



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

PLATAFORMA PER AL DESENVOLUPAMENT I IMPLEMENTACIÓ DE CLASSIFICADORS MOLECULARS PER AL CÀNCER PEDIÀTRIC

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. Objectiu

L'objectiu del projecte PECA (Plataforma de Classificadors Epigenètics per al Càncer Infantil) és abordar la necessitat clínica creixent de traslladar de forma més eficient els avenços en recerca i innovació als pacients amb càncer pediàtric, generant eines d'ajuda per a la presa de decisions clíniques, per tal d'individualitzar l'estratègia terapèutica dels pacients en funció de les característiques (epi)genètiques del tumor. Amb l'avenç en el coneixement de la biologia dels tumors pediàtrics, es defineixen les característiques genètiques que tenen un paper rellevant en el comportament clínic d'aquests tumors. Els estudis de transcripció i de perfils genòmics de metilació han mostrat que els tumors pediàtrics són heterogenis (epi)genèticament, amb característiques definides i diferents del càncer dels adults. Un exemple paradigmàtic és la classificació del medul·loblastoma, el tumor cerebral maligne més freqüent en l'edat pediàtrica. Estudis genòmics recents han identificat quatre subgrups principals de medul·loblastoma, que es caracteritzen per perfils epigenètics i genètics diferents, així com per diferent l'evolució clínica. Aquests subgrups de medul·loblastoma són cada cop més rellevants pel tractament dels pacients, ja que proporcionen informació clau per definir l'estratègia terapèutica. L'assignació dels tumors a aquests subgrups moleculars és rellevant però complexa de dur a terme. Calen tecnologies genòmiques, que inevitablement augmenten el cost i la complexitat, i requereixen de personal format, equips i recursos. Per això, molts centres que tracten pacients amb tumors cerebrals segueixen sense poder classificar el medul·loblastoma en les principals categories moleculars de consens (WNT, SHH i no-WNT/no-SHH) incloses actualment a la classificació de l'OMS de tumors del SNC 2021. En conseqüència, un nombre significatiu de pacients no es poden beneficiar dels avenços clínics associats a la classificació del medul·loblastoma.

El nostre grup de recerca ha desenvolupat recentment un classificador epigenètic basat en el perfil de metilació de sis citosines que permet classificar el medul·loblastoma en els subgrups clínicament rellevants de WNT, SHH i no-WNT/no-SHH, amb una precisió (99%) equivalent als mètodes basats en perfils genòmics de metilació d'ADN i de perfils expressió gènica (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 classificador de sis citosines representa un

enfocament simplificat per a la classificació precisa, ràpida i assequible de mostres individuals d'ADN de medul·loblastoma.

L'objectiu d'aquest projecte era proporcionar eines (Classificadors i Plataforma Digital) i nous enfocaments tècnics per facilitar l'aplicació del nostre classificador epigenètic a la pràctica clínica, permetent als centres, classificar amb precisió els pacients amb medul·loblastoma. Utilitzant el coneixement adquirit amb el medul·loblastoma, també preteníem desenvolupar altres classificadors moleculars robusts per a diferents tumors pediàtrics amb una necessitat clínica de classificació de la malaltia.

2. Resultats

Epigenetic Genotyping Application (EpiGe-App)

En aquest projecte, hem desenvolupat un sistema de suport a la presa de decisions (DSS) per permetre una classificació precisa dels tumors de medul·loblastoma en els subgrups moleculars WNT, SHH o no-WNT/no-SHH, utilitzant una metodologia clínicament aplicable basada en PCR quantitativa (qPCR). El DSS es va desenvolupar utilitzant el nostre classificador epigenètic basat en el perfil de metilació de sis citosines, desenvolupat prèviament pel nostre grup (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). Per incrementar l'aplicabilitat del sistema, vàrem desenvolupar una aplicació web interactiva e intuïtiva (EpiGe-App - <https://www.epige.irsjd.org/>) que permet la interpretació automatitzada de les dades de metilació per qPCR, la determinació de l'estat de metilació de les citosines, la predicció del subgrup molecular i l'obtenció d'un informe amb la classificació del medul·loblastoma. Per a l'estudi, es van analitzar 4.740 mostres que comprenien dades de microarrays de metilació de l'ADN (3.096 tumors de medul·loblastoma, 1.613 tumors no medul·loblastoma i 31 teixits normals), dades de 65 qPCR de tumors (55 mostres de medul·loblastoma i 10 no-medul·loblastoma) i mostres de sang (6 individus sans). L'estudi s'ha publicat a *iScience Cell press* (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).

Nous enfocaments per a l'anàlisi del classificador epigenètic

El nostre objectiu era analitzar el nostre panell de marcadors epigenètics en biòpsia líquida. Per fer-ho, vam recollir més de 200 mostres de líquid cefaloraquídi (LCR) i 75 de plasma/sèrum obtingudes de 62 pacients amb un tumor de medul·loblastoma. Els tumors primaris dels pacients havien estat prèviament classificats pel nostre grup utilitzant els arrays Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip o Illumina Methylation EPIC BeadChip, així com per el nostre panell de sis marcadors epigenètics (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). Hem dissenyat sondes específiques per permetre discriminar entre una citosina (metilat) i timina (no metilat) en ADN tumoral circulant mitjançant tecnologia de PCR Digital. Treball en curs: Anàlisi de l'especificitat/sensibilitat de les sondes de PCR digital per a la detecció de canvis de metilació.

Desenvolupament de nous classificadors epigenètics

La nostra estratègia de classificació del medul·loblastoma pot ser útil també en el context d'altres tumors pediàtrics. Actualment estem utilitzant el protocol de treball desenvolupat pel medul·loblastoma per efectuar un enfocament similar per a la classificació de l'ependimoma, un tumor pediàtric de sistema nerviós central. Els nostres resultats preliminars mostren que som capaços de classificar 9 dels 10 subgrups moleculars descrits per a l'ependimoma utilitzant un conjunt reduït de citosines amb patrons de metilació diferencial específics per a cada subgrup. El desè subgrup molecular és un subgrup de tumors agressiu i minoritari d'ependimoma pel que les seves dades de metilació són escasses. Recentment hem establert una col·laboració amb el grup de recerca que ha descrit recentment aquest subgrup de tumors (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). Això ens ha permès ampliar el conjunt de dades de la nostra cohort d'ependimomes. L'anàlisi de les dades de metilació està actualment en curs, per tal d'identificar possibles marcadors epigenètics específics que permetin classificar de manera precisa cada subgrup. Hem generat dos models predictius, basats en Gradient Boosting Classifier, una tècnica d'aprenentatge automàtic basada en arbres de decisió amb gradient reforçat distribuït i escalable. L'estratègia de validació creuada (CV) que s'ha realitzat ha estat una triple CV de 5 repeticions durant

l'entrenament del model amb el 75% de les mostres i s'ha provat amb el 25% restant de les mostres. El conjunt de marcadors epigenètics es validarà en una cohort de mostres independents d'ependimoma. El nostre proper objectiu és desenvolupar un DSS que permeti una classificació precisa utilitzant una metodologia basada en qPCR. El DSS s'integrarà a la Plataforma de Classificació EpiGe-App (<https://www.epige.irsjd.org/>) pel anàlisi automatitzat i la classificació d'aquests tumors. Els resultats de l'estudi es publicaran en un article científic i es considerarà la possibilitat d'una patent.

3. Impacte a la salut

Aquest projecte ha contribuït a desenvolupar una eina de suport a la presa de decisions clíniques en el context del càncer pediàtric. Els avenços aconseguits han estat traslladats ràpidament a la clínica per donar suport a les decisions clíniques, per tal d'individualitzar la teràpia dels pacients en funció de les característiques genètiques del seu tumor i oferir teràpies dirigides més específiques i amb menys toxicitat. La Plataforma PECA ha permès desenvolupar una web-app (EpiGe-App - <https://www.epige.irsjd.org/>), mitjançant la qual tots els centres que disposen de tecnologia qPCR poden classificar les mostres tumorals d'una manera robusta, ràpida, fàcil d'utilitzar i assequible. El protocol de treball desenvolupat en aquest projecte es pot aplicar a altres tumors, inclosos tumors no pediàtrics, a diferents dades (epi)genètiques i es pot emprar per a múltiples biomarcadors. El coneixement adquirit en aquest projecte facilitarà el desenvolupament d'altres eines/plataformes/serveis que puguin millorar la qualitat i la sostenibilitat dels sistemes sanitaris, a través de decisions clíniques més precises, ràpides, i amb reducció de costos associats. Aquest projecte multifacètic que inclou el anàlisi computacional integrat i validació experimental ha contribuït a millorar la comprensió de la patogènesi molecular del medul·loblastoma i, potencialment, d'altres càncers pediàtrics.

4. Publicacions

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