

# **PROTECCIÓN DIFERENCIAL FRENTE A MEDULOBLASTOMA EN NIÑOS CON SÍNDROME DE DOWN COMO BASE DE UNA TERAPIA ANTITUMORAL BASADA EN miRNAs**

## **Investigadoras:**

Dra. Águeda M. Tejera

Dra. Cristina Sánchez

Dra. María J. Delgado Martos

Dra. Blanca López Ibor

Dra. Marta Osuna

## **DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

El Síndrome de Down (SD) se produce por la presencia de un cromosoma 21 (HSA21) extra (trisomía 21) de forma total o parcial, por trisomía completa (95% casos), por mosaicismos (1-3%) o por translocaciones robertsonianas no balanceadas (2-4%) entre el HSA21 y otros cromosomas (fundamentalmente 14, 15, 21 o 22). Es la causa genética más frecuente de retraso mental. En España en 2016 nacieron 4,41 niños con SD/10.000 recién nacidos vivos (181 casos), con una incidencia en progresiva disminución debido a su aborto tras el diagnóstico prenatal. Se estima que en España a día de hoy hay 35.000 personas con SD.

Esta trisomía determina muchas características clínicas como algunos rasgos faciales, menor desarrollo intelectual, talla baja y más facilidad para infecciones, entre otras. El riesgo de desarrollar cáncer en las personas afectas de SD es similar o levemente inferior frente a la población general. Lo llamativo es que presentan un patrón de desarrollo de tumores muy peculiar y escasamente explicado en la actualidad. Por un lado, tienen una clara predisposición al desarrollo de leucemias agudas (linfoblásticas y mieloblásticas) en edad infantil y algunos tumores específicos como tumores germinales (extra e intracraneales) y retinoblastomas. Por el contrario, tienen una llamativa disminución de la incidencia de la gran mayoría de tumores sólidos. Algunos tumores como el cáncer de mama, meduloblastoma, neuroblastoma y nefroblastoma son excepcionales. Sin embargo, padecen otros tumores con la misma incidencia que el resto de la población.

A pesar de ello, son pocos los estudios moleculares desarrollados para dar respuesta a este enigma. La identificación de las causas subyacentes que sirven de protección frente al desarrollo de tumores de tan variada estirpe puede ser fundamental en comprender la fisiopatología y, potencialmente, identificar genes fundamentales en el desarrollo del cáncer. Con ello, además se podrá avanzar en el desarrollo de terapias eficaces en la población general afectada de cáncer.

Con el objetivo de determinar las causas que subyacen a esta protección, nuestro grupo realizó una profunda revisión bibliográfica (Osuna-Marco MP, et al. Ten Reasons Why People With Down Syndrome are Protected From the Development of Most Solid Tumors - A Review. Front

Genet. 2021 Nov 5;12:749480. doi: 10.3389/fgene.2021.749480.) en la que explicamos hasta 10 causas que intervienen en la protección frente a determinados tumores en las personas con SD.

Actualmente nuestro estudio se centra concretamente en investigar la protección de estas personas frente al desarrollo de meduloblastoma secundario mediante el estudio de la desregulación de los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs forman parte de una clase de moléculas de ácidos nucleicos, los llamados RNAs pequeños o cortos que tienen la capacidad de regular la expresión de múltiples genes y, por lo tanto, son importantes actores en el desarrollo del cáncer. Las personas con síndrome de Down por trisomía tienen al menos 5 miRNAs sobreexpresados, lo que conlleva una desregulación de un gran número de genes.

Debido a la amplitud de acción de estas moléculas, un mismo miRNA puede ejercer acciones pro-tumorales sobre un tipo de células y acciones anti-tumorales sobre otro tipo de células, lo que podría explicar el patrón de tumores tan característico de las personas con SD.

El objetivo central de nuestro proyecto es investigar los miRNAs implicados en la protección contra el meduloblastoma (MB) que muestran los pacientes con SD, con el fin de encontrar una diana potencial para desarrollar una terapia génica antitumoral para MB. Una vez identificados, estudiaremos en células tumorales las diferencias de expresión de esos miRNAs e investigaremos el efecto de los cambios en los niveles de expresión de estos miRNAs sobre el fenotipo tumoral de estas células. Una vez seleccionados los miRNAs de interés desarrollaremos una terapia avanzada con el fin de modular adecuadamente los niveles de expresión de esos miRNAs en tumores con el fin de reducir su agresividad, y así mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes.

## **JUSTIFICACIÓN CIENTÍFICA DE LA INVESTIGACIÓN**

Cada año se registran en España unos 1.500 casos nuevos de cáncer en niños menores de 15 años. De ellos, del 15 al 20% corresponden a tumores del Sistema Nervioso Central (SNC). El meduloblastoma es el tumor maligno de sistema nervioso central más frecuente en la infancia, con una incidencia aproximada de 5 casos/millón de personas/año, lo que supone unos 40 casos de meduloblastoma nuevos al año en España en niños de 0-14 años.

Su importancia radica en la importante morbimortalidad que conlleva esta enfermedad. Tiene una supervivencia global a los 5 años del 60-80% dependiendo del grupo de riesgo. Entre los supervivientes y a pesar de los tratamientos actuales disponibles, la enfermedad y el tratamiento de la misma producen importantes secuelas en los niños: déficits neurológicos, déficits endocrinológicos, disminución del crecimiento, disminución del coeficiente intelectual, segundos tumores e infertilidad. Por todo ello, esta enfermedad está necesitada de aproximaciones terapéuticas novedosas y menos dañinas.

En los últimos 10 años, la biología molecular ha supuesto una revolución en comprender la fisiopatología del meduloblastoma y ha permitido subclasificar esta enfermedad en diferentes grupos en función de alteraciones genéticas y moleculares presentes. Esta nueva clasificación tiene implicaciones tanto pronósticas como terapéuticas, permitiendo en la actualidad ajustar el tratamiento en cada paciente según las alteraciones moleculares de su tumor.

## **FINALIDAD Y OBJETIVOS**

Con el descubrimiento de los mecanismos moleculares que protegen a las personas con Síndrome de Down de desarrollar meduloblastoma, el objetivo central de nuestro proyecto es entender mejor la fisiopatología del meduloblastoma con el fin de encontrar una diana potencial para desarrollar una terapia antitumoral más específica, e idealmente menos dañina, frente al meduloblastoma.

De acuerdo con este objetivo central, en una primera fase, nos centraremos en el estudio de los miRNAs mencionados previamente para investigar el rol que desempeñan en la significativa reducción de la incidencia de MB observada en niños con SD. Por lo tanto, proponemos los siguientes objetivos específicos para alcanzar nuestro objetivo:

**Objetivo #1.** Estudiar los niveles de expresión de los miRNAs localizados en el HSA21 en dos líneas celulares de MB de diferente agresividad y seleccionar los miRNAs de interés.

**Objetivo #2.** Evaluar los cambios en el fenotipo tumoral de estas líneas de MB debidos a la sobreexpresión de estos miRNAs, mediante infección con virus rAAV, y verificación de los cambios mediante expresión de inhibidores.

**Objetivo #3.** Evaluar los niveles de expresión de los miRNAs identificados en muestras de pacientes para corroborar los resultados

**Objetivo #4.** Ensayo piloto de terapia génica con los rAAV que resulten beneficiosos en modelos murinos de MB y de SD (Ts65Dn).

## **CENTRO DONDE SE VA A LLEVAR A CABO EL PROYECTO**

Esta investigación se está desarrollando en el Grupo de Biología de Envejecimiento del Instituto de Investigaciones Biosanitarias de la Universidad Francisco de Vitoria (UFV) de Madrid, en colaboración con el Hospital Universitario HM Montepíncipe. En ella participan Marta Osuna Marco, que está desarrollando su tesis doctoral en este tema, dirigida por las doctoras Águeda M. Tejera y Blanca López-Ibor. Además, contamos con un equipo constituido por las doctoras Cristina Sánchez y María Jesús Delgado, con una amplia experiencia investigadora en este ámbito de conocimiento.

## **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

Brevemente, el estudio incluirá análisis in vitro de líneas tumorales frente a las cuales están protegidas las personas con Síndrome de Down y de tejidos humanos de personas con Síndrome de Down. En el primer caso, se utilizarán líneas celulares de meduloblastoma para inicialmente detectar y analizar la expresión de los miRNAs de interés y, en un segundo tiempo, comprobar los cambios en el fenotipo tumoral de las líneas de MB al modificar la expresión de esos miRNAs. Además, analizaremos las alteraciones en la expresión de los principales genes y vías moleculares implicadas al realizar estos tratamientos. al modificar la expresión de esos miRNAs. Posteriormente, se desarrollarán vectores virales adeno-asociados recombinantes (rAVV) para sobreexpresar los miRNAs candidatos y evaluar su efecto antitumoral. Además, se utilizarán modelos murinos para verificar las hipótesis previamente establecidas (principalmente en el modelo murino de SD Ts65Dn, modelos de ratón susceptibles a MB y también xenoinjertos de

MB en ratones nude, pero también en otros modelos murinos en función de los resultados de la etapa anterior); finalmente, se utilizarán tejidos humanos para verificar los hallazgos previos.

**Objetivo #1.** Estudiar los niveles de expresión de los miRNAs localizados en el HSA21 en dos líneas celulares de MB de diferente agresividad y seleccionar los miRNAs de interés.

Evaluaremos los niveles de cinco miRNAs sobreexpresados y relacionados con la patogénesis del SD: miR-99a, let-7c, miR-125b2, miR-155 y miR-802 en dos líneas celulares de MB (DAOY y D283), representativas de diferentes subtipos moleculares de MB. Aquellos miRNAs podrían mostrar las mayores diferencias entre las dos líneas, serán nuestros “miRNAs de interés”. Esta parte del trabajo representa un desafío técnico desde el punto de vista de la detección de diferencias reales de expresión en los miRNAs de interés en las diferentes líneas celulares.

**Objetivo #2.** Evaluar los cambios en el fenotipo tumoral de estas líneas de MB debidos a la sobreexpresión de estos miRNAs, mediante infección con virus rAAV, y verificación de los cambios mediante expresión de inhibidores.

Realizaremos estudios de ganancia y pérdida de función con los miRNAs identificados. Mediante vectores virales de adenoasociados (AAV) induciremos la sobreexpresión de cada miRNA de interés para evaluar su efecto sobre el fenotipo tumoral de estas células. Los vectores AAV son la plataforma líder en terapia génica. Este paso representa otro de los grandes desafíos técnicos del proceso, debido a la dificultad de la clonación de los diferentes elementos y la formación y producción de las partículas virales.

Después del tratamiento de las células, cuantificaremos las características celulares asociadas con la competencia metastásica en MB y analizaremos la agresividad tumoral. Posteriormente, evaluaremos los efectos de la inhibición de los miRNAs seleccionados en las mismas líneas celulares, como control para corroborar la especificidad del efecto. Complementaremos con un RNA-seq de las células tratadas para estudiar los cambios de expresión globales.

**Objetivo #3:** Evaluar los niveles de expresión de los miRNAs identificados en muestras de pacientes. Se analizarán los niveles de expresión de los miRNAs de interés en muestras de pacientes para corroborar los resultados obtenidos en las líneas celulares para evaluar la posibilidad de aplicar en un futuro la terapia desarrollada en los modelos animales.

**Objetivo #4.** Ensayo piloto de terapia génica con los rAAV en MB en ratones. Según los resultados obtenidos, realizaremos experimentos piloto para analizar el potencial terapéutico de la sobreexpresión del miRNA de interés tanto en un modelo de MB (como el Ptch1tm1Mps/J) o en xenoinjertos en ratones nude, siguiendo los procedimientos de experimentación animal permitidos. También usaremos un modelo murino de SD para investigar el efecto de estas alteraciones sobre el establecimiento del MB.

Los análisis estadísticos se realizarán utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba posterior de Bonferroni, la prueba t de Student de dos colas o la prueba U de Mann-Whitney, o la prueba de contingencia  $\chi^2$ , según corresponda.

## **OTRAS CONSIDERACIONES**

Para desarrollar este proyecto contamos con la dilatada experiencia de los investigadores asociados, con una amplia experiencia en las diferentes especialidades requeridas para lograr el

objetivo final: oncología pediátrica, patología, biología molecular, ingeniería genética, diseño y producción de rAVV y su aplicación en terapia génica en modelos de ratón.

La Dra. Águeda M. Tejera es profesora en el área de ingeniería genética en los grados de Biotecnología y Biomedicina y en el Máster de Terapias avanzadas en Biomedicina, en la Facultad de Ciencias experimentales de la UFV donde dirige el Grupo de Biología del Envejecimiento. Realizó su tesis doctoral en oncología traslacional y luego fue investigadora durante 15 años en el laboratorio de Telómeros y Telomerasa de la prestigiosa investigadora María Blasco (CNIO), participando activamente en la generación y análisis de modelos animales que permiten entender la función telomérica en el desarrollo del cáncer y el envejecimiento, como así también en terapia génica. Cabe mencionar que, en todos estos trabajos ha participado activamente la Dra. Tejera, IP del Proyecto, como miembro del Grupo de Telómeros y Telomerasa, lo que demuestra su experiencia tanto en oncología molecular, en técnicas de biología celular y molecular, ingeniería genética, como en terapia génica con vectores AVV que se utilizarán en este proyecto. Hasta ahora, ha publicado 26 artículos revisados por pares, la mayoría en Q1 y en revistas de alto índice de impacto, tiene dos sexenios de investigación y un tramo de Docencia. Cuenta con financiación específica para este Proyecto por parte de la UFV.

La Dra. Cristina Sánchez, profesora en los grados de Biotecnología y Biomedicina y en el Máster de Terapias avanzadas en Biomedicina e investigadora senior del Grupo de Investigación en Biología del Envejecimiento de la UFV aportará su extensa experiencia en la generación y producción de diferentes tipos de vectores virales con tropismo frente a células tumorales necesarios para la consecución del proyecto. La Dra. Sánchez fue Investigadora de la Unidad de Vectores Virales de la Fundación Inbiomed (San Sebastián) y de la Plataforma de Vectores Virales de la UMASS (Worcester-USA) y fue responsable del diseño y producción de vectores de transferencia de genes lentivirales y adenoasociados bajo el Sistema de Calidad UNE-EN ISO 9001: 2008, para su aplicación en diferentes ensayos in vitro e in vivo. Ha participado en relevantes proyectos de investigación como IP para la generación de vectores virales adenoasociados, tales como se van a desarrollar en este proyecto.

La Dra. María J. Delgado Martos es profesora en el grado de Biomedicina de la UFV e investigadora senior en el Grupo de Investigación en Biología del Envejecimiento, con más de 15 años de experiencia en investigación. Ha trabajado en estudios de regeneración osteocondral con células MSC y en modelos de trasplante de placa de crecimiento de rata en el grupo de investigación "Medicina Regenerativa y Desarrollo de Sistemas Osteocondrales", dirigido por Emilio Delgado Baeza MD-Ph.D. y en la Unidad de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, en la que ha dirigido dos tesis doctorales. Ha trabajado en el grupo de investigación "Medicina Regenerativa y Desarrollo del Sistema Cardiovascular", liderado por Begoña Quintana MD-Ph.D., en el Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Su conocimiento y experiencia son de gran relevancia en el análisis de los resultados de las estrategias propuestas en este proyecto. Cabe destacar que la Dra. Delgado ha participado como investigadora en 3 proyectos FIS consecutivos, desde 2011 a 2019.

La Dra. Blanca López-Ibor, prestigiosa oncólogo pediatra de HM Hospitales, aporta la visión desde el punto de vista de la oncología pediátrica. Se ha establecido un convenio marco para la investigación y la formación de investigadores entre la UFV y HM. La Dra. López-Ibor se doctoró en Medicina y Cirugía por la Universidad de Barcelona. Realizó su fellowship de Oncología y Hematología Pediátrica de la Universidad de Maryland. Fue nombrada experta en Diagnóstico Prenatal de Enfermedades Congénitas por la OMS. Tiene más de 30 años de experiencia en el manejo clínico de pacientes oncológicos pediátricos y adolescentes. Ha dirigido la Unidad de

Hematología-Oncología Pediátrica de La Zarzuela y del Hospital de San Rafael. Actualmente es Jefa de la Unidad de Hematología-Oncología Pediátrica de HM Hospitales/CIOCC. Es miembro del Consejo de Oncología Pediátrica del Sistema Nacional de Salud desde 2006 y de la Pontificia Academia para la Vida desde 2015. Es Patrono de la Fundación Curarte, en la Fundación Jaime Alonso Abruña, de la Fundación Científica de la AECC (2000-2015), y la Fundación Lejeune. Es la investigadora principal de varios ensayos clínicos, lo que aportará a nuestro proyecto un profundo conocimiento de la biología tumoral y su posible enfoque terapéutico.

Marta Osuna Marco, MD, es oncólogo pediatra, estudiante del Programa de Doctorado en Medicina de la UFV y miembro del Grupo de Biología del Envejecimiento de la UFV. Realizó su fellowship en oncología pediátrica en una de las becas de formación más prestigiosas e integrales de España. Ha completado su formación académica con un Máster en Oncología Molecular patrocinada por una beca de la AECC. Cuenta con una beca de investigación predoctoral otorgada por las Fundaciones Jérôme Lejeune y Álvaro Entrecañales, para realizar su tesis doctoral en nuestro Grupo de investigación.

Por lo expuesto anteriormente, el equipo cuenta con la experiencia indispensable en el campo dentro del cual se enmarca el Proyecto, que definitivamente lo avala para llevarlo a término.