

**Titulo:** Diseño personalizado de un panel de identificación de alteraciones genéticas en tumores sólidos pediátricos.

**Investigador Principal:** Dra. Blanca López-Ibor Aliño

**Afiliación:** Unidad de Oncopediatría. Fundación de Investigación HM Hospitales.

**Palabras Clave:** Tumores pediátricos, Biomarcador, alteraciones genéticas, PCR Digital.

## INDICE

	Página
1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
3. Bibliografía.....	5
4. Hipótesis de trabajo.....	7
5. Objetivos.....	7
6. Metodología de la Investigación.....	8
7. Plan de trabajo y distribución de tareas.....	9

## **1. RESUMEN**

Los tumores sólidos son una de las principales causas de mortalidad y secuelas por enfermedad en niños. La cirugía es una parte esencial del diagnóstico siendo la práctica habitual la realización de una biopsia, dejando el intento de resección del tumor para un segundo tiempo, cuando la quimioterapia al reducirlo de tamaño, lo hace más resecable. Sin embargo, en los casos de recaída o enfermedad metastásica que no responde a tratamiento, la cirugía tiene un papel diferente que no es tanto alcanzar la remisión completa, como la obtención de tejido para estudio molecular y búsqueda de nuevos tratamientos. Con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos o utilizar fármacos dirigidos contra alteraciones moleculares específicas que se detecten en un tumor en situación de recidiva sin respuesta a un tratamiento de quimioterapia de segunda línea, la identificación de alteraciones genéticas específicas, en los diferentes tumores sólidos de pacientes pediátricos, ha abierto un campo de posibilidades de tratamiento a niños que no tendrían alternativas terapéuticas de otro modo.

Sin embargo, hasta ahora, la detección de dichas alteraciones moleculares está limitada por dos aspectos fundamentales: la ausencia de paneles específicos pediátricos comercializados que nos lleva a la utilización de paneles de identificación de alteraciones genéticas relevantes en adultos, y la utilización casi exclusiva de tejido tumoral sólido obtenido mediante cirugía, lo cual dificulta la obtención de muestra en la recaída.

Así pues, en el presente proyecto nos proponemos como objetivo principal la búsqueda de alteraciones genéticas que puedan ser utilizadas como dianas terapéuticas o informar de la sensibilidad a tratamientos concretos en pacientes pediátricos tras recidiva o metástasis. Con este fin, se utilizarán las alternativas actualmente en el mercado, para la identificación de alteraciones genéticas. Sin embargo, como objetivo secundario, avanzaremos en el diseño y validación de un panel de identificación de alteraciones genéticas relevantes en tumores sólidos pediátricos, tanto a partir de biopsias de tejido sólido como de biopsias líquidas, utilizando para ello la mejor técnica disponible para cada alteración genética en términos de sensibilidad, especificidad y coste/efectividad. Los resultados permitirán disponer de una herramienta de gran utilidad para ayudar en la elección del tratamiento más adecuado para cada tumor y en cada momento de la enfermedad.

## 2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer es la segunda causa de muerte en niños mayores de un año, superada sólo por los accidentes. Cada año se diagnostican entre 12 y 14 casos de cáncer por cada 100.000 niños menores de 15 años. La leucemia es el más frecuente de los cánceres pediátricos, seguidos por los tumores del SNC(TSNC), linfomas, neuroblastomas (NBL), sarcoma de partes blandas (SPB), tumores de Wilms (TW), tumor de células germinales (TCG), tumores óseos (osteosarcoma y tumor de Ewing) y retinoblastoma.

La incidencia y las cifras de mortalidad en el cáncer infantil varían con la edad. En los últimos años ha tenido lugar un avance significativo en los resultados obtenidos en el tratamiento del cáncer infantil, y actualmente el porcentaje de curación se ha incrementado a cerca de un 75%. Sin embargo, estos porcentajes no afectan a todos los tipos de tumores por igual, sino que se debe sobre todo a la mejora de los tratamientos de tumores hematológicos. Por ejemplo, la leucemia aguda linfoblástica, que es la variedad más frecuente de Leucemia en la infancia, tiene una supervivencia a largo plazo que supera el 80%. Por el contrario, en el caso de los tumores sólidos y, principalmente en aquellos que aparecen con mayor frecuencia, como los que afectan al sistema nervioso central, osteosarcoma, etc. los resultados de supervivencia son todavía muy pobres, a pesar de las mejoras significativas en los tratamientos de cirugía, radioterapia y quimioterapia.

En este sentido, en los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio e identificación de alteraciones genéticas relacionadas con la biología de los diferentes tumores pediátricos. La detección de dichas alteraciones está permitiendo mejoras importantes en el diagnóstico, pronóstico y diseño de nuevos tratamientos más eficaces y eficientes. Esta aproximación, más personalizada, en el manejo clínico de tumores del adulto, ha supuesto el desarrollo y validación de un número importante de kits comerciales destinados a la identificación de alteraciones de genes individuales o de grupos de genes o paneles. La utilización de fármacos en base al perfil molecular a incrementado la supervivencia libre de enfermedad en pacientes adultos con tumores sólidos refractáneos (3). Estos paneles de genes actualmente en el mercado, son muy útiles para identificar algunas alteraciones genéticas en oncología pediátrica, sin embargo, están basados en el amplio conocimiento de la biología molecular de tumores adultos, y en la mayoría de los casos las alteraciones moleculares encontradas en tumores adultos no se correlacionan con los tumores pediátricos, en los que la frecuencia de alteraciones moleculares es más baja, así como la disponibilidad de fármacos dirigidos a dichas alteraciones (3).

Distinguimos dos poblaciones de niños, aquellos con, tumores que afectan al sistema nervioso central (SNC) que son los tumores más frecuentes en la edad pediátrica, y que representan la causa más común de morbimortalidad asociada al cáncer en este grupo de edad (4). Y un segundo grupo con tumores sólidos extra-cerebrales para los cuales no hay un tratamiento convencional por encontrarse en situación de recidiva o refractariedad al tratamiento.

En términos generales, el tratamiento convencional hasta el momento de los tumores cerebrales incluye inicialmente la cirugía, siendo el grado de resecabilidad el principal factor pronóstico en la mayoría de los casos. Además se utilizan terapias adyuvantes como la quimioterapia y radioterapia, en diferentes combinaciones, según la histología tumoral y la edad del niño. Sin embargo, el abordaje neuroquirúrgico se encuentra limitado por la localización anatómica. En algunos casos como en el glioma difuso de protuberancia (DIPG), el tumor es irresecable desde el diagnóstico, mientras que en otros puede existir un elevado riesgo de secuelas neurológicas en un intento de resección completa, como es el caso de tumores de tronco, de la vía óptica y aquellos que afectan a estructuras de línea media como los diencefálicos. Además, existen otras patologías de naturaleza proliferativa que pueden tener afectación exclusiva del SNC, con elevado riesgo de abordaje neuroquirúrgico en la infancia, como las histiocitosis de células de Langerhans con afectación del tallo hipofisario o el xantogranulomas Juvenil cerebral. En este sentido, la identificación de alteraciones moleculares se realiza únicamente sobre la primera biopsia, en caso de ser resecable o biopsiable, Así pues, en los casos de tumores irresecables del SNC es esencial poder disponer de herramientas, alternativas al tejido tumoral, que permitan el acceso a la información genética del tumor desde el momento del diagnóstico.

En el caso de los tumores sólidos pediátricos extra-cerebrales, el enfoque del proyecto de investigación se centra en aquellos casos en los que una cirugía en la recidiva supone un riesgo vital para el niño por lo que ésta se limita a la obtención de una biopsia y en su caso, de una biopsia líquida. El interés de obtener una muestra de tejido/ADN tumor está en buscar alteraciones moleculares para las que exista un fármaco determinado.

La búsqueda de estas alteraciones no solo se basará en la utilización de paneles existentes en el mercado sino en la actualización constante de las que se van describiendo en la literatura tanto en tumores pediátricos como en los del adulto. Además se realizarán estudios específicos dirigidos a cada tumor en concreto de acuerdo a las publicaciones sobre alteraciones moleculares en dicho tumor, siempre desde la óptica de una aplicación clínica, es decir, de búsqueda de un posible tratamiento.

Por lo tanto, en el presente proyecto nos proponemos el diseño y validación de un panel dinámico para la identificación de alteraciones genéticas relevantes en tumores sólidos pediátricos que no se limite a la búsqueda en tejido tumoral sólido o a un abordaje tecnológico único. Si no que utilice la mejor técnica disponible en términos de sensibilidad, especificidad y coste/efectividad para cada alteración genética, utilizando como fuente tanto tejido tumoral como biopsias líquidas en los casos de tumores irresecables o de difícil acceso. Los resultados permitirán disponer de una herramienta de gran utilidad para ayudar en la elección del tratamiento más adecuado para cada tumor y en cada momento de la enfermedad.

### 3. BIBLIOGRAFÍA

1. R. Peris, B. Giner. Epidemiología del cáncer en la infancia. L. Madero, A. Muñoz (Eds.), Hematología y oncología pediátricas (2da), Ergon, Madrid (2005), pp. 227-239.
2. Harris MH1, DuBois SG, Glade Bender JL, Kim A, Crompton BD, Parker E, Dumont IP, Hong AL, Guo D, Church A, Stegmaier K, Roberts CW6, Shusterman S, London WB, MacConaill LE, Lindeman N, Diller L, Rodriguez-Galindo C, Janeway KA6. Multicenter Feasibility Study of Tumor Molecular Profiling to Inform Therapeutic Decisions in Advanced Pediatric Solid Tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) Study. JAMA Oncol. 2016 Jan 28. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5689.
3. Federica Saletta, Carol Wadham, David S.Ziegler, Glenn M.Marshall, Michelle Haber, Geoffrey McCowage, Murray D.Norris, and Jennifer A.Byrneae. Molecular profiling of childhood cancer: Biomarkers and novel therapies. BBA Clinical 1: 59-77
4. N.J. Thorp, R.E. Taylor. Management of Central Nervous System Tumours in Children. Clinical Oncology 26 (2014) 438-445.

## 4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los conocimientos acumulados en los últimos años sobre la biología molecular de los tumores adultos y pediátricos ponen de manifiesto la diferencia en cuanto a frecuencia y tipo de alteraciones entre ambos grupos. Sin embargo, las diferentes opciones disponibles en el mercado para identificar alteraciones moleculares en pacientes con cáncer están basadas en los conocimientos obtenidos a partir de estudios en pacientes adultos, lo que reduce significativamente su utilidad en el manejo clínico de pacientes pediátricos. Así pues, el diseño de un panel para la identificación de alteraciones genéticas basado en los conocimientos disponibles sobre la biología molecular de tumores pediátricos, y validado tanto en tejido tumoral como en biopsias líquidas permitiría aumentar la utilidad de la identificación de biomarcadores moleculares en el manejo clínico de pacientes pediátricos con tumores sólidos refractarios al tratamiento convencional, o incurables desde el momento del diagnóstico

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

La búsqueda de alteraciones genéticas que puedan ser utilizadas como dianas terapéuticas, en pacientes pediátricos con tumores incurables al diagnóstico o tras recidiva o metástasis.

### Objetivos específicos

**Objetivo 1:** Identificación de todas las alteraciones moleculares descritas en la bibliografía en relación con tumores sólidos pediátricos y selección de aquellas relevantes exclusivamente para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de dichos pacientes.

**Objetivo 2:** Análisis de disponibilidad de ensayar las alteraciones moleculares identificadas en el objetivo 1 mediante aproximaciones comerciales; estudiando de forma comparativa, la posibilidad de utilizar tejido sólido o biopsia líquida, sensibilidad, especificidad, tiempos de respuesta.

**Objetivo 3:** Para las alteraciones moleculares identificadas en el objetivo 1 que, o bien no existan aproximaciones comerciales, o bien la sensibilidad, especificidad, tiempo de respuesta o coste del ensayo sean claramente mejorables, se buscarán alternativas técnicas para la identificación de las mismas:

3.1. Diseño de primers y sondas específicas para la detección de las alteraciones genéticas identificadas mediante técnicas de PCR y/o NGS.

3.2. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de las herramientas moleculares diseñadas en el objetivo 3.1 mediante la utilización de muestras de ADN control y ADN mutado. Evaluación de las herramientas moleculares en una

cohorte piloto de muestras de ADN, de tejido tumoral y de biopsia líquida, de pacientes pediátricos.

3.3. Validación de las herramientas moleculares diseñadas en una cohorte de validación de ADN, de tejido tumoral y de biopsia líquida, de pacientes pediátricos.

## 6. Metodología de la Investigación

En primer lugar se llevará a cabo una búsqueda exhaustiva de toda la bibliografía relacionada con la identificación de alteraciones moleculares a partir de muestras de tejido tumoral de tumores pediátricos. A partir de dicha bibliografía se elaborará un listado con todas aquellas alteraciones con valor diagnóstico, pronóstico o terapéutico (**Objetivo 1**). A continuación se realizará un estudio de todas las aproximaciones comerciales para la identificación de alteraciones moleculares utilizando como fuente tanto tejido sólido tumoral como biopsia líquida. Después, se realizará un análisis comparativo entre las diferentes aproximaciones centrándose en la presencia o ausencia de las alteraciones encontradas en el objetivo 1, sensibilidad y especificidad de la técnica, así como, el coste y los tiempos de respuesta (Objetivo 2). Para los casos en los que no existan ensayos comerciales o que se decida encontrar aproximaciones tecnológicas alternativas, se diseñarán herramientas moleculares específicas basadas en PCR y/o NGS (**Objetivo 3**). Con objeto de evaluar la sensibilidad y especificidad de las sondas diseñadas, se utilizará una cohorte de muestras de DNA con perfil molecular conocido y que contengan al menos alguna de las alteraciones moleculares seleccionadas, de manera que todas estén representadas en dicha cohorte. Por otro lado se evaluará la sensibilidad y especificidad de las sondas diseñadas en otra cohorte de ADN procedente de sangre periférica, para aquellos casos en los que esta fuente alternativa de alteraciones genéticas sea una posibilidad. En este último caso, la identificación de marcadores a partir de DNA de biopsias líquidas tiene que salvar 2 grandes inconvenientes: el primero es la cantidad total tanto de DNA circulante obtenido de un mismo paciente, la cual es relativamente baja (desde picogramos and varios nanogramos), lo que requiere de técnicas que permitan amplificar fragmentos de DNA a partir de cantidades muy bajas de muestra. El segundo es la cantidad relativa de la forma mutada con respecto a la forma normal dentro del total del compartimento de DNA circulante; en algunos casos esta cantidad relativa es extraordinariamente baja. Con objeto de resolver las dificultades mencionadas, utilizaremos tanto técnicas de PCR como técnicas de NGS. Una vez evaluadas la sensibilidad y especificidad de las herramientas moleculares en cohortes piloto de muestras de ADN de tejido tumoral y de biopsias líquidas, se validará en una cohorte prospectiva de validación.



## **7. PLAN DE TRABAJO Y DISTRIBUCIÓN DE TAREAS**

El grupo de investigación está formado por investigadores clínicos y básicos dirigidos por la Dra. Blanca López-Ibor Aliño. Los investigadores clínicos del proyecto se encargarán de la selección, recogida y entrega de las muestras, así como de recopilar, organizar y analizar los datos clínicos. La cohorte de pacientes estará coordinada por La Dra. Blanca López-Ibor Aliño, con una larga trayectoria en el manejo clínico de pacientes pediátricos oncológicos, incluidos pacientes diagnosticados con DIPG, la Dra. Marta Villa Alcázar, la Dra. Isabel Martínez Romera y la Lcda. en Medicina y Cirugía Pilar Areal Hidalgo, trabajarán en la identificación y selección de las alteraciones moleculares relacionadas con tumores sólidos pediátricos y la obtención de biopsias líquidas. La recogida de muestras tendrá lugar a lo largo de todo el proyecto, empezando desde la aprobación del CEIM. Además, el equipo de investigadores clínicos lo complementan la Dra. Sara García Duque, encargada de la selección de muestras de tejido sólido, en los casos en que puedan ser candidatos a cirugía o extracciones post-mortem, y La Dra. Esther de Luis que llevará a cabo el estudio de RMN de los pacientes con tumores cerebrales y el Dr Angel Lancharro en los pacientes con tumores sólidos extracraneales. El equipo de investigadores básicos está formado por el Dr. Ángel Ayuso Sacido, que dirigirá los trabajos de diseño y validación de herramientas moleculares y aislamiento de DNA a partir de tejido tumoral y biopsias líquidas, en colaboración con la Dra. Noemi García Romero y la Técnico en Anatomía Patológica Josefa Carrión Navarro; todos con amplia experiencia en el manejo de muestras sólidas y líquidas de tumores sólidos. En conjunto, constituimos un equipo con garantías para desarrollar el presente proyecto.

### **Investigadores**

Blanca López Ibor, MD., PhD. (Oncología Pediátrica)  
Ángel Ayuso Sacido, PhD, (Biología Celular y Molecular)  
Pilar Areal Hidalgo, MD. (Oncología Pediátrica)  
Isabel Martínez Romera, MD., PhD., (Oncología Pediátrica)  
Marta Villa Alcázar, MD., PhD., (Oncología Pediátrica)  
Sara García Duque, MD. (Neurocirugía)  
Esther de Luis, MD. (Neuroradiólogo)  
Ángel Lancharro, MD. (Radiólogo Pediátrico)  
Noemi García Romero, PhD (Biotecnóloga)  
Josefa Carrión Navarro FPII. (Anatomía Patológica)