Esta activación de GLI parece ser necesaria para la tumorigénesis mediada por *KRAS* (Ji, 2007). De forma similar, mutaciones de *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) en melanoma también promueve el crecimiento tumoral y la metástasis mediada por la activación de GLI. Se ha sugerido que estas mutaciones en *RAS* promueven la activación de GLI mediante las vías RAS/RAF, MAPK/ERK y PI3K/AKT (Stecca, 2007). No obstante, la evidencia más clara de una señalización HH no canónica en cáncer corresponde a la activación de GLI2 mediada por TGF- β 1 (*Transforming growth factor beta 1*) en el proceso de metástasis del cáncer de mama al hueso (Johnson, 2011).

Presumiblemente, existe un solapamiento entre la vía canónica y no canónica de HH. Por ejemplo, ambas vías median mecanismos anti-apoptóticos aunque mediante procesos diferentes: la vía no canónica mediante la inhibición de PTCH como receptor de dependencia (*vide supra* apartado 2.3.1) y la vía canónica mediante la activación de BCL2 (*B-cell lymphoma 2*). Este solapamiento dificulta establecer la contribución de la

vía no canónica a un determinado fenotipo y entender como interaccionan ambas vías (Marini, 2011).

2.4.3. Inhibidores de la vía Hedgehog

Una amplia variedad de tumores presentan una activación aberrante de la vía de señalización HH mediante varios mecanismos, tal y como se ha detallado anteriormente (*vide supra* apartado 2.4.1). Conocer el mecanismo específico de activación de la vía en cada tipo de neoplasia es esencial para seleccionar la estrategia óptima de inhibición. En tumores del tipo I como el BCC y el MB, originados por mutaciones en componentes de la vía HH que causan la activación constitutiva de la misma, podrían ser adecuadamente tratados con inhibidores que actúen por debajo de dichas mutaciones. En cambio, aquellos tumores con activación autocrina o paracrina serían tratados más efectivamente combinando inhibidores HH con agentes citotóxicos (Scales, 2009).

La ciclopamina fue el primer inhibidor HH identificado, la cual se une e inactiva SMO. No obstante, la ciclopamina no es un agente terapéutico adecuado debido a su baja solubilidad, baja potencia, toxicidad no específica e inestabilidad química (Lipinski, 2008). Este hecho ha potenciado el desarrollo de nuevos inhibidores de la vía HH. Para ello, han sido desarrollados varios ensayos *in vitro* utilizando reporteros dependientes de la transcripción de GLI1 (Ng, 2013).

Aunque SMO ha sido denominado el componente de la vía HH más “inhibible” y la mayoría de los inhibidores actualmente utilizados van dirigidos a él, otros componentes de la vía HH pueden ser inhibidos obteniendo el mismo resultado (Heretsch, 2010).

2.4.3.1. Descubrimiento de la ciclopamina

En la década de los 90, P.A. Beachy y sus colaboradores centraron sus investigaciones en la búsqueda de pequeñas moléculas inhibitoras de la vía HH. Estos investigadores aplicaron su conocimiento sobre la vía en un ámbito científico aparentemente diferente: recordaron un extraño incidente que ocurrió en el estado de Idaho en 1950.

Una década después de la Segunda Guerra Mundial, aproximadamente el 25% de los corderos recién nacidos en los montes de Idaho presentaban graves defectos craneofaciales. Estos defectos, denominados holoprosencefalia, implicaban ciclopía y otros defectos cerebrales. Finalmente, los pastores pidieron ayuda al Departamento de Agricultura cuando la enfermedad adquirió proporciones endémicas y las pérdidas económicas fueron notables. Uno de los científicos enviados, Lynn F. James, vivió 3 veranos con las ovejas y observó que en tiempos de sequía las ovejas se movían a montes más elevados y pastaban en zonas donde abundaba la planta silvestre *Veratrum californicum*. Posteriormente, un investigador especialista en plantas venenosas llamado R.F. Keeler averiguó la conexión entre el consumo de *V. californicum* por parte de ovejas preñadas en su día 14 de gestación y la aparición de ciclopía en su descendencia (Binns, 1968; Keeler, 1969). Sólo 3 compuestos alcaloides extraídos de *V. californicum* poseían la capacidad de inducir ciclopía en embriones, el más activo del cual fue llamado ciclopamina (**Figura I11**) (Keeler, 1970).

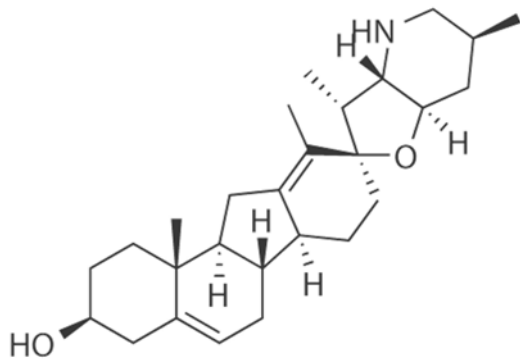


Figura I11. Estructura de la ciclopamina. Imagen obtenida de Heretsch (2010).

Beachy y sus colaboradores conocían que casos graves de síndrome de Smith-Lemli-Opitz (un defecto en la síntesis de colesterol causado por el déficit del enzima 3 beta-hidroxiesteroide-delta 7-reductasa, que convierte el 7-dehidrocolesterol (7DHC) en colesterol) también presentaban holoprosencefalia y propusieron que la ciclopamina podría actuar como inhibidor de la síntesis de colesterol. En 1998, Beachy y sus colaboradores refutaron esta primera hipótesis y demostraron que la ciclopamina es un inhibidor de la vía HH. Más concretamente, demostraron que interacciona con SMO,

induce su acumulación en el cilio e inhibe su actividad provocándole un cambio conformacional a su forma cerrada, incluso en presencia de ligando HH (Cooper, 1998).

2.4.3.2. Inhibidores de Smoothened

En los últimos años han sido desarrollados una amplia gama de compuestos inhibidores de SMO, con estructuras que difieren de la ciclopamina pero que conservan su lugar de unión a SMO. Más concretamente, ha sido descrito que se unen a un segmento de la sexta membrana de éste (Rominger, 2009). Estos derivados presentan una mayor potencia que la ciclopamina, en algunos casos hasta 100 veces mayor, y todos ellos pueden ser suministrados oralmente (Lin, 2012).

Todos los inhibidores HH que se evalúan actualmente en ensayos clínicos son antagonistas de SMO. Los más potentes y específicos – Vismodegib (GDC-0449), BMS-833923, Saridegib (IPI-926), Sonidegib (LDE225), PF-04449913, LY2940680, LEQ 506, y TAK-441 – han sido desarrollados y evaluados clínicamente (**Figura I12**) (Justilien, 2015). Hasta la actualidad, estos 8 inhibidores han sido evaluados en más de 140 ensayos clínicos en cánceres de estadios avanzados (www.clinicaltrials.gov) (**Tabla I6**). Varios de estos compuestos han inducido la reducción tumoral en pacientes de MB y BCC. Estos resultados, conjuntamente con la aprobación de Vismodegib para el tratamiento del BCC avanzado, apuntalan la vía HH como diana terapéutica en cáncer (Ng, 2013).

En enero del 2012, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó el Vismodegib para el tratamiento de pacientes con BCC metastásico o localmente avanzado que han recidivado después de la cirugía o que no son candidatos para cirugía ni radiación; convirtiéndose en el primer inhibidor de la vía HH aprobado por esta agencia (**Figura I13-A**). Este fármaco se subministra en cápsulas para ser administradas por vía oral y se recomienda una dosis de 150mg/día (Fellner, 2012). Vismodegib fue aprobado en base al porcentaje de tumores que respondieron a este inhibidor: el 30% en pacientes con BCC metastásico y el 43% en pacientes con BCC localmente avanzado. Se han obtenido resultados similares en BCC con los inhibidores Sonidegib (LDE-225), BMS-833923 (XL139) y Saridegib (IPI-926). También ha sido reportada respuesta tumoral en

pacientes de MB tratados con Vismodegib y Sonidegib (Amakye, 2013). En julio de 2015, Sonidegib también fue aprobado por la FDA para el BCC avanzado (Figura I13-B). El antagonista de SMO – PF-04449913 – también está proporcionando resultados alentadores en pacientes con neoplasias hematológicas (Jamieson, 2011; Martinelli, 2015).

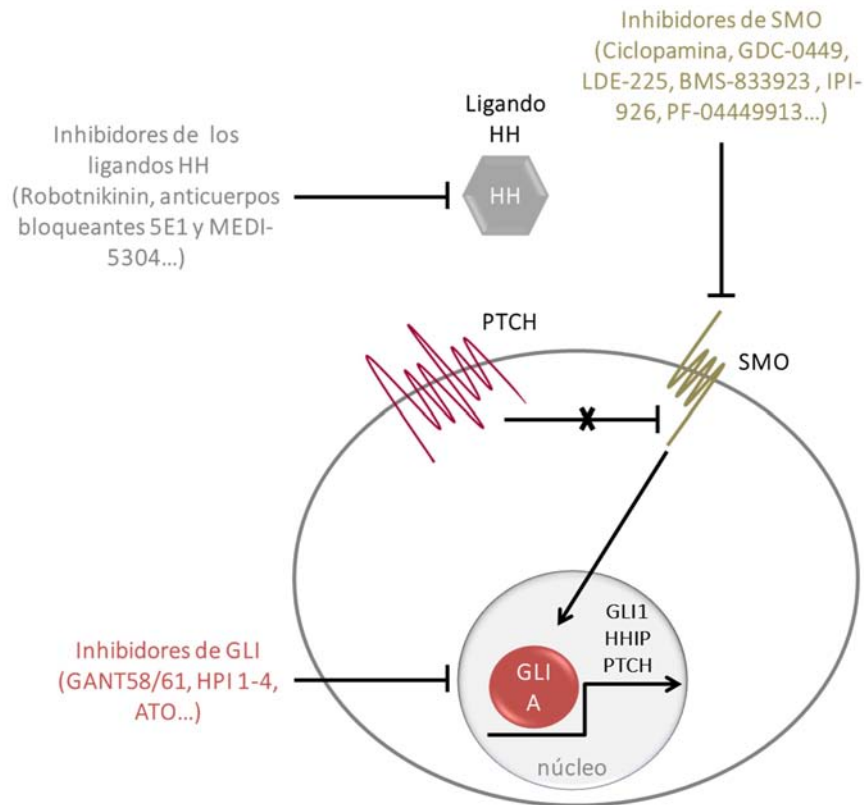


Figura I12. Mecanismos de inhibición farmacológica de la vía HH. Pequeñas moléculas inhibitoras han sido desarrolladas para bloquear la señalización HH a nivel de la unión de los ligandos HH a PTCH, de SMO o de la transcripción mediada por GLI. Imagen basada en Heretsch (2010).

A diferencia de los buenos resultados clínicos reportados en BCC y MB, no se han obtenido resultados similares con los inhibidores de SMO en otros tipos de cáncer. De hecho, varios ensayos clínicos han sido interrumpidos. Más concretamente, 3 ensayos clínicos de Vismodegib (cáncer de páncreas metastásico, cáncer de ovario avanzado y cáncer de colon metastásico) y 3 de Saridegib (mielofibrosis, condrosarcoma y cáncer de páncreas metastásico). Estos ensayos clínicos fueron interrumpidos al no obtener

mejoras significativas en comparación con el grupo placebo e incluso una mayor progresión de la enfermedad en el caso del Saridegib en cáncer de páncreas metastásico (McMillan, 2012; Catenacci, 2015).

Tabla I6. Inhibidores de SMO en ensayos clínicos*

Compuesto	Compañía	# ensayos totales	# ensayos abiertos	Indicaciones
Vismodegib (GDC-0449)	Genentec, Curis, Roche	67	22	MB, BCC, cáncer colorectal metastásico, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células pequeñas, condrosarcoma, cáncer de estómago/gastroesofágico, cáncer de próstata, linfoma de células B, linfoma crónico, cáncer odontogénico queratoquístico, sarcomas
Sonidegib (LDE-225)	Novartis	37	13	Cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, mieloma múltiple, cáncer de mama, leucemia aguda, cáncer de pulmón, BCC, leucemia mieloide, MB
BMS-833923 (XLI139)	Bristol Myers Squibb, Exelixis	14	-	BCC, leucemia mieloide crónica, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer gástrico metastásico, cáncer gastroesofágico, adenocarcinoma esofágico
Saridegib (IPI- 926)	Infinity	7	1	Cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, condrosarcoma
PF-04449913	Pfizer	11	5	Leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico, tumores sólidos
LY-2940680	Eli Lilly	7	2	MB, cáncer de pulmón, RMS, adenocarcinoma gastroesofágico, adenocarcinoma esofágico
TAK-441	Milenium	1	-	BCC
LEQ 506	Novartis	1	-	BCC, MB

* en www.clinicaltrials.gov a fecha de 18 de marzo del 2016

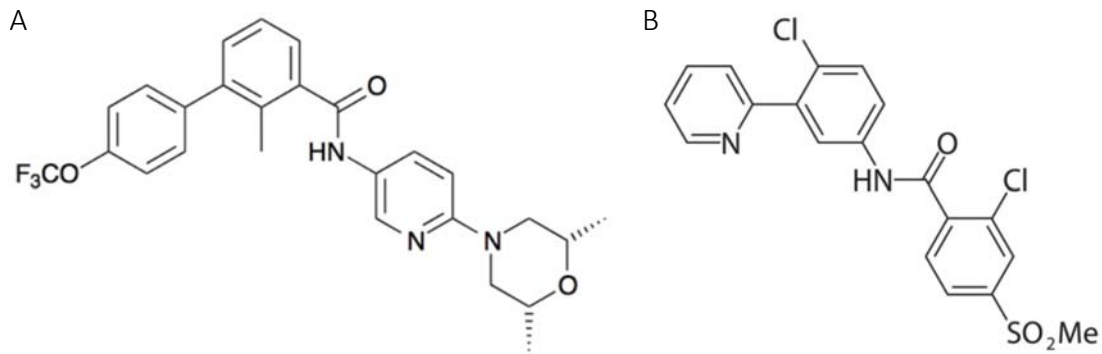


Figura 113. Estructura de los inhibidores de SMO: Vismodegib (A) y Sonidegib (B). Imagen obtenida de Fellner (2012).

Asimismo, ha sido descrito que el 23% de pacientes con BCC avanzado que han recibido tratamiento continuo con Vismodegib desarrollan resistencia. Recientemente ha sido reportado que estos pacientes que desarrollan resistencia a Vismodegib también son resistentes a Sonidegib, sugiriendo que en los pacientes resistentes a un inhibidor de SMO podría continuar la progresión tumoral en respuesta a otros inhibidores de SMO (Danial, 2016). En el 50% de los pacientes resistentes a Vismodegib se han identificado 4 diferentes mutaciones de *SMO* que confieren activación constitutiva de esta proteína y resistencia a inhibidores. En modelos murinos de MB tratados con Vismodegib y Sonidegib se han identificados mecanismos de resistencia mediados por amplificación de *GLI2* o la sobre-activación de la vía PI3K (Amakye, 2013). De hecho, ha sido descrito que el uso combinado de inhibidores de SMO y PI3K reduce de forma significativa los casos de resistencia adquirida (Buonamici, 2010).

El descubrimiento de la implicación del cilio primario para la activación de la señalización HH ha proporcionado una nueva vía para el desarrollo de inhibidores. Mientras Vismodegib y Sonidegib bloquean la translocación de SMO al cilio primario, la ciclopamina no la altera. Esta observación implica que hay diferencias en el modo de unión a SMO, hecho que puede ser útil para salvar los problemas de resistencia. Se ha demostrado que el antifúngico Itraconazol inhibe la vía HH, bloqueando la translocación de SMO al cilio. Itraconazol también mostró ser efectivo en presencia de mutaciones de SMO responsables de los problemas de resistencia (Ally, 2016).

Los datos clínicos obtenidos sobre los inhibidores de SMO Vismodegib, Sonidegib, Saridegib, BMS-833923, y PF-04449913 revelan que en general son bien tolerados. No obstante, causan efectos secundarios comunes: alteración del gusto (disgeusia), ligera alopecia, espasmos musculares y fatiga.

2.4.3.3. Inhibidores de los ligandos Hedgehog

Interferir en el mecanismo de interacción entre los ligandos HH y PTCH es otra alternativa para bloquear la señalización HH (**Figura I12**). Con esta finalidad fue desarrollado el anticuerpo monoclonal 5E1 que bloquea la unión de SHH a PTCH. Este anticuerpo ha sido utilizado en experimentos preclínicos, provocando por ejemplo la reducción tumoral en modelos murinos de cáncer de páncreas (Chang, 2013) o de cáncer gástrico (Song, 20119), pero no ha avanzado al desarrollo clínico. Otras aproximaciones basadas en moléculas pequeñas que interfieren en la unión de SHH a PTCH han sido reportadas: Robotnikinin y RU-SKI. Robotnikinin es una pequeña molécula macrocíclica que se une e inhibe a SHH (Stanton, 2009). RU-SKI es un inhibidor de HHAT (*Hedgehog acyltransferase, vide supra* apartado 2.2.2), inhibiendo la palmitilización de SHH (Petrova, 2013). No obstante, aún no se ha evaluado el potencial anti-tumoral de estos inhibidores en estudios preclínicos.

MedImmune ha desarrollado un anticuerpo bloqueante, denominado MEDI-5304, que reconoce SHH e IHH simultáneamente. En términos de eficacia preclínica, el anticuerpo mostró actividad anti-tumoral en un modelo paracrino de cáncer de colon, pero no en un modelo de tumor de páncreas. El uso de este anticuerpo no produjo efectos tóxicos relacionados con el fármaco en estudios realizados en ratas y monos, salvo una leve odontodisplasia de los incisivos de ratas, un hecho que no se traduce a los seres humanos (Michaud, 2014). MEDI-5304 es la única molécula descrita capaz de neutralizar IHH. Hasta la actualidad, no existe ninguna molécula capaz de bloquear DHH.

2.4.3.4. Inhibidores de GLI

Tal y como se ha descrito en apartados anteriores, la activación de la vía HH puede producirse debajo de SMO mediante mutaciones en *SUFU*, la amplificación de *GLI1* o la señalización no canónica de GLI1. En estos casos son necesarios inhibidores específicos de GLI1 que podrían llegar a tener una elevada aplicabilidad en cáncer, con independencia del componente responsable de la activación de la vía HH (**Figura I12**) (Heretsch, 2010). En un cribaje celular de inhibidores de la transcripción mediada por GLI fueron identificadas 2 moléculas estructuralmente diferentes denominadas GANT58 y GANT61. En el caso de GANT61 se ha descrito su capacidad de interferir en la unión de GLI1 al ADN. Aunque se desconoce el mecanismo de actuación exacto de GANT58, ambas moléculas son capaces de reducir las funciones de GLI e inhibir el crecimiento tumoral (Lauth, 2007). Existen otros inhibidores de HH (HPI 1-4) que actúan mediante varios mecanismos, tales como interfiriendo en el procesamiento de GLI (HPI 1), la activación de GLI (HPI 2-3) o la formación del cilio primario (HPI 4) (Hyman, 2009; Hadden, 2013). Aunque existen pocos trabajos que describan los efectos de estos inhibidores, ha sido descrita su capacidad anti-tumoral en modelos murinos de condrosarcoma (Xiang, 2014) y carcinoma hepatocelular (Xu, 2012).

El trióxido de arsénico (ATO, del inglés *arsenic trioxide*), un agente utilizado para tratar la leucemia promielocítica aguda, ha sido identificado recientemente como inhibidor de los factores de transcripción GLI. Varios estudios han demostrado su eficacia *in vivo* en tumores impulsados por HH, tales como MB o sarcoma de Ewing (Beauchamp, 2010). No obstante, es necesario determinar si estos agentes ofrecerán un beneficio sustancial con respecto a los inhibidores selectivos de la vía HH dada su inespecificidad (Amakye, 2012).

2.4.4. El papel de la vía HH en el Rabdomiosarcoma

Tal y como se ha descrito en el apartado 2.4, se estableció por primera vez la relación entre la vía HH y el RMS gracias a la identificación de mutaciones inactivadoras de *PTCH1* en pacientes afectos del síndrome de Gorlin, los cuales presentan una mayor incidencia de BCC, MB y RMS (Hahn, 1996; Johnson, 1996). La implicación de la sobre-

activación de la vía HH en la tumorigénesis del RMS fue confirmada con la generación de ratones heterocigotos de *PTCH1*; estos ratones no tan sólo presentaron características consistentes con el síndrome de Gorlin, tales como el crecimiento excesivo del cuerpo y una variedad de anomalías del sistema nervioso y del esqueleto, sino que también desarrollaron tumores de RMSe aunque con baja incidencia (Hahn, 1998).

Actualmente, está bien establecida y generalmente aceptada una activación persistente de la vía HH en RMS (Tostar, 2006; Zibat, 2010; Paulson, 2011; Pressey, 2011). Más concretamente, se ha determinado un mayor grado de activación en los subtipos embrionario y alveolar sin translocación en comparación al subtipo alveolar con translocación (Zibat, 2010). Además, se ha descrito que la activación de la vía en los pacientes de RMS sin translocación confiere un mal pronóstico y correlaciona de forma inversa con el grado de diferenciación muscular (Zibat, 2010; Satheesha, 2016).

Aunque esté reconocido el papel de la vía HH en el RMS, aún se desconoce su mecanismo de activación. Por una parte, niveles indetectables de SHH tanto en líneas celulares como en tumores de RMS sugieren un mecanismo de activación de la vía HH independiente de ligando (Tostar, 2006; Pressey, 2011). Por otra parte, existe cierta controversia respecto a la contribución de las mutaciones en la activación de esta vía en el RMS. Algunos trabajos han reportado la ausencia de mutaciones tanto en *PTCH1* como en *SMO* en tumores de RMS (Calzada-Wack, 2002; Pressey, 2011; Chen, 2013). No obstante, otros autores han identificado pérdida de heterocigosidad en *PTCH1* (región 9q22) y en *SUFU* en un 30% y 10% de tumores de RMSe, respectivamente (Bridge, 2000; Bridge, 2002; Tostar, 2006). Además, han sido identificadas amplificaciones genómicas en la región cromosómica 12q13-15, que contienen el gen *GLI1*, en un pequeño porcentaje de tumores de RMS (Bridge, 2002; Pressey, 2011). No obstante, estas mutaciones cromosómicas reportadas hasta el momento pueden ser las causantes, en el mejor de los escenarios, de la activación de la vía HH en un pequeño subgrupo de pacientes, siendo desconocido el mecanismo de activación en la mayoría de pacientes de RMS.

Varias publicaciones con modelos de RMS xenotrasplantados han planteado la posibilidad de reducir eficazmente el crecimiento del tumoral mediante inhibidores farmacológicos de la vía HH. Aunque la ciclopamina fue efectiva para inhibir la proliferación celular tanto en líneas celulares humanas de RMS como en cultivos primarios de células aisladas de tumores de ratones *PTCH1*^{+/-}, este efecto no fue reproducido en modelos *in vivo* (Ecke, 2008; Kawabata, 2011). La generación de derivados de la ciclopamina u otros inhibidores de los componentes de la vía HH abrió nuevas opciones para inhibir esta vía en el RMS. Estudios subsecuentes con nuevos inhibidores de GLI1 – forskolina, ácido betulínico y GANT61 – obtuvieron una reducción efectiva del crecimiento tumoral, aunque sin obtener una remisión tumoral completa (Eichenmüller, 2010; Tostar, 2010; Yamanaka, 2011). Dicha reducción en el crecimiento tumoral sugiere que la vía HH tiene un papel clave en la oncogenicidad del RMS y que, por lo tanto, puede ser considerada como una potencial diana molecular para nuevas estrategias terapéuticas en esta neoplasia.

No obstante, una de las limitaciones biológicas de las terapias dirigidas en el RMS, así como en otras neoplasias, es la posible existencia de una subpoblación de células tumorales, denominadas células madre tumorales o células iniciadoras de tumor. Estas células presentan una mayor tumorigenicidad, capacidad de auto-renovación y quimioresistencia y serían las únicas que tendrían las capacidades necesarias para iniciar un tumor, provocar recidivas, dar lugar a las metástasis y sobrevivir a las terapias convencionales (Hettmer, 2014). Este es un hecho prominente en el RMSe, en el cual se ha descrito que sigue un modelo jerárquico, hecho a considerar para el desarrollo de nueva estrategias terapéuticas. Asimismo, se considera que la vía HH tiene un papel importante en el mantenimiento de estas células iniciadoras de tumor. Por estos motivos, en este trabajo se ha estudiado la implicación de esta vía de señalización en las células iniciadoras de RMS. A continuación, se detallará el estado del arte en relación a los avances en la identificación de las células madre tumorales/células iniciadoras de tumor.

3. Células iniciadoras de tumor

Las células contenidas en un tumor presentan una elevada heterogeneidad, exhibiendo diferentes capacidades proliferativas y potenciales de diferenciación, característica denominada heterogeneidad tumoral (Heppner, 1983).

La existencia de una pequeña fracción de células, denominadas células madre tumorales o células iniciadoras de tumor (CITs), con organización jerárquica y responsables del inicio y propagación del cáncer fue descrita por primera vez en la leucemia aguda mieloide (Bonnet, 1997). Posteriormente, también ha sido descrita la existencia de CITs en tumores sólidos, tales como: carcinoma de próstata (Li, 2008), cáncer de páncreas (Li, 2007), melanoma (Regenbrecht, 2008), tumores cerebrales (Pérez, 2008) y carcinoma de mama (Velasco -Velázquez, 2012).

3.1. Modelos de heterogeneidad tumoral

Existen dos modelos que explican la heterogeneidad tumoral: el modelo de evolución clonal y el modelo de células madre tumorales (Visvader, 2008).

3.1.1. Modelo de evolución clonal

De acuerdo con el modelo de evolución clonal, las células tumorales adquieren mutaciones secuenciales que progresivamente les confieren ventajas adaptativas y proliferativas, convirtiéndose así en las responsables de la progresión tumoral. Según este modelo, cualquier célula puede ser responsable del inicio del tumor, así como la causante de recidivas y metástasis (**Figura I14-A**) (Campbell, 2007; Visvader, 2008).

3.1.2. Modelo de células madre tumorales

La hipótesis de las células madre tumorales sugiere que existe una pequeña subpoblación de células con características de células madre normales – capacidad de auto-renovación, potencial de diferenciación, extensa proliferación *in vivo* y resistencia

a agentes quimioterápicos – responsables de iniciar el tumor y generar la diversidad celular de éste. Por lo tanto, este modelo propone una organización jerárquica de los tumores, en el que las células madre tumorales residen en el ápice, siendo las únicas células con capacidad tumorigénica (**Figura I14-B**). La progresión tumoral es el resultado de la diseminación metastásica de las células madre tumorales y su resistencia a terapias es la causante de recidivas (Campbell, 2007; Visvader, 2008; Walter, 2011). La célula de origen de las células madre tumorales no tiene por qué ser necesariamente una célula madre, sino que pueden devenir de células progenitoras o células más diferenciadas que adquieren la capacidad de auto-renovación (Visvader, 2008).

No obstante, estos 2 modelos no son mutuamente excluyentes debido a que las células madre tumorales también sufren evolución clonal. Una segunda célula madre tumoral más maligna puede devenir si una mutación le confiere mayor capacidad de crecimiento y de auto-renovación. A medida que el tumor progresa, mecanismos genéticos y epigenéticos intervienen en la generación de una célula madre metastásica, la cual después de procesos invasivos forma un tumor secundario en un órgano distal (**Figura I14-C**) (Visvader, 2008).

3.2. Marcadores moleculares de las células iniciadoras de tumor

Uno de los puntos claves es distinguir las CITs del resto de células cancerosas. Determinar los marcadores moleculares de las CITs es crucial para caracterizarlas y desarrollar terapias específicas contra ellas. Se ha identificado candidatas a CITs mediante una variedad de marcadores, tales como proteínas de membrana, proteínas nucleares y citoplasmáticas, factores de transcripción, enzimas y/o atributos funcionales. Los marcadores más utilizados en la identificación de las CITs son: CD133, CD44, CD24, CD90, CD34, CD117, CD20, *side population* (SP) (capacidad de expulsar Hoechst debido a la presencia de la familia de transportadores multidroga ABCG) y ALDH1 (Friedman, 2012). El marcador de superficie más ampliamente utilizado para el aislamiento de CITs, tanto en cánceres del adultos como de la infancia, es la proteína CD133 (Bidlemaier, 2008). Más concretamente, dos epítomos de ésta, denominados CD133/1 y CD133/2, presentes únicamente en células no diferenciadas (Kemper, 2010).

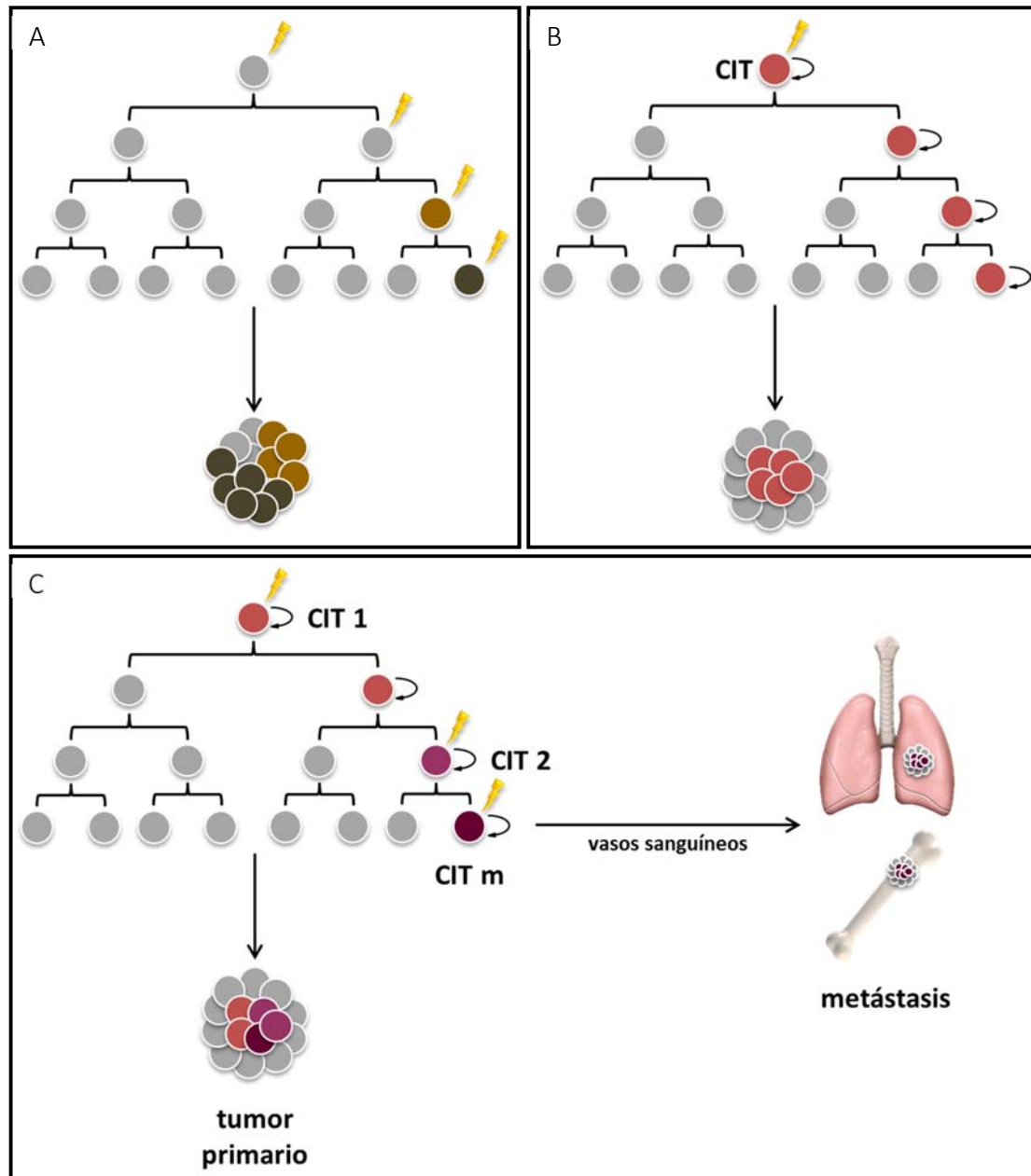


Figura I14. Modelos de heterogeneidad tumoral. **A:** Modelo de evolución clonal. Todas las células del tumor tienen una capacidad tumorigénica similar. **B:** Modelo de células madre tumorales. Organización jerárquica del tumor, en la cual las células iniciadoras de tumor (CIT) residen en el ápex y dan lugar a todas las células maduras del tumor. **C:** Combinación de ambos modelos. Una segunda célula iniciadora de tumor (CIT2) deviene debido a la adquisición de mutaciones adicionales. Esta CIT2 más agresiva resulta dominante y dirige la progresión tumoral. A medida que el tumor progresa, otras mutaciones resultan en la generación de una célula madre metastásica (CITm), la cual da lugar a un tumor secundario en un órgano distal. Figura basada en Visvader (2008).

3.3. Ensayos funcionales para evaluar las células iniciadoras de tumor

Existen varios ensayos que evalúan la capacidad tumorigénica y la presencia de características de células madre – capacidad de auto-renovación y potencial de diferenciación – para confirmar la condición de CIT de una determinada subpoblación celular. La prueba clave es la inyección ortotópica de estas células en ratones inmunodeprimidos: únicamente las células con condición de CIT serán capaces de iniciar un tumor al ser inyectadas en un bajo número. No obstante, se han desarrollado ensayos *in vitro* sustitutivos más sencillos y rápidos de realizar: ensayo de formación de esferas y ensayo de formación de colonias (Alison, 2010).

El ensayo de formación de esferas se basa en la capacidad de las células madre neurales de crecer en suspensión formando esferas, característica descrita por primera vez por Reynolds y Weiss (Reynolds, 1996). Se considera que sólo las CITs tienen la capacidad de formar esferas cuando son sembradas a baja densidad, así como de formar esferas secundarias después de ser disgregadas y sembradas de nuevo (Alison, 2010). En los últimos años, se ha confirmado la propiedad tumorigénica de las células contenidas en las esferas de diferentes cánceres del sistema nervioso y cáncer de mama, entre otros (Coulon, 2011; Lee, 2012).

De forma alternativa o complementaria existe el ensayo de formación de colonias, basado en la capacidad de proliferación y diferenciación de células seleccionadas. El ensayo clásico consiste en la siembra de células a baja densidad, condición bajo la cual las CITs tienen una mayor capacidad de formar colonias (Visvader, 2008). Actualmente, se realiza una alternativa de este ensayo en base a la relación descrita entre la morfología de las colonias y el potencial de diferenciación de las células que las forman. Más concretamente, este ensayo se basa en 2 publicaciones realizadas en queratinocitos por Barrandon y Green (Barrandon, 1985; Barrandon, 1987). En el primer trabajo demostraron que la capacidad de los queratinocitos para formar clones estaba relacionada con el tamaño celular, sólo las células $\leq 11\mu\text{m}$ podían formar clones mientras que las células $\geq 12\mu\text{m}$ estaban irreversiblemente encaminadas a una diferenciación terminal (Barrandon, 1985). Su siguiente trabajo en cultivos clonales reveló la existencia de 3 tipos de colonias con capacidades proliferativas muy

diferentes. Según criterios de compactación, contorno y capacidad replicativa de las colonias, éstas fueron clasificadas en holoclones, meroclones y paraclones. Los holoclones presentaban una gran capacidad replicativa y contenían células pequeñas y muy compactas, formando un contorno muy definido. Por el contrario, los paraclones estaban formados por células grandes y muy separadas con una escasa capacidad proliferativa. El tercer tipo de colonia, denominado meroclones, contenía una mezcla de células con diferentes capacidades proliferativas, siendo una transición entre los holoclones y los paraclones (**Figura 115**). Posteriormente, se confirmó que la habilidad de formar holoclones era una propiedad intrínseca de las células madre adultas del folículo piloso; únicamente los holoclones estaban formados por células con capacidad de auto-renovación. De forma similar a los queratinocitos, se ha reportado que las células en cultivo de diversos carcinomas también forman diferentes tipos de colonias, siendo los holoclones las colonias minoritarias. Diversos trabajos han demostrado que los holoclones formados por células de glioma, cáncer de próstata y de páncreas contienen CITs y que el resto de colonias están formadas por células más diferenciadas sin capacidad tumorigénica (Li, 2008; Zhou , 2009; Tan, 2011).

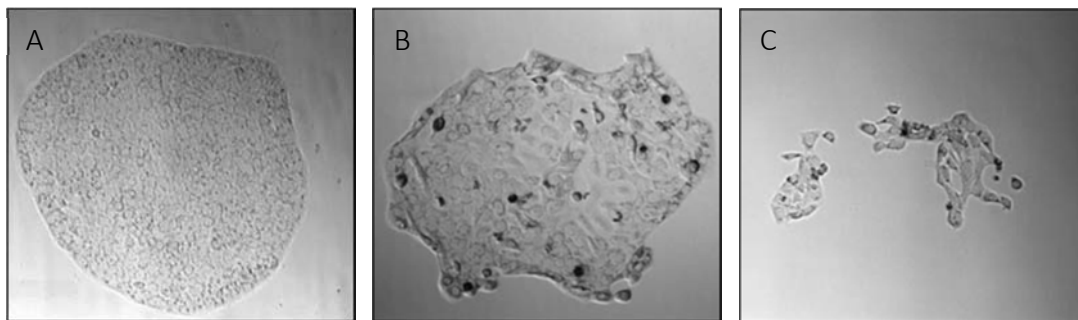


Figura 115. Heterogeneidad clonal. Los holoclones (A) contienen células madre, los paraclones (B) células terminalmente diferenciadas y los meroclones (C) están formados por células en un estadio de diferenciación intermedio. Imagen modificada de Tan (2011).

3.4. El papel de la vía Hedgehog en el mantenimiento de las células iniciadoras de tumor

Algunas vías de señalización que se caracterizan por su capacidad de regular la auto-renovación y diferenciación de células madre también son cruciales para iniciar tumores cuando están desreguladas. Entre ellas, se ha demostrado que la vía HH tiene un papel preponderante en los programas de auto-renovación de las células madre, en un mecanismo dependiente de ligando (Visvader, 2008; Scales, 2009). Recientemente, varias líneas de investigación han demostrado que la vía HH regula las CITs en carcinoma de mama (Yang, 2016), carcinoma de páncreas (Sharma, 2015), carcinoma de colon (Varnat, 2009), glioblastoma (Balbous, 2014), mieloma múltiple (Blotta, 2012) y leucemia mieloide crónica (Jagani, 2010), entre otras neoplasias. Las putativas CITs CD133⁺ en glioblastoma y carcinoma de colon, CD44⁺/CD24⁻ en carcinoma de mama y ALDH⁺ en carcinoma de páncreas mostraron sensibilidad a la inhibición farmacológica de la vía HH. En el caso de la leucemia mieloide crónica, en la cual existen fuertes evidencias que apoyan la hipótesis de las células madre tumorales, la inhibición de SMO redujo de forma significativa la tumorigenicidad de las putativas CITs BCR-ABL-positivas en modelos murinos (Zhao, 2009).

Existen evidencias que las CITs son resistentes a quimioterapia y radiación, convirtiéndose así en las causantes de recidivas después de terapias citoreductoras convencionales. La activación de la vía HH observada en las CITs de diferentes tipos de cáncer posiciona la inhibición de esta vía como una prometedora aproximación terapéutica para eliminar esta subpoblación celular, idealmente en combinación con otros agentes citoreductores para eliminar las células más diferenciadas que forman el tumor (Scales, 2009). Esta aproximación es de especial interés para la prevención de recidivas y resistencia a tratamientos estándares en leucemia mieloide crónica, glioblastoma, carcinoma de páncreas y carcinoma de mama. Actualmente, esta estrategia terapéutica está siendo evaluada en ensayos clínicos combinando inhibidores de SMO e inhibidores de tirosina quinasa en pacientes con leucemia mieloide crónica (Amakye, 2013).

3.5. Células iniciadoras de Rbdomiosarcoma

El cáncer infantil posee características específicas que lo definen como una entidad totalmente diferente al cáncer del adulto debido a sus diferencias en la etiología, biología, respuesta a tratamiento y pronóstico. En los adultos, los cánceres epiteliales son los más comunes y a menudo están relacionados con la exposición prolongada a agentes cancerígenos. Por el contrario, los tumores pediátricos tienden a ser de origen hematológico, mesenquimal o del sistema nervioso y su etiología es a menudo desconocida. Teniendo en cuenta estas diferencias, hay que preguntarse si existen CITs en los cánceres pediátricos y, en caso afirmativo, si su función es similar en tumores malignos pediátricos y adultos. Sin embargo, recientemente la presencia de células madre ha sido descrita en diversos tumores sólidos pediátricos como MB, glioblastoma, neuroblastoma, osteosarcoma, tumor de Wilms, RMS y sarcoma de Ewing (Friedman 2012), sugiriendo que el cáncer infantil también puede seguir el modelo de células madre tumorales.

En el caso particular del RMS, existe controversia en cuanto a los marcadores adecuados para el aislamiento de las CITs. Hirotsu *et al.* fueron los primeros en describir la existencia de CITs en el RMSe y propusieron la proteína FGFR3 (*Fibroblast growth factor receptor 3*) como marcador adecuado para su aislamiento (Hirotsu, 2009). Posteriormente, Walter *et al.* refutaron la idoneidad de FGFR3 como marcador de células madre en RMS, y propusieron el epítipo CD133/2 como un marcador de aislamiento para esta subpoblación (Walter, 2011). Pressey *et al.* confirmaron la presencia de precursores miogénicos CD133-positivos en líneas celulares de RMS (Pressey, 2012). Sin embargo, un trabajo reciente ha demostrado que las células CD133-positivas no son capaces de generar tumores en ratones inmunodeficientes. Estos autores proponen el factor de transcripción SOX2 como marcador de CITs en RMS, sarcoma de Ewing y osteosarcoma (Skoda, 2016).

En cuanto a los ensayos *in vitro* de enriquecimiento de CITs, se ha descrito la capacidad de las células del subtipo embrionario de formar esferas, denominadas rabdoesferas (Walter, 2011). Más concretamente, se ha identificado que estas rabdoesferas del RMSe están formadas por CITs que sobre-expresan el epítipo CD133/2, para el

mantenimiento de las cuales es esencial la activación de la vía de señalización HH (Walter, 2011; Satheesha, 2016). No obstante, no existen trabajos previos que estudien la capacidad de las células del RMSa de formar esferas. La capacidad de las células de formar holoclones en sarcomas pediátricos no ha sido reportada hasta la fecha.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de la aplicación de intensivos tratamientos multimodales, aproximadamente el 35% de los pacientes de RMS presentan recidivas y metástasis. En estos subgrupos más desfavorables la mortalidad puede alcanzar el 80%. El uso de nuevos fármacos dirigidos específicamente contra dianas moleculares – como complemento a los tratamientos actuales – puede conllevar a una mejoría en las tasas de supervivencia, especialmente en aquellos casos metastáticos y/o refractarios a las terapias convencionales.

No obstante, los componentes celulares que regulan la proliferación, la invasividad y la metástasis en el RMS siguen siendo en gran medida desconocidos. Las moléculas responsables de estos procesos deben ser identificadas como paso previo al desarrollo de terapias dirigidas en esta neoplasia. Este es el caso del papel de la vía de señalización HH en el RMS; aunque esté bien establecida su activación así como su implicación en el crecimiento tumoral, su mecanismo de activación en esta neoplasia continúa siendo un enigma. Por ende, hipotetizamos que establecer el mecanismo responsable de la activación de la vía HH en el RMS permitirá diseñar nuevas dianas terapéuticas para mejorar la supervivencia de los pacientes afectados de esta enfermedad.

Objetivo principal: establecer el mecanismo de activación de la vía de señalización HH en el RMS como paso previo para el desarrollo de terapias específicas contra esta neoplasia.

Para cumplir este objetivo, y partiendo de la hipótesis de la activación autocrina de la vía HH en RMS, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar la implicación de los ligandos HH en la oncogénesis del RMS.

1.1. Analizar los niveles de expresión de los 3 ligandos HH en líneas celulares y tumores de RMS.

1.2. Estudiar la correlación entre los niveles de expresión de los ligandos HH y el estado de activación de la vía HH en tumores de RMS.

1.3. Analizar el efecto de la infra-regulación génica de los ligandos HH mediante shRNA sobre el estado de activación de la vía HH así como sobre la proliferación e invasión de las células de RMS *in vitro* e *in vivo*.

1.4. Analizar el efecto de inhibición farmacológica de la vía HH, mediante la inhibición de SMO y de los ligandos HH, sobre la proliferación e invasión de las células de RMS.

2. Determinar el papel de los ligandos HH en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS.

2.1. Determinar la capacidad de las células de RMS de formación de holoclones y esferas, aproximaciones para el enriquecimiento de células madre tumorales.

2.2. Analizar los niveles de expresión de los ligandos HH y el estado de activación de la vía en la fracción de células iniciadoras de RMS.

2.3. Analizar el efecto de la infra-regulación génica de los ligandos HH mediante shRNA en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS.

2.4. Analizar el efecto de inhibición farmacológica de la vía HH, mediante la inhibición de SMO y de los ligandos HH, en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras tumorales humanas

33 muestras congeladas de tumores primarios de RMS fueron obtenidas de nuestra colección privada (ISCI C.0002311) y 20 del banco de tejidos CWS (*Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe*) (Stuttgart, Alemania), las cuales fueron recogidas inmediatamente tras la cirugía y guardadas a -80°C . Estas muestras de tumores primarios de RMS fueron utilizadas para la extracción y análisis de RNA y proteína, tal y como se detalla en los apartados 5.1 y 6.1. Para el análisis inmunohistoquímico, 23 muestras de tumores de RMS embebidas en parafina fueron cedidas por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron. Se obtuvo el consentimiento informado acorde con la declaración de Helsinki de todos los pacientes o de sus tutores legales, dependiendo de la edad del paciente. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

2. Cultivos celulares

2.1. Líneas celulares

En la siguiente tabla se detallan las principales características del panel de líneas celulares de RMS utilizadas en este estudio:

Tabla M1. Características del panel de líneas celulares de RMS

Nombre	Histología	Translocación	Metastásico	Localización
RH30	alveolar	PAX3-FOXO1	sí	médula ósea (metástasis)
RH4	alveolar	PAX3-FOXO1	sí	mama (metástasis)
CW9019	alveolar	PAX7-FOXO1	?	?
RH18	alveolar	-	no	perineo (tumor primario)
HTB82	embrionario	-	sí	brazo (tumor primario)
RD	embrionario	-	no	pelvis (tumor primario)

Todas las líneas celulares de RMS fueron cultivadas en *Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts* (MEM; Biowest), suplementado con el 10% de suero fetal bovino

(Sigma-Aldrich), 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio, 1x de aminoácidos no esenciales, 100U/mL de penicilina y 0.1mg de estreptomicina (todos de Biowest). Todas las líneas celulares fueron adquiridas en la *American Type Culture Collection* (ATCC), a excepción de las líneas celulares RH18 y RD cedidas por el Dr. Beat Schäfer y la línea CW9019 generada en laboratorio de la Dra. Jaclyn Biegel (ver la autenticación de las líneas celulares en el Anexo 1).

La línea celular HEK 293T, utilizada para la producción de partículas lentivirales, fue cultivada en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) enriquecido con glucosa, L-glutamina y piruvato (Thermo Fisher Scientific), suplementado con el 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich), 1x de aminoácidos no esenciales, 100U/mL de penicilina y 0.1mg de estreptomicina (todos de Biowest). Esta línea celular fue adquirida en la ATCC.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en incubadores de camisa de agua a 37°C en una atmósfera del 95% de aire y 5% de CO₂.

2.2. Subcultivo celular

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en cultivos monocapa, de los cuales se realizaron subcultivos al alcanzar una confluencia del 80%. Para realizar estos subcultivos, el medio fue descartado, se realizó un lavado con PBS (*phosphate buffered saline*), se añadió tripsina-EDTA al 0.05% en DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) (Biowest) en una proporción 1:5 para desenganchar las células y los cultivos fueron mantenidos a 37°C para alcanzar la actividad máxima de la tripsina. Transcurridos aproximadamente 5min, la actividad de la tripsina fue inhibida mediante la adición de medio fresco suplementado con suero fetal bovino. La suspensión celular fue recogida y centrifugada durante 5min a 1500rpm. El pellet celular fue resuspendido en medio completo y sembrado a la dilución pertinente en un nuevo frasco o placa de cultivo (en la **Tabla M2** se detallan las diluciones realizadas para el subcultivo de las líneas celulares utilizadas).

Tabla M2. Dilución para el subcultivo de las líneas celulares utilizadas

Línea celular	Dilución
RH30	1/3
RH4	1/4
CW9019	1/3
RH18	1/2
HTB82	1/5
RD	1/3
HEK 293T	1/10

2.3. Contaje de células

En los casos que fue requerida la siembra de un número exacto de células, los cultivos fueron tripsinizados y las células fueron contadas con la cámara de Neubauer (**Figura M1**). Se insertaron aproximadamente 10µL de la suspensión celular en cada una de las cámaras de contaje y se contaron el número de células contenidas en los 4 recuadros grandes que las forman. El número total de células se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Núm. total células} = \frac{\text{núm. células en 8 recuadros}}{8} \cdot 10^4 \cdot \text{dilución} \cdot \text{volumen suspensión celular}$$

2.4. Criopreservación y descongelación

La criopreservación consiste en el uso de bajas temperaturas (-80°C o -196°C) para preservar intactas las células durante mucho tiempo; a estas temperaturas toda la actividad biológica de la célula se paraliza, incluyendo las reacciones que llevan a la muerte celular. Este proceso permite almacenar alícuotas celulares por largo tiempo sin la necesidad de mantenerlas en cultivo.

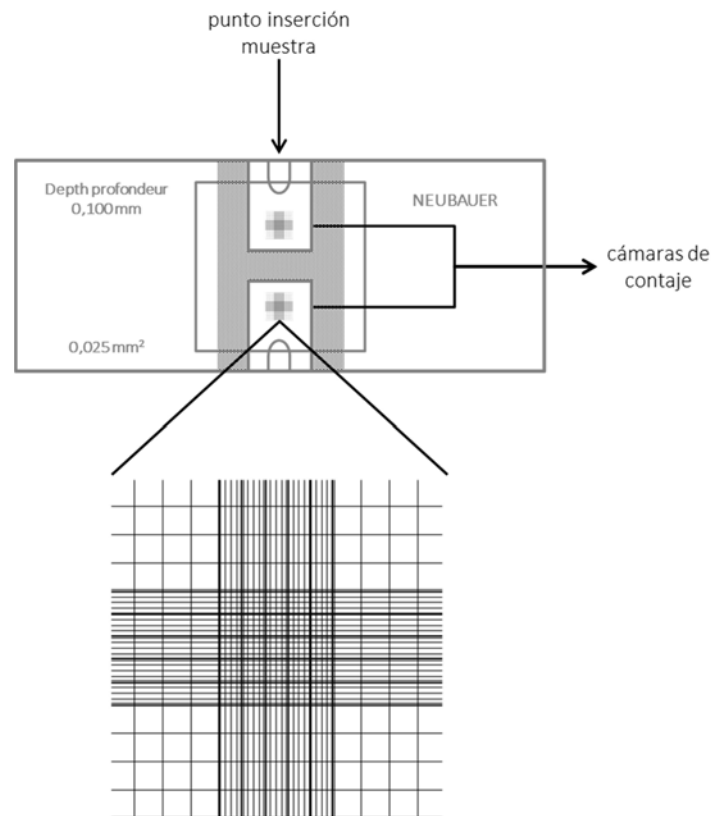


Figura M1. Cámara de Neubauer. Cada una de las dos cámaras de recuento está formada por 9 cuadrados grandes, cada uno de 1mm^2 de área. El recuento celular se realiza en los 4 cuadrados grandes de las esquinas, cada uno formado por 16 cuadrados medianos.

El principio básico de la criopreservación es minimizar el daño celular provocado tanto por las bajas temperaturas como por la posterior descongelación. La formación de hielo intracelular es un punto crítico que debe de ser controlado para preservar intacta la membrana celular y así mantener las células vivas. Los elementos cruciales para prevenir su formación son la composición del medio de congelación y la velocidad de congelación.

En este caso, las células fueron tripsinizadas y el pellet resultante fue resuspendido en medio de congelación, formado por medio completo al 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). El crioprotector DMSO es un solvente bipolar que debido a su bajo peso molecular entra rápidamente en las células a través de la membrana celular y previene la formación de hielo intracelular. No obstante, el DMSO es tóxico a temperatura ambiente y requiere rapidez en el proceso de congelación y

descongelación. La suspensión celular en medio de congelación fue añadida en crioviales (1mL/criovial), los cuales fueron congelados a -80°C introducidos en un contenedor *Nalgene Mr. Frosty Freezing* (Thermo Fisher Scientific). Este contenedor está diseñado para mantener la velocidad de congelación a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, velocidad óptima para la preservación de las células. Pasadas 24h, los crioviales fueron introducidos en un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento a largo plazo.

Para la descongelación, los viales extraídos del tanque de nitrógeno líquido fueron rápidamente introducidos en un baño a 37°C y, antes de su total descongelación para evitar la toxicidad del DMSO a temperatura ambiente, la suspensión celular fue diluida en PBS. Las células fueron centrifugadas durante 5min a 1500rpm, el pellet resuspendido en medio fresco y sembradas en frascos de 75cm^2 .

3. Tratamiento farmacológico

Los inhibidores de SMO, Vismodegib y Sonidegib, fueron adquiridos en Selleckchem. El anticuerpo bloqueante de SHH e IHH fue cedido por MedImmune. Las concentraciones seleccionadas para cada inhibidor fueron: Vismodegib ($50\mu\text{M}$), Sonidegib ($15\mu\text{M}$) y MEDI-5304 ($30\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las células control fueron tratadas con volúmenes equivalentes del vehículo DMSO.

4. Plásmidos, transfección, producción lentiviral e infección

Los shRNA (*short hairpin RNA*) están basados en el mecanismo de los ARN de interferencia de degradación específica de un determinado ARN mensajero (ARNm) mediante la liberación en el citoplasma de cadenas dobles de ARN idénticas a la secuencia diana. Más concretamente, los shRNA son transfectados en vectores plasmídicos e integrados en el ADN de las células diana mediante vectores víricos. Son transcritos bajo el control de promotores de la ARN polimerasa III y procesados en el núcleo por la ARNasa DROSHA y la proteína DGCR8 para formar el pre-shRNA, molécula de cadena sencilla en forma de horquilla formada por una región de 19-29 pares de bases de doble cadena de ARN puenteada por una región de cadena sencilla de 1-4

pares de bases (*loop*) y un saliente en el extremo 3'. Posteriormente, son exportados al citoplasma mediante la proteína *Exportin-5*. Una vez en el citoplasma, la nucleasa DICER procesa los shRNA en dúplex de siRNA (ARN pequeños de interferencia, del inglés *small interfering RNA*). Una de las cadenas del dúplex de siRNA (cadena guía) se une al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) con la ayuda de las proteínas *Argonaute* y otras proteínas de unión a cadenas dobles de ARN y la otra cadena del siRNA es degradada. RISC localiza la molécula de ARNm complementaria a la cadena guía; en el caso de complementariedad perfecta RISC degrada el ARNm y en el caso de complementariedad parcial RISC reprime la traducción del ARNm. En ambos casos, los shRNA provocan la infra-expresión de un determinado gen diana ya sea degradando su ARNm o impidiendo su traducción (**Figura M2**) (Cullen, 2006; Moore, 2010).

4.1. Plásmidos

La infra-regulación genética de los ligandos HH y *GLI1* fue realizada mediante la transducción vírica de shRNA clonados en el vector lentiviral pGIPZ (GE Dharmacon). Los vectores lentivirales derivan del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y son una de las mejores opciones de introducción de genes en células de mamíferos debido a que permiten una elevada eficiencia de transducción y la expresión estable del transgen. En este trabajo se utilizaron vectores lentivirales de segunda generación que fueron transfectados en la línea celular HEK 293T para la generación de partículas lentivirales. Esta línea celular, proveniente de riñón embrionario humano, es altamente transfectable y expresa constitutivamente el antígeno T largo del virus SV40, que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación de SV40. Más concretamente, para la producción de partículas lentivirales se co-transfectaron los siguientes vectores en las células HEK 293T:

1. Vector lentiviral pGIPZ codificante por el shRNA de interés. Contiene elementos cis necesarios para la infección viral y la transferencia del gen de interés (**Figura M3** y **Tabla M3**).
2. Vector psPAX2. Contiene las secuencias necesarias para el empaquetamiento de las partículas víricas: gag (proteínas estructurales de la cápside), pol

(retrotranscriptasa, integrasa y proteasa), rev (señal de exportación del núcleo al citoplasma) y tat (incrementa el nivel de transcripción del ARN bicatenario).

3. Vector pMD2G. Plásmido de la envoltura del virus que contiene la secuencia que codifica para la proteína VSV-G (*vesicular stomatitis virus envelope G protein*). Esta proteína, utilizada para el pseudotipado, confiere pantropismo a las partículas lentivirales ya que al reconocer fosfolípidos permite transducir cualquier tipo celular.

4.2. Transfección y producción lentiviral

A continuación se detalla el protocolo para la producción de partículas lentivirales seguido en este trabajo. Por cada shRNA, 4 millones de células HEK 293T fueron sembradas en placas de 100mm. Al día siguiente, a una confluencia del 70%, fueron transfectadas con el reactivo Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando la siguiente proporción de los plásmidos: 12µg vector shRNA-pGIPZ, 8µg psPAX2 y 4µg pMD2G. Entre las 36-48h tras la transfección, el medio de las células transfectadas fue recogido y centrifugado durante 5min a 1000rpm para eliminar los restos celulares. El sobrenadante, que contenía las partículas virales, fue filtrado con un filtro de 45µm. Este sobrenadante fue guardado a -80°C o utilizado directamente para infectar las líneas celulares de RMS.

4.3. Infección

Para la infección, las células de RMS fueron sembradas en placas de 60mm. Al día siguiente, a una confluencia del 40%, su medio fue remplazado por una dilución 1/2 del sobrenadante con partículas víricas en medio MEM. 24h tras la infección, el medio fue reemplazado por medio MEM fresco. Las células infectadas fueron seleccionadas con puromicina (1µg/mL, Sigma-Aldrich). La eficiencia de infra-regulación de cada shRNA fue evaluada mediante *Western blot* (apartado 6.5); los vectores seleccionados fueron: V3LHS_82400 (shSHH), V3LHS_336297 (shIHH), V3LHS_401021 (shDHH) y

V3LHS_262249 (shGLI1). Los ensayos funcionales fueron realizados 7 días post infección.

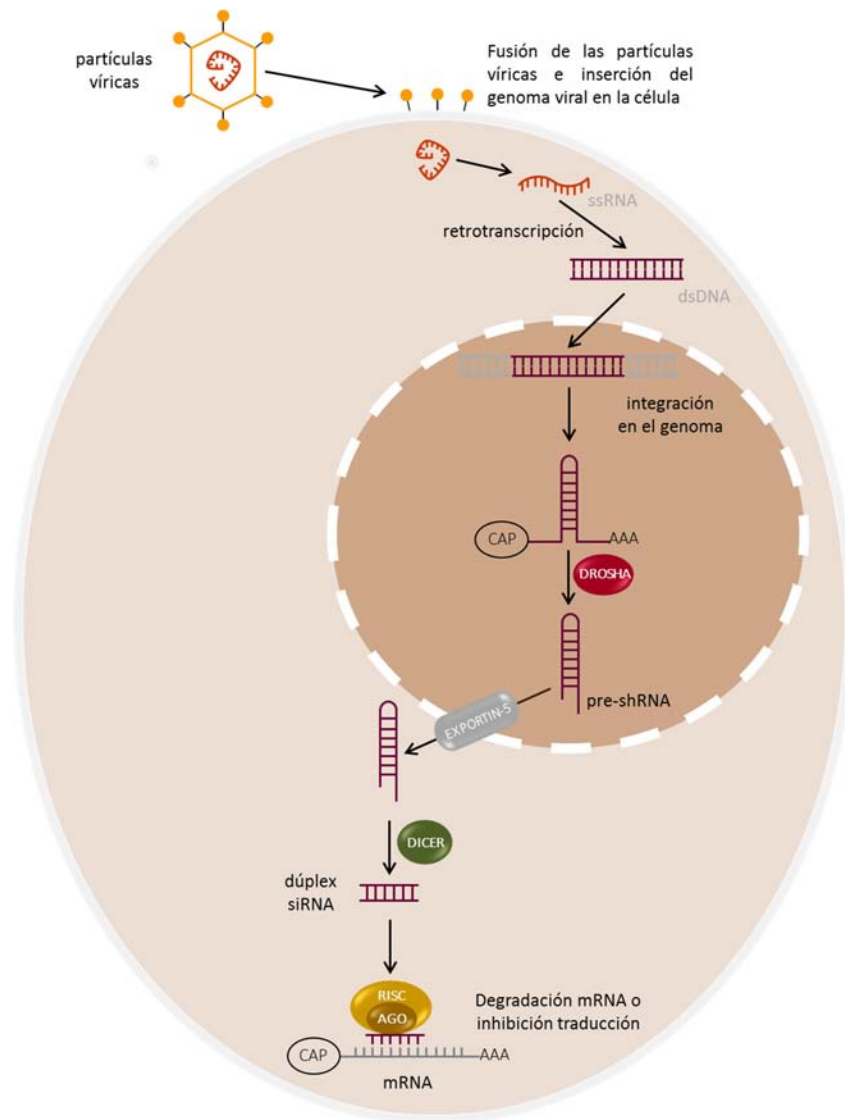


Figura M2. Representación del mecanismo de infra-regulación génica mediante shRNA. Los shRNA se integran en el genoma de la célula diana mediante partículas víricas. Son transcritos por la ARN polimerasa III y procesados por DROSHA. Los pre-shRNA son exportados del núcleo al citoplasma mediante la proteína *Exportin-5*. En el citoplasma, son procesados por la nucleasa DICER para generar dúplex de siRNA, una cadena del cual será la cadena guía para el complejo RISC. Este complejo facilita la localización y unión del mRNA diana, permitiendo la degradación del mRNA o inhibiendo su traducción. Abreviaturas: ssRNA (*single strand RNA*, ARN de cadena sencilla), dsDNA (*double strand DNA*, cadena doble de ADN), siRNA (*small interfering RNA*, ARN pequeños de interferencia) y mRNA (*messenger RNA*, ARN mensajero). Imagen y texto basados en Lambeth (2013).

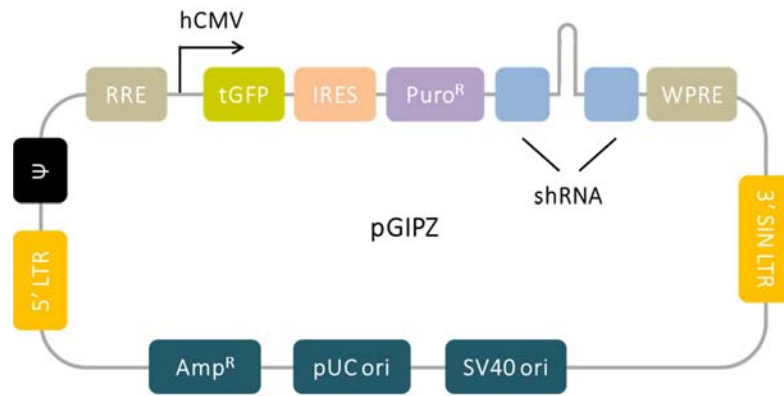


Figura M3. Representación esquemática de los principales elementos del plásmido pGIPZ. Imagen modificada de www.dharmacon.gelifesciences.com/shrna/gipz-lentiviral-shrna/

Tabla M3. Elementos del plásmido pGIPZ

Elementos	Descripción	Función
hCMV	Promotor humano citomegalovirus	Permite una fuerte expresión del transgen
tGFP	TurboGFP (<i>green fluorescent protein</i>)	Visualización de las células transducidas
Puro ^R	Resistencia a puomicina	Selección de las células que expresan el vector
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>	Permite la expresión de los genes turboGFP y de resistencia a puomicina en un único transcrito
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>	Infra-regulación génica
5' LTR	<i>5' long terminal repeat</i>	Permite la integración y, una vez integrado, actúa como promotor del genoma retroviral
3' SIN LTR	<i>3' self-inactivating long terminal repeat</i>	Incrementar la seguridad del lentivirus
Ψ	Secuencia de empaquetamiento <i>psi</i>	Permite el empaquetamiento del genoma viral
RRE	<i>Rev response elements</i>	Incrementar el título aumentando la eficiencia de empaquetamiento del genoma viral
WPRE	<i>Posttranscriptional regulatory element</i>	Incrementar la expresión del transgen en las células diana

5. Análisis de la expresión génica

5.1. Extracción del ARN total

El ARN total de las líneas celulares y de las muestras de tumores de RMS fue extraído utilizando el kit *RNeasy Mini* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este kit se basa en la unión selectiva del ARN a las membranas de sílica gel en combinación a la tecnología de microcentrifugado. Las muestras se lisan con la adición de un tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidinio y se homogenizan mecánicamente. Se añade etanol al lisado para precipitar los ácidos nucleicos y crear las condiciones óptimas de unión a la membrana de sílica gel. Las muestras se transfieren a las columnas de sílica gel, que permiten la unión selectiva del ARN, y se eliminan contaminantes mediante lavados. Las trazas de ADN se eliminan mediante el tratamiento de las membranas de sílica gel con ADNasa. Finalmente, el ARN total se eluye con agua libre de ARNasas.

El ARN total obtenido se analizó y cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Para la realización de microarrays de cDNA, la integridad del ARN total obtenido fue analizada mediante electroforesis con Bioanalyzer (Agilent Genomics).

5.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción o transcripción reversa consiste en la síntesis de ADN a partir de un molde de ARN, es decir, en la generación del denominado ADN complementario (cDNA, del inglés *complementary DNA*). Mediante cebadores complementarios al extremo 3' de los ARNm, las retrotranscriptasas utilizan de molde las cadenas de ARNm para la síntesis de la primera cadena de cDNA, las cuales serán utilizadas directamente como moldes para el análisis de expresión génica mediante qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*).

El ARN fue retrotranscrito utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV, del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus*) (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 2µg de ARN fueron incubados

con 1µg de cebadores aleatorios (*random primers*, Thermo Fisher Scientific) durante 5min a 70°C, temperatura que permite la desnaturalización de las estructuras secundarias y la hibridación de los cebadores. Las muestras se pusieron en hielo para evitar la formación de estructuras secundarias y se incubaron con 5µL de M-MLV 5x *reaction buffer* (Promega), 1.25µL de desoxirribonucleótidos trifosfato 10mM (dNTPs, Thermo Fisher Scientific) y 200U de M-MLV (Promega) durante 1h a 37°C para la elongación del cDNA.

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

El análisis de expresión de ARNm fue realizado mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando la tecnología de sondas *TaqMan* (Applied Biosystems, actualmente Thermo Fisher Scientific). La qPCR permite medir mediante fluorescencia la cantidad de ADN sintetizado, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Para cada muestra, el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal basal. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina Ct (del inglés, *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra (**Figura M4**).

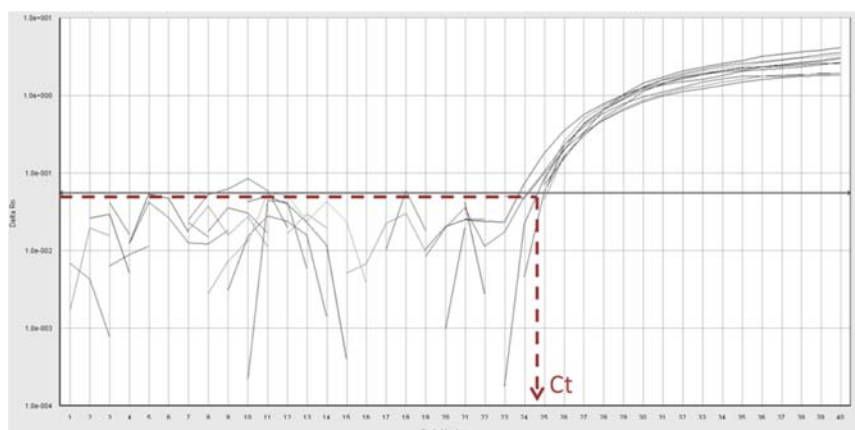


Figura M4. Curvas de amplificación obtenidas mediante qPCR. Gráfico que representa la fluorescencia obtenida (eje Y) en cada ciclo de amplificación (eje X). El valor de Ct corresponde al número del ciclo en el cual la fluorescencia supera la fluorescencia basal del sistema.

La utilización de sondas TaqMan permiten aumentar la especificidad de la reacción. Son sondas de hidrólisis formadas por oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador (*quencher*, en inglés) y están diseñadas para que se hibriden dentro del segmento de ADN diana flanqueado por los cebadores. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, el desplazamiento de la Taq polimerasa (ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*), que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (**Figura M5**) (Costa, 2004).

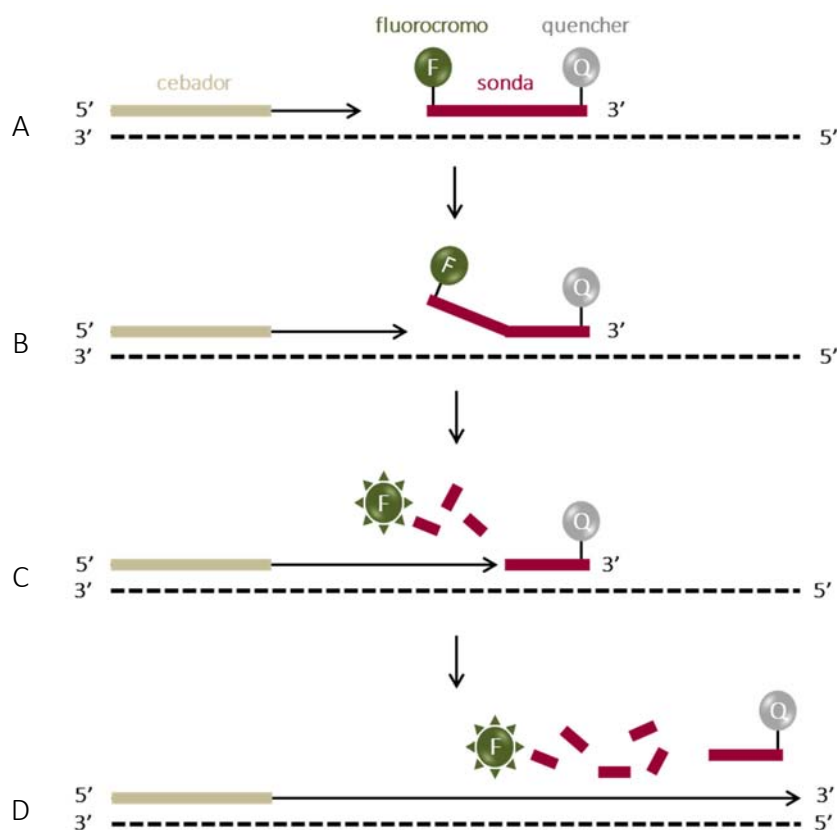


Figura M5. Sondas TaqMan. **A:** La sonda TaqMan, unida a un fluorocromo (F) donador y un aceptor (Q, *quencher*) se hibrida a la cadena de ADN diana en una zona flanqueada por los cebadores. **B:** La Taq polimerasa desplaza la sonda y gracias a su actividad 5' exonucleasa libera el fluorocromo. **C:** La separación del fluorocromo del *quencher* permite la emisión de fluorescencia. **D:** Polimerización completa.

La reacción de PCR se realizó en placas de 384 pocillos en un volumen final de 10µL por pocillo: 0.5µL de cDNA, 5µL de *Master mix* (que contiene la ADN polimerasa, los dNTPs, el MgCl₂ y el tampón de reacción), 0.5µL de la sonda TaqMan (que incluye los cebadores) y 4µL de H₂O DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para eliminar ribonucleasas); todos los reactivos de Thermo Fisher Scientific. Se realizaron 40 ciclos de amplificación en el termociclador con detección de fluorescencia ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa de amplificación: 50°C durante 2min, 95°C durante 10min y 40 ciclos de 95°C durante 15seg y 60°C durante 1min. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. En la **Tabla M4** se detallan las sondas TaqMan utilizadas para la detección de los niveles de expresión de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1*, utilizando *TBP* como control interno. El análisis de los datos se realizó mediante el *software 7900HT Sequence Detection Systems 2.3* (Applied Biosystems). Los niveles relativos de cada ARNm analizado fueron expresados como $-\Delta Ct$ o cuantificados mediante el método comparativo $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak, 2001).

Tabla M4. Sondas TaqMan

Gen	Sonda
<i>SHH</i>	Hs00179843_m1
<i>IHH</i>	Hs00745531_s1
<i>DHH</i>	Hs00368306_m1
<i>GLI1</i>	Hs00171790_m1
<i>TBP</i>	Hs00172424_m1

5.4. Microarray de cDNA

Los microarrays permiten obtener la expresión génica diferencial entre condiciones distintas. Están formados por un conjunto de sondas de ADN fijadas de forma ordenada en un soporte sólido. El cDNA de interés se marca con sondas fluorescentes y se hibrida con el microarray sintetizado. Tras lavados para eliminar las hibridaciones inespecíficas,

se procede a la medición de señal. Para las muestras marcadas fluorescentemente se utiliza un escáner provisto de láseres y filtros capaces de excitar los fluorocromos y captar la fluorescencia emitida. Se genera una imagen que se somete a un proceso de digitalización, normalización y cuantificación, obteniendo los datos de intensidad correspondientes a los genes incluidos en el microarray (Doménech-Sánchez, 2004).

En este trabajo se realizaron microarrays de cDNA para comparar el perfil de expresión génica de líneas celulares RD, RH4 y RH30 tras el tratamiento con Vismodegib respecto a sus controles (tratados con el vehículo DMSO). Esta técnica fue realizada por el servicio de genómica de la Unidad de Alta Tecnología del VHIR. La hibridación de los microarrays se realizó con 200ng de ARNm total en una plataforma *Affymetrix microarray 7000G* y el *Genechip Human Gene Array 2.0*. Las cadenas sencillas de ADN (cadenas sentido) se generaron a partir del ARN total con el kit *GeneChip WT Plus Reactivo* (Affymetrix). Brevemente, muestras de 5.5µg de ADN fueron fragmentadas y marcadas utilizando el kit *GeneChip WT Terminal Labeling* (Affymetrix), siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 5µg de ADN fragmentado y marcado fueron hibridados por array utilizando el kit *Affymetrix hybridization* (Affymetrix). Los arrays fueron hibridados durante 16h a 45°C a 60rpm en un horno de hibridación. Finalmente, los arrays fueron escaneados con *Affymetrix Scanner 3000 7G*. Se normalizaron los arrays y se resumieron las sondas con el algoritmo RMA y se analizaron los datos crudos mediante los *software* estadísticos Bioconductor y R. Los resultados finales fueron expresados como *fold change* (expresión Vismodegib vs DMSO), considerando sobre-expresión significativa un *fold change* superior a 1.5.

5.5. Base de datos

Las bases de datos públicas de microarrays permiten a la comunidad científica determinar los niveles de expresión de genes de interés en una cohorte de pacientes y establecer correlaciones entre los niveles de expresión de los genes de interés y parámetros clínicos. En este trabajo se consultó la base de datos "Davicioni-147-MAS5.0-u133.a" en la cual constan los datos de expresión de 147 tumores de RMS,

utilizando la plataforma de análisis de datos genómicos *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>).

6. Extracción y detección de proteínas

6.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó en hielo y mediante una homogenización mecánica para evitar la desnaturalización y degradación de las proteínas, y así asegurar la obtención de un extracto proteico que representara al máximo las condiciones fisiológicas de las células vivas.

Las muestras de tumores de RMS fueron homogenizadas con un *Pellet Pestle Motor* (Sigma-Aldrich) en el tampón de lisis *Pierce RIPA* (Thermo Fisher Scientific) suplementado con inhibidores de proteasas *Complete protease inhibitor cocktail tablets* (Thermo Fisher Scientific). Para la homogenización de células, se realizó un lavado con PBS y se disgregaron con el uso de rasquetas en el mismo tampón de lisis que en el caso anterior. Los homogenizados fueron incubados durante 3min a 95°C para facilitar la homogenización e inhibir la actividad de las proteasas y posteriormente centrifugados durante 10min a 5000rpm para descartar los restos celulares y de tejido. Los sobrenadantes, que contenían el extracto proteico, fueron inmediatamente congelados a -20°C.

6.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó en base al método Lowry con el kit *Dc protein assay* (Bio-Rad). El método Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. A la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas. Este método consta de 2 etapas (Lowry, 1951):

- Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -

proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de las tirosinas, que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina formando un complejo con tartrato.

- La reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, reacción en la cual el cobre actúa como catalizador. El principal constituyente del reactivo Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

La cuantificación de proteína se realizó mediante la comparación con una recta patrón de 0-2mg/mL de albúmina de suero bovino en agua. Brevemente, se realizó una dilución 1/5 de las muestras a cuantificar y se añadieron 5 μ L/pocillo (3 pocillos por muestra) en placas de 96 pocillos. Seguidamente, se añadieron 25 μ L/pocillo de la mezcla de los reactivos S (solución surfactante) y A (solución alcalina de tartrato de cobre) en una proporción 1/50. Seguidamente, se añadieron 200 μ L/pocillo del reactivo B (reactivo Folin) y se incubó durante 15min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de las absorbancias mediante un espectrofotómetro a 750nm y se determinó la concentración de proteína de las muestras extrapolando los resultados obtenidos en la recta patrón.

6.3. Preparación de las muestras

Tras la cuantificación, las muestras fueron preparadas para su posterior análisis mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y *Western blot*. 15-25 μ g de proteína fueron mezclados con el tampón de carga *Laemmli* (250mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol y 0.5% bromofenol azul) al 10% de ditiotreitól 1M (DTT) (todos los reactivos de Sigma-Aldrich) y desnaturalizados durante 5min a 95°C. El DTT reduce los puentes disulfuro entre los grupos tiol de los residuos cisteína. El SDS es un detergente aniónico que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula

de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína debido a que todas tienen la misma carga por unidad de masa.

6.4. SDS-PAGE

La electroforesis es un método de separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) es un método ampliamente utilizado para la separación de proteínas provenientes de una mezcla compleja en base a su movilidad electroforética. Más concretamente, el SDS-PAGE es un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas en función de su masa.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por la acción del agente entrecruzador, bisacrilamida. Como iniciador de la polimerización se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S^2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato amónico. A esta mezcla se le añade el 10% de SDS para garantizar las condiciones desnaturizantes. La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de acrilamida y bis-acrilamida (intervalo 60:1 a 20:1), siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs acrilamida se use. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel y habitualmente los geles se denominan en función de este porcentaje. La mayoría de las proteínas se separan bien en el rango del 5 al 12%; siendo un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) mejor para separar proteínas de gran tamaño y viceversa.

Para incrementar la resolución, se utiliza el sistema discontinuo de tampones. Este sistema consiste en el uso de un gel separado en dos regiones – *stacking* (apilamiento) y

resolving (resolutivo) – y diferentes tampones en los geles. El gel *stacking* o de apilamiento, de mayor poro y pH más ácido (formado por Tris-HCl 1M pH 6.8), permite la migración rápida de las proteínas que son frenadas al entrar al poro pequeño del gel *resolving* o resolutivo (formado por Tris-HCl 1.5M pH 8.8), provocando así que las proteínas se apilen y formen una fina banda que incrementará la resolución de la separación. Más concretamente, los iones Cl^- son los únicos aniones móviles presentes en ambos geles. Cuando la electroforesis empieza, la glicina presente en el tampón de electroforesis entra en el gel de apilamiento donde, al ser un pH ácido, se convierte en carga 0. El frente de glicina se mueve lentamente a lo largo del gel de apilamiento, muy por detrás de los altamente cargados iones Cl^- , generando así una zona de baja conductividad. Esta zona arrastra las proteínas por los poros del gel de apilamiento y las deposita en el extremo superior del gel resolutivo, formando una estrecha banda. Cuando la glicina alcanza el gel resolutivo su carga se convierte negativa y migra más rápido que las proteínas debido a su mayor ratio carga/masa, permitiendo que las proteínas sean la única fuente de carga y que por lo tanto se separen en función de su masa molecular (**Figura M6**).

Para inferir el peso molecular de las proteínas, se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad). Las electroforesis de geles del 8-12% de acrilamida/bisacrilamida fueron realizadas en cubetas de electroforesis Mini-PROTEAN (Bio-Rad) con tampón de electroforesis (250mM Tris, 1.92M glicina, 1% SDS), a un amperaje constante de 35mA/gel.

6.5. Western blot

El *Western blot* es una técnica de inmunodetección de proteínas. Tras la separación de las proteínas contenidas en una muestra mediante SDS-PAGE, estas son transferidas a una matriz (generalmente a membranas de nitrocelulosa o PVDF (fluoruro de polivinilideno, del inglés *polyvinylidene fluoride*)) y las proteínas de interés son detectadas mediante el uso de anticuerpos.

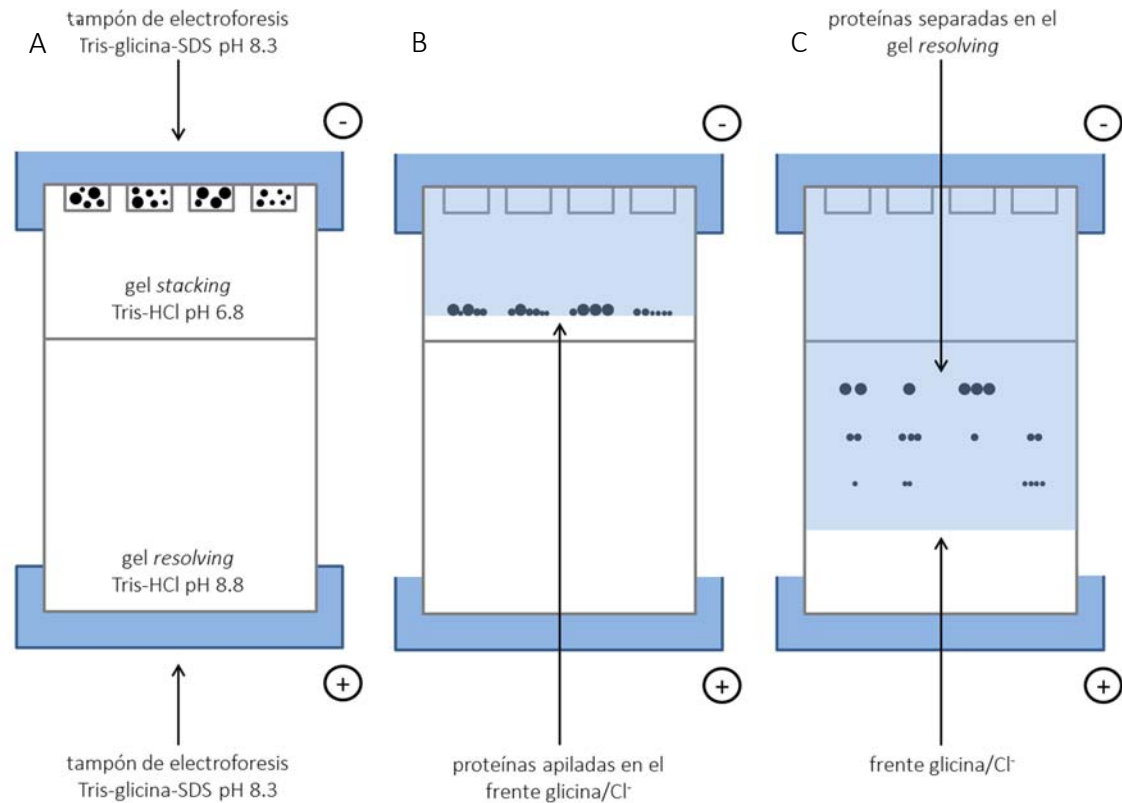


Figura M6. SDS-PAGE en sistema discontinuo de tampones. **A:** Los gels de electroforesis están compuestos por dos regiones: el *gel stacking* o de apilamiento (poros grandes y pH ácido) y el *gel resolving* o resolutivo (poros pequeños y pH básico). **B:** Al aplicar la corriente, la región de baja conductividad generada por la diferencia de carga entre los iones glicina y Cl⁻ permite el apilamiento de las proteínas en el *gel stacking*. **C:** El frente glicina/Cl⁻ migra más rápido que las proteínas permitiendo que éstas se separen en el gel resolutivo en función de su masa molecular.

Tras el SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF con poros de 0.45µm (GE Healthcare Life Sciences), previamente activadas en metanol. El sándwich de transferencia se montó en casetes en el siguiente orden: esponja - 2 x papel Whatman - gel - membrana PVDF - 2 x papel Whatman - esponja, embebidos en tampón de transferencia (10% tampón Tris/glicina (25mM Tris y 192mM glicina), 20% metanol y 70% H₂O). Las transferencias se realizaron en cubetas *Mini Trans-Blot* a 200mA durante 2h a 4°C.

Una vez transferidas, las membranas fueron bloqueadas en TBS-T (tampón Tris salino con Tween-20, del inglés *Tris-Buffered Saline and Tween-20*; 20mM Tris-HCl, 150mM

NaCl y 0.1% Tween-20) al 5% de albúmina de suero bovino durante 30min a temperatura ambiente. El bloqueo de las membranas evita la unión inespecífica de los anticuerpos utilizados en los siguientes pasos. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con la dilución adecuada de anticuerpo primario en tampón de bloqueo (**Tabla M5**) durante toda la noche a 4°C. Antes de la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados de 10min con TBS-T en agitación para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con una dilución en tampón de bloqueo del anticuerpo secundario adecuado, los cuales estaban conjugados a la enzima HRP (peroxidasa de rábano, del inglés *horseradish peroxidase*) (**Tabla M6**). Se volvieron a realizar 3 lavados de 10min con TBS-T en agitación para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y para el revelado se incubaron las membranas con *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare Life Sciences) durante 5min. Éste está formado por dos componentes – solución de peróxido y solución de luminol – que reaccionan con la enzima HRP a la cual están conjugados los anticuerpos secundarios. Más concretamente, el luminol es oxidado en presencia de peróxido por la encima HRP, reacción que genera luz. La luz emitida fue detectada mediante *SuperRX Fuji Medical X-RAY Films* (Fujifilm).

7. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica permite la localización de epítomos proteicos en secciones de tejidos mediante el uso de anticuerpos específicos.

El servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron realizó la fijación en formalina y la inclusión en parafina de las muestras de tumores de RMS y nos cedieron secciones de 23 tumores diferentes para la inmunodetección de SHH, IHH y DHH. Para eliminar el exceso de parafina, las secciones fueron depositadas durante toda la noche en una estufa a 65°C. Posteriormente, fueron desparafinadas sumergiéndolas en xileno y etanol al 100% y se hidrataron sumergiéndolas en concentraciones decrecientes de etanol. Tras lavados con PBS al 0.5% de tritón para la permeabilización de los tejidos, se

realizó el desenmascaramiento de los antígenos. La fijación e inclusión de los tejidos altera la estructura tridimensional de las proteínas, provocando que no sean reconocidos por los anticuerpos utilizados. Mediante técnicas de desenmascaramiento, principalmente técnicas enzimáticas o la aplicación de calor en presencia de tampones específicos, se restaura la conformación de los epítopos. En este caso, se realizó el desenmascaramiento sumergiendo las secciones en una dilución 1/10 de tampón citrato 10nM pH 6 (Dako) incubándolas en el microondas a máxima potencia (800W). Tras lavados con agua miliQ y PBS al 0.1% de Tween, se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con PBS-Tween al 10% de suero fetal bovino para bloquear uniones inespecíficas de los anticuerpos. Se añadieron 2-3 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% sobre las muestras para bloquear las peroxidasas endógenas del tejido, evitando así posteriores interferencias en el revelado. Se lavaron las secciones con PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C con una dilución 1:50 en PBS-Tween de los anticuerpos primarios anti-SHH, -IHH y -DHH (**Tabla M5**). Tras lavados con PBS-Tween para eliminar el exceso de anticuerpo primario, las muestras se incubaron con la dilución del anticuerpo secundario adecuado conjugados a la enzima HRP. El revelado se realizó con DAB (diaminobencidina) (Dako), el cual es un sustrato de la enzima HRP y permite la detección del anticuerpo primario mediante la formación de un producto de reacción marrón. Finalmente, las muestras fueron lavadas y contrateñidas con hematoxilina para visualizar los núcleos celulares.

Las muestras fueron evaluadas utilizando un método semi-cuantitativo en base al porcentaje de células positivas (0%, $\leq 25\%$, 26-50%, 51-75% y $\geq 75\%$ que corresponden a las puntuaciones 0, 1, 2, 3 y 4, respectivamente) más la intensidad de marcaje (puntuación del 0 al 3); obteniendo un rango de puntuación del 0 al 7.

Tabla M5. Especificaciones de los anticuerpos primarios

Anticuerpo	Antígeno (peso molecular)	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
anti-SHH	45 kDa	conejo	1:2000	06-1105	Millipore
anti-IHH	45 kDa	conejo	1:1000	MABF23	Millipore
anti-DHH	45 kDa	ratón	1:500	H00050846-B01P	Novus Biologicals
anti-GLI1	150 kDa	conejo	1:1000	EPR4523	Millipore
anti-GLI2	220 kDa	conejo	1:1000	R770	Cell Signaling
anti-PTCH1	160 kDa	conejo	1:1000	06-1102	Millipore
anti-Ciclina D2	34 kDa	conejo	1:200	sc-593	Santa Cruz Biotechnology
anti-PARP1	116, 89 kDa	conejo	1:1000	#9542	Cell Signaling
anti-TRIB3	42 kDa	conejo	1:1000	07-2160	Millipore
anti-CHOP	30 kDa	ratón	1:200	sc-7351	Santa Cruz Biotechnology
anti- α Tubulina	50 kDa	ratón	1:5000	ab7291	Abcam
anti-Actina	43 kDa	cabra	1:10000	sc-1616	Santa Cruz Biotechnology

Tabla M6. Especificaciones de los anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Dilución	Referencia	Casa comercial
anti-Ig conejo	1:1000	A0545	Sigma-Aldrich
anti-Ig ratón	1:2000	P016102	Dako
anti-Ig cabra	1:2000	P044901	Dako

8. Ensayos de proliferación celular

8.1. Recuento celular

Las células pertenecientes a las diferentes condiciones (shRNA o tratamientos) fueron sembradas a la misma concentración. Tras 5 días de incubación, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en 10mL de PBS. El recuento celular se realizó con el contador de partículas Coulter (Beckman Coulter). Cada condición fue analizada por triplicado en 3 ensayos independientes.

8.2. Ensayo WST-1

La proliferación celular fue analizada mediante el ensayo colorimétrico WST-1 (Sigma-Aldrich). El WST-1 es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) que es reducida a formazán (de color amarillo) por las dehidrogenasas mitocondriales implicadas en la producción glicolítica de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). La cantidad de formazán, evaluada en mediciones de absorbancia con un espectrofotómetro, es proporcional al número de células viables.

Las células pertenecientes a diferentes condiciones (shRNA o tratamientos) fueron sembradas a la misma concentración en placas de 96 pocillos. Tras 5 días de incubación, el WST-1 fue añadido a cada pocillo a una dilución final 1:10 y tras 2-3h de incubación, la absorbancia fue medida mediante un espectrofotómetro. Se realizaron 2 lecturas, la primera a 440nm (para la detección de formazán) y la segunda a 690nm (longitud de onda de referencia), y se expresaron los resultados como la diferencia entre ambos valores. Cada condición fue analizada por triplicado en 3 ensayos independientes.

9. Ensayo de invasión Transwell

El ensayo *Transwell* permite cuantificar *in vitro* la capacidad de invasión de las células. Esta técnica se basa en la capacidad de las células tumorales de degradar la matriz extracelular, mediante la producción de proteasas, para invadir el estroma, extravasar y establecer metástasis distales. En este ensayo, se promueve la invasión de las células

mediante quimiotaxis en un sistema de 2 cámaras separadas por una membrana porosa recubierta por *Matrigel*, la cual mimetiza la matriz extracelular. Las células tumorales se depositan en la cámara superior y se añade medio rico en suero en la cámara inferior; las células con capacidad de invasión se encontrarán en la superficie inferior de la membrana (Figura M7).

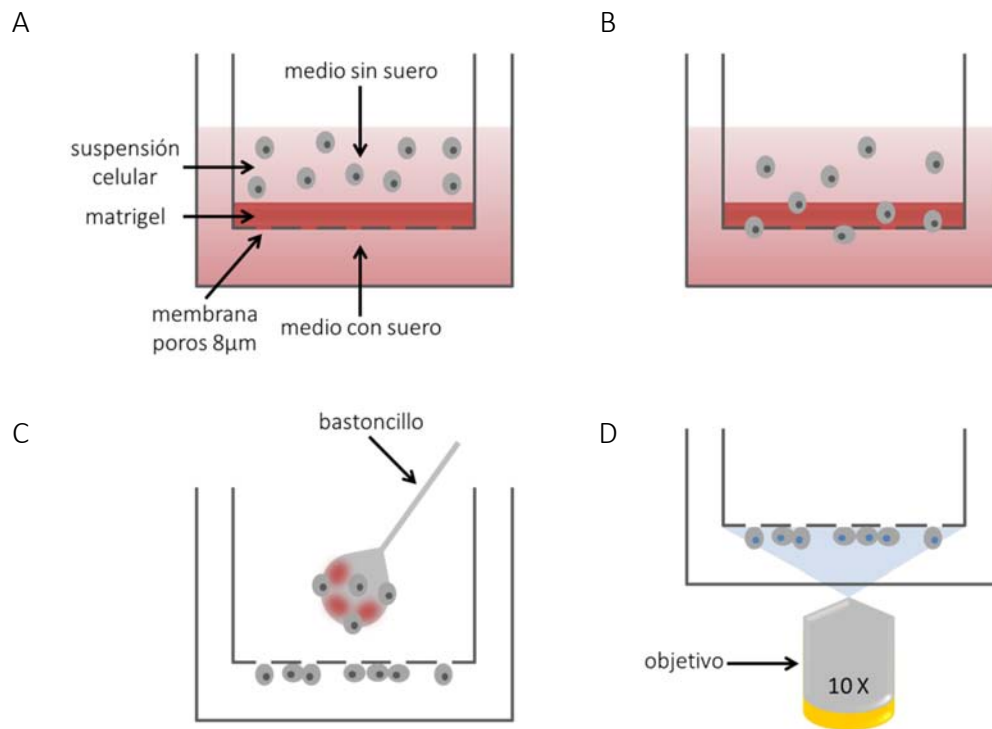


Figura M7. Representación del ensayo de invasión *Transwell*. **A:** Los insertos *Transwell* están formados por dos cámaras separadas por una membrana porosa recubierta por *Matrigel*, que mimetiza la matriz extracelular. En la cámara superior se añade la suspensión celular y se genera un gradiente de suero entre ambas cámaras. **B:** Durante la incubación, las células con capacidad invasiva degradan el *Matrigel* y atraviesan la membrana por sus poros, depositándose en la superficie inferior de ésta. **C:** Se fijan las células que han invadido y se retiran los restos de *Matrigel* y de las células sobrantes de la cámara superior mediante lavados y con la ayuda de un bastoncillo. **D:** Contaje de las células que se encuentran en la superficie inferior de la membrana mediante la tinción con Hoechst 33342 y su visualización con un microscopio de epifluorescencia.

En este caso, se utilizaron insertos de *Transwell* con membranas de policarbonato de 8µm de poro en placas de 24 pocillos (Corning). Las membranas fueron recubiertas por 25µL de *Matrigel Growth Factor Reduced* (Corning) diluido en medio sin suero (dilución

1/3) y se incubaron durante 20min a temperatura ambiente para su solidificación. Para la generación del gradiente de suero, en las cámaras superiores se añadieron 10^5 células en 100 μ L de medio sin suero y en las cámaras inferiores 600 μ L de medio al 10% de suero. Tras 24h de incubación en las condiciones normales de cultivo, el *Matrigel* fue aspirado y los insertos fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS, añadiendo 100 μ L en la cámara superior y 600 μ L en la cámara superior. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS y se eliminaron los restos de *Matrigel* y de células en la cámara superior con un bastoncillo. Las células de interés, es decir, aquellas que invadieron a la superficie inferior de la membrana porosa de policarbonato, fueron teñidas con Hoechst, colorante fluorescente que se intercala en el ADN y que permite el conteo de núcleos (**Figura M7**). Los insertos fueron incubados durante 10min con 5ng/mL de Hoechst 33342 y tras un lavado con PBS, se procedió al conteo realizando fotografías de 5 campos representativos de cada membrana con un microscopio de epifluorescencia. Cada condición fue evaluada por triplicado y se realizaron 3 réplicas independientes de cada ensayo.

10. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica en la cual las células resuspendidas en un tampón isotónico pasan individualmente a través de un rayo láser y mediante principios ópticos y de fluorescencia se realiza la medición y cuantificación de atributos celulares, tales como la mida celular, la granulosidad, el contenido de ADN o la presencia de receptores de membrana, entre otros. Un citómetro de flujo consta de 4 sistemas: fluídico, óptico, electrónico y computacional.

El primer paso es el sistema fluídico que permite que las células, previamente marcadas con un fluorocromo, pasen rápidamente y de forma individual a través del área del rayo láser de detección. El sistema óptico consiste en la fuente de amplificación de la luz (láser). El láser emite luz de una longitud de onda específica, existiendo varios tipos de láser, cada uno capaz de excitar fluorocromos específicos y haciendo que éstos se exciten y emitan luz. Una vez que las células pasan por el láser, se hacen dos detecciones iniciales: FSC y SSC. La dispersión frontal (FSC, del inglés *forward scatter*) es

la luz que se dispersa en la misma dirección que el láser y es indicativo de la morfología celular o tamaño de las células. La dispersión lateral (SSC, del inglés *side scatter*) es la luz que se dispersa en un ángulo de 90° de la dirección del láser y es proporcional a la granulosidad celular (**Figura M8**). Posteriormente, se realiza la detección de los fluorocromos de interés mediante la selección de los láseres y filtros de excitación y emisión adecuados. El sistema electrónico permite la conversión de fotones en datos interpretables gracias a unos detectores ópticos denominados fotomultiplicadores (PMT, del inglés *photomultiplier tubes*). Estos detectores son semiconductores que convierten los fotones detectados en señales eléctricas que pueden ser interpretadas. Cada señal detectada por el citómetro se denomina "evento" y todos los eventos de una determinada muestra son almacenados computacionalmente. El análisis de los datos y gráficos generados se realiza mediante *software* diseñados específicamente para citometría de flujo (Jaroszeski, 1999; Betters, 2015).

Muchos citómetros de flujo son capaces de separar las células que contienen una característica de interés, permitiendo así la obtención de una suspensión purificada a partir de una suspensión heterogénea. Este proceso es conocido como FACS (del inglés *fluorescence-activated cell sorting*).

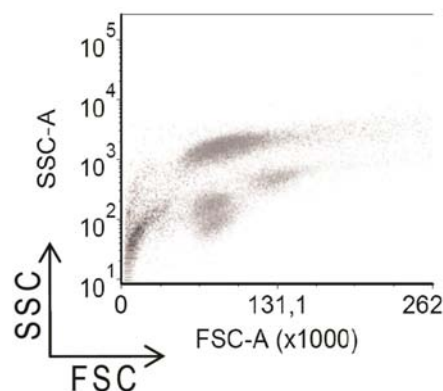


Figura M8. FSC y SSC. Gráfico que representa el FSC (*forward scatter*) y SSC (*side scatter*) de una muestra de médula ósea analizada mediante citometría de flujo. Imagen obtenida de Almazán-Moga (2014).

10.1. Ensayo de viabilidad celular

Se analizó la viabilidad celular tras el tratamiento con inhibidores de HH mediante citometría de flujo. También se utilizó este procedimiento para la siembra de células vivas en el ensayo de formación de holoclonos. Para ello, se utilizó el colorante fluorescente yoduro de propidio (IP). Este compuesto se intercala en las dobles cadenas de ADN y, al ser impermeable a la membrana celular, sólo entra en las células muertas (Figura M9).

El medio de las células fue recogido y las células fueron tripsinizadas, tal y como se ha descrito anteriormente. El mismo número de células, pertenecientes a cada condición, fueron incubadas con 2 µg/mL de IP (Sigma-Aldrich) en PBS y analizadas en el citómetro de flujo FACS Aria (BD Bioscience). Se utilizó el láser de excitación de 488nm (láser azul), y para la detección de la fluorescencia del IP se utilizó el filtro de emisión BP 610/20 y el detector *B-Blue*. Los resultados fueron analizados con el software *FCS Express 4 Flow Cytometry* (De Novo Software).

Para la realización del ensayo de formación de clones, se realizó el marcaje con IP y se sembró 1 célula viva por pocillo en placas de 96 pocillos con el citómetro FACS Aria.

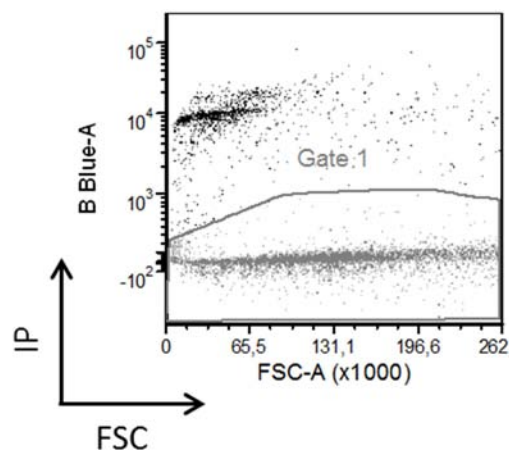


Figura M9. Ensayo de viabilidad celular mediante citometría de flujo. Gráfico que representa los niveles de IP (yoduro de propidio) de una muestra analizada mediante citometría de flujo. Las células negativas por IP (marcadas como *Gate 1*) corresponden a las células vivas.

10.2. Análisis de la apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso clave durante la embriogénesis así como en el mantenimiento de la homeostasis en tejidos adultos (Koopman, 1994). Este proceso se caracteriza por la condensación de la cromatina, la reducción en el volumen celular y la fragmentación del ADN como resultado final de una cascada de procesos bioquímicos. Uno de los procesos iniciales de la apoptosis es la pérdida de asimetría de los fosfolípidos de la membrana celular que resulta en la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular, esencial para el reconocimiento y la eliminación de las células apoptóticas por parte de los macrófagos (Vermes, 2000).

El análisis de la apoptosis realizado en este trabajo se basa en este cambio en la arquitectura de la membrana celular previo a su pérdida de integridad. La Anexina V es una proteína de 36kDa que se une a fosfolípidos de forma dependiente de Ca^{2+} , presentando una elevada afinidad por la fosfatidilserina. La conjugación de la Annexina V con un fluorocromo conjuntamente con la adición de un colorante fluorescente que se intercale en el ADN pero impermeable a la membrana celular (por ejemplo, ioduro de propidio) permite identificar las células apoptóticas tempranas, es decir, aquellas con exposición de fosfatidilserina en la superficie celular (Anexina V positivas) pero con la membrana celular íntegra (ioduro de propidio negativas) (**Figura M10**).

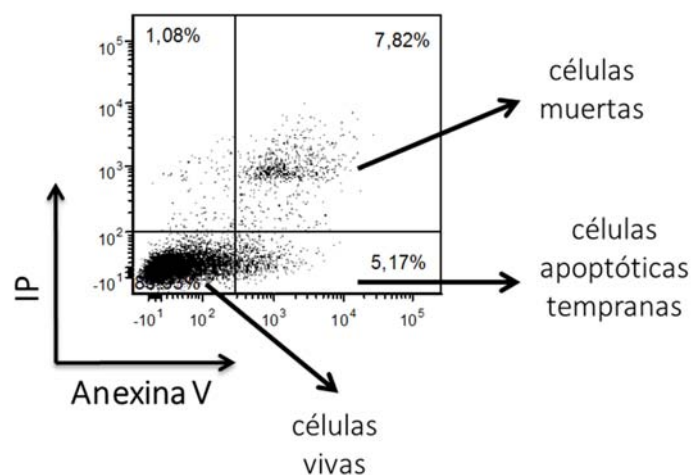


Figura M10. Análisis de apoptosis mediante citometría de flujo. Gráfico que representa los niveles de IP (ioduro de propidio) y Anexina V de una muestra analizada mediante citometría de flujo. Las células negativas por IP y positivas por Anexina V, situadas en el cuadrante derecho inferior, corresponden a las células apoptóticas tempranas.

El medio de las células fue recogido y las células fueron desenganchadas con la solución quelante *cell dissociation buffer enzyme-free* (Thermo Fisher Scientific). 10^5 células de cada condición fueron resuspendidas en 100 μ L de *binding buffer* 1x (BD Biosciences) e incubadas con 5 μ L de Anexina V-APC (aloficocianina, del inglés *allophycocyanin*) (BD Biosciences) durante 15min. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción añadiendo 400 μ L de *binding buffer* 1x y se añadió 0.5 μ L del colorante vital impermeable a la membrana celular Sytox Blue (Thermo Fisher Scientific). En paralelo, se analizó una muestra tratada con 0.5 μ M de estaurosporina durante 2h como control positivo de apoptosis. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo LSRFortessa (BD Bioscience). Para la excitación del APC, se utilizó el láser de 405nm (violeta) y para la detección de su fluorescencia se utilizó el filtro de emisión BP 450/50 y el detector C-Violet. Para el Sytox blue, se utilizó el láser de 640nm (rojo), el filtro de emisión BP 670/14 y el detector C-red. Los resultados fueron analizados con el *software FCS Express 4 Flow Cytometry* (De Novo Software).

11. Ensayos de enriquecimiento de células madre

11.1. Ensayo de formación y selección de colonias

Las células viables fueron separadas y sembradas a densidad clonal mediante el citómetro de flujo FacsAria (BD Bioscience) en placas de 96 pocillos. Tras 10 días de incubación, las colonias fueron clasificadas en holoclones, meroclones o paraclones según su morfología. El número total y la tipología de las colonias generadas fueron analizados por triplicado en las líneas celulares CW9019 y HTB82.

Para la formación de colonias secundarias, las colonias fueron tripsinizadas y sembradas a densidad clonal en placas de 96 pocillos. La tipología de colonias generadas a partir de cada uno de los tipos de colonia fue analizada por triplicado en 3 experimentos independientes.

Para la extracción de ARN, los clones fueron tripsinizados y expandidos en placas de 6 pocillos.

11.2. Ensayo de formación de esferas

10^4 y 10^3 células de las líneas celulares CW9019 y HTB82, respectivamente, fueron sembradas en medio Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 2x B27 (Gibco), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 0.1mg/mL de estreptomina (Biowest), 20ng/mL de EGF (*Epidermal Growth Factor*, R&D System) y 10ng/mL de FGF (*Fibroblast Growth Factor*, Sigma-Aldrich) en placas de 6 pocillos y mantenidas en incubadores de camisa de agua a 37°C en una atmósfera del 95% de aire y 5% de CO₂. Tras 1 semana de incubación, el número total de esferas formadas fue contado mediante la realización de fotografías de 9 campos representativos por pocillo y expresado como la media de 3 pocillos. La eficiencia de formación de esferas de cada línea celular fue evaluada en 3 ensayos independientes.

Para la formación de esferas secundarias, las esferas fueron recogidas, disgregadas mecánicamente y sembradas a la densidad mencionada anteriormente. El número total de esferas secundarias formadas fue contado tras 1 semana de incubación.

12. Modelos animales

Los ratones hembra SCID y SCID-Beige fueron adquiridos de Charles River Laboratories y estabulados en condiciones SPF (libre de patógenos específicos, del inglés *specific-pathogen-free*) con agua y comida *ad libitum*. Todos los protocolos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del VHIR (CEEA 30/14).

Ambas cepas de ratones pertenecen a la categoría de ratones inmunodeprimidos SCID (inmunodeficiencia combinada severa, del inglés *severe combined immunodeficiency*), los cuales se caracterizan por la mutación $Prkdc^{scid}$ que elimina la inmunidad adaptativa. El gen *PRKDC* codifica por la unidad catalítica de la quinasa implicada en la reparación de los cortes del ADN generados durante la recombinación V(D)J en el proceso de maduración de los linfocitos T y B. La mutación $Prkdc^{scid}$ provoca la pérdida de la función de esta quinasa y confiere una deficiencia severa de linfocitos T y B en estos ratones. Los ratones SCID (Fox Chase SCID Congenic; nomenclatura: CB17/Icr- $Prkdc^{scid}$ /IcrIcoCrI) son deficientes en linfocitos B y T pero poseen células NK (*natural killer*), macrófagos y

granulocitos. En cambio, los ratones SCID-Beige (Fox Chase SCID Beige; nomenclatura CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg}/Crl) además de la mutación SCID poseen también la mutación *beige* Lyst^{bg} que causa una reducción en la actividad citotóxica de las células NK. Ambas cepas son altamente utilizadas para experimentos *in vivo* en el campo de la oncología debido a que su inmunodeficiencia facilita el crecimiento de xenotransplantes.

12.1. Modelo ortotópico

Las células de la línea RD fueron transducidas de forma estable con vectores lentivirales codificantes por shRNA contra *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* (*vide supra* apartado 4). 7 días post infección, 10⁶ células fueron inyectados en el músculo gastrocnemio (**Figura M11**) de las extremidades posteriores de ratones SCID mientras que el mismo número de células control (transducidas con el vector vacío pGIPZ) fueron inyectadas en el músculo de las extremidades contralaterales de éstos (n=5/condición). Cada 2 días se pesaron los animales y el crecimiento tumoral fue monitorizado utilizando un pie de rey digital. Tras el sacrificio de los ratones mediante dislocación cervical, los tumores extraídos fueron pesados y medidos. El volumen tumoral fue expresado como la diferencia entre el volumen del tumor y el volumen de la extremidad contralateral. Los volúmenes se calcularon según la fórmula del volumen de una esfera:

$$\text{volumen tumor} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{L + A}{4}\right)^3$$

12.2. Modelo murino de metástasis

Para la generación de un modelo de metástasis, las células fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones SCID-Beige. El peso de los ratones fue controlado cada 2 días. Tras la pérdida del 20% de su peso, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se realizaron necropsias para la evaluación de las metástasis formadas.



Figura M11. Tumor generado por la inyección de células RD en el músculo gastrocnemio de ratones SCID.

Para testar el efecto de la inhibición de SHH sobre la formación de metástasis *in vivo*, células de la línea RD fueron transducidas de forma estable con vectores lentivirales codificantes por shRNA contra *SHH*. Los ratones fueron divididos en 2 grupos, un grupo fue inyectado con 2×10^6 células RD con infra-regulación de *SHH* y el grupo control con 2×10^6 células RD transducidas con el vector vacío pGIPZ (n=5/condición). Para la comprobación del efecto del inhibidor de SMO Vismodegib, 10^6 células de la línea celular RH30 fueron inyectadas en la vena de la cola. Los ratones fueron tratados diariamente con 40mg/kg de Vismodegib mediante una inyección intraperitoneal y los ratones del grupo control fueron tratados con el mismo volumen de vehículo (DMSO) (n=10/condición).

13. Análisis estadístico

Los resultados mostrados representan la media \pm SEM (error estándar de la media, del inglés *standard error of the mean*). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism*. Concretamente, se realizaron los siguientes test estadísticos:

- Prueba T de Student: prueba de hipótesis que permite determinar si existen diferencias significativas entre las medias de 2 grupos de datos que siguen una distribución normal.
- Correlación de Spearman: medida de correlación lineal entre 2 variables aleatorias continuas.

- Test Log-rank: prueba de hipótesis que permite determinar si existen diferencias significativas entre 2 curvas de supervivencia.

En todos ellos, se aceptaron los resultados como significativos con un p -valor <0.05 y se mostró la significancia siguiendo el siguiente criterio: * p -valor <0.05 ; ** p -valor <0.01 ; *** p -valor <0.001 .

IV. RESULTADOS

1. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA HEDGEHOG EN EL RABDOMIOSARCOMA: EL PAPEL DE LOS LIGANDOS

1.1. IHH y DHH son los ligandos HH predominantes en líneas celulares y tumores de RMS

1.1.1. Líneas celulares de RMS

Los niveles de expresión de los ligandos HH – *SHH*, *IHH* y *DHH* – fueron analizados mediante RT-qPCR y *Western blot* en 5 líneas celulares que representan los subtipos principales de RMS: alveolar con translocación PAX3-FOXO1 (RH30 y RH4), embrionario (HTB82 y RD) y alveolar sin translocación (RH18). Las 2 líneas celulares de RMSe (HTB82 y RD) presentaron niveles de expresión moderados de *SHH* mientras que las 3 líneas celulares de RMSa (RH30, RH4 y RH18) presentaron niveles de expresión extremadamente bajos (**Figura R1-A**). En cambio, los niveles de expresión de los ligandos *IHH* y *DHH* fueron elevados en todas las líneas celulares sin excepción (**Figura R1-A**). Adicionalmente, los niveles de proteína mostrados por *Western blot* fueron concordantes con la tendencia obtenida mediante RT-qPCR (**Figura R1-B**). Los niveles de proteína de *SHH* fueron extremadamente bajos en todas las líneas celulares del subtipo alveolar y muy bajos en las líneas celulares del subtipo embrionario. Por el contrario, todas las líneas celulares mostraron niveles muy altos de *IHH*. Los niveles de proteína de *DHH* fueron muy elevados en las líneas celulares analizadas del subtipo embrionario y moderados en las líneas celulares del subtipo alveolar, con la excepción de RH30 que mostró niveles de expresión muy bajos.

1.1.2. Tumores de RMS

Los niveles de expresión de los ligandos HH fueron analizados mediante RT-qPCR en un panel de 53 muestras de tumores humanos de RMS. Los resultados mostraron una tendencia similar a los obtenidos en las líneas celulares. De forma concordante, la expresión de *SHH* mostró ser negligible en la mayoría de las muestras. Sin embargo, aproximadamente el 30% de los pacientes mostraron una expresión notable de ARNm

de *SHH*, formando una subpoblación positiva bien diferenciada (Figura R1-C). Por el contrario, los niveles de ARNm de *IHH* y *DHH* fueron moderados, elevados o muy elevados en todas las muestras de pacientes analizadas. Teniendo en cuenta los subtipos de RMS, no se observaron diferencias significativas entre RMSa y RMSe (Figura R1-E).

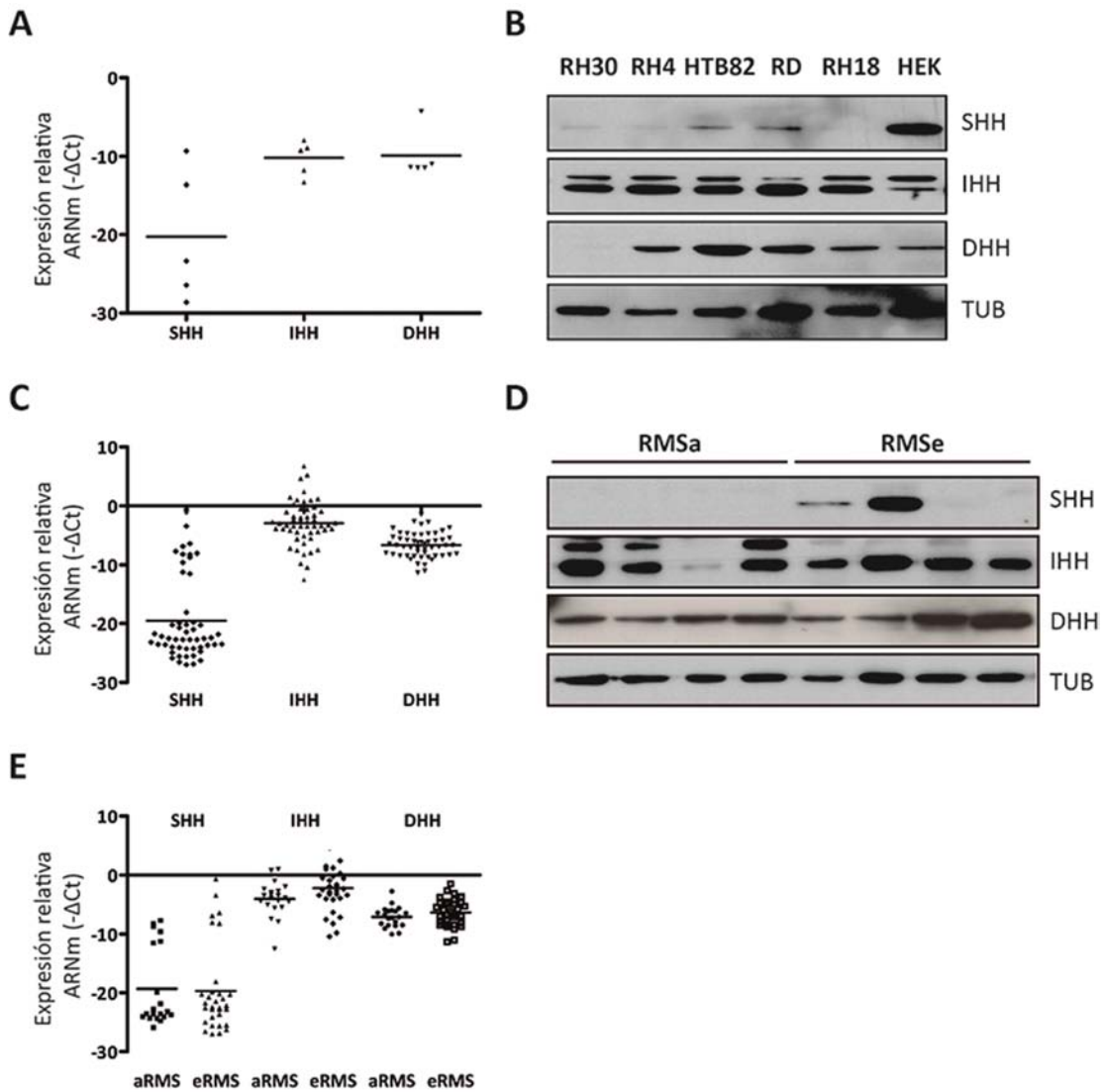


Figura R1. IHH y DHH están ampliamente expresados en RMS mientras que SHH sólo se expresa en un pequeño subconjunto de líneas celulares y pacientes de RMS. **A:** Análisis de los niveles de expresión de ARNm de *SHH*, *IHH* y *DHH* en 5 líneas celulares de RMS (RH30, RH4, HTB82, RD y RH18) mediante RT-qPCR. Los valores están expresados como $-\Delta Ct$ y las líneas horizontales representan la media de los valores obtenidos. **B:** Imágenes de *Western blot* que muestran los niveles de los ligandos HH en las mismas líneas celulares de RMS y la línea celular HEK como control positivo. La tubulina (TUB) fue utilizada como control de carga. **C:** Análisis de RT-qPCR de los niveles de expresión de los ligandos HH en tumores de pacientes de RMS. Los valores están expresados como $-\Delta Ct$ y las líneas horizontales representan la media de los valores obtenidos (n=53). **D:** Imágenes de *Western blot* que muestran los niveles de los ligandos HH en 8 tumores de pacientes con RMS (RMSa: alveolar; RMSe: embrionario.) La tubulina (TUB) fue utilizada como control de carga. **E:** Análisis de RT-qPCR de los niveles de expresión de los ligandos HH en tumores de RMS del subtipo alveolar (RMSa) versus tumores de RMS del subtipo embrionario (RMSe). Los valores están expresados como $-\Delta Ct$ y las líneas horizontales representan la media de los valores obtenidos.

Con la finalidad de confirmar si esta tendencia se observaba también en los niveles de proteína de los ligandos HH, se analizaron muestras de tumores de RMS mediante *Western blot* e inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos mediante *Western blot* en un panel de 8 muestras de tumores de pacientes de RMS reveló la misma tendencia: bajos o nulos niveles de SHH y de moderados a muy elevados niveles de IHH y DHH (**Figura R1-D**). Asimismo, el análisis inmunohistoquímico de secciones de tumores humanos de RMS (n=23) también reveló la expresión predominante de los ligandos IHH y DHH en las células tumorales (**Figura R2**). La mayoría de tumores analizados mostraron niveles muy bajos o negligibles de SHH (15 de 23, 65%), mientras que el 35% restante mostraron niveles bajos o moderados. En cambio, IHH y DHH fueron altamente expresados en todas las muestras, con una puntuación semi-cuantitativa ≥ 4 para IHH en 18 de 23 muestras (78%) y para DHH en 20 de 23 muestras (87%), y con una puntuación máxima (puntuación semi-cuantitativa de 7) para ambas proteínas en 14 de 23 muestras (61%) (**Figura R2-D**). En la **Figura R2 (A-C)** se muestran imágenes representativas de las inmunohistoquímicas de SHH, IHH y DHH, respectivamente.

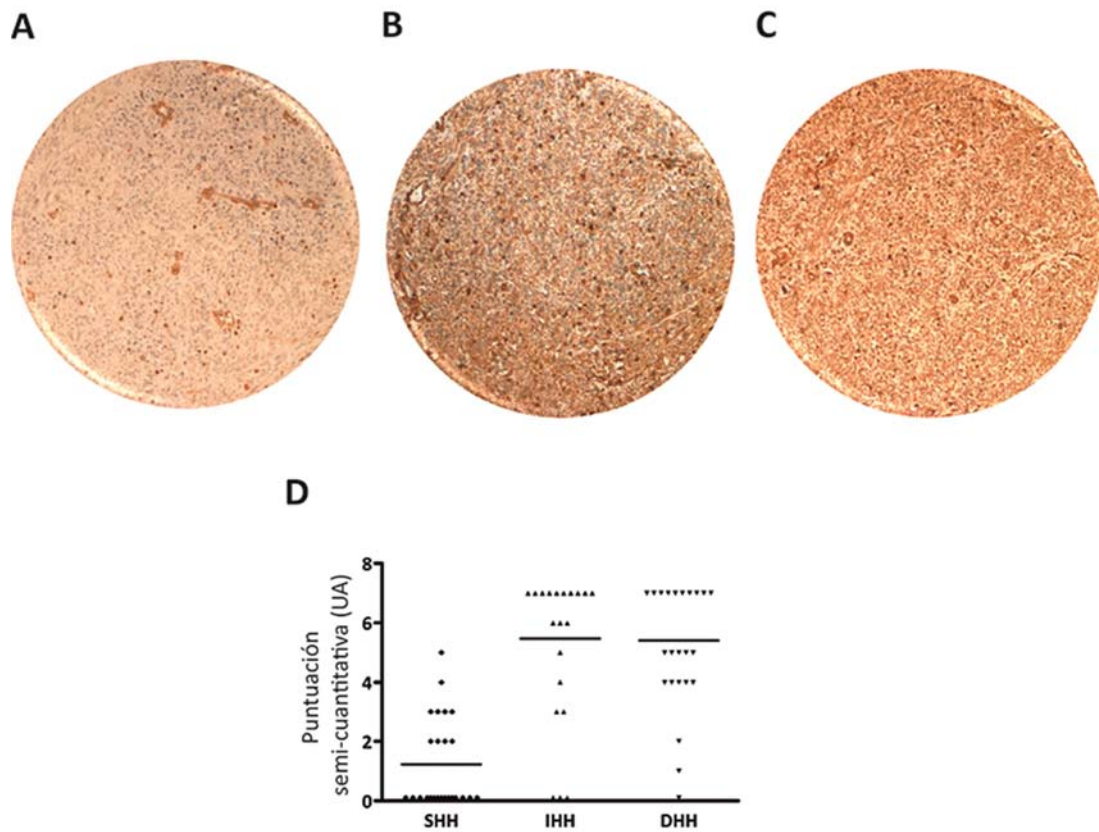


Figura R2. Los ligandos IHH y DHH son los ligandos preponderantes en las células tumorales de RMS. Presencia de SHH (A), IHH (B) y DHH (C) en muestras archivadas de tumores de pacientes de RMS analizada mediante inmunohistoquímica. D: Representación semi-cuantitativa de la expresión de los ligandos HH en muestras de tumores de pacientes de RMS (n=23). Las líneas horizontales representan la puntuación media por cada marcador. UA: unidad arbitraria.

1.2. La presencia de los ligandos HH correlaciona con la activación de la vía, sugiriendo un mecanismo autocrino

1.2.1. Correlación de los niveles de expresión de los ligandos HH y *GLI1* en muestras de tumores de RMS

Para determinar la implicación de los ligandos SHH, IHH y DHH en la activación de la vía HH, se estudió su correlación con el principal gen diana de la vía, *GLI1* (Figura R3, A-D). Los resultados mostraron correlaciones significativas para *SHH* (en el 30% de pacientes que mostraron expresión de éste) ($p=0.0197$), *DHH* ($p=0.0268$) y la suma de los 3

ligandos ($p=0.0189$). Para *IHH* no se obtuvo una correlación significativa, aunque se observó una tendencia.

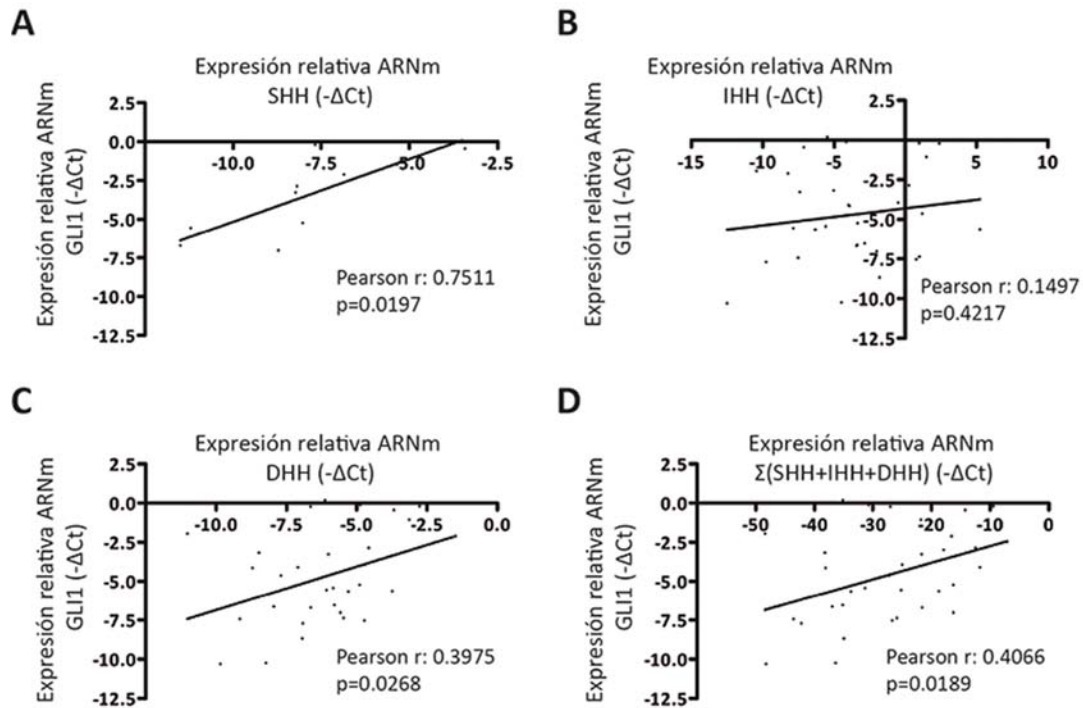


Figura R3. Correlación entre los niveles de expresión de ARNm de los ligandos HH y *GLI* en muestras de tumores de RMS. Grado de correlación entre la expresión de ARNm (valores de $-\Delta$ Ct) de *GLI1* y *SHH* (A), *IHH* (B), *DHH* (C) y la expresión total de los 3 ligandos (D). En el gráfico (A) solamente se muestran los pacientes con expresión significativa de *SHH*. Los coeficientes de correlación Pearson y p-valores están incluidos en cada gráfico.

1.2.2. La infra-regulación genética de los ligandos *SHH*, *IHH* y *DHH* en líneas celulares de RMS provoca la reducción de los genes diana de la vía HH

Con el objetivo de confirmar la capacidad de los ligandos HH de modular la vía, se generaron clones de líneas celulares de RMS (RD, RH4 y RH30) con infra-regulación genética de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNA (Figura R4) y se analizaron mediante *Western blot* los cambios en la expresión de los componentes y genes diana de la vía HH – *GLI1*, *GLI2* y *PTCH1* – en estos clones (Figura R5). La infra-expresión genética de los

ligandos HH y *GLI1* en las líneas celulares RD y RH4 reveló una infra-expresión de las dianas HH analizadas. La infra-regulación de *IHH*, *DHH* y *GLI1* resultó en una marcada disminución de *GLI1*, *GLI2* y *PTCH1*. La infra-expresión de *SHH* no afectó la expresión de *GLI1* pero claramente disminuyó los niveles de *GLI2* y *PTCH1* (**Figura R5, A y B**). En cambio, en la línea RH30 – que posee una amplificación génica de *GLI1* – ninguno de los ligandos moduló de forma significativa la expresión de *GLI1*. No obstante, la privación de *SHH*, *IHH* y *DHH* produjo una reducción de la expresión de *GLI2* y *PTCH1* (**Figura R5-C**). Conjuntamente, estos resultados sugieren fuertemente la activación autocrina de la vía HH en el RMS.

1.3. La inhibición de la vía HH reduce la proliferación de las células de RMS *in vitro* e *in vivo*

1.3.1. Únicamente la infra-regulación de los ligandos *IHH* y *DHH* provoca una reducción en la proliferación celular

Con la finalidad de determinar la implicación de los ligandos HH en la proliferación celular, se realizaron ensayos de conteo celular (**Figura R6, A, C y E**) y WST1 (**Figura R6, B, D y F**) en las líneas celulares RD, RH4 y RH30 tras la infra-regulación de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNA. La privación de *IHH*, *DHH* y *GLI1* redujo de forma significativa la proliferación celular en las líneas celulares RD y RH4 (**Figura R6, A a D**). Como era de esperar, no se observó ningún efecto en la línea celular RH30. En esta línea celular sólo la reducción de *GLI1* produjo un efecto anti-proliferativo (**Figuras R6, E y F**). De forma concordante, tras la infra-regulación de *IHH*, *DHH* y *GLI1* en las líneas celulares RD y RH4 se obtuvo un incremento en los niveles de la *Ciclina D2* (ciclina específica de la fase G1/S) (**Figura R7, A y B**), sugiriendo un arresto celular en la fase G1. En la línea celular RH30 no se observaron cambios en este efector del ciclo celular (**Figura, R7-C**).

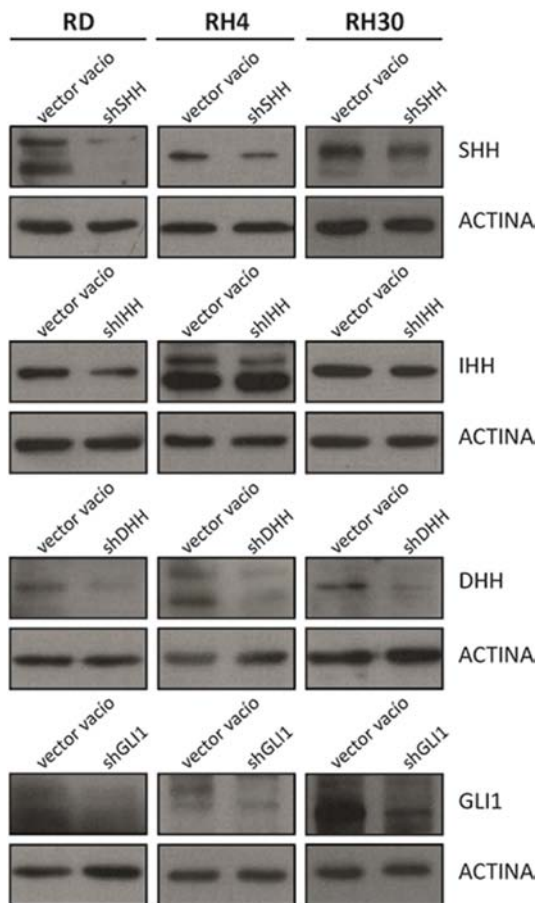


Figura R4. Evaluación de la infra-regulación de los ligandos HH y *GLI1* mediante shRNA en las líneas celulares de RMS RD, RH4 y RH30. Imágenes de *Western blot* que confirman la infra-regulación de SHH, IHH, DHH y *GLI1* mediante la transducción lentiviral de shRNA. Los resultados fueron comparados con los niveles de proteína de las células control (células transducidas con el control vacío). La actina fue utilizada como control de carga.

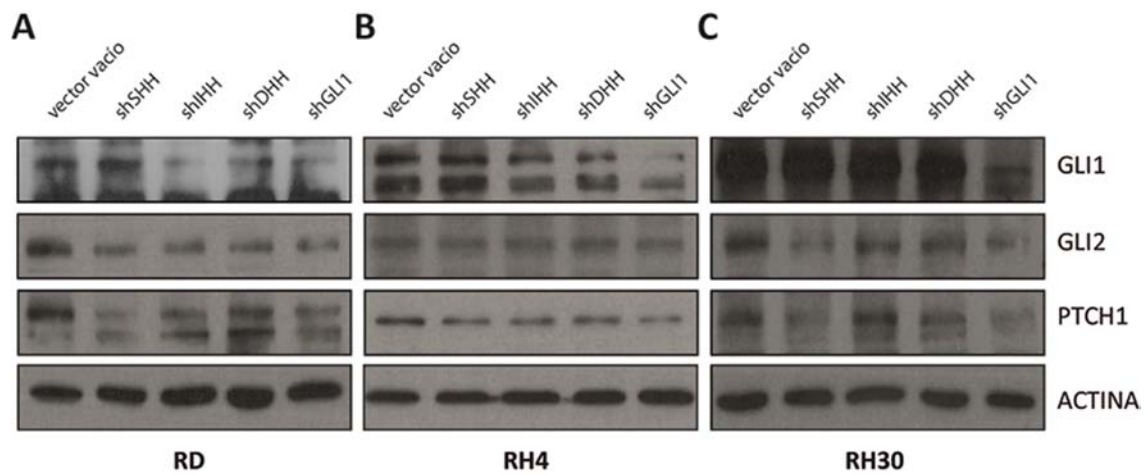


Figura R5. Efecto de la infra-regulación genética de los ligandos *SHH*, *IHH* y *DHH* sobre los componentes y genes diana de la vía HH. Imágenes de *Western blot* que muestran los efectos de la infra-regulación de *SHH*, *IHH* y *DHH* sobre los niveles de proteína de los componentes y genes diana de la vía HH – *GLI1*, *GLI2* y *PTCH1* – en las líneas celulares RD (A), RH4 (B) y RH30 (C). La actina fue utilizada como control de carga.

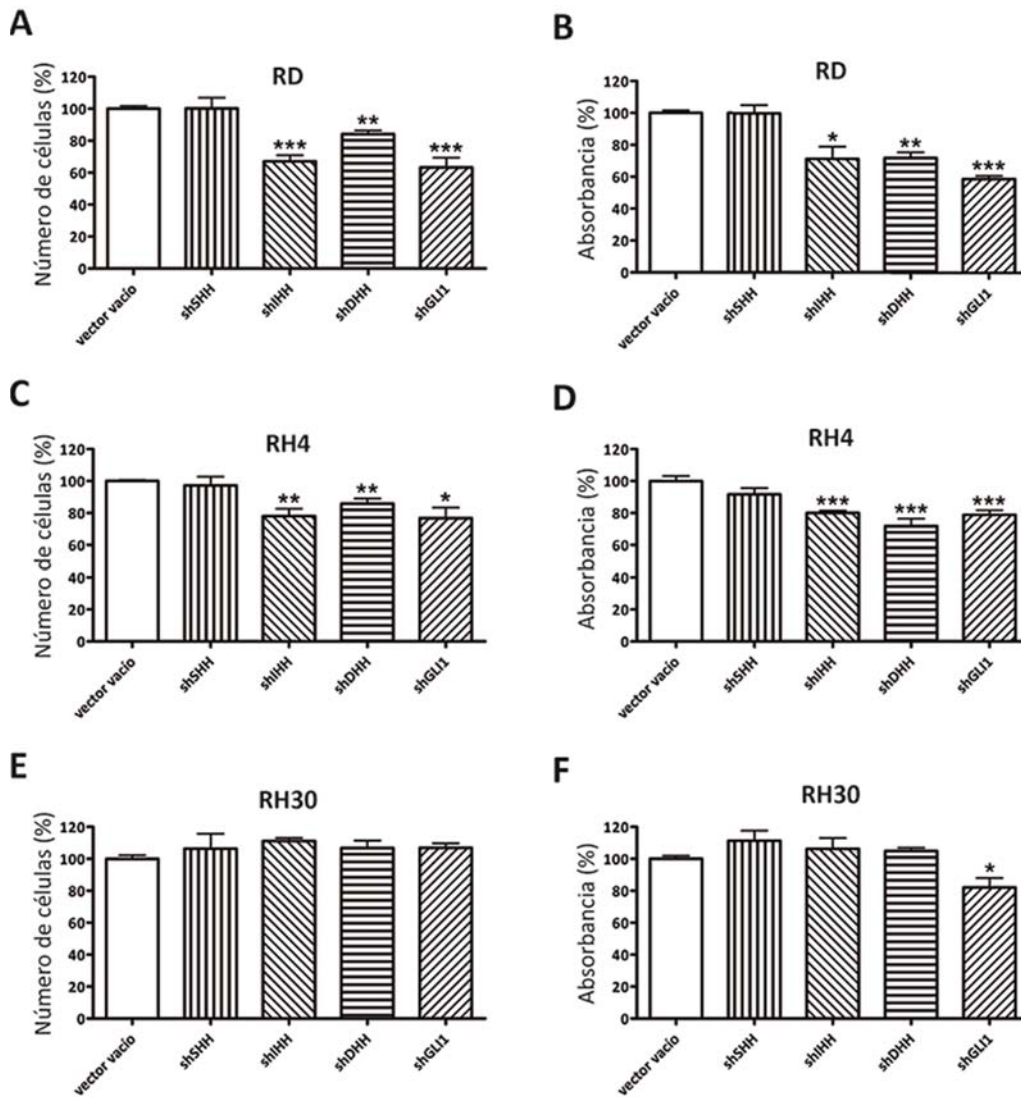


Figura R6. Efectos de la depleción de los ligandos HH y *GLI1* sobre la proliferación celular. A, C y E: Las células con infra-regulación de los ligandos HH y *GLI1* fueron sembradas a la misma concentración y contadas tras 5 días de incubación. Las líneas celulares analizadas fueron RD, RH4 y RH30, respectivamente. B, D y F: Proliferación relativa de las células con infra-regulación de los ligandos HH y *GLI1* analizada mediante el ensayo de WST1. Las líneas celulares analizadas fueron RD, RH4 y RH30, respectivamente. Los resultados fueron referidos a sus controles (células transducidas con el vector vacío) y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

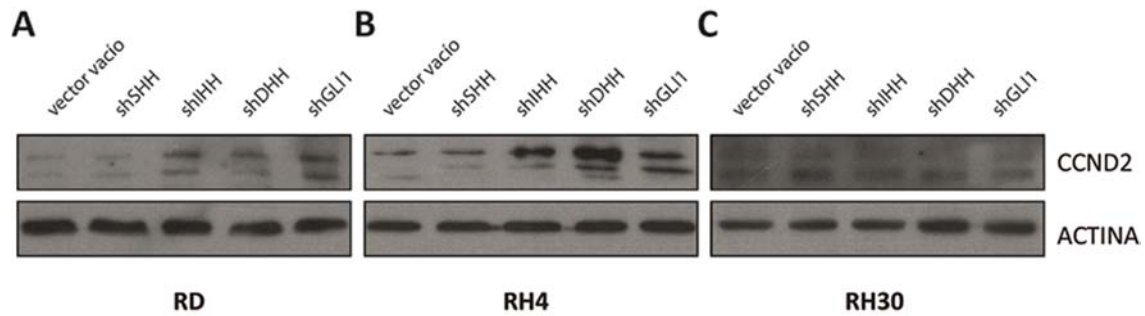


Figura R7. La infra-regulación genética de los ligandos *IHH* y *DHH* incrementa los niveles de *Ciclina D2*, ciclina específica de fase G1/S, en las líneas celulares dependientes de ligando. Imágenes de *Western blot* que muestran los niveles de la *Ciclina D2* (CCND2) tras la depleción de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNA en las líneas celulares RD (A), RH4 (B) y RH30 (C). La actina fue utilizada como control de carga.

Aunque se observó un ligero incremento de células apoptóticas tempranas y un concordante clivado de PARP1 en los clones con depleción de *DHH* y *GLI1* en la línea celular RD (**Figura R8, A y B**), los resultados obtenidos en las otras 2 líneas celulares descartaron la apoptosis como mecanismo que contribuyera a la disminución observada en el número total de células (**Figura R8, C a F**). Además, no se observaron cambios significativos en el número total de células muertas en ninguna de las 3 líneas celulares analizadas (datos no mostrados).

1.3.2. El tratamiento con los inhibidores de la vía HH – Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 – causa efectos anti-proliferativos

Se seleccionaron los inhibidores Vismodegib y Sonidegib (inhibidores de SMO) y MEDI-5304 (anticuerpo bloqueante de SHH e IHH) para testar el efecto de la inhibición farmacológica de la vía HH en las células de RMS.

Primeramente, las líneas RD, RH4 y RH30 fueron tratadas durante 5 días con estos inhibidores y los niveles de ARNm de *GLI1* fueron analizados mediante RT-qPCR para confirmar la inhibición de la vía HH (**Figura R9**). Los 3 inhibidores redujeron de forma significativa los niveles del gen diana de HH, *GLI1*, en las líneas celulares RD y RH4

(Figura R9, A y B). Como era de esperar, no modularon los niveles de *GLI1* en la línea celular RH30 (Figura R9-C).

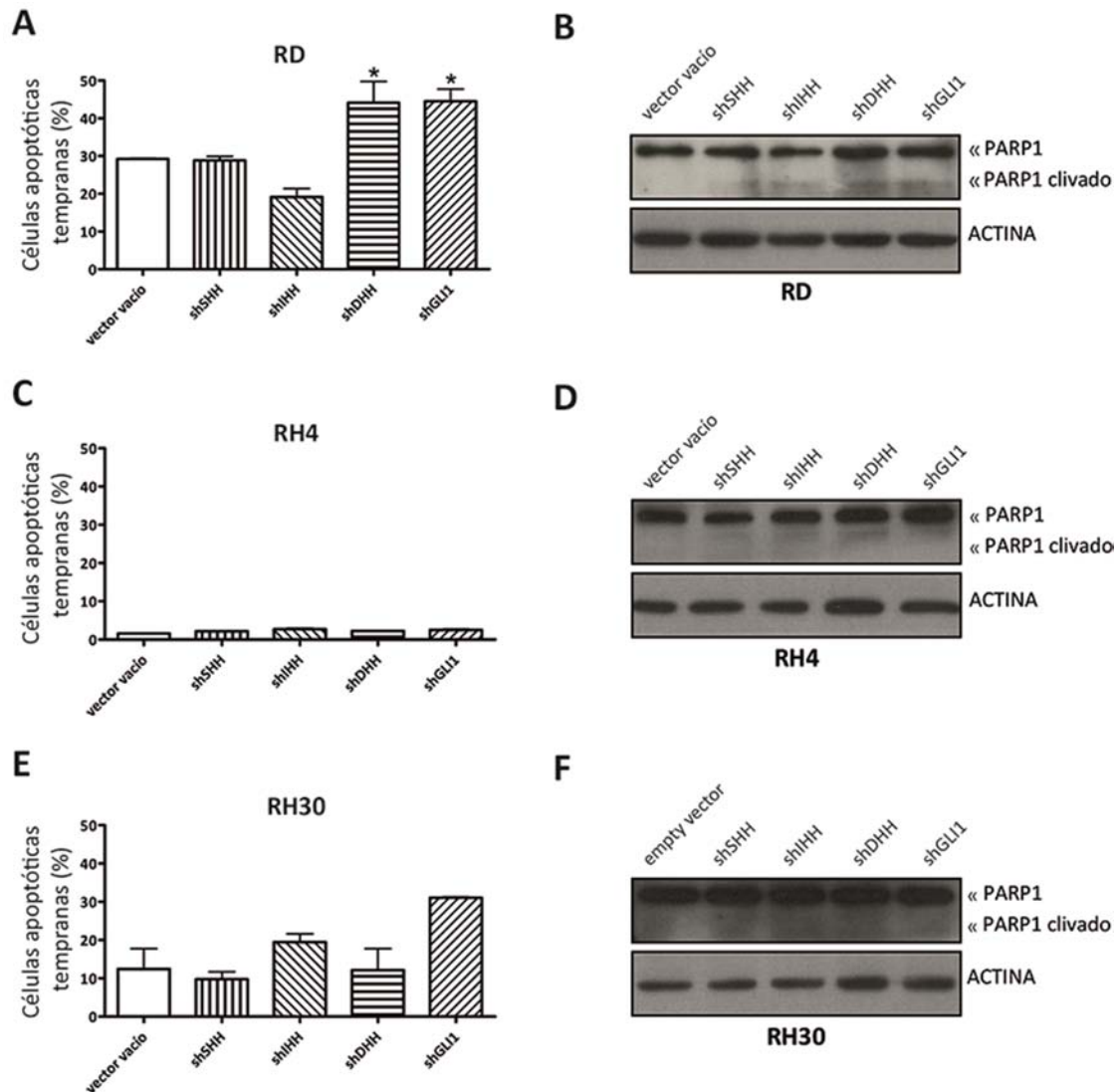


Figura R8. Análisis de la apoptosis tras la infra-regulación de los ligandos HH y *GLI1* mediante shRNA. A, C y E: Porcentaje de células apoptóticas tempranas (Anexina V-positivas y Sytox blue-negativas) detectadas mediante citometría de flujo. Se analizaron las líneas celulares RD, RH4 y RH30, respectivamente. Los resultados fueron referidos a sus controles (células transducidas con el vector vacío) y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$. B, D y F: Imágenes de *Western blot* que muestran los niveles de la forma completa y clivada de PARP1 en los clones anteriores. La forma clivada de PARP1 sólo se observa en la línea celular RD. La actina fue utilizada como control de carga.

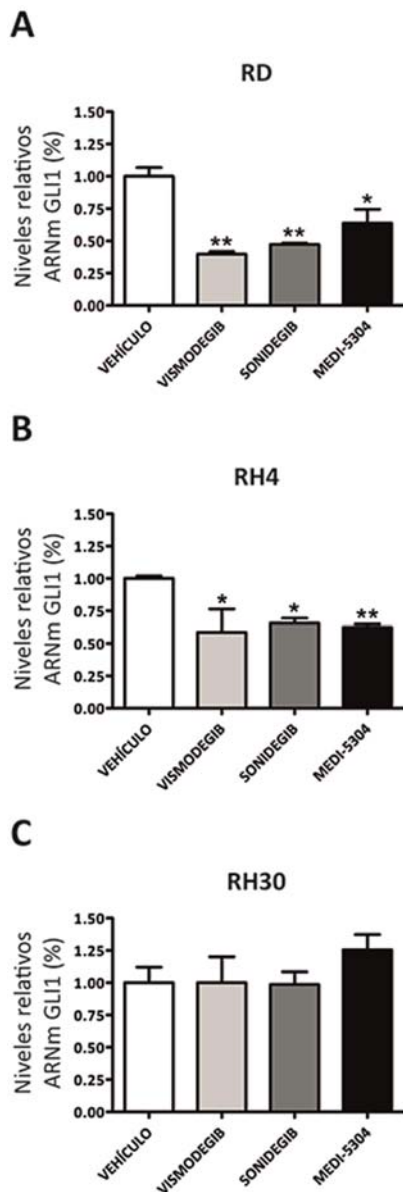


Figura R9. Los inhibidores de la vía HH – Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 – reducen la expresión de *GLI1* en las líneas celulares dependientes de ligando. Análisis de RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de *GLI1* en las líneas RD (A), RH4 (B) y RH30 (C) tras ser tratadas durante 5 días con los inhibidores de SMO, Vismodegib y Sonidegib, y el anticuerpo bloqueante de SHH e IHH, MEDI-5304. Los resultados fueron referidos a sus controles (células tratadas con el vehículo DMSO) y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Para evaluar si los inhibidores HH reproducían los efectos observados tras la infraexpresión genética de *IHH*, *DHH* y *GLI1*, se realizaron ensayos de conteo celular y WST1 tras el tratamiento durante 5 días de las líneas celulares RD, RH4 y RH30 con los inhibidores mencionados (Figura R10). De manera interesante, el efecto farmacológico del anticuerpo bloqueante MEDI-5304 en las líneas RD y RH4 fue comparable a la disminución en la proliferación observada en estas líneas tras la infra-regulación genética de *IHH* y *DHH*. Estas líneas celulares también fueron sensibles a los inhibidores de SMO, Vismodegib y Sonidegib (Figura R10, A a D). Una vez más, la línea RH30 fue completamente insensible a la inhibición de los ligandos mediante el anticuerpo bloqueante MEDI-5304. En cambio, Vismodegib y Sonidegib causaron un efecto anti-

proliferativo en esta línea, sugiriendo un posible efecto inespecífico de estos fármacos, siendo mayor el efecto causado por Vismodegib (Figura R10, E y F).

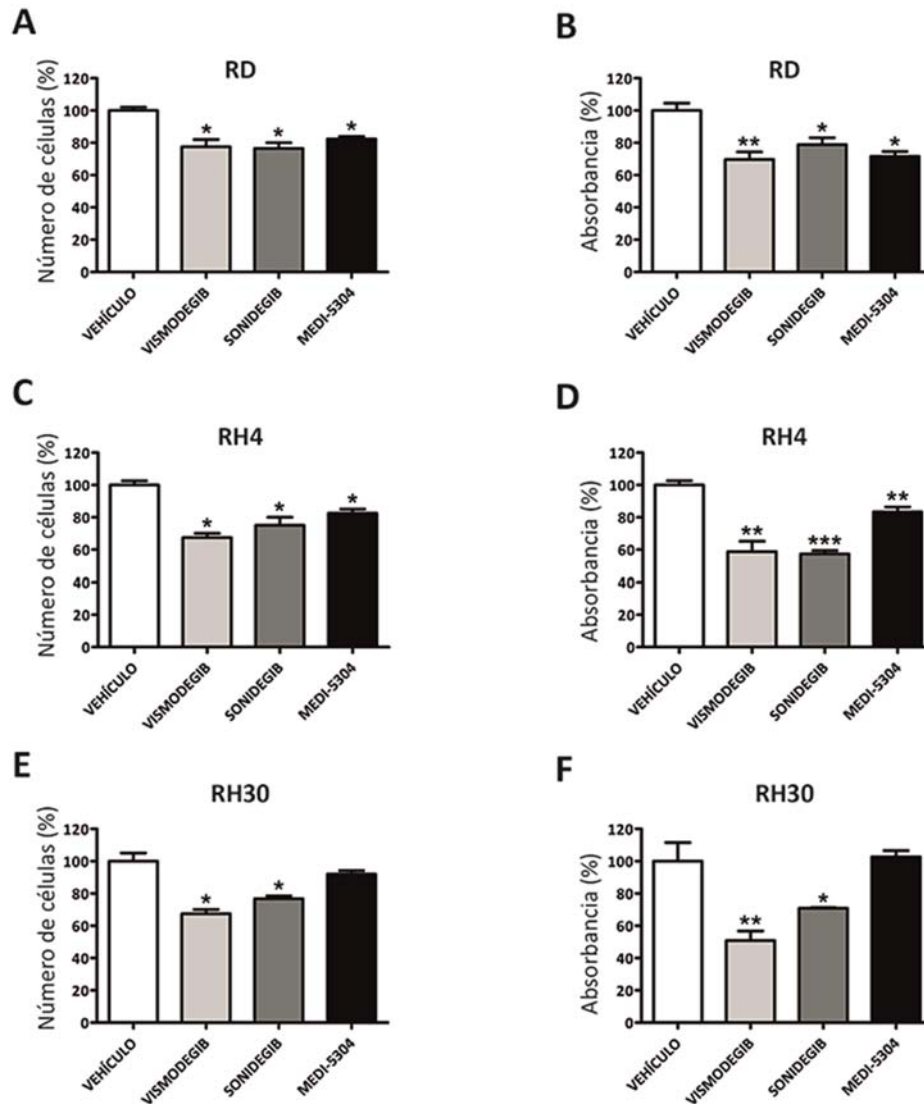


Figura R10. Los inhibidores de la vía HH – Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 – inhiben la proliferación celular. **A, C y E:** Las células fueron sembradas a la misma concentración, tratadas con Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 y contadas tras 5 días de incubación. Las líneas celulares analizadas fueron RD, RH4 y RH30, respectivamente. **B, D y F:** Proliferación relativa de las células tratadas durante 5 días con Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 medida mediante el ensayo de WST1. Las líneas celulares analizadas fueron RD, RH4 y RH30, respectivamente. Los resultados fueron referidos a sus controles (células tratadas con el vehículo DMSO) y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

1.4. La depleción genética de los ligandos HH produce una reducción severa del crecimiento tumoral en ratones SCID

Para confirmar los efectos anti-proliferativos observados *in vitro*, 10^6 células de la línea RD con expresión estable de los shRNA contra *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* fueron inyectadas en el músculo gastronecmio de ratones SCID. 6 semanas y media después de la inyección, los tumores extirpados fueron claramente menores – incluso no llegaron a crecer en algunos casos – en comparación con los tumores control (formados por células transducidas con el vector vacío) (**Figura, R11-A**). El peso promedio de los tumores también fue significativamente menor (**Figura, R11-B**). La diferencia fue particularmente destacable en los casos de infra-regulación de *SHH* y *GLI1* (<25%) pero también notable en los casos de infra-regulación de *IHH* y *DHH* (<40%). Las cinéticas de crecimiento fueron claramente reducidas en todos los casos, con diferencias significativas a partir de las semanas 5-6 (**Figura R11, C a F**).

1.5. SHH tiene un papel crucial en el fenotipo invasivo de las células de RMS

1.5.1. La depleción genética de *SHH* impide la invasividad celular

Hasta la actualidad se desconoce la implicación de la vía HH en el carácter invasivo de las células de RMS. Con el objetivo de determinarlo, así como de esclarecer la implicación individual de los ligandos HH, se analizó la capacidad invasiva de los clones con infra-regulación genética de los ligandos HH y *GLI1* en las líneas celulares RD, RH4 y RH30 mediante el ensayo *Transwell* (**Figura R12**). A diferencia de los efectos observados en proliferación, la inhibición genética de *IHH* y *DHH* no produjo ningún efecto sobre la invasión celular. De manera sorprendente, la infra-regulación de *SHH* redujo de forma significativa la capacidad invasiva de las células en las líneas RD y RH4 (**Figura R12, A a C**). Una vez más, la línea celular RH30 resultó ser refractaria a la privación de los ligandos (**Figura R12-D**).

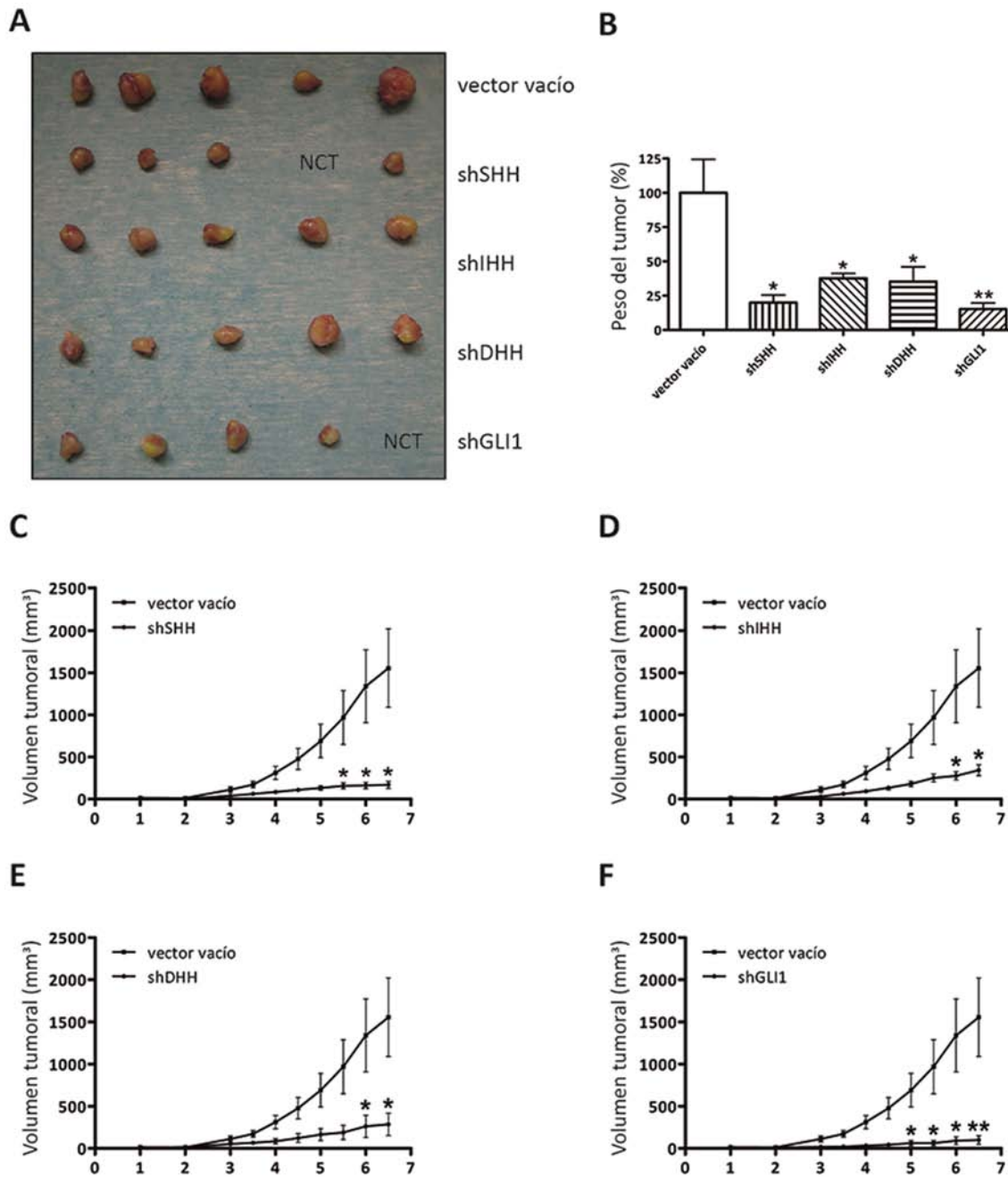


Figura R11. La infra-regulación de la los ligandos HH y *GLI1* reduce el crecimiento tumoral en ratones SCID. **A:** Fotografía de los tumores extirpados que muestra la reducción en el tamaño tumoral causada por la depleción de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNA (NCT: no crecimiento del tumor). **B:** Peso promedio de los tumores en el punto final del estudio referido al grupo control (tumores formados por células transducidas con el vector vacío). **C, D, E y F:** Cinéticas de crecimiento tumoral expresadas como el volumen promedio de los tumores generados por los clones con infra-regulación genética de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1*, respectivamente. Los resultados están expresados como media \pm SEM de los valores de los 5 ratones que formaban cada grupo. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

1.5.2. La infra-expresión de *SHH* reduce la formación de metástasis *in vivo*

Para evaluar el papel de SHH en el proceso de invasión celular *in vivo*, 2×10^6 células de la línea RD con infra-regulación genética de *SHH* fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones SCID-Beige y la evolución de estos ratones fue comparada con la evolución del grupo control (ratones inyectados con el mismo número de células transducidas con el vector vacío). El 80% de los ratones del grupo control formaron metástasis mientras que sólo metastatizaron el 50% de ratones del grupo inyectado con células con depleción de *SHH* (**Figura R12-E**). A pesar de esta reducción en el número de metástasis, la diferencia no fue significativa.

1.6. Efecto paradójico de Vismodegib sobre la invasividad celular

1.6.1. Sonidegib inhibe la capacidad invasiva de las células de RMS, mientras que Vismodegib la incrementa de forma paradójica

La afectación de la capacidad de invasión de las células de RMS tras el tratamiento con los inhibidores HH – Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 – fue analizada mediante el ensayo *Transwell* (**Figura R13**). Sonidegib redujo de forma significativa la capacidad invasiva de las 3 líneas de RMS analizadas, incluso en la línea RH30 que presenta una amplificación génica de *GLI1*. En cambio, los efectos del anticuerpo bloqueante MEDI-5304 sobre la invasividad celular no fueron significativos. De manera inesperada, Vismodegib incrementó significativamente la capacidad invasiva de las 3 líneas celulares en aproximadamente un 200% (**Figura R13, A a D**). Estos resultados sorprendentes sugieren un efecto *off-target* del Vismodegib sobre la invasividad celular.

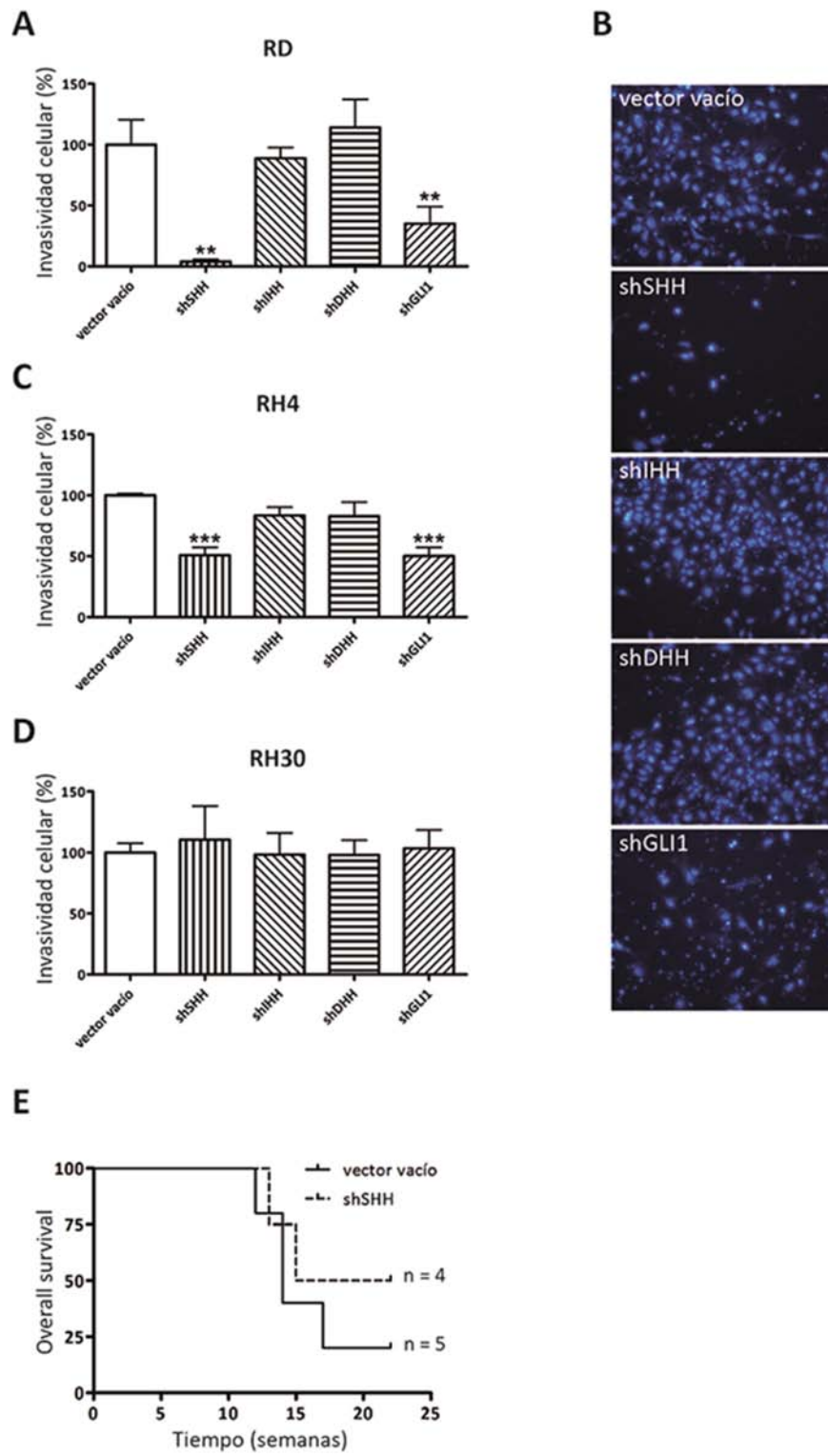


Figura R12. La depleción de SHH aminora la capacidad invasiva de las células de RMS *in vitro* e *in vivo*. **A, C y D:** Ensayos de invasión celular *Transwell* de los clones con infra-regulación genética de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* de las líneas celulares RD, RH4 y RH30, respectivamente. Los valores de invasividad celular están expresados en porcentajes referidos a sus controles (células transducidas con el vector vacío) y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **B:** Composición de fotografías que muestran un campo representativo de la superficie inferior de las membranas de *Transwell* con los clones de la línea RD. Las células teñidas con Hoechst 33342 corresponden a las células que travesaron los poros de la membrana y se depositaron en la superficie inferior de ésta. **E:** *Overall survival* (supervivencia global) del modelo murino de metástasis que muestra la supervivencia de los ratones con inyección en la vena de la cola de células RD con infra-regulación de *SHH* (shSHH) y la supervivencia del grupo control (inyectado con células transducidas con el vector vacío).

1.6.2. Vismodegib induce de formación de metástasis *in vivo*

Para confirmar el efecto *off-target* de Vismodegib sobre la invasión celular observado *in vitro*, 10^6 células de la línea RH30 fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones SCID-Beige y se comparó la evolución de los ratones tratados con Vismodegib en relación al grupo control (tratados con el vehículo DMSO). Siguiendo la tendencia observada en los ensayos *Transwell*, los ratones tratados con Vismodegib fueron más propensos a desarrollar metástasis. Mientras que en el grupo control tan sólo el 55% de los ratones desarrollaron metástasis, todos los ratones tratado con Vismodegib metastatizaron ($p=0.0467$) (**Figura R13-E**).

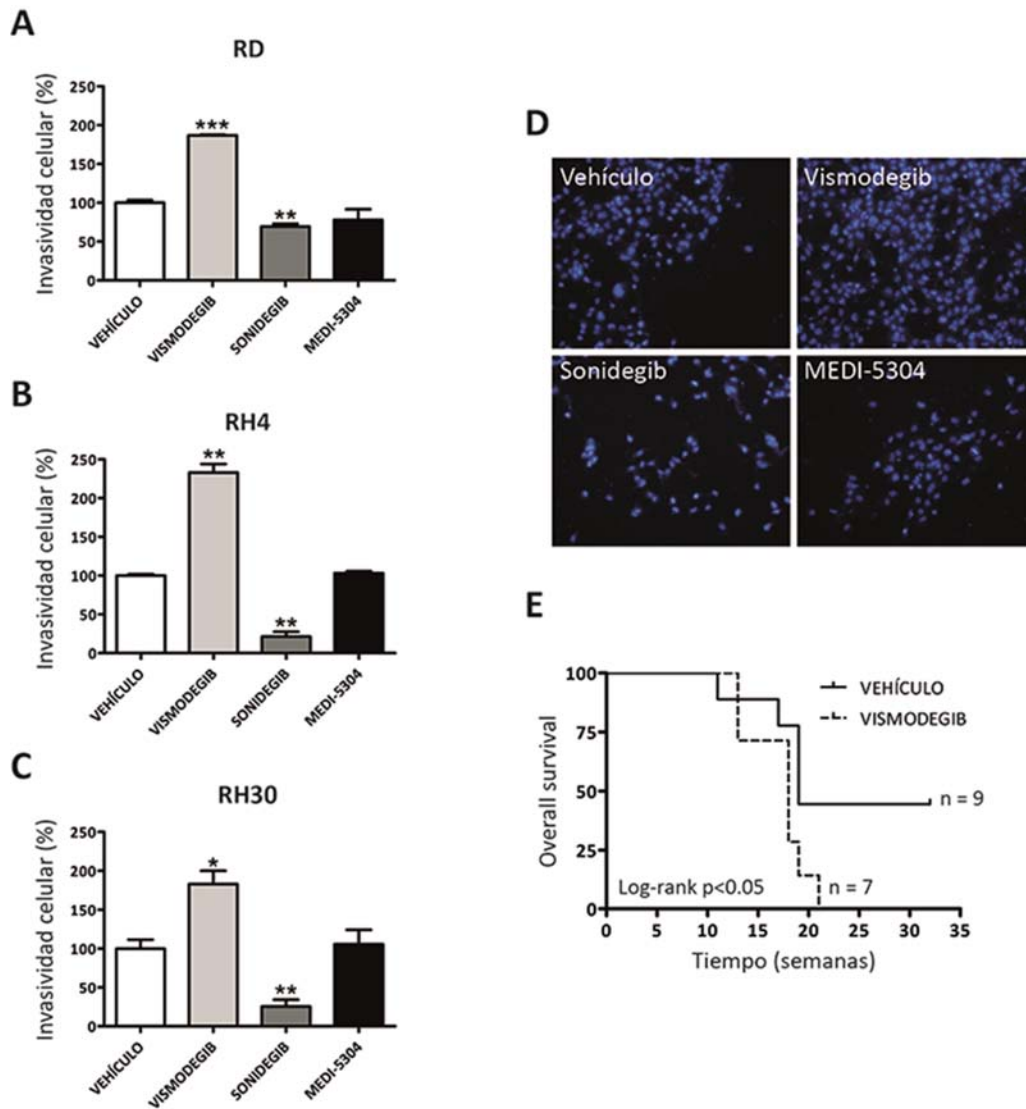


Figura R13. Efecto de los inhibidores HH – Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304 – sobre la capacidad invasiva de las células de RMS, el efecto paradójico de Vismodegib. **A, B y C:** Ensayos de invasión celular *Transwell* de células tratadas con Vismodegib, Sonidegib y MEDI-5304. Las líneas celulares analizadas fueron RD, RH4 y RH30, respectivamente. Los valores de invasividad celular están expresados en porcentajes referidos a sus controles (células tratadas con el vehículo DMSO) y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **D:** Composición de fotografías que muestran un campo representativo de la superficie inferior de las membranas de *Transwell* con células RD. Las células teñidas con Hoechst 33342 corresponden a las células que travesaron los poros de la membrana y se depositaron en la superficie inferior de ésta. **E:** *Overall survival* (supervivencia global) del modelo murino de metástasis que muestra la supervivencia de los ratones tratados con Vismodegib y la supervivencia del grupo control (tratados con el vehículo DMSO).

1.6.3. El efecto paradójico de Vismodegib sobre la capacidad invasiva de las células de RMS es mediado por la activación *off-target* de la vía *Unfolded protein response* (UPR)

Se realizó un microarray de cDNA con el objetivo de identificar las vías de señalización diferencialmente reguladas tras el tratamiento con Vismodegib y así determinar el mecanismo molecular responsable del efecto *off-target* de este inhibidor sobre la capacidad invasiva de las células de RMS. El análisis del perfil de expresión se realizó en las líneas celulares RD, RH4 y RH30, comparando las células tratadas con Vismodegib durante 48h y las células control (tratadas con el vehículo, DMSO). Solamente 6 genes candidatos resultaron alterados con un *fold change* superior a 1.5 en las 3 líneas celulares analizadas. De manera interesante, 2 de los 6 genes eran componentes de la vía UPR (*CHOP* y *TRIB3*) y los otros 4 genes estaban directamente relacionados con ella (*CHAC1*, *SESN2*, *VLDLR* y *ASNS*) (**Figura R14-A**). Estos resultados fueron confirmados mediante *Western blot*, que mostraron un incremento de la expresión de CHOP y TRIB3 tras el tratamiento con Vismodegib en 4 líneas celulares de RMS analizadas (RD, RH4, CW9019 y RH30). Se obtuvo un incremento consistente de CHOP en las 4 líneas celulares, incluso en la línea RH30 que presentaba niveles basales extremadamente bajos de esta proteína. Asimismo, se observó un incremento remarcable de TRIB3 en 3 de las líneas celulares (RD, RH4 y CW9019) y moderado en la línea RH30 (**Figura R14-B**). Dado que las líneas celulares analizadas representan los principales subtipos de RMS, estos resultados sugieren fuertemente que la activación de la vía UPR podría ser el mecanismo responsable del incremento en la capacidad invasiva de las células de RMS tras el tratamiento con Vismodegib.

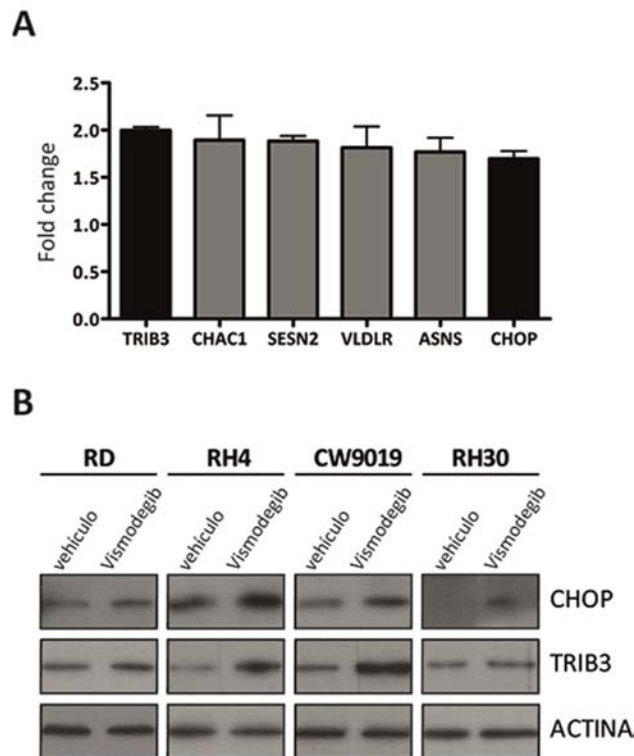


Figura R14. El tratamiento con Vismodegib activa la vía *Unfolded protein response* (UPR) en las células de RMS. **A:** Gráfico que muestra los genes con *fold change* promedio superior a 1.5 obtenidos mediante un microarray de cDNA comparando el perfil de expresión tras el tratamiento con Vismodegib de 3 líneas celulares (RD, RH4 y RH30). Todos los genes sobre-expresados están relacionados con la vía *Unfolded protein response* (UPR). **B:** Imágenes de *Western blot* que muestran el incremento de los componentes de la vía UPR – CHOP y TRIB3 – tras el tratamiento con Vismodegib en 4 líneas celulares de RMS (RD, RH4, CW9019 y RH30). La actina fue utilizada como control de carga.

1.6.4. La expresión del componente de la vía UPR – *TRIB3* – correlaciona con marcadores de mal pronóstico en pacientes con RMS

Dada la implicación de la vía UPR en el fenotipo invasivo de las células de RMS, se estudió la correlación de sus componentes con parámetros clínicos de pacientes de RMS. Los datos de expresión de tumores de RMS (n=147) fueron extraídos de la base de datos “Davicioni-147-MAS5.0-u133.a” utilizando la plataforma de análisis de datos genómicos *R2: Genomics Analysis and Visualization Platform* (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) y se analizaron los siguientes parámetros clínicos: histología (RMSa y RMSe), estatus de la fusión (presencia o ausencia de la

translocación PAX-FOXO1), estadio de la enfermedad (del 1 al 4) y estado del paciente (vivo o muerto). El análisis de esta base de datos reveló la existencia de una interesante correlación entre la expresión de *TRIB3*, el gen más sobre-expresado tras el tratamiento con Vismodegib, y parámetros clínicos asociados a mal pronóstico (Figura R15). La expresión promedio de *TRIB3* fue significativamente mayor en el subtipo de RMS alveolar que en el embrionario y en pacientes con la translocación PAX-FOXO1 respecto a los pacientes sin dicha translocación (Figura R15, A y B). Además, la expresión de *TRIB3* tendió a aumentar con la progresión de la enfermedad, siendo las diferencias significativas entre los estadios 2 y 4 con el estadio 1 (Figura R15-C). Aunque la expresión de *TRIB3* tendió a ser superior en pacientes que murieron debido a la enfermedad, la diferencia no fue significativa (Figura R15-D). Estos resultados posicionan *TRIB3* como un posible marcador de mal pronóstico para los pacientes con RMS.

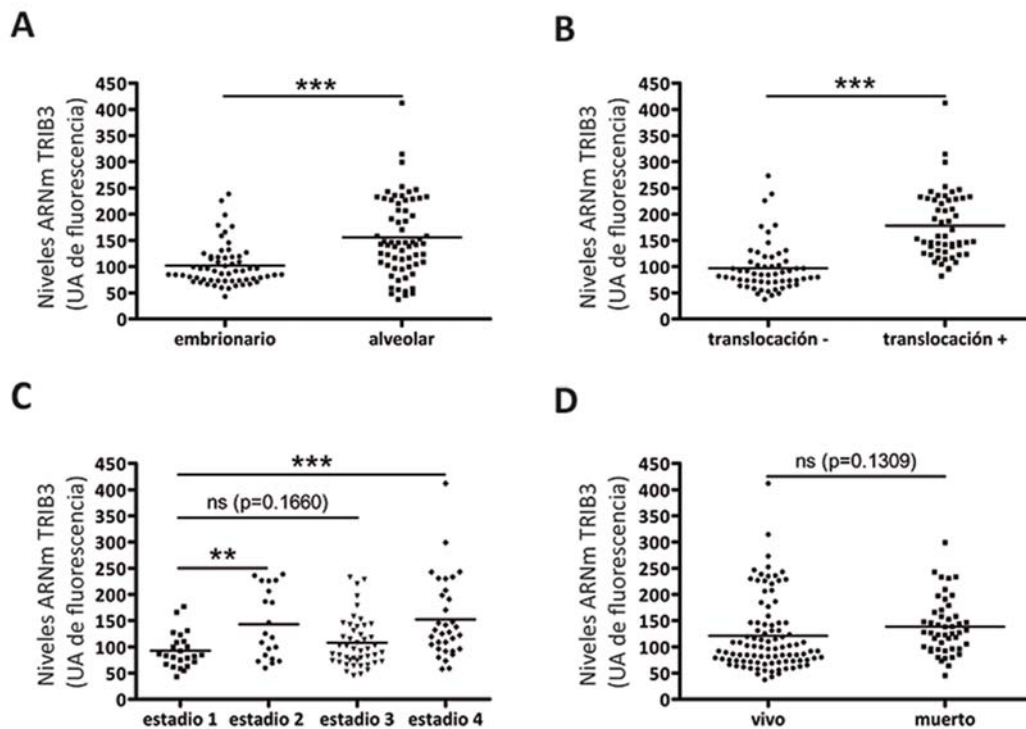


Figura R15. Análisis de la correlación entre la expresión de *TRIB3* y parámetros clínicos de pacientes de RMS. Gráficos que muestran los niveles de *TRIB3* en tumores de pacientes de RMS clasificados según los parámetros clínicos: histología (A), estatus de la fusión (B), estadio de la enfermedad (C) y estado del paciente (D). Los datos de expresión de tumores de RMS (n=147) fueron extraídos de la base de datos “Davicioni-147-MAS5.0-u133.a” utilizando la plataforma de análisis de datos genómicos R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) y expresados en unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia. Las líneas horizontales representan la media de los valores extraídos (n=147). Significación estadística: **p<0.01; ***p<0.001.

2. EL PAPEL DE LA VIA HEDGEHOG EN EL MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS INICIADORAS DE RABDOMIOSARCOMA

2.1. Las células de RMS contenidas en holoclones y esferas presentan características de células madre

2.1.1. Las células de RMS son capaces de formar holoclones y esferas

Se realizaron ensayos de formación de holoclones y esferas con el objetivo de enriquecer en células iniciadoras de RMS y así caracterizarlas en estudios posteriores. Las líneas celulares CW9019 (RMSa) y HTB82 (RMSe) fueron sembradas a densidad clonal para evaluar su heterogeneidad en la formación de colonias. Tras aproximadamente 10 días de incubación, ambas líneas celulares mostraron 3 tipos diferentes de colonias en base a criterios morfológicos. Colonias compactas con contornos claros correspondían a holoclones, mientras que colonias formadas por células separadas correspondían a paraclones; las colonias intermedias eran meroclones (**Figura R16-A**). Los meroclones fueron el tipo de colonia más frecuente (46-53%) seguidos de los paraclones (38%). Los holoclones fueron el tipo de colonia menos frecuente (9-16%) (**Figura R16-B**). Ambas líneas celulares también fueron capaces de formar esferas al ser sembradas a baja densidad en medio de neuroesferas (**Figura R16-C**). La línea celular HTB82 mostró una eficiencia de formación de esferas 5 veces superior a la línea celular CW9019 (25 esferas/1000 células versus 5 esferas/1000 células) (**Figura R16-D**).

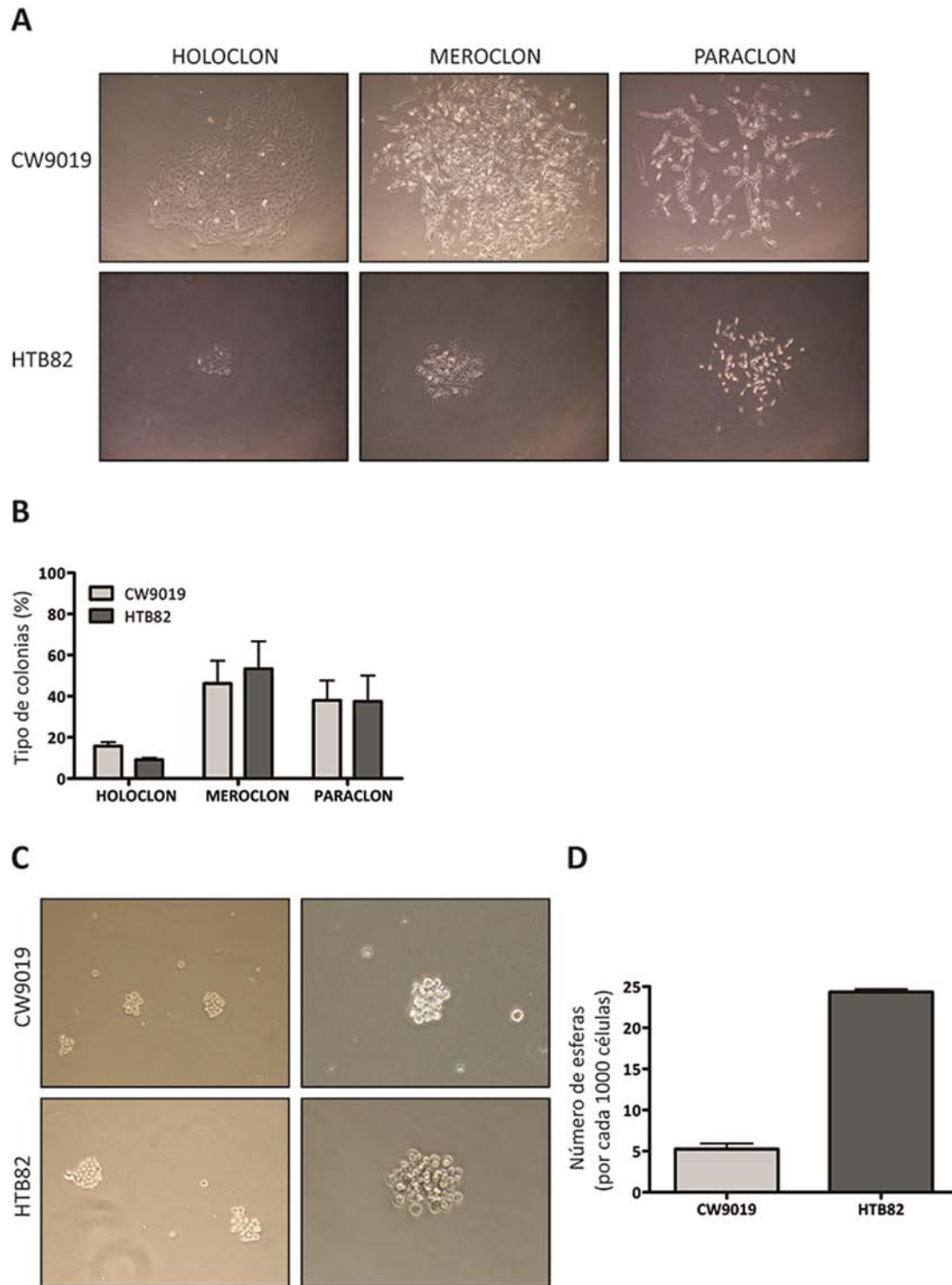


Figura R16. Formación de holoclonos y esferas en las líneas celulares de RMS. Imágenes representativas (A) y porcentajes (B) de los tipos de clones clasificados como holoclonos, meroclonos y paraclones formados por las líneas celulares CW9019 (RMSa) y HTB82 (RMSe). C: Imágenes representativas de las esferas de las líneas celulares CW9019 y HTB82. D: Número de esferas formadas por cada 1000 células sembradas en medio de neuroesferas. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes.

2.1.2. Las células de RMS contenidas en holoclones y esferas poseen la capacidad de auto-renovación

La capacidad de auto-renovación es una de las propiedades clave de las células madre. Confirmar que las células contenidas en holoclones y esferas poseen capacidad de auto-renovación es esencial para determinar su potencial de célula madre. Con este objetivo, los 3 tipos de clones fueron tripsinizados, disgregados y sembrados de nuevo a densidad clonal y los clones secundarios fueron clasificados y contados. En las 2 líneas celulares analizadas, las células derivadas de paraclones formaron exclusivamente paraclones (100%) (**Figura R17, D y H**), las células derivadas de meroclones formaron meroclones (30.3% y 56.7%, respectivamente) y paraclones (69.7% y 43.3%, respectivamente) (**Figura R17, C y G**), mientras que tan sólo las células derivadas de holoclones fueron capaces de generar los 3 tipos de colonias: 59-53,6% de holoclones, 24.8-34.5% de meroclones y 16.2-11.9% de paraclones, respectivamente (**Figura R17, B y F**). De manera interesante, se obtuvo un enriquecimiento significativo en la categoría de holoclones a partir de células derivadas de holoclones en comparación con el porcentaje inicial: del 16% al 59% en CW9019 (**Figura R17, A y B**) y del 9% al 53.6% en HTB82 (**Figura R17, E y F**). De forma similar, tras la disgregación y la resiembra de las esferas a baja densidad, se obtuvo un incremento significativo en el número de esferas en las 2 líneas analizadas (**Figura R17, I y J**). Estos resultados confirman la capacidad de auto-renovación de las células contenidas en holoclones y esferas de RMS, sugiriendo su potencial de célula madre.

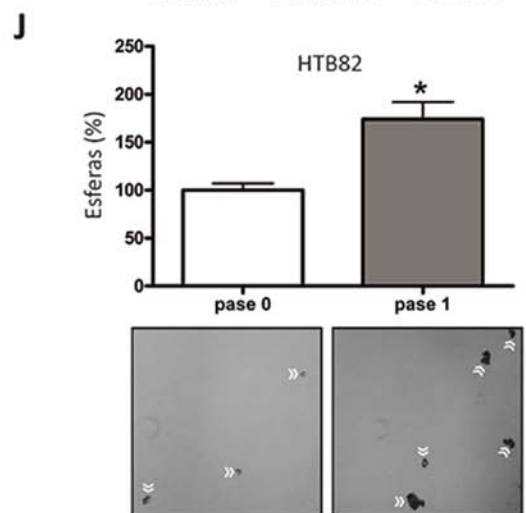
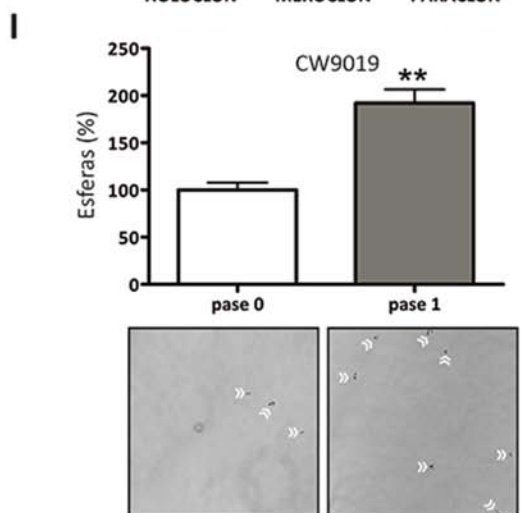
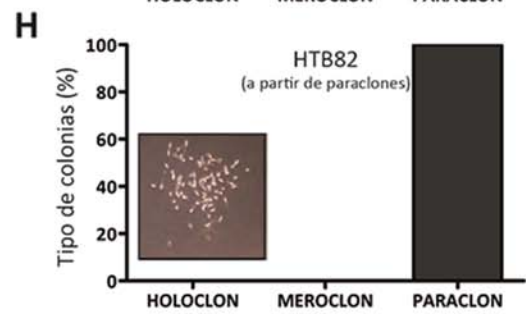
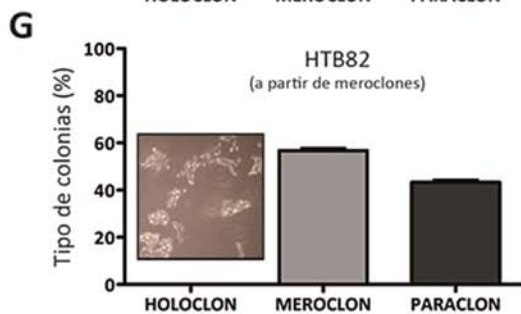
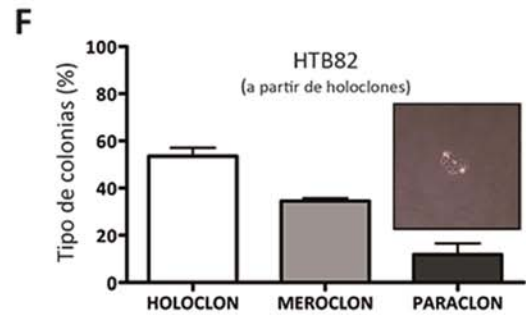
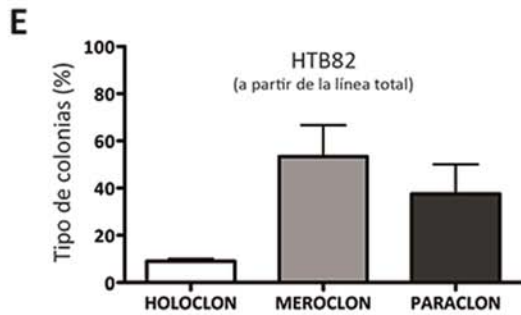
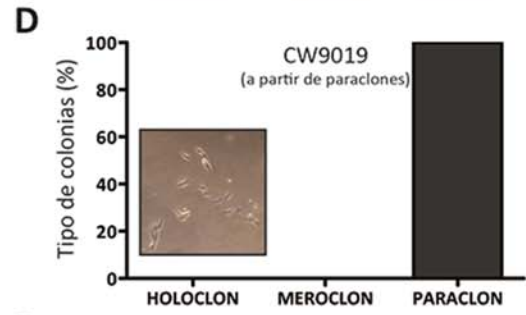
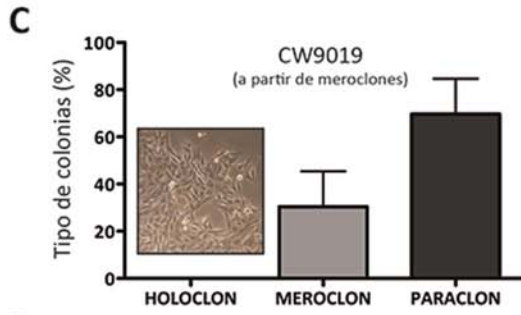
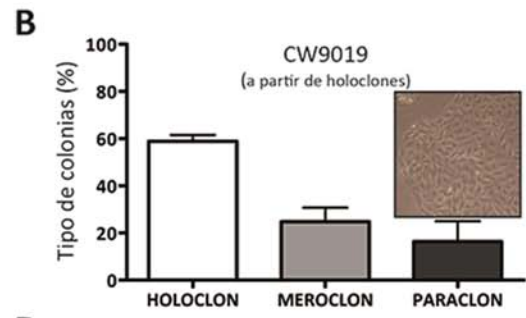
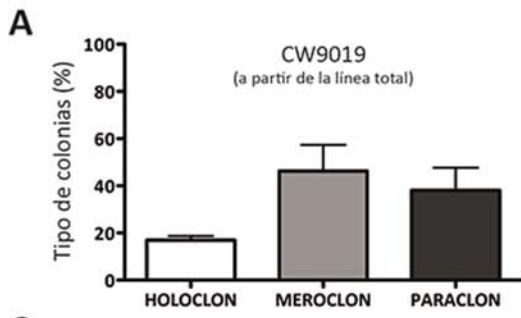


Figura R17. Capacidad de auto-renovación de las células contenidas en holoclonos y esferas de RMS. A y E: Porcentaje inicial de los 3 tipos de clones – holoclon, meroclon y paraclon – formados por las líneas celulares CW9019 y HTB82, respectivamente. Imágenes representativas y cuantificación de los clones secundarios formados a partir de holoclonos (**B y F**), meroclones (**C y G**) y paraclones (**D y H**) en las líneas celulares CW9019 y HTB82, respectivamente. Los resultados fueron referidos al número total de colonias generadas en cada ensayo y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Enriquecimiento en la fracción de esferas secundarias en las líneas celulares CW9019 (**I**) y HTB82 (**J**). Los resultados fueron referidos al número de esferas iniciales y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2.2. La vía de señalización HH tiene un papel clave en el mantenimiento de holoclonos y esferas de RMS

2.2.1. El principal efector de la vía HH está sobre-expresado en holoclonos y esferas de RMS

Con la finalidad de determinar el estado de activación de la vía HH en la subpoblación de células iniciadoras de RMS, se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de ARNm de los ligandos HH – *SHH*, *IHH* y *DHH* – y del gen diana de HH – *GLI1* – en holoclonos y esferas de las líneas celulares CW9019 y HTB82 y se compararon con los niveles de meroclones y células adheridas, respectivamente (**Figura R18**). Aunque los holoclonos presentaron elevados niveles de expresión de los ligandos HH, los niveles fueron similares a los de los meroclones, con la excepción de *DHH*, que exhibió una sobre-expresión significativa en holoclonos de HTB82 (**Figura R18, A a C**). Las esferas mostraron una clara sobre-expresión de los 3 ligandos HH en ambas líneas celulares (**Figura R18, E a G**). En cambio, tanto holoclonos como esferas de las 2 líneas celulares analizadas presentaron una sobre-expresión significativa de *GLI1* (**Figura R18, D y H**), sugiriendo que las células iniciadoras de RMS requieren la activación de la vía HH para su mantenimiento.

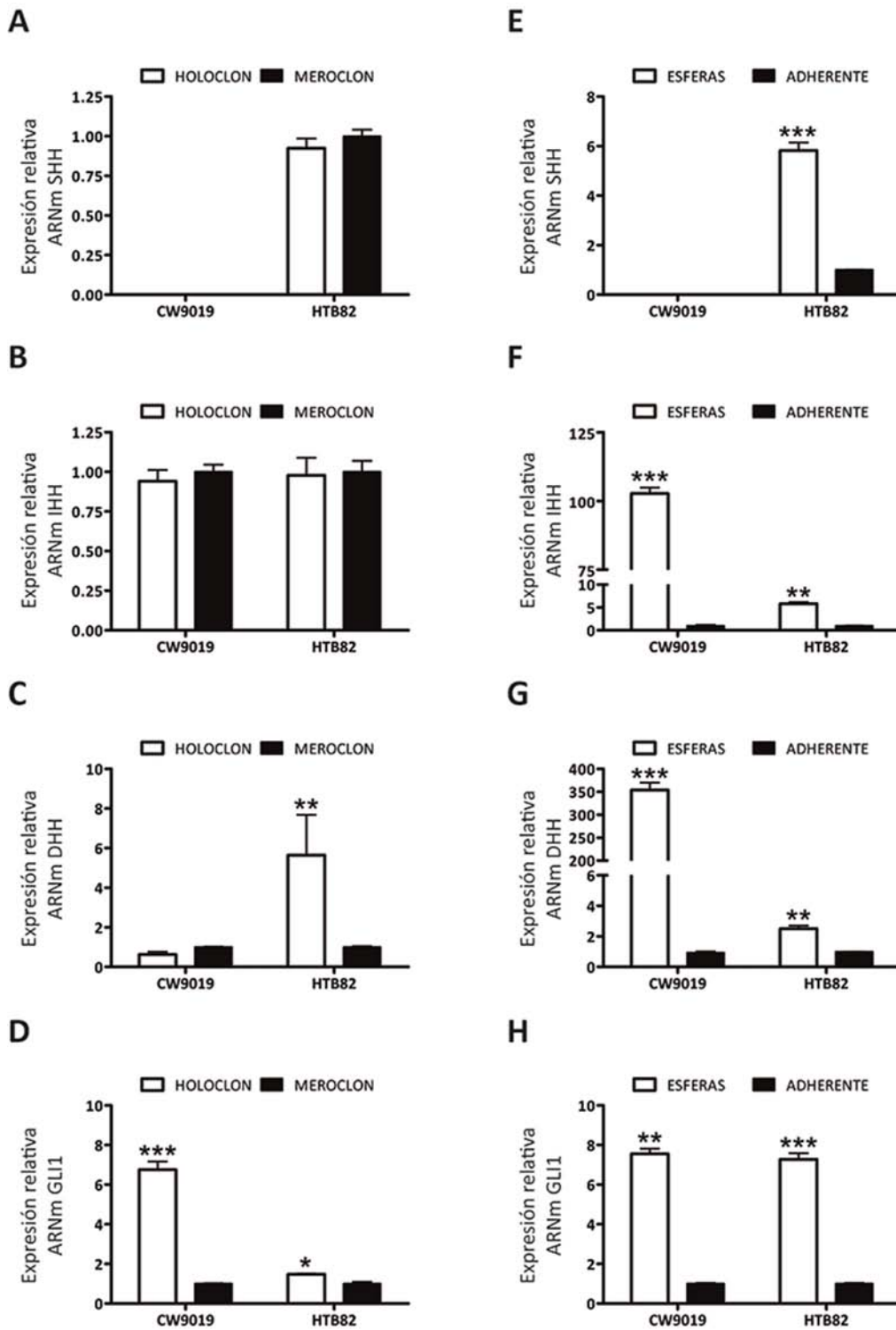


Figura R18. Las células iniciadoras de RMS sobre-expresan *GLI1*. Análisis de expresión de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* en holoclonos (A, B, C y D) y esferas (E, F, G y H) de las líneas celulares CW9019 y HTB82. Los valores fueron referidos a los niveles de expresión de meroclones y células adherentes. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.2.2. La inhibición de la vía HH impide la formación de holoclonos y esferas de RMS

2.2.2.1. La inhibición genética de *IHH*, *DHH* y *GLI1* bloquea la formación de holoclonos y frena el crecimiento de las esferas

Para confirmar la implicación de la vía HH en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS, se realizaron los ensayos de formación de holoclonos y esferas con células de las líneas celulares CW9019 y HTB82 con infra-regulación genética de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNA. La depleción de *IHH*, *DHH* y *GLI1* bloqueó la formación de holoclonos en ambas líneas celulares, mientras que el silenciamiento de *SHH* no produjo ningún efecto (**Figura R19, A y B**). El número total de células no fue afectado en ninguna condición, confirmando un efecto específico sobre los holoclonos (**Figura R20, A y B**). En cambio, los clones con infra-regulación de los ligandos HH y *GLI1* mantuvieron la misma eficiencia de formación de esferas que las células control (transfectadas con el control vacío) en ambas líneas celulares (**Figura R20, C y D**). No obstante, las esferas formadas por los clones con depleción de *IHH*, *DHH* y *GLI1* mostraron un diámetro significativamente menor (**Figura R19, C y D**).

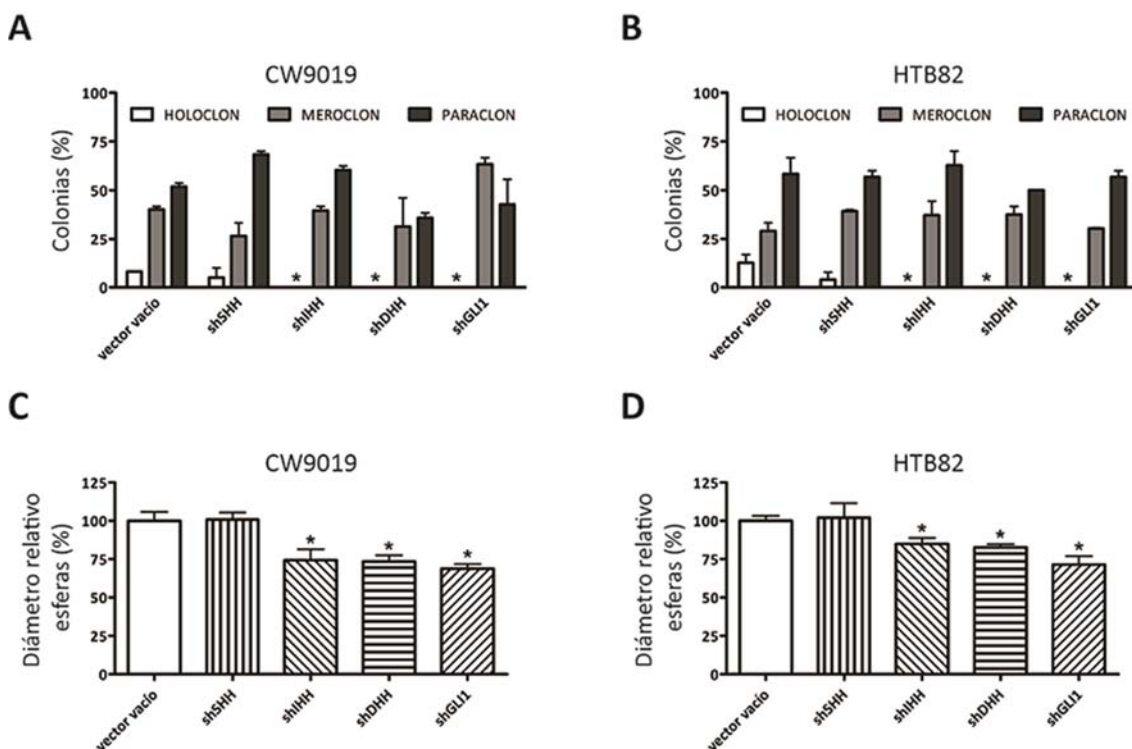


Figura R19. Efecto de la depleción de los ligandos HH y *GLI1* en la formación de holoclones y esferas de RMS. **A** y **B**: Gráficos que representan el porcentaje de cada tipo de colonia formadas por clones con infra-regulación de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNA en las líneas celulares CW9019 y HTB82, respectivamente. Los valores fueron referidos al número total de clones formados en cada condición y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. **C** y **D**: Gráficos que representan el diámetro de las esferas formadas por las células con expresión estable de shRNA contra los ligandos HH y *GLI1*. Los valores fueron referidos al diámetro de las esferas formadas por las células control (transducidas con el vector vacío) y expresados como la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$.

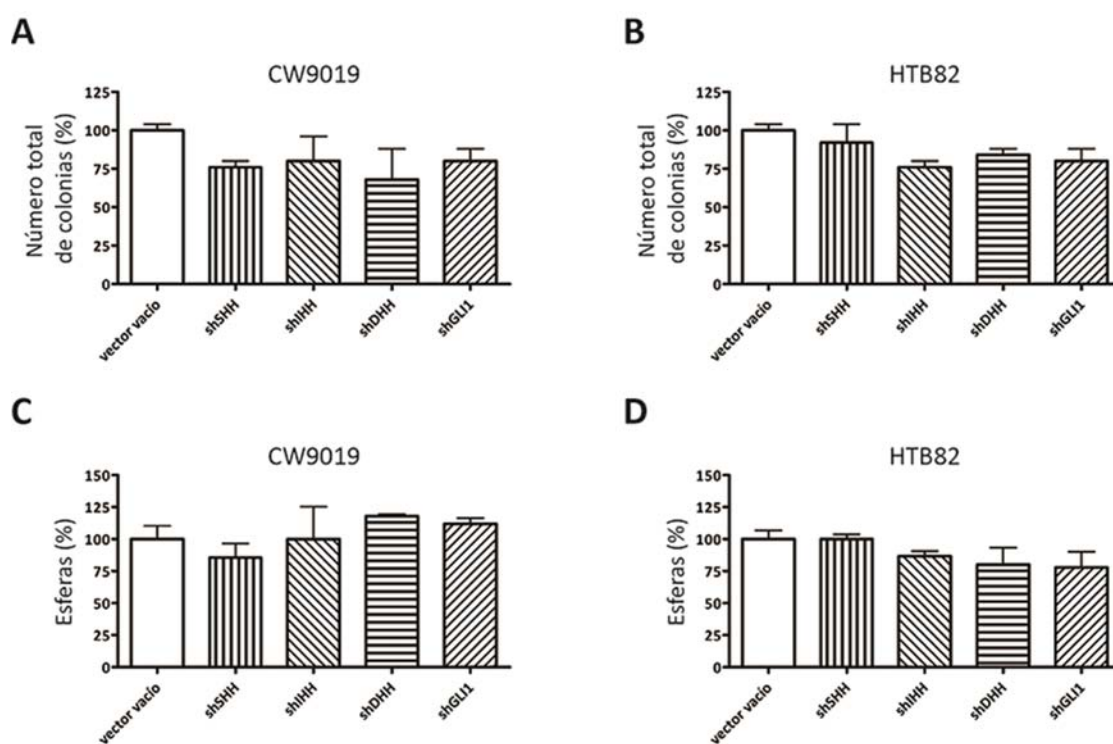


Figura R20. La infra-regulación genética de los ligandos HH y *GLI1* no afecta ni la clonogenicidad ni la eficiencia de formación de esferas de las células de RMS. Porcentaje del total de colonias (**A** y **B**) y esferas (**C** y **D**) formadas por células con depleción de *SHH*, *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNA en las líneas celulares CW9019 y HTB82, respectivamente. Los valores fueron referidos a sus controles (células transducidas con el vector vacío) y expresados como la media \pm SEM de 3 ensayos independientes.

2.2.2.2. Los inhibidores farmacológicos de la vía HH, Sonidegib y MEDI-5304, inhiben selectivamente la formación de holoclonos y esferas de RMS

Para determinar el efecto de la inhibición farmacológica de SMO (Sonidegib) y de los ligandos SHH y IHH (anticuerpo bloqueante MEDI-5304) en las células iniciadoras de RMS, las líneas celulares CW9019 y HTB82 fueron pretratadas durante 48h y seguidamente se realizaron los ensayos de formación de holoclonos y esferas en ausencia de los inhibidores para prevenir interferencias sobre la proliferación celular. El pretratamiento con Sonidegib y MEDI-5304 redujo significativamente el número de holoclonos con un incremento concomitante en el número de clones más diferenciados – meroclonos y paraclones – de forma significativa sólo en la línea HTB82 (**Figura R21, A y B**), sin afectar al número total de clones (**Figura R22, A y B**). Asimismo, una marcada reducción en el número de esferas así como de su diámetro fue observada tras la inhibición de la vía HH en ambas líneas celulares analizadas (**Figura R21, C a F**). Se descartó que este efecto fuera debido a un decremento en la viabilidad celular causado por el pretratamiento con Sonidegib y MEDI-5304 (**Figura R22, C y D**).

Conjuntamente, estos resultados sugieren el papel clave de la vía HH en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS y posicionan los inhibidores HH como posibles terapias contra esta subpoblación celular.

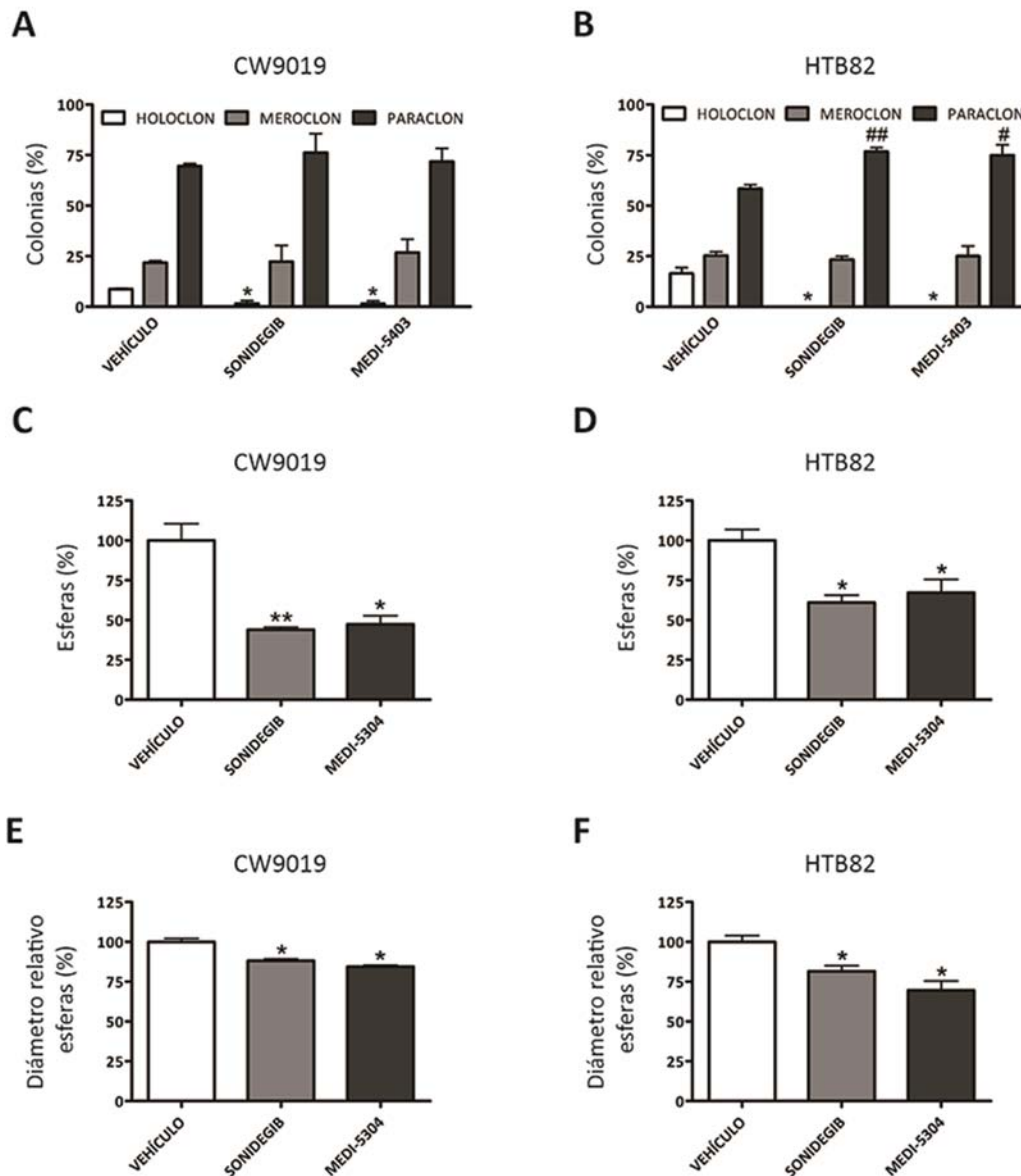


Figura R21. Los inhibidores de la vía HH – Sonidegib y MEDI-5304 – impiden la formación de holoclonos y esferas. **A** y **B**: Gráficos que representan el porcentaje de cada tipo de colonia formadas tras el pretratamiento de las líneas celulares CW9019 y HTB82 con los inhibidores de la vía HH Sonidegib (inhibidor de SMO) y MEDI-5304 (anticuerpo bloqueante de SHH e IHH). Los valores fueron referidos al número total de clones formados en cada condición y representan la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ en comparación al porcentaje de holoclonos formados por las células control (vehículo); # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ en comparación con el porcentaje de paraclones formados por las células control (vehículo). Porcentajes del número (**C** y **D**) y diámetro (**E** y **F**) de las esferas formadas tras el pretratamiento con los inhibidores HH. Los valores fueron referidos al número y diámetro de las esferas formadas por las células control (tratadas con el vehículo DMSO) y expresados como la media \pm SEM de 3 ensayos independientes. Significación estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

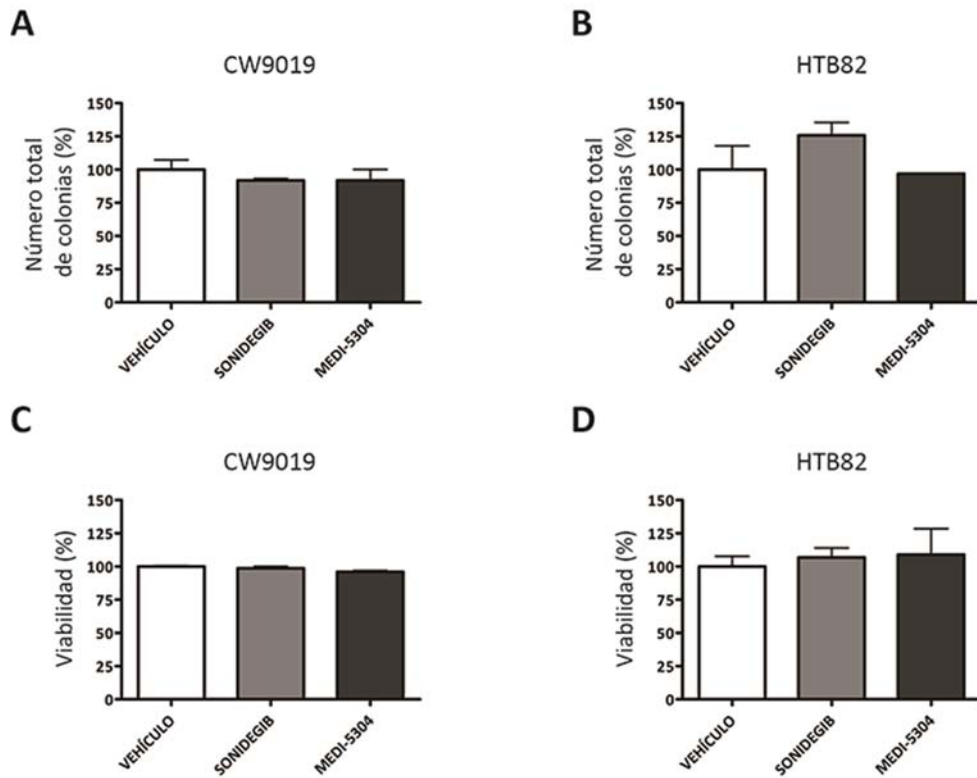


Figura R22. El pretratamiento con Sonidegib y MEDI-5304 no reduce ni la clonogenicidad ni la viabilidad celular. Porcentaje del total de colonias (A y B) y de la viabilidad celular (C y D) tras el pretratamiento con inhibidores de HH en las líneas celulares CW9019 y HTB82, respectivamente. Los valores fueron referidos a las células control (tratadas con el vehículo DMSO) y expresados como la media \pm SEM de 3 ensayos independientes.

V. DISCUSIÓN

1. EL MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA HEDGEHOG EN EL RABDOMIOSARCOMA: UNA OPORTUNIDAD TERAPÉUTICA

El papel oncogénico de la vía Hedgehog (HH) fue descrito por primera vez en tumores asociados al síndrome de Gorlin. Concretamente, los pacientes con este síndrome presentan una mayor incidencia de carcinoma de células basales (BCC), meduloblastoma (MB) y, en menor frecuencia, rhabdomiosarcoma (RMS). La base molecular del desarrollo de estas neoplasias en pacientes con el síndrome de Gorlin es la pérdida de función del gen *PTCH1*, ya sea por mutaciones inactivadoras o la pérdida de heterocigosidad, que conlleva a la activación constitutiva de la vía HH de manera independiente de ligando (Hahn, 1996; Johnson, 1996).

Actualmente está ampliamente aceptada la activación de la vía HH en el RMS (Hahn, 1998; Tostar, 2006; Zibat, 2010; Paulson, 2011; Pressey, 2011). No obstante, se desconoce su mecanismo de activación. Teniendo en cuenta que la presencia de mutaciones en los componentes de la vía HH en el RMS es poco frecuente (Bridge, 2000; Bridge, 2002; Tostar, 2006; Pressey, 2011), una hipótesis plausible es que la mayoría de tumores de RMS en relación con la activación de la vía HH se comportan como tumores dependientes de ligando. Sin embargo, trabajos previos sugieren niveles muy bajos o indetectables de SHH en líneas celulares y tumores de RMS (Tostar, 2006; Pressey, 2011), señalando de este modo a una activación independiente de ligando. Establecer el mecanismo de activación de la vía HH en el RMS es clave para el diseño de nuevas terapias que inhiban su efecto oncogénico.

1.1. Activación autocrina de la vía HH en el RMS

En este trabajo se ha descrito por primera vez el mecanismo de activación de la vía HH en el RMS. Concretamente, se ha caracterizado la presencia y el papel funcional de los ligandos HH en esta neoplasia.

A diferencia de las publicaciones anteriores (Tostar, 2006; Pressey, 2011), hemos identificado una pequeña subpoblación de tumores de RMS, representando aproximadamente el 30% del total de casos, con expresión baja o moderada de SHH.

Esta observación, conjuntamente con la identificación de elevados niveles de los ligandos IHH y DHH en todas las muestras de RMS analizadas, sugieren el papel crucial de los ligandos para la activación de la vía HH. La correlación entre los niveles de expresión de los ligandos HH y *GLI1* (el principal gen diana de la vía) en muestras de tumores y la evidente variación en la expresión de los componentes y dianas de la vía HH – *GLI1*, *GLI2* y *PTCH1* – tras la infra-regulación de los ligandos mediante shRNA, apuntan fuertemente a un mecanismo autocrino de activación en el cual las células de RMS tanto producen como responden a los ligandos (**Figura D1**).

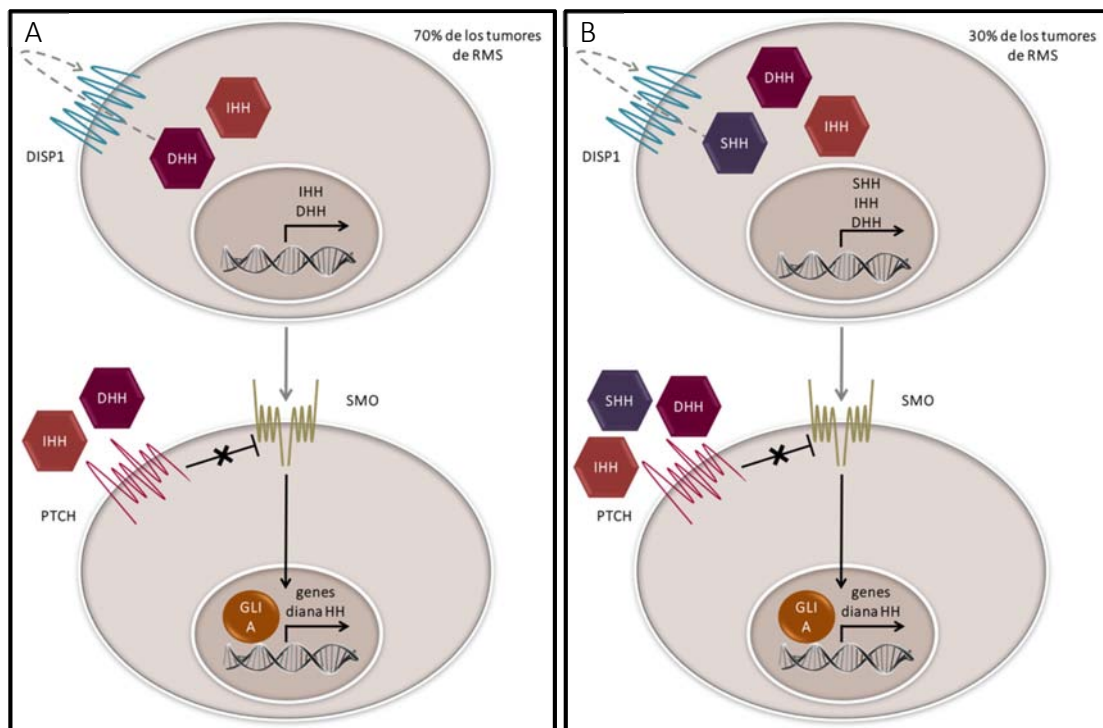


Figura D1. Representación del modelo propuesto de activación autocrina de la vía HH en las células de RMS. Los tumores de RMS presentan una expresión preponderante de los ligandos IHH y DHH. En el 70% de los tumores la activación de la vía HH es dependiente de la secreción autocrina de estos 2 ligandos (**A**), mientras que en el 30% restante también interviene SHH (**B**). En ambos casos, los ligandos HH modulan la expresión de los genes diana de la vía HH.

De manera concordante, y en paralelo a la realización de este trabajo, Satheesha *et al.* describieron que IHH y DHH eran los ligandos más comúnmente expresados en biopsias

de RMSe mientras que SHH tan sólo se expresaba en una minoría de casos. Además, estos autores descartaron una activación paracrina reversa de la vía HH en las células de RMS al detectar niveles ínfimos de las formas murinas de los ligandos HH en modelos murinos de xenotransplantes (Satheesha, 2016). Aunque hemos demostrado que las células de RMS secretan y responden a los ligandos HH no se puede descartar una posible activación paracrina de la vía HH en RMS; en la mayoría de cánceres se han acumulado evidencias de que una activación aberrante de la vía HH en las células tumorales puede estimular las células del estroma de manera paracrina, provocando la estimulación del crecimiento tumoral mediante mecanismos promovidos por las células del estroma, incluyendo entre otros la estimulación de la angiogénesis del tumor, modificaciones de la matriz extracelular y la secreción de factores de crecimiento como VEGF, IGF y WNT, los cuales a su vez influyen a las células tumorales (Curran, 2008; Yauch, 2008). Por consiguiente, el hecho que las células de RMS presenten una elevada expresión de IHH y DHH, y una moderada expresión de SHH en un pequeño subgrupo de casos, no tan sólo puede influir a las propias células tumorales sino que también puede modificar las células del estroma que envuelven el tumor para favorecer la progresión tumoral.

1.2. Los ligandos HH no presentan funciones equivalentes en el RMS

De la caracterización funcional de los ligandos realizada en este trabajo se desprende que los 3 ligandos HH no son equivalentes e intervienen en diferentes procesos oncogénicos en RMS; SHH desarrolla un papel crucial en invasividad, mientras que IHH y DHH promueven la proliferación pero no intervienen en la invasión celular. De manera concordante con nuestros resultados, se ha descrito que cada uno de los genes HH homólogos en Zefrafish son capaces de inducir respuestas diferentes y específicas (Currie, 1996; Lauderdale, 1998). Asimismo, Pathi *et al.* reportaron diferencias notables en la capacidad de los 3 ligandos HH de provocar respuestas funcionales. No obstante, estos autores propusieron el siguiente orden de los ligandos en función de su potencia de activación: SHH > IHH > DHH, siendo SHH e IHH los más similares en términos de potencia de activación de sus genes diana y función. En cambio, los resultados

obtenidos tras la modulación de los ligandos HH mediante shRNA en las líneas celulares de RMS analizadas sugieren que IHH y DHH están más próximos tanto en capacidad de activación como en función. La infra-regulación de *IHH* y *DHH* disminuyeron los niveles de GLI1 mientras que éstos no se vieron afectados tras la privación de *SHH*. En cambio, la infra-regulación de *SHH* provocó una reducción mayor en los niveles de GLI2 y PTCH que la infra-regulación de los otros 2 ligandos. Hipotetizamos que las diferencias en la capacidad de activación de los genes diana HH de los 3 ligandos podrían explicar las divergencias observadas en sus respuestas funcionales.

1.2.1. El papel de los ligandos HH en la proliferación de las células de RMS

Una de las fortalezas de este trabajo es la caracterización funcional de los ligandos HH en RMS. La reducción en la proliferación tras la infra-regulación genética de *IHH* y *DHH* mediante shRNA en las líneas celulares RD y RH4 claramente indica el papel crucial de estos ligandos en la activación de la vía y es una prueba más de que estas líneas celulares presentan una activación de la vía HH dependiente de ligando.

Dicha reducción en la proliferación celular sugiere una clara alteración en el ciclo celular. La acumulación obtenida de *Ciclina D2* tras la infra-regulación genética de *IHH*, *DHH* y *GLI1* confirma un arresto en la fase G1 del ciclo celular en las líneas celulares RD y RH4. Existen varios trabajos que relacionan la inhibición de la vía HH con un arresto en el ciclo celular. Ha sido descrito que las proteínas GLI actúan como vínculo entre el cilio primario y el cuerpo celular para promover una correcta división celular (Kim, 2011). Además, algunos de los genes activados por los factores de transcripción GLI, como por ejemplo *Ciclina D*, *Ciclina E* y el factor de transcripción E2F1, son reguladores clave de la transición G1/S en el ciclo celular (Kasper, 2006). No obstante, las proteínas GLI1 pueden tener un efecto dual sobre la expresión de *Ciclina D2*; GLI1 puede activar o reprimir su expresión, dependiendo del contexto celular (Vestergaard, 2008; Shahi, 2010). Shahi *et al.* en un estudio sobre la regulación de los genes diana de la vía HH en meduloblastoma y astrocitoma, reportaron un incremento de *Ciclina D2* tras el silenciamiento de *GLI1* en la línea celular astrocítica U87MG mientras que en la línea celular de meduloblastoma Daoy detectaron una disminución de ésta ciclina. Nuestros

resultados apuntan a que *GLI1* reprime la expresión de *Ciclina D2* en las células de RMS, la inhibición del cual causa la acumulación de esta ciclina, promoviendo así un arresto del ciclo celular en la fase G1 (**Figura D2**).

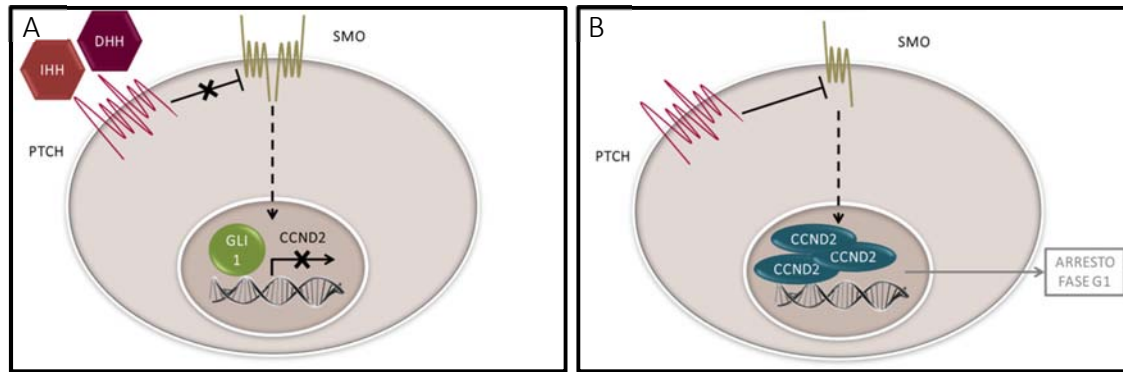


Figura D2. Representación del mecanismo propuesto de arresto del ciclo celular tras la infra-regulación genética de los ligandos *IHH* y *DHH* en células de RMS. A: La unión de *IHH* o *DHH* a *PTCH* induce la expresión del factor de transcripción *GLI1*, el cual reprime la transcripción de *Ciclina D2*. **B:** En ausencia de los ligandos *IHH* o *DHH* disminuyen los niveles de *GLI1*, promoviendo la acumulación de *Ciclina D2* y el consiguiente arresto del ciclo celular en la fase G1.

Es especialmente destacable la refractoriedad a la privación de ligandos *IHH* y *DHH* en la línea celular RH30, la cual ha sido reportado que posee una amplificación génica de *GLI1* (Pressey, 2011). Presumiblemente, esta amplificación génica confiere a la célula una activación de la vía independiente de ligando, debido a que la mutación se encuentra por debajo de éstos. Pressey et al. describieron la existencia de un subgrupo de pacientes de RMS con amplificación génica de *GLI1*, específico o por lo menos más frecuente del subtipo alveolar, sugiriendo que este mecanismo de activación de la vía HH independiente de ligando queda circunscrito a un particular subgrupo de pacientes de RMSa. Por lo tanto, la línea celular RH30 podría representar este subgrupo de pacientes previsiblemente refractario a una terapia basada en la inhibición de los ligandos. No obstante, la activación de la vía HH en la mayoría de tumores de RMS (incluyendo todos los RMSe y una proporción indeterminada de RMSa) no puede ser explicada mediante este mecanismo. Además, las líneas celulares RH4 y RD representan

aquellos tumores sin alteraciones genéticas en los componentes de la vía HH, en los cuales la oncogenicidad depende fuertemente de la presencia de los ligandos. Dicha dependencia conjuntamente con el hecho que este fenotipo podría representar la mayoría de pacientes de RMS, posiciona el bloqueo de los ligandos como una alternativa terapéutica con un elevado potencial translacional.

Aunque la infra-regulación de la expresión de los ligandos mediante shRNA no fue completa y se realizó por separado por cada ligando, los efectos observados sobre el crecimiento tumoral *in vivo* fueron remarcables. La reducción de cada uno de los ligandos HH provocó una clara disminución del crecimiento tumoral, sugiriendo que la participación de los 3 ligandos es crucial para este proceso. La reducción en el crecimiento tumoral fue particularmente notable con la privación de *SHH*. Aunque la infra-regulación genética de *SHH* no causó ningún efecto sobre proliferación *in vitro*, parece ser crucial en el microambiente tumoral incluso más que *IHH* y *DHH*, los cuales mostraron mayor efecto sobre la proliferación celular *in vitro*. El hecho que *SHH* esté involucrado en una plétora de procesos celulares hace pensar que muchos procesos *in vivo* deben de estar afectados por la falta de éste, los cuales son imperceptibles en un cultivo celular (como por ejemplo: el injerto o la angiogénesis del tumor). En este respecto, es de especial interés la conexión entre la secreción aberrante de ligandos HH y la estimulación paracrina de las células del estroma (Curran, 2008; Yauch, 2008), que puede llevar a la producción de VEGF e IGF por parte de las células del estroma estimuladas por los ligandos HH que, a su vez, inducirá la progresión del tumor creciente (**Figura D3**). En nuestra opinión, este posible efecto paracrino de *SHH* sobre la progresión tumoral, el cual es indetectable en estudios *in vitro* convencionales, es de especial interés para futuras investigaciones.

1.2.2. El papel de los ligandos HH en la capacidad invasiva de las células de RMS

El papel anti-oncogénico de la privación de los ligandos HH no está restringido a la inhibición de la proliferación celular. Está bien establecido el papel de la vía HH en la transición epitelio mesénquima y/o en el proceso de invasión celular en un amplio espectro de cánceres (Lee, 2015; Lei, 2015; Liu, 2015). No obstante, no se ha elucidado

la implicación de esta vía de señalización ni la contribución de los ligandos HH en la capacidad de invasión de las células de RMS. Los resultados mostrados en este trabajo demuestran por primera vez el papel crucial de la vía HH y, en particular de SHH, en el fenotipo invasivo de las células de RMS, en el que de forma sorprendente no intervienen ni IHH ni DHH (Figura D4).

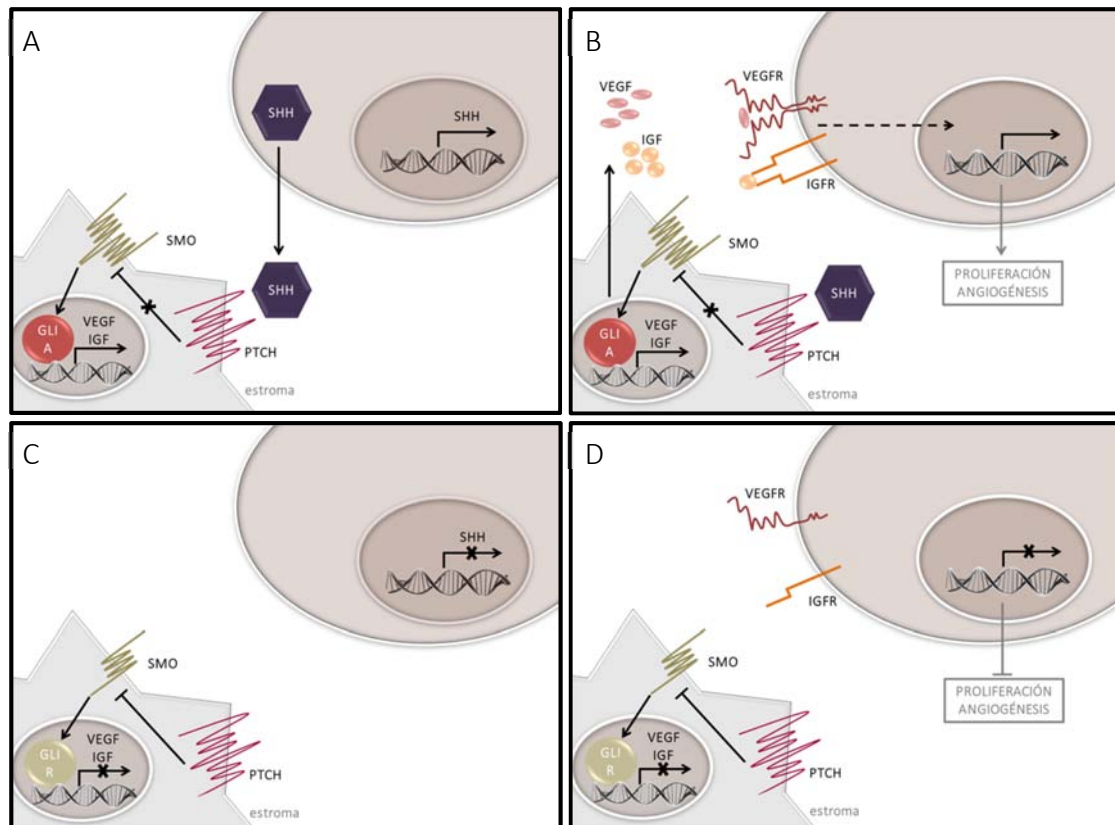


Figura D3. Representación del mecanismo propuesto de inhibición del crecimiento tumoral tras la infra-regulación genética de SHH en el RMS. A: SHH es secretado por las células de RMS y activa de forma paracrina la vía HH en las células del estroma que envuelven el tumor. **B:** La activación de la vía HH en las células del estroma provoca la expresión y secreción de los factores de crecimiento VEGF e IGF, entre otros. Estos factores promueven a su vez el crecimiento y la angiogénesis del tumor. **C y D:** En ausencia de SHH, se inhibe la expresión de los factores de crecimiento, comprometiendo la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

Asimismo, los resultados en modelos murinos de metástasis apuntan a que la infra-regulación de SHH también reduce la capacidad de invasión de las células de RMS *in*

vivo; no obstante, se requiere un ensayo más extenso para afirmar si la privación de SHH es suficiente para reducir el fenotipo invasivo de las células de RMS *in vivo*. La relación de SHH con la invasividad celular nos lleva a hipotetizar que este ligando podría ser un factor de mal pronóstico para pacientes con RMS, que permitiría diferenciar aquellos con mayor probabilidad de formación de metástasis. El estudio de la correlación de los niveles de expresión de *SHH* con parámetros clínicos permitirá esclarecer si la formación de 2 poblaciones claramente diferenciadas de tumores de RMS en función a la expresión de este ligando responde a una razón biológica. De manera concordante, en otros tumores ha sido descrita la expresión de SHH así como de otros componentes de la vía HH como marcadores de mal pronóstico (Kim, 2011; Chaudary, 2012; Azoulay, 2016).

Conjeturamos que la diferencia entre la respuesta a los diferentes ligandos HH en términos de invasión podrían ser debidos a su capacidad de modulación de GLI2. Tras la infra-regulación genética de *SHH* y *GLI1* observamos una mayor reducción de los niveles de GLI2 en comparación con la infra-regulación de los otros 2 ligandos. Un número creciente de trabajos describen el papel de GLI2 en el control del proceso de invasión de las células de melanoma y condrosarcoma (Alexaki, 2010; Nagao-Kitamoto, 2015), entre otras neoplasias; posiblemente fruto de la convergencia de las vías HH y TGF- β /SMAD a nivel de GLI2 (Javelaud, 2011).

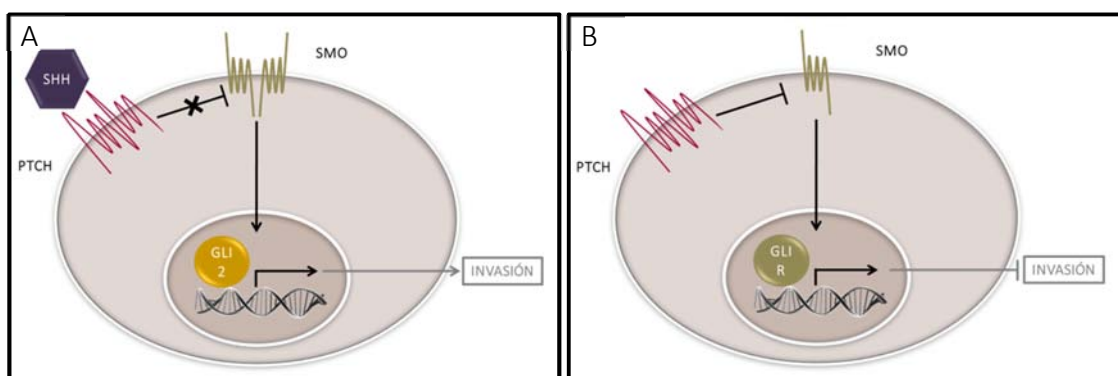


Figura D4. Representación del mecanismo propuesto de inhibición de la invasión de las células de RMS tras la infra-regulación genética de SHH. A: El incremento de la forma activadora de GLI2 en respuesta a SHH promueve la transcripción de genes involucrados en el fenotipo invasivo. **B:** GLI2 es degradado en ausencia de SHH, impidiendo la transcripción de genes involucrados en el fenotipo invasivo.

1.3. El efecto de la inhibición farmacológica de los ligandos HH y de SMO en las células de RMS

Es importante enfatizar que las terapias dirigidas a inhibir tumores con mutaciones en componentes de la vía HH solamente serán exitosas si van dirigidas a componentes situados debajo de estas mutaciones (Heretsch, 2010). En cambio, se espera que los tumores con activación de la vía HH dependiente de ligando sean sensibles a estrategias terapéuticas dirigidas al bloqueo de los ligandos.

De manera interesante, la reducción en la proliferación celular obtenida tras la inhibición genética de *IHH*, *DHH* y *GLI1* en las líneas celulares RD y RH4 fue comparable a la producida por la inhibición farmacológica de la vía HH, tanto con el anticuerpo bloqueante de los ligandos MEDI-5304 como con los inhibidores de SMO Sonidegib y Vismodegib (**Figura D5**). Los inhibidores de SMO también causaron una reducción de la proliferación en la línea RH30 pero sin producir una reducción concordante de los niveles de *GLI1*. El efecto observado en esta línea celular, que se esperaba que fuera insensible a la inhibición de SMO debido a su amplificación génica de *GLI1*, sugiere un efecto inespecífico tanto de Sonidegib como de Vismodegib. En cambio, el anticuerpo bloqueante MEDI-5304 parece ser específico de los ligandos HH debido a que no causó ningún efecto en esta línea celular con activación de la vía HH independiente de ligando. En conjunto, los resultados obtenidos en las 3 líneas celulares de RMS analizadas, apuntan a la reducción en la oncogenicidad tras el tratamiento con el anticuerpo bloqueante MEDI-5304 y sugieren que este inhibidor confiere mayor especificidad y una potencia similar que los inhibidores de SMO analizados en términos de inhibición de la proliferación inducida por la vía HH. Este anticuerpo bloqueante reconoce SHH e IHH pero falla en el bloqueo de DHH (Michaud, 2014). Los elevados niveles de DHH y su contribución en la proliferación de las células de RMS pueden explicar en parte los efectos moderados en la reducción de proliferación tras el

tratamiento con MEDI-5304; hipotetizamos que el diseño de moléculas que bloqueen tanto IHH como DHH provocarán una mayor reducción en la proliferación.

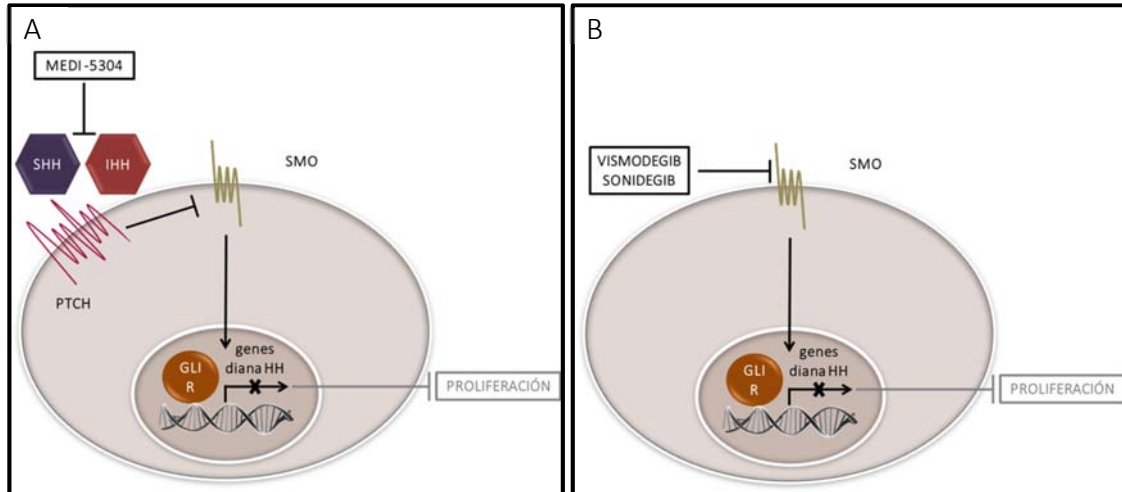


Figura D5. Representación del mecanismo propuesto de inhibición de la proliferación celular tras la inhibición farmacológica de la vía HH en células de RMS. El tratamiento de las células de RMS con el anticuerpo bloqueante de los ligandos HH – MEDI-5304 – (A) y los inhibidores de SMO – Sonidegib y Vismodegib – (B) producen la inhibición de la transcripción de los genes diana de la vía HH, provocando una subsecuente inhibición de la proliferación celular.

A diferencia de los ensayos de proliferación, los ensayos de invasión no mostraron concordancia entre la inhibición genética y la inhibición farmacológica. Por una parte, el tratamiento con el anticuerpo bloqueante MEDI-5304 no redujo la capacidad invasiva de las células de RMS, aunque se observó una leve tendencia en la línea celular RD. Este hecho podría ser debido a un bloqueo insuficiente de SHH y pone de manifiesto la necesidad de diseñar nuevas moléculas con mayor capacidad de bloqueo de los ligandos HH. Por la otra parte, el tratamiento con los inhibidores de SMO, Sonidegib y Vismodegib, mostraron resultados divergentes. El tratamiento con Sonidegib redujo de forma significativa la capacidad invasiva de las 3 líneas celulares de RMS analizadas, inclusive la línea RH30 con amplificación génica de *GLI1*, apuntando a cierto efecto inespecífico de este inhibidor. De manera sorprendente, el tratamiento con Vismodegib causó la inducción de la capacidad invasiva de las líneas de RMS tanto *in vitro* como *in*

vivo, mostrando un claro efecto *off-target* de este inhibidor. Mientras los inhibidores de SMO están activos en BCC y MB, los resultados clínicos obtenidos en otros tumores son menos prometedores (McMillan, 2012). Varios ensayos clínicos de los inhibidores Vismodegib y Saridegib han sido parados al no obtener mejoras significativas en comparación con el grupo placebo (McMillan, 2012; Catenacci, 2015). De manera concordante con nuestros resultados, el ensayo clínico de Saridegib con el quimioterapéutico Gemcitabina en cáncer de páncreas metastásico fue prematuramente parado después de que los pacientes tratados con Saridegib y Gemcitabina presentaran una mayor progresión de la enfermedad, sugiriendo un posible mecanismo malignizante relacionado con el tratamiento con inhibidores de SMO (McMillan, 2012). La explicación más plausible de estos fracasos es que los cánceres evaluados son dependientes de ligandos y no impulsados por mutaciones de componentes de la vía HH. Esto plantea la posibilidad de la inhibición farmacológica de los ligandos, en vez de los inhibidores de SMO, como alternativa terapéutica en los cánceres dependientes de ligando.

1.3.1. El efecto *off-target* de Vismodegib sobre la capacidad invasiva de las células de RMS es mediada por la activación de la vía UPR

Nuestros hallazgos en RMS, los cuales muestran que la inducción indeseada de la invasión celular tras el tratamiento con Vismodegib es mediada por la activación de la vía UPR (**Recuadro D1**) (**Figura D6**), suponen la primera descripción del mecanismo responsable de los efectos *off-target* de los inhibidores de SMO. Concretamente, el hecho que 2 de los genes significativamente sobre-expresados tras el tratamiento de las células de RMS con Vismodegib, *CHOP* y *TRIB3*, sean efectores de la vía inducida por PERK sugiere que la activación de la vía UPR en este caso está mediada por este sensor, por lo menos en RMS. Asimismo, 3 de los otros 4 genes sobre-expresados tras el tratamiento con Vismodegib (*CHAC1*, *SESN2* y *ASNS*) están directamente relacionados con este brazo de activación de la vía UPR (Gjymishka, 2009; Joo, 2015; Saveljeva, 2016).

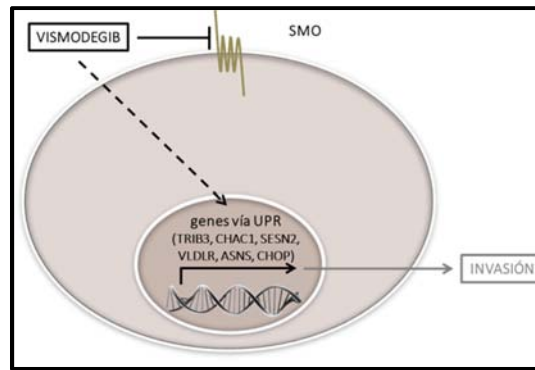


Figura D6. Representación del mecanismo propuesto de inducción de la invasión de las células de RMS tras el tratamiento con Vismodegib. El tratamiento de las células de RMS causa la inducción indeseada de la invasividad celular mediante la activación *off-target* de la vía UPR.

La implicación de la vía UPR en cáncer fue formalmente propuesta en 2004 y, en estos últimos años, se ha demostrado su activación en una amplia variedad de cánceres (Li, 2011). A diferencia de las células normales, las células tumorales están sujetas a importantes cambios moleculares debido a su elevada demanda metabólica y a la adaptación a ambientes hostiles, incluyendo condiciones de hipoxia, de estrés nutricional y de pH. Estas condiciones conllevan a la activación de la vía UPR, la cual contribuye a la progresión tumoral y a la supervivencia celular. Concretamente, se considera que las respuestas iniciadas por los sensores PERK e IRE1 α tienen papeles pro-oncogénicos, promoviendo la transformación celular y la progresión del tumor (Moenner, 2007; Auf, 2010). Hasta la actualidad, no existen trabajos sobre la implicación de la vía UPR en la malignización del RMS. No obstante, varios trabajos publicados en otros cánceres pueden ilustrar su posible papel. De manera concordante, entre todas las funciones de la vía UPR descritas en cáncer, unas de las más remarcables son la inducción de la transición epitelio mesénquima y de la invasividad, incluyendo la producción de algunas MMPs (*matrix metalloproteinses*), la remodelación de la membrana extracelular y la estimulación de la angiogénesis (Dejeans, 2015). La caracterización detallada de este mecanismo ayudará a los investigadores y compañías farmacéuticas interesadas en el desarrollo y aplicación de inhibidores de SMO en RMS y en otros cánceres dependientes de ligando dado que, tal y como se ha descrito anteriormente, este efecto *off-target* no está circunscrito exclusivamente a RMS.

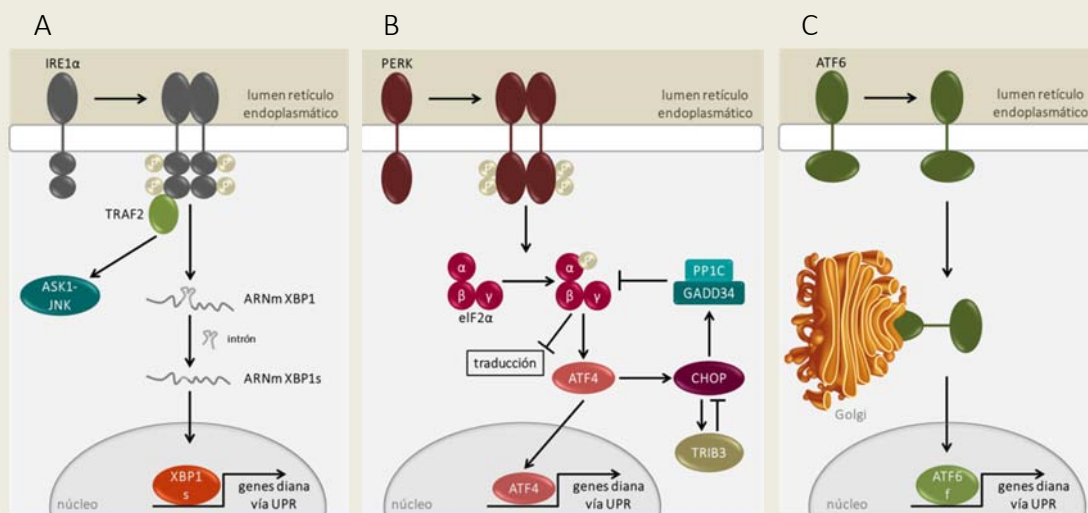
1.3.2. TRIB3, posible marcador de mal pronóstico en el RMS

Dada la relación entre la activación de la vía UPR y el fenotipo invasivo de las células de RMS, se estudió la correlación entre los componentes de esta vía sobre-expresados tras el tratamiento con Vismodegib y parámetros clínicos de pacientes con RMS. De manera interesante, se obtuvo una correlación significativa entre los niveles de expresión de *TRIB3* y los siguientes parámetros de mal pronóstico: histología alveolar, presencia de translocación PAX-FOXO1 y estadio 4 de la enfermedad. Estos resultados no tan sólo confirman la implicación de esta proteína perteneciente a la vía UPR en el proceso de malignificación de los tumores de RMS sino que también sugieren el posible uso de *TRIB3* como marcador de mal pronóstico en esta neoplasia. De manera concordante, ha sido descrita la sobre-expresión de *TRIB3* en una gran variedad de tejidos tumorales y su papel como marcador de mal pronóstico en los carcinomas de mama y de colon (Miyoshi, 2009; Hua, 2011; Wennemers, 2011). *TRIB3* es una pseudoquinasa cuya función es el ensamblaje de complejos proteicos, interaccionando con una amplia variedad de proteínas, hecho que dificulta establecer su mecanismo de interacción en cáncer. No obstante, se ha sugerido que el papel oncogénico de *TRIB3* es debido a su interacción con las vías de señalización MAPK, PI3K y TGF- β , entre otras (Hua, 2011; Wennemers, 2011; Hua 2015).

Recuadro D1. Vía *Unfolded protein response* (UPR)

El retículo endoplasmático es el principal compartimento subcelular involucrado en el plegamiento y maduración de las proteínas. Diferentes tipos de perturbaciones pueden alterar este orgánulo, provocando la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas dentro del retículo endoplasmático, una condición conocida como estrés del retículo endoplasmático. Los mecanismos adaptativos iniciados por el estrés del retículo endoplasmático reciben el nombre de *Unfolded protein response* (UPR) (Walter, 2011). La activación de esta vía implica cambios en el sistema secretorio, es decir, la infraestructura celular dedicada al plegamiento, maduración y tráfico de las

proteínas transmembrana y secretadas, para restablecer la homeostasis del retículo endoplasmático. Más concretamente, la vía UPR incluye procesos dirigidos a atenuar la traducción de proteínas, incrementar el metabolismo y la producción de proteínas redox y aumentar la producción de chaperonas y de enzimas de degradación. No obstante, si el daño celular es severo, la vía UPR induce la muerte celular mediante apoptosis (Tabas, 2011; Tanjore, 2011; Hetz, 2013).



La vía UPR transmite señales de estrés desde el lumen del retículo endoplasmático al resto de la célula mediante 3 sensores: IRE1α (*Inositol-requiring enzyme 1α*), PERK (*Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*) y ATF6 (*Activating transcription factor 6*). Estas proteínas transmembrana del retículo endoplasmático transducen señales al citosol y al núcleo para restablecer la capacidad de plegamiento de las proteínas mediante varios mecanismos. **A:** IRE1α, con capacidad ARNasa, procesa el ARNm codificante de XBP1 (*X-box binding protein 1*). Esto incrementa la formación de la forma activa del factor de transcripción (XBP1s) que promueve la transcripción de un subgrupo de genes diana de la vía UPR, involucrados en el plegamiento de las proteínas, la degradación de proteínas asociadas al retículo endoplasmático (ERAD, del inglés *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*), el control de calidad de las proteínas y la biogénesis de orgánulos. Además, IRE1α activa la vía de apoptosis JNK-ASK1 (*JUN N-terminal kinase, apoptosis signal-regulating kinase 1*) mediante la unión de proteínas adaptadoras como TRAF2

(*Tumour necrosis factor (TNF) receptor associated factor 2*). **B:** La activación de PERK atenúa la síntesis general de proteínas mediante la fosforilación de eIF2 α (*Eukaryotic translation initiator factor 2 α*). La fosforilación de eIF2 α permite la transcripción selectiva del ARNm de ATF4 (*Activating transcription factor 4*), que codifica por un factor de transcripción que induce la expresión de genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos, autofagia y apoptosis. ATF4 controla la expresión de las proteínas pro-apoptóticas GADD34 (*Growth arrest and DNA damage-inducible 34*) y CHOP (*C/EBP-homologous protein*). CHOP induce la expresión de su regulador negativo TRIB3 (*Tribbles homolog 3*). GADD34 se une a PP1C (*Protein phosphatase 1C*) para desfosforilar eIF2 α . **C:** ATF6 se localiza en el retículo endoplasmático en condiciones basales y su dominio citosólico codifica por un factor de transcripción. Bajo condiciones de estrés del retículo endoplasmático, ATF6 se transloca al aparato de Golgi donde es procesado para liberar su dominio citosólico (ATF6f). ATF6 controla la expresión de determinados genes diana de la vía UPR. Imagen y texto adaptados de Hetz (2013).

1.4. Implicaciones terapéuticas

La descripción del mecanismo de activación de la vía HH en RMS presentada en este trabajo abre la puerta al desarrollo de nuevas terapias dirigidas al bloqueo de los ligandos HH como posible alternativa en el futuro desarrollo de nuevos protocolos de tratamiento para pacientes con RMS. Además, en segundo lugar pero no menos importante, hemos aportado por primera vez la descripción del efecto deletéreo de Vismodegib, que podría explicar la ineficacia previamente descrita de los inhibidores de SMO en algunos ensayos clínicos en cánceres con activación de la vía HH dependiente de ligando. Por lo tanto, los hallazgos descritos en este trabajo pueden tener una implicación translacional significativa en RMS así como en otros cánceres con activación de la vía HH dependiente de ligando.

2. EL PAPEL DE LA VÍA HEDGEHOG EN EL MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS INICIADORAS DE RABDOMIOSARCOMA: LOS LIGANDOS HEDGEHOG COMO NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS CONTRA ESTA SUBPOBLACIÓN CELULAR

Las células madre tumorales son consideradas como las responsables de la génesis del tumor así como las causantes de resistencia a los tratamientos, recidivas y metástasis en estadios más avanzados de la enfermedad. A pesar de las evidencias acumuladas que afianzan su existencia en muchas neoplasias, en el caso del RMS continúan siendo un desafío. La existencia de dicha subpoblación de células sólo ha sido reportada en el RMS embrionario y no se han mostrado evidencias de su existencia en el subtipo alveolar, la forma más agresiva de RMS y con mayor tendencia a la formación de metástasis. Asimismo, aunque se hayan descrito 3 posibles marcadores – FGFR3, CD133/2 y SOX2 – para el aislamiento de las células iniciadoras de RMSe, existe controversia sobre su idoneidad (Hirotsu, 2009; Walter 2011; Skoda 2016). Por lo tanto, el uso de otras aproximaciones para el aislamiento de células indicadoras de tumor, como los ensayos de formación de holoclonos y esferas, son una alternativa interesante para el estudio de esta subpoblación de células en el RMS.

2.1. La formación de holoclonos y esferas como método de enriquecimiento de células iniciadoras de RMS

La capacidad de una subpoblación específica de formar holoclonos fue descrita por primera vez como una característica de células madre de queratinocitos (Barrandon, 1987). Recientemente, ha sido reportada también como característica de células madre tumorales en varios cánceres, incluyendo el cáncer de próstata (Li, 2008), páncreas (Tan, 2011), mama (Liu, 2013), pulmón (Manley, 2013) y colon (Philip, 2015). La capacidad de las células madre tumorales de formar esferas en cultivos también ha sido ampliamente reportada en cáncer, inclusive en RMSe (Walter, 2011). Ambos ensayos, basados en la formación de estructuras celulares, permiten el enriquecimiento de células con características de células madre.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran por primera vez la capacidad de las células de RMS de formar holoclones. También muestran la capacidad de estas células de formar esferas, confirmando los resultados previamente publicados en RMSe y descubriendo la capacidad de las células del subtipo alveolar de formar dichas estructuras celulares. Se seleccionaron las líneas celulares de RMS, CW9019 (subtipo alveolar) y HTB82 (subtipo embrionario), dado que fueron las que formaron esferas con mayor eficiencia y las diferentes tipologías de clones de manera más claramente diferenciable. Cabe destacar que tan sólo un pequeño porcentaje de células fueron capaces de formar holoclones (9-16%) y solamente del 0.5 al 2.5% de células formaron esferas. El hecho que tan sólo un pequeño porcentaje de células presenten la habilidad de formar estas estructuras celulares encaja con la hipótesis de la existencia de una pequeña subpoblación celular defendida por el modelo de células madre tumorales. No obstante, existe una clara discrepancia entre el porcentaje de células capaces de formar estas estructuras celulares, siendo menor el porcentaje de esferas que de holoclones. Esta diferencia puede ser explicada por el efecto deletéreo del medio Neurobasal utilizado para la formación de esferas sobre las células de RMS (Hogins, 2011). En cambio, el hecho que el ensayo de formación de holoclones se realice en el medio habitual de cultivo de las células puede explicar la mayor eficiencia obtenida, dado que las células tienden a acomodarse mejor y más rápidamente en su medio habitual.

La capacidad de auto-renovación es una de las características claves de las células madre. Para determinar si las células de RMS contenidas en holoclones y esferas poseían esta característica, se evaluó su capacidad de formación de colonias y esferas secundarias. La falta absoluta de holoclones en cultivos generados a partir de mero clones y para clones y el enriquecimiento en el porcentaje de holoclones formados por células provenientes de holoclones sugieren la capacidad exclusiva de auto-renovación de las células contenidas en holoclones. Asimismo, la capacidad de estas células de regenerar los 3 tipos de clones es sugestiva de su capacidad de diferenciación y, por lo tanto, de la división asimétrica de esta fracción celular. De una manera similar, el incremento en el porcentaje de esferas secundarias obtenidas es un indicativo de la capacidad de auto-renovación de estas células (**Figura D7**).

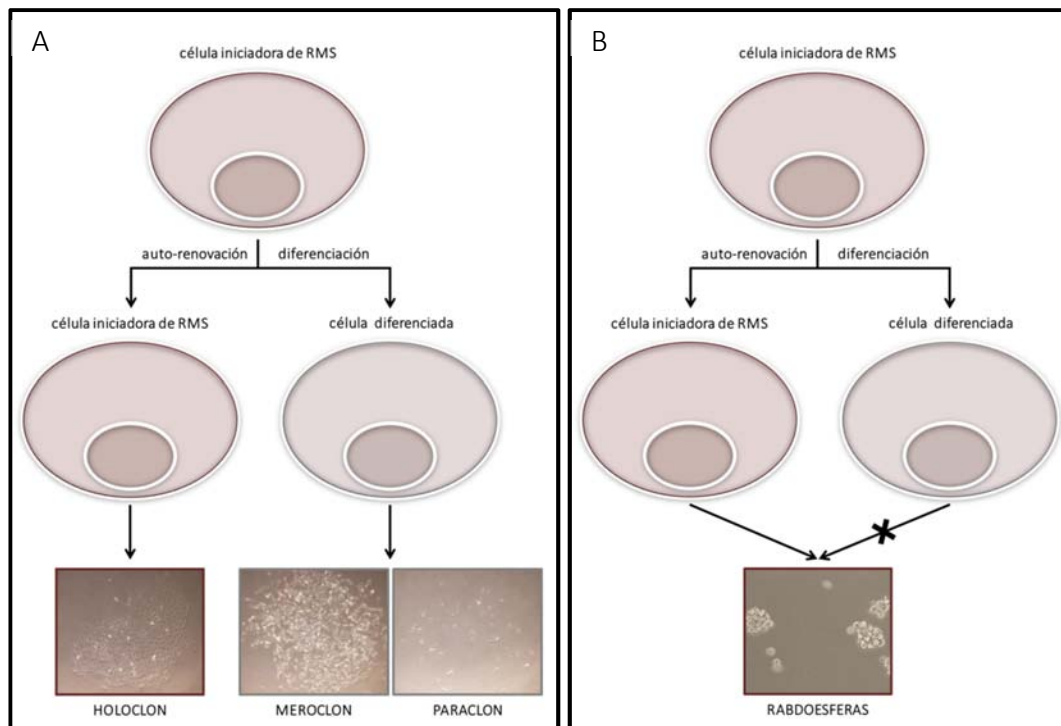


Figura D7. Modelo propuesto de organización jerárquica de las células de RMS. Únicamente los holoclones (A) y esferas (B) de RMS están formados por células con características de auto-renovación y capacidad de diferenciación propias de células iniciadoras de tumor. Las células diferenciadas únicamente son capaces de formar meroclones y paraclones (A) y no poseen la capacidad de formar esferas (B).

2.2. La activación de la vía HH en las células iniciadoras de RMS

En un amplio número de neoplasias ha sido demostrado el papel crucial de la vía de señalización HH para el mantenimiento de las células madre tumorales, incluyendo los cánceres de páncreas (Fu, 2012), próstata (Nanta, 2013), pulmón (Bora-Singhal, 2015), melanoma (Santini, 2012) y glioblastoma (Eimer, 2012).

Los resultados presentados en este trabajo muestran una clara activación de la vía HH en las subpoblaciones celulares enriquecidas en células iniciadoras de RMS. Por una parte, el principal gen diana de la vía HH, el factor de transcripción GLI1, mostró una acusada inducción en sus niveles de ARNm en holoclones y esferas, sugiriendo un papel destacado de esta vía en el mantenimiento de la propiedad de célula madre. De manera concordante, ha sido caracterizada su implicación en el mantenimiento de las células

madre tumorales en una gran variedad de cánceres. En esta dirección, recientemente ha sido descrita la habilidad de GLI1 de activar la expresión de NANOG y SOX2, 2 factores de transcripción claves para el fenotipo de célula madre (Bora-Singhal, 2015; Li, 2016). Por otra parte, los niveles de expresión de los ligandos HH estaban claramente sobre-expresados en esferas pero no en holoclones, pero esto no significa que estos últimos presentaran bajos niveles de los ligandos. De hecho, los niveles de los ligandos HH fueron relativamente altos en holoclones pero no presentaron una sobre-expresión en comparación con los meroclones. Destacar que los niveles de expresión fueron comparados con los de meroclones debido a la imposibilidad de extraer ARN de paraclones, al ser clones formados por células altamente diferenciadas cuya proliferación era muy limitada; hipotetizamos que en el caso que hubiera sido posible la comparación con los niveles de expresión de los paraclones, las diferencias hubieran sido aún mayores (**Figura D8, A y B**).

Tal y como se ha explicado en apartados anteriores, ha sido demostrado que la secreción aberrante de los ligandos HH por parte de las células tumorales puede estimular de forma paracrina las células del estroma que envuelven el tumor, incluyendo la estimulación de la angiogénesis del tumor, la modificación de la matriz extracelular y la secreción de VEGF e IGF, entre otros (Curran, 2008; Yauch, 2008). Este mecanismo podría explicar la clara inducción de los ligandos HH observada en las esferas de RMS y confirmada en paralelo a la realización de este trabajo por Satheesha *et al.*; especulamos que, a medida que las esferas crecen, las células situadas en la parte central se encuentran en condiciones de hipoxia y privación de nutrientes que desencadenaría en la inducción de la angiogénesis mediante la secreción de los ligandos HH. No obstante, se requiere la realización de más experimentos que apoyen esta hipótesis.

2.3. El efecto de la inhibición de la vía HH sobre la capacidad de formación de holoclones y esferas de RMS

En este trabajo se ha determinado el efecto de la inhibición de la vía HH sobre la capacidad de proliferación e invasión de las células de RMS tanto *in vitro* como *in vivo*.

Mediante los ensayos de formación de holoclones y esferas se evaluó también el efecto de la inhibición de esta vía sobre el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS.

La infra-regulación de *IHH*, *DHH* y *GLI1* mediante shRNAs redujo de forma significativa la formación de holoclones en las 2 líneas de RMS analizadas, pero no causó ningún efecto sobre la capacidad de formación de esferas aunque éstas mostraron un diámetro claramente inferior. Estos resultados confirman los efectos observados anteriormente sobre la inhibición de la proliferación pero dificultan la determinación de su efecto específico sobre la formación de holoclones y esferas y la capacidad de diferenciación de éstos. Para evitar los efectos sobre proliferación, se evaluó el efecto de los inhibidores de la vía HH – MEDI-5304 y Sonidegib – pretratando las células y realizando los ensayos en ausencia de éstos. El pretratamiento con ambos inhibidores aminoró la capacidad de las células de RMS de formación de holoclones y esferas, confirmando un efecto específico sobre las células iniciadoras de RMS. Asimismo, en el caso del ensayo de formación de clones, los inhibidores promovieron el crecimiento de clones más diferenciados (meroclones y paraclones), de forma significativa en la línea celular HTB82, sugiriendo que la reducción en el porcentaje de holoclones observada tras el pretratamiento con inhibidores podría ser debido a la diferenciación de las células iniciadoras de RMS (**Figura D8, C y D**). Por lo tanto, estos resultados sugieren que los inhibidores farmacológicos de la vía HH pueden reducir el número de células capaces de iniciar nuevos tumores de RMS, mostrando por primera vez la idoneidad de los inhibidores específicos de los ligandos HH. De manera concordante, recientemente Satheesa *et al.* describieron que el pretratamiento de la línea celular RD con el inhibidor de GLI1, GANT61, resultó en una reducción del crecimiento tumoral en un modelo murino de xenotransplante.

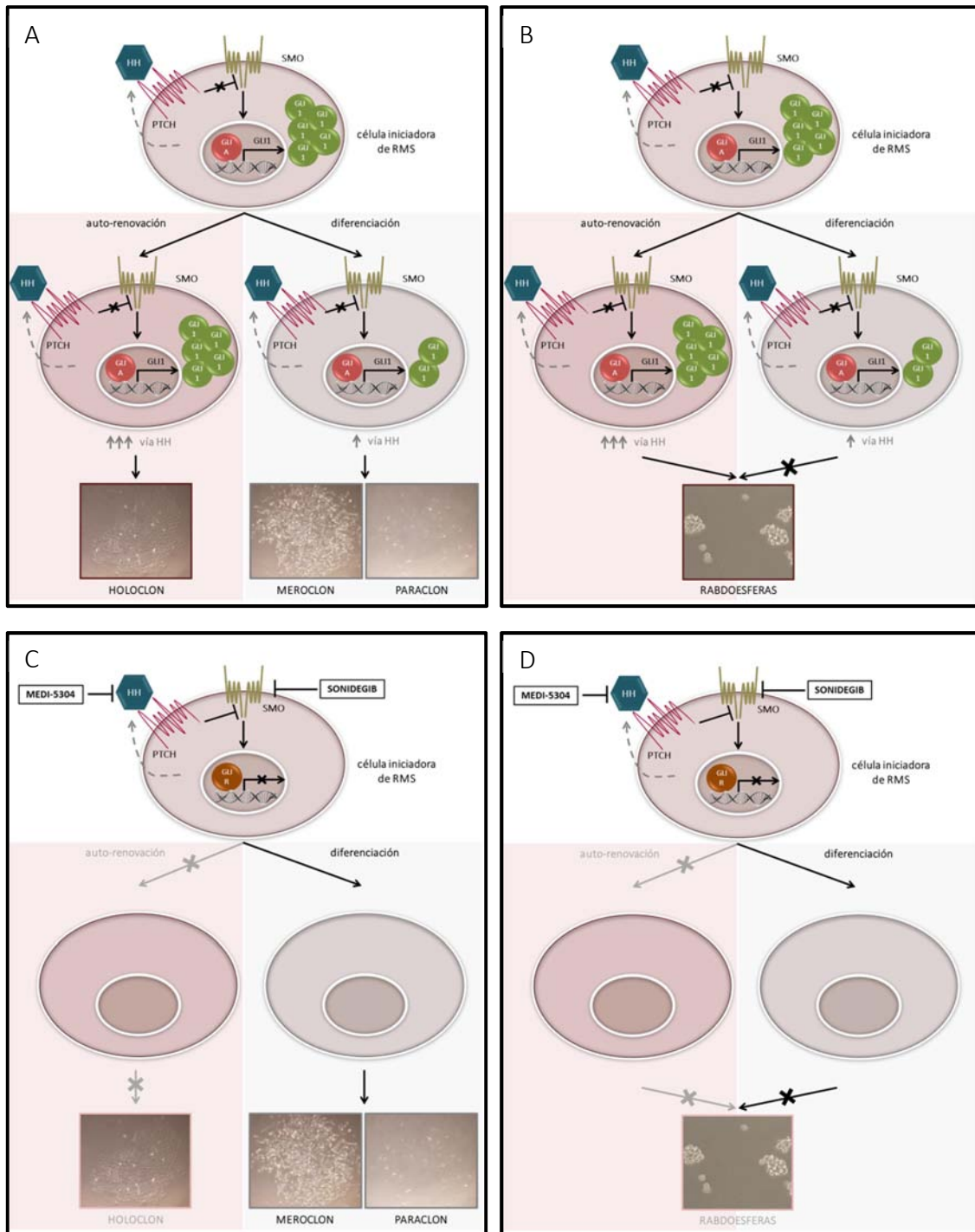


Figura D8. Modelo propuesto del estado de activación de la vía HH en las células iniciadoras de RMS. Las células iniciadoras de RMS contenidas en holoclonos (A) y esferas (B) presentan una sobre-activación de la vía HH. La inhibición farmacológica de esta vía, tanto mediante el tratamiento con MEDI-5304 (anticuerpo bloqueante de los ligandos SHH e IHH) o Sonidegib (inhibidor de SMO), impide la formación de holoclonos (C) y esferas (D), inhibiendo así la capacidad de auto-renovación de las células iniciadoras de RMS y promoviendo su diferenciación.

2.4. Implicaciones terapéuticas

Nuestros resultados sugieren con fuerza que una posible terapia basada en la inhibición de la vía HH no tan sólo tendría efectos sobre la proliferación celular sino que también reduciría la capacidad de generar nuevos tumores, incluyendo recidivas locales y metástasis. Teniendo en cuenta que la principal causa de muerte en los pacientes con sarcomas, así como en la mayoría de pacientes oncológicos, es el desarrollo y progresión de metástasis, una posible terapia dirigida tanto a inhibir la proliferación celular como la capacidad de iniciación de tumor podría impedir la progresión tumoral y, por lo tanto, mejorar la supervivencia de los pacientes. Por consiguiente, los resultados presentados refuerzan la aplicación de los inhibidores de la vía HH, y en particular de los ligandos, en el tratamiento contra el RMS.

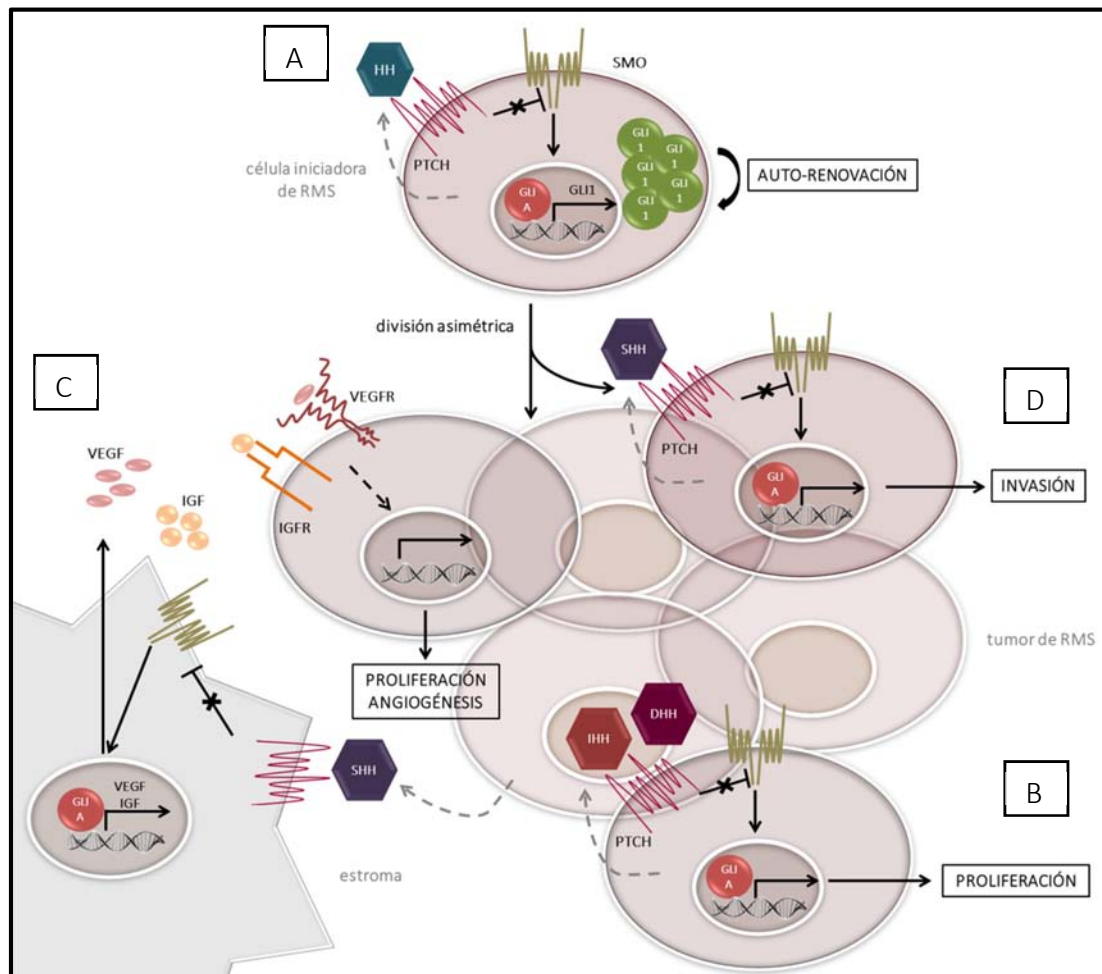


Figura D9. Representación de los resultados obtenidos en esta tesis. Las células que forman los tumores de RMS presentan una organización jerárquica en el cual las células iniciadoras de RMS, con capacidad de auto-renovación y diferenciación, residen en el ápice y son las responsables de generar el resto de células que forman el tumor. La vía de señalización HH tiene un papel clave tanto en las células iniciadoras de RMS como en las más diferenciadas, presentando un mecanismo de activación dependiente de ligando. **A:** Las células iniciadoras de RMS presentan una sobre-activación de la vía HH, la cual está implicada en la auto-renovación y mantenimiento de esta subpoblación celular. Mediante la división asimétrica de las células iniciadoras de RMS se genera el resto de células que forman el tumor, en las cuales la vía HH también tiene un papel importante. **B:** Los tumores de RMS con activación autocrina de la vía HH presentan niveles de expresión elevados de IHH y DHH, ligandos implicados en la proliferación celular. Un pequeño subgrupo de tumores de RMS también expresan SHH. **C:** Los resultados en modelos *in vivo* sugieren el papel de SHH en la activación paracrina de la vía HH, implicada en la estimulación de la proliferación y angiogénesis de las células tumorales mediadas por la secreción de factores de crecimiento por parte del estroma en respuesta a este ligando. **D:** SHH también interviene en la invasividad celular, posiblemente en células iniciadoras de RMS que, según el modelo de células madre tumorales, son las responsables de la formación de metástasis.

VI. CONCLUSIONES

Primera. Las líneas celulares y los tumores de RMS presentan una expresión preponderante de los ligandos IHH y DHH, mientras que tan sólo un subgrupo de ellos presenta expresión de SHH.

Segunda. Los niveles de expresión de los ligandos HH correlacionan con el estado de activación de la vía HH en tumores de RMS. Asimismo, la infra-regulación genética de los ligandos HH reducen los componentes y genes diana de la vía HH en líneas celulares de RMS, sugiriendo la activación autocrina de la vía HH en esta neoplasia.

Tercera. La inhibición genética de la vía HH reduce la proliferación de las células de RMS *in vitro* e *in vivo*. Los 3 ligandos HH tienen un papel clave en este proceso celular. Mientras IHH y DHH regulan la proliferación celular mediante un mecanismo autocrino de activación de la vía HH, los resultados obtenidos en modelos murinos sugieren que SHH lo haría mediante un mecanismo paracrino.

Cuarta. La inhibición farmacológica de la vía HH reduce la proliferación de las células de RMS. MEDI-5304, el anticuerpo bloqueante de los ligandos HH, presenta un efecto más específico que los inhibidores de SMO, Sonidegib y Vismodegib.

Quinta. La inhibición de la vía HH reduce la invasividad celular en RMS. SHH es el ligando responsable del fenotipo invasivo, posicionándolo como posible marcador de mal pronóstico en RMS.

Sexta. El tratamiento de las células de RMS con Vismodegib provoca la inducción indeseada de la invasión celular *in vitro* e *in vivo* mediante la activación *off-target* de la vía UPR. TRIB3, el miembro de esta vía más sobre-expresado tras el tratamiento con Vismodegib, correlaciona con factores de mal pronóstico en pacientes con RMS, sugiriendo su idoneidad como factor pronóstico en esta neoplasia.

Séptima. Las células de RMS de ambos subtipos histológicos poseen la capacidad de formar holoclones y esferas.

Octava. Las células de RMS contenidas en holoclones y esferas presentan la capacidad de auto-renovación y diferenciación, confirmando que poseen características de células madre.

Novena. Las células de RMS contenidas en holoclones y esferas presentan una sobre-activación de la vía HH. Las esferas de RMS presentan también una sobre-expresión de los ligandos HH.

Décima. La inhibición farmacológica de la vía HH, tanto la inhibición de SMO como el bloqueo de los ligandos HH, impide la formación de holoclones y esferas, sugiriendo el papel clave de esta vía de señalización, y en particular de los ligandos HH, en el mantenimiento de las células iniciadoras de RMS.

Undécima. En conjunto, una terapia basada en la inhibición de la vía HH, y en particular de los ligandos HH, no tan sólo podría interferir en la proliferación celular sino que también sería capaz de inhibir la invasividad y la capacidad clonogénica de las células de RMS, reduciendo así la formación de metástasis y causando una mejora en la supervivencia de los pacientes afectados de esta neoplasia.

VII. REFERENCIAS

- Abbasi**, A.A., Goode, D.K., Amir, S., and Grzeschik, K.H. (2009). Evolution and functional diversification of the GLI family of transcription factors in vertebrates. *Evol Bioinform Online*, 5:5-13.
- Accili**, D., and Arden, K.C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117(4):421-426.
- Alexaki**, V.I., Javelaud, D., Van Kempen, L.C., Mohammad, K.S., Dennler, S., Luciani, F., Hoek, K.S., Juárez, P., Goydos, J.S., Fournier, P.J., Sibon, C., Bertolotto, C., Verrecchia, F., Saule, S., Delmas, V., Ballotti, R., Larue, L., Saiag, P., Guise, T.A., and Mauviel, A. (2010). GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 102(15):1148-1159.
- Alison**, M.R., Islam, S., and Wright, N.A. (2010). Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J Cell Sci*, 123(Pt 14):2357-2368.
- Ally**, M.S., Ransohoff, K., Sarin, K., Atwood, S.X., Rezaee, M., Bailey-Healy, I., Kim, J., Beachy, P.A., Chang, A.L., Oro, A., Tang, J.Y., and Colevas, A.D. (2016). Effects of Combined Treatment With Arsenic Trioxide and Itraconazole in Patients With Refractory Metastatic Basal Cell Carcinoma. *JAMA Dermatol*, 13:1-5.
- Almazán-Moga**, A., Roma, J., Molist, C., Vidal, I., Jubierre, L., Soriano, A., Segura, M.F., Llorca, A., Sánchez de Toledo, J., and Gallego, S. (2014). Optimization of rhabdomyosarcoma disseminated disease assessment by flow cytometry. *Cytometry A*, 85(12):1020-1029.
- Amakye**, D., Jagani, Z., and Dorsch, M. (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med*, 19(11):1410-1422.
- Apuzzo**, S., and Gros, P. (2007). Cooperative interactions between the two DNA binding domains of Pax3: helix 2 of the paired domain is in the proximity of the amino terminus of the homeodomain. *Biochemistry*, 46: 2984–2993.
- Auf**, G., Jabouille, A., Guérit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouchecareilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., von Deimling, A., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chevet, E., Bikfalvi, A., and Moenner, M. (2010). Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(35):15553-15558.
- Azoulay**, S., Terry, S., Chimingqi, M., Sirab, N., Faucon, H., Gil Diez de Medina, S., Moutereau, S., Maillé, P., Soyeux, P., Abbou, C., Salomon, L., Vacherot, F., de La Taille, A., Loric, S., and Allory, YJ. (2008). Comparative expression of Hedgehog ligands at different stages of prostate carcinoma progression. *Pathol*, 216(4):460-740.

- Balbous**, A., Renoux, B., Cortes, U., Milin, S., Guilloteau, K., Legigan, T., Rivet, P., Boissonnade, O., Martin, S., Tripiana, C., Wager, M., Bensadoun, R.J., Papot, S., and Karayan-Tapon, L. (2014). Selective release of a cycloamine glucuronide prodrug toward stem-like cancer cell inhibition in glioblastoma. *Mol Cancer Ther*, 13(9):2159-2169.
- Barnes**, E.A., Kong, M., Ollendorff, V., and Donoghue, D.J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J*, 20(9):2214-2223.
- Barr**, F.G., Gallili, N., Holich, J., Biegel, J.A., Rovera, G., and Emanuel, B.S. (1993). Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumor alveolar rhabdomyosarcomas. *Nat. Genet* 3, 113-117.
- Barr**, F.G., Fitzgerald, J.C., Ginsberg, J.P., Vanella, M.L., Davis, R.J., and Bennicelli, J.L. (1999). Predominant expression of alternative PAX3 and PAX7 forms in myogenic and neural tumor cell lines. *Cancer Res*, 59: 5443-5448.
- Barrandon**, Y., and Green, H. (1985). Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(16):5390-5394.
- Barrandon**, Y., and Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(8):2302-2306.
- Baruch**, M., Hertzog, B.B., Ravins, M., Anand, A., Cheng, C.Y., Biswas, D., Tirosh, B., and Hanski, E. (2014). Induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response constitutes a pathogenic strategy of group A streptococcus. *Front Cell Infect Microbiol*, 4:105.
- Beauchamp**, E.M., Ringer, L., Bulut, G., Sajwan, K.P., Hall, M.D., Lee, Y.C., Peaceman, D., Ozdemirli, M., Rodriguez, O., Macdonald, T.J., Albanese, C., Toretsky, J.A., and Uren, A. (2011). Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. *J Clin Invest*, 121(1):148-160.
- Belgacem**, Y.H., and Borodinsky, L.N. (2011). Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(11):4482-4487.
- Betters**, D.M. (2015). Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *J Adv Pract Oncol*, 6(5):435-440.
- Bidlingmaier**, S., Zhu, X., and Liu, B. (2008). The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*, 86(9):1025-1032.
- Binns**, W., James, L.F., Keeler, R.F., and Balls, L.D. (1968). Effects of teratogenic agents in range plants. *Cancer Res*, 28(11):2323-2326.

Blotta, S., Jakubikova, J., Calimeri, T., Roccaro, A.M., Amodio, N., Azab, A.K., Foresta, U., Mitsiades, C.S., Rossi, M., Todoerti, K., Molica, S., Morabito, F., Neri, A., Tagliaferri, P., Tassone, P., Anderson, K.C., and Munshi, N.C. (2012). Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 120(25):5002-5013.

Bora-Singhal, N., Perumal, D., Nguyen, J., and Chellappan, S. (2015). Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia*, 17(7):538-551.

Brastianos, P.K., Horowitz, P.M., Santagata, S., Jones, R.T., McKenna, A., Getz, G., Ligon, K.L., Palescandolo, E., Van Hummelen, P., Ducar, M.D., Raza, A., Sunkavalli, A., Macconail, L.E., Stemmer-Rachamimov, A.O., Louis, D.N., Hahn, W.C., Dunn, I.F., and Beroukhi, R. (2013). Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat. Genet.* 45, 285-289.

Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M., and Riobo, N.A. (2012). Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitam Horm*, 88:55-72.

Bridge, J.A., Liu, J., Weibolt, V., Baker, K.S., Perry, D., Kruger, R., Qualman, S., Barr, F., Sorensen, P., Triche, T., and Suijkerbuijk, R. (2000). Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study. *Genes Chromosomes Cancer*, 27(4):337-344.

Bridge, J.A., Liu, J., Qualman, S.J., Suijkerbuijk, R., Wenger, G., Zhang, J., Wan, X., Baker, K.S., Sorensen, P., and Barr, F.G. (2002). 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 Cancer*, 33(3):310-321.

Brugières, L., Remenieras, A., Pierron, G., Varlet, P., Forget, S., Byrde, V., Bombled, J., Puget, S., Caron, O., Dufour, C., Delattre, O., Bressac-de Paillerets, B., Grill, J. (2012). High frequency of germline SUFU mutations in children with desmoplastic/nodular medulloblastoma younger than 3 years of age. *J Clin Oncol* 30(17):2087-2093.

Brüning, A., Rahmeh, M., and Friese, K. (2013). Nelfinavir and bortezomib inhibit mTOR activity via ATF4-mediated sestrin-2 regulation. *Mol Oncol*, 7(6):1012-1018.

Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., Yu, Q., Ostrom, L., Fordjour, P., Anderson, D.L., Monahan, J.E., Kelleher, J.F., Peukert, S., Pan, S., Wu, X., Maira, S.M., García-Echeverría, C., Briggs, K.J., Watkins, D.N., Yao, Y.M., Lengauer, C., Warmuth, M., Sellers, W.R., and Dorsch, M. (2010). Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med*, 2(51):51ra70.

Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L., and Schiffman, J.D. (2012). The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res*, 2(1):14-30.

Calzada-Wack, J., Schnitzbauer, U., Walch, A., Wurster, K.H., Kappler, R., Nathrath, M., and Hahn, H. (2002). Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma. *Hum Mutat*, 20(3):233-234.

Campbell, L.L., and Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 6(19):2332-2338.

Cao, L., Yu, Y., Bilke, S., Walker, R.L., Mayeenuddin, L.H., Azorsa, D.O., Yang, F., Pineda, M., Helman, L.J., and Meltzer PS. (2010). Genome-wide identification of PAX3-FKHR binding sites in rhabdomyosarcoma reveals candidate target genes important for development and cancer. *Cancer Res*, 70:6497-6508.

Carroll, S.J., and Nodit, L. (2013). Spindle cell rhabdomyosarcoma: a brief diagnostic review and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*, 137(8):1155-1158.

Catenacci, D.V., Junntila, M.R., Karrison, T., Bahary, N., Horiba, M.N., Nattam, S.R., Marsh, R., Wallace, J., Kozloff, M., Rajdev, L., Cohen, D., Wade, J., Sleckman, B., Lenz, H.J., Stiff, P., Kumar, P., Xu, P., Henderson, L., Takebe, N., Salgia, R., Wang, X., Stadler, W.M., de Sauvage, F.J., and Kindler, H.L. (2015). Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol*, 33(36):4284-4292.

Chang, Q., Foltz, W.D., Chaudary, N., Hill, R.P., and Hedley, D.W. (2013). Tumor-stroma interaction in orthotopic primary pancreatic cancer xenografts during hedgehog pathway inhibition. *Int J Cancer*, 133(1):225-234.

Charytonowicz, E., Cordon-Cardo, C., Matushansky, I., and Ziman, M. (2009). Alveolar rhabdomyosarcoma: is the cell of origin a mesenchymal stem cell? *Cancer Lett*, 279(2):126-136.

Chaudary, N., Pintilie, M., Hedley, D., Fyles, A.W., Milosevic, M., Clarke, B., Hill, R.P., and Mackay, H. (2012). Hedgehog pathway signaling in cervical carcinoma and outcome after chemoradiation. *Cancer*, 118(12):3105-3115.

Chen Y., and Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*, 87(3):553-63.

Chen, M.H., Wilson, C.W., Li, Y.J., Law, K.K., Lu, C.S., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C.C., and Chuang, P.T. (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev*, 23(16):1910-1928.

Chen, X., Stewart, E., Shelat, A.A., Qu, C., Bahrami, A., Hatley, M., *et al.* (2013). St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, 24(6):710-724.

Chen, Y., and Jiang, J. (2013). Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res*, 23(2):186-200.

Chen, X., Pappo, A., and Dyer, M.A. (2015). Pediatric solid tumor genomics and developmental plasticity. *Oncogene*, 34(41):5207-5215.

Chiles, M.C., Parham, D.M., Qualman, S.J., Teot, L.A., Bridge, J.A., Ullrich, F., Barr, F.G., and Meyer, W.H. (2004). Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. Sclerosing rhabdomyosarcomas in children and adolescents: a clinicopathologic review of 13 cases from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group and Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol*, 7(6):583-594.

Claudinet, S., Nicolas, M., Oshima, H., Rochat, A., and Barrandon, Y. (2005). Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(41):14677-14682.

Coffin, C.M., Davis, J.L., and Borinstein, S.C. (2014). Syndrome-associated soft tissue tumours. *Histopathology*, 64(1): 68-87.

Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1998). Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science*, 280(5369):1603-1607.

Corbit, K.C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A.R., Stainier, D.Y., and Reiter, J.F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 437:1018-1021.

Costa, J. Real-time PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(5):299-304.

Coulon, A., Flahaut, M., Mühlethaler-Mottet, A., Meier, R., Liberman, J., Balmas-Bourlout, K., Nardou, K., Yan, P., Tercier, S., Joseph, J.M., Sommer, L., and Gross, N. (2011). Functional sphere profiling reveals the complexity of neuroblastoma tumor-initiating cell model. *Neoplasia*, 13(10):991-1004.

Crucis, A., Richer, W., Brugières, L., Bergeron, C., Marie-Cardine, A., Stephan, J.L., Girard, P., Corradini, N., Munzer, M., Lacour, B., Minard-Colin, V., Sarnacki, S., Ranchere-Vince, D., Orbach, D., and Bourdeaut, F. (2015). Rhabdomyosarcomas in children with neurofibromatosis type I: A national historical cohort. *Pediatr Blood Cancer*, 62(10):1733-1738.

Cullen, B.R. (2006). Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther*, 13(6):503-508.

Curran, T., and Ng, J.M. (2008). Cancer: Hedgehog's other great trick. *Nature*, 455(7211):293-294.

Currie, P.D., and Ingham, P.W. (1996). Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature*, 382(6590):452-455.

Danial, C., Sarin, K.Y., Oro, A.E., Chang, A.L. (2016). An Investigator-Initiated Open-Label Trial of Sonidegib in Advanced Basal Cell Carcinoma Patients Resistant to Vismodegib. *Clin Cancer Res*, 22(6):1325-1329.

Dasgupta, R., and Rodeberg, D.A. (2012). Update on rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg*, 21(1):68-78.

Davicioni, E., Anderson, M.J., Finckenstein, F.G., Lynch, J.C., Qualman, S.J., Shimada, H., Schofield, D.E., Buckley, J.D., Meyer, W.H., Sorensen, P.H., and Triche, T.J. (2009). Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol*, 174(2):550-564.

Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lowell, M.A., Biegel, J.A., and Barr, F.G. (1994). Fusion of PAX7 to the FOXO1 by the variant t(1;13) (p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas. *Cancer Res*, 54(11):2869-2872.

De Giovanni, C., Landuzzi, L., Nicoletti, G., Lollini, P.L., and Nanni, P. (2009). Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Future Oncol*, 5(9):1449-1475.

Dejeans, N., Barroso, K., Fernandez-Zapico, M.E., Samali, A., and Chevet E. Novel roles of the unfolded protein response in the control of tumor development and aggressiveness. *Semin Cancer Biol*, 33:67-73.

Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N.P., Guo, G.R., Veelken, H., Engelhardt, M., Mertelsman, R., Kelleher, J.F., Schultz, P., and Warmuth, M. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*, 13(8):944-51. Epub 2007 Jul 15.

Doménech-Sánchez, A., and Vila, J. (2004). Basis, types and application of DNA arrays in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(1):46-54.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7):1417-1430.

Ecke, I., Rosenberger, A., Obenauer, S., Dullin, C., Aberger, F., Kimmina, S., Schweyer, S., and Hahn, H. (2008). Cyclopamine treatment of full-blown Hh/Ptch-associated RMS partially inhibits Hh/Ptch signaling, but not tumor growth. *Mol Carcinog*, 47(5):361-372.

Eichenmüller, M., Hemmerlein, B., von Schweinitz, D., and Kappler, R. (2010). Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma. *Br J Cancer*, 103(1):43-51.

Eimer, S., Dugay, F., Airiau, K., Avril, T., Quillien, V., Belaud-Rotureau, M.A., and Belloc, F. (2012). Cyclopamine cooperates with EGFR inhibition to deplete stem-like cancer cells in glioblastoma-derived spheroid cultures. *Neuro Oncol*, 14(12):1441-1451.

Epstein, E.H. (2008). Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*, 8(10):743-754.

Fernández-Plaza, S., Sevilla, J., and Madero, L. (2004). Tratamiento del càncer en pediatria: estado actual y expectativas futuras. *Pediatr Integral*, VIII(6):501-510.

Ferrari, A., Sultan, I., Huang, T.T., Rodriguez-Galindo, C., Shehadeh, A., Meazza, C., Ness, K.K., Casanova, M., and Spunt, S.L. Soft tissue sarcoma across the age spectrum: a population-based study from the Surveillance Epidemiology and End Results database. *Pediatr Blood Cancer*, 57(6):943-949.

Figueroa-Carbajal, J.J., Cárdenas-Cardós, R., Rivera-Luna, R., and Castellanos-Toledo, A. (2010). Rhabdomyosarcoma, 7 years experience at the National Institute of Pediatrics. *GAMO*, 9(5): 198-207.

Frascella, E., Toffolatti, L., and Rosolen, A. (1988). Normal and rearranged PAX3 expression in human rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 102:104-109.

Friedman, G.K., Cassady, K.A., Beierle, E.A., Markert, J.M., and Gillespie, G.Y. (2012). Targeting pediatric cancer stem cells with oncolytic virotherapy. *Pediatr Res*, 71(4 Pt 2):500-510.

Fu, J., Rodova, M., Roy, S.K., Sharma, J., Singh, K.P., Srivastava, R.K., and Shankar, S. (2013). GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft. *Cancer Lett*, 330(1):22-32.

Gajjar, A.J., Gururangan, S., Qaddoumi, I.A., Packer, R., Goldman, S., Prados, M., Desjardins, A., Fouladi, M., Takebe, N., Li, S., Ellison D.W., Curran, T., Gilbertson, R.J., and Boyett, J.M. (2013). A prospective phase II study to determine the efficacy of GDC 0449 (vismodegib) in adults with recurrent medulloblastoma (MB): A Pediatric Brain Tumor Consortium study (PBTC 25B). *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 2035).

Gallego, S. (2010). Sarcomas de partes blandes. En: Sánchez de Toledo, J. y Ortega, J.J. *Manual práctico de hematología y oncología pediátricas*. España. Ergon: 303-312.

Gatta, G., Botta, L., Rossi, S., Aareleid, T., Bielska-Lasota, M., Clavel, J., Dimitrova, N., Jakab, Z., Kaatsch, P., Lacour, B., Mallone, S., Marcos-Gragera, R., Minicozzi, P., Sánchez-

Pérez, M.J., Sant, M., Santaquilani, M., Stiller, C., Tavilla, A., Trama, A., Visser, O., and Peris-Bonet, R. (2014). EURO CARE Working Group. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol*, 15(1):35-47.

Gjymishka, A., Su, N., and Kilberg, M.S. (2009). Transcriptional induction of the human asparagine synthetase gene during the unfolded protein response does not require the ATF6 and IRE1/XBP1 arms of the pathway. *Biochem J*, 417(3):695-703.

Goebel, G., Berger, R., Strasak, A.M., Egle, D., Müller-Holzner, E., Schmidt, S., Rainer, J., Presul, E., Parson, W., Lang, S., Jones, A., Widschwendter, M., and Fiegl, H. (2012). Elevated mRNA expression of CHAC1 splicing variants is associated with poor outcome for breast and ovarian cancer patients. *Br J Cancer*, 106(1):189-198.

Goetz, S.C., and Anderson, K.V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet*, 11(5):331-44.

Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., Scott, M.P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev*, 10(3):301-312.

Gupta, S., Takebe, N., and Lorusso, P. (2010). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 2(4):237-250.

Hadden, MK. (2013). Hedgehog pathway inhibitors: a patent review (2009-present). *Expert Opin Ther Pat*, 23(3):345-361.

Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A.B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D.J., Gerrard, B., Goldstein, A.M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., and Bale, A.E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6):841-51.

Hahn, H., Wojnowski, L., Zimmer, A.M., Hall, J., Miller, G., and Zimmer, A. (1998). Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med*, 4(5):619-622.

Heppner, G.H., and Miller, B.E. (1983). Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev*, 2(1):5-23.

Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L., and Giannis, A. (2010). Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem*, 18(18):6613-6624.

Hettmer, S., and Wagers, A.J. (2010). Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nat Med*, 16(2):171-173.

Hettmer, S., Li, Z., Billin, A.N., Barr, F.G., Cornelison, D.D., Ehrlich, A.R., Guttridge, D.C., Hayes-Jordan, A., Helman, L.J., Houghton, P.J., Khan, J., Langenau, D.M., Linardic, C.M., Pal, R., Partridge, T.A., Pavlath, G.K., Rota, R., Schäfer, B.W., Shipley, J., Stillman, B., Wexler, L.H., Wagers, A.J., and Keller, C. (2014). Rhabdomyosarcoma: current challenges and their implications for developing therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3;4(11):a025650.

Hetz, C., Chevet, E., and Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12(9):703-719.

Hirotsu, M., Setoguchi, T., Matsunoshita, Y., Sasaki, H., Nagao, H., Gao, H., Sugimura, K., and Komiya, S. (2009). Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells. *Br J Cancer*, 101(12):2030-2037.

Hogins, J., Crawford, D.C., Zorumski, C.F., and Mennerick, S. (2011). Excitotoxicity triggered by Neurobasal culture medium. *PLoS One*, 6(9):e25633.

Hooper, J.E., and Scott, M.P. (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4):306-317.

Hua, F., Mu, R., Liu, J., Xue, J., Wang, Z., Lin, H., Yang, H., Chen, X., and Hu, Z. (2011). TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion. *J Cell Sci*, 124(Pt 19):3235-3246.

Hua, F., Li, K., Yu, J.J., Lv, X.X., Yan, J., Zhang, X.W., Sun, W., Lin, H., Shang, S., Wang, F., Cui, B., Mu, R., Huang, B., Jiang, J.D., and Hu, Z.W. (2015). TRB3 links insulin/IGF to tumour promotion by interacting with p62 and impeding autophagic/proteasomal degradations. *Nat Commun*, 6:7951.

Humke, E.W., Dorn, K.V., Milenkovic, L., Scott, M.P., and Rohatgi, R. (2010). The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev*, 24(7):670-682.

Hyman, J.M., Firestone, A.J., Heine, V.M., Zhao, Y., Ocasio, C.A., Han, K., Sun, M., Rack, P.G., Sinha, S., Wu, J.J., Solow-Cordero, D.E., Jiang, J., Rowitch, D.H., and Chen, J.K. (2009). Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(33):14132-14137.

Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 15(23):3059-3087.

Jagani, Z., Dorsch, M., and Warmuth, M. (2010). Hedgehog pathway activation in chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle*, 9(17):3449-56.

Jamieson, C., Cortes, J.E., Oehler, V., Baccarani, M., Kantarjian, H.M., Papayannidis, C., Rice, K.N., Zhang, X., Shaik, N., Courtney, R., Levin, W.J., and Martinelli, G. Phase 1 dose-escalation study of PF04449913, an oral Hedgehog (Hh) inhibitor, in patients with select hematologic malignancies. *ASH Annu Meet Abstr*, 118:424.

Jaroszeski, M.J., and Radcliff, G. (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*, 11(1):37-53.

Javelaud, D., Alexaki, V.I., Dennler, S., Mohammad, K.S., Guise, T.A., and Mauviel, A. (2011). TGF- β /SMAD/GLI2 signaling axis in cancer progression and metastasis. *Cancer Res*, 71(17):5606-5610.

Ji, Z., Mei, F.C., Xie, J., and Cheng, X. (2007). Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*, 282(19):14048-14055.

Jo, V.Y., and Fletcher, C.D. (2014). WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*, 46(2):95-104.

Johnson, R.L., Rothman, A.L., Xie, J., Goodrich, L.V., Bare, J.W., Bonifas, J.M., Quinn, A.G., Myers, R.M., Cox, D.R., Epstein, E.H. Jr., and Scott, M.P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, 272(5268):1668-1671.

Johnson, R.W., Nguyen, M.P., Padalecki, S.S., Grubbs, B.G., Merkel, A.R., Oyajobi, B.O., Matrisian, L.M., Mundy, G.R., and Sterling, J.A. (2011). TGF-beta promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. *Cancer Res*, 71(3):822-831.

Joo, J.H., Ueda, E., Bortner, C.D., Yang, X.P., Liao, G., and Jetten, A.M. (2015). Farnesol activates the intrinsic pathway of apoptosis and the ATF4-ATF3-CHOP cascade of ER stress in human T lymphoblastic leukemia Molt4 cells. *Biochem Pharmacol*, 97(3):256-268.

Justilien, V., and Fields, A.P. (2015). Molecular pathways: novel approaches for improved therapeutic targeting of Hedgehog signaling in cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, 21(3):505-513.

Kakanj, P., Reuter, K., Séquaris, G., Wodtke, C., Schettina, P., Frances, D., Zouboulis, C.C., Lanske, B., and Niemann, C. (2013). Indian hedgehog controls proliferation and

differentiation in skin tumorigenesis and protects against malignant progression. *Cell Rep*, 4(2):340-351.

Kasper, M., Regl, G., Frischauf, A.M., and Aberger, F. (2006). Gli transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer*, 42(4):437-445.

Kawabata, N., Ijiri, K., Ishidou, Y., Yamamoto, T., Nagao, H., Nagano, S., Maeda, S., Komiya, S., and Setoguchi, T. (2011). Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth. *39(4):899-906*.

Keeler, R.F. (1969). Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). VII. The structure of the glycosidic alkaloid cycloposine. *Steroids*, 13(5):579-588.

Keeler, R.F. (1970). Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand) X. Cyclopia in rabbits produced by cycloposine. *Teratology*, 3(2):175-180.

Kellenberger, C.J., Epelman, M., Miller, S.F., and Babyn, P.S. (2004). Fast STIR whole-body MR imaging in children. *Radiographics*, 24(5):1317-1330.

Keller, C., Hansen, M.S., Coffin, C.M., and Capecchi, M.R. (2004). Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes Dev*, 18(21):2608-2613.

Kemper, K., Sprick, M.R., de Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S.T., Mehmet, H., Stassi, G., and Medema, J.P. (2010). The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res*, 70(2):719-729.

Kim, J., Kato, M., and Beachy, P.A. (2009). Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(51):21666-21671.

Kim, S., and Tsiokas, L. (2011). Cilia and cell cycle re-entry: more than a coincidence. *Cell Cycle*, 10(16):2683-2690.

Kim, T.J., Lee, J.Y., Hwang, T.K., Kang, C.S., and Choi, Y.J. (2011). Hedgehog signaling protein expression and its association with prognostic parameters in prostate cancer: a retrospective study from the view point of new 2010 anatomic stage/prognostic groups. *J Surg Oncol*, 104(5):472-479.

Kimura, H., Stephen, D., Joyner, A., and Curran, T. (2005). Gli1 is important for medulloblastoma formation in *Ptc1*^{+/-} mice. *Oncogene*, 24(25):4026-4036.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., and van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5):1415-1420.

Kristiansen, K. (2004). Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther*, 103(1):21-80.

Kumar, S., Balczarek, K.A., and Lai, Z.C. (1996). Evolution of the hedgehog gene family. *Genetics*, 142(3):965-972.

Kumar, A., Singh, M., Sharma, M.C., Bakshi, S., and Sharma, B.S. (2014). Pediatric sclerosing rhabdomyosarcomas: a review. *ISRN Oncol*, 2014:640195.

Lahat, G., Lazar, A., and Lev, D. (2008). Sarcoma epidemiology and etiology: potential environmental and genetic factors. *Surg Clin North Am*, 88(3):451-481.

Lam, C.W., Xie, J., To, K.F., Ng, H.K., Lee, K.C., Yuen, N.W., Lim, P.L., Chan, L.Y., Tong, S.F., and McCormick, F. (1999). A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene*, 18(3):833-836.

Lambeth, L.S., and Smith, C.A. (2013). Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol Biol*, 942:205-232.

Lauderdale, J.D., Pasquali, S.K., Fazel, R., van Eeden, F.J., Schauerte, H.E., Haffter, P., and Kuwada, J.Y. (1998). Regulation of netrin-1a expression by hedgehog proteins. *Mol Cell Neurosci*, 11(4):194-205.

Lauth, M., Bergström, A., Shimokawa, T., and Toftgård, R. (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(20):8455-8460.

Lawrence, W. Jr., Hays, D.M., Heyn, R., Tefft, M., Crist, W., Beltangady, M., Newton, W. Jr., and Wharam, M. (1987). Lymphatic metastases with childhood rhabdomyosarcoma. A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer*, 60(4):910-915.

Lee, J., Jeong, S., Lee, C.R., Ku, C.R., Kang, S.W., Jeong, J.J., Nam, K.H., Shin, D.Y., Chung, W.Y., Lee, E.J., and Jo, Y.S. (2015). GLI1 Transcription Factor Affects Tumor Aggressiveness in Patients With Papillary Thyroid Cancers. *Medicine (Baltimore)*, 94(25):e998.

Lee, K.M., Han, W., Kim, J.B., Shin, I., Ko, E., Park, I.A., Lee, D.S., Oh, K., and Noh, D.Y. (2012). The CD49d+/high subpopulation from isolated human breast sarcoma spheres possesses tumor-initiating ability. *Int J Oncol*, 40(3):665-672.

- Lei, J., Fan, L., Wei, G., Chen, X., Duan, W., Xu, Q., Sheng, W., Wang, K., and Li, X. (2015).** Gli-1 is crucial for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer. *Tumour Biol*, 36(4):3119-3126.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007).** Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67(3):1030-1037.
- Li, H., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Claypool, K., and Tang, D.G. (2008).** PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res*, 68(6):1820-1825.
- Li, X., Zhang, K., and Li, Z. (2011).** Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol*, 4:8.
- Li, Q., Lex, R.K., Chung, H., Giovanetti, S.M., Ji, Z., Ji, H., Person, M.D., Kim, J., and Vokes, S.A. (2016).** The Pluripotency Factor NANOG Binds to GLI Proteins and Represses Hedgehog-mediated Transcription. *J Biol Chem*, 291(13):7171-82.
- Lin, T.L., and Matsui, W. (2012).** Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development. *WOnco Targets Ther*, 5:47-58.
- Lipinski, R.J., Hutson, P.R., Hannam, P.W., Nydza, R.J., Washington, I.M., Moore, R.W., Girdaukas, G.G., Peterson, R.E., and Bushman W. (2008).** Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. *Toxicol Sci*, 104(1):189-97.
- Liu, T.J., Sun, B.C., Zhao, X.L., Zhao, X.M., Sun, T., Gu, Q., Yao, Z., Dong, X.Y., Zhao, N., and Liu, N. (2013).** CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 32(5):544-53.
- Liu, Q., Sheng, W., Dong, M., Dong, X., Dong, Q., and Li, F. (2015).** Gli1 promotes transforming growth factor-beta1- and epidermal growth factor-induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Surgery*, 158(1):211-24.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25(4):402-8.
- López-Martín, J.A.** Sociedad Española de Oncología Médica [sitio web]. Madrid. [consulta: 18 marzo 2016]. Disponible en: <http://www.seom.org>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265-75.

- Mahajan**, P., Leavey, P.J., and Galindo, R.L. (2015). PAX genes in childhood oncogenesis: developmental biology gone awry? *Oncogene*, 34(21):2681-9.
- Manley**, E. Jr., and Waxman, D.J. (2014). H460 non-small cell lung cancer stem-like holoclones yield tumors with increased vascularity. *Cancer Lett*, 346(1):63-73.
- Mann**, R.K., and Beachy, P.A. (2004). Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem*, 73:891-923.
- Mao**, J., Ligon, K.L., Rakhlin, E.Y., Thayer, S.P., Bronson, R.T., Rowitch, D., McMahon, A.P. (2006). A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res*, 66(20):10171-10178.
- Marett-Nielsen**, K. (2014). Prognostic factors in soft tissue sarcoma. *Danish Medical Journal* 2014; 61(11):B4957.
- Marini**, K.D., Payne, B.J., Watkins, D.N., and Martelotto, L.G. (2011). Mechanisms of Hedgehog signalling in cancer. *Growth Factors*, 29(6):221-234.
- Martinelli**, G., Oehler, V.G., Papayannidis, C., Courtney, R., Shaik, M.N., Zhang, X., O'Connell, A., McLachlan, K.R., Zheng, X., Radich, J., Baccarani, M., Kantarjian, H.M., Levin, W.J., Cortes, J.E., and Jamieson, C. (2015). Treatment with PF-04449913, an oral smoothed antagonist, in patients with myeloid malignancies: a phase 1 safety and pharmacokinetics study. *Lancet Haematol*, 2(8):e339-346.
- Maurer**, H.M., Beltangady, M., Gehan, E.A., Crist, W., Hammond, D., Hays, D.M., et al. (1988). The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report. *Cancer*, 61(2):209-220.
- McMahon**, A.P., Ingham, P.W., and Tabin, C.J. (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*, 53:1-114.
- McMillan**, R., and Matsui, W. (2012). Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 18(18):4883-4888.
- Memmi**, E.M., Sanarico, A.G., Giacobbe, A., Peschiaroli, A., Frezza, V., Cicalese, A., Pisati, F., Tosoni, D., Zhou, H., Tonon, G., Antonov, A., Melino, G., Pelicci, P.G., and Bernassola, F. (2015). p63 Sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(11):3499-3504.
- Mentzel**, T., and Kuhnen, C. (2006). Spindle cell rhabdomyosarcoma in adults: clinicopathological and immunohistochemical analysis of seven new cases. *Virchows Arch*, 449(5):554-560.

Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J.C., and Mehlen, P. (2009). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol*, 11(6):739-746.

Missiaglia, E., Williamson, D., Chisholm, J., Wirapati, P., Pierron, G., Petel, F., Concordet, J.P., Thway, K., Oberlin, O., Pritchard-Jones, K., Delattre, O., Delorenzi, M., and Shipley, J. PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification. *J Clin Oncol*, 30(14):1670-1677.

Miyoshi, N., Ishii, H., Mimori, K., Takatsuno, Y., Kim, H., Hirose, H., Sekimoto, M., Doki, Y., and Mori, M. (2009). Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. *Br J Cancer*, 101(10):1664-1670.

Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M., and Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res*, 67(22):10631-10634.

Moore, C.B., Guthrie, E.H., Huang, M.T., and Taxman, D.J. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*, 629:141-158.

Morón, F.E., Morriss, M.C., Jones, J.J., and Hunter, J.V. (2004). Lumps and bumps on the head in children: use of CT and MR imaging in solving the clinical diagnostic dilemma. *Radiographics*, 24(6):1655-1674.

Nagao-Kitamoto, H., Nagata, M., Nagano, S., Kitamoto, S., Ishidou, Y., Yamamoto, T., Nakamura, S., Tsuru, A., Abematsu, M., Fujimoto, Y., Yokouchi, M., Kitajima, S., Yoshioka, T., Maeda, S., Yonezawa, S., Komiya, S., and Setoguchi, T. (2015). GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma. *Int J Cancer*, 136(6):1276-1284.

Naini, S., Etheridge, K.T., Adam, S.J., Qualman, S.J., Bentley, R.C., Counter, C.M., and Linardic, C.M. (2008). Defining the cooperative genetic changes that temporally drive alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, 68(23):9583-9588.

Nanta, R., Kumar, D., Meeker, D., Rodova, M., Van Veldhuizen, P.J., Shankar, S., and Srivastava, R.K. (2013). NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2R γ null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. *Oncogenesis*, 2:e42.

Ng, J.M., and Curran, T. (2011). The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(7):493-501.

Niewiadomski, P., Kong, J.H., Ahrends, R., Ma, Y., Humke, E.W., Khan, S., Teruel, M.N., Novitsch, B.G., and Rohatgi, R. (2014). Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell Rep*, 6(1):168-181.

Nilsson, M., Undèn, A.B., Krause, D., Malmqwist, U., Raza, K., Zaphiropoulos, P.G., and Toftgård, R. (2000). Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(7):3438-43.

Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785):795-801.

Oro, A.E. (2007). The primary cilia, a 'Rab-id' transit system for hedgehog signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 19(6):691-696.

Oustanina, S., Hause, G., and Braun, T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J*, 23(16):3430-9.

Pappo, A.S., and Pratt, C.B. (1997). Soft tissue sarcomas in children. *Cancer Treat Res* 1997; 91: 205-222.

Parham, D.M., and Barr, F.G. (2013). Alveolar rhabdomyosarcoma. In Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F eds. WHO classification of tumours of soft tissue and bone, 4th edn. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 130-132.

Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D.P., Garber, E.A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Tabin, C.J., Blake Pepinsky, R., and Williams, K.P. (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev*, 106(1-2):107-17.

Paulson, V., Chandler, G., Rakheja, D., Galindo, R.L., Wilson, K., Amatruda, J.F., and Cameron, S. (2011). High-resolution array CGH identifies common mechanisms that drive embryonal rhabdomyosarcoma pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 50(6):397-408.

Pedrick, T.J., Donaldson, S.S., and Cox, R.S. (1986). Rhabdomyosarcoma: the Stanford experience using a TNM staging system. *J Clin Oncol*, 4(3):370-378.

Pérez, A., Aguilar-Morente, D., Morales-García, J.A., and Dorado, J. (2008). Cancer stem cells and brain tumors. *Clin Transl Oncol*, 10(5): 262-267.

Peris-Bonet, R., Ruiz Martinez, N., Felipe García, S., Pardo Romaguera, E., and Valero Poveda, S. (2013). Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980–2012. Registro Nacional de Tumores Infantiles (RNTI-SEHOP). Valencia: Universitat de València.

Petrova, E., Rios-Esteves, J., Ouerfelli, O., Glickman, J.F., and Resh, M.D. (2013). Inhibitors of Hedgehog acyltransferase block Sonic Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol*, 9(4):247-249.

Pettigrew, C.A., Aspm E., and Emerson, C.P. Jr. (2014). A new role for Hedgehogs in juxtacrine signaling. *Mech Dev*, 131:137-149.

Philip, R., Heiler, S., Mu, W., Büchler, M.W., Zöller, M., and Thuma, F. (2015). Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer. *Oncotarget*, 10;6(4):2046-2063.

Pinto, N., and Hawkins, D.S. (2015). Second Malignant Neoplasms in Rhabdomyosarcoma: Victims of Our Own Success or an Underlying Genetic Predisposition Syndrome? *Pediatr Blood Cancer*, 63(2):189-190.

Polizio, A.H., Chinchilla, P., Chen, X., Kim, S., Manning, D.R., and Riobo, N.A. (2011). Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem*, 286(22):19589-19596.

Pressey, J.G., Anderson, J.R., Crossman, D.K., Lynch, J.C., and Barr, F.G. (2011). Hedgehog pathway activity in pediatric embryonal rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 57(6):930-938.

Pressey, J.G., Haas, M.C., Pressey, C.S., Kelly, V.M., Parker, J.N., Gillespie, G.Y., and Friedman, G.K. (2013). CD133 marks a myogenically primitive subpopulation in rhabdomyosarcoma cell lines that are relatively chemoresistant but sensitive to mutant HSV. *Pediatr Blood Cancer*, 60(1):45-52.

Pritchard-Jones, K. (1996). Genetics of childhood cancer. *Br Med Bull*, 52(4):704-723.

Ramis, R., Gómez-Barroso, D., Tamayo, I., García-Pérez, J., Morales, A., Pardo Romaguera, E., and López-Abente, G. (2015). Spatial analysis of childhood cancer: a case/control study. *PLoS One*, 10(5):e0127273.

Regenbrecht, C., Welte, Y., Hugel, R., Trefzer, U., Losch, F.O., Adjaye, J., and Walden, P. (2008). Cancer stem cells in melanoma. *Escancermersicalscience*, 2:114.

Reifenberger, J., Wolter, M., Weber, R.G., Megahed, M., Ruzicka, T., Lichter, P., and Reifenberger, G. (1998). Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas

of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*, 58(9):1798-803.

Ren, Y.X., Finckenstein, F.G., Abdueva, D.A., Shahbazian, V., Chung, B., Weinberg, K.I., Triche, T.J., Shimada, H., and Anderson, M.J. (2008). Mouse mesenchymal stem cells expressing PAX-FKHR form alveolar rhabdomyosarcomas by cooperating with secondary mutations. *Cancer Res*, 68(16):6587-6597.

Renault, M.A., Roncalli, J., Tongers, J., Thorne, T., Klyachko, E., Misener, S., Volpert, O.V., Mehta, S., Burg, A., Luedemann, C., Qin, G., Kishore, R., and Losordo, D.W. (2010). Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 49(3):490-498.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*, 175(1):1-13.

Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M.P. (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 317(5836):372-376.

Rohatgi, R., Milenkovic, L., Corcoran, R.B., and Scott, M.P. (2009). Hedgehog signal transduction by Smoothed: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(9):3196-201.

Roma, J., Almazán-Moga, A., Sánchez de Toledo, J., and Gallego, S. (2012). Notch, wnt, and hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network. *Sarcoma*, 2012:695603.

Rominger, C.M., Bee, W.L., Copeland, R.A., Davenport, E.A., Gilmartin, A., Gontarek, R., Hornberger, K.R., Kallal, L.A., Lai, Z., Lawrie, K., Lu, Q., McMillan, L., Truong, M., Tummino, P.J., Turunen, B., Will, M., Zuerche, W.J., and Rominger, D.H. (2009). Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothed receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 329(3):995-1005.

Rothenberg, A.J., and Pilz, C.G. (1966). Unusual Manifestations of Rhabdomyosarcoma. *Arch Intern Med*, 118(5):446-448.

Rubin, L.L., and de Sauvage, F.J. (2006). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5(12):1026-1033.

Rudzinski, E.R., Anderson, J.R., Hawkins, D.S., Skapek, S.X., Parham, D.M., and Teot, L.A. (2015). The World Health Organization Classification of Skeletal Muscle Tumors in Pediatric Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med*, 139(10):1281-1287.

Ruiz i Altaba, A. (2011). Hedgehog signaling and the Gli code in stem cells, cancer, and metastases. *Sci Signal*, 4(200):pt9.

Ryan, K.E., and Chiang, C. (2012). Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J Biol Chem*, 287(22):17905-17913.

Santini, R., Vinci, M.C., Pandolfi, S., Penachioni, J.Y., Montagnani, V., Olivito, B., Gattai, R., Pimpinelli, N., Gerlini, G., Borgognoni, L., and Stecca, B. (2012). Hedgehog-Gli signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Stem Cells*, 30(9):1808-1818.

Satheesha, S., Manzella, G., Bovay, A., Casanova, E.A., Bode, P.K., Belle, R., Feuchtgruber, S., Jaaks, P., Dogan, N., Koscielniak, E., and Schäfer, B.W. (2016). Targeting hedgehog signaling reduces self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 35(16):2020-2030.

Saveljeva, S., Cleary, P., Mnich, K., Ayo, A., Pakos-Zebrucka, K., Patterson, J.B., Logue, S.E., Samali, A. (2016). Endoplasmic reticulum stress-mediated induction of SESTRIN 2 potentiates cell survival. *Oncotarget*, 15;7(11):12254-12266.

Scales, S.J., and de Sauvage, F.J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 30(6):303-312.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6):777-786.

Shahi, M.H., Afzal, M., Sinha, S., Eberhart, C.G., Rey, J.A., Fan, X., and Castresana, J.S. (2010). Regulation of sonic hedgehog-Gli1 downstream target genes PTCH1, Cyclin D2, Plakoglobin, PAX6 and NKX2.2 and their epigenetic status in medulloblastoma and astrocytoma. *BMC Cancer*, 10:614.

Sharma, N., Nanta, R., Sharma, J., Gunewardena, S., Singh, K.P., Shankar, S., Srivastava, R.K. (2015). PI3K/AKT/mTOR and sonic hedgehog pathways cooperate together to inhibit human pancreatic cancer stem cell characteristics and tumor growth. *Oncotarget*, 6(31):32039-32060.

Sharp, R., Recio, J.A., Jhappan, C., Otsuka, T., Liu, S., Yu, Y., Liu, W., Anver, M., Navid, F., Helman, L.J., DePinho, R.A., and Merlino, G. (2002). Synergism between INK4a/ARF inactivation and aberrant HGF/SF signalling in rhabdomyosarcomagenesis. *Nat Med*, 8(11):1276-1278.

Shern, J.F., Chen, L., Chmielecki, J., Wei, J.S., Patidar, R., Rosenberg, M., *et al.* (2014). Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discov*, 4(2):216-31.

Skapek, S.X., Anderson, J., Barr, F.G., Bridge, J.A., Gastier-Foster, J.M., Parham, D.M., Rudzinski, E.R., Triche, T., and Hawkins, D.S. (2013). PAX-FOXO1 fusion status drives unfavorable outcome for children with rhabdomyosarcoma: a children's oncology group report. *Pediatr Blood Cancer*, 60(9):1411-1417.

Skoda, J., Nunukova, A., Loja, T., Zambo, I., Neradil, J., Mudry, P., Zitterbart, K., Hermanova, M., Hampl, A., Sterba, J., and Veselska, R. (2016). Cancer stem cell markers in pediatric sarcomas: Sox2 is associated with tumorigenicity in immunodeficient mice. *Tumour Biol.* [Epub ahead of print]

Stanton, B.Z., Peng, L.F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J.L., Taveras, K.M., Hyman, J.M., Lee, S.W., Koehler, A.N., Chen, J.K., Fox, J.L., Mandinova, A., Schreiber, S.L. (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol*, 5(3):154-156.

Stecca, B., Mas, C., Clement, V., Zbinden, M., Correa, R., Piguet, V., Beermann, F., and Ruiz i Altaba, A. (2007). Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(14):5895-5900.

Steliarova-Foucher, E., Stiller, C., Lacour, B., and Kaatsch, P. (2005). International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer* 2005; 103(7):1457-1467.

Stout, A.P. (1946). Rhabdomyosarcoma of the Skeletal Muscles. *Ann Surg.* 1946 Mar; 123(3):447-472.

Sun, L.S., Li, X.F., and Li, T.J. (2008). PTCH1 and SMO gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *J Dent Res*, 87(6):575-9.

Sun, X., Guo, W., Shen, J.K., Mankin, H.J., Hornicek, F.J., and Duan, Z. (2015). Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma*, 2015:232010.

Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 13(3):184-190.

Taipale, J., and Beachy, P.A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 411(6835):349-354.

Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*, 418(6900):892-897.

Tan, L., Sui, X., Deng, H., and Ding, M. (2011). Holoclone forming cells from pancreatic cancer cells enrich tumor initiating cells and represent a novel model for study of cancer stem cells. *PLoS One*, 6(8):e23383.

Tanjore, H., Cheng, D.S., Degryse, A.L., Zoz, D.F., Abdolrasulnia, R., Lawson, W.E., and Blackwell, T.S. (2011). Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 286(35):30972-30980.

Thibert, C., Teillet, M.A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N.M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science*, 301(5634):843-846.

Teglund, S., and Toftgård, R. (2010). Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1805(2):181-208.

Tostar, U., Malm, C.J., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G., Toftgård, R., and Undén, A.B. (2006). Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol*, 208(1):17-25.

Tostar, U., Toftgård, R., Zaphiropoulos, P.G., and Shimokawa, T. (2010). Reduction of human embryonal rhabdomyosarcoma tumor growth by inhibition of the hedgehog signaling pathway. *Genes Cancer*, 1(9):941-151.

Varnat, F., Duquet, A., Malerba, M., Zbinden, M., Mas, C., Gervaz, P., and Ruiz i Altaba, A. (2009). Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*, 1(6-7):338-351.

Velasco-Velázquez, M.A., Homsí, N., De LA Fuente, M., and Pestell, R.G. (2012). Breast cancer stem cells. *Int J biochem Cell Biol*, 44(4): 573-577.

Vermes, I., Haanen, C., and Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 243(1-2):167-190.

Vestergaard, J., Lind-Thomsen, A., Pedersen, M.W., Jarmer, H.O., Bak, M., Hasholt, L., Tommerup, N., Tümer, Z., Larsen, L.A. (2008). GLI1 is involved in cell cycle regulation and proliferation of NT2 embryonal carcinoma stem cells. *DNA Cell Biol*, 27(5):251-256.

Visavader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, 8:755-768.

Vorechovský, I., Tingby, O., Hartman, M., Strömberg, B., Nister, M., Collins, V.P., and Toftgård, R. (1997). Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene*, 15(3):361-366.

Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 273(5275):613-22.

Wachtel, M., Dettling, M., Koscielniak, E., Stegmaier, S., Treuner, J., Simon-Klingenstein, K., Bühlmann, P., Niggli, F.K., and Schäfer, B.W. (2004). Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Res*, 64(16):5539-5545.

Walter, D., Satheesha, S., Albrecht, P., Bornhauser, B.C., D'Alessandro, V., Oesch, S.M., Rehrauer, H., Leuschner, I., Koscielniak, E., Gengler, C., Moch, H., Bernasconi, M., Niggli, F.K., and Schäfer, B.W. (2011). CD133 positive embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population is enriched in rhabdospheres. *PLoS One*, 6(5):e19506.

Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059):1081-1086.

Wang, Q.T., and Holmgren, R.A. (2000). Nuclear import of cubitus interruptus is regulated by hedgehog via a mechanism distinct from Ci stabilization and Ci activation. *Development*, 127(14):3131-3139.

Wennemers, M., Bussink, J., Scheijen, B., Nagtegaal, I.D., van Laarhoven, H.W., Raleigh, J.A., Varia, M.A., Heuvel, J.J., Rouschop, K.M., Sweep, F.C., and Span, P.N. (2011). Tribbles homolog 3 denotes a poor prognosis in breast cancer and is involved in hypoxia response. *Breast Cancer Res*, 13(4):R82.

Williamson, D., Missiaglia, E., de Reyniès, A., Pierron, G., Thuille, B., Palenzuela, G., Thway, K., Orbach, D., Laé, M., Fréneaux, P., Pritchard-Jones, K., Oberlin, O., Shipley, J., and Delattre, O. (2010). Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 28(13):2151-2158.

Xiang, W., Jiang, T., Guo, F., Gong, C., Yang, K., Wu, Y., Huang, X., Cheng, W., Xu, K. (2014). Hedgehog pathway inhibitor-4 suppresses malignant properties of chondrosarcoma cells by disturbing tumor ciliogenesis. *Oncol Rep*, 32(4):1622-1630.

Xu, Y., Chenna, V., Hu, C., Sun, H.X., Khan, M., Bai, H., Yang, X.R., Zhu, Q.F., Sun, Y.F., Maitra, A., Fan, J., and Anders, R.A. (2012). Polymeric nanoparticle-encapsulated hedgehog pathway inhibitor HPI-1 (NanoHHI) inhibits systemic metastases in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 18(5):1291-1302.

Yang, D., Gao, L., Wang, T., Qiao, Z., Liang, Y., and Zhang, P. (2014). Hypoxia triggers endothelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis via induction of VLDL receptor. *FEBS Lett*, 588(23):4448-4456.

Yang, N., Zhou, T.C., Lei, X.X., Wang, C., Yan, M., Wang, Z.F., Liu, W., Wang, J., Ming, K.H., Wang, B.C., Xu, B.L., and Liu, Q. (2016). Inhibition of Sonic Hedgehog Signaling Pathway by Thiazole Antibiotic Thiostrepton Attenuates the CD44+/CD24-Stem-Like Population and Sphere-Forming Capacity in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 38(3):1157-1170.

Yamanaka, H., Oue, T., Uehara, S., and Fukuzawa, M. (2011). Hedgehog signal inhibitor forskolin suppresses cell proliferation and tumor growth of human rhabdomyosarcoma xenograft. *J Pediatr Surg*, 46(2):320-325.

Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J.C., Rubin, L.L., and de Sauvage, F.J. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, 455(7211):406-410.

Yokoyama, S., and Asahara, H. (2011). The myogenic transcriptional network. *Cell Mol Life Sci*, 68(11):1843-1849.

Yusuf, F., and Brand-Saber, B. (2006). The eventful somite: Patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat Embryol (Berl)*, 211 Suppl 1:21-30.

Zhao, Y., Tong, C., and Jiang, J. (2007). Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature*, 450(7167):252-258.

Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C.H., Fereshteh, M., Abrahamsson, A., Blum, J., Kwon, H.Y., Kim, J., Chute, J.P., Rizzieri, D., Munchhof, M., VanArsdale, T., Beachy, P.A., and Reya, T. (2009). Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*, 458(7239):776-779.

REFERENCIAS

Zhou, Z.H., Ping, Y.F., Yu, S.C., Yi, L., Yao, X.H., Chen, J.H., Cui, Y.H., and Bian, X.W. (2009). A novel approach to the identification and enrichment of cancer stem cells from a cultured human glioma cell line. *Cancer Lett*, 281(1):92-99.

Zibat, A., Missiaglia, E., Rosenberger, A., Pritchard-Jones, K., Shipley, J., Hahn, H., Fulda, S. (2010). Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 29(48):6323-6330.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Autenticación de las líneas celulares



HUMAN CELL LINE STR PROFILE

DATE:
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):
LABORATORY:

01.04.2016
M110
Genomics Core Facility.
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.
28029 Madrid
00 34 91 585 44 74 (Tel.) 00 34 91 585 44 01 (Fax)
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:
Sample submitted by:

RH30 (ATCC® CRL-2061)
Pilar Mancera Aroca
Hospital Vall D' Hebron
pilar.mancera@vhir.org

STR PROFILE DATA:

STR PROFILE OBTAINED	EXPECTED	EXPECTED
D5S818	12,13	12,13
D13S317	11	11
D7S820	10	10
D16S539	12	12
vWA	17,18	17,18
TH01	9,9.3	9,9.3
TPOX	8,11	8,11
CSF1PO	10,11	10,11
D21S11	29,31.2	
Amelogenin	X,Y	X,Y
RESULTS		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

TEST RESULTS:

Query profiles were sent against ATCC database

Cell lines with $\geq 80\%$ match are considered to be related (i.e. common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description
- The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
- No human STRs are amplified



HUMAN CELL LINE STR PROFILE

DATE:
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):
LABORATORY:

01.04.2016
M110
Genomics Core Facility.
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.
28029 Madrid
00 34 91 585 44 74 (Tel.) 00 34 91 585 44 01 (Fax)
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:
Sample submitted by:

RH4 (RH-41)
Pilar Mancera Aroca
Hospital Vall d' Hebron
pilar.mancera@vhir.org

STR PROFILE DATA:

STR PROFILE OBTAINED	EXPECTED	
D5S818	10,13	10,13
D13S317	8,9	8,9
D7S820	10,11	10,11
D16S539	12,13	12,13
vWA	16,17,18	16,18
TH01	7,9,3	7,9,3
TPOX	8,11	8,11
CSF1PO	11,12	11,12
D21S11	29,31	
Amelogenin	X	X
RESULTS		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

TEST RESULTS:

Query profiles were sent against DSMZ database

Cell lines with ≥80% match are considered to be related (i.e. common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description
The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
No human STRs are amplified



HUMAN CELL LINE STR PROFILE

DATE:
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):
LABORATORY:

01.04.2016
M110
Genomics Core Facility.
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.
28029 Madrid
00 34 91 585 44 74 (Tel.) 00 34 91 585 44 01 (Fax)
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:
Sample submitted by:

RD (ATCC® CCL-136)
Pilar Mancera Aroca
Hospital Vall D' Hebron
pilar.mancera@vhir.org

STR PROFILE DATA:

STR PROFILE OBTAINED		EXPECTED
D5S818	11	11
D13S317	13	13
D7S820	8,12	8,12
D16S539	10,11	10,11
vWA	18	18
TH01	9,3	9,3
TPOX	9	9
CSFIPO	10,11	10,11
D21S11	28,29	
Amelogenin	X	X
RESULTS		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

TEST RESULTS:

Query profiles were sent against ATCC database

Cell lines with ≥80% match are considered to be related (i.e common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description
- The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
- No human STRs are amplified



HUMAN CELL LINE STR PROFILE

DATE:
MICROSATELLITE RUN NUMBER (pdf attached):
LABORATORY:

01.04.2016
M110
Genomics Core Facility.
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM.
28029 Madrid
00 34 91 585 44 74 (Tel.) 00 34 91 585 44 01 (Fax)
genomica@iib.uam.es

Cell-line description according to customer:
Sample submitted by:

HTB-82(ATCC® HTB-82)
Pilar Mancera Aroca
Hospital Vall D' Hebron
pilar.mancera@vhir.org

STR PROFILE DATA:

STR PROFILE OBTAINED		EXPECTED
D5S818	12	12
D13S317	11,12	11,12
D7S820	8,10	8,10
D16S539	11,12	11,12
vWA	15,17	15,17
TH01	8,9,3	8,9,3
TPOX	8,9	8,9
CSF1PO	10,13	10,13
D21S11	28,30	
Amelogenin	X	X
RESULTS		
Number of shared alleles: 16		
Number of alleles in database: 16		
Percent match: 100%		

TEST RESULTS:

Query profiles were sent against ATCC database

Cell lines with ≥80% match are considered to be related (i.e common ancestor).

Cell lines with 55%-80% match require further profiling

- ✓ The submitted sample profile is human and matches 100% with customer cell line description
- The submitted sample profile is human, but does not match customer cell line description
- No human STRs are amplified

ANEXO 2. Publicaciones

Publicaciones aceptadas:

1. Roma J., Masià A., **Almazán-Moga A.**, Rebull M., Velasco P., Gallego S., Sánchez de Toledo J. (2012). Chromosomal translocations in soft tissue sarcomas: from molecular biology to clinical application. *An Pediatr (Barc)*, 76(2):103.e1-7.
2. Roma J., **Almazán-Moga A.**, Sánchez de Toledo J., Gallego S. (2012). Notch, wnt, and hedgehog pathways in rhabdomyosarcoma: from single pathways to an integrated network. *Sarcoma*, 2012:695603.
3. Masià A., **Almazán-Moga A.**, Velasco P., Reventós J., Torán N., Sánchez de Toledo J., Roma J., Gallego S. (2012). Notch-mediated induction of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells. *Br J Cancer*, 107(8):1374-1383.
4. Soriano A., Jubierre L., **Almazán-Moga A.**, Molist C., Roma J., Sánchez de Toledo JS., Gallego S., Segura MF. (2013). microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacol Res*, 75:3-14.
5. Roma J., **Almazán-Moga A.**, Sánchez de Toledo J., Gallego S., Segura MF. (2014). miRNA-Targeted Therapies in the Most Prevalent Pediatric Solid Tumors. En Sarkar FH., *MicroRNA Targeted Cancer Therapy* (pp. 239-263). Springer.
6. **Almazán-Moga A.**, Roma J., Molist C., Vidal I., Jubierre L., Soriano A., Segura MF., Llorca A., Sánchez de Toledo J., Gallego S. (2014). Optimization of Rhabdomyosarcoma disseminated disease assessment by flow cytometry. *Cytometry A*, 85(12):1020-1029.
7. Soriano A., París-Coderch L., Jubierre L., Martínez A., Zhou X., Piskareva O., Bray I., Vidal I., **Almazán-Moga A.**, Molist C., Roma J., Bayascas JR., Casanovas O., Stallings RL., Sánchez de Toledo J., Gallego S., Segura MF. (2016). MicroRNA-497 impairs the growth of chemoresistant neuroblastoma cells by targeting cell cycle, survival and vascular permeability genes. *Oncotarget*, 7(8):9271-9287.

8. Jubierre L., Soriano A., Planells-Ferrer L., París-Coderch L., Tenbaum SP., Romero OA., Moubarak RS., **Almazán-Moga A.**, Molist C., Roma J., Navarro S., Noguera R., Sánchez-Céspedes M., Comella JX., Palmer HG., Sánchez de Toledo J., Gallego S., Segura MF. (2016). BRG1/SMARCA4 is essential for neuroblastoma cell viability through modulation of cell death and survival pathways. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2016.50.

Publicaciones en revisión:

1. **Almazán-Moga A.**, et al. Ligand-dependent Hedgehog pathway activation in Rhabdomyosarcoma: the oncogenic role of the ligands. (*Oncogene*; ONC-2016-01729).
2. **Almazán-Moga A.**, et al. Hedgehog pathway hampers sphere and holoclone formation in Rhabdomyosarcoma. (*Stem Cells International*; 7507380).

