



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

PLATAFORMA PARA EL DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE CLASIFICADORES MOLECULARES PARA EL CÁNCER PEDIÁTRICO

Dra. Cinzia Lavarino

Hospital Sant Joan de Déu - FSJD Fundació per a la Recerca i la Docència Sant Joan de Déu

Dr. Alexandre Perera Lluna

CREB Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica - UPC Universitat Politècnica de Catalunya

1. Objetivo

El objetivo del proyecto PECA (Plataforma de Clasificadores Epigenéticos para el Cáncer Infantil) es abordar la creciente necesidad clínica de trasladar de forma más eficiente los avances en investigación e innovación a los pacientes con cáncer pediátrico, generando herramientas de ayuda para la toma de decisiones clínicas, con el fin de individualizar la estrategia terapéutica de los pacientes en función de las características (epi)genéticas del tumor.

Con el avance en el conocimiento de la biología de los tumores pediátricos, se van definiendo las características genéticas que desempeñan un papel relevante en el comportamiento clínico de estos tumores. Estudios de transcripción y perfiles genómicos de metilación han mostrado que los tumores pediátricos son heterogéneos (epi)genéticamente, con características definidas y diferentes del cáncer en adultos. Un ejemplo paradigmático es la clasificación del meduloblastoma, el tumor cerebral maligno más frecuente en la edad pediátrica. Estudios genómicos recientes han identificado cuatro subgrupos principales de meduloblastoma, que se caracterizan por perfiles epigenéticos y genéticos distintos, así como por cursos clínicos diferentes. Estos subgrupos de meduloblastoma son cada vez más relevantes para el tratamiento de los pacientes, ya que proporcionan información clave para definir la estrategia terapéutica. La asignación de los tumores a estos subgrupos moleculares es relevante, pero compleja de llevar a cabo. Se necesitan tecnologías genómicas, que inevitablemente aumentan el coste y la complejidad, y requieren de personal formado, equipos y recursos. Por ello, muchos centros que tratan a pacientes con tumores cerebrales siguen sin poder clasificar el meduloblastoma en las principales categorías moleculares de consenso (WNT, SHH y no-WNT/no-SHH) incluidas actualmente en la clasificación de la OMS de tumores del SNC 2021. En consecuencia, un número significativo de pacientes no puede beneficiarse de los avances clínicos asociados a la clasificación del meduloblastoma.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado recientemente un clasificador epigenético basado en el perfil de metilación de seis citosinas que permite clasificar el meduloblastoma en los subgrupos clínicamente relevantes de WNT, SHH y no-WNT/no-SHH, con una precisión (99%) equivalente a los métodos basados en perfiles genómicos de metilación de ADN y de perfiles expresión génica (Gómez, Soledad et al.

"A Novel Method for Rapid Molecular Subgrouping of Medulloblastoma." *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 24,6 (2018): 1355-1363. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2243). El clasificador de seis citosinas representa un enfoque simplificado para la clasificación precisa, rápida y asequible de muestras individuales de ADN de meduloblastoma. El objetivo de este proyecto era proporcionar herramientas (Clasificadores y Plataforma Digital) y nuevos enfoques técnicos para facilitar la aplicación de nuestro clasificador epigenético a la práctica clínica, permitiendo a los centros clasificar con precisión a los pacientes con meduloblastoma. Utilizando la experiencia que adquirimos con el meduloblastoma, también pretendíamos desarrollar clasificadores moleculares robustos para otros tumores pediátricos con una necesidad clínica de clasificación de la enfermedad.

2. Resultados

Epigenetic Genotyping Application (EpiGe-App)

En el presente proyecto, hemos desarrollado un sistema de apoyo a la toma de decisiones (DSS) para permitir una clasificación precisa de los tumores de meduloblastoma en los subgrupos moleculares WNT, SHH o no-WNT/no-SHH, utilizando una metodología clínicamente aplicable basada en PCR cuantitativa (qPCR). El DSS se desarrolló utilizando nuestro clasificador epigenético basado en el perfil de metilación de seis citosinas, desarrollado previamente por nuestro grupo (Gómez, Soledad et al. "A Novel Method for Rapid Molecular Subgrouping of Medulloblastoma." *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 24,6 (2018): 1355-1363. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2243). Para incrementar la aplicabilidad del sistema, desarrollamos una aplicación web interactiva e intuitiva (EpiGe-App - <https://www.epige.irsjd.org/>) que permite la interpretación automatizada de los datos de metilación qPCR, la determinación del estado de metilación de las citosinas, la predicción del subgrupo molecular y la obtención de un informe con la clasificación del meduloblastoma. Para el estudio, se analizaron 4.740 muestras que comprendían datos de microarrays de metilación del ADN (3.096 tumores de meduloblastoma, 1.613 tumores no meduloblastoma y 31 tejidos normales), y 65 datos de qPCR de tumores (55 muestras de meduloblastoma y 10 de no meduloblastoma) y muestras de sangre (6 individuos sanos). El estudio se ha

publicado en iScience Cell press (Gómez-González, Soledad et al. "EpiGe: A machine-learning strategy for rapid classification of medulloblastoma using PCR-based methylgenotyping." iScience vol. 26,9 107598. 12 Aug. 2023, doi:10.1016/j.isci.2023.107598).

Nuevos enfoques para el análisis del Clasificador Epigenético

Nuestro objetivo era analizar nuestro panel de marcadores epigenéticos en biopsia líquida. Para ello, hemos recogido más de 200 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y 75 de plasma/suero obtenidas de 62 pacientes con un tumor de meduloblastoma. Los tumores primarios de los pacientes habían sido previamente clasificados por nuestro grupo utilizando los arrays Illumina Infinium HumanMethylation 450 BeadChip o Illumina Methylation EPIC BeadChip, así como nuestro panel de seis marcadores epigenéticos (Gómez, Soledad et al. "A Novel Method for Rapid Molecular Subgrouping of Medulloblastoma." Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research vol. 24,6 (2018): 1355-1363. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2243). Hemos diseñado sondas específicas para permitir discriminar entre una citosina (metilado) y timina (no metilado) en ADN tumoral circulante mediante tecnología de PCR Digital. Trabajo en curso: Análisis de la especificidad/sensibilidad de las sondas de PCR digital para la detección de cambios de metilación.

Desarrollo de nuevos clasificadores epigenéticos

Nuestra estrategia de clasificación del meduloblastoma puede resultar útil también en el contexto de otros tumores pediátricos. Actualmente estamos utilizando el protocolo de trabajo desarrollado para el meduloblastoma para desarrollar un enfoque similar para la clasificación del ependimoma, un tumor pediátrico de sistema nervioso central. Nuestros resultados preliminares muestran que somos capaces de clasificar 9 de los 10 subgrupos moleculares descritos para el ependimoma utilizando un conjunto reducido de citosinas con patrones de metilación diferencial específicos para cada subgrupo. El décimo subgrupo molecular es un subgrupo agresivo y minoritario de ependimoma. Los datos de metilación de este subgrupo son escasos. Recientemente hemos establecido una colaboración con el grupo de investigación que ha descrito recientemente este subgrupo de tumores (Ghasemi, David R et al. "MYCN amplification drives an aggressive form of spinal ependymoma." Acta neuropathologica vol. 138,6 (2019): 1075-1089. doi:10.1007/s00401-019-02056-2). Esto nos ha permitido ampliar el conjunto de datos

de nuestra cohorte de ependimomas. El análisis de los datos de metilación está actualmente en curso, con el objetivo de identificar posibles marcadores epigenéticos específicos que permitan clasificar de forma precisa cada subgrupo. Hemos generado dos modelos predictivos, basados en *Gradient Boosting Classifier*, una técnica de aprendizaje automático basada en árboles de decisión con gradiente reforzado distribuido y escalable. La estrategia de validación cruzada (CV) que se ha realizado ha sido una triple CV de 5 repeticiones durante el entrenamiento del modelo con el 75% de las muestras, y se ha probado con el 25% restante de las muestras. El conjunto de marcadores epigenéticos está siendo validado en una cohorte de muestras independientes de ependimoma. Nuestro próximo objetivo es desarrollar un DSS que permita una clasificación precisa utilizando una metodología basada en qPCR. El DSS se integrará en la Plataforma de Clasificación EpiGe-App (<https://www.epige.irsjd.org/>) para el análisis automatizado y la clasificación de estos tumores. Los resultados del estudio se publicarán en un artículo científico y se considerará la posibilidad de una patente.

3. Impacto en la salud

Este proyecto ha contribuido a desarrollar una herramienta de apoyo a la toma de decisiones clínicas en el contexto del cáncer pediátrico. Los avances logrados han sido trasladados rápidamente a la clínica para apoyar las decisiones clínicas, con el fin de individualizar la terapia de los pacientes en función de las características genéticas del tumor y ofrecer terapias dirigidas más eficaces y con menos toxicidad. La Plataforma PECA ha permitido desarrollar una web-app (EpiGe-App - <https://www.epige.irsjd.org/>), mediante la cual todos los centros que disponen de tecnología qPCR pueden clasificar sus muestras tumorales de una manera robusta, rápida, fácil de usar y asequible. El protocolo de trabajo desarrollado en este proyecto puede aplicarse a otros tumores, incluidos tumores no pediátricos, a diferentes datos (epi)-genéticos y puede emplearse para múltiples biomarcadores. El conocimiento adquirido en este proyecto facilitará el desarrollo de otras herramientas/plataformas/servicios que puedan mejorar la calidad y sostenibilidad de los sistemas sanitarios, a través de decisiones clínicas más precisas, rápidas, con reducción de retrasos y costes asociados. Este proyecto multifacético que incluye análisis computacionales integrados y validación experimental ha contribuido a mejorar la comprensión de la patogénesis molecular del meduloblastoma y, potencialmente, de otros cánceres pediátricos.

4. Publicaciones

Gómez-González, Soledad et al. "EpiGe: A machine-learning strategy for rapid classification of medulloblastoma using PCR-based methyl-genotyping." *iScience* vol. 26,9 107598. 12 Aug. 2023, doi:10.1016/j.isci.2023.107598

Gene-Olaciregui, Nagore et al. "Clinical and Molecular Evolution of an ALK-Driven Infant-Type Hemispheric Glioma Treated Sequentially With Second- and Third-Generation Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors." *JCO precision oncology* vol. 7 (2023): e2200547. doi:10.1200/PO.22.00547

Esperanza-Cebollada, Elena et al. "A miRNA signature related to stemness identifies high-risk patients in paediatric acute myeloid leukaemia." *British journal of haematology* vol. 202,1 (2023): 96-110. doi:10.1111/bjh.18746

En revision interna: "EpiGe-App: A web-based tool for the automated classification of medulloblastoma subgroups directly from quantitative PCR experiments"