

# **ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE PI3K/AKT/MTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/B-CATENINA Y SONIC-HEDGEHOG EN OSTEOSARCOMA**

**Trabajo Fin de Máster**

**Máster Universitario en Investigación en Medicina Clínica. UMH**

**Alumno: Pablo Berlanga Charriel**

Dirección: Unidad de Oncología Pediátrica Hospital La Fe

Avenida Fernando Abril Martorell, nº 106. Torre G-2.

46026, Valencia (Spain). E-mail: [berlanga\\_pab@gva.es](mailto:berlanga_pab@gva.es)

## **INDICE:**

<b>A.Antecedentes .....</b>	<b>Pág 3</b>
<b>Pregunta de investigación .....</b>	<b>Pág 9</b>
<b>B.Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>Pág 11</b>
<b>C.Metodología .....</b>	<b>Pág 12</b>
<b>D. Resultados preliminares .....</b>	<b>Pág 15</b>
<b>E.Discusión preliminar .....</b>	<b>Pág 19</b>

## A. ANTECEDENTES

En España se diagnostican anualmente 900 pacientes menores de 15 años afectados de cáncer, y alrededor de 500 casos en adolescentes con edades comprendidas entre los 15-19 años [1]. Los avances de la terapia antineoplásica han llevado a un significativo aumento de los índices de supervivencia en las últimas décadas, siendo actualmente el índice medio de curación del cáncer infantil del 70-80% [2]. Sin embargo, el cáncer en la edad pediátrica es todavía la causa más frecuente de mortalidad por enfermedad en los niños mayores de un año de edad y el pronóstico continúa siendo sombrío en algunos diversos de cáncer. (Figura 1). Por otra parte, a pesar de que los niños toleran la toxicidad aguda del tratamiento mejor que los adultos, son más vulnerables a las secuelas tardías de la terapia frente al cáncer, ya que hasta un 62% de los supervivientes presentará a largo plazo secuelas crónicas secundarias al tratamiento recibido, 27% de ellos secuelas severas [3,4].

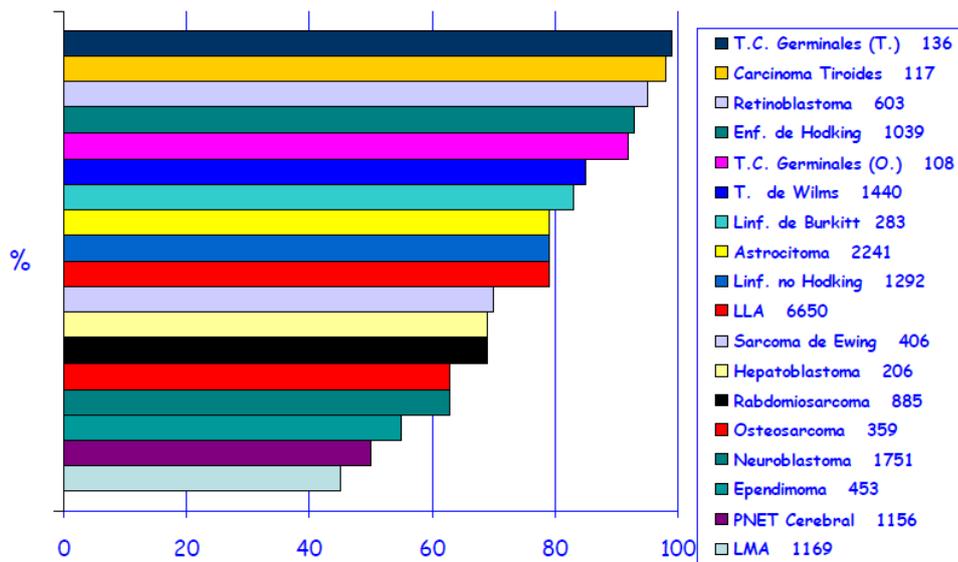


Figura 1: Supervivencia global a los 5 años según los diferentes neoplasias pediátricas en Europa. Adaptado de [2]

El osteosarcoma es el tumor óseo maligno primario más frecuente en niños y adolescentes, así como uno de los tumores pediátricos con peor pronóstico (Figura 1). Histológicamente se caracteriza por células malignas mesenquimales productoras de osteide o hueso inmaduro tumoral. La incidencia de osteosarcoma en la población general es de 2-3 casos/1.000.000/año llegando a los 8-11casos/1.000.000/año en la adolescencia [5]. Presenta una incidencia bimodal: un pico de mayor incidencia en la

adolescencia y otro pico de presentación después de los 65 principalmente secundario a radioterapia o enfermedad de Paget.

Histológicamente, el osteosarcoma central convencional (intramedular de alto grado) es el tipo más frecuente y comprende cerca del 90% de todos los casos de osteosarcoma. Según el componente celular predominante se pueden clasificar en osteoblásticos, condroblásticos o fibroblásticos. Otras variantes menos frecuentes son el osteosarcoma de células pequeñas o el telangiectásico. Sin embargo, a pesar de las distintas variables histológicas, el comportamiento clínico y el manejo médico son idénticos para todos ellos. Otro grupo distinto lo constituye el osteosarcoma de superficie (paraostal, perióstico y yuxtacortical), variantes de bajo grado que se tratan únicamente con cirugía con excelente pronóstico [6].

A diferencia de otros sarcomas, el osteosarcoma no presenta una alteración molecular o translocación específica. La mayoría son esporádicos y parece existir una asociación con el crecimiento óseo acelerado como demuestra un mayor pico de incidencia cercano al estirón puberal y aparición en zonas metafisiarias, donde se produce el crecimiento óseo. Sin embargo, existe asociación con diversos trastornos genéticos principalmente Li-Fraumeni, retinoblastoma hereditario y síndromes de Rothmund-Thomson, Bloom y Werner.

En el momento del diagnóstico, aproximadamente un 10-20% de los pacientes presentan metástasis, principalmente pulmonares, con un pronóstico claramente más desfavorable que el resto. Sin embargo, hasta un 60-70% de los pacientes con enfermedad localizada presentan inicialmente metástasis pulmonares subclínicas, por lo que es fundamental un tratamiento multidisciplinar como enfermedad sistémica aún en los casos en los que no se haya podido objetivar diseminación a distancia.

Existen distintos factores pronósticos asociados a la supervivencia, principalmente el tamaño del tumor primario inicial, presencia de metástasis en el momento del diagnóstico, escasa respuesta histológica a la quimioterapia neoadjuvante y cirugía completa de todas las lesiones tumorales [7-11].

Previo a los años 70, el tratamiento del osteosarcoma era exclusivamente quirúrgico, alcanzando únicamente 5-20% de supervivencia. Sin embargo, gracias a la introducción en los años 70-80 de quimioterapia neoadjuvante/adjuvante

(doxorubicina, metotrexato, cisplatino, ifosfamida) en combinación con resección completa del tumor primario/metástasis, la tasa de supervivencia ha mejorado hasta alcanzar un 20-30% para las formas metastásicas [7,12] y un 60-70% para los pacientes con enfermedad inicialmente localizada [13,14].

Sin embargo, a pesar de los importantes logros alcanzados en la década de los 70-80, el arsenal terapéutico y las tasas de curación no ha cambiado en las últimas décadas. Por ello, son necesarias nuevas estrategias terapéuticas para intentar mejorar el pronóstico vital de estos pacientes, así como valorar la introducción de nuevos fármacos que permitan disminuir la toxicidad de las terapias actuales.

En los últimos años, se postula un nuevo paradigma para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales basado en la biología del tumor y no únicamente en su histología, posibilitando un enfoque más “personalizado” del tratamiento antitumoral [15]. Para ello es necesario profundizar en el estudio de la biología tumoral para poder identificar determinados marcadores biológicos (biomarcadores), que jueguen un papel importante en la fisiopatogenia de los tumores y/o en su evolución y respuesta terapéutica [16].

### **Estudio de cascadas y redes de señalización intracelular**

Las células de todo organismo pluricelular están en permanente intercomunicación a través de diferentes tipos de señales (citoquinas, hormonas, factores crecimiento, etc.) que regulan la proliferación, diferenciación, metabolismo, comportamiento celular e incluso apoptosis. Estas señales interaccionan con sus respectivos receptores en las células diana produciendo la activación de diferentes rutas específicas de transducción de señales, por las que serán transmitidas hacia el interior de la célula para generar la respuesta adecuada. Cada señal extracelular es transmitida a través de múltiples rutas, o cascadas de señalización, en las que intervienen numerosas proteínas que ganan y/o pierden su actividad biológica mediante diversas modificaciones tales como fosforilación, desfosforilación, etc

Dentro de las cascadas de señalización intracelular más importantes implicadas en la génesis/supervivencia de las células cancerígenas destacan las redes de PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/ $\beta$ -catenina y Sonic-Hedgehog.

La cascada de **PI3K/AKT/mTOR** juega un papel importante en el crecimiento y supervivencia celular. Las phosphoinositide-3-kinasas (PI3Ks) son una familia de quinasas lipídicas que producen una cascada de señal intracelular que regula un amplio abanico de procesos celulares y que suele estar activada en distintos tumores interviniendo en la proliferación incontrolada, resistencia a la apoptosis, angiogénesis y metástasis (Figura 2). Este circuito juega un papel importante no sólo en el crecimiento tumoral, sino también en la respuesta potencial de los tumores al tratamiento antitumoral. La activación de Akt promueve resistencia adquirida frente a diversos tratamientos antineoplásicos [17] y se suele asociar a mal pronóstico y resistencia a diversos tratamientos antitumorales [18,19]. En la actualidad existen diversos fármacos inhibidores de esta vía en desarrollo a nivel de PI3K, Akt y mTORC1/mTORC2.

La activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR se puede producir por distintas alteraciones en diferentes puntos como pérdida de PTEN, amplificación/mutación de PI3K, mutación de AKT o activación de los receptores tirosina quinasas. Todas ellas producen una activación constitutiva de la vía que resulta en la fosforilación de Akt [20]. Sin embargo, a diferencia de otros tumores pediátricos [21], existen escasos datos sobre la activación de esta vía en osteosarcoma [22,23].

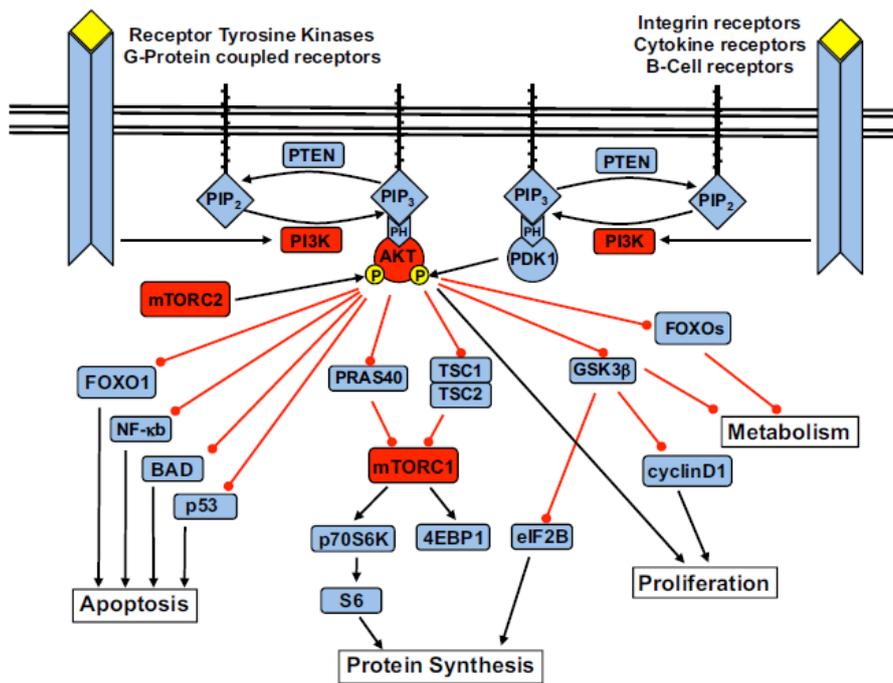


Figura 2: Circuito PI3K/Akt/mTOR [21]

La cascada de **RAS/RAF/MEK/ERK** es asimismo una de las más desreguladas en el cáncer, controlando múltiples funciones celulares críticas incluyendo proliferación, crecimiento y senescencia [24]. La activación de esta vía se puede producir por activación por medio de los receptores tirosina quinasas o por mutaciones de los componentes intracelulares de la vía que confluyen en la fosforilación de ERK. En la actualidad existen diversos fármacos inhibidores de esta vía en desarrollo a nivel de RAF y MEK. La vía de RAS/RAF/MEK/ERK está activada en distintos tumores pediátricos encontrándose mutaciones/duplicaciones de RAS y/o BRAF en 10% y 65% de gliomas de alto y bajo grado respectivamente [25], así como en un 12% de rhabdomiosarcomas y casos puntuales de neuroblastoma y sarcoma de Ewing [26] y osteosarcoma [27].

La cascada de **WNT/ $\beta$ -catenina** juega un papel igualmente decisivo en los procesos de regulación, diferenciación y proliferación y muerte celular. Esta vía controla los niveles intracelulares de beta-catenina, de forma que en ausencia de factores de Wnt, los niveles de beta-catenina en el citoplasma son bajos. Wnt estabilizan la proteína, conllevando un aumento de sus niveles citoplasmáticos y su paso al núcleo, donde se une a diversos genes diana [28]. Alteraciones en esta vía son frecuentes en numerosos cánceres, con datos contradictorios en el caso del osteosarcoma [29].

La cascada de **Sonic-Hedgehog** juega un papel crítico en desarrollo y homeostasis de los principales órganos y tejidos humanos, encontrándose fisiológicamente activa en tejidos embrionarios donde regula la diferenciación y regeneración celular. En los tejidos adultos se encuentra típicamente inactivada. Su activación anómala se correlaciona con distintos tumores, principalmente meduloblastoma y carcinoma basocelular (Síndrome de Gorlin), así como en múltiples otros tumores [30]. La activación de esta vía se puede producir por sobreexpresión en la señalización extracelular o por mutaciones en los distintos componentes intracelulares de la vía (PTCH1, SuFu, Smo) que confluyen en una activación de GLI1 (Figura 4). La activación anómala de esta vía se relaciona con diversos tumores pediátricos, principalmente meduloblastoma, rhabdomiosarcoma, hepatoblastoma, neuroblastoma [31] y algunos casos de osteosarcoma [32].

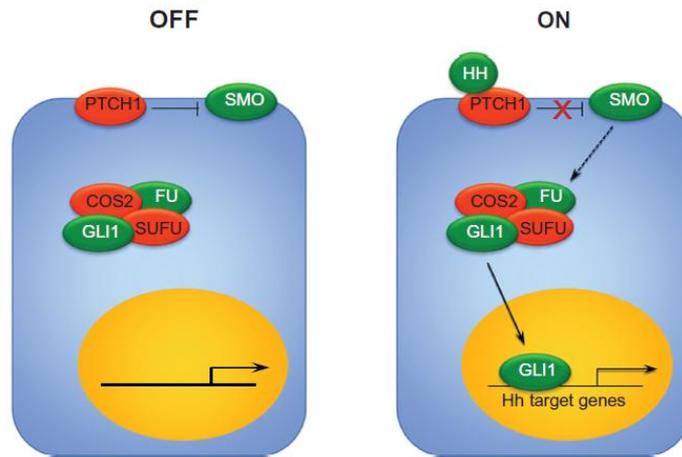


Figura 3: Vía de Sonic-Hedgehog [30]

Existe una interacción en distintos puntos de estas cuatro cascadas de señalización [33]: la inhibición de MEK no sólo reduce pERK sino que incrementa pAKT [34], el tratamiento con un inhibidor de mTOR produce un incremento de pERK [35], la presencia de genes activadores de PI3K se correlaciona con resistencia a inhibidores de Sonic-Hedgehog [36].

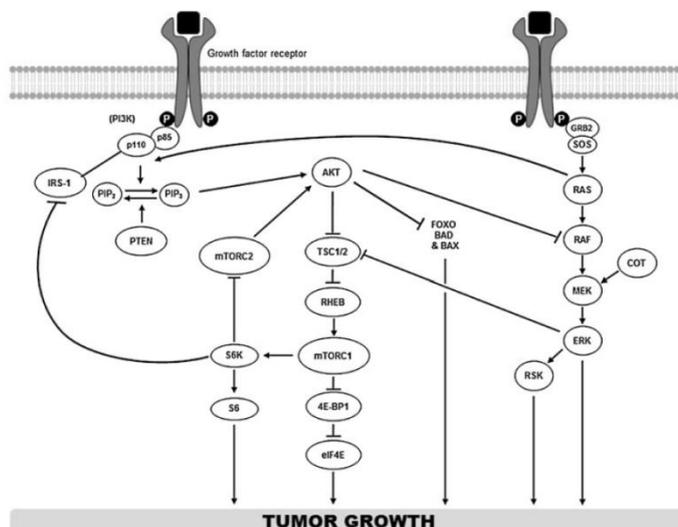


Figura 4: Interacción entre PI3K/Akt/mTOR y RAS/RAF/MEK/ERK [33]

### **Pregunta de investigación:**

El osteosarcoma es uno de los tumores pediátricos con peor pronóstico. En las últimas décadas no se han introducido nuevos tratamientos que permitan mejorar la supervivencia de estos pacientes. Dentro de las cascadas de señalización intracelular más importantes implicadas en la génesis/supervivencia de las células cancerígenas destacan las redes de PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/ $\beta$ -catenina y Sonic-Hedgehog, para las que actualmente existen fármaco diana. Por ello, la pregunta que se plantea en este estudio es la correlación pronóstica de la activación de estas rutas de señalización intracelular en pacientes con osteosarcoma.

### **Definición de la pregunta:**

Forma PIR:

- P: Pacientes con osteosarcoma.
- I: Estudio de redes de señalización intracelular (PI3K/PTEN/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/bcateinna y Sonic Hedgehog).
- R: Pronóstico

Según esto, la pregunta estructurada de nuestro trabajo es ¿La activación de redes de señalización intracelular en niños y adolescentes con osteosarcoma se correlaciona con el pronóstico?

### **Selección de la fuente de información más adecuada:**

El osteosarcoma es el tumor óseo maligno primario más frecuente en niños y adolescentes. Sin embargo, al igual que la mayoría de tumores malignos pediátricos se considera un tumor raro ya que la incidencia del osteosarcoma en la población general es de únicamente 2-10 casos/1.000.000 personas/año. En base a la baja incidencia de este tipo de tumores y la necesidad de colaboración y difusión internacional de los proyectos de investigación más importantes realizados, la comunicación de resultados se realiza principalmente en revistas internacionales y principalmente en inglés. Por ello, la búsqueda de información se ha realizado en las bases de datos y recursos de información internacionales en ciencias de la salud, en concreto Pubmed.

### **Ecuación de búsqueda:**

Teniendo en cuenta que realmente se realizan 4 preguntas (una por cada una de las rutas de señalización intracelular analizadas). Dado que interesan tanto los resultados en humanos como preclínicos y en base al bajo número de publicaciones que se esperaban encontrar no se han fijado límites.

- Ruta PI3K/PTEN/Akt/mTOR:
  - o "Osteosarcoma"[Mesh] AND ("Prognosis"[Mesh]) AND ("Phosphatidylinositol 3-Kinases"[Mesh].
  - o "Osteosarcoma"[Mesh] AND ("Prognosis"[Mesh]) AND "Proto-Oncogene Proteins c-akt"[Mesh].
  - o "Osteosarcoma"[Mesh] AND ("Prognosis"[Mesh]) AND "TOR Serine-Threonine Kinases"[Mesh]
  - o "Osteosarcoma"[Mesh] AND ("Prognosis"[Mesh]) AND "PTEN Phosphohydrolase"[Mesh].
  
- Ruta RAS/RAF/MEK/ERK:
  - o "Osteosarcoma"[Mesh] AND ("Prognosis"[Mesh]) AND (("MAP Kinase Signaling System"[Mesh]) OR ("Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases"[Mesh]) OR "MAP Kinase Kinase Kinases"[Mesh])
  
- Wnt/ $\beta$ catenina:
  - o "Osteosarcoma"[Mesh] AND ("Prognosis"[Mesh]) AND "Wnt Signaling Pathway"[Mesh]
  
- Sonic hedgehog:
  - o "Osteosarcoma"[Mesh] AND ("Prognosis"[Mesh]) AND "Hedgehog Proteins"[Mesh]

Existen escasas publicaciones que analicen en pacientes con osteosarcoma el valor pronóstico de la activación de las rutas de señalización previamente descritas. No existe ningún estudio que analice la activación de estas rutas en los mismos pacientes en un modelo multivariante.

## **B. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis del estudio:**

La activación de las redes de PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/ $\beta$ -catenina y Sonic-Hedgehog se correlaciona con el pronóstico en los pacientes con osteosarcoma.

### **Objetivos:**

- Objetivo principal:
  - Determinar si la activación de PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/ $\beta$ -catenina y Sonic-Hedgehog se correlaciona con el pronóstico en niños y adolescentes con osteosarcoma.
- Objetivos secundarios:
  - Determinar los factores pronósticos clínicos y supervivencia de los pacientes  $\leq 21$  años diagnosticados de osteosarcoma en el Hospital La Fe desde 1985.
  - Analizar el porcentaje de pacientes con osteosarcoma con activación de PI3K/Akt/mTOR mediante la fosforilación de pAKT.
  - Analizar el porcentaje de pacientes con osteosarcoma con activación de RAS/RAF/MEK/ERK mediante la fosforilación de pERK.
  - Analizar el porcentaje de pacientes con osteosarcoma con activación de Sonic-Hedgehog mediante la expresión nuclear de GLI.
  - Analizar el porcentaje de pacientes con osteosarcoma con activación de la ruta WNT/ $\beta$ -catenina mediante la expresión nuclear de  $\beta$ -catenina.

## C. METODOLOGÍA

**Sujetos del estudio:** Pacientes  $\leq 21$  años diagnosticados de osteosarcoma en el Hospital La Fe desde 1985. Para el análisis de la activación de las rutas de señalización de las diferentes vías intracelulares se han incluido únicamente aquellos pacientes en los que se conserve muestra tumoral que permita la realización de los estudios biológicos, previa obtención de consentimiento informado. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de acuerdo a la legislación vigente.

**VARIABLES DEL ESTUDIO:** La variable dependiente principal es el exitus (sí/no) y el tiempo de seguimiento. Las variables independientes son las variables demográficas y factores pronósticos clínicos conocidos (tamaño del tumor primario inicial, presencia de metástasis en el momento del diagnóstico, respuesta histológica a la quimioterapia neoadyuvante y cirugía completa de todas las lesiones tumorales), así como la activación de las rutas de señalización de PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/ $\beta$ -catenina y Sonic-Hedgehog.

Para la determinación de la activación de las rutas de señalización se han realizado los siguientes pasos:

1. Revisión de muestras conservadas en bloques de parafina en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Fe.
2. Homogeneización del diagnóstico por el mismo patólogo.
3. Selección de cada bloque de parafina de zonas tumorales no necróticas. Extracción de dos cilindros tumorales para la creación de Tissue Microarrays (TMAs). La elaboración de Tissue Microarrays (TMAs) consiste en la inclusión en un único bloque de parafina de múltiples fragmentos de tejido, también en parafina, previamente seleccionados. Ello permite el análisis inmunohistoquímico simultáneo y estandarizado de múltiples muestras (Figura 5). Inclusión de al menos dos “punch” de 0.6mm por cada muestra tumoral previamente seleccionada. Inclusión de “punches” adicionales como controles internos de inmunohistoquímica y como marcadores de orientación.

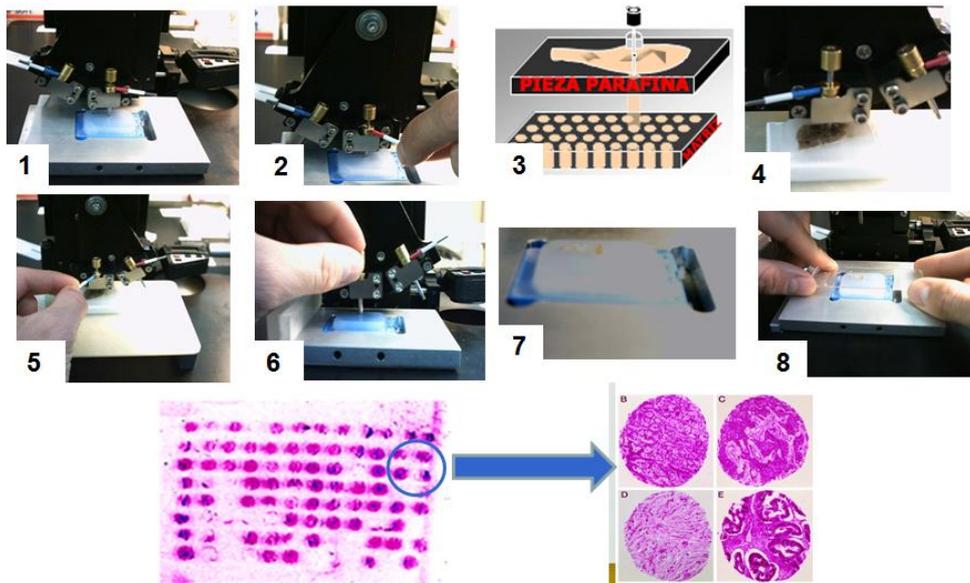


Figura 5: Proceso de creación de Tissue Microarray (TMAs)

4. Estudio de la activación de las rutas de señalización intracelular:
  - Estudio por inmunohistoquímica de la activación de la cascada PI3K/Akt/mTOR mediante fosforilación de la proteína AKT.
  - Estudio por inmunohistoquímica de la activación de la cascada RAS/RAF/MEK/ERK mediante la fosforilación de la proteína ERK.
  - Estudio por inmunohistoquímica de la activación de la cascada de WNT/ $\beta$ -catenina mediante la expresión de  $\beta$ -catenina.
  - Estudio por inmunohistoquímica de la activación de la cascada de Sonic-Hedgehog mediante la expresión de GLI
  
5. Evaluación de los resultados inmunohistoquímicos con dos anatomopatólogos de experiencia en el diagnóstico de tumores óseos valorando la intensidad de inmunotinción y porcentaje de células teñidas (HSCORE) (Figura 6), determinando la media de los dos cilindros tumorales de cada paciente.

$$\text{HSCORE} = \sum \text{IS} * \text{PS}(\text{IS}) \quad (0-300)$$

IS = intensidad de la tinción (0= negativo, 1= débil, 2= intermedio, 3=fuerte)

PS (IS) = % células tumorales tinción (número de células teñidas/número total de células en cada muestra)

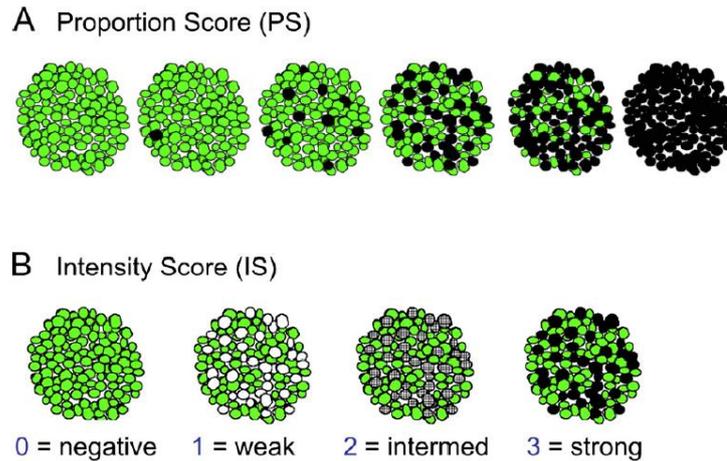


Figura 6: Evaluación tinción inmunohistoquímica (HSCORE) en función del porcentaje celularidad (A) y de la intensidad de la tinción (B) [37]

**Recogida de datos:** Los datos obtenidos de la revisión de las historias clínicas y determinación de activación de las rutas de señalización de PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, WNT/ $\beta$ -catenina y Sonic-Hedgehog se han informatizado anonimizados en una base de datos creada para tal fin. El análisis de los datos se ha realizado con el paquete estadístico SPSS 20.0.

**Análisis estadístico:** Las variables categóricas se describen con el recuento numérico (porcentaje) de cada categoría. Las variables continuas se describen como media  $\pm$  DE si la distribución es normal ( $p > 0.05$ , prueba de Kolmogorov-Smirnov) o como mediana y rango intercuartílico ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) si la distribución no es normal. La estimación de la curva de supervivencia se ha realizado mediante el método de Kaplan-Meier y la comparación univariante con la activación de las distintas rutas de señalización mediante el test Log-Rank y multivariante mediante regresión de Cox. Se acepta como límite de significación estadística una  $p \leq 0.05$ .

#### D. RESULTADOS PRELIMINARES.

En el periodo analizado (1985-2011) se diagnosticaron y trataron 77 pacientes  $\leq 21$  años con osteosarcoma de alto grado en el Hospital La Fe. El análisis exhaustivo de los factores pronósticos clínicos y supervivencia de los pacientes  $\leq 21$  años diagnosticados de osteosarcoma en el Hospital La Fe desde 1985 ha sido recientemente publicado [38] y por tanto no es analizado en este trabajo de investigación (Se adjunta publicación como Anexo 1).

Para el estudio de la activación de las vías de señalización se han creado de momento 3 TMAs (Figura 7) con un total de 66 muestras tumorales correspondientes a los 43 primeros pacientes.

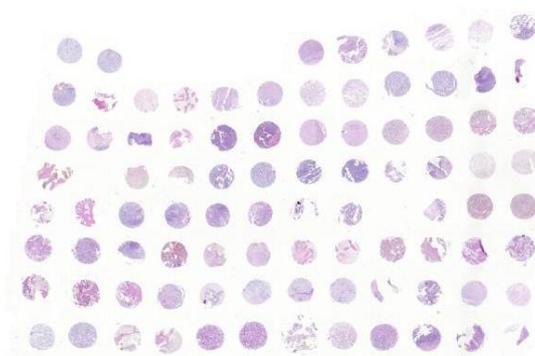


Figura 7: Tissue Microarray (TMA).

En las Tablas 1 y 2 se especifican las características de los pacientes y de las muestras tumorales analizadas hasta el momento, respectivamente.

<b>Variable</b>	<b>Casos (%)</b>
Edad	13,7 años (6,7-21,0)*
Sexo	
Hombre	23 (53%)
Mujer	20 (47%)
Estadio	
Localizado	39 (91%)
Metastásico	4 (9%)
Localización	
Fémur	27 (63%)
Tibia	9 (21%)
Otros	7 (16%)
Grado necrosis tumoral	70 % (0-100%)*
Exitus	24 (56%)
Tiempo seguimiento (vivos)	11,1 años (2,5-26,4 años)

Tabla 1: Características de los pacientes (n=43). \* Mediana (rango).

<u>Tipo muestra tumoral</u>	<u>Número de muestras</u>
Biopsia tumor primario al diagnóstico	20
Cirugía tumor primario postquimioterapia	26
Metástasis pulmonar	20

Tabla 2: Características de las muestras incluidas en los TMAs (n=66)

Tras la revisión conjunta con los dos patólogos se ha establecido la media del HSCORE de los dos cilindros integrados en el TMA por cada muestra tumoral. Como se ha especificado previamente, el valor máximo del HSCORE de cada muestra es 300 (100% células tumorales teñidas, intensidad máxima) y el mínimo 0 (0% células teñidas), Figura 8 y 9.

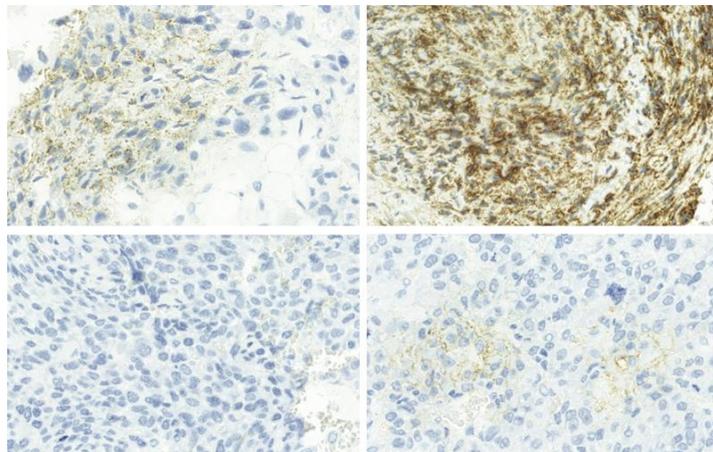


Figura 8: Diversos casos de diferente intensidad y porcentaje de tinción  $\beta$ -catenina.

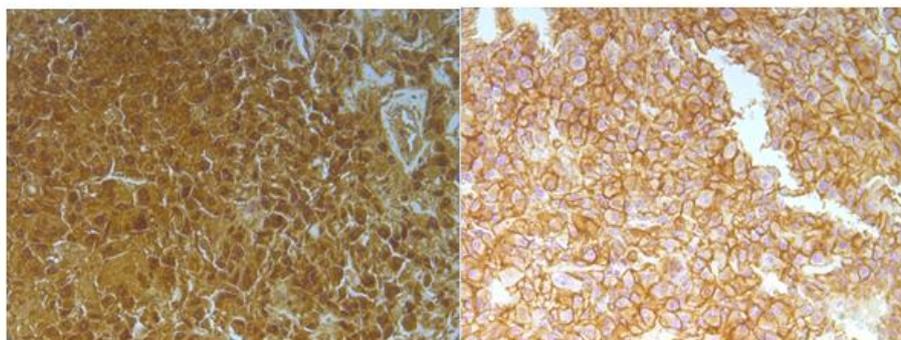


Figura 9: Tinción GLI HSCORE =300 (100% celularidad tumoral teñida, intensidad 3)

En base a los datos de HSCORE obtenidos se han definido dos puntos de corte:

- Escenario A: Punto de corte HSCORE 40.
  - HSCORE > 40: Positivo.
  - HSCORE  $\leq$  40: Negativo.
- Escenario B: Punto de corte HSCORE 150.

- HSCORE > 150: Positivo.
- HSCORE ≤ 150: Negativo.

En el análisis univariante preliminar, la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR (mediante fosforilación de AKT) así como la vía de WNT/ $\beta$ -catenina (mediante expresión de  $\beta$ -catenina) en pacientes con osteosarcoma se correlaciona con un peor pronóstico. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la activación de la vía de RAS/RAF/MEK/ERK (mediante fosforilación de ERK) ni de Sonic-Hedgehog (mediante expresión de GLI), Figuras 10-13.

En el análisis multivariante preliminar, únicamente la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR (mediante fosforilación de AKT) mantiene significación estadística ( $p=0.040$ ), no hallándose diferencias estadísticamente significativas respecto a la activación del resto de vías de señalización intracelular.

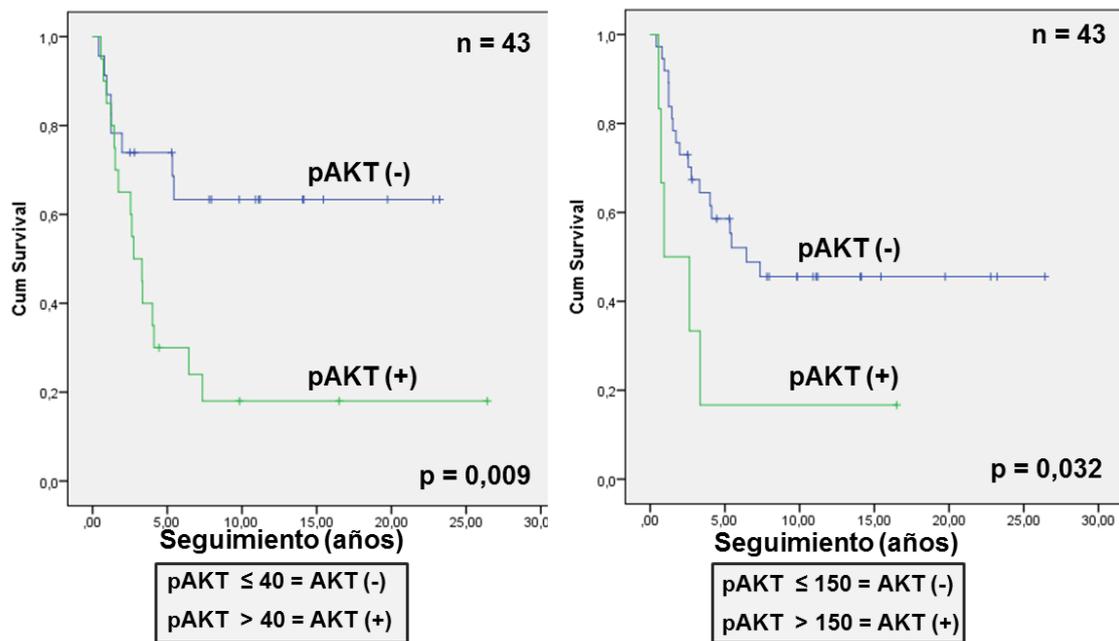


Figura 10: Curva supervivencia global en función de HSCORE pAKT (n=43).

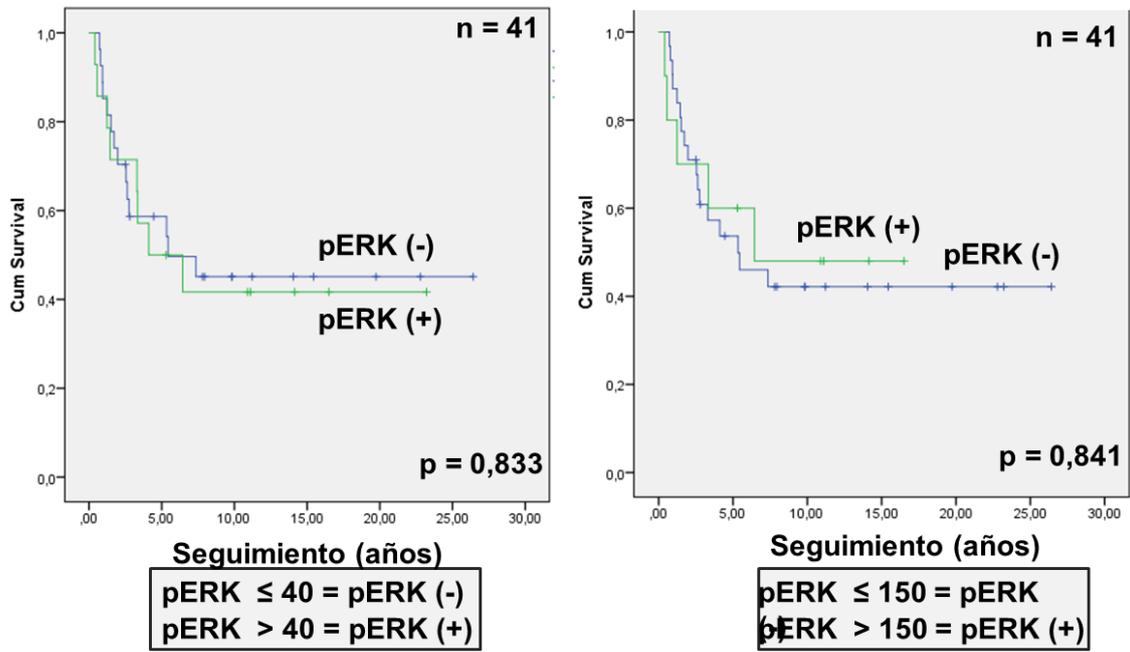


Figura 11: Curva supervivencia global en función de HSCORE pERK (n=41).

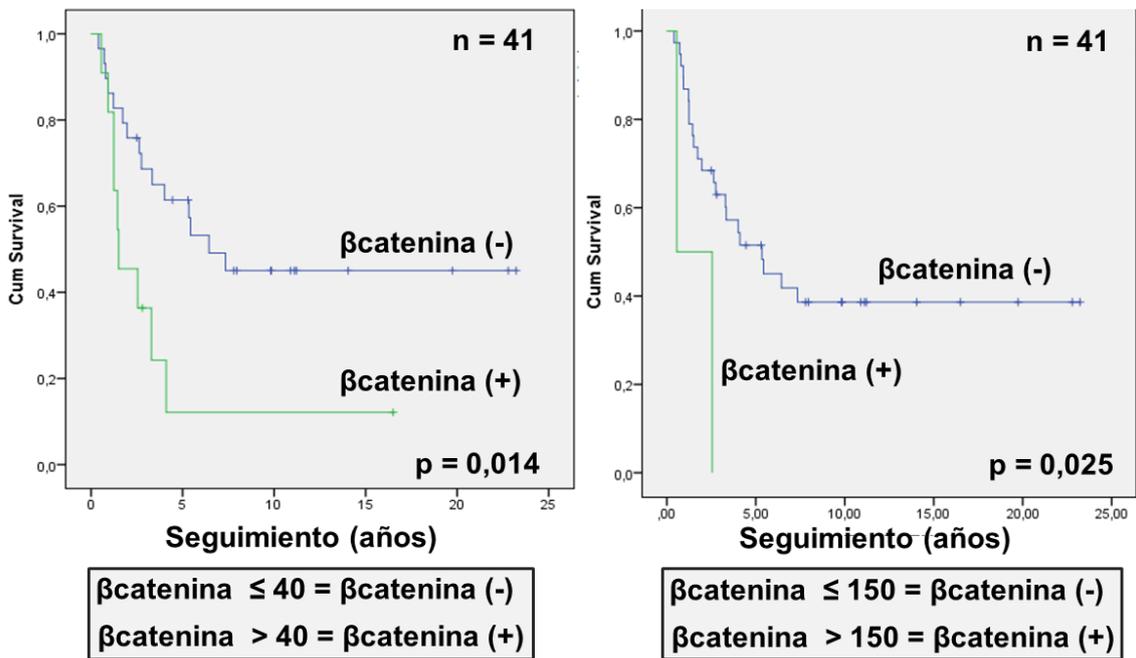


Figura 12: Curva supervivencia global en función de HSCORE  $\beta$ -catenina (n=41).

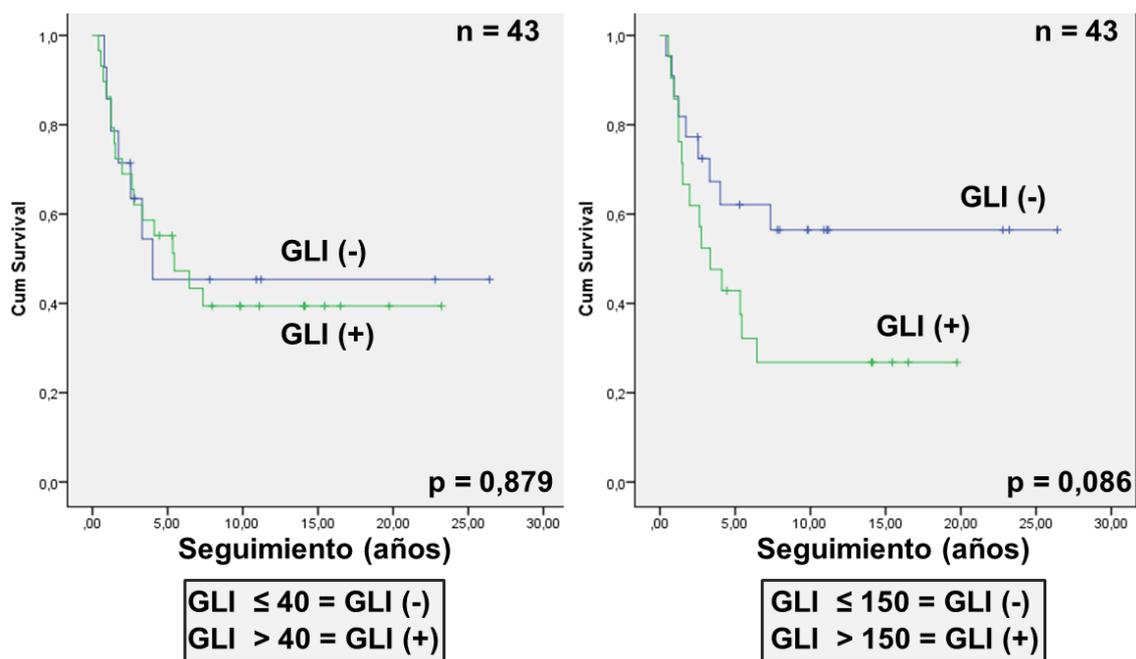


Figura 13: Curva supervivencia global en función de HSCORE GLI (n=43).

Variable	Hazard ratio	IC 95%	p-value
PI3K/Akt/mTOR (pAKT)	2,777	1,048-7,363	0,040
WNT/ $\beta$ -catenina (B-catenina)	2,139	0,769-5,952	0,145
RAS/RAF/MEK/ERK (pERK)	0,472	0,097-2,307	0,354
Sonic-Hedgehog (GLI)	2,229	0,859-5,786	0,100

Tabla 3: Análisis multivariante de la activación de las vías de señalización (Punto de corte: HSCORE 40).

Actualmente estamos completando la creación del 4º y 5º TMA con el resto de muestras tumorales para poder completar el total de muestras a analizar y realizar un análisis definitivo.

## E. DISCUSIÓN PRELIMINAR.

El trabajo presentado supone el primer estudio en niños y adolescentes con osteosarcoma de valoración pronóstica de diversas rutas de señalización previamente descritas en el cáncer. Aunque los resultados previamente mostrados son únicamente preliminares, únicamente la vía de PI3K/AKT/MTOR presenta una clara correlación pronóstica; los pacientes con tumores con activación de esta vía valorada por medio de la fosforilación de Akt presentan peor pronóstico. En caso de confirmación de estos resultados con el resto de muestras se realizará en un segundo tiempo la secuenciación de los principales genes de esta ruta de señalización para identificar la alteración principal que produce esta activación anómala (PI3K, PTEN, Akt,) ya que en la actualidad existen diversos fármacos inhibidores de esta vía en desarrollo a nivel de PI3K, Akt y mTORC1/mTORC2 con potencial aplicación terapéutica en este grupo de pacientes.

## **Bibliografía:**

1. Peris-Bonet R, Salmeron D, Martinez-Beneito MA, Galceran J, Marcos-Gragera R, Felipe S, et al. Childhood cancer incidence and survival in Spain. *Ann Oncol* 2010; 21: 103-110
2. Gatta G, Zigon G, Capocaccia R, Coebergh JW, Desandes E, Kaatsch P, et al. Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 992-1005.
3. Hudson MM, Mertens AC, Yasui Y, Hobbie W, Chen H, Gurney JG, et al. Health status of adult long-term survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *JAMA*. 2003;290:1583-92.
4. Oeffinger et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006;355: 1572-82.
5. Gurney JG SA, Bulterys M. Malignant bone tumors. In: *Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, Ries LA, Smith MAS, Gurney JG, et al (Eds), SEER program, National Cancer Institute, Bethesda MD 1999 p99.
6. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol*. 2006;125: 555-81.
7. Mialou V, Philip T, Kalifa C, Perol D, Gentet JC, Marec-Berard P, et al. Metastatic osteosarcoma at diagnosis: prognostic factors and long-term outcome--the French pediatric experience. *Cancer*. 2005; 104: 1100-9.
8. Bielack S, Kempf-Bielack B, Von Kalle T, Schwarz R, Wirth T, Kager L, et al. Controversies in childhood osteosarcoma. *Minerva Pediatr*. 2013; 65: 125-48.
9. Ritter J, Bielack SS. Osteosarcoma. *Ann Oncol*. 2010; 21: 20-5.
10. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 776-90.
11. Whelan JS, Jinks RC, McTiernan A, Sydes MR, Hook JM, Trani L, et al. Survival from high-grade localised extremity osteosarcoma: combined results and prognostic factors from three European Osteosarcoma Intergroup randomised controlled trials. *Ann Oncol*. 2012; 23: 1607-16.
12. Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol*. 2003 15; 21: 2011-8.
13. Bielack S, Jurgens H, Jundt G, Kevric M, Kuhne T, Reichardt P, et al. Osteosarcoma: the COSS experience. *Cancer Treat Res*. 2009; 152: 289-308.
14. Ferrari S, Palmerini E, Staals EL, Mercuri M, Franco B, Picci P, et al. The treatment of nonmetastatic high grade osteosarcoma of the extremity: review of the Italian Rizzoli experience. Impact on the future. *Cancer Treat Res*. 2009; 152: 275-87.
15. de Bono JS, Ashworth A. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature*. 2010; 467: 543-9.
16. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003; 3: 525-9.
17. Huang WC, Hung MC. Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J Formos Med Assoc*. 2009; 108: 180-94.

18. Hartmann W, Kuchler J, Koch A, Friedrichs N, Waha A, Endl E, et al. Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 4538-45.
19. Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin KM, Fulda S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2007; 67: 735-45.
20. Haagenen EJ, Kyle S, Beale GS, Maxwell RJ, Newell DR. The synergistic interaction of MEK and PI3K inhibitors is modulated by mTOR inhibition. *Br J Cancer.* 2012; 106: 1386-94.
21. Loh AH, Brennan RC, Lang WH, Hickey RJ, Malkas LH, Sandoval JA. Dissecting the PI3K Signaling Axis in Pediatric Solid Tumors: Novel Targets for Clinical Integration. *Front Oncol.* 2013; 3: 93.
22. Freeman SS, Allen SW, Ganti R, Wu J, Ma J, Su X, et al. Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors. *Cancer.* 2008; 113: 1453-61.
23. Choy E, Hornicek F, MacConaill L, Harmon D, Tariq Z, Garraway L, et al. High-throughput genotyping in osteosarcoma identifies multiple mutations in phosphoinositide-3-kinase and other oncogenes. *Cancer.* 2012; 118: 2905-14.
24. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16: 103-19.
25. Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 2011; 121: 397-405.
26. Shukla N, Ameer N, Yilmaz I, Nafa K, Lau CY, Marchetti A, et al. Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 748-57.
27. Chandhanayingyong C, Kim Y, Staples JR, Hahn C, Lee FY. MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions. *Sarcoma.* 2012;2012:404810.
28. MacDonald B, Tamai K, He X. Wnt/  $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms and diseases. *Dev Cell.* 2009; 17:9-26.
29. Tian J, He H, Lei G. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in bone cancers. *Tumour Biol.* 2014; 35: 9439-45.
30. Lin TL, Matsui W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *OncoTargets Ther.* 2012; 5: 47-58.
31. Oue T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M. Increased expression of the hedgehog signaling pathway in pediatric solid malignancies. *J Pediatr Surg.* 2010; 45: 387-92.
32. Mohseny AB, Cai Y, Kuijjer M, Xiao W, van den Akker B, de Andrea CE, et al. The activities of Smad and Gli mediated signalling pathways in high-grade conventional osteosarcoma. *Eur J Cancer.* 2012; 48: 3429-38.
33. Britten CD. PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71: 1395-409.
34. Hoeflich KP, Merchant M, Orr C, Chan J, Den Otter D, Berry L, et al. Intermittent administration of MEK inhibitor GDC-0973 plus PI3K inhibitor GDC-0941 triggers robust apoptosis and tumor growth inhibition. *Cancer Res.* 2012; 72: 210-9.
35. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3065-74.

36. Metcalfe C, de Sauvage FJ. Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against Smoothed antagonists. *Cancer Res.* 2011; 71: 5057-61.
37. Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, et al. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. *J Histochem Cytochem.* 2010; 58: 95-107.
38. Berlanga P, Cañete A, Díaz R, Salom M, Baixauli F, Gomez J, et al. Presentation and Long-term Outcome of High-grade Osteosarcoma: A Single-Institution Experience. *J Pediatr Hematol Oncol* [Epub ahead of print]